



Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
aus der Sektion für Kinderpathologie (Leiter Prof. Dr. I. Leuschner)

**Bestimmung von prognostischen Faktoren bei Klarzellsarkomen  
der Niere des Kindesalters mittels Morphologie, Immunhistochemie  
und komparativer genomischer Hybridisierung**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**INGA KRETSCHMER**  
aus Berlin

Kiel (2012)

1. Berichtersteller: Prof. Dr. I. Leuschner\_\_\_\_\_

2. Berichtersteller: Priv.-Doz. Dr. C. M. Naumann\_\_\_\_\_

Tag der mündlichen Prüfung: 29.08.2012\_\_\_\_\_

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 29.08.2012\_\_\_\_\_

gez.: Prof. Dr. Ch. Röcken\_\_\_\_\_



# Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Glossarium .....                                 |    |
| 1. Einleitung und Zielsetzung.....               | 1  |
| 2. Material und Methoden.....                    | 5  |
| 2.1 Patienten.....                               | 5  |
| 2.2 Tumorgewebe .....                            | 6  |
| 2.3 Arbeitsgeräte und Materialien .....          | 6  |
| 2.4 Entparaffinierung der Schnittpräparate ..... | 9  |
| 2.5 Haematoxylin und Eosin .....                 | 9  |
| 2.6 Immunhistochemie .....                       | 10 |
| 2.7 Comparative Genomische Hybridisierung.....   | 15 |
| 2.8 Statistik .....                              | 21 |
| 3. Ergebnisse.....                               | 21 |
| 3.1 Patientendaten und Tumorstadien .....        | 21 |
| 3.2 Histomorphologie .....                       | 22 |
| 3.3 Immunhistochemie .....                       | 25 |
| 3.3.1 CD34 Expression und Gefäßdichte .....      | 25 |
| 3.3.2 CD10 Expression.....                       | 29 |
| 3.3.3 bFGF Expression.....                       | 34 |
| 3.3.4 p53 Protein Expression .....               | 36 |
| 3.4 Tumorstadien .....                           | 37 |
| 3.5 CGH.....                                     | 37 |

|   |    |
|---|----|
| 4. Diskussion .....                               | 38 |
| 4.1 Einleitung .....                              | 38 |
| 4.2 Histomorphologie .....                        | 39 |
| 4.3 Angiogenese .....                             | 44 |
| 4.4 KZSN mit Hirnmetastasen, p53 Expression ..... | 51 |
| 4.5 Ausblick.....                                 | 52 |
| 5. Zusammenfassung .....                          | 53 |
| 6. Anhang .....                                   | 55 |
| 7. Literaturverzeichnis .....                     | 57 |
| 8. Danksagung .....                               | 65 |
| 9. Lebenslauf .....                               | 66 |

## Glossarium

|            |  |
|------------|--|
| ABC        | Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex Methode   |
| AK         | Antikörper   |
| Aqua dest. | Aqua destilata   |
| bp         | Basenpaare   |
| CD         | Cluster of Differentiation   |
| CGH        | Comparative Genomische Hybridisierung  |
| DAB        | Diaminobenzidin Lösung   |
| EMA        | Epitheliales Membranantigen  |
| EGFR       | Epidermal Growth Factor Receptor   |
| bFGF       | Basic Fibroblast Growth Factor   |
| FISH       | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung   |
| GPOH/SIOP  | Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie/<br>Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique |
| HE         | Hämatoxylin und Eosin Färbung  |
| IGF-2      | Insulin-like Growth Factor-2   |
| IHC        | Immunhistochemie   |
| KZSN       | Klarzellsarkom der Niere   |
| KI         | Konfidenzintervall   |
| M          | Mol  |
| MVD        | Microvaskuläre Dichte  |
| NSE        | Neuronen Spezifische Enolase   |
| NGFR       | Nerv Growth Factor Receptor  |
| NWTSG      | National Wilms Tumor Study Group   |
| NZK        | Nierenzellkarzinom   |
| OD         | Optische Dichte  |
| OT         | Objektträger   |
| p53        | Protein 53   |
| PDGF       | Platelet Derived Growth Factor   |
| SD         | Standardabweichung   |
| upm        | Umdrehungen pro Minute   |
| VEGF       | Vascular Endothelien Growth Factor   |
| VF         | Verdünnungsfaktor  |

## 1. Einleitung und Zielsetzung

Das Klarzellsarkom der Niere (KZSN) ist ein seltener und hochmaligner Nierentumor bei Kindern. Es zählt mit 30 % zu den am häufigsten fehldiagnostizierten Tumoren der Niere (Cutcliffe et al. 2005; Perlman 2005) und zeigt trotz moderner interdisziplinärer Behandlung eine relativ schlechte Prognose (Green et al. 1994). Anfang der 70er Jahre wurde das KZSN erstmals in seiner klinisch und histopathologischen Erscheinung von Kidd beschrieben (Kidd 1970). Auffällig zeigte sich die Neigung des Tumors in Knochengewebe zu metastasieren. Damals zählte das KZSN zur Gruppe der sarkomatoid wachsenden Wilms Tumoren und galt als ein Tumor vom Klarzelltyp. In den darauffolgenden Jahren wurde das KZSN von unabhängigen Arbeitsgruppen untersucht und die Abgrenzung des KZSN vom Wilms Tumor bestätigt. Das aggressive Wachstumsverhalten, der hohe Vaskularisierungsgrad sowie das Fehlen typischer Oberflächenmarker wurden zu ausgesprochenen Charakteristika für das KZSN (Beckwith et al. 1978; Morgan et al. 1978). Mit einer Inzidenz von ca. 0,006 (20 Neuerkrankungen in den USA pro Jahr) repräsentiert das KZSN, mit anteilig 4 %, den zweithäufigsten malignen Nierentumor im Kindesalter (Balarezo et al. 2001; Perlman 2005; van den Heuvel-Eibrink et al. 2008) (s. Anhang S. 53, Tab.19). Bei Diagnosestellung liegt das durchschnittliche Lebensalter der Patienten zwischen 30 und 36 Monaten und die Tumorausbreitung zeigt sich überwiegend im Stadium II und III (s. Anhang S.53, Tab.21). Das männliche Geschlecht ist im Verhältnis 2:1 deutlich häufiger betroffen, als das Weibliche (Argani et al. 2000).

In Europa werden Kinder mit Nierentumoren im Rahmen von Studien der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH)/ Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique (SIOP) betreut. Im Alter von über sechs Monaten und unter 16 Jahren erhalten sie bei der Diagnose eines malignen Nierentumors eine praeoperative Chemotherapie zur Tumormassereduktion vor der

eigentlichen Tumorresektion, gefolgt von einer postoperativen, stadiengerechten Chemotherapie, die für den jeweiligen Malignitätsgrad vorgesehen ist. In einigen Fällen erfolgt zusätzlich eine Strahlentherapie. Amerikanische Therapieprotokolle der National Wilms Tumor Study Group (NWTSG) sehen im Gegensatz zu europäischen Therapieregimes für maligne Nierentumoren im Kindesalter keine praeoperative Chemotherapie vor. Die seit 1986 mit dem Wirkstoff Doxorubizin erweiterte Multichemotherapie, führte zu einer deutlichen Verbesserung der Langzeitüberlebens- und Rezidivraten (Green et al. 1994). Heute werden 5-Jahres-Gesamtüberlebensraten von über 80 % erreicht (Seibel et al. 2004). Dennoch entwickeln 20 % der Betroffenen auch nach über drei Jahren rezidivfreier Zeit noch Fernmetastasen. Besonders häufig sind osseäre und zerebrale Rezidive, Lungenmetastasen sowie lokoregionäre/retroperitoneale und hepatische Absiedlungen (Ahmed et al. 2007; Argani et al. 2000; Radulescu et al. 2008). Die Auswertung amerikanischer Studien ergab, dass bei 5 - 29 % der Fälle schon bei Diagnosestellung eine hiläre Lymphknotenmetastasierung der Niere vorliegt (Argani et al. 2000; Sebire et al. 2009).

### Morphologie

Klinisch präsentiert sich das KZSN als eine im Abdomen liegende Raumforderung von durchschnittlich 11,3 cm. Das Tumorwachstum ist typischerweise unilateral und vom Zentrum der Niere ausgehend (Charles et al. 1998). Makroskopisch findet sich eine glatte Tumoroberfläche und eine mukoide Schnittfläche mit fokaler Tumornekrose sowie marginal zystischen Formationen (Balarezo et al. 2001).

Histologisch zeigt sich das KZSN mit mehr als neun verschiedenen Wachstumsmustern sehr variabel. Hinzu kommt eine charakteristische Vaskularisierung, die sich in Zahl und Anordnung sehr von anderen Nierentumoren unterscheidet. Trotz der glatten Abgrenzung von Tumorgewebe zu gesundem



Nierengewebe, mit unregelmäßiger Ausbildung einer fokalen Tumorkapsel, spiegelt sich das invasive Wachstum von KZSN in der Ummauerung von Reststrukturen gesunden Nierengewebes im Inneren des Tumorgewebes sowie durch zystisch aufgeweitete Nierentubuli im Tumorrandbereich und Infiltration des Nierenhilus wider. Das dominierende und namengebende Wachstum vom klassischen Typ findet sich in unterschiedlicher Ausprägung in über 90 % der Tumoren. Neben den ovoid bis spindelzelligem Tumorzellen des KZSN (engl. cord cells) und der Interzellulärmatrix, zeigt sich eine dritte zelluläre Komponente. Sie durchsetzen das Tumorgewebe in fibrovaskulären Septen ähnlich der Konfiguration eines Maschendrahtzauns (engl. septal cells) (Argani et al. 2000). Die Ausbildung mehrerer und ineinander übergehender Wachstumsmuster erzeugt große histologische Ähnlichkeit mit anderen benignen und malignen Nierentumoren im Kindesalter. Der blastenreiche Wilms Tumor, das mesoblastische Nephrom, primitive neuroektodermale Tumoren oder das Rhabdomyosarkom sind zum Teil schwer vom KZSN abzugrenzen, was bei über einem Drittel der Fälle zu Diagnoseunsicherheiten von Seiten der Pathologen führt (Cutcliffe et al. 2005; Perlman 2005).

#### Molekulare Marker und genetische Mutationen

Der Ursprung von KZSN ist aufgrund mangelnder immunhistochemisch nachweisbarer Oberflächenmarker unklar. Die Vermutung der Tumor könne mesenchymalen Ursprungs sein gründet auf der zuverlässigen Expression des Antigens Vimentin, einem unspezifischen Marker für mesenchymale Zellen. Jedoch könnte auch eine renale Stammzelle als Vorläuferzelle dienen. Dies implizieren erhöhte Werte des insulinähnlichen Wachstumsfaktors-2 (engl. Insulin-like Growth Factor-2, IGF-2) (Schuster et al. 2003). Aus einer Arbeit an fünf KZSN ist bekannt, dass neben Vimentin auch das Oberflächenantigen CD10 von 30-50 % der Tumorzellen in KZSN exprimiert wird (Perlman 2005; Radhakrishnan et al. 2004).

CD10 ist eine neutrale Endopeptidase und gehört zur Gruppe der Typ II integralen Membranglykoproteine. Es spaltet enzymatisch kleine bioaktive Moleküle, wie Enkephaline, blutdruckregulierende Hormone und Proteine vom Typ der  $\beta$ -Amyloide und nimmt so Einfluss auf Zellproliferation und -differenzierung (Nanus 2003). CD10 wurde ursprünglich zur Phänotypisierung von Leukämien eingesetzt (Greaves et al. 1975). Heute ist CD10 ein weit verbreiteter Tumormarker, dient der Charakterisierung von soliden Tumoren und wird insbesondere auf Zellen des Urogenitaltraktes und der Lunge exprimiert (Chu et al. 2000). Als ein weiterer Oberflächenmarker für das KZSN konnte der epidermale Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (engl. Epidermal Nerve Growth Factor Receptor, NGFR) nachgewiesen werden (Cutcliffe et al. 2005).

Eine Assoziation zu genetischen oder familiären Syndromen ist für das KZSN nicht bekannt. Auch die in soliden Tumoren häufig vorkommenden Genmutationen, wie die des Tumorsuppressorgens p53 oder der Zugewinn der Region 1q finden sich in KZSN nur selten und zufällig (Hsueh et al. 2002). Ob genetischen Mutationen überhaupt eine Rolle in der Pathogenese von KZSN zu zuordnen, ist bleibt zu klären (Barnard et al. 2000; Schuster et al. 2003; Sebire et al. 2009).

Die Vaskularisierung ist eine wichtige Voraussetzung für solide Tumoren, um selber Proliferieren und Metastasieren zu können (Zhang, X. et al. 2002). Komplexe Regulationsmechanismen zwischen Gefäßendothelzellen, perivaskulär gelegenen fibroblastenartigen Zellen sowie der umgebenden Extrazellulärmatrix nehmen unter Ausschüttung von Wachstumsfaktoren Einfluss auf das Tumor- und Gefäßwachstum (Carmeliet 2003). Den Wachstumshormonen basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF) und vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. Vascular Endothelial Growth Faktor, VEGF) werden unter anderem großes onkogenetisches Potential zugeschrieben, da sie die Tumor-induzierte Neoangiogenese bewiesen fördern (Zhang, Y. et al. 2004).

### Ziele dieser Arbeit

Mit dem Wissen, dass das KZSN zu einer Gruppe hochmaligner Nierentumoren im Kindesalter zählt und einer aggressiven und nebenwirkungsreichen Therapie bedarf, um Überlebensraten von über 90 % zu erzielen, ist es von besonderer Bedeutung eine präzise und zeitnahe Diagnosestellung zu ermöglichen und prognostische Faktoren zu bestimmen.

Anhand von 66 KZSN wurden in vorliegender Arbeit folgende Punkte untersucht:

1. Histologische Einordnung der Tumoren nach den von Argani et al. und der NWTSG definierten Wachstumsmustern.
2. Beschreibung und Analyse der Expression des Oberflächenantigens CD10.
3. Quantifizierung der Gefäßdichte anhand des Endothelzellmarkers CD34 und Angabe dieser als microvaskuläre Dichte in MVD/0,5mm<sup>2</sup>.
4. Nachweis des Wachstumsfaktors bFGF und Analyse von Zusammenhängen mit der MVD und der CD10 Expression.
5. Analyse der p53 Expression.
6. Untersuchung von sechs KZSN mit Hirnmetastasierung auf genetische Veränderungen mit Hilfe der comparativen genomischen Hybridisierung (CGH).

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

In dieser Arbeit wurden 66 Tumoren von Kindern mit einem Klarzellsarkom der Niere aus den Jahren 1982 bis 2005 untersucht, deren Untersuchungsgut im Kindertumorregister der deutschen GPOH in der Sektion für Kinderpathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel vorhanden war.

Patientendaten aus der Zeit vor 1989 wurden im Kinderkrebsregister in Mainz bzw. in Vorläuferstudien dokumentiert. Ab dem Jahr 1989 steht nach Gründung der GPOH und der Dokumentation in Studienprotokollen eine erweiterte Dokumentation der Fälle zur Verfügung.

## **2.2 Tumorgewebe**

Das Gewebe war in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Mit einem Rotationsmikrotom wurden je Paraffinblock 2-3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden im Anschluss auf unbeschichtete SuperFrost® Plus-Adhäsionsobjektträger aufgezogen und ca. 60 min getrocknet. Die Diagnosestellung erfolgte referenzpathologisch an konventionell mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbten Schnittpräparaten. Zudem wurden die Tumoren auf ihre histomorphologischen Merkmale untersucht. In Paraffin eingebettetes Tonsillengewebe und Gewebe eines Mammakarzinoms wurden als Positivkontrollen in der Immunhistochemie verwendet.

## **2.3 Arbeitsgeräte und Materialien**

### Arbeitsgeräte

Brutschrank, Fa. Memmert, Schwabach, Deutschland

CCD-Kamera JAM CGH M300, JAI Corporation, Virginia, USA

Dampfkochtopf, Pascal S2801, Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark

Diamantenschreiber, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland

Fluoreszenzmikroskop, Axioplan 2, Fa. Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Gelelektrophorese-Apparatur, Fa. Bio-Rad, München, Deutschland

Gelelektrophoresekammer, Fa. WMG Biotech, Ebersberg, Deutschland

Heizplatte, Fa. Ikamag RCT, Staufen, Deutschland

Kühlplatte, Fa. Medite, Burgdorf, Deutschland

Laborwaage, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland

Leica Digitalkamera DFC280, Wetzlar, Deutschland

Messzylinder, Fa. Assistent Sondheim, Deutschland

pH-Meter, Fa. WTW, Weilheim, Deutschland

Pipetten, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Rotationsmikrotom RM 2145, Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland

Schüttler, Fa. Edmund Bühler, Tübingen, Deutschland

Standküvetten, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland

Thermocycler, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

UV-Photometer, Fa. Hoefer, San Francisco, USA

UV-Tisch mit Fotodokumentation, Fa. Kaiser, Buchen, Deutschland

Vortex, Fa. Jahnke und Kunkel, Ika-Werke, Staufen, Deutschland

Wasserbad, Fa. Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland

Zentrifuge, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

#### Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen (eckig: 24x60 mm), Fa. Menzel, Braunschweig, Deutschland

Eukitt, Novoglas, Labortechnik Bern, Schweiz

Metaphase-Objektträger, Fa. Vysis, Stuttgart, Deutschland

Pasteur-Pipetten, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Reaktionsgefäße (1,5 ml, 39x10 mm), Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

sterile Pipettenspitzen, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

sterile Falcon-Röhrchen, Fa. Greiner, Nürtingen, Deutschland

SuperFrost®Plus-Objektträger (25x7x1 mm), Fa. Menzel, Braunschweig, Deutschland

#### Chemikalien, Reagentien, Kits und Substrate

Agarose, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Bioprime DNA Labeling System, Invitrogen™, Californien, USA

Blockpuffer, Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark

Cot-1-DNA, Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland  
DAB Substrate Kit for Peroxidase, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA  
DAKO EnVision+™, Peroxidase, Goat/Rabbit, Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark  
DAPI Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, USA  
DNA-Längenstandard Lambda (1kb-DNA-Leiter), Fa. Promega, Deutschland  
EDTA Triplex III, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland  
Eosin G-Lösung C.I. 45380, Certistain® Merck, Darmstadt, Deutschland  
Ethidiumbromid, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland  
Ethanol (70 %, 85 %, 100 %), Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland  
Fixogum, Marabu GmbH, Tamm, Deutschland  
Formamid, deionisiert, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland  
HCL, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland  
KCl, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland  
Ladepuffer Blue-Orange, Fa. Promega, Mannheim, Deutschland  
Master Mix (30 %), Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland  
Mayers Hämalaulösung, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland  
Methanol (100 %), Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland  
Milchpulver, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland  
MiniElute DNA Extraction Kit., Qiagen, Hilden, Deutschland  
Na-Citrat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland  
NaCl, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland  
Normalserum, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland  
Pertex, Fa. Medite, Burgdorf, Deutschland  
Proteinase K, Qiagen, Hilden, Deutschland  
QIAamp DNA Mini Kit, Tissue Protocol, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland  
Random Priming, Invitrogen, Labeling System, Carlsbad, USA  
SpectrumGreen dNTP / -Red dNTP, Abbott, Deutschland

SpectrumGreen Control DNA, Abbott, Deutschland

SSC-Puffer (20fach), Fa. Sigma, München, Deutschland

TRIS-Base und -HCl, Fa. Sigma, München, Deutschland

Tri-Na-Citrat-Dihydrat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Tween20, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Vectastain ABC Peroxidase Kit, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA

Xylol (100%), Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Zitronensäuremonohydrat, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

## **2.4 Entparaffinierung der Schnittpräparate**

Die auf SuperFrost<sup>®</sup>Plus-Adhäsionsobjektträger aufgezogenen 2-3 µm dicken Gewebeschnitte wurden zur Entparaffinierung zweimal für 15 min in Xylol inkubiert. Anschließend wurden die Präparate zur Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe (je zweimal 100 %, 96 %, 70 %) geführt und mit fließend kaltem Wasser und Aqua dest. gespült.

## **2.5 Haematoxylin und Eosin**

Die Untersuchung der histologischen Merkmale (Zelltyp, Zellulärität, Kapselausbildung, Tumornekrose, Gefäßeinbruch, Hilusinfiltration, Wachstumsmuster) erfolgte an HE gefärbte Präparaten. Nach Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte (2.4) folgte eine dreiminütige Behandlung mit Mayers Hämalaunlösung sowie eine kurze Inkubation in einem HCl/Alkohol-Gemisch (400 ml 96 % Alkohol mit 2 ml 2,5 % HCl). Danach folgte ein Waschschrift mit Wasser. Im Anschluss wurden die Präparate für 5 min in Eosin G-Lösung getaucht und durch eine aufsteigender Alkoholreihe bis Xylol (je zweimal 70 %, 96 %, 100 %, Xylol) gezogen. Zuletzt wurden die gefärbten Schnitte mit Eukitt eingedeckelt. Die Präparate wurden bei 10- und 20facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop

beurteilt und mit einer Digitalkamera fotografiert.

## 2.6 Immunhistochemie

Die Schnittpräparate wurden immunhistochemisch mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (AK) untersucht (Tab.1).

| Antikörper      | Klon    | Quelle                                  | Spezies   | Verdünnung  | Vorbehandlung       | Detektion |
|-----------------|---------|---|-----------|-------------|---------------------|-----------|
| Anti-CD10       | 56C6    | Leica, Wetzlar, BRD                     | Maus      | 1:20        | Citratpuffer (pH 6) | EnVision™ |
| Anti-CD34       | QBEND10 | Immunotech, Marseille, F                | Maus      | 1:250       | -                   | ABC       |
| Anti-Podoplanin | D2-40   | Signet, US                              | Maus      | 1:150       | -                   | EnVision™ |
| Anti-CD31       | JC70A   | DAKO, Glostrup, DK                      | Maus      | 1:20        | Citratpuffer (pH 6) | EnVision™ |
| Anti-p53        | Do-1    | Calbiochem, La Jolla, US                | Maus      | 1:20        | Citratpuffer (pH 6) | ABC       |
| Anti-bFGF       | sc-79   | Santa Cruz Biotechnolog, Santa Cruz, US | Kaninchen | 1: 500-2000 | TEC-Puffer (pH 7,8) | ABC       |

**Tabelle 1: Übersicht der Primärantikörper und Färbemethoden in der Immunhistochemie.**

### Vorbehandlung der Schnittpräparate zur Immunfärbung

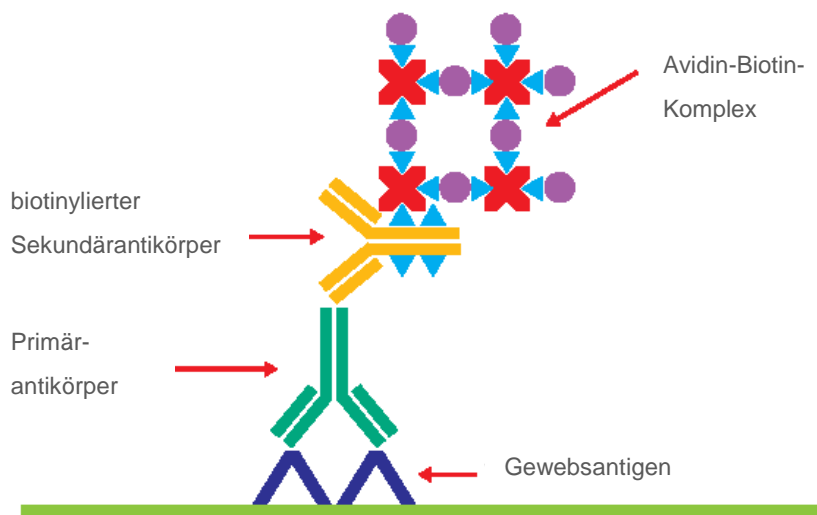
Die Präparate wurden nach Entparaffinierung und Rehydrierung (2.4) dreimal mit (TRIS-) Waschpuffer (4,5 g TRIS-Base, 34,25 g TRIS-HCl, 43,9 g NaCl in 5000 ml Aqua dest. lösen, pH 7,4-7,6) gewaschen und durch eine bis Aqua dest. absteigende Alkoholreihe geführt. Es folgte die Antigen-Hitzedemaskierung, da es durch die formaldehydhaltige Fixierung der Gewebe zur Ausbildung von Methylenbrücken und so zur Antigenmaskierung kommen kann. Die Präparate wurden in 1 l des jeweiligen 1:10 verdünnten Puffers bei entsprechendem pH Wert (Tab.1, Stammlösung TEC-Kochpuffer 10fach: 2,5 g TRIS-Base, 5 g EDTA, 3,2 g Tri-Na-Citrat-Dihydrat auf 1000 ml Aqua dest.; einstellen mit Stammlösung Citratpuffer (10,5 g Zitronensäuremonohydrat in 500 ml Aqua dest.) oder NaOH) für vier Minuten auf



höchster Stufe im Dampfkochtopf erhitzt und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurden die Schnitte erneut durch eine aufsteigende Alkoholreihe bis zu 96 %igem Ethanol geführt. Um eine unspezifische Hintergrundfärbung der Präparate zu reduzieren wurden endogene Peroxidasen durch ein Methanolbad mit 2 %igem  $H_2O_2$ -Anteil (5 ml  $H_2O_2$  in 250 ml Methanol) für 15 min inaktiviert. Abschließend erfolgte eine weitere Behandlung der Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe bis Aqua dest. und anschließender Spülung in Waschpuffer. Die Vorbereitung der Schnitte war hiermit abgeschlossen.

### Färbung nach der ABC-Methode

Mit Hilfe der Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex-Methode (ABC-Methode) können Antigene indirekt nachgewiesen werden. Sie beruht auf der starken Affinität von (Strept)avidin (gewonnen aus *Streptomyces avidinii*) gegenüber dem Vitamin Biotin (gewonnen aus Hühnerei) (Hsu et al. 1981).



**Abbildung 1: ABC-Methode (mit freundlicher Genehmigung, Fa. DAKO)**

Es bedarf eines Primärantikörpers, eines biotinylierten Sekundärantikörpers, mit der Fähigkeit an das Fc-Fragment des Primärantikörpers zu binden und eines

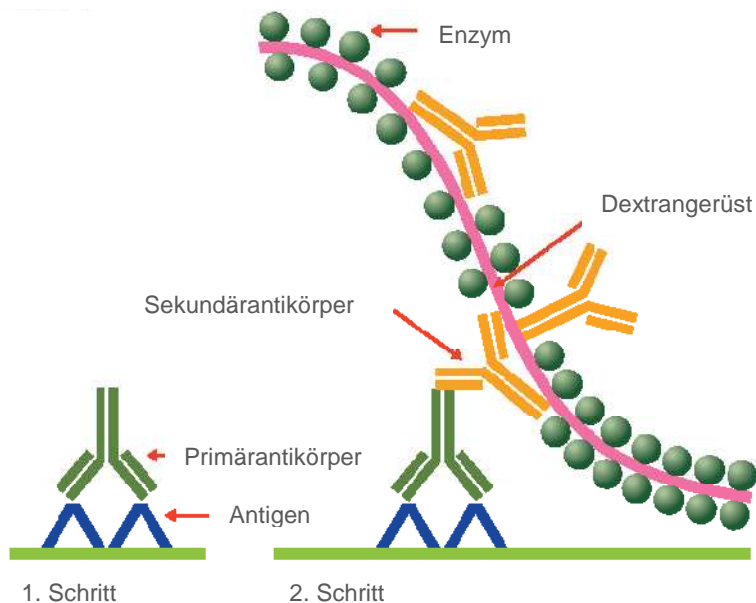
biotinbindenden Avidin-Peroxidase-Konjugates, das letztendlich für die Umsetzung des Chromogens sorgt. Avidin hat die Fähigkeit vier Biotinmoleküle gleichzeitig zu binden. Der Mechanismus der ABC-Methode ist in Abbildung 1 dargestellt.

Für die ABC-Methode wurde in dieser Arbeit das Vectastain<sup>®</sup> Kit verwendet. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurden die Präparate für 15 min in einem Gemisch aus Serum und Milchpulver (15 µl Normalserum in 1 ml 1fach PBS mit 4 % Milchpulver gelöst; Vectastain ABC Kit) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit 150 µl des entsprechend mit Waschpuffer (2 % Milchpulver) verdünnten Primärantikörpers (Tab.1) betropft. Nach 45 min wurde überflüssiger Primärantikörper mit dreimaliger Waschung mit Waschpuffer entfernt. Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (5 µl Sekundärantikörper auf 1 ml Waschpuffer mit 2 % Milchpulver) für 30 min. Erneut wurden die Präparate mit Waschpuffer gewaschen und im Anschluss mit dem kurz vorher angesetzten ABC-Reagenz (10 µl ABC-Reagenz in 1 ml Waschpuffer mit 2% Milchpulver) betropft und für 30 min inkubiert. Ein weiterer Waschschrift beendet die Reaktion und das Chromogen 3,3`Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB Substrate Kit for Peroxidase) kann für 15 min auf die Schnitte aufgetragen werden (je Schnitt 125 µl Aqua dest., 2,5 µl Puffer, 2,5 µl DAB, 2,5µl Hydrogen-Peroxidase). Auf einen weiteren Waschschrift folgte die einminütige Kernfärbung in Hämalaun nach Mayer mit anschließender Wässerung unter kaltem Leitungswasser. Zuletzt wurden die Schnittpräparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol geführt. Das Eindeckeln der Präparate mit Pertex schießt die Immunfärbung ab.

#### Färbung nach EnVision<sup>™</sup>

Die Färbung nach EnVision<sup>™</sup> ist eine indirekte Zwei-Schritt-Methode und basiert auf einem Polymersystem. Der an das Antigen gebundene Primärantikörper wird von einem Sekundärantikörper erkannt, der seinerseits an ein Enzym-gekoppeltes

Polymergerüst, wie z.B. ein Dextran- oder Polypeptidmolekül gebunden ist. Das peroxidasekonjugierte Polymermolekül ist in der Lage mehrere Sekundärantikörper zu binden (Abb. 2).



**Abbildung 2: EnVision™-Methode (mit freundlicher Genehmigung, Fa. DAKO)**

Das hier verwendete EnVision™ Kit von DAKO, zur immunhistochemischen Färbung gegenüber CD10, Podoplanin und CD31, beinhaltet ein gebrauchsfertiges Polymer. Zuerst wurde der Primärantikörper in jeweiliger Verdünnung (Tab.1) in Kombination mit einem gebrauchsfähigen Blockpuffer (DAKO) für 45 min inkubiert. Es folgte ein Waschschrift in Waschpuffer anschließend das Auftragen des Sekundärantikörper-Polymer-Peroxidase-Komplexes für 30 min. Durch einen erneuten Waschschrift mit Waschpuffer wurde die Reaktion mit dem Sekundärantikörper beendet. Im Anschluss wurde die Substratlösung DAB aufgetragen und nach 15 min für 2-3 min mit Aqua dest. abgewaschen. Auf einen weiteren Waschschrift mit Waschpuffer folgte die einminütige Kernfärbung in Mayers Hämalaun Lösung und eine letzte Wässerung mit Aqua dest.. Die Schnittpräparate wurden abschließend durch eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol geführt und

mit Pertex eingedeckelt.

### Auswertung der Immunfärbungen

Die immunhistochemisch mit Antikörpern gegen bFGF und p53 gefärbten Präparate wurden mittels 10- und 20facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop betrachtet, um die Zahl der markierten Zellen zu bestimmen.

Die Bewertung nach bFGF wurde wie folgt bewertet: starke Färbung bei >50 % markierter Tumorzellen, mittel starke Färbung bei 10-50 % markierter Tumorzellen und leichte Färbung bei <10 % markierter Tumorzellen. Die prozentuale Angabe der Färbereaktion nach p53 markierten Zellen erfolgte in den Schritten: 0%, 1-5%, >5-15%, >15% Tumorzelle positiv.

### Quantifizierung der Vaskularisierung mittels Markierung von CD34

Für die Bestimmung der Gefäßdichte wurden pro Fall zehn Areale à 0,5 mm<sup>2</sup> mit einer Digitalkamera unter 100facher Vergrößerung und dem Programm IM50 fotografiert und anschließend archiviert. Mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms Scion Image (Scion Image für Windows 95/98, Scion Corporation, Maryland, USA) erfolgte dann die Zählung der Gefäße. Die Gefäßdichte wurde als microvaskuläre Dichte in MVD/0,5mm<sup>2</sup> angegeben. Die MVD/0,5mm<sup>2</sup> ergibt sich aus dem arithmetischen Mittel der zehn Zählwerte. Zur Vergleichsmöglichkeit der hier eruierten Gefäßdichte mit Ergebnisse zukünftiger Arbeiten zur MVD erfolgte die Ermittlung von Schwellenwerten für Quartilen (Tab.2).

|                        | 25. Perzentile | 50. Perzentile | 75. Perzentile |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|
| MVD/0,5mm <sup>2</sup> | 77,1           | 117,5          | 168,4          |

**Tabelle 2: Schwellenwerte der MVD bei Stratifikation in Quartilen.**

## 2.7 Comparative Genomische Hybridisierung

Die CGH basiert auf einer quantitativen Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und ist insbesondere zur tumorzytogenetischen Untersuchung solider Tumoren geeignet, für die keine Metaphasechromosomen zur Verfügung stehen (Kallioniemi, A. et al. 1992). Ein einziges Hybridisierungsexperiment erlaubt die umfassende Analyse des gesamten Tumorgenoms, da die vollständige Tumor-DNA als Hybridisierungssonde verwendet wird. Das Verfahren detektiert numerische Unterschiede, Deletionen und Amplifikationen einzelner Chromosomen oder Chromosomenabschnitte und wird daher als Screeningmethode eingesetzt. Aberrationen ohne quantitative Differenzen, wie balancierte Translokationen oder Inversionen kann die CGH nicht erfassen. Verschiedenfarbig fluoreszenzmarkierte Tumor-DNA (grün) und Referenz-DNA (rot) werden auf Kontrollmetaphasen in gleichen Mengen aufgetragen und hybridisiert (du Manoir et al. 1993). Eine quantitative Differenz, entsprechend einer Über- oder Unterrepräsentationen von Chromosomensequenzen (Ried et al. 1993) kann mittels digitaler Bildanalyseverfahren anhand der Fluoreszenzintensitäten gemessen werden (du Manoir et al. 1993; Piper et al. 1995). Da bei der CGH die Hybridisierung auf Metaphasechromosomen erfolgt, ist ihr Auflösungsvermögen durch die Kondensation dieser Referenz-Chromosomen limitiert. Die Sensitivität der Methode schwankt in Abhängigkeit der Kopienzahl der veränderten Region und liegt für den Zugewinn von genetischem Material im Bereich von 2 Mbp (Megabasenpaare) bis zu 50 Kbp (Kilobasenpaare) bei hochamplifizierten Bereichen (Ried et al. 1997). Für Verluste liegt die Detektionsgrenze in einer Größenordnung von 10-20 Mbp (Piper et al. 1995). Sechs KZSN mit Hirnmetastasierung wurden mit dieser Methode untersucht.

### DNA-Extraktion aus paraffiniertem Gewebe

Die DNA-Extraktion aus paraffiniertem Gewebe wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Fa. Roche) durchgeführt. Von jedem Präparat wurden sechs Gewebeschnitte à 10 µm Schnittdicke angefertigt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Entparaffinierung der Gewebeschnitte wurden diese für jeweils 10 min zweimal mit 1000 µl Xylol und zweimal mit 1000 µl Ethanol inkubiert. Zwischen den Schritten wurden die Ansätze bei 13.000 upm für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Gewebe in geöffnetem Reaktionsgefäß bei ca. 60 °C im Brutschrank über Nacht getrocknet.

Um die Zellmembran aufzulösen wurden 200 µl DNA-Isolierungspuffer und 40 µl Proteinase K auf die Proben gegeben. Das Gemisch wurde im Vortex gut gemischt und im Thermomixer bei 55 °C und 850 upm über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze für 8 min auf 95 °C im Thermomixer erhitzt, um die Proteinase K zu inaktivieren. Anschließend wurden die Proben bei 13.500 upm 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden die Proben mit 200 µl AL-Puffer versetzt, gut gemischt und im Thermomixer bei 70 °C und 14.000 upm für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 5 min mit 240 µl 100 %igem Ethanol versetzt. Dann wurden die Proben auf eine Filtersäule überführt und bei Raumtemperatur für 2 min bei 10.000 upm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, der Filter in eine neue Säule platziert und wieder für 2 min bei 10.000 upm zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl AW 1 Puffer auf den Filter aufgebracht und für 3 min bei 14.000 upm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Ebenso wurde nach der Zugabe von 500 µl AW 2 Puffer verfahren. Im letzten Schritt wurde die DNA aus dem Filter herausgelöst, indem der Filter verkehrt herum in ein neues Gefäß gesetzt, mit 50 µl AE Puffer versetzt und bei 10.000 upm für 2 min zentrifugiert wurde. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal durchgeführt. Das Endvolumen beträgt 100 µl DNA.

### DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Photometer

Die Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration (Verdünnungsfaktor (VF) 20: 5 µl DNA plus 95 µl Aqua ad injectabile) erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum der DNA. 100 µl Aqua ad injectabile dienten als Referenzwert. Der Reinheitsgrad der Probe wurde durch photometrische Messung bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, bestimmt. Der Reinheitsgrad der DNA wurde durch den Quotienten aus  $OD_{260}/OD_{280}$  (optische Dichte, OD) ermittelt. Der Quotient sollte bei allen Proben einen Wert zwischen 1,7-1,95 annehmen. Die Berechnung der DNA-Konzentration (CDNA) erfolgte nach der Formel  $CDNA (\mu\text{g/ml}) = 0,05 \times VF \times (A_{260} - A_{310})$ . Hierbei entspricht  $A_{260}$  dem Absorptionsmaximum der DNA bei 260 nm und  $A_{310}$  der Grundabsorption der Probe bei 310nm. 0,05 steht für den Extinktionskoeffizient des VF.

### DNA-Fragmentlängenkontrolle mittels Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung der DNA-Fragmentlängen wurden diese in einem Agarosegel (0,75 g Agarose wurden unter Hitze in 50 ml 1fach TBE Puffer (Stocklösung: 5 ml 10facher TBE Puffer auf 45 ml Aqua bidest) in Lösung gebracht und nach Abkühlung unter Zugabe von 7,5 µl Ethidiumbromid, Auspolymerisation des Gels in der Gelkammer) aufgetrennt. Die optimale DNA-Fragmentlänge sollte zwischen 500-1000 bp liegen. Je 5 µl DNA einer Probe wurden mit je 3 µl DNA Gelladepuffer versetzt und in eine Geltaschen pipettiert. Zur Längenbestimmung der DNA-Fragmente wurde zusätzlich ein DNA Längenstandardgemisch aus 3 µl DNA Gelladepuffer, 5 µl Aqua ad injectabile und 1,5 µl Lambda DNA-Leiter aufgetragen und der Behälter mit TBE Puffer aufgefüllt.

Die Gelelektrophorese erfolgte für 45 min bei 80 Volt. Zuletzt wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente unter einem UV-Gerät sichtbar gemacht (Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und macht diese nach Bestrahlung mit UV-

Licht sichtbar) und mittels integrierter Kamera fotodokumentiert.

### Random Priming

Die Farbstoffkopplung der Tumor- und Referenz-DNA-Fragmente unter DNA-Polymerisation erfolgte mit dem MiniElute DNA Extraction Kit (Quiagen). Dazu wurde 1 µg DNA mit Aqua dest. auf ein Volumen von 24 µl verdünnt und mit 20 µl Random Primer (Polymerase) versetzt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 95 °C im Wasserbad inkubiert, um zu denaturieren. Anschließend wurde der Reaktionsansatz sofort auf Eis gestellt, um die Reaktion zu stoppen. Die Zugabe von 5 µl direkt-markierten dNTPs erfolgte unter Lichtausschluss. Dann wurde 1 µl DNA Klenow-Fragment Polymerase vorsichtig eingespült, der Ansatz kurz an-zentrifugiert und im Brutschrank über Nacht bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden wurden am nächsten Morgen 5 µl Stop-Puffer hinzugefügt. Zur Aufreinigung der markierten DNA von freien Restsubstanzen wurden die Proben unter Zugabe von Aqua dest. und anschließender Zentrifugation bei 13.000 upm wiederholt gespült. Das Ergebnis waren 50 µl markierte Tumor- bzw. Referenz-DNA.

### Hybridisierungsvorgang

Zur Herstellung der DNA-Sonden wurden je 50 µl (1 µg) markierte Tumor- und gegengeschlechtliche Kontroll-DNA unter dem Zusatz von 30 µl (300 µg) Cot-1-DNA, 420 µl Ethanol (100 %, -20 °C) sowie 13 µl Natriumacetatpuffer (3M, pH 4,8) für 30 min bei -80 °C gefällt. Im Anschluss wurde der Ansatz bei 14.000 upm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Durch die Zugabe von 800 µl Ethanol (70 %) wurde die DNA im Thermomixer bei 1.400 upm und 45 °C für 10 min gewaschen und anschließend bei 14.000 upm und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach der Trocknung des DNA-Pellets bei Raumtemperatur wurde dieses in 6 µl deionisiertem Formamid aufgenommen und im



Thermomixer bei 1.400 upm und 37 °C resuspendiert.

Die Hybridisierung der CGH-Sonden erfolgte auf kommerziell erworbenen Metaphase-Objektträgern (OT). Diese wurden zunächst für 2 min in eine 69 °C warme Denaturierungslösung (5 ml 20fach SSC Puffer (3M NaCl, 30M Natriumcitrat pH 5,3), 35 ml deionisiertes Formamid, 5 ml Aqua bidest., 5 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7) gegeben und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Lösungen bei -20°C) bis 100 % Ethanol für jeweils 5 min dehydriert. Zur Denaturierung der CGH-Sonden wurden die Proben für 6 min bei 78 °C mit 7 µl Master Mix (30 %) erhitzt und anschließend im Brutschrank bei 37 °C für 30 min prähybridisiert. Die vorbehandelten Proben wurden auf markierte Areale der OT zur Hybridisierung aufgetragen. Die Hybridisierungsfläche wurde mit einem Deckglaschen bedeckt und mit Fixogum versiegelt, um das Verdunsten des Hybridisierungsgemisches zu verhindern. Anschließend wurden die OTs für drei Tage bei 37 °C unter Lichtausschluss in einer feuchten Kammer inkubiert.

Am Ende der Hybridisierung wurde das Fixogum durch zweiminütiges Einweichen in Waschlösung 2 (40 ml 20fach SSC Puffer, 360 ml Aqua bidest., pH7) entfernt. Dann wurden die OT in einer Standkuvette für je 3x 5 min in 42 °C warme Waschlösung 1 (75 ml 50 %iges Formamid, 15 ml 20fach SSC Puffer, 60 ml Aqua bidest., einstellen auf pH7 mit 3M HCl) gespült. Nach Entfernung der Deckglaschen wurden die OT für je 3x 5 min mit Waschlösung 2 und für je 3x 5 min mit Waschlösung 3 (60 ml 20xfach SSC Puffer, 240 ml Aqua bidest., 300 µl Tween 20, pH7) gewaschen. Anschließend wurden die OT für 20 min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss getrocknet. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden die OT zuletzt mit einem Tropfen (20 µl) DAPI-Antifade versehen, eingedeckelt und bis zur Fotodokumentation, innerhalb von zwei Wochen, bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

### Auswertung der CGH

Die Auswertung der CGH erfolgte durch Dr. med. Ch. Vokuhl. Zur Bildaquirierung wurde der mit DAPI-Antifade eingedockte OT unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Jena), das mit einer 100-W-Quecksilber-Dampflampe ausgestattet war, analysiert. Gut gespreitete Metaphasen wurden zunächst in einer 10 x 20fachen Vergrößerung mit Hilfe eines DAPI-Filters ausgesucht und in der Vergrößerung zehn mal hundert wurden pro Fall 10-15 Metaphasen aufgenommen. Von jeder Metaphase wurden drei monochrome Bilder entsprechend den Fluorochromen aufgenommen. Die Bildaufnahme erfolgte über eine mit dem Mikroskop verbundene gekühlte CCD-Kamera. Die Fluoreszenz-Signale wurden jeweils separat als Graustufenbilder digital aufgenommen und gespeichert. Die digitale Bildauswertung erfolgte anhand eines speziellen CGH-Analyseprogramms (isis, MetaSystems, Althusheim). Die aufgenommenen Metaphasen wurden anhand des DAPI-Bildes karyotypisiert, wobei zur besseren Sichtbarmachung des Bandenmusters eine inverse Darstellung gewählt wurde. Die Auswertung der CGH-Daten fand in Anlehnung an verschiedene Autoren statt (du Manoir, Kallioniemi et al. 1995; du Manoir, Schrock et al. 1995; Kallioniemi, O. P. et al. 1994). Nach der Identifizierung der Chromosomen wurde für jede Metaphase ein Karyogramm erstellt. Pro Fall wurden je 10 Metaphasen analysiert und dann ein Summen-Karyogramm errechnet, um ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. Neben den Chromosomen-Ideogrammen sind die DNA-Veränderungen als Profile angegeben. Die einzelnen Profile müssen gleichmäßig verlaufen. Die mittlere der drei Linien verdeutlicht das Gleichgewicht zwischen Tumor- und Referenz- DNA. Die linke (rote) bzw. rechte (grüne) Linie repräsentiert den theoretischen Wert für eine Mono- bzw. Trisomie in 50 % der Tumorzellen, wenn ein Schwellenwert von 0,75 bzw. 1,25 festgelegt wurde (Kallioniemi, O. P. et al. 1994). Bei der Auswertung der Daten wurden folgende Chromosomenabschnitte nicht berücksichtigt: die Zentromere, die

heterochromatinreichen kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen, die telomerischen Bereiche. Als Kontrollexperiment wurden eine Referenz-DNA rot bzw. grün markiert und jeweils gegeneinander hybridisiert. Die daraus resultierenden Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten sollten für jedes Chromosom einen Näherungswert von 1 ergeben.

## **2.8 Statistik**

Mittelwertberechnungen und Standardabweichungen wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel errechnet. Die Datenkorrelationen basieren auf dem Pearson-Korrelationskoeffizienten nach vorheriger Überprüfung der statistischen Normalverteilung und wurden mit dem Statistikprogramm JMP 5.0.1 Software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) errechnet. Bei der vergleichenden Analyse wurden entsprechend den Fragestellungen der Student T-Test bzw. der gepaarte T-Test durchgeführt.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Patientendaten und Tumorstadien**

Das durchschnittliche Patientenalter, bezogen auf 63 Fälle, lag bei 4,3 Jahren und zeigte eine Geschlechterverteilung von annähernd 2:1 für das männliche Geschlecht. Sechs der hier untersuchten Patienten zeigten im Verlauf der Erkrankung eine Hirnmetastasierung. Ihr durchschnittliches Lebensalter bei Diagnosestellung betrug 3,5 Jahre. Patienten die bei Diagnose älter als sechs Monate und jünger als 16 Jahre alt waren erhielten nach 1988 eine neoadjuvante Chemotherapie zur Reduktion der Tumormasse. Für 36 Fälle war das Tumorstadium erhältlich, wobei sich 19 Tumoren im Stadium I, sieben Tumoren im Stadium II und zehn Tumoren im Stadium III befanden (Tumorstadien des KZSN s. S. 53, Tab.21).

### 3.2 Histomorphologie

Die lichtmikroskopische Beurteilung der HE gefärbten Tumorpräparate (n=66) erfolgte hinsichtlich der Merkmale: Zelltyp, Zellularität, Tumorkapsel, Tumornekrose, Gefäßeinbruch und Hilusinfiltration. Vorherrschend zeigte sich in 47 Fällen (71 %) ein rund-ovaler Tumorzelltyp (Tab.3) sowie eine mittlere Tumorzellichte bei 39 Tumoren (59 %) (Tab.4).

| <b>Tumorzelltypen</b> |           |           |                |
|-----------------------|-----------|-----------|----------------|
|                       | rund-oval | spindelig | gemischtzellig |
| n (%)                 | 47 (71)   | 15 (8)    | 14 (21)        |

**Tabelle 3: Vorkommen der Tumorzelltypen rund-oval, spindelig sowie beider Formen.**

| <b>Zellularität</b> |         |         |         |
|---------------------|---------|---------|---------|
|                     | niedrig | mittel  | hoch    |
| n (%)               | 9 (14)  | 39 (59) | 18 (27) |

**Tabelle 4: Angabe der Tumorzellichte in niedrig, mittel und hoch.**

Die Abgrenzung des Tumorgewebes zu gesundem Nierenrindengewebe war bei 32 Fällen (59 %) überwiegend glattwandig, mit fokaler oder durchgehender Tumorkapsel (Tab.5).

| <b>Tumorkapsel</b> |         |         |             |                   |
|--------------------|---------|---------|-------------|-------------------|
|                    | keine   | fokal   | durchgehend | nicht beurteilbar |
| n (%)              | 20 (30) | 17 (26) | 15 (23)     | 14 (21)           |

**Tabelle 5: Beurteilung des Übergangs von Tumorgewebe zu gesundem Nierengewebe.**

Tumornekrosen zeigten sich in 38 Fällen (50 %). Nekroseareale mit >30 % der Schnittfläche zeigten sich nur bei 4 Fällen (Tab.6).

Darüber hinaus wiesen 10 Tumoren (15 %) Gefäßleinbrüche und 15 Tumoren (22 %) eine Hilusinfiltration auf.

#### Tumornekrose (%)

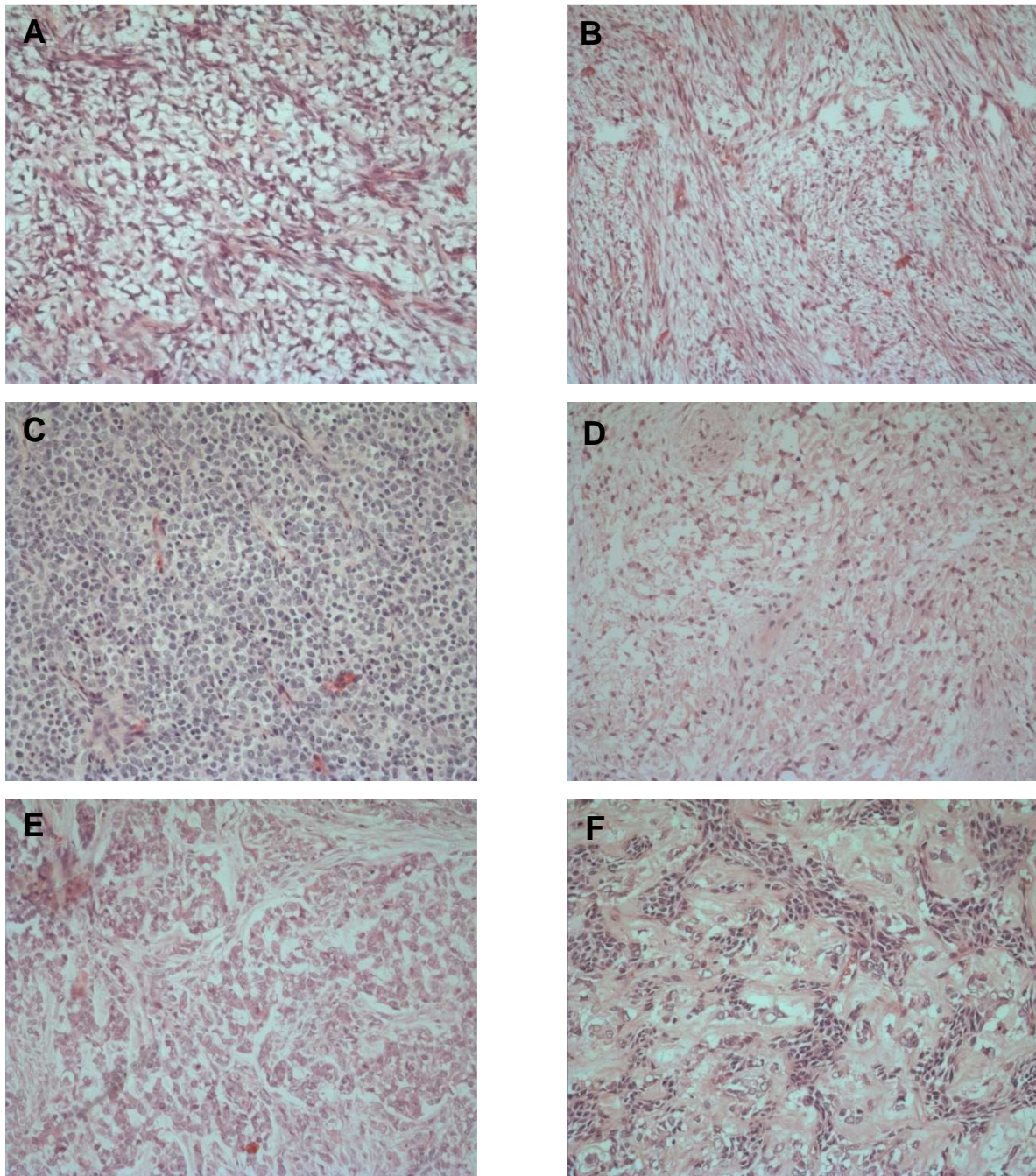
|       | keine   | >0-10   | >10-30  | >30-50 | >50   |
|-------|---------|---------|---------|--------|-------|
| n (%) | 27 (40) | 19 (30) | 16 (25) | 1 (1)  | 3 (4) |

**Tabelle 6: Angabe der mikroskopisch sichtbaren Tumornekrose in %.**

#### Vorkommen der histologischen Wachstumsmuster

Bei der Untersuchung der Wachstumsmusterverteilung zeigte sich das klassische Wachstum in 31 von 66 Fällen (46,9 %) vorherrschend und demnach als Hauptwachstumsmuster. Insgesamt trat das klassische Muster, als Haupt- oder Nebenwachstumsmuster, in 59 Tumoren (89 %) auf.

Das spindelzellige Wachstum zeigte sich in 12 Fällen (18,2 %) vorherrschend, das zelluläre und myxoide Wachstumsmuster in je 8 Fällen (12,1 %). Das epitheloide Wachstum war bei 6 Fällen (9,1 %) und das sklerosierende in einem Fall (1,6 %) Hauptwachstumsmuster. Die Wachstumsformen storiform (2 Fälle) und palisardenartig (1 Fall) zeigten sich nur als Nebenwachstumsmuster (Tab.7). Das seltene anaplastische Wachstum konnte in keinem Tumoren abgegrenzt werden. Abbildung 3 stellt die in dieser Arbeit eruierte Wachstumsmusterverteilung dar.



**Abbildung 3: Darstellung der in dieser Arbeit beschriebenen Hauptwachstumsmuster. 10  $\mu$ m dicke Paraffinschnitte wurden nach HE gefärbt und lichtmikroskopisch bei 20facher Vergrößerung fotografiert. A: klassisch, B: spindelig, C: zellulär, D: myxoid, E: epitheloid, F: sklerosierend.**

| Wachstumsmuster | Gesamtvorkommen | Hauptwachstumsmuster |
|-----------------|-----------------|----------------------|
|                 | n (%)           | n (%)                |
| klassisch       | 59 (89,4)       | 31(46,9)             |
| spindelzellig   | 19 (28,8)       | 12 (18,2)            |
| zellulär        | 11 (16,6)       | 8 (12,1)             |
| myxoid          | 48 (2,7)        | 8 (12,1)             |
| epitheloid      | 38 (57,6)       | 6 (9,1)              |
| sklerosierend   | 7 (10,6)        | 1 (1,6)              |
| storiform       | 2 (2,4)         | -                    |
| palisardenartig | 1 (1,2)         | -                    |

**Tabelle 7: Wachstumsmusterverteilung und Vorkommen dieser als Hauptwachstumsmuster.**

### 3.3 Immunhistochemie

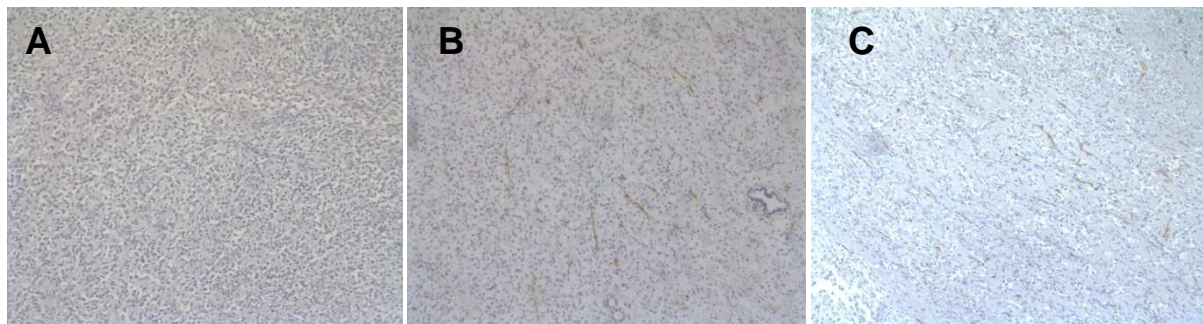
#### 3.3.1 CD34 Expression und Gefäßdichte

CD34 ist ein auf Gefäßendothelien exprimiertes Antigen. Die immunhistochemische Markierung ermöglicht die Darstellung und Quantifizierung von Gefäßen. Die Gefäßdichte wurde in dieser Arbeit als microvaskuläre Dichte (MVD) in  $MVD/0,5mm^2$  angegeben (s. S.14, Abschnitt 2.6).

#### Validierung der Blutgefäßdarstellung

Um sicher zu stellen, dass die Markierung von CD34 in KZSN ausschließlich Blutgefäßendothelien und nicht auch Lymphgefäßendothelien darstellt, wurden zwei weitere Endothelmarker, CD31 und Podoplanin (D2-40), eingesetzt. Die Markierung von CD31 ermöglicht die Darstellung von sowohl Lymph- als auch Blutgefäßendothelien. Demnach lassen sich mittels CD31 alle Endothelstrukturen

eines Gewebes anfärben (Yan et al. 1995). Das Oberflächenantigen Podoplanin wird auf lymphatischen Endothelzellen, Tumorzellen und Keimzellen exprimiert und ist somit hinsichtlich der Darstellung von Endothelien ein selektiver Marker für Lymphgefäßendothelien (Raica et al. 2007). Abbildung 4A-C zeigt die Markierung von Endothelzellen nach Färbung von CD31, Podoplanin und CD34 an drei Schnittpräparaten eines Falls.



**Abbildung 4A-C: Vergleichende Darstellung der Endothelzellmarkierung nach Färbung der Oberflächenantigene CD31, Podoplanin und CD34 an einem Fallbeispiel. 10 µm dicke Paraffinschnitte wurden nach HE gefärbt und lichtmikroskopisch bei 10facher Vergrößerung fotografiert. A: Die Markierung von Podoplanin stellt keine Endothelzellen dar. B: Darstellung der CD31 Expression auf Endothelzellen. C: Darstellung CD34 markierter Gefäße.**

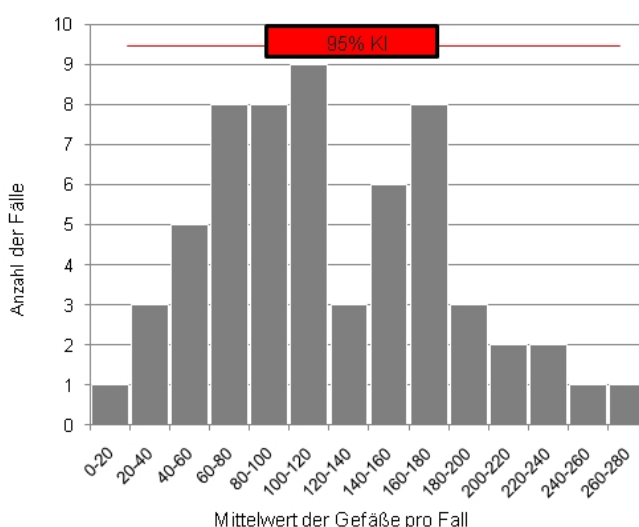
In 61 Tumoren (92,4%) ließen sich keine endothelialen Strukturen durch Markierung von Podoplanin anfärben. Dies bestätigt, dass KZSN nahezu keine Lymphgefäßendothelien besitzen (persönliche Anmerkung Prof. Dr. I. Leuschner). Die Markierung von CD31 erfolgte stichprobenartig an 15 Fällen. 12 Fälle (75%) wiesen eine Endothelzellmarkierung auf. Die Färbung nach CD34 zeigte in nahezu 100 % der Tumoren markierte Endothelien.. Somit konnte bewiesen werden, dass CD34 in KZSN ausschließlich Blutgefäßendothelien markiert und zur Quantifizierung der Gefäßdichte gut geeignet ist.

#### Quantifizierung der Gefäßdichte mittels CD34

Die Gefäßdichte, angegeben in  $MVD/0,5mm^2$ , zeigte sich statistisch normal verteilt



(Abb.5), mit einer minimalen MVD von  $77/0,5\text{mm}^2$  und einer maximalen MVD von  $181,3/0,5\text{mm}^2$ . Die durchschnittliche MVD betrug  $126,5/0,5\text{mm}^2$ . Einzelzählwerte variierten zwischen  $5/0,5\text{mm}^2$  und  $397/0,5\text{mm}^2$  Gefäßanschnitten (Tab.8). Im Vergleich zur Gefäßdichte von Stadium I Tumoren ( $n=16$ ) mit einer MVD von  $142/0,5\text{mm}^2$  zeigten hirnmetastasierte KZSN einen schwachen, nicht signifikanten Trend zu einer geringeren Gefäßdichte ( $n=6$ ) mit  $110/0,5\text{mm}^2$  ( $p < 0,2$ ). Nach CD34 gefärbte Schnittpräparate unterschiedlicher Gefäßdichte zeigt Abbildung 6.



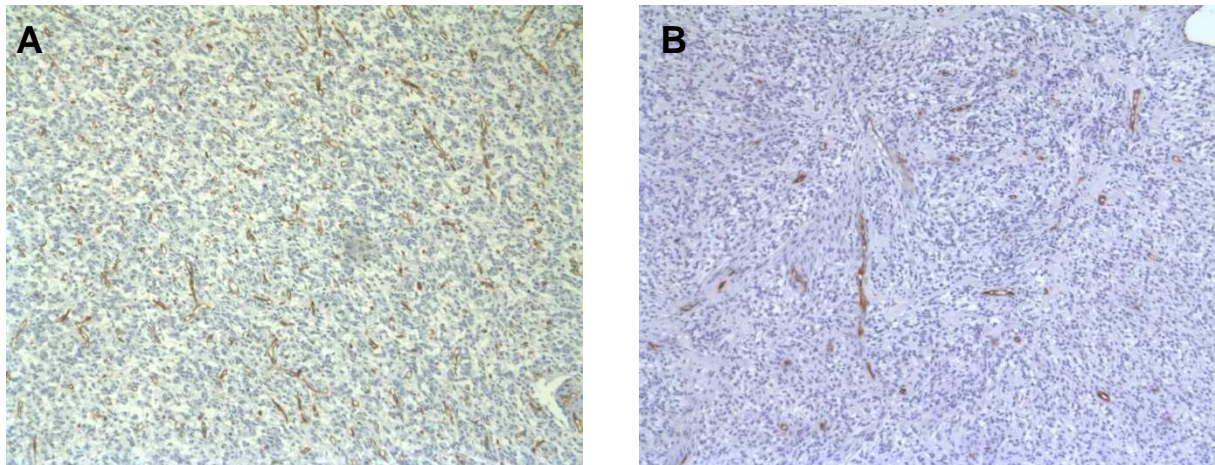
**Abbildung 5: Darstellung der statistischen Normalverteilung der microvaskulären Gefäßdichte in  $MVD/0,5\text{mm}^2$  in KZSN dieser Arbeit.**

### Gefäßanschnitte/ $0,5\text{mm}^2$ (SD)

|             | Mittelwert | Minimalwert | Maximalwert |
|-------------|------------|-------------|-------------|
| Mittelwert  | 126,5 (61) | 77 (48)     | 181,3 (81)  |
| Minimalwert | 16 (8)     | 5           | 37          |
| Maximalwert | 278 (37)   | 229         | 397         |

**Tabelle 8 : Basiswerte der mittleren, minimalen und maximalen durchschnittlichen und**

absoluten Gefäßdichtewerte in  $\text{MVD}/0,5\text{mm}^2$  mit Angabe der Standardabweichung.



**Abbildung 6: Darstellung CD34 markierter Blutgefäßendothelien in KZSN bei unterschiedlicher Gefäßdichte, angegeben in  $\text{MVD}/0,5\text{mm}^2$  und fotografiert bei 10facher Vergrößerung. A:  $\text{MVD } 230/0,5\text{mm}^2$ , B:  $\text{MVD } 40/0,5\text{mm}^2$ .**

#### Korrelation zwischen MVD und histologischen Merkmalen

Die MVD von Tumoren mit Gefäßeinbrüchen ( $n=10$ ) lag bei  $99/0,5\text{mm}^2$ . Im Vergleich zu Tumoren ohne Gefäßinvasion, mit  $130/0,5\text{mm}^2$ , zeigte sich ein nicht signifikanter Trend zu weniger Gefäßen ( $p < 0,1$ ). Tumoren mit Gewebsnekrose ( $n=36$ ) wiesen eine MVD von  $123/0,5\text{mm}^2$  auf. Diese war nicht signifikant abweichend zur MVD von Tumoren ohne Nekrose ( $n=26$ ) mit  $129/0,5\text{mm}^2$ . Tumoren mit Hilusinfiltration ( $n=13$ ) und einer MVD von  $108/0,5\text{mm}^2$  und Tumoren mit Hirnmetastasierung ( $n=6$ ) und einer MVD von  $110/0,5\text{mm}^2$  zeigen keine vom Mittelwert ( $126,5/0,5\text{mm}^2$ ) abweichende Gefäßdichte. Auch die Aufteilung nach Wachstumsmustern zeigte ähnliche Gefäßdichtewerte der einzelnen Typen. Hier lag die MVD zwischen  $113/0,5\text{mm}^2$  für das epitheloide und  $131/0,5\text{mm}^2$  für das spindelzellige Wachstum. Die hohe Gefäßdichte des sklerosierenden Wachstumsmusters von  $169/0,5\text{mm}^2$  basiert auf nur einem Fall (Tab.9).

**MVD/0,5mm<sup>2</sup>**

| <b>Hauptwachstumsmuster</b> | <b>n (%)</b> | <b>Mittelwert</b> | <b>Minimalwert</b> | <b>Maximalwert</b> |
|-----------------------------|--------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| klassisch                   | 30 (47)      | 128 (62)          | 84 (48)            | 182 (75)           |
| spindelzellig               | 11 (18)      | 131 (70)          | 88 (61)            | 186 (84)           |
| zellulär                    | 8 (12)       | 113 (63)          | 50 (35)            | 158 (85)           |
| myxoid                      | 7 (11)       | 115 (59)          | 71 (42)            | 171 (72)           |
| epitheloid                  | 6 (9)        | 128 (63)          | 57 (58)            | 211 (127)          |
| sklerosierend               | 1 (1,5)      | 169               | -                  | -                  |

**Tabelle 9: Angabe der mittleren, minimalen und maximalen Gefäßdichte in MVD/0,5mm<sup>2</sup>, gruppiert nach den sechs Hauptwachstumsmustern und Angabe der Standardabweichung.**

### 3.3.2 CD10 Expression

CD10 ist eine neutrale Endopeptidase und insbesondere auf der Oberfläche von Zellen des Urogenitaltraktes und der Lunge zu finden. Durch enzymatische Spaltung bioaktiver Moleküle nimmt es Einfluss auf das Zellwachstum und die Zellausreifung in gesundem und malignen Gewebe. Auf soliden Tumoren ist CD10 ein weit verbreitetes Antigen und lässt sich als Tumormarker zuverlässig einsetzen.

51 von 64 Fällen zeigten eine diffuse und zytoplasmatische CD10 Expression in Tumorzellen (Tab.10).

### **CD10 Gesamtexpression**

|              | <b>negativ</b> | <b>positiv</b> |
|--------------|----------------|----------------|
| <b>n (%)</b> | 13 (20,3)      | 51(79,7)       |

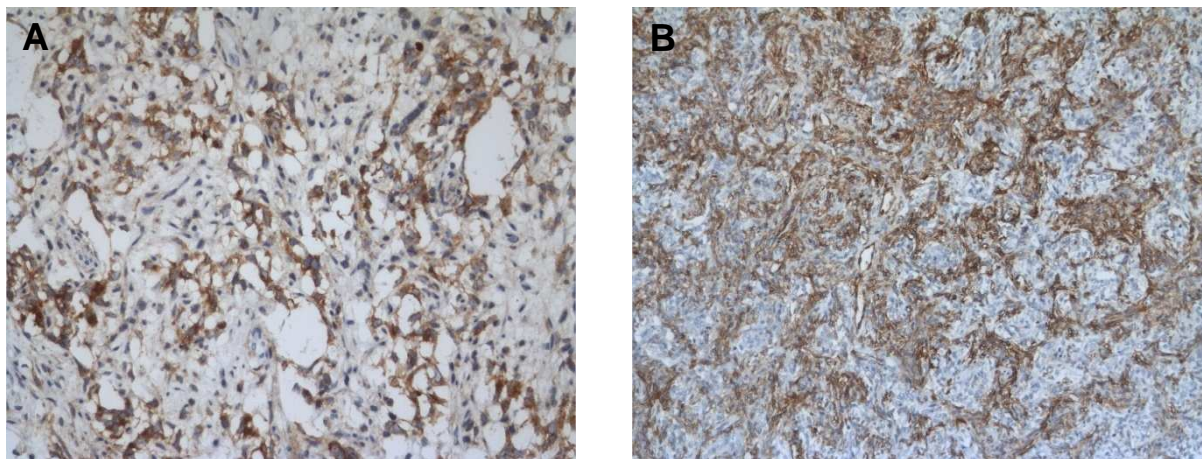
**Tabelle 10: Basiswerte der CD10 Gesamtexpression in Tumorgewebe.**

Auffällig war die zusätzliche Expression von CD10 in perivaskulär gelegenen Zellen bei 36 der 51 tumorzell-positiven Fälle (70,5 %) (Tab.11, Abb. 7A und B).

### CD10 Lokalisation in Tumorzellen

|       | diffus    | diffus und perivaskulär |
|-------|-----------|-------------------------|
| n (%) | 15 (29,5) | 36 (70,5)               |

**Tabelle 11: Angabe der Lokalisation der CD10 Expression in Tumorzellen als alleinige diffuse zytoplasmatische Expression oder mit perivaskulärer Expression.**



**Abbildung 7A und B: Darstellung der CD10 Expression in Tumorzellen und in perivaskulären Zellen. 10 µm dicke Paraffinschnitte wurden nach immunhistochemischer Färbung bei 10 und 20facher Vergrößerung fotografiert. A: Zytoplasmatische CD10 Expression in Tumorzellen eines KZSN mit spindelzelligem Hautwachstumsmuster. B: Perivaskuläre CD10 Expression sowie diffuse zytoplasmatische CD10 Expression in Tumorzellen eines KZSN vom klassischen Wachstumstyp.**

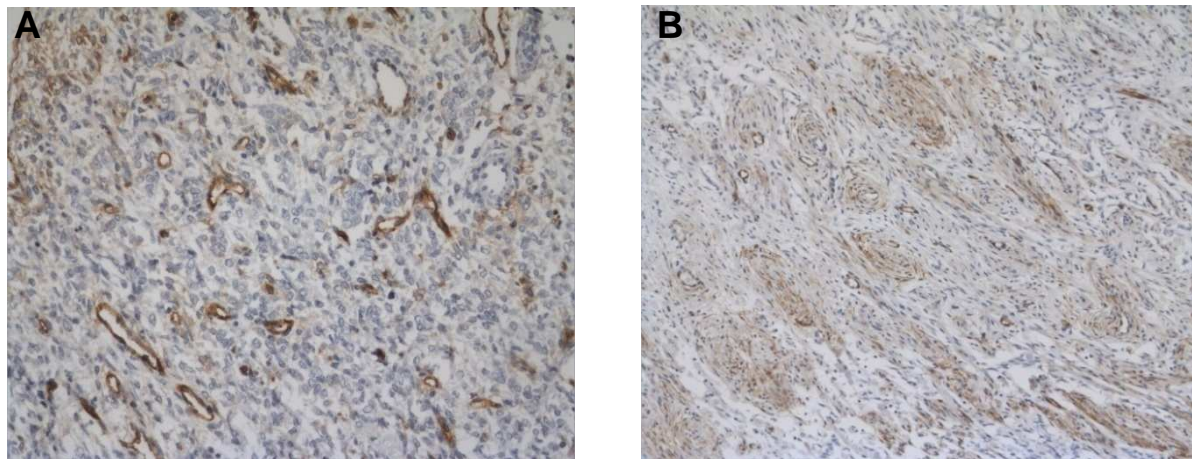
Darüber hinaus zeigten 35 der 51 Fälle (68,6 %) auch eine positive Färbereaktion in Endothelzellen (Tab.11, Abb. 8A und B). Hirnmetastasierte Tumoren zeigten keine CD10 Expression in Endothelzellen. 12 Tumoren (19,1 %) wiesen eine auffällig intensive Expression von CD10 in spindelzelligen Arealen auf. In sehr zellreichen

oder zellarmen, z.B. myxoiden Arealen, fand sich eine weniger intensive Expression des Antigens.

### CD10 Expression in Endothelzellen

|       | negativ   | positiv   |
|-------|-----------|-----------|
| n (%) | 16 (31,4) | 35 (68,6) |

**Tabelle 12: CD10 Gesamtexpression in Endothelzellen.**



**Abbildung 8A und B: Darstellung der CD10 Expression in Endothelzellen. 10 µm dicke Paraffinschnitte wurden nach immunhistochemischer Färbung bei 10 und 20facher Vergrößerung fotografiert. A: zytoplasmatische CD10 Expression in Endothelzellen eines Falls mit klassischem Wachstumstyp, B: zytoplasmatische CD10 Expression in Endothelzellen eines KZSN vom myxoiden Typ.**

Insgesamt zeigte sich keine signifikant abweichende CD10 Expression unter den in dieser Arbeit beschriebenen Wachstumsmustern und die Expression von CD10 zeigte sich sowohl in Tumorzellen als auch in Endothelzellen unabhängig vom jeweiligen Hauptwachstumsmuster des Tumors. In Bezug auf die hier untersuchten KZSN mit Hirnmetastasierung zeigte nur einer von sechs Tumoren eine CD10 Expression.

### Signifikanter MVD Anstieg bei CD10 Expression in Endothelzellen

Tumoren mit diffuser und / oder perivaskulärer CD10 Expression (n=49) zeigen mit einer MVD von  $136,3/0,5\text{mm}^2$  signifikant mehr Gefäße, als CD10 negative Tumoren (n=13) mit einer Gefäßdichte von  $85,9/0,5\text{mm}^2$  ( $p < 0,001$ ) (Tab.13).

| CD10 Expression in Tumorzellen | MVD/ $0,5\text{mm}^2$ (SD) |              |             |              |
|--------------------------------|----------------------------|--------------|-------------|--------------|
|                                | n (%)                      | Mittelwert   | Minimal     | Maximal      |
| negativ                        | 13 (20,3)                  | 85,9 (29,2)  | 45 (19,8)   | 144,5 (65,3) |
| diffus                         | 15 (23,5)                  | 135 (76,8)   | 83 (52,4)   | 198 (103,8)  |
| diffus und perivaskulär        | 36 (56,2)                  | 136,3 (59,2) | 88,4 (50,2) | 186,2 (73,7) |

**Tabelle 13: Gefäßdichte in  $\text{MVD}/0,5\text{mm}^2$  in Korrelation mit der CD10 Expression in Tumorzellen.**

Tumoren mit CD10 Antwort in Endothelzellen (n=33) weisen mit  $151/0,5\text{mm}^2$  eine signifikant höhere MVD auf, als solche ohne Endothelantwort (n=15) mit  $104/0,5\text{mm}^2$  ( $p < 0,01$ ). Die CD10 Antwort im Endothel ließ sich nur in Kombination mit einer gleichzeitigen CD10 Expression in Tumorzellen beobachten. Der Anstieg der MVD war hierbei lediglich in den 33 Fällen signifikant höher, in denen eine CD10 Expression auch in Endothelzellen nachgewiesen wurde (Abb.9A). Eine zusätzliche CD10 Expression in perivaskulären Zellen zeigte keine Assoziation mit einer weiteren Zunahme der Gefäßdichte (Abb.9B).

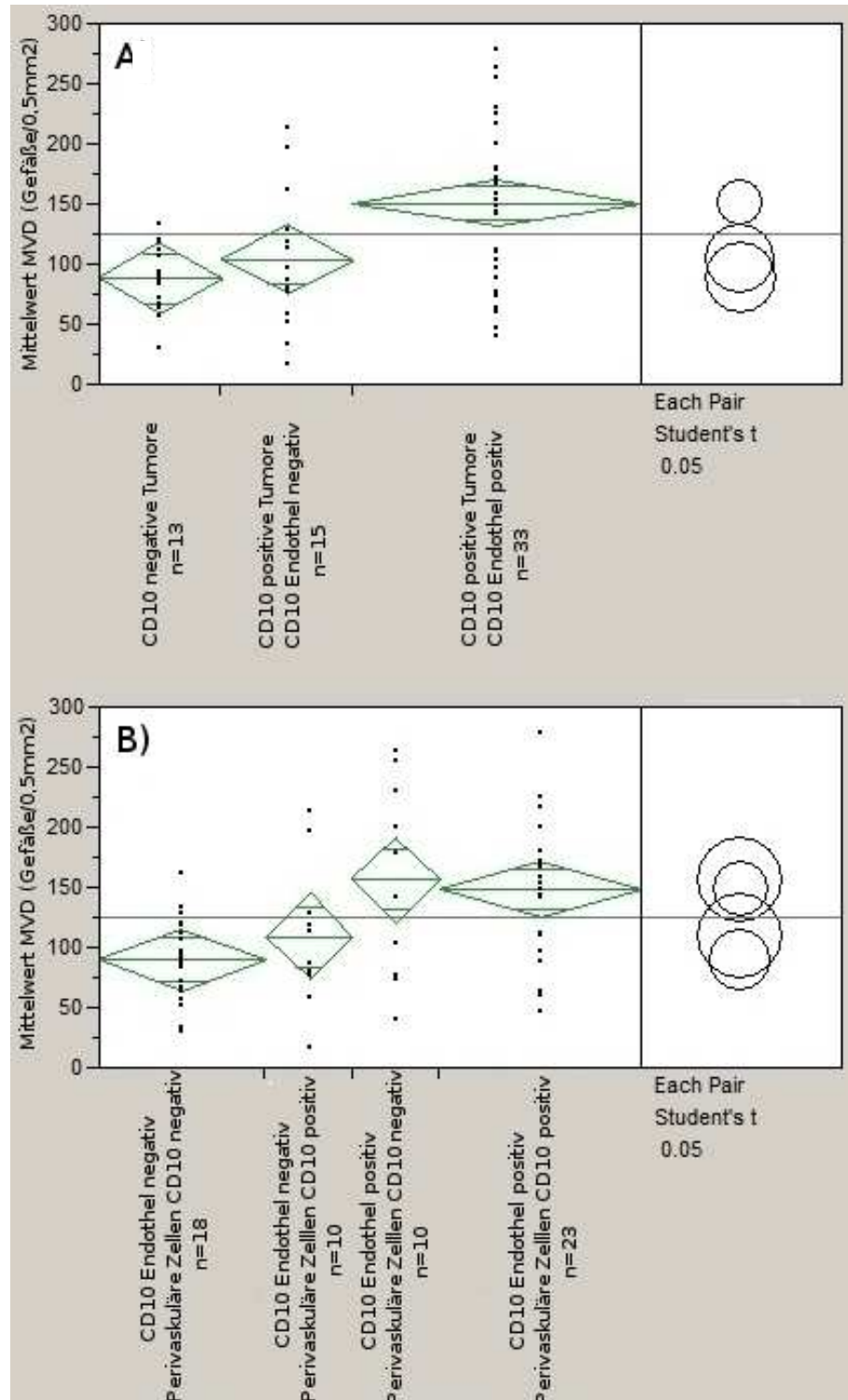


Abbildung 9A: Es findet sich eine signifikante Zunahme der Gefäßdichte bei Tumoren mit CD10 Expression in Endothelzellen ( $p < 0,05$ ).

Abbildung 9B: Eine zusätzliche Expression von CD10 in perivaskulären Zellen geht nicht mit einer weiteren Zunahme der Gefäßdichte einher.

### 3.3.3 bFGF Expression

Eine bFGF Expression konnte bei 57 Fällen (89%) in Tumorzellen und / oder in Endothelzellen beobachtet werden, wobei 43 Fälle ( 67 %) das Antigen in den Tumorzellen (Tab.15) und 55 Fälle ( 86 %) bFGF in den Endothelzellen exprimierten (Tab.16).

#### bFGF Gesamtexpression

|       | negativ | positiv |
|-------|---------|---------|
| n (%) | 7 (11)  | 57 (89) |

**Tabelle 15: Gesamtexpression von bFGF im KZSN.**

#### bFGF Expression in Endothelzellen

|       | negativ | positiv |
|-------|---------|---------|
| n (%) | 9 (14)  | 55 (86) |

**Tabelle 16: bFGF Expression in Endothelzellen.**

Eine gleichzeitige Expression fand sich in 41 Tumoren ( 64 %). Die Expression war zu über 80 % im Zellkern lokalisiert. 14 Fälle (22 %) exprimierten bFGF ausschließlich in den Endothelzellen. In zwei Fällen waren ausschließlich Tumorzellen angefärbt. Die Intensität der Expression zeigte sich zu gleichen Teilen schwach, mittel und stark.

Tumoren mit vorhandener MVD und einer bFGF Expression in Tumorzellen (n=43) zeigten eine MVD von  $121/0,5\text{mm}^2$ , Tumoren ohne Expression (n=21) von  $134/0,5\text{mm}^2$ . Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich nicht. Die Intensität der bFGF Antwort in Tumorzellen zeigte ebenso keinen Einfluß auf die Gefäßdichte.

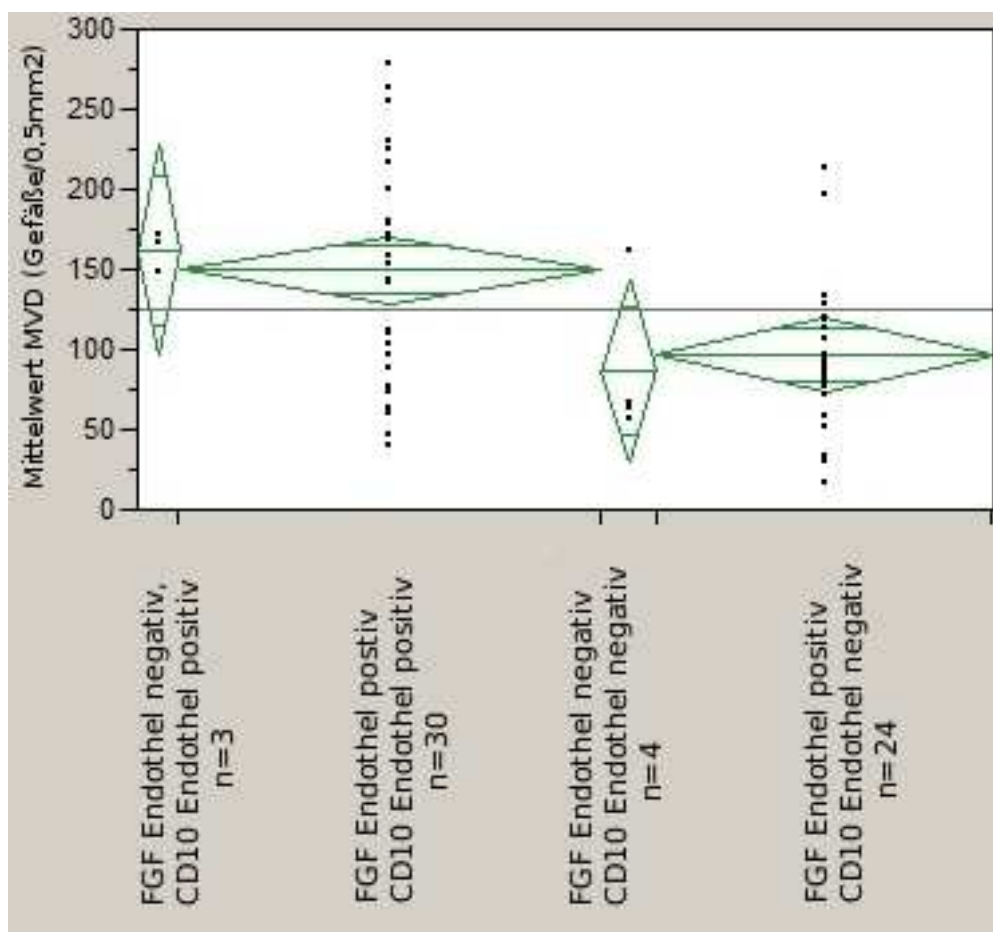


Tumoren mit bFGF Expression in Endothelzellen und negativer Tumorzellantwort (n=14) zeigten eine MVD von  $146/0,5\text{mm}^2$  und haben im Vergleich zu Tumoren ohne jede bFGF Expression (n=5), mit einer MVD von  $101/0,5\text{mm}^2$ , deutlich weniger Gefäße. Diese Werte sind bei zu kleinen Fallgruppen ohne statistische Signifikanz. Aufgrund des jeweiligen Anstiegs der Gefäßdichte in Tumoren mit bFGF und CD10 Expression in Endothelzellen wurde die gemeinsame Expression beider Marker näher untersucht. Hier zeigten Tumoren, welche weder bFGF noch CD10 exprimierten (n=3) eine signifikant geringere MVD ( $82,5/0,5\text{mm}^2$ ), als solche mit Expression und einer MVD von  $131,5/0,5\text{mm}^2$  ( $p<0,04$ ). Zuletzt ist zu vermerken, dass eine bFGF Expression in Tumorzellen (n=43), nicht aber in Endothelzellen, mit einer signifikanten Zunahme der CD10 Expression in Endothelzellen vergesellschaftet war ( $p<0,05$ ) (Tab.17, Abb.10).

#### Korrelation bFGF in Tumorzellen und CD10 im Endothel

|                         | bFGF positive TZ (n=43) | bFGF negative TZ (n=21) |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| CD10 positives Endothel | 25                      | 8                       |
| CD10 negatives Endothel | 18                      | 11                      |

**Tabelle 17: Die bFGF Expression in Tumorzellen geht mit einem signifikanten Anstieg der CD10 Expression in Endothelzellen einher ( $p<0,05$ ).**



**Abbildung 10:** Bekannt ist die signifikante Zunahme der MVD bei Fällen mit CD10 Expression in Endothelzellen ( $p < 0,05$ ). Die hier aufgeführte Abbildung zeigt, dass eine zusätzliche bFGF Expression in Endothelzellen nicht zu einer weiteren Veränderungen in der MVD. Somit ist die signifikante Zunahme der MVD bei bFGF Expression nicht durch die bFGF Expression in Endothelien sondern durch die koinzidentielle Expression von CD10 in Endothelzellen bedingt.

### 3.3.4 p53 Protein Expression

Die hier untersuchten KZSN waren nur selten und schwach p53 positiv. 58 Fälle (89,3%) zeigten keine p53 Expression. In übrigen Präparaten konnte eine geringe Färbereaktion von 1-5 % und in einem Fall von bis zu 15 % im Zellkern vermerkt werden. In keinem der Fälle ließ sich ein anaplastisches Wachstum nachweisen. Tumoren mit Hirnmetastasierung zeigten keine Abweichungen in der Expression des Antigens (Tab.18).

**p53 Expression**

|       | 0         | 1-5%    | >5-15%  | >15% |
|-------|-----------|---------|---------|------|
| n (%) | 58 (89,3) | 6 (9,2) | 1 (1,5) | 0    |

---

**Tabelle 18: p53 Nachweis in Fällen dieser Arbeit.**

**3.4 Tumorstadien**

Angaben zum Tumorstadium waren für 36 Fälle vorhanden. Tumoren im Stadium I (n= 19) zeigten in 18 Fällen eine CD10 Expression und somit signifikant mehr CD10 exprimierende Tumorzellen und Endothelzellen ( $p < 0,04$ ), als Tumoren im Tumorstadium III (n=9). Sechs Stadium III Tumoren zeigten eine CD10 Expression. Ebenso zeigte sich ein Trend zu einer höheren MVD mit  $155/0,5\text{mm}^2$  gegenüber Tumoren im Tumorstadium II, mit einer MVD von  $105/0,5\text{mm}^2$  ( $p < 0,054$ ).

Ein signifikanter Unterschied in der MVD zeigte sich hinsichtlich des Tumorstadiums nicht. Die bFGF Expression zeigte sich bezogen auf das Tumorstadium ebenso nicht signifikant unterschiedlich.

**3.5 CGH**

In keinem der sechs mittels CGH untersuchten Tumoren mit Hirnmetastisierung ergaben sich Hinweise auf zytogenetische Veränderungen. Abbildung 11 zeigt unauffällige Metaphasechromosomen eines Falls.

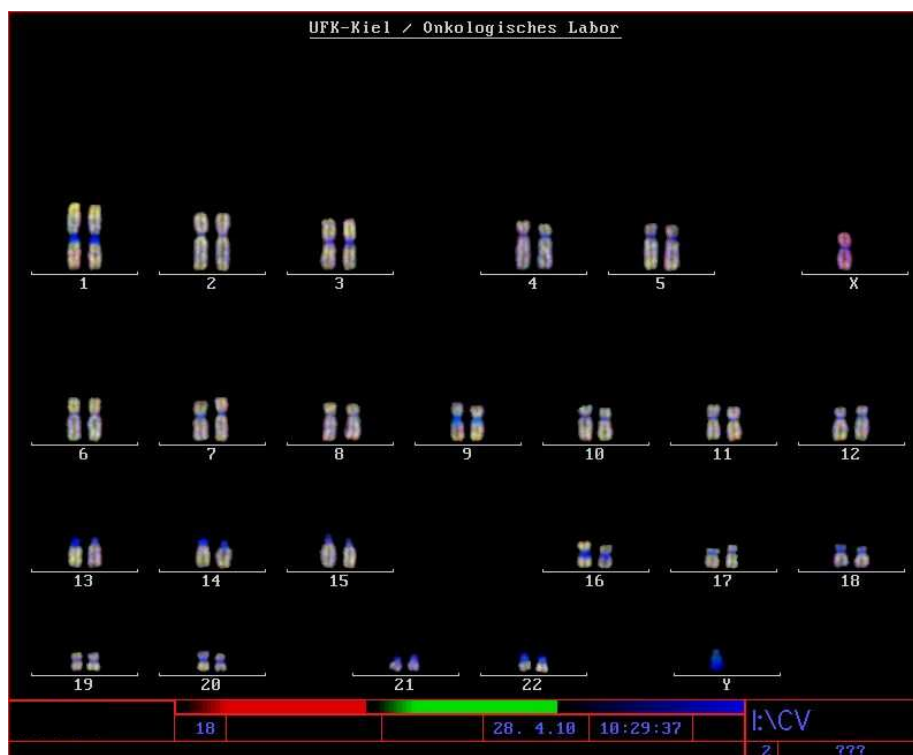


Abbildung 11: Darstellung von Metaphasechromosomen nach comparativer genomischer Hybridisierung eines Falls ohne genetische Veränderungen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Einleitung

Die histopathologische Diagnose eines Klarzellsarkoms der Niere (KZSN) basiert nach wie vor auf rein morphologischen Kriterien. Eine Absicherung der Diagnose durch zusätzliche Techniken ist bisher nur eingeschränkt möglich. Daher liegt die Fehldiagnoserate teilweise bei bis zu einem Drittel der Tumoren. Hauptsächlich Gründe hierfür sind die Präsentation des Tumors in diversen Wachstumsmustern und das Fehlen tumorspezifischer Oberflächenmarker, welche eine direkte Abgrenzung zu Differentialdiagnosen ermöglichen (Perlman 2005). Auch die molekulargenetische Analyse des Tumors konnte bisher keine diagnoseweisenden genetischen Mutationen identifizieren. Die geringe Inzidenz von KZSN limitiert zudem die Größe von Studienkollektiven und schafft stattdessen eine große Bandbreite an Einzelfallberichten mit limitierter Aussagekraft. Somit liegt dieser Arbeit im

Wesentlichen nur eine Referenzstudie mit 351 eingeschlossenen KZSN und retrospektiv erhobenen Daten aus der amerikanischen NWTSG (Trials 1-4) zum Vergleich vor.

Die hier vorgestellte Arbeit verfolgt das Ziel einer detaillierten beschreibenden Charakterisierung und explorativen Analyse des KZSN an einer für diesen Tumor großen Studienpopulation von bis zu 66 Tumoren von Patienten, die im Rahmen der deutschen GPOH-Nierentumorstudien behandelt wurden. Es erfolgte die Einteilung nach histologischen Wachstumsmustern, die Quantifizierung der Gefäßdichte sowie die Beschreibung der Expression des Tumormarkers CD10 und des Gefäßwachstumsfaktors bFGF. Da keine aussagekräftigen Literaturangaben zur Expression von CD10 und bFGF im KZSN vorliegen, wurden die hier gewonnenen Ergebnisse mit Beobachtungen aus Studien zu besser untersuchten Tumoren unterschiedlichster Entität verglichen.

Weiterhin wurde die Expression des p53 Proteins untersucht, da nach Literaturangaben (Hsueh et al. 2002) in einem Teil der KZSN eine Überexpression dieses Tumorsuppressorgens nachgewiesen werden konnte. Tumoren mit Hirnmetastasierung wurden weiterhin mit Hilfe der komparativen genomischen Hybridisierung, einer Screeningmethode für Chromosomenabberationen, genetisch untersucht.

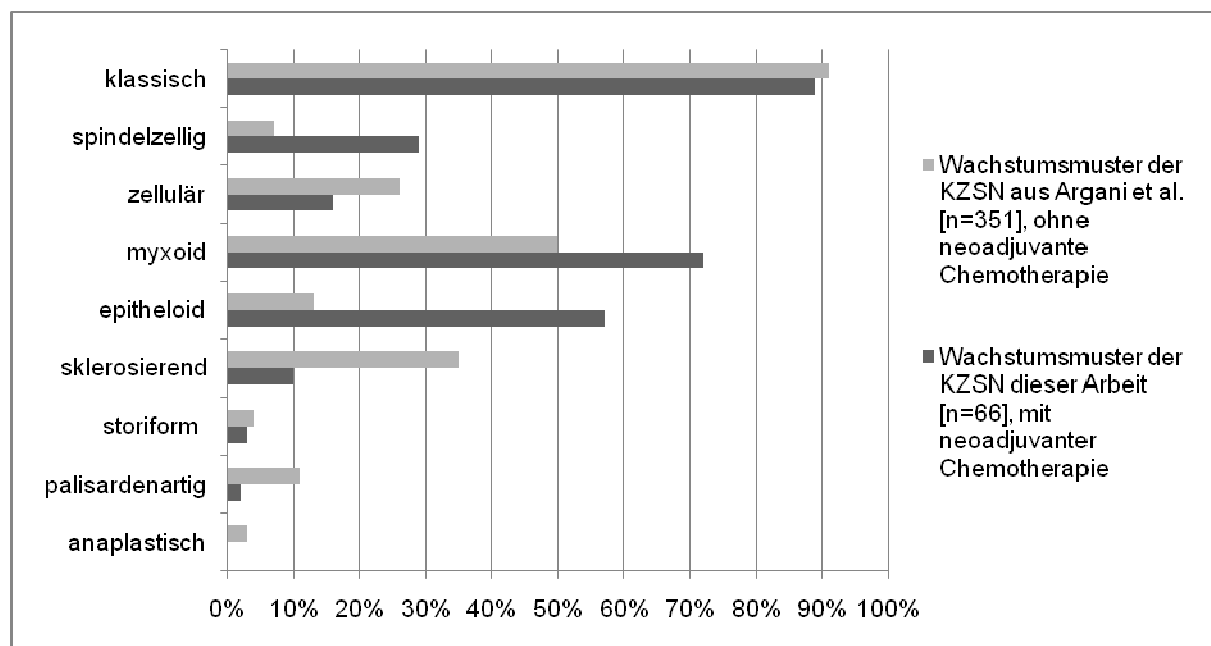
## **4.2 Histomorphologie**

### Wachstumsmuster

Die Bedeutung der vielfältigen Wachstumsmuster in KZSN, in Bezug auf Genese und Aggressivität des Tumors, ist anhaltend Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion. Möglich ist, dass die verschiedenen Wachstumsmuster Ausdruck einer Tumorentwicklung sind. Murphy und Beckwith stellten die Vermutung auf, dass die

unterschiedliche Ausprägung von cord cells und septal cells ausschlaggebend für die Ausbildung von Wachstumsmustern ist und eventuell einen gemeinsamen Ursprung aller Wachstumsmuster darstellen (Murphy et al. 1994).

Zur besseren Interpretation und Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, wurden die untersuchten Tumoren nach von Argani et al. beschriebenen histologischen Wachstumsmustern eingeteilt (Argani et al. 2000). Das Wachstumsmuster vom anaplastischen Typ, welches nach Argani et al. in nur 3 % der Fälle vorkommt, konnte bei den untersuchten Tumoren nicht gefunden werden. Somit konnten acht der neun vorbeschriebenen Wachstumsmuster identifiziert werden, wobei das Wachstumsmuster vom klassischen Typ in annähernd 90 % der Fälle zu finden war. Dies entspricht den Literaturangaben. Auffallend abweichend zeigte sich das Vorkommen übriger Wachstumsmuster (Argani et al. 2000) (Tab.19). Sebire und Vujanic weisen in ihrer Übersichtsarbeit zu Kindernierentumoren darauf hin, dass die Vergleichbarkeit von Studienergebnissen für Nierentumoren im Kindesalter nur unter Vorbehalt möglich ist, da diesen abweichende präoperative Therapien vor Tumorresektion zugrunde liegen (Sebire et al. 2009). So beurteilten Argani und Kollegen Tumorgewebe von 351 KZSN aus Studien der amerikanischen National Wilms Tumor Study Group (NWTSG), in welchen vor Tumorresektion dem Patienten keine neoadjuvante Chemotherapie verabreicht wird (Argani et al. 2000). Dem gegenüber stehen 65 in dieser Arbeit untersuchte Tumoren, welche nach den Therapieprotokollen der Internationalen Gesellschaft für pädiatrische Onkologie (SIOP/GPOH) behandelt wurden und eine präoperative Chemotherapie vor der eigentlichen Resektion erhielten. Diese präoperative Chemotherapie ist als der Grund für die unterschiedliche Ausprägung der verschiedenen Wachstumsmuster zwischen den hier untersuchten Tumoren sowie den Ergebnissen von Argani und Kollegen anzusehen.



**Tabelle 19: Darstellung der Wachstumsmusterverteilung von Argani et al. und Fällen dieser Arbeit.**

Auch in Wilms Tumoren wird ein verändertes histologisches Spektrum nach präoperativer Chemotherapie mit vermehrter Fibrose, Nekrose sowie Makrophagen mit Hämosiderinablagerungen gefunden. Die für den Wilms Tumor beschriebenen, an primär operierten Tumoren gefundenen, histomorphologischen Typen, zeigten nach präoperativer Chemotherapie eine andere Verteilung, als bei primär operierten Tumoren (Guarda et al. 1984; Weirich et al. 2001). Argani et al. beschrieben außerdem das histologische Wachstum von Rezidivtumoren nach adjuvanter Chemotherapie (Argani et al. 2000). Dabei wurde insbesondere eine deutliche Rarifizierung des epitheloiden Wachstumsmusters sowie das vermehrte Aufkommen des sklerosierenden Wachstums beobachtet. Alle übrigen Wachstumsmuster glichen der Verteilung in Primärtumoren (Argani et al. 2000). Trotz chemotherapeutischer Vorbehandlung zeigt sich das sklerosierende Wachstum im Untersuchungsgut dieser Arbeit mit niedriger Inzidenz, das myxoide Wachstum war dem gegenüber stark vertreten. Denkbar ist, daß die Regressionmuster in Primärtumoren und Metastasen

unterschiedlich sind. Dieses könnte durch die Tatsache erklärt werden, daß Metastasen häufig nicht gleichzeitig mit dem Primärtumor reseziert werden, da sie teilweise metachron entstehen. Daher ist von einem unterschiedlichen biologischen Verhalten in dem Primärtumor und den Metastasen auszugehen.

### Tumornekrose

Neben den oben genannten Wachstumsmustern wurden die Tumornekrose, die Tumorbegrenzung, Gefäßeinbrüche sowie Nierenveneninfiltrationen beurteilt. In 60 % der lichtmikroskopisch gesehenen Fälle fanden sich Tumornekroseareale, die bis zu 50 % des Tumors ausmachten. Argani und Kollegen dokumentierten eine fokale und diskrete Nekrose in 73 % der Fälle bei Beurteilung des makroskopischen Tumorpräparates. Angaben über eine mikroskopische Quantifizierung liegen von den Autoren nicht vor. Somit wurden hinsichtlich der Bestimmung von Tumornekrose unterschiedliche Beurteilungsmethoden angewandt. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist somit nicht möglich. Es ist davon auszugehen, daß die nekrotischen Anteile in Tumoren, die nach den Therapieprotokollen der NWTs-Studien behandelt wurden, insgesamt weniger Nekrosen aufweisen als Patienten der SIOP/GPOH-Studien, da die Patienten der NWTs-Studien in der Regel keine präoperative Chemotherapie erhalten. Im Rahmen der SIOP/GPOH-Studien werden der Nekroseanteil im Tumor nach einem vorgegebenen Schema sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch quantifiziert. Daher ist die Angabe Argani und Kollegen über fokale und diskrete Nekrosen in 73 % der Fälle relativ zu sehen, da eine Quantifizierung im eigentlichen Sinne nicht vorgenommen wurde.

### Tumorbegrenzung

Makroskopisch wie auch mikroskopisch zeigen KZSN eine überwiegend glatte Tumorbegrenzung zu gesundem Nierengewebe. In dieser Arbeit wiesen 50 % der



Fälle eine kapselartige Begrenzung zum angrenzenden Nierengewebe auf. Dies ist abweichend zu differentialdiagnostisch in Betracht zu ziehenden anderen Nierentumoren des Kindesalters: Wilmstumoren weisen praktisch immer nach präoperativer Chemotherapie eine kapselartige Begrenzung auf („Pseudokapsel“). Demgegenüber ist es für konnatale mesoblastische Nephrome gerade typisch, daß zum angrenzenden Nierengewebe keine Kapsel vorhanden ist (persönliche Mitteilung Prof. Leuschner, Kindertumorregister der GPOH). Die KZSN nehmen daher in Bezug auf die Tumorbegrenzung eine Zwischenstellung, zwischen Wilmstumoren und konnatalen mesoblastischen Nephromen ein.

#### Gefäßinvasion

15 % der Fälle wiesen Gefäßeinbrüche auf. Dies ist im Vergleich zu Angaben bei Argani et al., die in 5 % der Fälle eine makroskopische Nierenveneninfiltration feststellten, auffallend höher und dennoch passend zum bekanntlich hohen Lymphknotenbefall von 29 % bei Diagnosestellung eines KZSN (Argani et al. 2000). Die unterschiedliche Inzidenz zwischen den Angaben von Argani et al. und den hier erhobenen Ergebnissen läßt sich damit erklären, die Argani und Mitarbeiter nur eine makroskopische Untersuchung bezüglich einer Nierenveneninfiltration durchführten. In dieser Arbeit wurde neben makroskopischen Befunden auch das Tumorgewebe mikroskopisch nach Gefäßeinbrüchen untersucht. Dies erklärt die höhere Inzidenz der Gefäßinvasionen in den hier untersuchten Fällen.

#### Nierenhilusinvasion

Die intensive mikroskopische Untersuchung der Hilusregion gehört zu einem Standardverfahren in der Aufarbeitung von Nierentumoren von Patienten, die im Rahmen der SIOP/GPOH-Studien untersucht werden. Eine Infiltration des Nierenhilus ändert das Tumorstadium (Stadium II) und bedingt eine intensivere

Chemotherapie, als bei Patienten mit Tumoren, die auf das Nierengewebe begrenzt sind (Stadium I) (Weirich et al. 2001). Eine Infiltration des Nierenhilus ließ sich in 22 % der untersuchten Fälle nachweisen. Dieses entspricht einer vergleichbaren Nierenhilusinfiltrationsrate wie sie bei Nephroblastomen gefunden wird (Reinhard et al. 2004). In den NWTs-Studien wurde von Argani et al. angegeben, daß 37 % der Fälle ein Stadium II aufwiesen. Da die Stadiendefinition in den NWTs- und SIOP/GPOH-Studien gleich ist, liegt der Anteil der Tumoren mit einem Stadium II in den NWTs-Studien höher. Dieser Unterschied läßt sich wiederum durch die präoperative Chemotherapie der hier untersuchten Fälle erklären. Durch diese Therapie werden die Tumoren kleiner und das Stadium niedriger (Weirich et al. 2001).

### **4.3 Angiogenese**

Wie wichtig eine funktionierende Angiogenese für das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren ist, wurde erstmals von Folkman postuliert (Folkman et al. 1989). Ein rasches Tumorstadium führt zur Ausbildung ausgedehnter Nekrosezonen, da die Vaskularisierung im Tumor nicht schnell genug erfolgt und daher die Nekrosen das Missverhältnis von Tumorgewebe zu Gefäßdichte widerspiegeln (Weidner 1995). Zhang schreibt, dass solide Tumoren das Wachstum neuer Gefäße zwingend selbst induzieren müssen, um proliferieren und metastasieren zu können (Zhang, X. et al. 2002). Für Malignome unterschiedlichen Ursprungs ist der Zusammenhang zwischen hohem Angiogenesegrad und aggressivem Tumorverhalten belegt. Beim Mammakarzinom konnte nachgewiesen werden, wie ein hoher Vaskularisierungsgrad mit verstärktem Metastasierungsverhalten einhergeht (Leek 2001; Zhang, X. et al. 2002). Für den häufigsten Nierentumor im Kindesalter, den Wilms Tumor, ist beschrieben worden, dass eine hohe microvaskuläre Dichte mit einer schlechteren Prognose einhergeht

(Mikulic et al. 2006; Skoldenberg et al. 2001). Für das KZSN lässt sich in dieser Arbeit kein Zusammenhang von hoher MVD und verstärkter Tumoraggressivität darstellen, wobei letztere am Aufkommen von ausgedehnten Tumornekrosen (über 30 %) sowie Hilus- und Gefäßinfiltrationen gemessen wurde. Bei Fällen mit Gefäßeinbrüchen zeigte sich sogar ein Trend zu weniger Gefäßen ( $p \leq 0,1$ ). Diese Beobachtung findet eine Parallele zu Studienergebnissen am Nierenzellkarzinom (NZK). Imao und Kollegen konnten zeigen, dass das NZK eine signifikante Korrelation von niedriger MVD und hoher Tumoraggressivität aufweist, wobei die MVD nicht als unabhängiger prognostischer Faktor angesehen wurde (Imao et al. 2004). Dem gegenüber stehen Ergebnisse, die eine direkte Abhängigkeit von Tumorwachstum und -nekrose und Angiogeneseegrad in NZK aufzeigen (Hemmerlein et al. 2001). Die hier für das KZSN ermittelte MVD lag im Durchschnitt bei 126,5 Gefäßanschnitten pro  $0,5 \text{ mm}^2$  mit einer Varianz von 77 – 181 Gefäßanschnitten pro  $0,5 \text{ mm}^2$ . Im Vergleich dazu zeigte sich die MVD beim NZK mit 208 (+/-126) Gefäßanschnitte pro  $0,5 \text{ mm}^2$  in einer Arbeit von Mertz et al. doppelt so hoch (Mertz et al. 2007). Ein Grund für diese deutlich höhere MVD in NZK könnte sein, daß beide Tumoren grundsätzlich die gleichen Mechanismen zur Gefäßinduktion benutzen, das KZSN jedoch, als deutlich geringer differenzierter Tumor, die Angiogenese quantitativ weniger stimulieren kann, als das höher differenzierte NZK.

Ein gut untersuchter Tumormarker in NZK ist die Metalloendopeptidase CD10. Diese degradiert in ihrer physiologischen Funktion wichtige Peptide der renalen Autoregulation (Langner et al. 2004) und zeigt eine Assoziation zur Neovaskularisation in Tumoren (Konstantinou et al. 2009). In gesundem Nierengewebe kommt CD10 vor allem in der Nierenrinde und dort in Epithelzellen des proximalen Tubulus und des Glomerulums vor, während das Antigen im Nierenstroma und Strukturen des Marks fehlt (Oefner et al. 2004). Mit der

Entwicklung des monoklonalen Antikörpers vom Clon 56C6 ist es seit Ende der 90er Jahre möglich, CD10 in Formalin-fixiertem-Paraffin-eingebettetem Gewebe zuverlässig darzustellen (Chu et al. 2000). Seitdem konnte gezeigt werden, dass CD10 ein auch in nicht-hämatopoietischen Geweben weit verbreitetes Antigen ist und eine hohe Expressionsrate in Zellen des Urogenitaltraktes hat (Chu et al. 2000; Metzgar et al. 1981). Radhakrishnan und Kollegen beschrieben erstmals im Jahre 2004, dass auch das KZSN CD10 exprimiert (Radhakrishnan et al. 2004). In einer kleinen Untersuchungsgruppe zeigten drei von fünf KZSN eine CD10 Expression in fast 50 % der Tumorzellen. Eine Zuordnung der CD10 Expression zu verschiedenen Wachstumsmustern sowie weiteren histopathologischen Parametern wurde in dieser Publikation nicht vorgenommen. In dieser Arbeit konnte in rund 80 % der Fälle eine diffuse CD10 Expression in KZSN nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Radhakrishnan et al. wurde das Antigen jedoch diffus und von wesentlich weniger als 50 % der Tumorzellen exprimiert. Zwischen den verschiedenen Wachstumsmustern ließ sich kein signifikanter Unterschied in der CD10 Expression zeigen.

Neben der Expression in den Tumorzellen selbst konnte ferner eine zuvor nicht beschriebene Expression von CD10 in Endothelzellen und perivaskulären Zellen beobachtet werden. In 70 % der Fälle mit CD10 Expression in Tumorzellen fand sich zusätzlich eine CD10 Expression in perivaskulär gelegenen Zellen. 68 % der tumorzellpositiven Fälle exprimierten CD10 in Gefäßendothelien. Interessanterweise konnte eine Expression in Endothel- und / oder perivaskulären Zellen ausschließlich in der Umgebung von CD10-positiven Tumorzellen beobachtet werden. Eine mögliche Hypothese wäre demnach, dass die Expression von CD10 in den Tumorzellen die Expression von CD10 in den Endothelien induziert. Bemerkenswerterweise zeigte sich auch eine erhöhte Gefäßdichte in CD10-positiven Tumoren gegenüber CD10-negativen Tumoren ( $p < 0,05$ ). Hierzu paßt, dass die

MVD erst dann signifikant ansteigt, wenn zusätzlich zu den Tumorzellen auch Endothelzellen CD10 exprimieren (s. Abb.9 A / 9 B).

Die Ursprungszelle von KZSN ist nach wie vor unbekannt. Daher konnte bisher auch nicht untersucht werden, ob CD10 eine Rolle in der Entstehung des Tumors hat. Langner und Kollegen untersuchten den diagnostischen und prognostischen Wert einer CD10 Expression in klarzelligen NZK, deren Ursprung eine CD10 exprimierende renale Tubuluszelle darstellt. Sie konnten zeigen, dass das klarzellige NZK bei niedrigem Zelldifferenzierungsgrad eine geringere CD10 Expression aufweist, als gut differenzierte Tumoren. Dem gegenüber zeigt das Urothelkarzinom, welches sich vom Urothel des Nierenbeckens ableitet, gegenteilige Zusammenhänge. Die Urothelzelle zeigt keine CD10 Expression (Langner et al. 2004). Eine CD10 Expression in Urothelkarzinomen ist anscheinend mit einer Entdifferenzierung der Tumorzellen und somit mit einem höheren Tumor-Grading und dem Verlust von Oberflächenantigenen assoziiert (Langner et al. 2004). In den hier vorgestellten Daten zum KZSN läßt sich dieser Zusammenhang, von Antigenexpression und Zelldifferenzierungsgrad nicht zeigen, da KZSN generell aus undifferenzierten Zellen bestehen.

Bilalovic und Kollegen konnten zeigen, dass eine Tumorzelle ihr invasives Potential nicht alleine durch die Expression von CD10, sondern im Wesentlichen mit der Fähigkeit zur Interaktion mit den umgebenden Stromazellen erlangt (Bilalovic et al. 2004; Iwaya et al. 2002). Für Karzinome wie das Mammakarzinom und das Endometriumkarzinom ist bekannt, dass eine erhöhte CD10 Expression in Stromazellen mit der Invasivität des Tumors korreliert (Ohishi et al. 2008). Solchen Stromazellen könnten die in dieser Arbeit beschriebenen CD10 positiven perivaskulären Zellen entsprechen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von CD10 positiven Stromazellen in Mammakarzinomen zeigten, dass es sich

wahrscheinlich um einfache Myofibroblasten und Fibroblasten handelt (Makretsov et al. 2007). Vor dem Hintergrund, dass zwischen Stroma und Tumorzelle eine wesentliche Interaktion besteht, die Differenzierung, Tumorwachstum sowie Tumorinvasion beeinflusst, stellt sich auch für das KZSN die Frage nach dem Ursprung und dem Einfluss dieser perivaskulären Zellen (De Wever et al. 2003). Somit könnte es sich auch in KZSN um Fibroblasten oder glatte Muskelzellen handeln bzw. um echte Tumorzellen, wobei die Rolle dieser Zellen auf die Tumorinvasion unklar bleibt, da Tumoren mit perivaskulärer CD10 Expression in dieser Arbeit keinen Zusammenhang zu infiltrativem Wachstum oder der MVD zeigten.

KZSN mit Hirnmetastasen zeigten in vier von fünf Fällen keine CD10 Expression. Zudem fand sich im Vergleich zu Tumoren im Stadium I (lokalisierte Tumoren, komplett reseziert) ein Trend zu einer geringeren Gefäßdichte (Stadium I Tumoren (n=19): MVD 142/0,5mm<sup>2</sup> vs. metastasierte Tumoren (n=6): MVD 110/0,5mm<sup>2</sup>) ( $p < 0,2$ ). Im Gegensatz hierzu verhalten sich Tumoren epithelialen Ursprungs. Für kolorektale Karzinome ist beispielsweise bekannt, dass eine Expression von CD10 in Tumorzellen signifikant mit einem erhöhten Metastasierungsverhalten korreliert (Khanh et al.). Carrel et al. konnten zeigen, dass metastasierte maligne Melanome CD10 stärker exprimieren, als solche ohne metastatische Absiedlungen (Carrel et al. 1993). Des Weiteren ist festgestellt worden, dass Melanome mit CD10 positiven Stromazellen eine erhöhte Proliferationsrate und fortgeschrittene Tumorstadien aufweisen (Bilalovic et al. 2004). In den genannten Tumoren ist demnach die CD10 Expression mit der Tumorinvasion und der Metastasierungstendenz assoziiert.

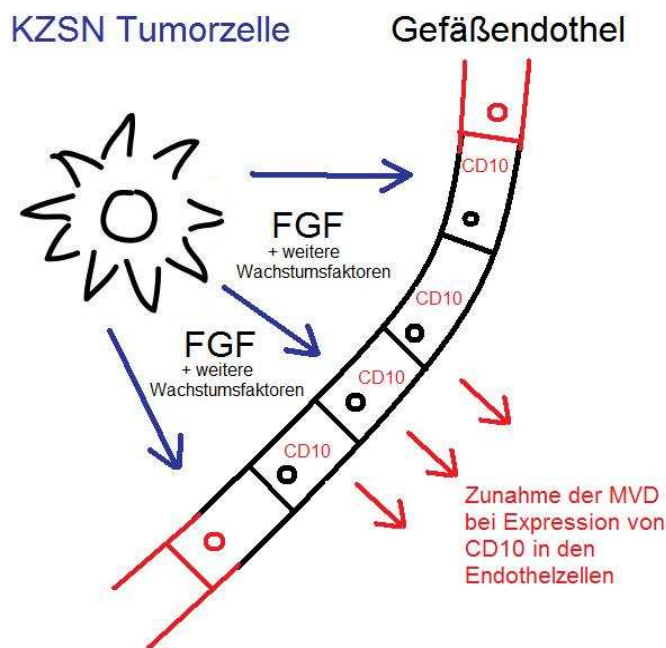
Aufgrund der konstanten Expression des mesenchymalen Markers Vimentin und des vereinzelt extrarenalen Auftretens von KZSN in Weichteilgeweben, wird vermutet, dass sich das KZSN aus primitiven mesenchymalen Zellen entwickeln (Weeks et al. 1991). Das epitheloide Wachstumsmuster könnte demgegenüber für eine

ektodermale Abstammung sprechen (Argani et al. 2000). Neuere Erkenntnisse aus der Arbeitsgruppe um Cutcliffe und Perlman konnten zeigen, dass KZSN ein ähnliches Genexpressionsprofil aufweisen, wie Tumoren neuroektodermalen Ursprungs. In ihrer Arbeit an 15 KZSN aus dem Jahre 2005 konnte eine deutliche Expression neuronaler Marker, eine vermehrte Aktivität der Zellregulationswege des sonic hedgehog Pfades und des Phosphoinositide-3-Kinase Weges sowie ein erhöhtes Vorkommen der Antigene CD117 und des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (engl. epidermal growth factor receptor, EGFR) nachgewiesen werden. Unter den neuronalen Markern zeigte sich der Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor (engl. nerv growth factor receptor, NGFR) als ein vielversprechender Tumormarker für das KZSN (Cutcliffe et al. 2005). Die Frage nach der Ursprungszelle von KZSN bleibt somit offen, da sowohl mesenchymale, als auch neuroektodermale Marker im KZSN exprimiert werden.

bFGF gehört zu einer großen Familie von Wachstumsfaktoren mit mindestens 23 in ihrer Struktur ähnlichen Vertretern, welche eine große Rolle in der Angiogenese bzw. tumorinduzierten Neoangiogenese spielen (Grose et al. 2005; Zhang, X. et al. 2002). Ebenso nehmen sie in gesundem und malignen Gewebe Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Zellen epithelialen, mesenchymalen und neuroektodermalen Ursprungs, fördern die Stammzelldifferenzierung und sind in Gewebheilungsprozesse sowie Osteosynthese involviert (Cao et al. 2008).

Bisher liegen keine Daten zur Expression von bFGF in KZSN vor. Der Wachstumsfaktor bFGF wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl in Tumorzellen (89 %) als auch in Endothelzellen (86 %) gefunden. Im Falle einer bFGF Expression in Endothelzellen wurde eine deutliche Steigerung der Gefäßdichte beobachtet. Diese war jedoch bei einer zu geringen Fallzahl der Subgruppen ohne statistische Signifikanz. In der multivariaten Analyse konnte allerdings gezeigt werden (vgl. Abb.

10), dass für den vermuteten Zusammenhang nicht die Expression von bFGF in Tumorzellen ausschlaggebend war, sondern die koinzidentell gesteigerte CD10 Expression in Endothelzellen. Dennoch zeigte sich ein Trend, dass bei bFGF Expression in Tumorzellen ebenso eine CD10 Expression in Endothelzellen stattfindet (Tab.17). Somit finden sich Hinweise, dass der Wachstumsfaktor bFGF möglicherweise als Stimulus auf die Expression von CD10 in Endothelzellen einwirkt und auf diesem Weg indirekt auf die Gefäßproliferation Einfluss nimmt.



**Abbildung 12: Darstellung des vermuteten Zusammenhangs der bFGF und CD10 Expression und dem daraus resultierenden Zuwachs der Gefäßdichte.**

Dieses Modell (Abb.12) wäre im groben Einklang mit Angaben aus der Literatur (Cao et al. 2008; Hemmerlein et al. 2001), wobei das komplexe Zusammenspiel aus diversen Wachstums- und Hemmfaktoren in der Angiogenese hierbei nicht berücksichtigt wird.

Es wird vermutet, dass genetische Veränderungen der Grund für die Überexpression von Wachstumsfaktoren in malignen Tumoren sind, wodurch sie Wachstumsvorteile erreichen, welche sich beispielsweise in einer erhöhten Gefäßdichte äußern (Cao et



al. 2008). In vorliegender Arbeit sind Tumoren mit bFGF Expression in Tumorzellen sowohl mit einer gesteigerten CD10 Expression in Endothelzellen und vermutlich auch mit einer erhöhten Gefäßdichte assoziiert. Im Unterschied zur Gefäßentwicklung unter dem Einfluss des Wachstumsfaktors VEGF zeigen durch bFGF induzierte Gefäße einen stabilen Gefäßwandaufbau mit Endothelzellen, Perizyten und glatten Muskelzellen (Cao et al. 2008). In Einzelfallstudien zur Expression von VEGF in KZSN konnte gezeigt werden, dass Tumorgefäße, welche von perivaskulären Myofibrozyten stabilisiert werden, nach einer chemotherapeutischen Behandlung weiter existieren und Gefäße ohne perivaskuläre Begleitzellen eine stärkere Schädigung aufwiesen. Das KZSN ist von einem weit verzweigten fibrovaskulären Gefäßnetz durchzogen. Der Aufbau der Gefäßwände wird in der Literatur nur selten beschrieben, dennoch heißt es, dass Fibroblasten und Myofibroblasten die Gefäße begleiten (Boo et al. 2009; Parham 1996). Somit ist eine weiterführende Analyse der Gefäße in KZSN als sehr sinnvoll anzusehen.

#### **4.4 KZSN mit Hirnmetastasen, p53 Expression**

Das KZSN wurde früher auch als „bone metastazing tumor of the kidney“ bezeichnet, da häufig Knochenmetastasen im Verlauf der Erkrankung auftraten. Durch die heute zur Anwendung kommenden Chemotherapien konnte die Inzidenz von Knochenmetastasen deutlich verringert werden. Dem gegenüber steht jetzt das vermehrte Auftreten von Hirnmetastasen (Radulescu et al. 2008; Seibel et al. 2006). Die Ursache für das veränderte Metastasierungsverhalten ist unklar. Eine Erklärung dieses Phänomens könnte die, durch die Blut-Hirn-Schranke hervorgerufene, erniedrigte Konzentration von Chemotherapeutika im Liquor sein.

P53 gehört zu den Tumorsuppressorgenen und ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert. Eine Deletion oder Überexpression im p53-Gen ist bei

kindlichen Wilms-Tumoren mit einer Anaplasie und einer ungünstigen Prognose assoziiert (Govender et al. 1998; Natrajan et al. 2007). In KZSN ist eine Überexpression des p53 Proteins in mehr als 50 % der Tumorzellen nur in Arealen mit anaplastischem Wachstumsmuster zu finden. Tumoren mit abweichenden Wachstumsmustern exprimieren p53 nur selten und in wenigen Tumorzellen (Hsueh et al. 2002). Fälle der NWTSG zeigten im Durchschnitt eine p53 Expression von 11-40 % (Argani et al. 2000). In den hier untersuchten Fällen fand sich eine schwache Expression in nur sieben Tumoren, bei fehlendem anaplastischen Wachstum. Dieses ist übereinstimmend mit Literaturangaben. Auch zeigte sich keine vermehrte p53 Expression in Fällen mit Hirnmetastasierung. Die p53 Expression scheint somit in KZSN nicht mit einer ungünstigen Prognose assoziiert zu sein.

Sechs Tumoren mit zerebraler Metastasierung wurden zusätzlich mittels comparativer genomischer Hybridisierung untersucht. In keinem der Fälle zeigten sich chromosomale Auffälligkeiten. Schuster et al. untersuchten dreißig KZSN aus der NWTSG auf genetische Mutationen. Auch hier wurde u.a. die Methode der CGH angewandt, wobei in nur zwei Fällen ein 1q Zugewinn mit zusätzlichem Verlust von 10q und 4p sowie in zwei weiteren Fällen Aberrationen am Chromosom 19 nachgewiesen werden konnten (Schuster et al. 2003). Diese eher sporadisch auftretenden genetischen Veränderungen decken sich mit dem hier gewonnenen Ergebnis.

#### **4.5 Ausblick**

Die vorliegende Arbeit hat Ergebnisse hervorgebracht, die hinsichtlich der Vaskularisierung, insbesondere im Zusammenhang mit der Expression von bFGF und CD10, sehr interessant sind. Da die Vaskularisierung des Tumors nicht nur für das Wachstum sehr wichtig ist, sondern auch ein Angriffsziel für eine (zusätzliche)

Therapie darstellt, ist die weitere Untersuchung der Vaskularisierung sowie der steuerenden Faktoren für das KZSN bedeutsam. Hier könnten VEGF und VEGFR eine große Rolle spielen.

Da über die molekulargenetischen Veränderungen des KZSN bisher nur sehr wenig bekannt ist, sollten auch hier weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Da die CGH sowohl in unseren Untersuchungen, als auch in publizierten Daten praktisch keine Auffälligkeiten erbracht hat, muß davon ausgegangen werden, dass bei den KZSN keine größeren chromosomalen Zugewinne oder Verluste vorkommen, sondern die genetische Basis dieser Tumoren auf der Ebene von Mutationen, Translokationen und / oder Mechanismen wie „loss of heterozygosity“ oder „loss of imprinting“ zu suchen sind, die sich jeweils mittels CGH nicht nachweisen lassen. Entsprechende Untersuchungsmethoden müssen daher für zukünftige molekulargenetische Untersuchungen eingesetzt werden.

## **5. Zusammenfassung**

In dieser Arbeit wurden 66 Klarzellsarkome der Niere bei Kindern des Kindertumorregisters der deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) (zwischen 1982-2005) systematisch aufgearbeitet. Ziel war es, das histologische Wachstum dieses äußerst seltenen Kindertumors zu charakterisieren, die Gefäßdichte mittels MVD zu quantifizieren sowie die Expression von CD10, des Tumorsuppressorgens p53 und des Wachstumsfaktors bFGF zu untersuchen. Tumoren, welche eine Hirnmetastasierung aufwiesen und als besonders aggressive KZSN gelten, wurden zusätzlich mittels CGH genetisch aufgearbeitet.

Es zeigte sich, dass das klassische Wachstumsmuster, trotz vorangegangener neoadjuvanter Chemotherapie der untersuchten Tumoren, in gleicher Ausprägung zu finden war, wie in Tumoren amerikanischer Referenzstudien, die primär operiert

worden waren. Die Wachstumsmuster sklerosierend und myxoid fanden sich vermehrt in dem Untersuchungsgut und die Inzidenz dieser Muster wich deutlich von dem Vorkommen in der amerikanischen Studie ab. Dies wurde am ehesten als Folge der chemotherapeutischen Auswirkungen gesehen. Das anaplastische Wachstum war als einziges Muster nicht in den hier untersuchten Tumoren vertreten.

Die Analyse der CD10 Expression ergab, dass CD10 von 80 % der Tumoren exprimiert wurde und sowohl in Tumorzellen, in Endothelzellen als auch in ihrer Funktion und Abstammung bisher nicht definierten perivaskulären Zellen lokalisiert war.

In Bezug auf die Vaskularisierung zeigte das KZSN in der vergleichenden Analyse Parallelen zum ebenfalls gut vaskularisierten NZK. Wie beim NZK fand sich auch bei den KZSN eine signifikante Steigerung der Gefäßdichte, wenn eine Expression von CD10 vorlag. Hierbei ließ sich die CD10 Expression in Endothelzellen als unabhängiger Faktor für eine erhöhte Gefäßdichte abgrenzen. Diese CD10 Expression in Endothelzellen zeigte sich nur dann, wenn auch Tumorzellen CD10 exprimierten. Ebenfalls vereinbar mit Ergebnissen aus Studien am NZK fand sich eine Expression von CD10 in Endothelzellen, wenn eine Expression von bFGF in Tumorzellen nachgewiesen werden konnte. Daher erscheint es schlüssig, dass auch in KZSN die Tumorzelle mittels der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, wie hier bFGF, einen indirekten Einfluss auf die Tumorangio-genese besitzt.

Vergleichbar zu anderen Studien am KZSN fanden sich bei Fällen mit Fernmetastasierung weder eine erhöhte p53 Expression, noch chromosomale Abberationen, die sich mittels CGH hätten nachweisen lassen.

## 6. Anhang

| <b>Tumoren der Niere im Kindesalter</b>   | <b>%</b> |
|---|----------|
| Wilms Tumor   | 80       |
| Mesoblastisches Nephrom   | 5        |
| KZSN  | 4        |
| Rhabdomyosarkom   | 2        |
| Zystisches Nephrom, Adenom, Angiomyolipom,<br>Nierenzellkarzinom, neuroepitheliale Tumoren, renales<br>Lymphom u.a. | 9        |

**Tabelle 19: Prozentuale Häufigkeit von Nierentumoren im Kindesalter (Perlman 2005).**

| <b>Wachstumsmuster</b> | <b>Charakteristika</b>  |
|------------------------|---|
| klassisch              | Ovoid bis spindelzellige Tumorzellen (TZ) mit normochromen Nuklei und blassem Zytoplasma, umgeben von klarer mukopolysaccharider Interzellulärmatrix und durchflochten von einem dicht verzweigten Gefäßnetz aus fibrovaskulären Septen, mit Ausbildung von Tumorzellnestern. |
| spindelzellig          | Spindelzellige TZ, die Interzellulärmatrix ist reduziert.   |
| zellulär               | Zellreiches Tumorgewebe mit eher kleinen runden TZ, überlappenden Zellkernen und geringer Interzellulärmatrix.  |
| myxoid                 | TZ zeigen sich umgeben von amphophiler muzinöser Extrazellulärmatrix, z.T. zeigen diese Ähnlichkeit mit Pseudozysten.   |

|                           |   |
|---------------------------|---|
| epitheloid                | TZ sind in bandförmigen Trabekeln von 1-2 Zellreihen angeordnet und in größerem Abstand zu fibrovaskulären Septen gelegen.  |
| sklerosierend             | Hypozelluläres Tumorgewebe mit osteoid-ähnlichen Ablagerungen, teils kollagenös oder hyalin.  |
| storiform<br>(verwirbelt) | Gilt als eine Form des spindelzelligen Wachstumsmusters. Beide Zellkomponenten (cord und septal cells) zeigen sich spindelzellig, die Abgrenzung der Komponenten verwischt.                         |
| palisadenartig            | Zellkerne und Zytoplasma der eher spindelzelligen TZ zeigen sich parallel zueinander angeordnet, in sogenannten „ <i>verocay bodies</i> “, die Septen zeigen sich von kollagenöser Materie umgeben. |
| anaplastisch              | Zellkerne zeigen sich hyperchromatisch und vergrößert, mit atypischen Mitosenstadien  |

**Tabelle 20: Wachstumsmuster und ihre Charakteristika in KZSN (Argani et al. 2000).**

Die Einteilung der Tumorstadien (Tab.21) erfolgt nach den Kriterien der amerikanischen NWTSG 5. Alle KZSN werden unabhängig vom Wachstumstyp anhand ihrer Ausdehnung nach TNM klassifiziert.

|            |   |
|------------|---|
| Stadium I  | Der Tumor ist auf die Niere beschränkt, kann vollständig reseziert werden. Keine Infiltration der Nierenkapsel, keine vorherige Nierenbiopsie oder Nierenruptur, keine Nierensinusveneninfiltration.                              |
| Stadium II | Tumorausbreitung über die Niere hinaus, mit möglichen Merkmalen: Penetration der Nierenkapsel, ausgeprägte Infiltration benachbarten Weichteilgewebes oder extrarenaler Gefäßstrukturen. Tumor kann vollständig reseziert werden. |

|             |   |
|-------------|---|
| Stadium III | Tumorresektion ist inkomplett, in den Aspekten abdomino-pelvinen Lymphknotenbefalls, Infiltration bzw. Ruptur des Peritoneum,, Tumor ist irresektabel, praeoperative Tumorbiose, operationsbedingte Tumorzellverteilung sowie Tumorteilung bei Operation. |
| Stadium IV  | Der Tumor metastasiert hämatogen oder Befall von Lymphknoten außerhalb der abdomino-pelvinen Region.  |
| Stadium V   | Bilateraler Nierentumor. Beide Seiten sollten einem eigenen Staging unterliegen.  |

**Tabelle 21: Stadieneinteilung des KZSN nach der NWTSG 5.**

## 7. Literaturverzeichnis

1. Ahmed, H.U., Arya, M., Levitt, G., Duffy, P.G., Mushtaq, I., Sebire, N.J. (2007): Part I: Primary malignant non-Wilms' renal tumours in children. *Lancet Oncol*, 8, 730-7.
2. Argani, P., Perlman, E.J., Breslow, N.E., Browning, N.G., Green, D.M., D'Angio, G.J., Beckwith, J.B. (2000): Clear cell sarcoma of the kidney: a review of 351 cases from the National Wilms Tumor Study Group Pathology Center. *Am J Surg Pathol*, 24, 4-18.
3. Balarezo, F.S., Joshi, V.V. (2001): Clear cell sarcoma of the pediatric kidney: detailed description and analysis of variant histologic patterns of a tumor with many faces. *Adv Anat Pathol*, 8, 98-108.
4. Barnard, M., Bayani, J., Grant, R., Zielenska, M., Squire, J., Thorner, P. (2000): Comparative genomic hybridization analysis of clear cell sarcoma of the kidney. *Med Pediatr Oncol*, 34, 113-6.
5. Beckwith, J.B., Palmer, N.F. (1978): Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study. *Cancer*, 41, 1937-48.

6. Bilalovic, N., Sandstad, B., Golouh, R., Nesland, J.M., Selak, I., Torlakovic, E.E. (2004): CD10 protein expression in tumor and stromal cells of malignant melanoma is associated with tumor progression. *Mod Pathol*, 17, 1251-8.
7. Boo, Y.J., Fisher, J.C., Haley, M.J., Cowles, R.A., Kandel, J.J., Yamashiro, D.J. (2009): Vascular characterization of clear cell sarcoma of the kidney in a child: a case report and review. *J Pediatr Surg*, 44, 2031-6.
8. Cao, Y., Cao, R., Hedlund, E.M. (2008): Regulation of tumor angiogenesis and metastasis by FGF and PDGF signaling pathways. *J Mol Med*, 86, 785-9.
9. Carmeliet, P. (2003): Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 9, 653-60.
10. Carrel, S., Zografos, L., Schreyer, M. (1993): Expression of CALLA/CD10 on human melanoma cells. *Melanoma Res*, 319-323.
11. Charles, A.K., Vujanic, G.M., Berry, P.J. (1998): Renal tumours of childhood. *Histopathology*, 32, 293-309.
12. Chu, P., Arber, D.A. (2000): Paraffin-section detection of CD10 in 505 nonhematopoietic neoplasms. Frequent expression in renal cell carcinoma and endometrial stromal sarcoma. *Am J Clin Pathol*, 113, 374-82.
13. Cutcliffe, C., Kersey, D., Huang, C.C., Zeng, Y., Walterhouse, D., Perlman, E.J. (2005): Clear cell sarcoma of the kidney: up-regulation of neural markers with activation of the sonic hedgehog and Akt pathways. *Clin Cancer Res*, 11, 7986-94.
14. De Wever, O., Mareel, M. (2003): Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol*, 200, 429-47.
15. du Manoir, S., Kallioniemi, O.P., Lichter, P., Piper, J., Benedetti, P.A., Carothers, A.D., Fantes, J.A., Garcia-Sagredo, J.M., Gerdes, T., Giollant, M., et al. (1995): Hardware and software requirements for quantitative analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 19, 4-9.
16. du Manoir, S., Schrock, E., Bentz, M., Speicher, M.R., Joos, S., Ried, T., Lichter, P., Cremer, T. (1995): Quantitative analysis of comparative genomic hybridization.



Cytometry, 19, 27-41.

17. du Manoir, S., Speicher, M.R., Joos, S., Schrock, E., Popp, S., Dohner, H., Kovacs, G., Robert-Nicoud, M., Lichter, P., Cremer, T. (1993): Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet*, 90, 590-610.

18. Folkman, J., Watson, K., Ingber, D., Hanahan, D. (1989): Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*, 339, 58-61.

19. Govender, D., Harilal, P., Hadley, G.P., Chetty, R. (1998): p53 protein expression in nephroblastomas: a predictor of poor prognosis. *Br J Cancer*, 77, 314-8.

20. Greaves, M.F., Brown, G., Rapson, N.T., Lister, T.A. (1975): Antisera to acute lymphoblastic leukemia cells. *Clin Immunol Immunopathol*, 4, 67-84.

21. Green, D.M., Breslow, N.E., Beckwith, J.B., Moksness, J., Finklestein, J.Z., D'Angio, G.J. (1994): Treatment of children with clear-cell sarcoma of the kidney: a report from the National Wilms' Tumor Study Group. *J Clin Oncol*, 12, 2132-7.

22. Grose, R., Dickson, C. (2005): Fibroblast growth factor signaling in tumorigenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 16, 179-86.

23. Guarda, L.A., Ayala, A.G., Jaffe, N., Sutow, W.W., Bracken, R.B. (1984): Chemotherapy-induced histologic changes in Wilms' tumors. *Pediatr Pathol*, 2, 197-206.

24. Hemmerlein, B., Kugler, A., Ozisik, R., Ringert, R.H., Radzun, H.J., Thelen, P. (2001): Vascular endothelial growth factor expression, angiogenesis, and necrosis in renal cell carcinomas. *Virchows Arch*, 439, 645-52.

25. Hsu, S.M., Raine, L. (1981): Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*, 29, 1349-53.

26. Hsueh, C., Wang, H., Gonzalez-Crussi, F., Lin, J.N., Hung, I.J., Yang, C.P., Jiang, T.H. (2002): Infrequent p53 gene mutations and lack of p53 protein expression in clear cell sarcoma of the kidney: immunohistochemical study and mutation analysis

of p53 in renal tumors of unfavorable prognosis. *Mod Pathol*, 15, 606-10.

27. Imao, T., Egawa, M., Takashima, H., Koshida, K., Namiki, M. (2004): Inverse correlation of microvessel density with metastasis and prognosis in renal cell carcinoma. *Int J Urol*, 11, 948-53.

28. Iwaya, K., Ogawa, H., Izumi, M. (2002): Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma: a new predictor of clinical outcome. *Virchows Arch*, 589-93.

29. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D. (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258, 818-21.

30. Kallioniemi, O.P., Kallioniemi, A., Piper, J., Isola, J., Waldman, F.M., Gray, J.W., Pinkel, D. (1994): Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 10, 231-43.

31. Khanh, D.T., Mekata, E., Mukaisho, K.I., Sugihara, H., Shimizu, T., Shiomi, H., Murata, S., Naka, S., Yamamoto, H., Endo, Y., Tani, T. Prognostic Role of Cd10-Positive Myeloid Cells in Association with Tumor Budding at the Invasion Front of Colorectal Cancer. *Cancer Sci*.

32. Kidd, J.M. (1970): Exclusion of certain renal neoplasms from the category of Wilms tumor (Abstract). *Am J Pathol*, 58, 611.

33. Konstantinou, K., Yamamoto, K., Ishibashi, F., Mizoguchi, Y., Kurata, M., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Sawabe, M., Ohta, M., Miyakoshi, S., Crawley, J.T., Kitagawa, M. (2009): Angiogenic mediators of the angiopoietin system are highly expressed by CD10-positive lymphoma cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 144, 696-704.

34. Langner, C., Ratschek, M., Rehak, P., Schips, L., Zigeuner, R. (2004): CD10 is a diagnostic and prognostic marker in renal malignancies. *Histopathology*, 45, 460-7.

35. Leek, R.D. (2001): The prognostic role of angiogenesis in breast cancer.

Anticancer Res, 21, 4325-31.

36. Makretsov, N.A., Hayes, M., Carter, B.A., Dabiri, S., Gilks, C.B.,Huntsman, D.G. (2007): Stromal CD10 expression in invasive breast carcinoma correlates with poor prognosis, estrogen receptor negativity, and high grade. *Mod Pathol*, 20, 84-9.

37. Mertz, K.D., Demichelis, F., Kim, R., Schraml, P., Storz, M., Diener, P.A., Moch, H.,Rubin, M.A. (2007): Automated immunofluorescence analysis defines microvessel area as a prognostic parameter in clear cell renal cell cancer. *Hum Pathol*, 38, 1454-62.

38. Metzgar, R.S., Borowitz, M.J., Jones, N.H.,Dowell, B.L. (1981): Distribution of common acute lymphoblastic leukemia antigen in nonhematopoietic tissues. *J Exp Med*, 154, 1249-54.

39. Mikulic, D., Ilic, I., Cepulic, M., Giljevic, J.S., Orlic, D., Zupancic, B., Fattorini, I.,Seiwerth, S. (2006): Angiogenesis and Ewing sarcoma--relationship to pulmonary metastasis and survival. *J Pediatr Surg*, 41, 524-9.

40. Morgan, E.,Kidd, J.M. (1978): Undifferentiated sarcoma of the kidney: a tumor of childhood with histopathologic and clinical characteristics distinct from Wilms' tumor. *Cancer*, 42, 1916-21.

41. Murphy, W.M., Beckwith, J.B.,Farrow, G.M. (1994): Atlas of Tumor Pathology; Tumors of the kidney, bladder, and related urinary structures In: Pathology, A.F.I.o. (Hrsg.), Fascicle 11, (Aufl.), vol. 3,

42. Nanus, D.M. (2003): Of peptides and peptidases: the role of cell surface peptidases in cancer. *Clin Cancer Res*, 9, 6307-9.

43. Natrajan, R., Little, S.E., Sodha, N., Reis-Filho, J.S., Mackay, A., Fenwick, K., Ashworth, A., Perlman, E.J., Dome, J.S., Grundy, P.E., Pritchard-Jones, K.,Jones, C. (2007): Analysis by array CGH of genomic changes associated with the progression or relapse of Wilms' tumour. *J Pathol*, 211, 52-9.

44. Oefner, C., Roques, B.P., Fournie-Zaluski, M.C.,Dale, G.E. (2004): Structural

analysis of neprilysin with various specific and potent inhibitors. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60, 392-6.

45. Ohishi, Y., Kaku, T., Kobayashi, H., Aishima, S., Umekita, Y., Wake, N., Tsuneyoshi, M. (2008): CD10 immunostaining distinguishes atypical polypoid adenomyofibroma (atypical polypoid adenomyoma) from endometrial carcinoma invading the myometrium. *Hum Pathol*, 39, 1446-53.

46. Parham, D.M. (1996): *Pediatric neoplasia: morphology and biology*.

47. Perlman, E.J. (2005): *Pediatric renal tumors: practical updates for the pathologist*. *Pediatr Dev Pathol*, 8, 320-38.

48. Piper, J., Rutovitz, D., Sudar, D., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Waldman, F.M., Gray, J.W., Pinkel, D. (1995): Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry*, 19, 10-26.

49. Radhakrishnan, A., Parast, M.M., Amin, B.M. (2004): CD10 positivity in clear cell sarcoma of the kidney: utility in the differential diagnosis of pediatric renal neoplasms. *Modern Pathology*, 17, 265-275.

50. Radulescu, V.C., Gerrard, M., Moertel, C., Grundy, P.E., Mathias, L., Feusner, J., Diller, L., Dome, J.S. (2008): Treatment of recurrent clear cell sarcoma of the kidney with brain metastasis. *Pediatr Blood Cancer*, 50, 246-9.

51. Raica, M., Cimpean, A.M., Anghel, A. (2007): Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) does not correlate with microvessel density in renal cell carcinoma. *Neoplasma*, 54, 278-84.

52. Reinhard, H., Semler, O., Burger, D., Bode, U., Flentje, M., Gobel, U., Gutjahr, P., Leuschner, I., Maass, E., Niggli, F., Scheel-Walter, H.G., Stockle, M., Thuroff, J.W., Troger, J., Weirich, A., von Schweinitz, D., Zoubek, A., Graf, N. (2004): Results of the SIOP 93-01/GPOH trial and study for the treatment of patients with unilateral nonmetastatic Wilms Tumor. *Klin Padiatr*, 216, 132-40.

53. Ried, T., Arnold, N., Ward, D.C., Wienberg, J. (1993): *Comparative high-*

resolution mapping of human and primate chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 18, 381-6.

54. Ried, T., Liyanage, M., du Manoir, S., Heselmeyer, K., Auer, G., Macville, M., Schrock, E. (1997): Tumor cytogenetics revisited: comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *J Mol Med*, 75, 801-14.

55. Schuster, A.E., Schneider, D.T., Fritsch, M.K., Grundy, P., Perlman, E.J. (2003): Genetic and genetic expression analyses of clear cell sarcoma of the kidney. *Lab Invest*, 83, 1293-9.

56. Sebire, N.J., Vujanic, G.M. (2009): Paediatric renal tumours: recent developments, new entities and pathological features. *Histopathology*, 54, 516-28.

57. Seibel, N.L., Li, S., Breslow, N.E., Beckwith, J.B., Green, D.M., Haase, G.M., Ritchey, M.L., Thomas, P.R., Grundy, P.E., Finklestein, J.Z., Kim, T., Shochat, S.J., Kelalis, P.P., D'Angio, G.J. (2004): Effect of duration of treatment on treatment outcome for patients with clear-cell sarcoma of the kidney: a report from the National Wilms' Tumor Study Group. *J Clin Oncol*, 22, 468-73.

58. Seibel, N.L., Sun, J., Anderson, J.R., Breslow, N.E., Perlman, E.J., Ritchey, M.L., Thomas, P.R., Coppes, M.J., Grundy, P.E., Green, D.M. (2006): Outcome of clear cell sarcoma of the kidney (CCSK) treated on the National Wilms Tumor Study-5 (NWT5). *Journal of Clinical Oncology*, 24, 9000.

59. Skoldenberg, E.G., Christiansson, J., Sandstedt, B., Larsson, A., Lackgren, G., Christofferson, R. (2001): Angiogenesis and angiogenic growth factors in Wilms tumor. *J Urol*, 165, 2274-9.

60. van den Heuvel-Eibrink, M.M., Grundy, P., Graf, N., Pritchard-Jones, K., Bergeron, C., Patte, C., van Tinteren, H., Rey, A., Langford, C., Anderson, J.R., de Kraker, J. (2008): Characteristics and survival of 750 children diagnosed with a renal tumor in the first seven months of life: A collaborative study by the SIOP/GPOH/SFOP, NWTSG, and UKCCSG Wilms tumor study groups. *Pediatr*

Blood Cancer, 50, 1130-4.

61. Weeks, D.A., Beckwith, J.B., Mierau, G.W., Zuppan, C.W. (1991): Renal neoplasms mimicking rhabdoid tumor of kidney. A report from the National Wilms' Tumor Study Pathology Center. *Am J Surg Pathol*, 15, 1042-54.
62. Weidner, N. (1995): Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol*, 147, 9-19.
63. Weirich, A., Leuschner, I., Harms, D., Vujanic, G.M., Troger, J., Abel, U., Graf, N., Schmidt, D., Ludwig, R., Voute, P.A. (2001): Clinical impact of histologic subtypes in localized non-anaplastic nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH. *Ann Oncol*, 12, 311-9.
64. Yan, H.C., Baldwin, H.S., Sun, J., Buck, C.A., Albelda, S.M., DeLisser, H.M. (1995): Alternative splicing of a specific cytoplasmic exon alters the binding characteristics of murine platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1). *J Biol Chem*, 270, 23672-80.
65. Zhang, X., Yamashita, M., Uetsuki, H., Kakehi, Y. (2002): Angiogenesis in renal cell carcinoma: Evaluation of microvessel density, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases. *Int J Urol*, 9, 509-14.
66. Zhang, Y., Wu, X.H., Cao, G.H., Li, S. (2004): Relationship between expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and angiogenesis in renal cell carcinoma. *Ai Zheng*, 23, 326-9.

## 8. Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn **Prof. Dr. Ivo Leuschner**, möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas und die Bereitstellung der Arbeitsräume danken. Darüberhinaus stand er mir mit herausragendem Fachwissen und anregender Kritik zur Seite.

Herzlich bedanken möchte ich mich an zweiter Stelle bei Herrn Dr. Christian Vokuhl, der mich bei inhaltlichen und praktischen Fragen immer freundlich und motivierend unterstützte, mich geduldig in die Labormethodik einführte und diese mit mir auswertete.

Stellvertretend möchte ich Frau Sylvia Holz und Frau Maike Pacena für die Hilfe bei der Anfertigung der Schnittpräparate und der immunhistochemischen Färbungen, Frau Corinna Pahl für die Hilfe bei der Beschaffung von Patientendaten und Herrn Prof. Dr. Bence Sipos und seinem Team für die vielen Färbeversuche zu Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren im KZSN danken.

Dem Studienteam der Nephroblastomstudie und insbesondere Herrn Dr. Rhoikos Furtwängler möchte ich für die konstruktiven und kritischen Anmerkungen und für die gute Zusammenarbeit bei der Datenbeschaffung Dank sagen.

Ein sehr persönlicher Dank geht an Frau Dr. Birte Kretschmer und an Herrn Dr. Jan Borggreffe, die mich mit ihren Erfahrungen, wertvollen Ratschlägen und kreativen Ideen bei der Fertigstellung der Arbeit unterstützten.

Meinen wunderbaren Eltern Annette und Dr. Bernd-Harald Kretschmer ist diese Arbeit mit großem Dank gewidmet.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Inga Kretschmer  
 Geburtsdatum: 06.12.1980  
 Geburtsort: Berlin-Wilmersdorf  
 Staatsangehörigkeit: Deutsch  
 Familienstand: Ledig

### Schulische Laufbahn:

1993-2000 Gymnasium Wilhelm-Raabe-Schule, Lüneburg  
 1991-1993 Orientierungsstufe Stadtmitte, Lüneburg  
 1989-91 Grundschule im Roten Feld, Lüneburg  
 1987-89 Grundschule Am Rüdeshheimer Platz, Berlin  
 1985-86 Grundschule Marina School, Gambia/Westafrika

### Beruflicher Werdegang:

seit 10/2011 Assistenzärztin in der Klinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsklinikum Köln  
 05/2009-07/2011 Assistenzärztin, Klinikum Kassel, Dermatologie  
 2002-2008 Studium der Humanmedizin, an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
 2001/2002 Ausbildung zur kaufm. Fremdsprachenassistentin, Staatl. Fremdsprachenschule Hamburg  
 2000/2001 12 monatiger Aupair-Auslandsaufenthalt in Australien