



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Pathologie der Universität zu Lübeck

Direktorin: Prof. Dr. med. Verena- Wilbeth Sailer

Expressionsanalyse von histonmodifizierenden Enzymen und deren Rolle im Nierenzellkarzinom

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- **Aus der Sektion Medizin** -

vorgelegt von
Alexandra Bourguignon geb. Kuczynski
aus Hamburg

Lübeck 2025

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Jutta Kirfel

Ko- Betreuer: Prof. Dr. med. Karl- Friedrich Klotz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Mario Kramer

Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 08.07.2025

- Promotionskommission der Sektion Medizin-

I. Inhaltsverzeichnis

II.	Abkürzungsverzeichnis	5
1	Einleitung und Fragestellung	7
1.1	Nierenzellkarzinome	7
1.2	Chromatinmodifizierende Enzyme	9
1.2.1	LSD1	12
1.2.2	KDM2B und KDM2A.....	14
1.2.3	JARID1C	15
1.3	Epigenetische Veränderungen im Zusammenhang mit malignen Neoplasien	17
1.4	Ziele dieser Arbeit	18
2	Material.....	20
2.1	Geräte.....	20
2.2	Verbrauchsmaterialien	20
2.3	Software	21
2.4	Antikörper	21
2.5	Chemikalien und Reagenzien	21
2.6	Färbeprotokolle	22
2.6.1	Färbeprotokoll der Immunhistochemischen Anfärbungen	22
2.6.2	Färbeprotokoll der Hämatoxylin- Eosin- Färbungen	23
3	Methoden	24
3.1	Aufbau der Kohorte.....	24
3.2	Tissue Micro Arrays	25
3.3	Immunhistochemische Anfärbungen	27
3.4	Statistische Auswertung.....	28
4	Ergebnisse.....	30
4.1	Expression von LSD1	30

4.2	Expression von KDM2B	34
4.3	Expression von JARID1C.....	43
5	Diskussion	52
5.1	LSD1 zeigt sowohl im Normalgewebe der Niere als auch im Nierenzellkarzinom eine starke Expression	52
5.2	KDM2B wird im Zellkern von klarzelligem Nierenzellkarzinomen signifikant überexprimiert und korreliert mit dem pT- Status	55
5.3	Die Expression von JARID1C im Nierenzellkarzinom korreliert mit G-Status und pT- Status.....	57
5.4	Limitationen dieser Arbeit.....	60
5.5	Ausblick über die Funktion chromatinmodifizierender Enzyme im Nierenzellkarzinom	61
6	Zusammenfassung	64
7	Literaturverzeichnis.....	65
8	Abbildungsverzeichnis	74
9	Tabellenverzeichnis	75
10	Anhänge	76
10.1	Arbeitsschritte der immunhistochemischen Anfärbungen	76
10.1.1	Färbeprotokoll KDM2B	76
10.1.2	Färbeprotokoll Hämatoxylin- Eosin- Färbung nach Gill.....	77
10.2	Ethikvotum der Universität zu Lübeck	78
10.3	Vorstellung des Projekts als Kongressbeitrag	78
10.4	Stipendium.....	78
11	Danksagung	79
12	Versicherung an Eides Statt	80

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AML	Akute myeloische Leukämie
BHC80	PHD finger protein 21A gene
BPCA	Blocking peptide competition assay
ca.	Circa
CH	Schweiz
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
CO	Colorado
CoREST	Repressor element 1 silencing transcription factor Corepressor
D	Deutschland
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ebd.	Ebenda
EMT	Epithelial- mesenchymale Transition
et al.	Et alia
etc.	Et cetera
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FAD	Flavin- Adenin- Dinucleotid
FBXW7	F-box and WD repeat domain containing 7
Fe ²⁺	Eisen (II)- Kation, zweiwertiges Eisen
FOXA1	Forkhead box A1
H2A	Histon 2A
H2B	Histon 2B
H3	Histon 3
H3K27me3	Trimethylierung des Lysinrests K27 am Histon- Protein H3
H3K36me3	Trimethylierung des Lysinrests K36 am Histon- Protein H3
H3K4me3	Trimethylierung des Lysinrests K4 am Histon- Protein H3
H3K9me2	Dimethylierung am Lysinrest K9am Histon- Protein H3
H4	Histon 4
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDMT	Histondemethylase
HMT	Histonmethyltransferase
IARC	International agency on cancer
J	Japan
JARID1C	Lysine (K)-specific demethylase 5C (Synonyme: KDM5C, JARID1C, DXS1272E, XE169, SMCX)
JmjC	Jumonji- Domäne
K27	Lysinrest K27
K36	Lysinrest K36
K4	Lysinrest K4
K9	Lysinrest K9
KDM1A	Lysine (K)-specific demethylase 1A (Synonyme: LSD1, KDM1, Lysine-specific histone demethylase 1A, KIAA0601, BHC110, AOF2), Lysine (K)-specific demethylase 1A (Synonyme: LSD1, KDM1, Lysine-specific histone demethylase 1A, KIAA0601, BHC110, AOF2)

KDM2A	Lysine (K)-specific demethylase 2A (Synonyme: KDM2A, JHDM1A, FBL11, CXXC8, FBL7, F -box and leucine-rich repeat protein 11, KIAA1004, LILINA, FBXL11)
KDM2B	Lysine (K)-specific demethylase 2B (Synonyme: KDM2B, JHDM1B, PCCX2, CXXC2, F -box and leucine-rich repeat protein 10, FBXL10, Fbl10)
KDM4B	Lysine (K)-specific demethylase 4B (Synonyme: KDM4B, KIAA087, TDRD14B, JMJD2B)
KDM5C	Lysine (K)-specific demethylase 5C (Synonyme: KDM5C, JARID1C, DXS1272E, XE169, SMCX), lysine (K)-specific demethylase 5C (Synonyme: KDM5C, JARID1C, DXS1272E, XE169, SMCX)
KDM7	Lysine (K)-specific demethylase 7 (Synonyme: KIAA1718, JHDM1D, JmjC domain-containing histone demethylation protein 1D, histone lysine demethylase JHDM1D)
KIRC	Klarzelliges Nierenzellkarzinom
LRR	Leucin- rich- repeats
LSD1	Lysine (K)-specific demethylase 1A (Synonyme: LSD1, KDM1, lysine-specific histone demethylase 1A, KIAA0601, BHC110, AOF2)
mm	Milimeter
mTor	Mammalian target of rapamycin
NCC	Nierenzellkarzinom; Nierenzellkarzinome
ncRNAs	Noncoding RNAs
NSCLC	Non-small-cell lung cancer
NY	New York
ORY-1001	Ladademstat
Phd	Plant homeodomain
Prm1	Protamine 1 gene
RKI	Robert Koch Institut
SETD2	SET domain containing 2
sog.	Sogenannt
Tab.	Tabelle
TCGA	The cancer genome atlas
TMA	Tissue micro array
TNM	Tumor (T), nodes (N), metastases (M)
Tnp1	Transition nuclear protein 1 gene
U.S.A.	The United States of America
UK	United Kingdom
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WA	Washington
ZF	Zinkfinger

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Nierenzellkarzinome

Laut Berechnungen der International Agency for Research on Cancer (IARC) starben im Jahr 2020 ca. 179.368 Menschen weltweit an Nierenzellkarzinomen und 431.288 neue Fälle wurden diagnostiziert, somit sind Nierenzellkarzinome (NCC) für ca. 2% aller karzinombedingten Todesfälle weltweit verantwortlich (Sung et al. 2021). Die Diagnosestellung eines Nierenzellkarzinoms erfolgt meist als Zufallsbefund während bildgebenden Untersuchungen wie Ultraschall, Computertomographie etc. oder im bereits symptomatischen, metastasierten Stadium (Moch et al. 2016; Xing und He 2016).

In Deutschland betrug die Zahl der im Jahr 2014 gemeldeten Nierenzellkarzinomfälle erwachsener Personen ca. 14.860, unter ihnen 5430 Frauen (Fiebig und Kraywinkel 2019). Im Jahr 2019 waren es 13.993 Personen, darunter 4778 Frauen und 9215 Männer (Auszug aus der Statistik des RKI 2023). Von der amtlichen Todesursachenstatistik in Deutschland wurden 5150 Todesfälle durch Nierenzellkarzinome im Jahr 2019 registriert (RKI, 2023). Die altersstandardisierten Erkrankungsraten verlaufen seit 1999 sowohl bei Männern und Frauen relativ konstant und die Sterberaten sind für beide Geschlechter leicht rückläufig (Fiebig und Kraywinkel 2019). Männer sind im Vergleich zu Frauen deutlich häufiger vom Nierenzellkarzinom betroffen (ca. 2:1), eine Tatsache, für die es bisher noch keine Erklärung gibt (Moch et. al 2016). Da sich dieses Inzidenzverhältnis konstant über die Zeit beobachten lässt, geht man davon aus, dass nicht nur soziokulturelle oder den Lebensstil betreffende Verhaltensweisen (z.B. metabolisches Syndrom, Nikotinkonsum) für die unterschiedlichen Inzidenzzahlen von Männern und Frauen verantwortlich sind (Mancini et al. 2020). Diskutiert wird hierbei auch, dass Steroidhormone eine mögliche Rolle bezüglich der unterschiedlichen Inzidenz des Nierenzellkarzinoms bei Männern und Frauen spielen könnten (Mancini et al. 2020).

Hinsichtlich der Verteilung der Tumorstadien zum Zeitpunkt der Diagnose sowie den Überlebensaussichten gibt es dagegen keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Geschlechtern (Fiebig und Kraywinkel 2019).

Auffällig ist, dass das Nierenzellkarzinom eine höhere Inzidenz in Industrienationen (Europa, Nordamerika, Australien) aufweist als in Teilen der Erde mit niedrigem sozioökonomischem Entwicklungsstand (Afrika, Ostasien) (Moch et. al 2016). Zu den

möglichen ätiologischen Faktoren dieser Tumorerkrankung zählen Übergewicht, Rauchen und Bluthochdruck (S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms 2023; Weikert et al. 2008; Renehan et al. 2008). Auch erworbene Nierenerkrankungen, Niereninsuffizienz im Endstadium sowie Exposition gegenüber bestimmten chemischen Substanzen wie Trichlorethylen bedingen ein erhöhtes Risiko für Nierenzellkarzinome (S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms 2023; Moch et al. 2016). Die meisten Fälle des Nierenzellkarzinoms treten sporadisch auf, nur in 2-4% liegt eine familiäre Prädisposition vor (Fiebig und Kraywinkel 2019). Mutationen im von-Hippel-Lindau-Gen, einem Tumorsuppressor, stehen in einer engen Verbindung mit dem Auftreten des klarzelligen Nierenzellkarzinoms: In 85% der sporadischen, nicht-familiär bedingten Fälle ist eine Mutation beider Allele oder eine epigenetische Inaktivierung des von-Hippel-Lindau-Gens nachweisbar (Maher 2013).

Das Nierenzellkarzinom ist die häufigste maligne Tumorerkrankung der Niere, wobei mehrere Subtypen existieren, die sich histomorphologisch oder in der Anfärbbarkeit ihrer Zellen unterscheiden. Das klarzellige Nierenzellkarzinom stellt hierbei mit 70-80% der Fälle den häufigsten Subtyp dar (Xing und He 2016). Es zeichnet sich durch ein auffällig klares und transparent erscheinendes Zytoplasma in der mikroskopischen Aufsicht aus. Zweithäufigste Form (15-20%) ist das papilläre Nierenzellkarzinom, welches ein markantes papilläres Wachstumsmuster aufweist und von dem noch weitere Untergruppen existieren (Linehan et al. 2016), gefolgt vom dritthäufigsten (5-7%) Subtyp, dem chromophoben Nierenzellkarzinom (Riazalhosseini und Lathrop 2016). Darüber hinaus existieren weitere Subtypen des Nierenzellkarzinoms mit geringerer Prävalenz (Morris und Latif 2017). Obwohl es sich beim Nierenzellkarzinom um den dritthäufigsten urologischen Tumor handelt (Oliveira et al. 2017), sind die Therapieoptionen begrenzt. Kausale Therapiemöglichkeiten stellen sowohl die operative Tumorexstirpation als auch die medikamentöse Therapie dar, wobei eine Operation die einzige kurative Therapieoption darstellt (Moch et al. 2016; S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms 2023). Dabei kommt je nach Stadium eine partielle oder radikale Nephrektomie in Betracht. Ist der Tumor noch lokal begrenzt, stellt die operative Entfernung die beste Therapie dar (ebd.). Bei einer vorliegenden Metastasierung oder Irresektabilität dagegen kommt eine systemische medikamentöse Therapie zum Einsatz. In der aktuellen S3 Leitlinie Nierenzellkarzinom wird als

Erstlinientherapie des fortgeschrittenen oder metastasierten, klarzelligem Nierenzellkarzinoms bei allen Risikogruppen eine Kombinationstherapie aus einem Immuncheckpoint-Inhibitor (z.B. Nivolumab) und einem Multikinaseinhibitor (z.B. Cabozantinib) empfohlen (S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms 2023). Im metastasierten Stadium ist das Nierenzellkarzinom unheilbar, da es nicht auf Chemotherapie oder Radiotherapie anspricht (Riazalhosseini und Lathrop 2016; Sharma et al. 2021). Die Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms ist somit fast in allen Fällen palliativer Intention.

Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen im Nierenzellkarzinom und die Identifikation neuer Targets sind dringend nötig, um neue Therapieansätze entwickeln zu können und damit die Überlebenschancen der Patienten zu verbessern. Neu entdeckte Zielmoleküle könnten nicht nur bei der Therapie des Nierenzellkarzinoms eine Rolle spielen, sondern auch die Diagnostik verbessern und Aussagen zur Progression der Erkrankung ermöglichen.

1.2 Chromatinmodifizierende Enzyme

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass nicht nur Veränderungen auf genetischer Ebene, sondern insbesondere auch epigenetische Modifikationen ein Grund für Tumorentstehung und -wachstum sein können. Solche epigenetischen Modifikationen umfassen u.a. reversible posttranslationale Veränderungen von DNA oder Histonen.

DNA, Histone und sog. Nicht-Histone bilden zusammen das Chromatin. Das Histon ist ein Oktamer und besteht aus je zwei Molekülen Histon 2A (H2A), Histon 2B (H2B), Histon 3 (H3) und Histon 4 (H4) (Felsenfeld und Groudine 2003). An ihrem N-Terminalen Ende werden Histone durch Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung oder Methylierung posttranslational modifiziert (Xing und He 2016). Die verschiedenen Modifikationen spielen eine wichtige Rolle für verschiedene zelluläre Prozesse, wie DNA-Replikation, DNA-Reparatur, Apoptose oder die Regulation der Genexpression (Felsenfeld und Groudine 2003). Dysregulationen der histonmodifizierenden Enzyme findet man bei der Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen (Linehan et al. 2016; Riazalhosseini und Lathrop 2016; Shih et al. 2012).

Histone werden durch antagonistisch arbeitende Enzyme modifiziert, zu denen

Histonmethyltransferasen (HMTs) und Histondemethylasen (HDMTs), Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) gehören (Xing und He 2016).

Die Acetylierung durch HATs führt zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität und der Überführung des Chromatins in Euchromatin. Die Auswirkungen der HMTs sind vielfältiger, da für den resultierenden Effekt der Modifikationen nicht nur der Methylierungsgrad (Mono-, Di- oder Trimethylierung), sondern auch die Position der methylierten Aminosäure ausschlaggebend ist (Xing und He 2016). So bewirkt eine Trimethylierung der Lysinreste K4 oder K36 am Histon-Protein H3 (H3K4me3 bzw. H3K36me3) eine aktivierte Genexpression, wohingegen eine Dimethylierung an Lysinrest K9 (H3K9me2) oder eine Trimethylierung von Lysinrest K27 (H3K27me3) am selben Histon-Protein eine Repression bedingt (Xing und He 2016; siehe auch Abb. 1).

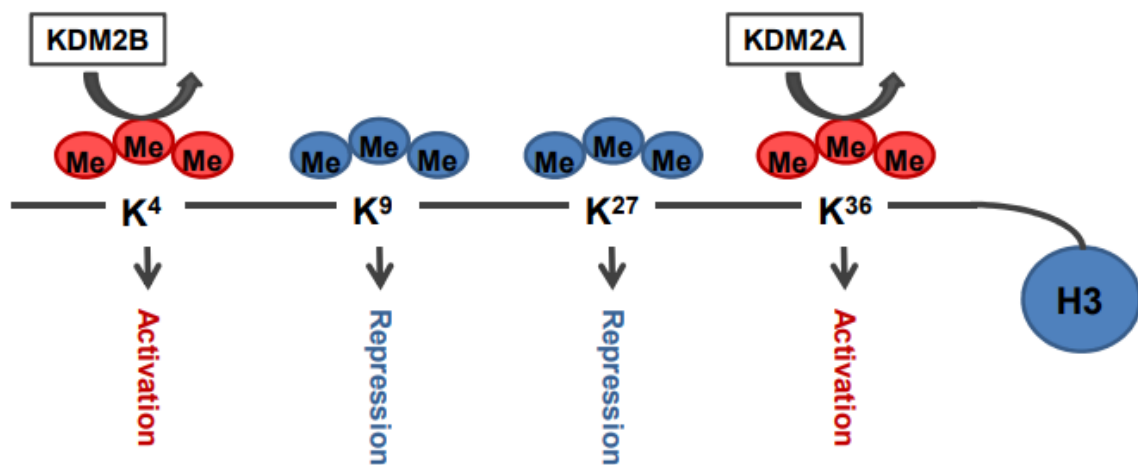


Abbildung 1: Modifikation durch Histondemethylasen KDM2B und KDM2A

Gezeigt sind Lysin-Reste an einem Histon-Schwanz, welche durch KDM2B oder KDM2A demethyliert werden können. Die je nach Position und Methylierungsgrad der Lysinreste können solche Modifikationen eine Repression oder Aktivierung zur Folge haben, was wiederum zu einer Modifikation der Transkription von Genen führt.

Die Enzymfamilie der Histondemethylasen gliedert sich in mehrere Gruppen. Im Jahr 2004 wurde die erste Lysin-spezifische-Demethylase 1 (LSD1 identifiziert (Shi et al. 2004). LSD1, auch KDM1A genannt, benötigt das Coenzym Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), um eine Mono- oder Di-Demethylierung an H3K4me1/2 oder H3K9me1/2 zu katalysieren. Bald darauf wurde eine zweite, größere Gruppe Histondemethylasen (KDM2- KDM7) beschrieben (Tsukada et al. 2006), die auch

trimethylierte Lysinreste an Histonen zu demethylieren vermag (Abb.1, Abb. 2). Die Mitglieder dieser Gruppe enthalten alle eine sog. Jumonji-Domäne an ihrem N-terminalen Ende, die für die Demethylierungsfunktion wichtig ist und als Cofakoren Fe^{2+} und alpha-Ketoglutarat benötigt.

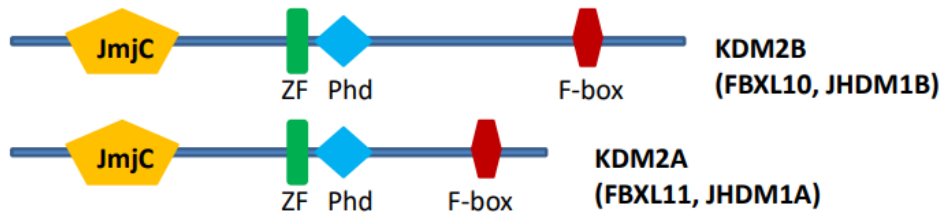


Abbildung 2: Struktur der Histondemethylasen KDM2A und KDM2B.

Sie gehören zu der Histondemethylasen- Familie, deren Mitglieder eine sog. Jumonji-Domäne (JmjC) an ihrem N-terminalen Ende ausweisen. Die Phd- Domäne vermittelt die Bindung zu Histonen. Als weitere Proteinstruktur motive zeigen sich Zinkfinger- (ZF) Domäne sowie F- box.

In letzter Zeit sind Histondemethylasen zunehmend in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt, da viele Tumore eine Überexpression dieser Enzyme aufweisen.

Die Histondemethylase JARID1C (KDM5C) beispielsweise ist in die Regulation humaner Colonkarzinomzellen involviert, indem sie die Transkription des Repressorgens FBXW7 reguliert (Lin et al. 2020). Hierdurch nimmt JARID1C Einfluss auf die Proliferationsaktivität der Colonkarzinomzellen. In der Zellkultur konnte bereits beobachtet werden, dass ein knock-down von LSD1 in verlangsamtem Wachstum und einer Abnahme der Migrationsfähigkeit von Nierenzellkarzinomzellen resultiert (Lee et al. 2020).

Auch eine ganze Reihe von Studien der AG Kirfel zeigen eine Überexpression von LSD1 in unterschiedlichsten Tumorentitäten, so beispielsweise in Neuroblastomen (Schulte et al. 2009), mesenchymalen Tumoren (Schildhaus et al. 2011), hämatopoetischen und lymphatischen Neoplasien (Niebel et al. 2014) oder in hormonrezeptor-negativen Mammakarzinomen (Lim et al. 2010).

Um herauszufinden, welche Tumorentitäten eine starke Expression von Histondemethylasen aufweisen, wurden von uns Daten aus der TCGA *in silico* ausgewertet (Deng et al. 2016). Bei dieser *in silico* Analyse zeigte sich deutlich, dass viele Tumorentitäten eine Unter- oder Überexpression verschiedener Histondemethylasen aufweisen (Abb. 3). Die stärkste Überexpression der Histondemethylasen

KDM2A, KDM2B und KDM5C zeigte sich jedoch im Rahmen unserer Analyse im klarzelligen Nierenzellkarzinom.

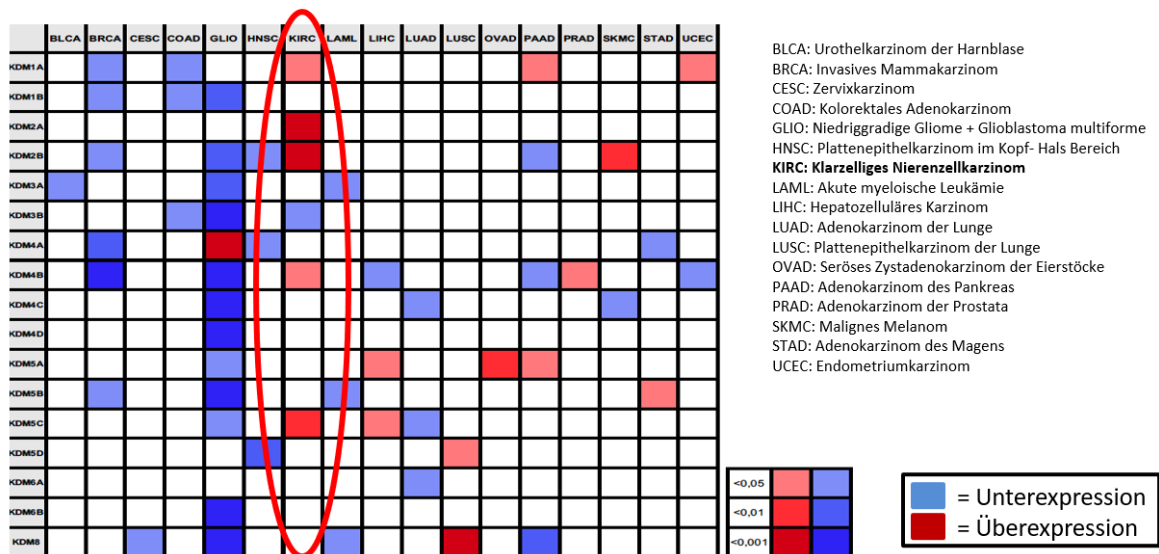


Abbildung 3: Veränderte Expression von Histondemethylasen in Tumorgewebe.

Gezeigt ist eine in silico Analyse von TCGA-Daten. Die Tabelle demonstriert die Expression von Histondemethylasen in verschiedenen Tumorentitäten (KIRC: Klarzelliges Nierenzellkarzinom, rot umrandet hervorgehoben). Die Legende rechts unten an der Grafik verdeutlicht das Signifikanzniveau der Unter- bzw. Überexpression der untersuchten Histondemethylasen im untersuchten Tumorgewebe. Quelle: Klümper und Kirfel, unveröffentlichte Daten

1.2.1 LSD1

Im Jahr 2004 wurde die erste Lysin-spezifische-Demethylase 1 (LSD1) identifiziert (Shi et al. 2004). LSD1, auch KDM1A genannt, benötigt das Coenzym Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), um eine Mono- oder Di-Demethylierung an H3K4me1/2 oder H3K9me1/2 zu katalysieren. Shi et al. konnten mit ihrer Arbeit zeigen, dass LSD1 spezifisch für die Demethylierung des Histons H3 Lysin 4 zuständig ist, was wiederum mit Repression verbunden ist.

Des Weiteren konnten Shi et al. beobachten, dass die Histondemethylase LSD1 eine stringente Substratspezifität aufweist: So war LSD1 in den durchgeführten Versuchen fähig, zwischen Histon-H3-Peptiden zu differenzieren, die dieselbe Methylierung (Dimethylierung der Aminosäure Lysin) aufwiesen, welche jedoch an unterschiedlichen Lysinresten vorlag (K4 gegenüber K9, K36 und K79). Die Forscher stellten die Hypothese auf, dass diese strikte Selektivität durch Sequenzen hervorgerufen werden könnte, welche die Lysinreste umgeben. Zudem mutmaßten Shi et al., dass die Fähigkeit von LSD1, zwischen Di- und Trimethylierung auf dem

gleichen Lysin H3- K4 unterscheiden zu können, ebenfalls zu der ausgeprägten Substratspezifität dieser Histondemethylase beitrage.

Bereits zum Zeitpunkt der Entdeckung von LSD1 im Jahr 2004 vermutete man, dass noch weitere, bislang unbekannte Histon- Demethylasen existieren könnten, welche auch zur Demethylierung trimethylierter Lysinreste an Histonen fähig sind. Aufgrund der chemischen Natur der Aminoxidationsreaktion, die durch Flavin-haltige Aminoxidasen katalysiert wird, ist LSD1 unfähig, trimethylierte Lysinreste an Histonen zu demethylieren, was diese als mögliches Substrat ausschließt (Shi et. al 2004). Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass noch weitere Histondemethylasen existent sein müssten, welche für Demethylierungsreaktionen an anderen Lysin- oder Argininresten spezifisch sind. Man vermutete, dass auch diese, noch unbekannte Gruppe von Histondemethylasen entweder mit Aktivierung oder Repression der Transkription von Genen in Zusammenhang stehen musste.

In der Vergangenheit konnten Forschungsarbeiten belegen, dass LSD1 spezifisch mit dem Androgen- Rezeptor (Metzger et al. 2005) oder großen chromatinmodifizierenden Co- Repressor- Komplexen wie BHC80 interagiert (Shi et al. 2005). Gao et al. untersuchten die Auswirkung des Transkriptionsfaktors FOXA1 im Zusammenspiel mit LSD1 im Hinblick auf das Prostatakarzinom. Sie konnten *in vitro* zeigen, dass LSD1 zusammen mit FOXA1 und weiteren aktiven Enhancer- Markern in Prostatakrebszellen assoziiert und eine Hemmung von LSD1 in einer Unterbrechung der FOXA1- Chromatinbindung resultiert (Gao et al. 2020).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass LSD1 und durch Histondemethylierung bedingten, epigenetischen Modifikationen eine bedeutende Rolle in Tumorentstehung und -progress zukommt. Daraus ergibt sich ein denkbarer prädiktiver oder therapeutischer Nutzen dieser Histondemethylase im Rahmen verschiedener maligner Tumorerkrankungen. Es existieren bereits mehrere klinische Studien, die sich mit der Untersuchung von LSD1 Inhibitoren (z.B. ORY-1001, SP-2509) und deren Potential zur Therapie von Tumorerkrankungen beschäftigen (Maes T. et al. 2018; Pishas et al. 2018).

Eine Aktivierung von LSD1 im Mammakarzinom führt zu einem fördernden Einfluss auf induzierbare EMT- Programme und löst gezielt Genexpressionsprogramme in Tumorstammzellen aus (Boulding et al. 2018). Auch im Prostatakarzinom konnte der Einfluss von LSD1 beobachtet werden: Durch die demethylierende Aktivität von

LSD1 wird die Chromatinbindung von Transkriptionsfaktor FOXA1 im Prostatakarzinom gefördert (Gao et al. 2020).

1.2.2 KDM2B und KDM2A

Bald nach der Entdeckung der ersten Lysin-spezifischen Demethylase 1 (LSD1) wurde nur zwei Jahre später eine zweite, größere Gruppe Histondemethylasen (KDM2- KDM7) beschrieben (Tsukada et al. 2006), die auch trimethylierte Lysinreste an Histonen zu demethylieren vermag. Die Mitglieder dieser Gruppe enthalten alle eine sog. Jumonji-Domäne an ihrem N-terminalen Ende, die für die Demethylierungsfunktion wichtig ist und als Cofaktoren Fe^{2+} und alpha-Ketoglutarat benötigt.

Sowohl KDM2A (FBXL11, JHDM1A) als auch KDM2B (FBXL10, JHDM1B) weisen mehrere funktionelle Domänen auf: Die Jumonji-Domäne (JMJD) liegt N-Terminal und vermittelt die Funktion der enzymatischen Aktivität (Janzer et al. 2012). Über die Funktion der PHD- Domäne ist bekannt, dass sie eine Verbindung des Enzyms zum Histon herstellt, außerdem wird eine Reader- Funktion diskutiert (Janzer et al. 2012). Darüber hinaus besitzen beide Enzyme noch eine F-Box Domäne, eine Zinkfinger Domäne und C-Terminale Leucin-rich repeats (LRR), deren genaue Funktion noch ungeklärt ist (siehe Abb. 2).

Über die Rolle von KDM2A *in vivo* ist bekannt, dass es eine essenzielle Rolle in der Embryonalentwicklung spielt, indem es die Zellproliferation reguliert: Kawakami et al. konnten 2015 belegen, dass der Knockout von KDM2A in Mäusen mit schweren embryonalen Entwicklungsstörungen und intrauteriner Letalität der Embryonen einhergeht (Kawakami et al. 2015). Im Rahmen von *in vitro* Experimenten wurde KDM2A als transkriptioneller Co-Aktivatoren beschrieben: Die KDM2A-abhängige H3K9 Demethylierung spielt dabei eine Rolle bei der hormonabhängigen Androgenrezeptor Aktivierung (Yamane et al. 2006). Im Tierexperiment konnte beobachtet werden, dass das Gen *Kdm2a* unentbehrlich für die Spermatogenese in Mäusen ist. Dabei soll KDM2A Gene wie *Tnp1* und *Prm1*, die für die Spermienentwicklung und -reifung wichtig sind, regulieren (Okada et al. 2007).

KDM2B spielt eine wichtige Rolle hinsichtlich der Regulation von Zellproliferation, Zellzyklus und Seneszenz. So konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown von *Kdm2b* in Mausfibroblasten (He et al. 2008) als auch ein Knockdown von *KDM2B*

in Glioblastomzellen (Wang et al. 2018) zur Zellwachstumshemmung führt. Eine Überexpression von *Fbxl10* in Mausfibroblasten führt zu Veränderungen in Zellmorphologie, Zellmetabolismus und Chemokinexpression (Janzer et al. 2012). Rohde et al. konnten 2016 zeigen, dass eine Überexpression von *Fbxl10* die Fähigkeit zur Migration in Mausfibroblasten erhöht und dass migrationsassoziierte Gene direkt durch *Fbxl10* reguliert werden. Ebenfalls wurde eine Beteiligung von KDM2B an der Regulation von Apoptose-Signalwegen nachgewiesen (Kurt et al. 2017).

Sowohl KDM2A als auch KDM2B werden mit Tumorentstehung und –wachstum in Verbindung gebracht. Wie beide Enzyme die Tumorgenese genau beeinflussen, ist jedoch bisher weitestgehend unklar. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression von KDM2A im Mammakarzinom mit Tumorprogression und schlechter Prognose einhergeht sowie die Angiogenese in Brustkrebszellen fördert (Chen et al. 2016). Auch für das Nicht-Kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC) wurde im Xenograftmodell bewiesen, dass KDM2A eine essenzielle Rolle für Tumorstadium und –metastasierung spielt (Wagner et al. 2013). Für KDM2B wurde gezeigt, dass es in verschiedenen malignen Neoplasien wie dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas (Tzatzos et al. 2013), Ovarialtumoren (Kuang et al. 2017) oder im Glioblastom (Staberg et al. 2018) überexprimiert ist.

Histondemethylasen kommen in Multienzymkomplexen vor (Sánchez et al. 2007). Eine Beeinflussung ihrer Substratspezifität durch Interaktion mit anderen Proteinen wird diskutiert und wurde bereits für LSD1 beschrieben (Shi et al. 2004). Im Xenograftmodell wurde gezeigt, dass KDM2B zusammen mit Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2), einer zum Polycomb Repressive Complex 2 gehörenden Histonmethyltransferase, Tumorstadium im Ovarialkarzinom fördert (Kuang et al. 2017). Tzatzos et al. konnten 2013 mittels Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) nachweisen, dass der KDM2B-EZH2-Komplex die Expression von Genen wie *Nanog* oder des Notch-Signalwegs reguliert, welche eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung, Zellerneuerung und der Pluripotenz von Stammzellen spielen (Tzatzos et al. 2013).

1.2.3 JARID1C

JARID1C, auch bekannt als KDM5C, gehört zu derselben Familie der Histondemethylasen wie die bereits unter 1.2.2 beschriebenen Enzyme KDM2B und KDM2A.

Die Mitglieder dieser Enzymfamilie sind, im Gegensatz zu LSD1, zur Demethylierung trimethylierter Lysinreste an Histonen fähig (Tsukada et al. 2006). JARID1C besitzt wie auch die restlichen Mitglieder dieser Enzymfamilie am N-terminalen Ende die sog. Jumonji- Domäne, welche die Demethylierungsfunktion vermittelt. Durch seine Demethylierungsfunktion überführt JARID1C trimethylierte Lysinreste an Histon H3 (H3K4) in einen di- bzw. monomethylierten Zustand (Iwase et al. 2007). Als Cofaktoren spielen Fe^{2+} und alpha-Ketoglutarat eine essenzielle Rolle.

Die genaue Funktion von JARID1C ist noch weitestgehend unklar. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass JARID1C Einfluss auf zerebrale Entwicklung und die Funktion von Neuronen ausübt; Mutationen des Gens stehen im Zusammenhang mit mentaler Retardierung (Iwase et al. 2007; Kramer und van Bokhoven, 2009). Auch im Zusammenhang mit Krebsentstehung scheint JARID1C eine wichtige Rolle zu spielen. Im *The cancer genome atlas* (TCGA) Projekt wurde das Gen, welches für JARID1C kodiert, als eines von fast 300 Genen beschrieben, die eine Progression von Tumoren fördern (Chang et al. 2019). Rondinelli et al. berichteten 2015, dass Nierenzellkarzinome oftmals inaktivierende Mutationen von JARID1C aufweisen. Die Forscher konnten beobachten, dass ein Verlust von JARID1C genomische Instabilität auslöst, da dieser zur Expression von nichtkodierenden RNAs (ncRNAs) führt. Nierenzellkarzinome mit JARID1C- Mutationen wiesen eine deutlich stärkere genetische Derangierung auf, als es in Nierenzellkarzinomen mit Mutationen in anderen Treibergenen der Fall war (Rondinelli et al. 2015). Auch in anderen Tumorentitäten scheint JARID1C eine bedeutende Rolle zu spielen. So führt eine Überexpression dieser Histondemethylase in humanen Kolonkarzinomzellen zu einer Regulationsstörung des Protoonkogens *c-Jun*, was in einer verstärkten Proliferation der Kolonkarzinomzellen resultiert (Lin et al. 2020). In einer 2014 veröffentlichten Studie konnten wir demonstrieren, dass JARID1C als negativer prognostischer Marker bei Patienten mit Zustand nach radikaler Prostatektomie dienen kann, da es im Prostatakarzinom überexprimiert ist (Stein et al. 2014).

1.3 Epigenetische Veränderungen im Zusammenhang mit malignen Neoplasien

Tumorentstehung ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess, während dem die normale Zelle mehrere genetische Umwandlungen durchläuft, bevor sie schließlich zur bösartigen Tumorzelle transformiert. Es gibt viele Hinweise, dass diese Umwandlung der normalen Zelle auf einer veränderten Genexpression beruht. Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass vor allem epigenetische Veränderungen einen großen Einfluss auf die Entstehung und Progression von malignen Tumorerkrankungen ausüben, da sie zu Veränderungen der Genexpression beitragen (Rondinelli et al. 2015; Xing und He 2016; Qi et al. 2021).

Aus dieser Erkenntnis haben sich nicht nur mögliche neue Felder zur Diagnostik und Prognostik verschiedener Tumorerkrankungen, sondern zugleich auch eine ganze Reihe neuer Therapieansätze ergeben (Stein et al. 2014; Maes et al. 2018; Pishas et al. 2018). Dies hat zur Folge, dass Epigenetik zunehmend im Fokus wissenschaftlicher Forschungsbestrebungen steht. Dabei wird Epigenetik als eine Modifikation der Genexpression definiert, welche keine Veränderungen der primären DNA- Sequenz zur Folge hat und im Rahmen der Mitose vererbt werden kann (Kanwal und Gupta 2010). Epigenetische Regulation ist ein dynamisches und komplexes Geschehen. Sie umfasst Prozesse wie DNA- Methylierung, posttranslationale Histonmodifikationen oder posttranskriptionelle Genregulation durch nichtkodierende RNAs (Ducasse und Brown 2006). Dabei spielen vor allem die posttranslationalen Histonmodifikationen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung maligner Tumore, da sie Einfluss auf die Struktur des Chromatins ausüben und zudem verschiedene Effektorproteine aktivieren (Ellis et al. 2009). Solche posttranslationalen Modifikationen umfassen Prozesse wie Acetylierung, Phosphorylierung und Methylierung (Xing und He 2016).

Multiple essenzielle Vorgänge auf zellulärer Ebene werden durch posttranslationale Histonmodifikationen gesteuert, so zum Beispiel DNA- Reparatur, Apoptose oder die Steuerung der Genexpression (Felsenfeld und Groudine 2003). Kommt es zu einer Störung dieser bedeutenden zellulären Abläufe, kann dies die Entstehung und Progression von malignen Neoplasien fördern (Linehan et al. 2016; Shih et al. 2012). Diese Forschungsergebnisse beleuchten nicht nur den komplexen Entstehungsprozess bösartiger Tumore auf epigenetischer Ebene, sondern zeigen auch

neue Wege bzw. einen möglichen wertvollen Nutzen in der Tumorthherapie auf (Karakaidos et al. 2019). Da histonmodifizierende Enzyme bei epigenetischen Veränderungen eine entscheidende Rolle spielen, stehen sie im Hinblick auf die Identifikation neuer Felder der epigenetisch gestützten Tumorthherapie im Fokus aktueller Studien. Beispielsweise wird die Hemmung von LSD1 als therapeutischer Pfad bei aggressiven hämatopoetischen Malignomen wie AML bereits mit vielversprechenden präklinischen Resultaten eingesetzt (Magliulo et al. 2018; Zhang et al. 2021). Auch in der Therapie von Glioblastomen, die sich als hochresistent gegenüber Chemotherapie zeigen, könnten epigenetisch ansetzende Therapien in Zukunft bessere Therapieoptionen für Patienten bieten. So konnte bereits *in vitro* gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von KDM2B die Sensibilisierung von Glioblastomzellen gegenüber Chemotherapie zur Folge hat (Staberg et al. 2018)

Angesichts dieser Forschungserkenntnisse ist anzunehmen, dass in Zukunft gezielte epigenetische Therapien oder die Kombination aus epigenetischer Medizin und bereits etablierten Therapieformen, wie Radiotherapie oder Chemotherapie, einen großen Stellenwert in der Therapie maligner Tumorerkrankungen des Menschen einnehmen werden.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Nierenzellkarzinome stellen im Vergleich mit anderen Tumorentitäten eine Besonderheit hinsichtlich der therapeutischen Optionen dar, da sie nicht auf Chemotherapie oder eine Radiotherapie ansprechen. Entsprechend anspruchsvoll ist die Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms, bei der nach aktuellen Leitlinien zunächst eine Kombination aus Immuncheckpoint-Inhibitoren und einem Multikinaseinhibitor in der Erstlinientherapie zum Einsatz kommt (S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms 2023). Doch die bislang verfügbaren therapeutischen Maßnahmen zur Therapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms sind begrenzt. Ein weiteres Problem besteht darin, dass Nierenzellkarzinome oftmals als Zufallsbefund diagnostiziert werden und Stand heute keine Früherkennungsuntersuchung, wie es für andere maligne Tumorerkrankungen der Fall ist, etabliert ist. Angesichts dieser Tatsachen ist es umso wichtiger, potentielle neue targets zu identifizieren, die helfen können, das diagnostische und therapeutische Spektrum für Nierenzellkarzinompatienten zu erweitern.

Die Zielsetzung dieser Arbeit sollte durch folgende Schritte erreicht werden:

- Erstellung einer eigenen Kohorte, welche humane Gewebeproben (Normalgewebe der Niere als auch Primärtumorgewebe) beinhaltet
- Zusammenstellung pathologisch- klinischer Daten der Kohorte und Erfassung dieser in einer Datentabelle
- Auswählen adäquater, paraffinfixierter Gewebelöcke und Anfertigen von TMAs
- Untersuchung der Expression der Histondemethylasen LSD1, KDM2B und JARID1C mittels IHC
- Auswertung der Ergebnisse und Prüfung auf mögliche Korrelation mit den zuvor erhobenen pathologischen Daten

Die von uns im Vorfeld zu dieser Studie durchgeführte *in silico* Analyse von TCGA-Daten ergab, dass eine starke Überexpression der Histondemethylasen KDM1A, KDM2A, KDM2B, KDM4B und KDM5C im klarzelligen Nierenzellkarzinom zu finden ist (Abb. 3). Auch sollte überprüft werden, ob sich hierbei Unterschiede zwischen den drei häufigsten histologisch differenzierbaren Subtypen (klarzelliges, papilläres- bzw. chromophobes Nierenzellkarzinom) zeigen.

Die durchgeführten Untersuchungen können helfen, neue Ansatzpunkte in den Bereichen Diagnostik, Prognostik und Therapie für das Nierenzellkarzinom in Form von neuen Biomarkern zu identifizieren. So könnte beispielsweise die Identifikation eines neuen Biomarkers die Entwicklung neuer, spezifisch gegen ein bestimmtes target gerichteter Therapieoptionen ermöglichen.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

Geräte	Hersteller
Eismaschine	Scotsman ice systems, Vernon hills, IL U.S.A.
Feinwaagen	Ohaus, Kern, Balingen, D
Kühl- und Gefrierschrank	Liebherr Kirchdorf, D
Leica ST 4040 Färbeautomat	Leica DSC 1, Leica Camera, Wetzlar, D
Maxwell® Rapid Sample Concentrator	Promega, Fitchburg, WI, U.S.A.
Multipipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop	Olympus BX 51 Olympus, Tokio, J
Pipetten 2,5 µl; 10 µl; 100 µl; 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Picofuge	Sarstedt, Nümbrecht, D
Rotationsmikrotom	Leica DSC 1, Leica Camera, Wetzlar, D
Surescan® high resolution Scanner	Agilent Technologies, Santa Clara, CA U.S.A.
Thermocycler	Heraeus, Hanau, D, Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifugen	Biometra, Analytik Jena, Jena, D
VENTANA® BenchMark ULTRA Färbeautomat	Roche, Basel, CH
Vortexer	IKA Genius 3, Staufen i. Breisgau, D
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau, D

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckgläschen	Leica DSC 1, Leica Camera, Wetzlar, D
Latex Einmalhandschuhe	B. Braun, Melsungen, D
Objektträger Metallhalter	Leica Biosystems, Leica Camera, Wetzlar, D
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäß	Greiner, Nürtingen, D
Superfrost Objektträger	Menzel Gläser, Buch a. Erlbach, D

2.3 Software

Tabelle 3: Software

Software	Hersteller
AGFA Orbis	Dedalus Healthcare GmbH, Bonn, D
Microsoft Excel	Microsoft Office 2016, Redmond, WA, U.S.A.
Microsoft Word	Microsoft Office 2016, Redmond, WA, U.S.A.
Microsoft PowerPoint	Microsoft Office 2016, Redmond, WA, U.S.A.
Nexus	Nexus AG, Donaueschingen, D
SPSS Version 25.0	IBM Statistics, Armonk. NY, U.S.A.

2.4 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti- JARID1C antibody polyclonal rabbit, ab34718	1: 1000	Abcam, Cambridge, UK
Anti- KDM2B antibody polyclonal rabbit, ab137547	1: 75	Abcam, Cambridge, UK
Anti- LSD1 antibody 1B2E5 monoclonal mouse, nb 100 1762	1: 250	Novus Biological, Littleton, CO, U.S.A

2.5 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien	Hersteller
Bluing Reagent	Promega, Fitchburg, Wisconsin, U.S.A.
Destilliertes Wasser	Apotheke des UKSH, Campus Lübeck, D
Eosin G (C.I. 45380)	Merck, Darmstadt, D
Ethanol (100%, 96%, 70%)	Merck, Darmstadt, D
HistoCore SPECTRA CV XI Eindeckmittel	Leica Biosystems, Leica Camera, Wetzlar, D
Hämatoxylinlösung nach Gill III	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, D
ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1)	Roche, Basel, CH

2.6 Färbeprotokolle

2.6.1 Färbeprotokoll der Immunhistochemischen Anfärbungen

Die immunhistochemischen Anfärbungen der zu untersuchenden Histondemethylasen LSD1, KDM2B und JARID1C wurden mit Hilfe des VENTANA® BenchMark ULTRA Färbeautomaten (Roche, Basel, Schweiz) von Wenzel Vogel und Eva Dreyer durchgeführt. Der LSD1 Antikörper 1B2E5 (Anti- LSD1 antibody 1B2E5 monoclonal mouse, nb 100 1762; Novus Biological, Littleton, CO, U.S.A) wurde in der Verdünnung 1: 250, der JARID1C Antikörper ab34718 (Anti- JARID1C antibody polyclonal rabbit, ab34718; Abcam, Cambridge, UK) in der Verdünnung 1:1000 und der KDM2B Antikörper ab137547 (Anti- KDM2B antibody ab137547, Abcam, Cambridge, UK) in der Verdünnung 1:75 verwendet.

In dem für die IHC- Anfärbung von KDM2B verwendeten Färbeprotokoll Nr. 156 erfolgt zunächst die Entparaffinierung, hierbei wird der Objektträger auf 72 °C erwärmt und für 8 Minuten inkubiert (Zyklus 1). Dann erfolgt zwei weitere Male ein Inkubieren für jeweils 8 Minuten (Zyklus 2 und 3). Nach diesem Schritt findet eine Hitzevorbehandlung statt: Dazu wird der Objektträger auf 98°C erwärmt und für 4 Minuten mit Cell Conditioner Nr. 1 (Ultra CC1), einer alkalischen Demaskierungslösung (ph 8,4), inkubiert. Schließlich wird ein Inhibitor aufgetragen und für weitere 4 Minuten inkubiert. Nachfolgend wird der jeweilige primäre Antikörper titriert und 60 min bei 37 °C inkubiert, dann der Sekundärantikörper aufgetragen und für 20 Min inkubiert. Anschließend werden mit Hämatoxylin nach Mayer die Kerne gegengefärbt und mit Bluing gebläut (siehe auch Färbeprotokoll KDM2B unter 10.1.1 bzw. Tabelle 12).

Die IHC- Anfärbungen von JARID1C und LSD1 mit den jeweils zuvor genannten Antikörpern waren bereits durch unsere Vorarbeiten etabliert (für JARID1C, siehe Stein et al. 2014; für LSD1, siehe Bottner et al. 2022). Dabei wurden die IHC- Anfärbungen von JARID1C (siehe Stein et al. 2014) im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn, die IHC- Anfärbungen für LSD1 (Bottner et al. 2022) im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig- Holstein, Campus Lübeck, angefertigt.

2.6.2 Färbeprotokoll der Hämatoxylin- Eosin- Färbungen

Die Hämatoxylin- Eosin- Färbungen (HE) nach Gill wurden mit dem Färbeautomaten Leica ST 4040 (Leica, Wetzlar, Deutschland) im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig- Holstein, Campus Lübeck angefertigt (siehe auch Färbeprotokoll Hämatoxylin- Eosin- Färbungen unter 10.1.2 bzw. Tabelle 13).

3 Methoden

3.1 Aufbau der Kohorte

Es wurde für diese Studie eine Kohorte erstellt, welche Nierenzellkarzinomfälle (n= 351) der Jahre 2009 bis 2017 aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, beinhaltet. In diese Studie wurden keine tierexperimentellen Versuche oder die Beteiligung von Probanden eingeschlossen. Bei den verwendeten Gewebeproben handelt es sich ausschließlich um Primärtumore. Ein positives Ethikvotum für diese Studie liegt vor (AZ 17- 341, Universität zu Lübeck).

Tabelle 6: Charakteristika der Lübecker Kohorte

Lübecker Kohorte [n (%)]	351 (100%)
Männer	208 (59.3%)
Frauen	143 (40.7%)
Alter der Patienten [n (%)]	
< 44 Jahre	15 (4%)
45- 54	55 (14.6%)
55- 67	123 (32.6%)
68- 80	131 (34.7%)
> 80	21 (5.6%)
unbekannt	6 (8.5%)
Tumorsubtyp [n (%)]	
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	276 (78.6%)
Papilläres Nierenzellkarzinom	64 (18.2%)
Chromophobes Nierenzellkarzinom	11 (3.2%)
pT- Stadium [n (%)]	
1-1b	211 (60.1%)
2- 2b	37 (10.6%)
≥3	85 (24.2%)
unbekannt	18 (5.1%)
pN- Stadium [n (%)]	
0	29 (8.3%)
1	6 (1.7%)
2	3 (0.9%)
unbekannt	313 (89.2%)
M- Stadium [n (%)]	
1	16 (4.6%)
unbekannt	335 (95.4%)
pR- Stadium [n (%)]	
0	251 (71.5%)

1	29 (8.3%)
2	7 (2%)
unbekannt	64 (18.2%)
G- Stadium [n (%)]	
1	69 (19.7%)
2	190 (54.1%)
≥3	85 (24.2%)
unbekannt	7 (2%)

3.2 Tissue Micro Arrays

Für das Anfertigen der Tissue Micro Arrays (TMAs) wurden Hämatoxylin-Eosin gefärbte Tumor- und Normalgewebeschnitte der ausgewählten Patienten am Mikroskop begutachtet und der zu untersuchende Bereich auf dem Objektträger markiert. Aus den korrespondierenden Paraffinblöcken wurden Stanzen mit je 0,6 mm Durchmesser heraus gestanzt und zu Tissue Micro Arrays (TMAs) arrangiert, wobei nicht nur Tumorgewebe, sondern teilweise auch zugehöriges Normalgewebe mit in die folgenden Arbeitsschritte einbezogen wurde. Es wurden drei Cores pro Patient erstellt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass nur solche Fälle ausgewählt werden, bei denen ausreichend Restmaterial für weitere diagnostische Untersuchungen vorhanden ist. Um sicherzustellen, dass genügend Material für das weitere Vorhaben und eventuelle weitere Forschungsarbeiten vorhanden ist, wurde jedes TMA als dreifache Kopie angefertigt. Um das korrekte Ausrichten der TMAs und die Orientierung im Präparat am Mikroskop zu erleichtern, wurden pro TMA drei Leberstanzen arrangiert (siehe Abb. 4), welche sich bereits makroskopisch deutlich vom gestanzten Nierengewebe abheben. Anhand der auf den Paraffinblöcken vermerkten Journalnummern wurde eine Tabelle erstellt, in der die dem jeweiligen Fall zugehörigen klinisch-pathologischen Daten (TNM-Status, Grading, Geschlecht des Patienten, Alter des Patienten bei Erstdiagnose, durchgeführte Therapien, etc.) aufgelistet sind. Für diese retrospektiv und einmalig durchgeführte Datenerhebung wurden die Pathologie-Software Nexus (Nexus AG; Donaueschingen, Deutschland) und das Krankenhausinformationssystem AGFA Orbis (Dedalus Healthcare GmbH; Bonn, Deutschland) sowie die zu diesem Zeitpunkt vorliegenden Arztbriefe genutzt.

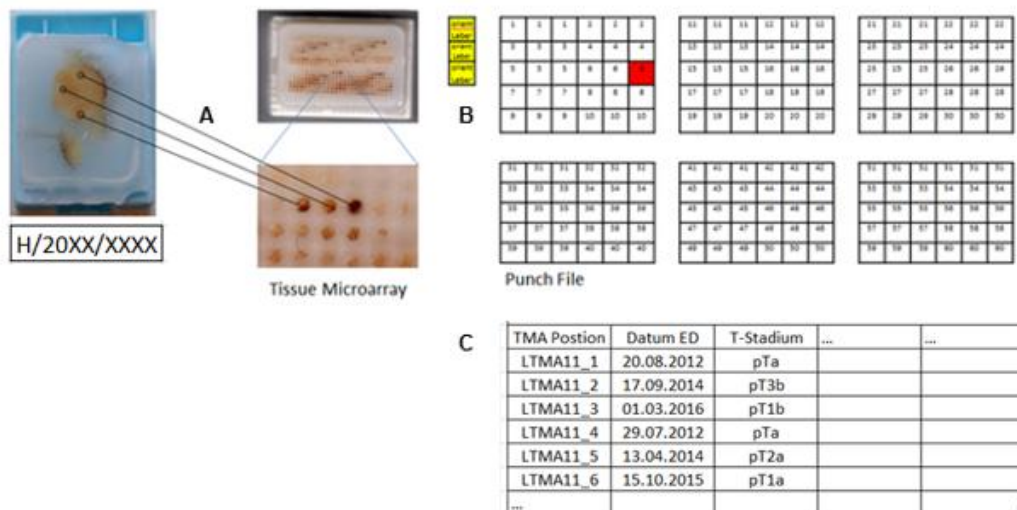


Abbildung 4: Erstellen eines Tissue Micro Arrays (TMAs)

Gezeigt sind in **A** die einzelnen Schritte vom Stanzen der Cores aus dem Paraffinpräparat und die Anordnung der Stanzen auf dem TMA. In **B** veranschaulicht schematisch die Anordnung der einzelnen Gewebeproben (jeweils drei Cores pro Patient) sowie die drei Leberstanzen zur Kontrolle (gelb markiert, links). **C** zeigt beispielhaft das Erstellen der Datentabelle mit pathologischen Patientendaten (Quelle: AG Kirfel)

Anschließend erfolgte eine Anonymisierung der Patientendaten: Nachdem jedem Paraffinblock eine Position auf den TMAs (Studien-ID) zugeordnet wurde, konnten die zugehörigen patientenbezogenen Daten wiederum den Studien-IDs zugewiesen werden. Anschließend wurden die Journal-Nummern aus der Tabelle gelöscht; eine Zuordnung der Gewebeproben zu den korrespondierenden klinisch-pathologischen Daten bleibt auf diese Weise trotz Anonymisierung gewährleistet. Die anonymisierten Patientendaten ohne Identifikationsmerkmale der Patienten und Ergebnisse werden für voraussichtlich zehn Jahre in einer Datenbank gespeichert.

Alle verwendeten Paraffinblöcke wurden nach erfolgter Anfertigung der TMAs wieder zurück in das Archiv der Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, sortiert. Ein Rückschluss vom Paraffinblock auf das korrespondierende TMA oder die Journal-Nummer ist nicht mehr möglich.

Der Aufbau der Kohorte, das Erstellen der Datentabelle mit pathologischen und klinischen Patientendaten, das Auswählen der Paraffinblöcke und das Markieren der zu untersuchenden Tumorareale wurden von mir selbst durchgeführt. Die von mir markierten Tumorareale wurden anschließend am Mikroskop durch Frau Dr. Anne Offermann sowie Frau Professor Jutta Kirfel und Herrn Professor Sven Perner im

Vier- Augen-Prinzip kontrolliert. Hierbei wurden nicht eindeutige Proben durch Herrn Professor Sven Perner verifiziert. Die praktische Arbeit bei der Erstellung der TMAs übernahmen die Medizinisch- technischen Assistent*innen Herr Wenzel Vogel, Frau Eva Dreyer und Frau Michelle Thiermann.

3.3 Immunhistochemische Anfärbungen

Von den ausgewählten TMAs wurden Dünnschnitte angefertigt und die zu untersuchenden Marker mittels immunhistochemischer Färbung im Tumor- bzw. Normalgewebe nachgewiesen. Für die immunhistochemischen Anfärbungen kamen die Primärantikörper Anti- LSD1 (Anti- LSD1 antibody 1B2E5 monoclonal mouse, nb 100 1762; Novus Biological, Littleton, CO, U.S.A), der JARID1C Antikörper ab34718 (Anti- JARID1C antibody polyclonal rabbit, ab34718; Abcam, Cambridge, UK) und der KDM2B Antikörper ab137547 (Anti- KDM2B antibody ab137547, Abcam, Cambridge, UK) zum Einsatz.

Die immunhistochemische Anfärbung für KDM5C (JARID1C) sowie KDM1A (LSD1) waren bereits durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (für JARID1C, siehe Stein et al. 2014; für LSD1, siehe Bottner et al. 2022) etabliert. Alle weiteren Primärantikörper wurden zunächst für den Einsatz auf Paraffinmaterial optimiert und auf ihre Spezifität getestet, um immunhistochemische Anfärbungen in gleichbleibender Qualität und damit reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können (Färbeprotokoll). Als Positiv-Kontrolle dienten Schnitte formalinfixierter, paraffin-eingebetteter Proben humaner Haut.

Um die spezifische Bindungsaffinität der ausgewählten Primärantikörper zu testen, wurde ein Blocking Peptide Competition Assay (BPCA) durchgeführt. Bei dieser Methode wird der Primärantikörper zusammen mit einem Überschuss an Peptid inkubiert. Dieses Peptid ist korrespondierend zu dem Epitop, für das der Primärantikörper spezifisch ist. Der Primärantikörper, der spezifisch an das Peptid gebunden hat, kann folglich nicht mehr an das Epitop im gesuchten Zielmolekül in der Zelle bzw. der zu testenden Gewebeprobe binden. Wenn der Primärantikörper spezifisch für das Epitop ist, fällt das Signal in der Probe mit dem neutralisierten Antikörper schwächer aus als in der Probe mit dem unbehandelten Antikörper. Nach dieser Spezifitätskontrolle der verwendeten Primärantikörper erfolgte der Nachweis der Marker im Gewebe. Hierfür wurde die indirekte Zwei-Schritt Methode

durchgeführt: Dabei bindet zuerst der unkonjugierte Primärantikörper an das Epitop. Erst in einer anschließenden Indikatorreaktion wird der Primärantikörper mit Hilfe eines enzymkonjugierten Sekundärantikörpers nachgewiesen.

Die immunhistochemischen Färbungen der zu untersuchenden Histondemethylase KDM2B wurden mit Hilfe des VENTANA® - Färbeautomaten (Roche; Basel, Schweiz) von den medizinisch- technischen Assistent*innen Herrn Wenzel Vogel und Frau Eva Dreyer durchgeführt. Auch die Hämatoxylin- Eosin- Färbungen wurden von Herrn Wenzel Vogel und Frau Eva Dreyer angefertigt, hierfür wurde der Leica ST 4040 Färbeautomat (Leica; Wetzlar, Deutschland) genutzt. Die immunhistochemischen Färbungen der Histondemethylase JARID1C wurden im Institut für Pathologie des Uniklinikums Bonn, die der Histondemethylase LSD1 im Institut für Pathologie des Uniklinikums Schleswig- Holstein, Campus Lübeck, angefertigt.

Die Digitalisierung der Färbeergebnisse wurde von mir selbst unter Verwendung des Surescan® high resolution Scanners (Agilent Technologies; Santa Clara, CA U.S.A) durchgeführt. Die Auswertung der immunhistochemisch angefärbten TMAs erfolgte mittels Eyeballing durch Frau Professor Jutta Kirfel und mich im Vier- Augen- Prinzip. Beurteilt wurden dabei die Zytosplasma- und Kernfärbung der untersuchten Nierenzellkarzinom- und Normalgewebeproben.

3.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der fertigen TMAs war der Einsatz einer semiautomatischen quantitativen Bildanalysesoftware (Definiens®, Version 2.2; München, Deutschland) sowie auch eine Auswertung per Blickdiagnose durch zwei unabhängige Auswerter am Mikroskop geplant. Da Histondemethylasen wie JARID1C und KDM2B sowohl im Zytoplasma der Zelle als auch im Zellkern vorkommen (Liang et al. 2011), sollten für diese beiden Histondemethylasen sowohl die zytoplasmatische als auch die nukleäre Anfärbung separat ausgewertet werden. LSD1 dagegen zeigt sich eher im Zellkern lokalisiert, so dass hier nur eine Auswertung der nukleären Anfärbung erfolgte. Analysiert werden sollte nicht nur die Expression der verschiedenen Enzyme: Auch mögliche Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe sollten, wenn vorhanden, miteinander verglichen werden. Es zeigte sich jedoch, dass die computergestützte Auswertung für unser Vorhaben ungeeignet war, da die Bildanalysesoftware nicht sicher zytoplasmatische von nukleärer Anfärbung

abgrenzen konnte. Somit erfolgte die Auswertung der angefärbten TMAs ausschließlich per Eyeballing durch zwei unabhängige Auswerter am Mikroskop. Hierbei wurde die Expression der untersuchten Enzyme anhand der Färbequantität in drei Stufen (0= 0- 14,99% Anfärbung; 1= 15- 24,99% Anfärbung; 2= $\geq 25\%$) eingeteilt und bewertet (0= „keine Expression“; 1= „mittlere Expression“; 2= „starke Expression“). Anschließend wurden die identifizierten Expressionsmuster mit den zuvor erhobenen klinisch- pathologischen Daten (TNM-Status, Grading, etc.) verglichen, um die diagnostische, prognostische und prädiktive Bedeutung der untersuchten Marker sowie ihre Rolle in Tumorgenese und -progression zu analysieren.

Eine Überlebensanalyse zu erstellen gelang nicht, da das erhältliche Datenmaterial hierfür nicht ausreichte und auch eine Anfrage der Sterbedaten über das Krebsregister keine hierfür verwertbare Datenmenge erbrachte. Auch ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression der untersuchten Marker und klinischen Informationen, wie z.B. Geschlecht, Komorbiditäten oder dem Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Tumorentfernung.

Um die im praktischen Teil der Arbeit gewonnenen Daten hinsichtlich ihrer Signifikanz zu prüfen, erfolgte eine statistische Auswertung mittels der im Institut zur Verfügung stehenden SPSS® -Software (Version 25.0; IBM Statistics, Armonk. NY, U.S.A.). Da die Daten ein nominal- bis ordinalskaliertes Skalenniveau aufweisen, wurden hierfür Kreuztabellen und der Chi-Quadrat-Test verwendet (Signifikanz-Niveau $p \leq 0.05$).

Die Bewertung der immunhistochemisch angefärbten TMAs erfolgte mittels Eyeballing durch Frau Professor Jutta Kirfel und mich selbst. Die Digitalisierung der Färbeergebnisse und die statistischen Auswertungen wurden von mir selbst durchgeführt. Bei letzterem erhielt ich Beratung durch Frau Dr. Anne Offermann. Zudem nahm ich an zwei SPSS® - Kursen des Instituts für Sozialmedizin und Epidemiologie der Universität zu Lübeck teil.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von LSD1

Für die immunhistochemische Untersuchung der LSD1- Expression standen 429 Gewebeproben von 344 Patienten zur Verfügung, davon 344 Proben Primärtumorgewebe des Nierenzellkarzinoms und 85 Proben korrespondierendes Normalgewebe der Niere. Die Tumorgewebeproben setzten sich aus 78,5% (n= 270) klarzelligem Nierenzellkarzinom, 18,3% (n= 63) papillärem Nierenzellkarzinom und 3,2% (n= 11) chromophobem Nierenzellkarzinom zusammen. Dabei war der Anteil der verwertbaren TMA- Stenzen aus der Untergruppe des chromophoben Nierenzellkarzinoms aufgrund der geringen Anzahl Gewebeproben so gering, dass er in der statistischen Auswertung keine separate Berücksichtigung finden konnte. Die LSD1- Expression im chromophoben Nierenzellkarzinom wurde deshalb ausschließlich als Teil der Gesamtkohorte in die Auswertung miteinbezogen.

Tabelle 7: Verteilung der Färbeintensität von LSD1.

Immunhistochemische LSD1- Anfärbung innerhalb der Gesamtkohorte mit allen Tumorsubtypen sowie Normalgewebe der Niere.

LSD1 Primärtumor Kernfärbung Score [n (%)]	344 (100%)
0 (negativ)	48 (14%)
1 (mittel)	24 (7%)
2 (stark)	272 (79%)
LSD1 Normalgewebe Kernfärbung Score [n (%)]	85 (100%)
0 (negativ)	2 (2,4%)
1 (mittel)	5 (5,9%)
2 (stark)	78 (91,8%)

Bei der Analyse der immunhistochemischen Anfärbungen zeigte sich zunächst wie erwartet, dass LSD1 vor allem im Zellkern exprimiert ist (siehe Abb. 5). Besonders im Vergleich von Tumor- und Normalgewebe der Niere fällt auf, dass LSD1 im Normalgewebe vor allem im Epithel der Sammelrohre und Tubuli lokalisiert ist, wohingegen es sich im Tumorgewebe ubiquitär nachweisen lässt. Jedoch war teilweise auch eine schwache Anfärbung des Zytoplasmas einiger Zellen zu beobachten (siehe Abb. 5, Pfeil).

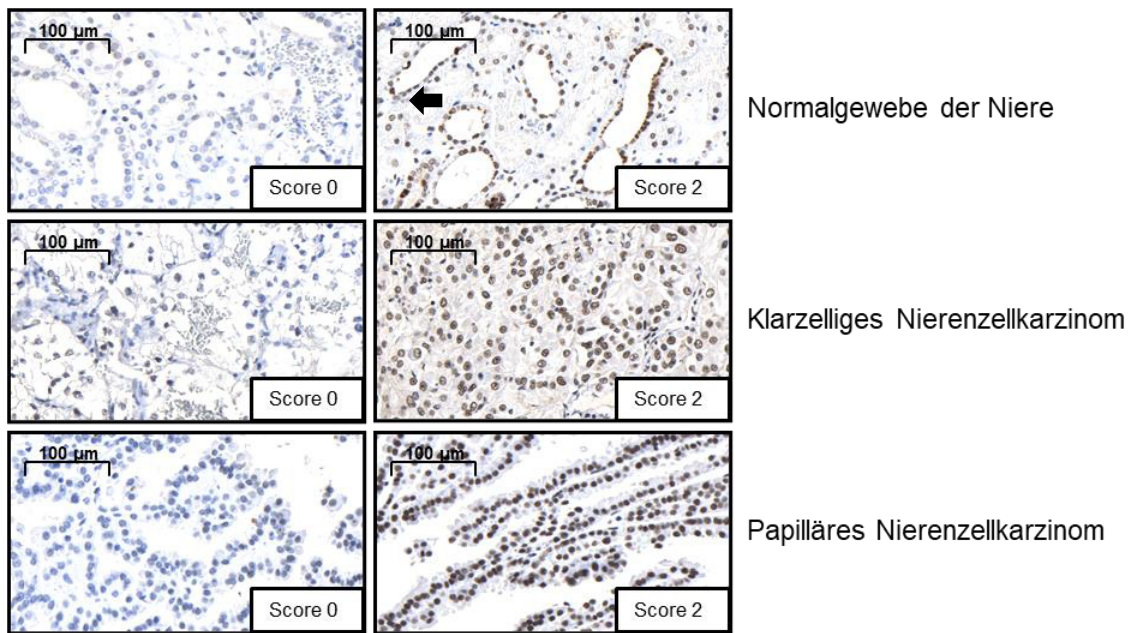


Abbildung 5: Expression von LSD1

Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild mit schwacher (linke Spalte) sowie starker (rechte Spalte) LSD1-Expression in Normal- sowie Tumorgewebe von Nierenzellkarzinompatienten (Immunhistochemie; 40fache Vergrößerung). Der Pfeil markiert zytoplasmatische Anfärbung im Normalgewebe der Niere. Die quantitative Bewertung der Anfärbung erfolgte per Eyeballing durch zwei unabhängige Untersucher am Lichtmikroskop (Score 0: 0-14,99% Anfärbung; Score 1: 15- 24,99% Anfärbung; Score 2: \geq 25% Anfärbung).

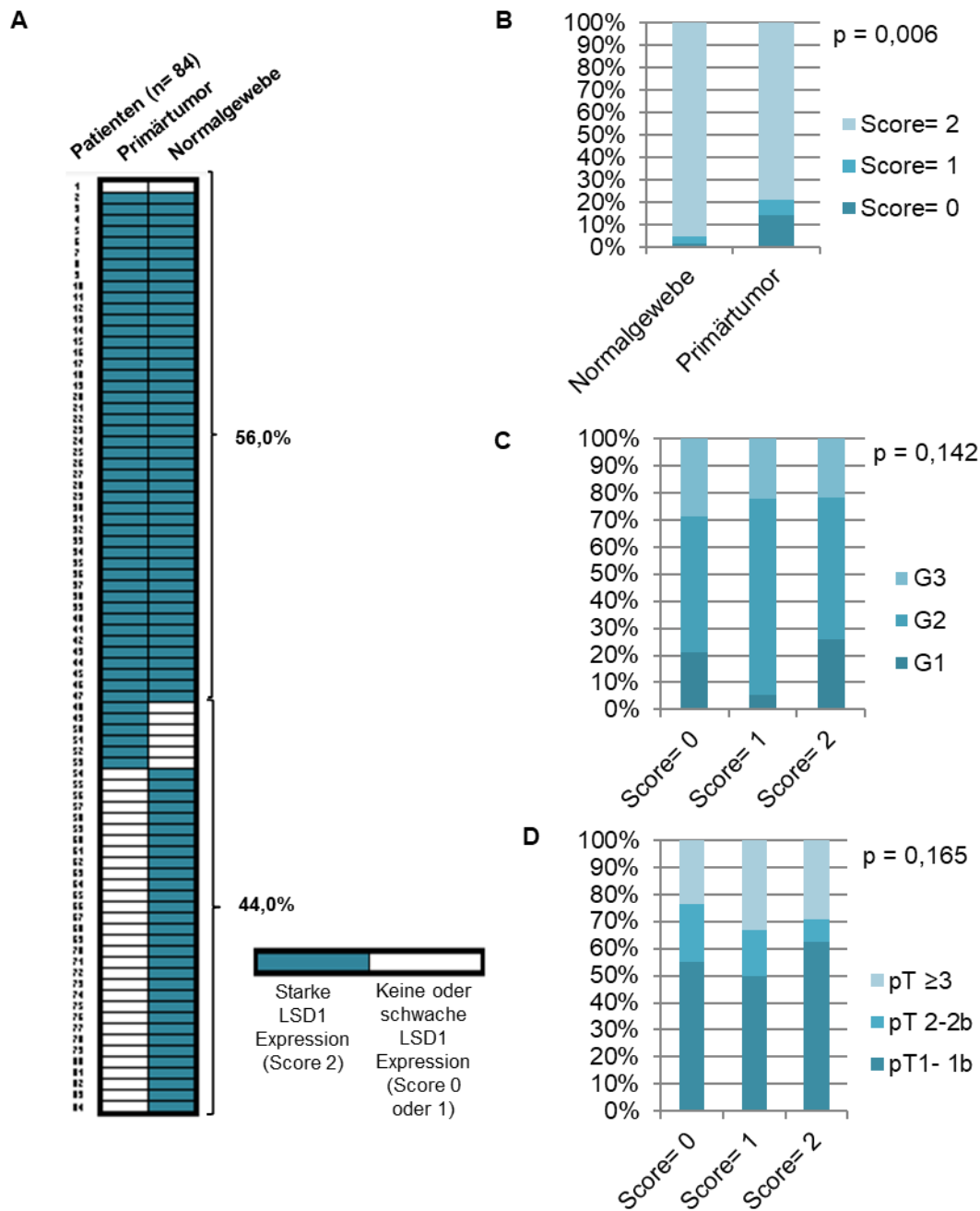


Abbildung 6: Die LSD1- Expression im Zellkern von Normal- und Tumorgewebe der Niere unterscheidet sich.

A Expression von LSD1 im Zellkern von Primärtumor und korrespondierendem Normalgewebe der Niere (n= 84 Patienten). Eine Abweichung der Expression von LSD1 in Primärtumor und dazugehörigem Normalgewebe der Niere zeigt sich in 44,0% der Fälle **B** Beim Vergleich der Expressions- Kategorien von Klarzelligem Nierenzellkarzinom (n= 270) und korrespondierendem Normalgewebe der Niere (n=65) wird ein signifikanter Unterschied deutlich ($p= 0.006$). **C-D**: Verteilung der LSD1 Expressions- Kategorien im Bezug zum T-Status **C** und Grading **D** im Klarzelligem Nierenzellkarzinom.

Die Heatmap in Abb. 6 A zeigt vergleichend die LSD1- Expression im Zellkern von korrespondierendem Proben beider Gewebearten. Hierzu wurden die entsprechenden Gewebeproben von n= 84 Patienten als TMAs arrangiert und mit Hilfe von immunhistochemischer Anfärbung auf ihre LSD1- Expression untersucht. Bei 56% der untersuchten Probenpaare fand sich kein Unterschied in der LSD1- Expression zwischen Primärtumor- und Normalgewebe, bei 54,8% wiesen beide Gewebearten eine starke LSD1- Expression auf. Eine starke Anfärbung und damit LSD1- Expression des Tumorgewebes in Kombination mit schwacher oder fehlender Anfärbung des Normalgewebes zeigte sich in 7,14% der Proben. 36,9% der gepaarten Gewebeproben dagegen zeigten im Normalgewebe eine starke LSD1- Expression, während sich im Tumorgewebe keine oder allenfalls eine schwache Expression beobachten ließ.

In Abb. 6 B sieht man die LSD1- Expression im Zellkern von n= 270 Gewebeproben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms und n= 65 Normalgewebeproben der Niere. Die immunhistochemisch angefärbten Gewebeproben wurden je nach Intensität ihrer Anfärbbarkeit mit einem Score beurteilt (Score 0= keine, Score 1= schwache, Score 2= starke Anfärbung). Im Diagramm zeigt sich, dass sich in einem Großteil der Proben eine starke LSD1- Expression (Score 2) sowohl im Normalgewebe als auch im Primärtumorgewebe findet. Eine schwache Anfärbung (Score 1) war dagegen seltener nachzuweisen, wenn auch im Primärtumorgewebe mehr als doppelt so viel häufiger als im Normalgewebe. Keine Anfärbung (Score 0) war deutlich häufiger in Proben des Primärtumorgewebes zu finden als im Normalgewebe (vgl. Abb. 6 B). Bei Betrachtung der Proben des häufigsten Tumorsubtyps, dem klarzelligen Nierenzellkarzinom, konnte im Vergleich zum korrespondierenden Normalgewebe eine noch höhere LSD1 Expression beobachtet werden ($p=0,006$). Dies gelang im Hinblick auf das papilläre Nierenzellkarzinom jedoch nicht ($p=0,197$).

Im Vergleich zur Literatur zeigte sich keine Korrelation zwischen LSD1 Expression und dem Grading. Abb. 6 C zeigt die Intensität der immunhistochemischen Anfärbung von LSD1 im Zellkern von n= 265 Primärtumorgewebeproben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms. Die Färbeintensität wurde wieder in drei Scoring-Gruppen unterteilt (0= keine, 1= schwache und 2= starke LSD1- Anfärbung bzw. Expression) und mit dem Grading (G1- G3) verglichen. Dabei fiel auf, dass sich die meisten G1-Tumore in den Gruppen Score 2 und Score 0 finden, wohingegen die Gruppe Score

1 den geringsten Anteil G1- Tumore aufweist. Dafür imponieren in dieser Gruppe die meisten Tumore mit einem G2- Status, während sie in den anderen beiden Scoring- Gruppen jeweils ungefähr die Hälfte der Gewebeproben ausmachen. Betrachtet man den G3- Status, so sind die meisten Primärtumorproben in der Gruppe Score= 0 zu finden, während sie in den anderen beiden Gruppen weniger häufig vorkommen. In der statistischen Auswertung kamen wir zu keinem signifikanten Ergebnis.

Untersucht wurde auch die Intensität der IHC- Anfärbung von Primärtumorproben des klarzelligen NCC (n= 259) in Zusammenschau mit dem pT- Status der Gewebeproben (Abb. 6 D). Der Übersichtlichkeit halber wurden sowohl die IHC- Anfärbungen in Scores unterteilt (Score 0= keine, Score 1= schwache, Score 2= starke Anfärbung) als auch die Primärtumorproben entsprechend ihres Stagings eingruppiert (Gruppe pT1- 1b, Gruppe pT2- 2b, Gruppe pT \geq 3). Den höchsten Anteil von Tumorproben mit pT1- 1b Status wies die Score-Gruppe 2 auf, während pT1- 1b- Anteil in den anderen beiden Scoring- Gruppen in etwa die Hälfte ausmachte (Score- Gruppe 0: 55,3%, Score- Gruppe 1: 50%). Ebenfalls fanden sich in den Score- Gruppen 0 und Score- Gruppe 1 mehr Tumorproben, die einen pT2- 2b Status aufwiesen, als dies in Score- Gruppe 2 der Fall war; hier fiel der Anteil an pT2- 2b- Tumoren am geringsten aus. Hinsichtlich der Tumorproben mit pT \geq 3 Status waren die meisten Fälle in Score- Gruppe 1 zu verzeichnen (33,3%), gefolgt von Score- Gruppe 2 mit 29,1%. In Score- Gruppe 0 zeigte sich dagegen die geringste Anzahl von Tumorproben mit pT \geq 3 Status. Das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht.

4.2 Expression von KDM2B

Für die immunhistochemische Untersuchung der Expression von KDM2B im Zellkern konnten 421 Gewebeproben von 332 Patienten verwendet werden, davon 332 Proben Primärtumorgewebe und 89 Proben korrespondierendes Normalgewebe der Niere. Die Kohorte der Tumorgewebeproben bestand aus 77,7% (n= 258) klarzelligem Nierenzellkarzinom, 19% (n= 63) papillärem Nierenzellkarzinom und 3,3% (n= 11) chromophobem Nierenzellkarzinom. Um die Expression von KDM2B im Zytoplasma mittels Immunhistochemie zu analysieren, konnten 431 Gewebeproben von 342 Patienten verwendet werden, davon 342 Proben Primärtumorgewebe und

89 Proben korrespondierendes Normalgewebe der Niere. Hierbei setzten sich die Tumorgewebeproben aus 78% (n= 267) klarzelligem Nierenzellkarzinom, 18,7% (n= 64) papillärem Nierenzellkarzinom und 3,2% (n= 11) chromophobem Nierenzellkarzinom zusammen.

Die geringe Anzahl von Gewebeproben des chromophoben Nierenzellkarzinoms (n=11) konnte in der statistischen Auswertung keine separate Berücksichtigung finden und wurde deshalb ausschließlich als Teil der Gesamtkohorte in die Auswertung miteinbezogen.

Tabelle 8: Verteilung der Anfärbung von KDM2B.

Intensität der IHC-Anfärbung innerhalb der Gesamtkohorte mit allen Tumorsubtypen und Normalgewebe der Niere, jeweils mit Fokus auf Zytoplasma- und Kernfärbung

KDM2B Primärtumor Kernfärbung Score [n (%)]	332 (100%)
0 (negativ)	10 (3%)
1 (mittel)	23 (6.9%)
2 (stark)	299 (90.1%)
KDM2B Normalgewebe Kernfärbung Score [n (%)]	89 (100%)
0 (negativ)	5 (5.6%)
1 (mittel)	45 (50.6%)
2 (stark)	39 (43.8%)
KDM2B Primärtumor Zytoplasmafärbung Score [n (%)]	342 (100%)
0 (negativ)	5 (1.5%)
1 (mittel)	7 (2%)
2 (stark)	330 (96.5%)
KDM2B Normalgewebe Zytoplasmafärbung Score [n (%)]	89 (100%)
0 (negativ)	2 (2.2%)
1 (mittel)	10 (11.2%)
2 (stark)	77 (86.5%)

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Anfärbungen zeigte sich, dass KDM2B sowohl in Normalgewebe der Niere als auch im Primärtumorgewebe im Zytoplasma vorkommt. Auch im Zellkern konnte KDM2B sowohl in Primärtumor- und Normalgewebe nachgewiesen werden, wobei das Enzym vor allem im Epithel von Glomerulum und Tubulus exprimiert wird (Abb. 7 und 8).

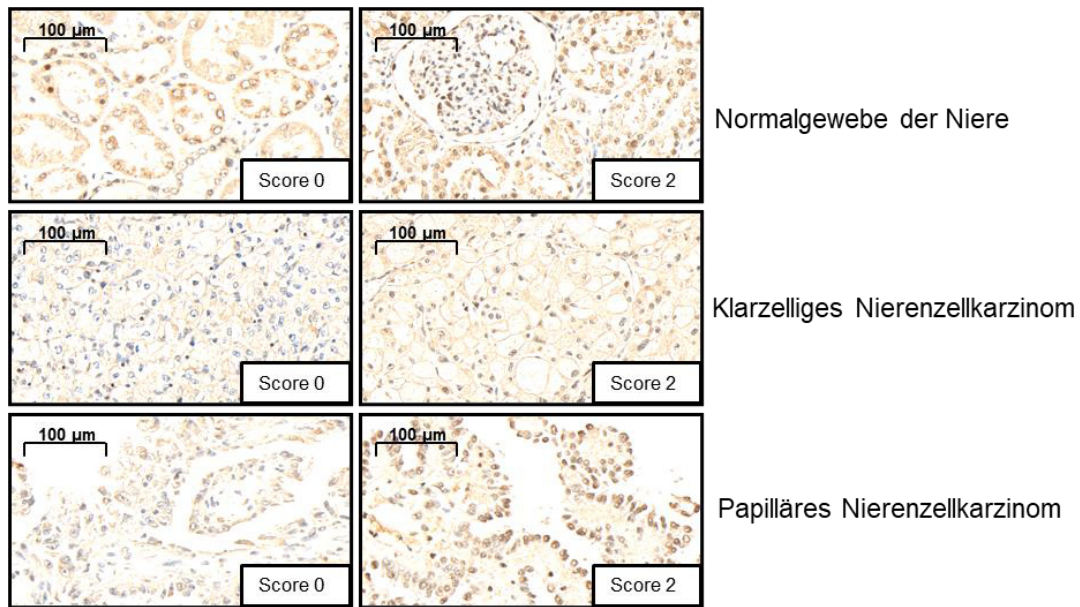


Abbildung 7: Expression von KDM2B im Zellkern

Abgebildet ist die KDM2B- Expression im Zellkern des Normal- sowie Tumorgewebes von Nierenzellkarzinompatienten (Immunhistochemie; 40fache Vergrößerung). Vergleichend ist auf der linken Seite schwache Expression (Score 0) und rechts starke Expression (Score 2) gezeigt. Die quantitative Bewertung der Anfärbung erfolgte per Eyeballing durch zwei unabhängige Untersucher am Lichtmikroskop (Score 0: 0-14,99% Anfärbung; Score 1: 15- 24,99% Anfärbung; Score 2: \geq 25% Anfärbung).

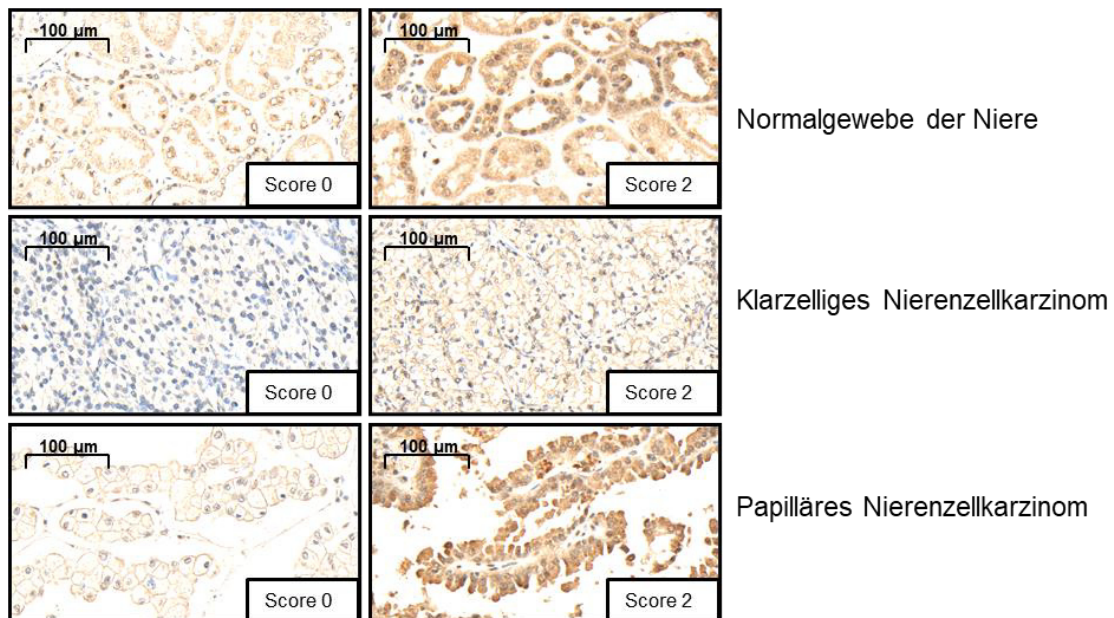


Abbildung 8: Expression von KDM2B im Zytoplasma.

Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild mit schwacher (linke Spalte) sowie starker (rechte Spalte) KDM2B-Expression im Zellplasma (Immunhistochemie; 40fache Vergrößerung). Angefärbt wurde Normal- sowie Tumorgewebe von Nierenzellkarzinompatienten. Die quantitative Bewertung der Anfärbung erfolgte per Eyeballing durch zwei unabhängige Untersucher am Lichtmikroskop (Score 0: 0-14,99% Anfärbung; Score 1: 15- 24,99% Anfärbung; Score 2: \geq 25% Anfärbung).

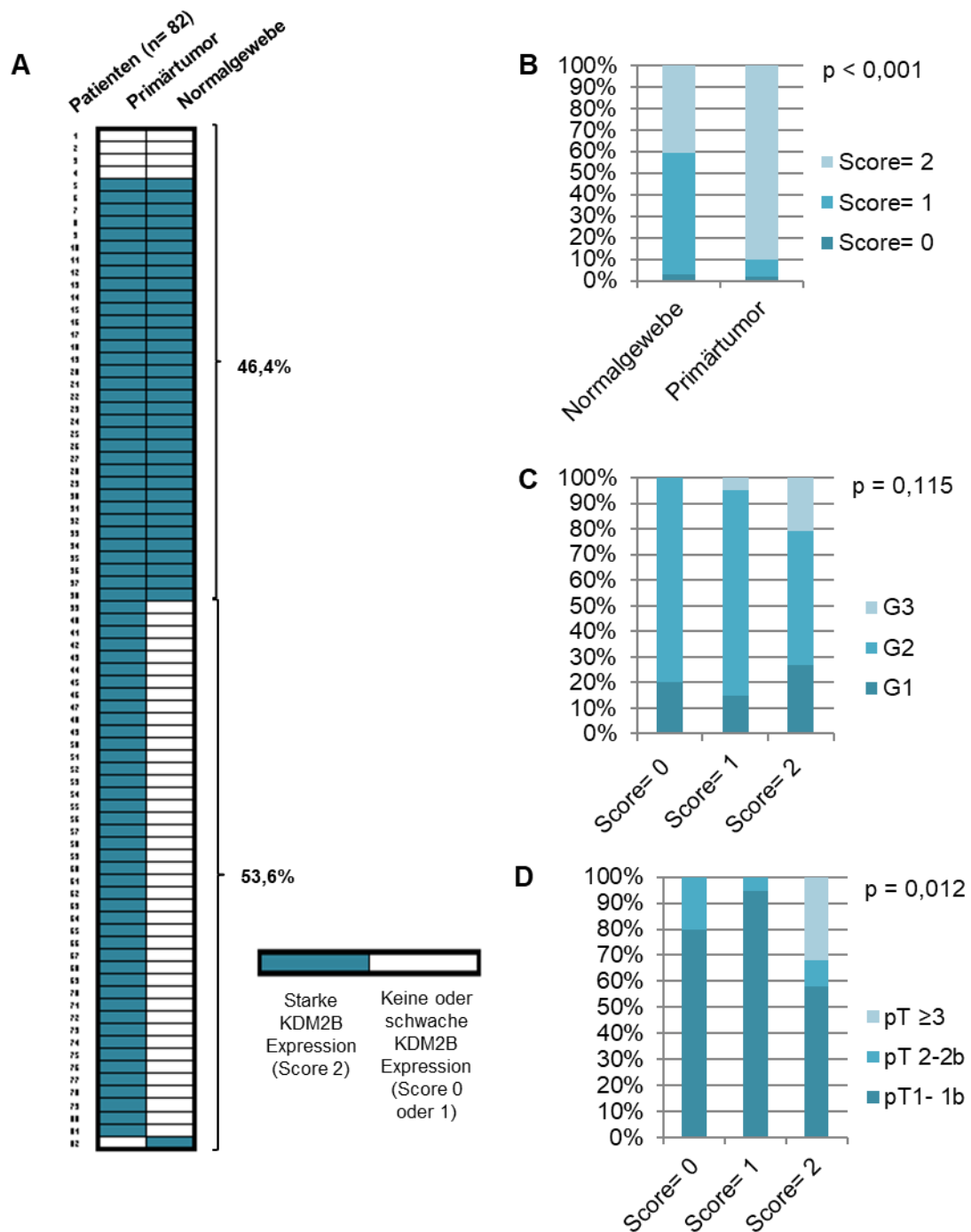


Abbildung 9: Expression von KDM2B im Zellkern von korrespondierendem Normalgewebe der Niere und Primärtumor.

Die Heat Map **A** zeigt Gewebeproben von n= 82 Patienten, von denen sowohl Tumors als auch korrespondierendes Normalgewebe angefärbt wurde. Ein Unterschied in der Expression von KDM2B in Primärtumor und dazugehörigem Normalgewebe der Niere findet sich bei 53,6% der Patienten. **B** Vergleich der KDM2B- Expression im Zellkern von Normalgewebe der Niere (n= 69) und Primärtumorgewebe des klarzelligem Nierenzellkarzinoms (n= 258) **C- D** Demonstriert ist die Intensität der IHC- Anfärbungen von Primärtumorproben des klarzelligem Nierenzellkarzinoms hinsichtlich ihres **C** Grading (n= 53) bzw. **D** T- Status (n= 247).

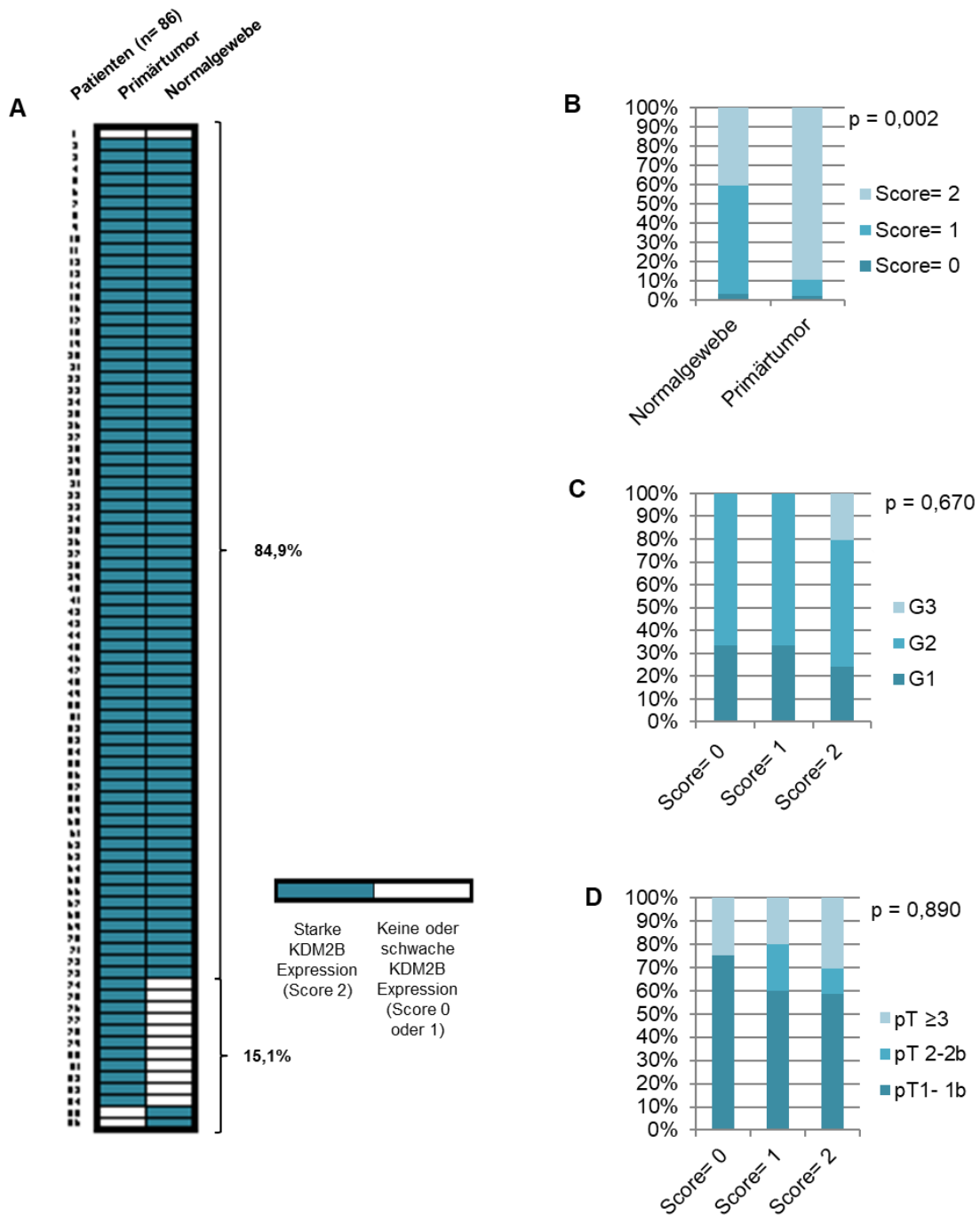


Abbildung 10: Expression von KDM2B im Zytoplasma von Primärtumor und korrespondierendem Normalgewebe der Niere.

Die Heatmap **A** zeigt n= 86 Patienten, von denen sowohl Tumor- als auch Normalgewebe angefärbt wurde **B** Unterschiede der zytoplasmatischen KDM2B- Expression in Normalgewebe der Niere (n= 69) und Primärtumorgewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms (n= 267) **C- D** Gezeigt ist die Zusammensetzung der IHC- Anfärbungen von Primärtumorproben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms hinsichtlich ihres **C** Gradings (n= 261) bzw. **D** T- Status (n= 256).

Tabelle 9: Expression von KDM2B in Zellkern und Zytoplasma.

Evaluation der KDM2B-Expression in Korrelation zu verschiedenen Parametern (p- Wert errechnet mittels Chi-Quadrat- Test, Signifikanz- Niveau $p < 0,05$).

KDM2B Primärtumor Kernfärbung			
	vs. Normalgewebe	vs. T- Status	vs. Grading
Kohorte gesamt	<0,001	0,007	0,007
Klarzelliges NCC	<0,001	0,012	0,115
Papilläres NCC	<0,001	0,634	0,087
KDM2B Primärtumor Zytoplasmafärbung			
	vs. Normalgewebe	vs. T- Status	vs. Grading
Kohorte gesamt	<0,001	0,465	0,431
Klarzelliges NCC	0,002	0,686	0,670
Papilläres NCC	0,071	0,984	0,582

Tabelle 8 veranschaulicht die Expression von KDM2B in der Gesamtkohorte aller Tumorsubtypen und dem Normalgewebe der Niere. Hierbei imponierte eine starke KDM2B- Expression im Zellkern in 90,1% der untersuchten Primärtumorproben (siehe Tab. 8). In den hinsichtlich der KDM2B-Expression untersuchten Normalgewebeproben zeigte sich dagegen nur in 43,8% eine starke Expression im Zellkern (siehe Tab. 8).

Auch im Vergleich gematchter Gewebeproben von Patienten, von denen sowohl Normal- als auch Primärtumorgewebe untersucht wurde, ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen Zytoplasma- und Kernfärbung.

Es wurde die KDM2B- Expression im Zellkern der Gewebeproben von $n= 82$ Patienten analysiert, von denen jeweils Normal- als aus Primärtumorgewebe immunhistochemisch angefärbt wurde (Abb. 9 A). In 46,4% der untersuchten gepaarten Gewebeproben fand sich hinsichtlich der Intensität der Anfärbung in Normal- und Primärtumorgewebe kein Unterschied. Die Primärtumorproben wiesen in 52,4% der Fälle eine starke KDM2B- Expression im Zellkern auf, während das zugehörige Normalgewebe keine oder nur eine schwache Expression aufwies (Abb. 9 A).

Wir verglichen die Intensität der zytoplasmatischen KDM2B- Anfärbung in Normal- und Primärtumorgewebe der Niere nach gleichem Schema (Abb. 10 A). Untersucht wurden hier mit Hilfe von immunhistochemischen Anfärbungen die korrespondierenden Gewebeproben von $n= 86$ Patienten.

Die Mehrzahl der Gewebeproben zeigte keinen Unterschied in der zytoplasmatischen Expressionsstärke von KDM2B zwischen Normal- und Primärtumorgewebe:

In 83,7% der Fälle wies sowohl das Normal- als auch das Tumorgewebe eine starke KDM2B- Expression im Zytoplasma auf. Lediglich bei 12,8% der Gewebeproben imponierte eine stärkere KDM2B- Expression im Tumorgewebe, während sie im Normalgewebe schwach oder gar nicht ausgeprägt war. In 1,2% zeigte sich sowohl im Tumor- als auch im Normalgewebe eine schwach bzw. nicht ausgeprägte KDM2B- Expression und 2,3% der Gewebeproben zeigten eine schwache bzw. nicht ausgeprägte KDM2B- Expression im Tumorgewebe, jedoch eine starke KDM2B- Expression im Normalgewebe (vgl. Abb. 9 A).

Während sich also in der Zytoplasmafärbung nur in 15,1% der Fälle eine Abweichung der Expression von KDM2B in Normal- und zugehörigem Primärtumorgewebe der Niere zeigte, waren dies in der Kernfärbung in über der Hälfte der untersuchten Proben der Fall.

In der Gesamtkohorte ergab sich sowohl in der KDM2B-Zytoplasmafärbung als auch im Hinblick auf die KDM2B- Kernfärbung im Bezug zum Normalgewebe ein signifikantes Ergebnis (jeweils $p < 0,001$). Auch bei isolierter Betrachtung des papillären Nierenzellkarzinoms konnte das Signifikanzniveau im Vergleich mit dem Parameter „Normalgewebe“ in der KDM2B- Kernfärbung ($p < 0,001$) erreicht werden, nicht jedoch in der KDM2B- Zytoplasmafärbung ($p = 0,071$). Wir führten zudem eine isolierte Analyse der Kernfärbung von KDM2B im klarzelligen Nierenzellkarzinom im Vergleich zur Expression im Normalgewebe durch. Die Unterschiede der immunhistochemischen Anfärbung von Normalgewebe der Niere ($n = 69$) und korrespondierendem Primärtumorgewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms ($n = 258$) werden in Abb. 9 B verdeutlicht ($p < 0,001$). In unseren Auswertungen fiel auf, dass Primärtumorproben mehr als doppelt so häufig mit einem Score von 2 (d.h. starke Anfärbung) assoziiert waren, als dies in der Gruppe der Normalgewebeproben der Fall war. Dagegen fand sich ein Score von 1 (schwache Anfärbung) in über der Hälfte der Normalgewebeproben, bei den Tumorgewebeproben war dies hingegen nur bei 7,8% der Fall. Hinsichtlich der Häufigkeit des Scores 0 (keine Anfärbung) zeigte sich in beiden Gruppen ein sehr geringer Anteil, dennoch überwog die Gruppe mit dem Normalgewebe hierbei knapp vor der Gruppe mit den Primärtumoren.

Bei der isolierten Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von KDM2B im Zytoplasma des klarzelligen Nierenzellkarzinoms fand sich ein ähnliches

Verteilungsmuster, wie es bei der Zellkernfärbung der Fall war (Abb. 10 B). Untersucht wurden dafür n= 69 Proben Normalgewebe der Niere und n= 267 Proben korrespondierendes Primärtumorgewebe vom klarzelligen Nierenzellkarzinom. Das Primärtumorgewebe wies häufiger eine starke KDM2B- Expression bzw. -Anfärbung (Score 2) im Zytoplasma auf, als dies beim Normalgewebe der Fall war. Dagegen zeigte die Mehrzahl der Normalgewebeprouben einen Score von 1 (schwache Anfärbung) - wesentlich häufiger, als dies bei den Primärtumorgewebeprouben beobachtet werden konnte. Hinsichtlich der Häufigkeit des Scores 0 (keine Anfärbung) fand sich dagegen bei beiden Gewebeproubengruppen nur ein geringer Unterschied (Normalgewebe: 2,9%; Primärtumorgewebe: 1,9%). Die statistische Auswertung zeigte hier ein signifikantes Ergebnis (p= 0,002).

Wir untersuchten Gewebeprouben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms hinsichtlich der Zusammensetzung des Grading (G1- G3) innerhalb der immunhistochemischen Scoring- Gruppen (Score 0= keine, Score 1= schwache, Score 2= starke Anfärbung).

In Abb. 9 C ist die Auswertung der Zellkernfärbung von n= 253 Proben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms gezeigt. Die Gewebeprouben der Score= 0 Gruppe setzten sich überwiegend aus G2- Primärtumoren zusammen, Proben mit einem G3- Status waren in dieser Gruppe nicht vorhanden. Die Score- 1 Gruppe zeigte sich ähnlich von der Zusammensetzung des Grading, hier fand sich jedoch auch ein geringer Teil Gewebeprouben mit G3 Status. Der größte Anteil an G3- Tumorgewebeprouben war in der Score- 2 Gruppe zu verzeichnen (20,6%). Zwar zeigte sich in der Score- 2 Gruppe der niedrigste prozentuale Anteil von G2- Tumoren, jedoch überwog der Anteil an G1- Tumoren mit 26,8% deutlich die anderen beiden Scoring- Gruppen. Das Signifikanzniveau konnte in der statistischen Auswertung nicht erreicht werden.

Analog erfolgte die Auswertung der zytoplasmatischen KDM2B- Anfärbung bezüglich des Grading. Hierfür standen n= 261 Gewebeprouben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms zur Verfügung. Diese wurden mit Hilfe von immunhistochemischen Anfärbungen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen KDM2B- Expression und Grading untersucht (Abb. 10 C). Die Scoring- Gruppen 0 und 1 wiesen beide einen gleich hohen Anteil von G1- Tumoren auf, wohingegen die Scoring- Gruppe 2 geringsten Anteil an G1- Tumoren zeigte. Ähnlich verhielt es sich mit der Verteilung des G2- Status: In den Scoring Gruppen 0 und 1 waren Tumorprouben mit G2-

Status häufiger vertreten, als es in der Scoring Gruppe 2 der Fall war. Dafür war letztere die einzige Scoring Gruppe, in der Tumorproben mit G3- Status zu verzeichnen waren; diese machten ein Fünftel der Gewebeproben aus.

Tendenziell zeigte sich bei der Auswertung, dass ein höheres Grading der Tumorgewebeproben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms häufiger mit einer stärkeren immunhistochemischen Anfärbung bzw. Expression von KDM2B einherging, wenngleich aus der statistischen Auswertung kein signifikantes Ergebnis resultierte. Diese Beobachtung zeigte sich sowohl bei der Kern- als auch bei der zytoplasmatischen KDM2B- Expression im klarzelligen Nierenzellkarzinom. Eine gesonderte Analyse des papillären Nierenzellkarzinoms auf eine mögliche Korrelation hinsichtlich des Gradings erbrachte weder bei Betrachtung der Zytoplasma-, noch bei der Zellkernanfärbung ein signifikantes Ergebnis.

Ferner prüften wir, ob sich ein möglicher Zusammenhang zwischen der KDM2B- Expression und dem pT- Status der jeweiligen Primärtumorproben zeigte. Im Hinblick auf die Gesamtkohorte war ein höherer pT- Status in unseren Untersuchungen mit einer stärkeren Expression bzw. immunhistochemischen Anfärbung von KDM2B im Zellkern ($p= 0,007$), jedoch nicht mit einer stärkeren KDM2B- Expression im Zytoplasma der untersuchten Zellen verbunden. Es erfolgte zudem eine isolierte Betrachtung der immunhistochemischen KDM2B- Zellkernfärbung von Primärtumorproben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms ($n= 247$) in Zusammenschau mit ihrem pT- Status (Abb. 9 D). Die Anfärbbarkeit der Zellkerne wurde nach Intensität wie auch bei den Untersuchungen zuvor in drei Scoring- Gruppen eingeteilt (Score 0= keine, Score 1= schwache, Score 2= starke Anfärbung), ebenso wurde der pT- Status der Tumorproben in Gruppen erfasst (Gruppe pT1- 1b, Gruppe pT2- 2b, Gruppe pT ≥ 3). Den höchsten Anteil eines pT1- 1b Status wiesen die Gewebeproben der Scoring- Gruppe 1 auf, gefolgt von Scoring- Gruppe 0. Primärtumorproben, die einen pT2- 2b Status aufwiesen, ließen sich in allen drei Scoring- Gruppen ausmachen, wobei der größte Prozentsatz in Scoring- Gruppe 0 lag. Einen pT ≥ 3 Status dagegen wiesen nur Gewebeproben auf, die mit einer starken Anfärbung (Score 2) assoziiert waren. Unsere Analyse führte hinsichtlich Expression im Tumorgewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms in Korrelation zum pT- Status zu einem signifikanten Ergebnis ($p= 0,012$, siehe Tab. 9).

Ein anderes Resultat erbrachte dagegen die Untersuchung von pT- Status und

immunhistochemischen KDM2B- Anfärbung im Zytoplasma. Die Auswertung von n= 256 Primärtumorproben des klarzelligem Nierenzellkarzinoms in Bezug zur Konstellation des pT- Status innerhalb der einzelnen Scoring- Gruppen wird in Abb. 10 D verdeutlicht. Die Scoring- Gruppe 0 (keine Anfärbung) wies mit 75% die meisten Tumore mit einem pT1- 1b Status auf, gefolgt von Scoring- Gruppe 1 und 2, die sich in dieser Hinsicht kaum in ihrer Zusammensetzung unterschieden. Primärtumorproben mit einem pT2- 2b Status fanden sich ausschließlich in den Scoring- Gruppen 1 und 2, fehlten jedoch gänzlich in Scoring- Gruppe 0. Anders verhielt es sich mit dem Vorkommen von Primärtumoren, die einen pT \geq 3 Status aufwiesen: Hier zeigte sich die größte Häufigkeit in Scoring- Gruppe 2, doch auch in Scoring- Gruppe 0 und Scoring Gruppe 1 waren Tumore mit einem pT \geq 3 Status enthalten. Insgesamt erwiesen sich unsere Beobachtungen hier als nicht signifikant. Auch bei isolierter Betrachtung der Tumorproben des papillären Nierenzellkarzinoms ließ sich weder im Hinblick auf die KDM2B-Expression in Zellkern, noch im Zytoplasma eine signifikante Korrelation hinsichtlich des pT- Status der verwendeten Proben nachweisen.

4.3 Expression von JARID1C

Um die Expression von JARID1C mittels immunhistochemischer Anfärbung im Zellkern zu untersuchen, standen 367 Gewebeproben von 284 Patienten zur Verfügung. Dabei handelte es sich um 284 Proben Primärtumorgewebe und 83 Proben korrespondierendes Normalgewebe der Niere. Die Gruppe der Tumorgewebeproben setzte sich zusammen aus 79,2% (n= 225) klarzelligem Nierenzellkarzinom, 16,9% (n= 48) papillärem Nierenzellkarzinom und 3,9% (n= 11) chromophobem Nierenzellkarzinom. Für die immunhistochemische Analyse der zytoplasmatischen JARID1C Expression wurden 394 Gewebeproben von 311 Patienten verwendet, darunter 311 Proben Primärtumorgewebe und 83 Proben Normalgewebe der Niere. Dabei fanden sich unter den Tumorgewebeproben 78,8% (n= 245) klarzelliges Nierenzellkarzinom, 18% (n= 56) papilläres Nierenzellkarzinom und 3,2% (n= 10) chromophobes Nierenzellkarzinom.

Aufgrund der geringen Anzahl Gewebeproben des chromophoben Nierenzellkarzinoms wurde diese Tumoruntergruppe nicht gesondert statistisch ausgewertet, sondern ausschließlich als Teil der Gesamtkohorte in die Auswertung miteinbezogen.

Tabelle 10: Expression von JARID1C.

Gezeigt ist die Intensität der IHC-Anfärbung von Zytoplasma- und Zellkernanfärbung. Gesamtkohorte mit allen Tumorsubtypen und korrespondierendem Normalgewebe der Niere.

JARID1C Primärtumor Kernfärbung Score [n (%)]	284 (100%)
0 (negativ)	5 (1,8%)
1 (mittel)	60 (21,1%)
2 (stark)	219 (77,1%)
JARID1C Normalgewebe Kernfärbung Score [n (%)]	83 (100%)
0 (negativ)	38(45,8%)
1 (mittel)	27 (32,5%)
2 (stark)	18 (21,7%)
JARID1C Primärtumor Zytoplasmafärbung Score [n (%)]	311 (100%)
0 (negativ)	14 (4,4%)
1 (mittel)	35 (11,3%)
2 (stark)	262 (84,2%)
JARID1C Normalgewebe Zytoplasmafärbung Score [n (%)]	83 (100%)
0 (negativ)	19 (22,9%)
1 (mittel)	39 (47%)
2 (stark)	25 (30,1%)

JARID1C konnte in der Analyse unserer immunhistochemischen Untersuchungen in Zellkern und Zytoplasma nachgewiesen werden, sowohl im Normalgewebe der Niere als auch im Primärtumorgewebe. Ähnlich wie KDM2B zeigte sich vor allem eine starke Expression bzw. Anfärbung im Epithel der Tubuli des Normalgewebes, wobei JARID1C verstärkt im Primärtumor nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 11 und 12).

Im Hinblick auf die Auswertung der Gesamtkohorte fand sich eine starke JARID1C Zellkernexpression in 77,1% der Primärtumorproben, jedoch nur in 21,7% der Normalgewebeproben (siehe Tab. 10). Im Zytoplasma zeigten 84,2% der Primärtumorgewebeproben eine starke JARID1C- Expression, während dies beim Normalgewebe der Gesamtkohorte nur in 30,1% der Proben der Fall war (Tab. 10).

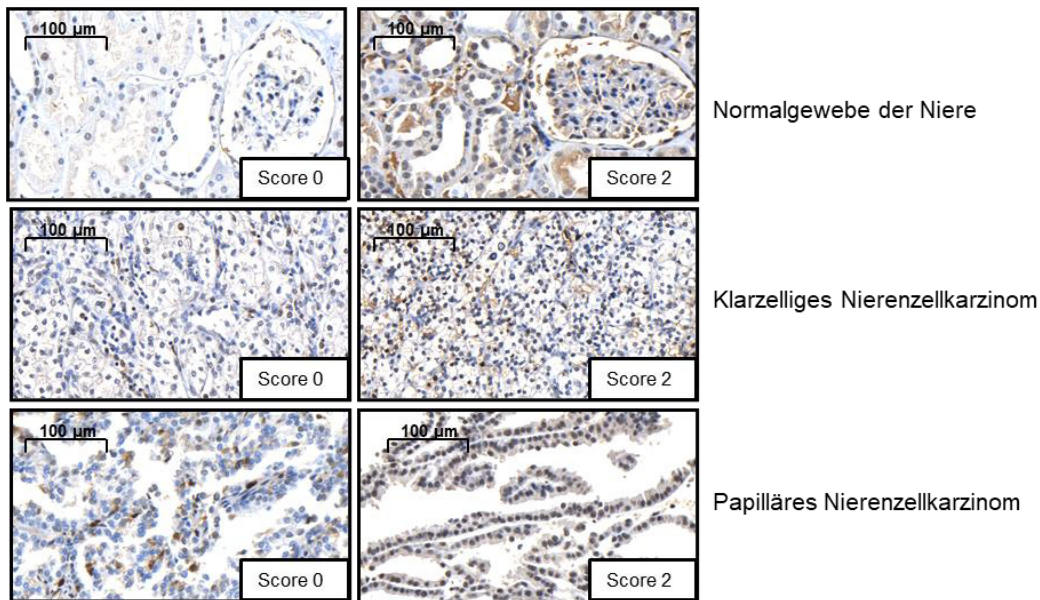


Abbildung 11: Expression von JARID1C im Zellkern.

Jeweils ein repräsentatives Bild mit schwacher (Score 0, linke Spalte) sowie starker (Score 2, rechte Spalte) zeigt die JARID1C-Expression in Normal- sowie Tumorgewebe von Nierenzellkarzinompatienten (Immunhistochemie; 40fache Vergrößerung). Die quantitative Bewertung der Anfärbung erfolgte per Eyeballing durch zwei unabhängige Untersucher am Lichtmikroskop (Score 0: 0-14,99% Anfärbung; Score 1: 15- 24,99% Anfärbung; Score 2: \geq 25% Anfärbung).

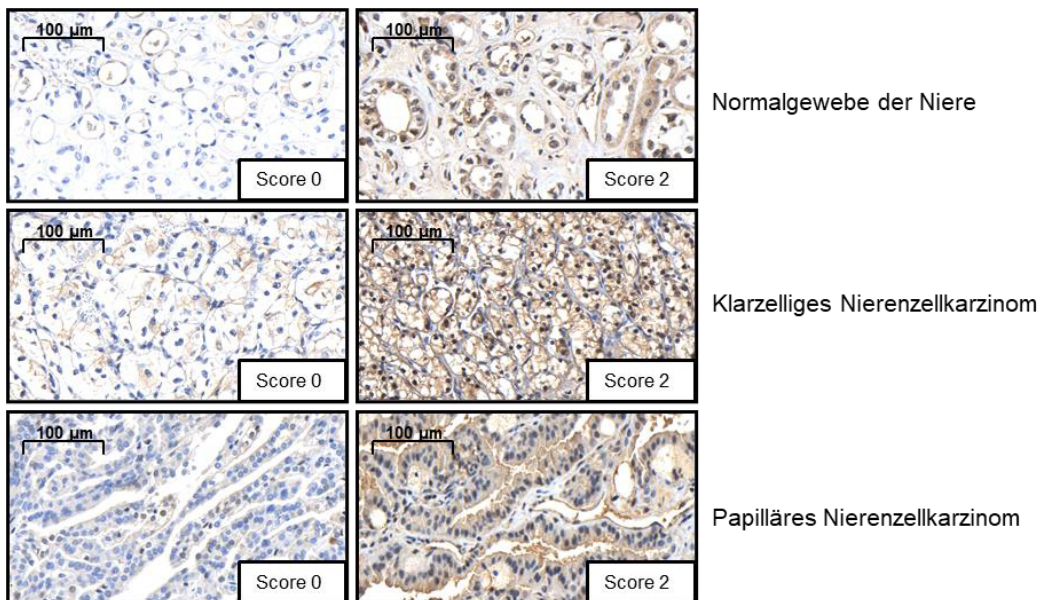


Abbildung 12: Expression von JARID1C im Zytoplasma.

JARID1C-Expression in Normal- sowie Tumorgewebe von Nierenzellkarzinompatienten (Immunhistochemie; 40fache Vergrößerung). Linke Spalte: Schwache Expression (Score 0), rechte Spalte: Starke Expression (Score 2). Die quantitative Bewertung der Anfärbung erfolgte per Eyeballing durch zwei unabhängige Untersucher am Lichtmikroskop (Score 0: 0-14,99% Anfärbung; Score 1: 15- 24,99% Anfärbung; Score 2: \geq 25% Anfärbung).

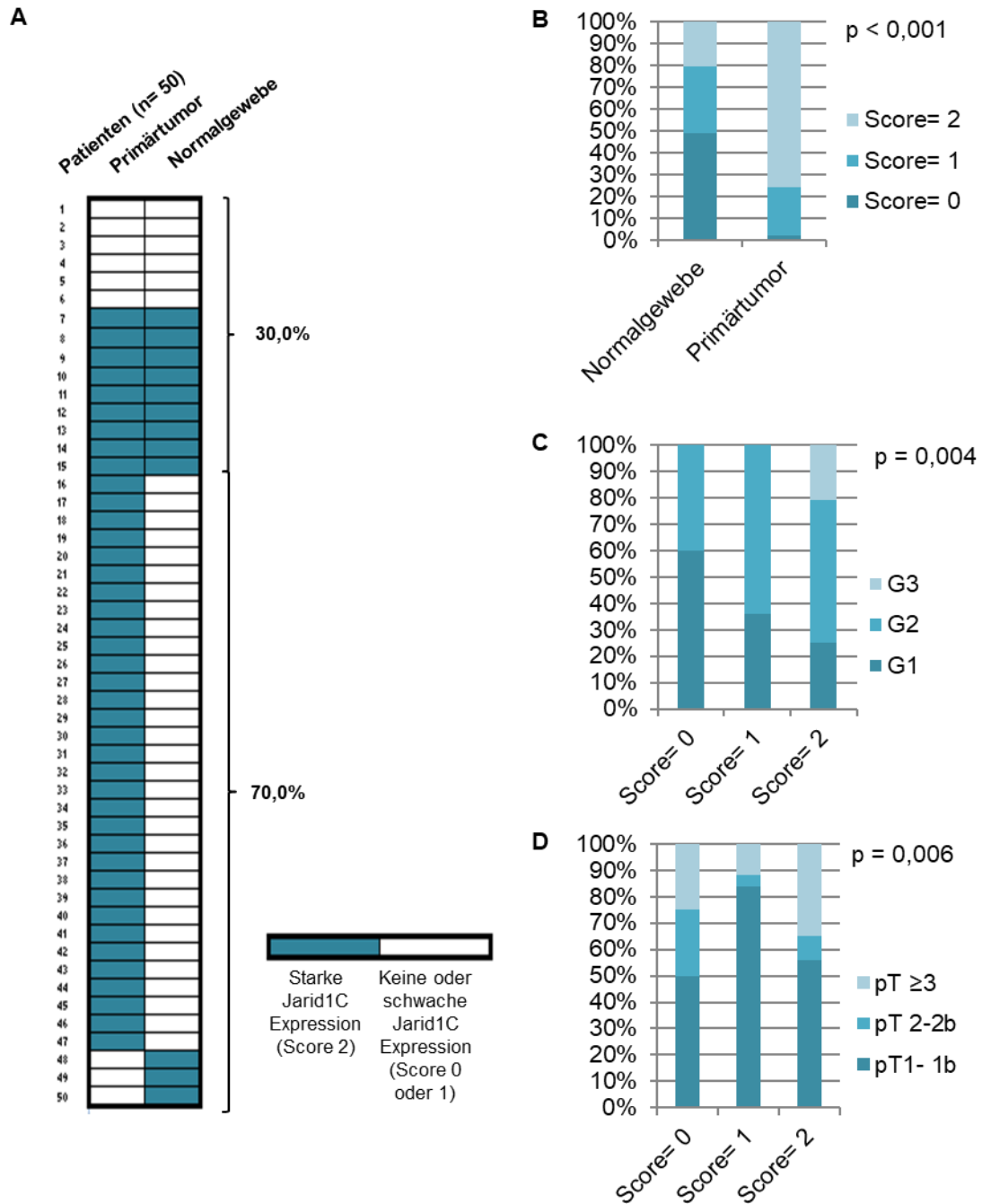


Abbildung 13: Abweichung der Expression von JARID1C im Zellkern von Primärtumor und korrespondierendem Normalgewebe der Niere.

A zeigt korrespondierende Gewebeproben von n= 50 Patienten, von denen sowohl Tumor- als auch Normalgewebe angefärbt wurde. In **B** ist die Verteilung der Expressions- Kategorien in klarzelligem Nierenzellkarzinom (n= 255) und korrespondierendem Normalgewebe der Niere (n= 63) dargestellt. Gezeigt werden außerdem die Unterschiede der JARID1C- Expressions- Kategorien im Bezug zum **C** Grading (n=219) und **D** T-Status (n=216) im klarzelligem Nierenzellkarzinom.

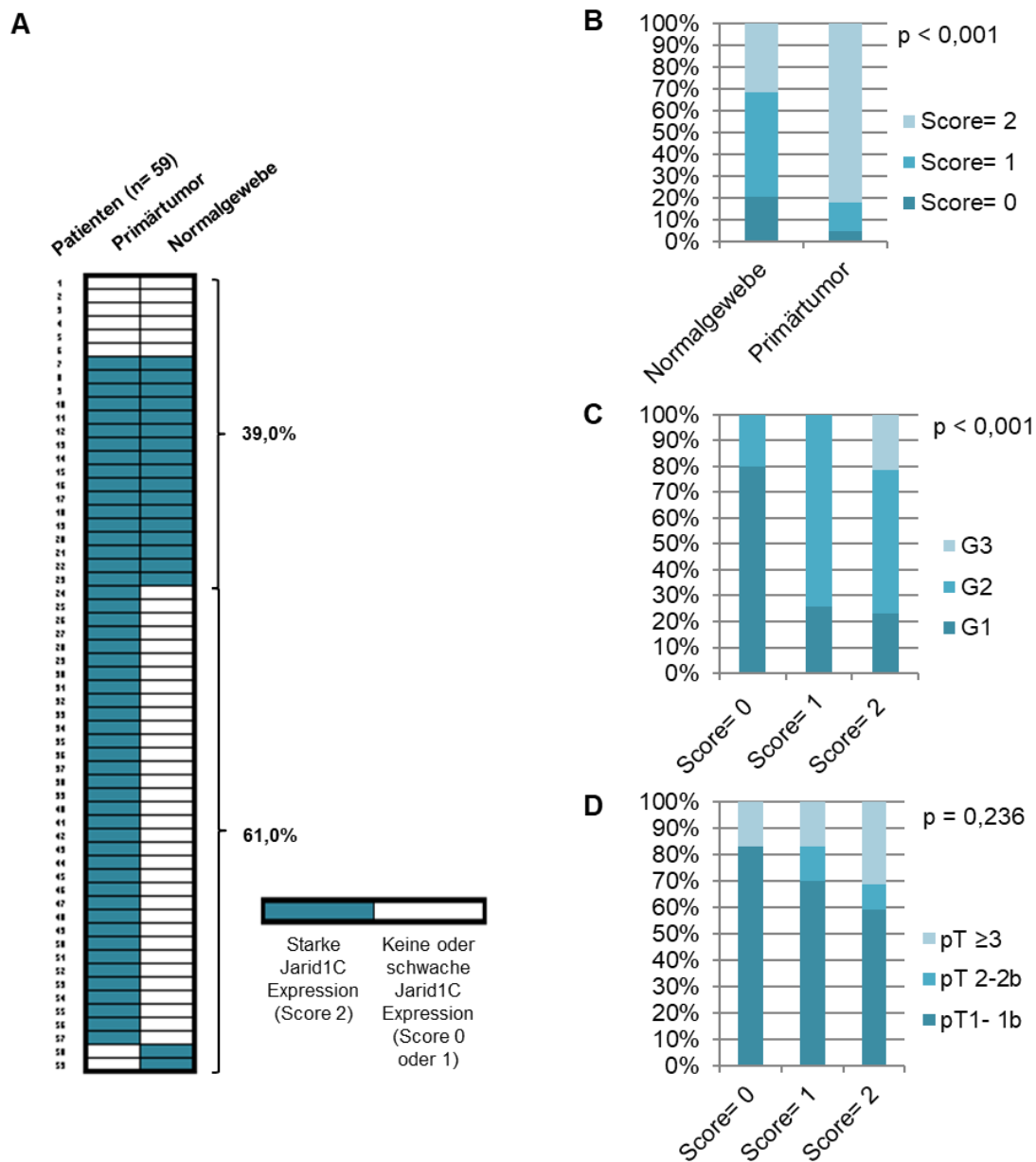


Abbildung 14: Expression von JARID1C im Zytoplasma von Primärtumor und korrespondierendem Normalgewebe der Niere.

In **A** sind n= 59 Patienten gezeigt, von denen sowohl Primärtumor- als auch Normalgewebe mittels IHC- Anfärbungen auf die Expression von JARID1C untersucht wurde. **B** veranschaulicht Unterschiede der JARID1C- Expression zwischen klarzelligem Nierenzellkarzinom (n= 245) und Normalgewebe (n= 63) der Niere. **C** und **D** zeigen die Intensität der IHC- Anfärbungen im Vergleich mit dem G- Status **C** (n= 239) bzw. T- Status **D** (n= 235) der Gewebeproben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms.

Tabelle 11: Expression von JARID1C in Zellkern und Zytoplasma.

Dargestellt ist die JARID1C-Expression in Korrelation zu verschiedenen Parametern (p- Wert errechnet mittels Chi-Quadrat- Test, Signifikanz- Niveau $p < 0,05$).

JARID1C Primärtumor Kernfärbung

	vs. Normalgewebe	vs. T- Status	vs. Grading
Kohorte gesamt	<0,001	0,004	0,001
Klarzelliges NCC	<0,001	0,006	0,004
Papilläres NCC	<0,001	0,576	0,046

JARID1C Primärtumor Zytoplasmafärbung

	vs. Normalgewebe	vs. T- Status	vs. Grading
Kohorte gesamt	<0,001	0,702	<0,001
Klarzelliges NCC	<0,001	0,873	<0,001
Papilläres NCC	<0,001	<0,001	0,011

Im direkten Vergleich der Gewebeproben (Normalgewebe der Niere und Primärtumor) zeigten sich Unterschiede bezüglich der Expression: Sowohl die Gesamtkohorte der Nierenzellkarzinomproben, als auch die klarzelliges und papillären Nierenzellkarzinome als isolierte Gruppen betrachtet, wiesen eine stärkere JARID1C-Expression als das Normalgewebe der Niere auf. Dabei ergab sich sowohl für die Auswertung zytoplasmatischen Anfärbung als auch für die Kernfärbung ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,001$, vgl. Tab. 11).

Wir untersuchten die JARID1C- Expression im Zellkern der Gewebeproben von $n = 50$ gematchten Patienten, von denen jeweils Normal- als auch Primärtumorgewebe vom Nierenzellkarzinom anhand von TMAs für unsere immunhistochemischen Untersuchungen zur Verfügung stand (Abb. 13). Bei dem Vergleich der Expressionsstärke zeigte sich bei 30% der Gewebeproben kein Unterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe. 70% der Proben wiesen dagegen hinsichtlich der Expression im Zellkern einen Expressionsunterschied zwischen Normal- und Tumorgewebe auf: Nur in 3% der Fälle zeigte das Normalgewebe eine stärkere Expression von JARID1C im Zellkern, bei einem Großteil (67%) jedoch war eine stärkere Expression von JARID1C im Primärtumorgewebe des Nierenzellkarzinoms zu finden. Eine stärkere Anfärbung des Zellkerns wurde bei der Auswertung der Proben häufiger im Primärtumorgewebe nachgewiesen, als es beim Normalgewebe der Fall war ($p < 0,001$).

Abb. 14 zeigt vergleichend die JARID1C- Expression im Zytoplasma der Gewebeproben von $n = 59$ gematchten Patienten, von denen jeweils Normal- als aus

Primärtumorgewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms immunhistochemisch angefärbt wurde. Bei 57,6% der Proben zeigte das Normalgewebe der Niere keine oder nur eine schwache Expression, während das Primärtumorgewebe eine starke JARID1C- Expression des Zytoplasmas aufwies ($p < 0,001$). Bei 39% der untersuchten Gewebeproben fiel die Intensität der Anfärbung sowohl in Primärtumor- als auch im Normalgewebe gleich stark bzw. schwach aus; lediglich in 3,4% wies das Normalgewebe eine stärkere Expression als das Primärtumorgewebe auf (vgl. Abb. 14).

Ein höheres Grading des Primärtumorgewebes ging häufiger mit einer stärkeren JARID1C-Expression im Zellkern einher. Diese Beobachtung fand sich sowohl bei der Auswertung der Gesamtkohorte mit allen Tumorsubtypen ($p < 0,001$) als auch in isolierter Auswertung von klarzelligem ($p = 0,004$) und papillärem Nierenzellkarzinom ($p = 0,046$) (siehe Tab. 11). Wir untersuchten die Zusammensetzung der Primärtumorproben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms in den vorbeschriebenen Score- Gruppen (Score 0 bis Score 2) hinsichtlich der Intensität der Zellkernfärbung und ihres Gradings (G1- G3). Einbezogen wurden $n = 219$ Gewebeproben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms, welche mittels immunhistochemischer Anfärbung auf die Expression von JARID1C im Zellkern untersucht wurden (Abb. 13 C). Bei dem Vergleich der einzelnen Score- Gruppen der Grafik wird deutlich, dass in der mit Score= 0 gewerteten Gruppe der Anteil von Primärtumoren mit G1- Status mit 60% am höchsten ausfällt und über die mit Score= 1 gewerteten Gruppe bis zu der mit Score= 2 gewerteten Gruppe stark abfällt; in der Score= 2 gewerteten Gruppe fand sich ein G1- Status nur noch bei ca. einem Viertel der Primärtumorproben (vgl. Abb. 13 C). Anders verhielt es sich hinsichtlich der G2- Status Verteilung: In der Score= 1 Gruppe wiesen 63,8%, in der Score= 2 Gruppe gut die Hälfte der Proben einen G2- Status auf. Interessanterweise war die Score= 3 Gruppe die einzige, in der sich Tumorgewebeproben mit einem G3- Status fanden (21%). In den untersuchten Primärtumorproben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms korrelierte eine stärkere Zellkernfärbung signifikant mit einem höheren Grading ($p = 0,004$, siehe Tab. 11).

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung von JARID1C im Zytoplasma ergaben sich Parallelen zur Analyse der Kernfärbung. Analysiert wurde die zytoplasmatische JARID1C- Expression von $n = 239$ Gewebeproben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms in Zusammenschau mit dem G- Status (Abb. 14 C), die Auswertung erfolgte analog zur Zellkernfärbung. Auch hier zeigte sich der höchste

Anteil von G1- Tumoren mit 80% in der Gruppe der Gewebeproben, die mit Score= 0 bewertet worden waren. In den anderen beiden Gruppen zeigte sich dagegen nur ein geringer Unterschied bezüglich der enthaltenen G1- Tumoren. Hinsichtlich des G2- Status fanden sich die meisten Tumorproben in der Score=1 Gruppe. Die einzige Gruppe, in der sich Tumorgewebeproben mit einem G3- Status fanden, war auch hier die Score= 2 Gruppe mit 22,2% G3- Anteil unter den analysierten Proben. In unseren Untersuchungen war ein höheres Grading beim klarzelligen Nierenzellkarzinom signifikant häufiger mit einer starken JARID1C- Expression des Zytoplasmas vergesellschaftet ($p < 0,001$). Das gleiche Ergebnis wie bei diesem Tumorsubtyp zeigte sich in der Gesamtkohorte ($p < 0,001$). Wenngleich sich beim papillären Nierenzellkarzinom nicht so eine starke Korrelation ergab, wie beim Fokus auf das Grading in der Gesamtkohorte, wurde das Signifikanzniveau dennoch erreicht ($p = 0,011$).

Eine Untersuchung der JARID1C- Expressionskategorien im Bezug zum pT- Status der verwendeten Primärtumorproben erbrachte nur im Hinblick auf die Kern-, nicht jedoch im Hinblick auf die Zytoplasmafärbung signifikante Ergebnisse (vgl. Tab. 11). Wir analysierten hierfür die immunhistochemischen Zellkernfärbungen von $n = 217$ Primärtumorproben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms hinsichtlich der Zusammensetzung nach pT- Status (Abb. 13 D).

Es wurde das bereits zuvor etablierte Scoring- System zur Kategorisierung der Anfärbung verwendet (Score 0 bis Score 2). Außerdem wurden drei pT- Status- Gruppen gebildet und die Primärtumorproben entsprechend ihres Stagings eingruppiert (Gruppe pT1- 1b, Gruppe pT2- 2b, Gruppe pT ≥ 3). In der mit Score= 1 bewerteten Gruppe offenbarte sich der höchste Anteil von Tumorproben mit pT1- 1b Status, gefolgt von der mit Score= 2 bewerteten Gruppe. Die Tumorproben der Score= 0 Gruppe wiesen mit 50% den geringsten Anteil von Tumorproben mit pT1- 1b Status aller Score- Gruppen auf, dafür jedoch den höchsten Anteil von Tumorproben mit pT2-2b Status (25%). Die meisten Tumorproben mit pT ≥ 3 Status waren in der Score= 2 Gruppe zu verzeichnen (35%). Das Signifikanzniveau konnte bei der Untersuchung von klarzelligem Nierenzellkarzinom ($p = 0,006$) und der Gesamtkohorte ($p = 0,004$) erreicht werden, nicht jedoch beim Subtyp des papillären Nierenzellkarzinoms.

Es folgte die Analyse der zytoplasmatischen Anfärbung von JARID1C hinsichtlich des pT- Status; anders als bei der Zellkernfärbung von JARID1C ergab sich weder für die Gesamtkohorte, noch für einen der isoliert untersuchten Tumorsubtypen (klarzelliges oder papilläres Nierenzellkarzinom) ein signifikantes Ergebnis (vgl. Tab. 11). Für die Untersuchung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms wurden n= 235 Primärtumorproben in Zusammenschau mit der Verteilung des pT- Status innerhalb der einzelnen Scoring- Gruppen ausgewertet (Abb. 14 D). In Betrachtung des pT1-1b Status fand sich eine klare Abstufung des Häufigkeitsgefälles von Scoring- Gruppe 0 (83,3%) über Scoring- Gruppe 1 (70%) bis hin zu Scoring- Gruppe 2 (59,1%). Interessanterweise kamen Primärtumorproben, die einen pT2- 2b Status aufwiesen, nur in den Scoring- Gruppen 1 und 2 vor, nicht jedoch in Scoring- Gruppe 0. Die größte Häufigkeit von Primärtumorproben, die einen pT ≥ 3 Status aufwiesen, fand sich mit 31,1% in Scoring- Gruppe 2 und lag dagegen in den anderen beiden Gruppen auf dem gleichen Häufigkeitsniveau bei je 16,7%. Das Signifikanzniveau konnte nicht erreicht werden.

5 Diskussion

5.1 LSD1 zeigt sowohl im Normalgewebe der Niere als auch im Nierenzellkarzinom eine starke Expression

Im Jahr 2004 wurde die erste Lysin-spezifische-Demethylase 1 (LSD1) von Shi et al. beschrieben. LSD1, auch KDM1A genannt, benötigt das Coenzym Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), um eine Mono- oder Di-Demethylierung an H3K4me1/2 oder H3K9me1/2 zu katalysieren (Shi et al. 2004). LSD1 hat Einfluss auf wichtige physiologische Zellfunktionen, die in der Vergangenheit beschrieben wurden, so ist es essenziell für Zellwachstum und -differenzierung der embryonalen Entwicklung von Säugetieren. Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass LSD1 als Teil des LSD1 / CoREST / HDAC-Komplexes Einfluss auf die Expression und das korrekte Zusammenspiel der wichtigsten Entwicklungsregulatoren während der frühen Embryonalentwicklung nimmt (Foster et al. 2010).

Ein Einfluss von LSD1 auf die Pathogenese verschiedener Tumorerkrankungen konnte in der Vergangenheit bereits in Studien von uns und anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Hayami et al. 2011). Eine Überexpression von LSD1 wurde in hormonrezeptor-negativen Mammakarzinomen nachgewiesen (Lim et al. 2010). Weitere eigene Studien belegen eine Überexpression von LSD1 in Neuroblastomen (Schulte et al. 2009), mesenchymalen Tumoren wie Synovialsarkomen und Rhabdomyosarkomen (Schildhaus et al. 2011) sowie in hämatopoetischen und lymphatischen Neoplasien (Niegel et al. 2014). Auch in unseren Vorarbeiten zu dieser Promotion zeigte sich im Rahmen einer *in silico* Analyse von TCGA-Daten, dass viele Tumorentitäten eine Unter- oder Überexpression verschiedener Histondemethylasen aufweisen.

In unseren Versuchen zu dieser Arbeit verglichen wir die LSD1- Expression anhand von immunhistochemischer Anfärbung im Zellkern von gepaarten Normalgewebeprobe n der Niere und Nierenzellkarzinomproben. Die überwiegende Mehrzahl der Gewebeprobe n (54,8%) zeigte dabei sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe eine starke LSD1- Expression, in 36,9% fand sich im Normalgewebe eine starke Expression, während sie im Tumorgewebe dagegen schwach oder gar nicht beobachtet wurde. Lediglich 7,1% der gepaarten Proben wiesen eine starke LSD1- Expression im Tumor und eine schwache bis fehlende Expression im Normalgewebe auf; 1,1% zeigten keine oder schwache LSD1- Expression sowohl in Primärtumor-

als auch Normalgewebe. Auch im Vergleich der LSD1- Expression im Zellkern von Normalgewebe der Niere und Primärtumorgewebe des klarzelligem Nierenzellkarzinoms zeigte sich ein ähnliches Ergebnis: In einem Großteil der Gewebeprobeen imponierte eine starke LSD1- Expression sowohl im Normalgewebe der Niere als auch im Primärtumorgewebe, war jedoch im Normalgewebe häufiger der Fall (95,4%, $p=0,006$, vgl. Abb. 6 B).

Andere Forschungsarbeiten erbrachten bereits Rückschlüsse darauf, dass LSD1 zu den initiiierenden Faktoren zählt, die bereits in einem sehr frühen Stadium der Krebsentstehung eine Rolle spielen (Hayami et al. 2011). Unsere Beobachtungen könnten ein weiterer Hinweis hierfür sein. Die verwendeten Normalgewebeprobeen unserer Kohorte stammen alle von Nierenzellkarzinompatienten. Es ist daher nicht auszuschließen, dass LSD1 und andere in die epigenetischen Vorgänge der Zelle eingreifenden Enzyme auch im Normalgewebe bereits in einem frühen Stadium hoch- oder herunterreguliert vorliegen, bevor es zur histologisch sichtbaren, malignen Transformation des Gewebes kommt. Um diese Hypothese weiter zu überprüfen, sind in der Zukunft weitere Studien notwendig. Dabei könnte vergleichend das Nierennormalgewebe sowohl von Nierenzellkarzinompatienten als auch von Personen, die nicht am Nierenzellkarzinom erkrankt sind, auf Veränderungen der LSD1- Expression untersucht werden.

Ferner beschäftigte uns die Frage, ob ein erhöhter Entdifferenzierungs- bzw. Malignitätsgrad der Tumorzelle mit einer verstärkten LSD1- Expression im Nierenzellkarzinom vergesellschaftet ist. So wurde bereits 2012 gezeigt, dass die LSD1- Expression im Mammakarzinom zusammen mit der Progression des Tumors vom duktalem Carcinoma in situ (DCIS) zum invasiven duktalem Mammakarzinom zunimmt (Serce et al. 2012). Wir untersuchten die Konstellation des G- Status innerhalb der immunhistochemischen Anfärbungen von Primärtumorprobeen des klarzelligem Nierenzellkarzinoms. Dabei kristallisierte sich jedoch keine klare Zuordnung von einem bestimmten G- Status zu einer bestimmten Scoring- Gruppe heraus. Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang. Ähnliche Beobachtungen wurden jedoch bereits bei der Untersuchung der LSD1- Expression in Gewebeprobeen von humanen Blasen- tumoren beschrieben (Hayami et al. 2011): Auch hier wiesen G1- Tumore bereits signifikant hohe LSD1- Expressionslevel auf. Zudem stellten Hayami et al. in ihren Untersuchungen fest, dass keine signifikante Korrelation zwischen LSD1- Expression und klinisch- pathologischen Daten bestand. Diese Beobachtung fand sich

auch in unseren Auswertungen wieder.

Im Rahmen unserer Untersuchungen prüften wir außerdem, ob ein höherer pT- Status mit einer verstärkten LSD1- Expression im Tumorgewebe einhergeht. Hierzu verglichen wir die Unterschiede der LSD1- Expressionskategorien (Score 0 bis 2) der Zellkernfärbung im Verhältnis zum pT- Status im klarzelligen Nierenzellkarzinom. Den Hauptanteil in allen drei Score- Gruppen machten dabei Tumorproben mit pT1-1b Status aus, wohingegen sich die meisten Tumore mit pT \geq 3 Status (33,3%) in Score- Gruppe 1 finden ließen (nicht signifikant).

Diese Beobachtung könnte ebenfalls darin begründet liegen, dass LSD1 bereits in einem sehr frühen Stadium der Karzinogenese eine Rolle spielt. Dies würde erklären, weshalb die Expression der untersuchten Histondemethylase sich eher unge richtet in allen Stadien von Primärtumoren zunehmender Größe und Eindringtiefe nachweisen lässt. Auch könnten die Beobachtungen unserer Studie in der unterschiedlich starken LSD1- Expression im Gewebe verschiedener Tumorentitäten begründet sein; so konnte bereits am Hypopharynxkarzinom gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von LSD1 mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und verkürztem progressionsfreiem Überleben korreliert (Bottner et al. 2022).

Zudem mag unsere Beobachtung der Tatsache geschuldet sein, dass ein Großteil der Patienten unserer Lübecker Kohorte einen Tumor in einem niedrigen T- Stadium aufwies: Von den 351 Tumorgewebeproben hatten 60,1% einen pT1- 1b Status, lediglich 24,2% wiesen einen pT \geq 3 Status auf. Hier könnte in Zukunft eine genauere Untersuchung mittels einer größeren Kohorte, in der mehr Fälle mit pT \geq 3 Status vorhanden sind, erfolgen und wegweisend für weitere Studien sein.

In unserer Studie wurde eine starke Expression der Histondemethylase sowohl im Normalgewebe der Niere, als auch im Primärtumorgewebe der untersuchten Proben nachgewiesen. Als target scheint LSD1 daher unbrauchbar, da im Rahmen einer gegen LSD1 gerichteten Therapie nicht nur selektiv Tumorgewebe, sondern auch Normalgewebe negativ beeinflusst werden würde. Denkbar ist jedoch eine Rolle von LSD1 als prognostischer Marker in anderen Tumorentitäten, wie bereits von Bottner et al. 2022 am Hypopharynxkarzinom demonstriert wurde.

5.2 KDM2B wird im Zellkern von klarzelligen Nierenzellkarzinomen signifikant überexprimiert und korreliert mit dem pT- Status

KDM2B gehört wie JARID1C in die Familie der Histondemethylasen (KDM2-KDM7), deren Kennzeichen die sog. Jumonji- Domäne am N- terminalen Ende des Enzyms ist (Tsukada et al. 2006). Allen Mitgliedern dieser Enzymfamilie ist zudem gemeinsam, dass sie als Cofaktoren Fe^{2+} und alpha-Ketoglutarat für ihre Demethylierungsfunktion benötigen. KDM2B wird eine wichtige Funktion im Rahmen von zellulären Prozessen, wie Zellproliferation, Zellzyklus und Seneszenz zugeschrieben. Eine Überexpression von KDM2B in Mausfibroblasten führt zu Veränderungen in Zellmorphologie, Zellmetabolismus und Chemokinexpression (Janzer et al. 2012). Ebenfalls wurde eine Beteiligung an der Regulation von Apoptose-Signalwegen nachgewiesen (Kurt et al. 2017).

KDM2B wird zudem mit Tumorentstehung und –wachstum in Verbindung gebracht. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown von KDM2B sowohl in Mausfibroblasten (He et al. 2008) als auch in Glioblastomzellen (Wang et al. 2018) zur Zellwachstumshemmung führt. Es wurde in mehreren Arbeiten gezeigt, dass KDM2B in verschiedenen bösartigen Neubildungen wie dem duktalem Adenokarzinom des Pankreas (Tzatzos et al. 2013), Ovarialtumoren (Kuang et al. 2017) oder im Glioblastom (Staberg et al. 2018) überexprimiert vorkommt. Die Rolle von KDM2B im Nierenzellkarzinom ist bisher jedoch noch größtenteils unerforscht und sollte daher durch unsere Studie genauer untersucht werden.

Wir verglichen dazu zunächst die immunhistochemische KDM2B- Expression in Zellkern und Zytoplasma zwischen korrespondierenden Gewebeproben von Normalgewebe der Niere und Primärtumorgewebeproben. Hierbei ergaben sich sowohl für die Auswertung der zytoplasmatischen KDM2B-Expression ($p < 0,001$) als auch der KDM2B- Expression im Zellkern ($p < 0,001$) in Korrelation zum untersuchten Normalgewebe signifikante Ergebnisse (vgl. Tab. 9).

In der isolierten Betrachtung von Gewebeproben des Klarzelligen Nierenzellkarzinoms fand sich sowohl im Zellkern ($p < 0,001$) als auch im Zytoplasma ($p = 0,002$) signifikant häufiger eine starke KDM2B- Expression, als es im Normalgewebe der Niere der Fall war. Diese Beobachtung entspricht dem Ergebnis einer von uns im Vorfeld zu dieser Studie durchgeführten *in silico* Analyse von TCGA Daten, welche ergab, dass die stärkste Überexpression der Histondemethylasen KDM2A, KDM2B,

und KDM5C (JARID1C) im klarzelligen Nierenzellkarzinom zu finden ist (Abb. 3). Wie KDM2B und die anderen Mitglieder der Enzymfamilie die Tumorgenese genau beeinflussen, ist jedoch bisher weitestgehend unklar. In einem *gain of function* Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression von KDM2B die Fähigkeit zur Migration in Mausfibroblasten erhöht und dass migrationsassoziierte Gene direkt durch KDM2B reguliert werden (Rohde et al. 2016). Diese Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass eine Überexpression von KDM2B gestörtes Proliferations- und Migrationsverhalten von Zellen, wie man es in Tumorgewebe findet, fördert.

KDM2B spielt eine essenzielle Rolle bei Vorgängen wie Zellproliferation, Zellzyklus und Seneszenz. Auch das Homolog KDM2A ist in wichtige zelluläre Prozesse involviert. So konnten Kawakami et al. 2015 zeigen, dass der Knockout von KDM2A in Mäusen mit schweren embryonalen Entwicklungsstörungen und intrauteriner Letalität der Embryonen einhergeht. Diese Ergebnisse lassen auf einen regulatorischen Einfluss von KDM2B auf Zellproliferation und Zellzyklus schließen und passen zu den Beobachtungen aus eigenen und anderen Arbeiten. Janzer et al. berichteten 2012, dass eine Überexpression von KDM2B in Mausfibroblasten Veränderungen in Zellmorphologie, Zellmetabolismus und Chemokinexpression nach sich zieht. Kurt et al. dokumentierten 2017 eine Steuerung von Apoptose-Signalwegen durch KDM2B.

Diese Beobachtungen legen nahe, dass Histondemethylasen wie KDM2B einen bedeutenden Einfluss auf zelluläre Vorgänge im Rahmen von Tumorgenese und -progression ausüben, wenn es zu einer Fehlregulation dieser Enzyme kommt. Eine Überexpression von KDM2B wurde bereits im duktalem Adenokarzinom des Pankreas beschrieben, wobei ein höheres Grading oder Staging mit erhöhter KDM2B Expression einherging (Tzatsos et al. 2013). In unserer Untersuchung war ein höherer G-Status tendenziell eher mit einer stärkeren KDM2B- Expression im Zellkern bzw. Zytoplasma verbunden. Auch untersuchten wir die Zusammensetzung des pT-Status von Proben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms in Zusammenschau mit der immunhistochemischen Anfärbbarkeit von KDM2B. Bezüglich der Anfärbbarkeit des Zellkerns dieser Proben zeigte sich eine Korrelation zwischen Höhe des pT- Status und Intensität der Anfärbung ($p= 0,012$). Dies war jedoch nur für die KDM2B- Expression im Zellkern, nicht dagegen im Zytoplasma der Fall. Ob diese Beobachtungen der individuellen Zusammensetzung unserer Lübecker Kohorte geschuldet

sind, könnte in weiteren Studien an einer größeren Kohorte Nierenzellkarzinomproben oder gar an verschiedenen Tumorentitäten genauer untersucht werden. Wir konnten anhand dieser Studie zeigen, dass KDM2B im Zellkern des klarzelliges Nierenzellkarzinoms signifikant überexprimiert wird und dabei mit dem pT-Status der untersuchten Proben korreliert. Hieraus lässt sich ein potentieller klinischer Nutzen von KDM2B ableiten, beispielsweise wäre eine Funktion als Target in der Tumorthherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms in Zukunft denkbar. Ob und inwieweit sich die Histondemethylase KDM2B hierfür eignet, könnte in weiteren Studien, z.B. am Mausmodell, genauer untersucht werden.

5.3 Die Expression von JARID1C im Nierenzellkarzinom korreliert mit G-Status und pT- Status

Die Histondemethylase JARID1C gehört zu der Klasse der Histondemethylasen, deren Enzyme fähig sind, auch trimethylierte Lysinreste an Histonen zu demethylieren (Tsukada et al. 2006). Die sog. Jumonji- Domäne am N- Terminalen Ende spielt dabei eine wichtige Rolle.

Vieles über Funktion und Aufgabe von JARID1C ist bisher noch weitestgehend unklar. Es wurde berichtet, dass JARID1C über eine Regulierung epigenetischer Prozesse eine wichtige Rolle in der zerebralen Entwicklung und Funktion von Neuronen spielt und Mutationen des Gens mit mentaler Retardierung assoziiert sind (Kramer und van Bokhoven, 2009).

Im Rahmen des *The cancer genome atlas* (TCGA) Projekts wurden fast 300 Gene identifiziert, die eine Progression von Tumoren fördern (Chang et al. 2019). Zwölf dieser beschriebenen Gene sind an histonmodifizierenden Prozessen wie Histonmethylierung und -demethylierung beteiligt. Auch das Gen, welches für die Histondemethylase JARID1C codiert, wurde als Tumortreiber beschrieben (Chang et al. 2019). Bereits in früheren Studien wurde berichtet, dass inaktivierende Mutationen von JARID1C sich häufig im Nierenzellkarzinom finden (Rondinelli et al. 2015). Dalgliesh et al. veröffentlichten 2010 eine Arbeit über die Identifizierung von inaktivierenden Mutationen in zwei Genen, welche Enzyme codieren, die an der Histonmodifikation beteiligt sind: SETD2, eine Histon-H3-Lysin-36-Methyltransferase und JARID1C (KDM5C), eine Histon -H3- Lysin- 4- Demethylase.

Unsere Studie sollte mit Hilfe immunhistochemischer Analysen prüfen, ob JARID1C vermehrt im Tumorgewebe exprimiert wird. Beim Vergleich der Expression von JARID1C im Zellkern von korrespondierenden Normal- und Primärtumorgewebe-proben zeigte sich, dass bei 67% der Probenpaare das Primärtumorgewebe eine starke Expression, das Normalgewebe der Niere jedoch keine oder nur eine schwache Expression von JARID1C im Zellkern zeigte (Abb. 13). Eine Untersuchung mit dem Fokus auf die JARID1C- Expression im Zytoplasma erbrachte ein ähnliches Ergebnis: Hierbei wiesen 57,6% der gepaarten Proben im Primärtumorgewebe eine starke JARID1C- Expression des Zytoplasmas auf, während sich im zugehörigen Normalgewebe keine nennenswerte Expression nachweisen ließ (Abb. 14). Wir führten zudem eine isolierte Auswertung der JARID1C-Expression im Zellkern von Normalgewebe der Niere und Primärtumorgewebe des klarzelligem Nierenzellkarzinoms durch. In den Gewebeproben des klarzelligem Nierenzellkarzinoms imponierte dabei signifikant häufiger eine starke JARID1C- Expression als im Normalgewebe der Niere, und zwar sowohl im Zellkern ($p < 0,001$) als auch im Zytoplasma ($p < 0,001$; siehe Abb. 13 B und 14 B bzw. Tab. 11).

Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen vorheriger Studien, die eine Überexpression von JARID1C im Tumorgewebe nachwiesen. So wurde jüngst darüber berichtet, dass eine JARID1C- Überexpression in humanen Kolonkarzinomzellen zu einer Regulationsstörung des Protoonkogens *c-Jun* führt, was wiederum eine gesteigerte Proliferation der Kolonkarzinomzellen zur Folge hat (Lin et al. 2020). Bereits 2014 konnte gezeigt werden, dass JARID1C im Prostatakarzinom überexprimiert ist und zudem als negativer prognostischer Marker nach radikaler Prostatektomie dienen kann (Stein et al. 2014). Auch im Nierenzellkarzinom wäre ein Gebrauch von JARID1C als prognostischer oder diagnostischer Marker, ggf. sogar der therapeutische Nutzen als target, denkbar. Da JARID1C in Studien vermehrt im Zusammenhang mit Onkogenese, Tumoraggressivität oder – progress beobachtet wurde, scheint auch die Entwicklung von JARID1C- Inhibitoren Potential zu haben. Weitere Studien in der Zukunft, beispielsweise in der Zellkultur oder am Mausmodell, könnten helfen, um diesen möglichen Nutzen weiter zu untersuchen.

Des Weiteren untersuchten wir die Zusammensetzung der immunhistochemischen Anfärbungen von Primärtumorproben des klarzelligem Nierenzellkarzinoms hinsichtlich ihres Gradings. Dabei zeigte sich, dass ein höherer G- Status des Tumors mit

einem höheren Scoring der Anfärbung, also einer stärkeren JARID1C-Expression im Zellkern, einhergeht ($p=0,004$). Auch das untersuchte Zytoplasma der Gewebeproben wies eine signifikante Korrelation zwischen G- Status des Tumorgewebes und Intensität der JARID1C- Expression auf ($p < 0,001$). Aktuell (Stand Oktober 2024) existiert keine vergleichbare Studie, die eine ähnlich große Kohorte humaner Nierenzellkarzinomproben beinhaltet. Entsprechend existieren noch keine Publikationen, die über eine mögliche Korrelation zwischen JARID1C-Expression und Grading im klarzelligem Nierenzellkarzinom berichten. Demnach wäre es interessant, die Studie in Zukunft an einer noch größeren Kohorte humaner Nierenzellkarzinomproben zu wiederholen; im Idealfall an einer Progressionskohorte mit ausreichenden klinischen Daten. So könnte der Einfluss von JARID1C auf die Entdifferenzierung der Tumorzellen genauer mit den Ergebnissen dieser Studie verglichen und ein möglicher therapeutischer oder diagnostischer Nutzen weiter untersucht werden.

Im Rahmen unserer Studie stellte sich zudem die Frage, ob ein fortgeschrittenes Tumorstadium mit einer stärkeren JARID1C- Expression in Zellkern oder Zytoplasma korreliert. Um dies genauer zu prüfen, untersuchten wir die Intensität der immunhistochemischen Anfärbung im Bezug zum pT- Status im klarzelligem Nierenzellkarzinom. Hierbei fiel der Anteil der Tumorproben mit einem pT ≥ 3 Status in der Gruppe der Gewebeproben mit der stärksten JARID1C-Expression am höchsten aus, das Signifikanzniveau konnte erreicht werden ($p=0,006$). Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits in der Arbeit von Stein et al. beschrieben (2014): Auch hier zeigte sich eine starke JARID1C- Expression häufiger in den Prostatakarzinomgewebeproben mit pT ≥ 3 Status als in solchen mit geringerem pT- Status ($\leq pT2$). Die Auswertung der zytoplasmatischen JARID1C- Expression erbrachte ein ähnliches Ergebnis: Obwohl ein niedrigerer pT- Status in unseren Untersuchungen meist mit schwacher oder gar fehlender JARID1C- Expression im Zytoplasma einherging und Proben mit starker JARID1C- Expression häufiger einen höheren pT- Status aufwiesen, ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen starker JARID1C- Expression und höherem pT- Status in unserer Studie.

Zusammengefasst können wir in dieser Arbeit zeigen, dass das Primärtumorgewebe des klarzelligem Nierenzellkarzinoms sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma eine stärkere JARID1C- Expression aufweist, als dies im Normalgewebe

der Niere der Fall ist. Dies deckt sich mit ähnlichen Beobachtungen anderer Forschungsgruppen. So wurde bereits über eine Überexpression von JARID1C in anderen Tumorentitäten wie Kolon- oder Mammakarzinom berichtet (Lin et al. 2020, Wang et al. 2015). Eine vergleichbare Studie an einer so großen Kohorte humaner Nierenzellkarzinomproben wie in dieser Arbeit wurde bisher nicht publiziert.

Wir beobachteten zudem, dass eine starke JARID1C- Expression in der immunhistochemischen Anfärbung häufiger mit einem höheren pT- Status einherging. Diese Beobachtung wurde auch bereits in einer Arbeit über das Vorkommen von JARID1C im Prostatakarzinom beschrieben (Stein et al. 2014). Dort wurde JARID1C als negativer prädiktiver Marker nach erfolgter Prostatektomie vorgestellt. Ein ähnlicher Nutzen von JARID1C in Bezug auf das Nierenzellkarzinom wäre vorstellbar. Jedoch sind weitere Studien notwendig, um die Rolle von JARID1C im Nierenzellkarzinom noch genauer zu untersuchen.

Dadurch, dass diese Studie keine *in vitro* Untersuchungen, beispielsweise Anhand von Zellkulturen, enthält, weist sie Limitierungen auf, welche in einer entsprechend gestalteten Wiederholungsstudie aufgearbeitet werden könnten. Chang et al. beschrieben das für JARDI1C codierende Gen als Tumortreibergen (Chang et al. 2019). So wäre beispielsweise auch eine Untersuchung der Rolle von JARID1C im Nierenzellkarzinom hinsichtlich des Progresses von Tumorwachstum interessant, beispielweise am Xenograft- Mausmodell. Auch eine erneute IHC- basierte Studie zur Verifizierung der in unserer aktuellen Studie erhobenen Beobachtungen wäre denkbar. Diese sollte optimalerweise auch ausreichend klinische Daten beinhalten, um beispielsweise Überlebenskurven erstellen und Rückschlüsse auf mögliche Korrelationen zwischen klinischen und pathologischen Daten ziehen zu können.

5.4 Limitationen dieser Arbeit

Trotz sorgfältiger Planung und Umsetzung der einzelnen Arbeitsschritte dieser Studie sind verschiedene Limitationen dieser Arbeit zu diskutieren.

Im Rahmen dieser Studie wurde zunächst eine Datenbank angelegt, in welche klinisch-pathologische Daten eingepflegt wurden. Das zu diesem Zeitpunkt im Krankenhausinformationssystem erhältliche Datenmaterial und auch die Abfrage der Sterbedaten über das Krebsregister reichte jedoch nicht aus, um eine Überlebensanalyse mithilfe von Kaplan-Meyer-Kurven zu erstellen, wie initial geplant.

Somit kann diese Studie keine Aussage zur klinischen Prognose treffen. Hierzu wäre eine Wiederholung der Studie denkbar, unter Verwendung einer Kohorte, für die ausreichendes Datenmaterial zum Erstellen von Überlebensanalysen vorhanden ist. Hierbei könnten aktuell noch offene Fragestellungen, beispielsweise, ob eine ausgeprägte Expression einer der untersuchten Histondemethylasen in einem frühen TNM- Stadium signifikant häufiger mit einem verkürzten Überleben der Nierenzellkarzinompatienten einhergeht, genauer untersucht werden.

Das für die IHC- Untersuchungen dieser Arbeit verwendete Nierennormalgewebe stammt ebenfalls von Nierenzellkarzinompatienten. Es ist nicht auszuschließen, dass Prozesse, die in die Karzinogenese involviert sind, nicht bereits im Nierennormalgewebe dieser Patienten vorhanden sind, auch wenn diese mikroskopisch anhand der Morphologie der Zellen als solche zu diesem Zeitpunkt noch nicht nachweisbar sind. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in humanen Bläsentumorgewebeproben beschrieben (Hayami et al. 2011); hier wiesen G1-Tumore bereits signifikant hohe LDS1-Expressionslevel auf.

Dies könnte eine veränderte Expression der untersuchten Histondemethylasen im Nierennormalgewebe bereits zu diesem Zeitpunkt und somit eine Fehlinterpretation im Rahmen der Ergebnisauswertung zur Folge haben. Hierbei mag eine mögliche Fehlerquelle dieser Studie begründet liegen. Eine Wiederholung der in dieser Studie durchgeführten IHC- Anfärbungen anhand einer neuen Kohorte, bestehend sowohl aus Tumorgewebe von Nierenzellkarzinompatienten und Nierennormalgewebe von Patienten, die nicht am Nierenzellkarzinom erkrankt sind, könnte hierbei aufschlussreich sein und zur Ergebniskontrolle dienen.

5.5 Ausblick über die Funktion chromatinmodifizierender Enzyme im Nierenzellkarzinom

Bereits unsere *in silico* Analyse von TCGA Daten ergab, dass sich in vielen Tumorentitäten eine verminderte oder vermehrte Expression verschiedener Histondemethylasen findet (Abb. 3). Dabei imponierte die stärkste Überexpression der Histondemethylasen KDM2A, KDM2B und KDM5C im klarzelligen Nierenzellkarzinom.

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass das Primärtumorgewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma eine stärkere JARID1C- Expression aufweist, als dies im Normalgewebe der Niere der Fall ist ($p <$

0,001). Gewebeproben, die eine starke JARID1C- Expression zeigten, wiesen auch häufig einen höheren pT- Status auf. Auch ging ein höherer G- Status des Tumors mit einer stärkeren JARID1C-Expression im Zellkern einher ($p= 0,004$). Diese Forschungsergebnisse legen nahe, dass JARID1C in Zukunft als prädiktiver Marker für das Nierenzellkarzinom klinische Verwendung finden könnte. Die Beobachtung, dass JARID1C in Primärtumorzellen eine Überexpression aufweist, dagegen jedoch im Normalgewebe der Niere sehr viel schwächer exprimiert wird, lässt auch einen Einsatz von JARID1C als target für neue medikamentöse Tumorthérapien denkbar erscheinen. Dennoch werden in Zukunft weitere Studien notwendig sein, um einen möglichen Einsatz von JARID1C in Bezug auf prädiktiven oder diagnostischen Nutzen für Nierenzellkarzinompatienten zu erforschen. Von Vorteil wäre hierbei eine größere Kohorte, idealerweise mit einem höheren Anteil von Primärtumorproben mit pT ≥ 3 Status. Auch die Verwendung von funktionellen Zellkultur- Assays könnte helfen, Rückschlüsse auf die tumorbiologische Rolle von JARID1C zu erzielen.

Bezüglich KDM2B fand sich in den Gewebeproben des klarzelliges Nierenzellkarzinoms der Lübecker Kohorte eine ähnliche Beobachtung. So war im Zellkern ($p < 0,001$) als auch im Zytoplasma ($p=0,002$) signifikant häufiger eine starke KDM2B-Expression nachweisbar, als es im Normalgewebe der Niere der Fall war. Wir beobachteten eine Korrelation zwischen Höhe des pT- Status und Intensität der Zellkernanfärbung, welche das Signifikanzniveau erreichte ($p= 0,012$). Somit könnte auch KDM2B, ähnlich wie JARID1C, in Zukunft als potenzieller Tumormarker oder target für systemische Therapien in Betracht kommen. Es konnte bereits in anderen Studien belegt werden, dass ein KDM2B- Knockdown die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen vermindert (Sanches et al. 2021; Wang et al. 2018).

Andere Studien konnten bereits zeigen, dass eine Überexpression von KDM2B in Mausfibroblasten Veränderungen in Zellmorphologie, Zellmetabolismus und Chemokinexpression zur Folge hat (Janzer et al. 2012). Auch wurde bereits über eine Steuerung von Apoptose-Signalwegen durch KDM2B berichtet (Kurt et al. 2017). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass eine Überexpression von KDM2B der initialen Umwandlung von normalen Nierenzellen in entartete Tumorzellen zugrunde liegt. Mit Hilfe weiterer Studien, beispielsweise am Xenograft- Mausmodell, könnte in Zukunft genauer evaluiert werden, inwieweit KDM2B sich als target für die systemische Therapie von Nierenzellkarzinompatienten eignet. Der Einsatz selektiver Inhibitoren wäre hierbei ein vielversprechender Forschungsansatz. Könnte man

KDM2B in dieser Hinsicht erfolgreich etablieren, wäre dies ein großer Fortschritt bezüglich der Therapiemöglichkeiten des Nierenzellkarzinoms, welches nicht auf Chemotherapie oder Radiatio anspricht. Auch eine Verwendung von KDM2B als diagnostischer Parameter wäre denkbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wiederholung dieser Studie an einer größeren Kohorte zur Verifizierung der erhobenen Ergebnisse wünschenswert wäre. Im Idealfall sollten die verwendeten Gewebeproben dann aus Tumorgewebe von Nierenzellkarzinompatienten und Nierennormalgewebe von Patienten, die nicht am Nierenzellkarzinom erkrankt sind, bestehen, um etwaige Fehlinterpretationen von Expressionsergebnissen zu vermeiden. Auch eine höhere Anzahl von Primärtumorproben mit pT ≥ 3 Status und das Erstellen von Überlebenskurven wäre ideal. Die Durchführung weiterer Experimente, so zum Beispiel funktioneller Zellkultur-Assays, könnte helfen, neue Aspekte über die tumorbiologische Rolle der untersuchten Histondemethylasen zu identifizieren und prognostische Aussagen treffen zu können. Eine Auswertung der TMA- Anfärbungen unter Verwendung einer Bildanalysesoftware, wie z.B. Definiens oder QuPath anstatt Eye- Balling ist jedoch auch in einer Wiederholungsstudie nicht empfehlenswert: Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsmuster der Histondemethylasen in den Zellkompartimenten Zellkern und Zytoplasma sind die genannten Softwares hierbei zurzeit noch nicht zufriedenstellend einsetzbar, da die Software diese im Gegensatz zum menschlichen Untersucher am Mikroskop nicht sicher differenzieren kann.

6 Zusammenfassung

Nierenzellkarzinome stellen mit einer Inzidenz von 431.288 Fällen weltweit pro Jahr die dritthäufigsten urologischen Karzinome dar (Sung et al. 2021, Moch et al. 2016). Sie sind für ca. 2% aller karzinombedingten Todesfälle weltweit verantwortlich (Sung et al. 2021). Die Studie soll die Funktion von Histondemethylasen – insbesondere JARID1C, KDM2B und LSD1- in NCC untersuchen, insbesondere ihre Rolle in der Tumorgenese. Aktuell existiert keine andere Studie, in der eine so große Kohorte humaner Nierenzellkarzinomgewebeproben Verwendung findet (Stand Oktober 2024). Unsere IHC- Analyse von 429 Gewebeproben wies sowohl im Primärtumorgewebe als auch im Normalgewebe der Niere eine starke LSD1- Expression im Zellkern nach. Ein hoher G- oder pT- Status korrelierte nicht mit einer stärkeren LSD1 Expression. Dies könnte darin begründet sein, dass LSD1 bereits in einem sehr frühen Stadium der Karzinogenese eine Rolle spielt (Hayami et al. 2011).

Die Untersuchung der KDM2B Expression erfolgte an 431 Gewebeproben. Im klarzelligen Nierenzellkarzinom unserer Kohorte fand sich sowohl im Zellkern ($p < 0,001$) als auch im Zytoplasma ($p=0,002$) signifikant häufiger eine starke KDM2B-Expression, als es im Normalgewebe der Niere der Fall war. Diese Beobachtung deckt sich mit der von uns im Vorfeld durchgeführten *in silico* Analyse von TCGA-Daten (vgl. Abb. 3). Es zeigte sich eine Korrelation zwischen Höhe des pT- Status und Intensität der KDM2B-Expression im Zellkern im klarzelligen Nierenzellkarzinom ($p= 0,012$). Diese Beobachtungen lassen einen Einsatz von KDM2B als therapeutisches target oder prädiktiven Marker denkbar erscheinen. Anhand von 367 Gewebeproben untersuchten wir die Expression von JARID1C. Vor allem im Gewebe des klarzelligen Nierenzellkarzinoms imponierte dabei signifikant häufiger ($p < 0,001$) eine starke JARID1C- Expression als im Normalgewebe der Niere, und zwar sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. Auch ging ein höherer G- Status des Tumors mit einer stärkeren JARID1C-Expression in Zellkern ($p=0,004$) und Zytoplasma ($p < 0,001$) einher. Ein hoher pT- Status korrelierte signifikant mit einer starken JARID1C-Expression im Zellkern ($p=0,006$). Diese Beobachtungen legen den Einsatz von JARID1C als prädiktiven Marker oder therapeutisches target in Zukunft nahe. Hierfür sind weitere Studien notwendig, beispielweise Forschung mittels selektiver Inhibitoren am Xenograft- Modell oder Zellkultur.

7 Literaturverzeichnis

Bottner, J.; Ribbat-Idel, J.; Klapper, L.; Jagomast, T.; Lemster, A.-L.; Perner, S.; Idel, C.; Kirfel, J. Elevated LSD1 and SNAIL Expression Indicate Poor Prognosis in Hypopharynx Carcinoma. *Int J Mol Sci* 2022, 23 (9), 5075. <https://doi.org/10.3390/ijms23095075>.

Chang, S.; Yim, S.; Park, H. The Cancer Driver Genes IDH1/2, JARID1C/ KDM5C, and UTX/ KDM6A: Crosstalk between Histone Demethylation and Hypoxic Reprogramming in Cancer Metabolism. *Exp Mol Med* 2019, 51 (6), 66. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0230-6>.

Chen, J.-Y.; Li, C.-F.; Chu, P.-Y.; Lai, Y.-S.; Chen, C.-H.; Jiang, S. S.; Hou, M.-F.; Hung, W.-C. Lysine Demethylase 2A Promotes Stemness and Angiogenesis of Breast Cancer by Upregulating Jagged1. *Oncotarget* 2016, 7 (19), 27689–27710. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8381>.

Dagliesh, G. L.; Furge, K.; Greenman, C.; Chen, L.; Bignell, G.; Butler, A.; Davies, H.; Edkins, S.; Hardy, C.; Latimer, C.; Teague, J.; Andrews, J.; Barthorpe, S.; Beare, D.; Buck, G.; Campbell, P. J.; Forbes, S.; Jia, M.; Jones, D.; Knott, H.; Kok, C. Y.; Lau, K. W.; Leroy, C.; Lin, M.-L.; McBride, D. J.; Maddison, M.; Maguire, S.; McLay, K.; Menzies, A.; Mironenko, T.; Mulderrig, L.; Mudie, L.; O'Meara, S.; Pleasance, E.; Rajasingham, A.; Shepherd, R.; Smith, R.; Stebbings, L.; Stephens, P.; Tang, G.; Tarpey, P. S.; Turrell, K.; Dykema, K. J.; Khoo, S. K.; Petillo, D.; Wondergem, B.; Anema, J.; Kahnoski, R. J.; Teh, B. T.; Stratton, M. R.; Futreal, P. A. Systematic Sequencing of Renal Carcinoma Reveals Inactivation of Histone Modifying Genes. *Nature* 2010, 463 (7279), 360–363. <https://doi.org/10.1038/nature08672>.

Deng M, Brägelmann J, Schultze JL, Perner S. Web-TCGA: an online platform for integrated analysis of molecular cancer data sets. *BMC Bioinformatics*. 2016 Feb 6;17:72. doi: 10.1186/s12859-016-0917-9. PMID: 26852330; PMCID: PMC4744375.

Ducasse, M.; Brown, M. A. Epigenetic Aberrations and Cancer. *Mol Cancer* 2006, 5, 60. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-5-60>.

Ellis, L.; Atadja, P. W.; Johnstone, R. W. Epigenetics in Cancer: Targeting Chromatin Modifications. *Molecular Cancer Therapeutics* 2009, 8 (6), 1409–1420. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0860>.

Felsenfeld, G.; Groudine, M.; Controlling the double helix. *Nature* 2003, 421(6921), 448-53. DOI: 10.1038/nature01411. PMID: 12540921.

Fiebig, J.; Kraywinkel, K. Epidemiologie des Nierenzellkarzinoms in Deutschland. *Onkologie* 2019, 25, 483–487.

Foster, C. T.; Dovey, O. M.; Lezina, L.; Luo, J. L.; Gant, T. W.; Barlev, N.; Bradley, A.; Cowley, S. M. Lysine-Specific Demethylase 1 Regulates the Embryonic Transcriptome and CoREST Stability. *Mol Cell Biol* 2010, 30 (20), 4851–4863. <https://doi.org/10.1128/MCB.00521-10>.

Gao, S.; Chen, S.; Han, D.; Wang, Z.; Li, M.; Han, W.; Besschetnova, A.; Liu, M.; Zhou, F.; Barrett, D.; Luong, M. P.; Owiredo, J.; Liang, Y.; Ahmed, M.; Petricca, J.; Patalano, S.; Macoska, J. A.; Corey, E.; Chen, S.; Balk, S. P.; He, H. H.; Cai, C. Chromatin Binding of FOXA1 Is Promoted by LSD1-Mediated Demethylation in Prostate Cancer. *Nat Genet* 2020, 52 (10), 1011–1017. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0681-7>.

Hayami, S. Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers - Hayami - 2010 - International Journal of Cancer- Wiley Online Library. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.25349/abstract;jsessionid=DFBC7722E945D29BE3CE4DBE4DF7EB16.f04t02> (Zugriff am 26.02.2018).

He, J.; Kallin, E. M.; Tsukada, Y.; Zhang, Y. The H3K36 Demethylase Jhdm1b/Kdm2b Regulates Cell Proliferation and Senescence through P15Ink4b. *Nat Struct Mol Biol* 2008, 15 (11), 1169–1175. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1499>.

Iwase, S.; Lan, F.; Bayliss, P.; Torre-Ubieta, L. de la; Huarte, M.; Qi, H. H.; Whetsstine, J. R.; Bonni, A.; Roberts, T. M.; Shi, Y. The X-Linked Mental Retardation Gene SMCX/JARID1C Defines a Family of Histone H3 Lysine 4 Demethylases. *Cell* 2007, 128 (6), 1077–1088. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.017>.

Janzer, A.; Stamm, K.; Becker, A.; Zimmer, A.; Buettner, R.; Kirfel, J. The H3K4me3 Histone Demethylase Fbxl10 Is a Regulator of Chemokine Expression, Cellular Morphology, and the Metabolome of Fibroblasts. *J Biol Chem* 2012, 287 (37), 30984–30992. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341040>.

Kanwal, R.; Gupta, S. Epigenetics and Cancer. *J Appl Physiol* (1985) 2010, 109 (2), 598–605. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00066.2010>.

Karakaidos, P.; Verigos, J.; Magklara, A. LSD1/KDM1A, a Gate-Keeper of Cancer Stemness and a Promising Therapeutic Target. *Cancers* (Basel) 2019, 11 (12), 1821. <https://doi.org/10.3390/cancers11121821>.

Kawakami, E.; Tokunaga, A.; Ozawa, M.; Sakamoto, R.; Yoshida, N. The Histone Demethylase Fbxl11/Kdm2a Plays an Essential Role in Embryonic Development by Repressing Cell-Cycle Regulators. *Mechanisms of Development* 2015, 135, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2014.10.001>.

Kramer, J. M.; van Bokhoven, H. Genetic and Epigenetic Defects in Mental Retardation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009, 41 (1), 96–107. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.009>.

Kuang, Y.; Lu, F.; Guo, J.; Xu, H.; Wang, Q.; Xu, C.; Zeng, L.; Yi, S. Histone Demethylase KDM2B Upregulates Histone Methyltransferase EZH2 Expression and Contributes to the Progression of Ovarian Cancer in Vitro and in Vivo. *Onco Targets Ther* 2017, 10, 3131–3144. <https://doi.org/10.2147/OTT.S134784>.

Kurt, I. C.; Sur, I.; Kaya, E.; Cingoz, A.; Kazancioglu, S.; Kahya, Z.; Toparlak, O. D.; Senbabaoglu, F.; Kaya, Z.; Ozyerli, E.; Karahüseyinoglu, S.; Lack, N. A.; Gümüş, Z. H.; Onder, T. T.; Bagci-Onder, T. KDM2B, an H3K36-Specific Demethylase, Regulates Apoptotic Response of GBM Cells to TRAIL. *Cell Death Dis* 2017, 8 (6), e2897. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.288>.

Lee, K.-H.; Kim, B.-C.; Jeong, S.-H.; Jeong, C. W.; Ku, J. H.; Kwak, C.; Kim, H. H. Histone Demethylase LSD1 Regulates Kidney Cancer Progression by Modulating Androgen Receptor Activity. *Int J Mol Sci* 2020, 21 (17). <https://doi.org/10.3390/ijms21176089>.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 4.0, 2023, AWMF-Registernummer: 043-017OLLL_Nierenzellkarzinom_Flowchart_SystemtherapieVers4.pdf (leitlinienprogramm-onkologie.de) <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/nierenzellkarzinom/>;
Zugriff am 29.08.2024

Liang, Z.; Diamond, M.; Smith, J. A.; Schnell, M.; Daniel, R. Proliferating Cell Nuclear Antigen Is Required for Loading of the SMCX/KMD5C Histone Demethylase onto Chromatin. *Epigenetics Chromatin* 2011, 4, 18. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-4-18>.

Lim, S.; Janzer, A.; Becker, A.; Zimmer, A.; Schüle, R.; Buettner, R.; Kirfel, J. Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) Is Highly Expressed in ER-Negative Breast Cancers and a Biomarker Predicting Aggressive Biology. *Carcinogenesis* 2010, 31 (3), 512–520. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp324>.

Lin, H.; Ma, N.; Zhao, L.; Yang, G.; Cao, B. KDM5c Promotes Colon Cancer Cell Proliferation Through the FBXW7-c-Jun Regulatory Axis. *Front Oncol* 2020, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.535449>.

Linehan, W. M.; Spellman, P. T.; Ricketts, C. J.; Creighton, C. J.; Fei, S. S.; Davis, C.; Wheeler, D. A.; Murray, B. A.; Schmidt, L.; Vocke, C. D.; Peto, M.; Al Mamun, A. A. M.; Shinbrot, E.; Sethi, A.; Brooks, S.; Rathmell, W. K.; Brooks, A. N.; Hoadley, K. A.; Robertson, A. G.; Brooks, D.; Bowlby, R.; Sadeghi, S.; Shen, H.; Weisenberger, D. J.; Bootwalla, M.; Baylin, S. B.; Laird, P. W.; Cherniack, A. D.; Saksena, G.; Haake, S.; Li, J.; Liang, H.; Lu, Y.; Mills, G. B.; Akbani, R.; Leiserson, M. D. M.; Raphael, B. J.; Anur, P.; Bottaro, D.; Albiges, L.; Barnabas, N.; Choueiri, T. K.; Czeraniak, B.; Godwin, A. K.; Hakimi, A. A.; Ho, T.; Hsieh, J.; Ittmann, M.; Kim, W. Y.; Krishnan, B.; Merino, M. J.; Mills Shaw, K. R.; Reuter, V. E.; Reznik, E.; Shelley, C. S.; Shuch, B.; Signoretti, S.; Srinivasan, R.; Tamboli, P.; Thomas, G.; Tickoo, S.; Burnett, K.; Crain, D.; Gardner, J.; Lau, K.; Mallery, D.; Morris, S.; Paulauskis, J. D.; Penny, R. J.; Shelton, C.; Shelton, W. T.; Sherman, M.; Thompson, E.; Yena, P.; Avedon, M. T.; Bowen, J.; Gastier-Foster, J. M.; Gerken, M.; Leraas, K. M.; Lichtenberg, T. M.; Ramirez, N. C.; Santos, T.; Wise, L.; Zmuda, E.; Demchok, J. A.; Felau, I.; Hutter, C. M.; Sheth, M.; Sofia, H. J.; Tarnuzzer, R.; Wang, Z.; Yang, L.; Zenklusen, J. C.; Zhang, J. (Julia); Ayala, B.; Baboud, J.; Chudamani, S.; Liu, J.; Lolla, L.; Naresh, R.; Pihl, T.; Sun, Q.; Wan, Y.; Wu, Y.; Ally, A.; Balasundaram, M.; Balu, S.; Beroukhim, R.; Bodenheimer, T.; Buhay, C.; Butterfield, Y. S. N.; Carlsen, R.; Carter, S. L.; Chao, H.; Chuah, E.; Clarke, A.; Covington, K. R.; Dahdouli, M.; Dewal, N.; Dhalla, N.; Doddapaneni, H.; Drummond, J.; Gabriel, S. B.; Gibbs, R. A.; Guin, R.; Hale, W.; Hawes, A.; Hayes, D. N.; Holt, R. A.; Hoyle, A. P.; Jefferys, S. R.; Jones, S. J. M.; Jones, C. D.; Kalra, D.; Kovar, C.; Lewis, L.; Li, J.; Ma, Y.; Marra,

M. A.; Mayo, M.; Meng, S.; Meyerson, M.; Mieczkowski, P. A.; Moore, R. A.; Morton, D.; Mose, L. E.; Mungall, A. J.; Muzny, D.; Parker, J. S.; Perou, C. M.; Roach, J.; Schein, J. E.; Schumacher, S. E.; Shi, Y.; Simons, J. V.; Sipahimalani, P.; Skelly, T.; Soloway, M. G.; Sougnez, C.; Tam, A.; Tan, D.; Thiessen, N.; Veluvolu, U.; Wang, M.; Wilkerson, M. D.; Wong, T.; Wu, J.; Xi, L.; Zhou, J.; Bedford, J.; Chen, F.; Fu, Y.; Gerstein, M.; Haussler, D.; Kasaian, K.; Lai, P.; Ling, S.; Radenbaugh, A.; Van Den Berg, D.; Weinstein, J. N.; Zhu, J.; Albert, M.; Alexopoulou, I.; Andersen, J. J.; Auman, J. T.; Bartlett, J.; Bastacky, S.; Bergsten, J.; Blute, M. L.; Boice, L.; Bollag, R. J.; Boyd, J.; Castle, E.; Chen, Y.-B.; Cheville, J. C.; Curley, E.; Davies, B.; DeVolk, A.; Dhir, R.; Dike, L.; Eckman, J.; Engel, J.; Harr, J.; Hrebinko, R.; Huang, M.; Huelsenbeck-Dill, L.; Iacocca, M.; Jacobs, B.; Lobis, M.; Maranchie, J. K.; McMeekin, S.; Myers, J.; Nelson, J.; Parfitt, J.; Parwani, A.; Petrelli, N.; Rabeno, B.; Roy, S.; Salner, A. L.; Slaton, J.; Stanton, M.; Thompson, R. H.; Thorne, L.; Tucker, K.; Weinberger, P. M.; Winemiller, C.; Zach, L. A.; Zuna, R. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2016, 374 (2), 135–145. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1505917>.

Maes, T.; Mascaró, C.; Tirapu, I.; Estiarte, A.; Ciceri, F.; Lunardi, S.; Guibourt, N.; Perdones, A.; Lufino, M.; Somervaille, T.; Wiseman, D. H.; Duy, C.; Melnick, A.; Willekens, C.; Ortega, A.; Martinell, M.; Valls, N.; Kurz, G.; Fyfe, M.; Castro-Palomino, J. C.; Buesa, C. ORY-1001, a Potent and Selective Covalent KDM1A Inhibitor, for the Treatment of Acute Leukemia: *Cancer Cell* 2018, 33 495–511 e12 [https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108\(18\)30023-0](https://www.cell.com/cancer-cell/fulltext/S1535-6108(18)30023-0) (Zugriff 08.08.2022).

Magliulo, D.; Bernardi, R.; Messina, S. Lysine-Specific Demethylase 1A as a Promising Target in Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol* 2018, 8, 255. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00255>.

Maher, E. R. Genomics and Epigenomics of Renal Cell Carcinoma. *Seminars in Cancer Biology* 2013, 23 (1), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.06.003>.

Mancini, M., Righetto, M., and Baggio, G. (2020). Gender-Related Approach to Kidney Cancer Management: Moving Forward. *Int J Mol Sci* 21, 3378. [10.3390/ijms21093378](https://doi.org/10.3390/ijms21093378).

Metzger, E.; Wissmann, M.; Yin, N.; Müller, J. M.; Schneider, R.; Peters, A. H. F. M.; Günther, T.; Buettner, R.; Schüle, R. LSD1 Demethylates Repressive Histone Marks to Promote Androgen-Receptor-Dependent Transcription. *Nature* 2005, 437 (7057), 436–439. <https://doi.org/10.1038/nature04020>.

Moch, Holger; Humphrey, Peter A.; Ulbright, Thomas M. (Hg.) (2016): WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs. Weltgesundheitsorganisation; International Agency for Research on Cancer; Editorial and consensus conference. WHO Working Group on Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs. Lyon: IARC Press (World Health Organization classification of tumours, 14- 18).

Morris, M. R.; Latif, F. The Epigenetic Landscape of Renal Cancer. *Nature Reviews Nephrology* 2017, 13 (1), 47–60. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.168>.

Niebel, D.; Kirfel, J.; Janzen, V.; Höller, T.; Majores, M.; Gütgemann, I. Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) in Hematopoietic and Lymphoid Neoplasms. *Blood* 2014, 124 (1), 151–152. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-569525>.

Okada, Y.; Scott, G.; Ray, M. K.; Mishina, Y.; Zhang, Y. Histone Demethylase JHDM2A Is Critical for Tnp1 and Prm1 Transcription and Spermatogenesis. *Nature* 2007, 450 (7166), 119–123. <https://doi.org/10.1038/nature06236>.

Oliveira, R. de C.; Ivanovic, R. F.; Leite, K. R. M.; Viana, N. I.; Pimenta, R. C. A.; Junior, J. P.; Guimarães, V. R.; Morais, D. R.; Abe, D. K.; Nesrallah, A. J.; Srougi, M.; Nahas, W.; Reis, S. T. Expression of Micro-RNAs and Genes Related to Angiogenesis in CcRCC and Associations with Tumor Characteristics. *BMC Urology* 2017, 17, 113. <https://doi.org/10.1186/s12894-017-0306-3>.

Pishas, K. I.; Drenberg, C. D.; Taslim, C.; Theisen, E. R.; Johnson, K. M.; Saund, R. S.; Pop, I. L.; Crompton, B. D.; Lawlor, E. R.; Tirode, F.; Mora, J.; Delattre, O.; Beckerle, M. C.; Callen, D. F.; Sharma, S.; Lessnick, S. L. Therapeutic Targeting of KDM1A/LSD1 in Ewing Sarcoma with SP-2509 Engages the Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Mol Cancer Ther* 2018, 17 (9), 1902–1916. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0373>.

Qi, J.; Zhou, L.; Li, D.; Yang, J.; Wang, H.; Cao, H.; Huang, Y.; Zhang, Z.; Chang, L.; Zhu, C.; Zhan, J.; Yuan, Y. Oncogenic Role of ALX3 in Cervical Cancer Cells

through KDM2B-Mediated Histone Demethylation of CDC25A. *BMC Cancer* 2021, 21 (1), 819. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08552-7>.

Renehan, A. G.; Tyson, M.; Egger, M.; Heller, R. F.; Zwahlen, M. Body-Mass Index and Incidence of Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Observational Studies. *Lancet* 2008, 371 (9612), 569–578. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60269-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60269-X).

Riazalhosseini, Y.; Lathrop, M. Precision Medicine from the Renal Cancer Genome. *Nature Reviews Nephrology* 2016, 12, 655.

Rohde M.; Sievers E.; Janzer A.; Willmann D.; Egert A.; Schorle H.; Schüle R.; Kirfel J. Overexpression of histone demethylase Fbxl10 leads to enhanced migration in mouse embryonic fibroblasts. *Experimental Cell Research* 2016, 348 (2), 123-131. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.08.026>.

Rondinelli, B.; Rosano, D.; Antonini, E.; Frenquelli, M.; Montanini, L.; Huang, D.; Segalla, S.; Yoshihara, K.; Amin, S. B.; Lazarevic, D.; The, B. T.; Verhaak, R. G. W.; Futreal, P. A.; Di Croce, L.; Chin, L.; Cittaro, D.; Tonon, G. Histone Demethylase JARID1C Inactivation Triggers Genomic Instability in Sporadic Renal Cancer. *J Clin Invest* 2015, 125 (12), 4625–4637. <https://doi.org/10.1172/JCI81040>.

Schildhaus H.-U.; Riegel R.; Hartmann W.; Steiner S.; Wardelmann E.; Merkelbach-Bruse S.; Tanaka S.; Sonobe H.; Schüle R.; Buettner R.; and Kirfel J. Lysine-specific demethylase 1 is highly expressed in solitary fibrous tumors, synovial sarcomas, rhabdomyosarcomas, desmoplastic small round cell tumors, and malignant peripheral nerve sheath tumors. *Human Pathology* 2011, 42 (11), 1667–1675.

Schulte, J. H.; Lim, S.; Schramm, A.; Friedrichs, N.; Koster, J.; Versteeg, R.; Ora, I.; Pajtler, K.; Klein-Hitpass, L.; Kuhfittig-Kulle, S.; Metzger, E.; Schüle, R.; Eggert, A.; Buettner, R.; Kirfel, J. Lysine-Specific Demethylase 1 Is Strongly Expressed in Poorly Differentiated Neuroblastoma: Implications for Therapy. *Cancer Res* 2009, 69 (5), 2065–2071. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1735>.

Serce, N.; Gnatzy, A.; Steiner, S.; Lorenzen, H.; Kirfel, J.; Buettner, R. Elevated Expression of LSD1 (Lysine-Specific Demethylase 1) during Tumour Progression from Pre-Invasive to Invasive Ductal Carcinoma of the Breast. *BMC Clin Pathol* 2012, 12, 13. <https://doi.org/10.1186/1472-6890-12-13>.

Sharma, R., Kadife, E., Myers, M., Kannourakis, G., Prithviraj, P., and Ahmed, N. (2021). Determinants of resistance to VEGF-TKI and immune checkpoint inhibitors in metastatic renal cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 40, 186. [10.1186/s13046-021-01961-3](https://doi.org/10.1186/s13046-021-01961-3).

Shih, A. H.; Abdel-Wahab, O.; Patel, J. P.; Levine, R. L. The Role of Mutations in Epigenetic Regulators in Myeloid Malignancies. *Nature Reviews Cancer* 2012, 12 (9), 599–612. <https://doi.org/10.1038/nrc3343>.

Shi, Y.; Lan, F.; Matson, C.; Mulligan, P.; Whetstine, J.R.; Cole, P.A.; Casero, R.A.; Shi, Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 2004, 119, 941–953. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.012>.

Shi, Y.-J.; Matson, C.; Lan, F.; Iwase, S.; Baba, T.; Shi, Y. Regulation of LSD1 Histone Demethylase Activity by Its Associated Factors. *Molecular Cell* 2005, 19 (6), 857–864. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.027>.

Staberg, Mikkel; Rasmussen, Rikke Darling; Michaelsen, S. R.; Pedersen, H.; Jensen, K. E.; Villingshøj, M.; Skjoth-Rasmussen, J.; Brennum, J.; Vitting-Seerup, K.; Poulsen, H. S.; Hamerlik, P. Targeting glioma stem-like cell survival and chemoresistance through inhibition of lysine-specific histone demethylase KDM2B - Staberg - 2018 - *Molecular Oncology* - Wiley Online Library. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1878-0261.12174/full>(Zugriff 23.02.2018)

Stein, J.; Majores, M.; Rohde, M.; Lim, S.; Schneider, S.; Krappe, E.; Ellinger, J.; Dietel, M.; Stephan, C.; Jung, K.; Perner, S.; Kristiansen, G.; Kirfel, J. KDM5C Is Overexpressed in Prostate Cancer and Is a Prognostic Marker for Prostate-Specific Antigen-Relapse Following Radical Prostatectomy. *The American Journal of Pathology* 2014, 184 (9), 2430–2437. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.05.022>.

Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2021, 71 (3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.

Tsukada, Y.; Fang, J.; Erdjument-Bromage, H.; Warren, M. E.; Borchers, C. H.; Tempst, P.; Zhang, Y. Histone Demethylation by a Family of JmjC Domain-Containing Proteins. *Nature* 2006, 439 (7078), 811–816. <https://doi.org/10.1038/nature04433>.

Tzatsos, A.; Paskaleva, P.; Ferrari, F.; Deshpande, V.; Stoykova, S.; Contino, G.; Wong, K.-K.; Lan, F.; Trojer, P.; Park, P. J.; Bardeesy, N. KDM2B Promotes Pancreatic Cancer via Polycomb-Dependent and -Independent Transcriptional Programs. *J Clin Invest* 2013, 123 (2), 727–739. <https://doi.org/10.1172/JCI64535>.

Wagner, K. W.; Alam, H.; Dhar, S. S.; Giri, U.; Li, N.; Wei, Y.; Giri, D.; Cascone, T.; Kim, J.-H.; Ye, Y.; Multani, A. S.; Chan, C.-H.; Erez, B.; Saigal, B.; Chung, J.; Lin, H.-K.; Wu, X.; Hung, M.-C.; Heymach, J. V.; Lee, M. G. KDM2A Promotes Lung Tumorigenesis by Epigenetically Enhancing ERK1/2 Signaling. *J Clin Invest* 2013, 123 (12), 5231–5246. <https://doi.org/10.1172/JCI68642>.

Wang, J.-J.; Dong, R.; Wang, L.-P.; Wang, J.-S.; Du, J.; Wang, S.-L.; Shan, Z.-C.; Fan, Z.-P. Histone Demethylase KDM2B Inhibits the Chondrogenic Differentiation Potentials of Stem Cells from Apical Papilla. *Int J Clin Exp Med* 2015, 8 (2), 2165–2173.

Wang, Y.; Zang, J.; Zhang, D.; Sun, Z.; Qiu, B.; Wang, X. KDM2B Overexpression Correlates with Poor Prognosis and Regulates Glioma Cell Growth. *Onco Targets Ther* 2018, 11, 201–209. <https://doi.org/10.2147/OTT.S149833>.

Weikert, S.; Boeing, H.; Pischon, T.; Weikert, C.; Olsen, A.; Tjonneland, A.; Overvad, K.; Becker, N.; Linseisen, J.; Trichopoulou, A.; Mountokalakis, T.; Trichopoulos, D.; Sieri, S.; Palli, D.; Vineis, P.; Panico, S.; Peeters, P. H. M.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Verschuren, W. M. M.; Ljungberg, B.; Hallmans, G.; Berglund, G.; González, C. A.; Dorronsoro, M.; Barricarte, A.; Tormo, M. J.; Allen, N.; Roddam, A.; Bingham, S.; Khaw, K.-T.; Rinaldi, S.; Ferrari, P.; Norat, T.; Riboli, E. Blood Pressure and Risk of Renal Cell Carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Am J Epidemiol* 2008, 167 (4), 438–446. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm321>.

Xing, T.; He, H. Epigenomics of Clear Cell Renal Cell Carcinoma: Mechanisms and Potential Use in Molecular Pathology. *Chin J Cancer Res* 2016, 28 (1), 80–91. <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2016.02.09>.

Yamane, K.; Toumazou, C.; Tsukada, Y.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Wong, J.; Zhang, Y. JHDM2A, a JmJc-Containing H3K9 Demethylase, Facilitates Transcription Activation by Androgen Receptor. *Cell* 2006, 125 (3), 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.027>.

Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch Instituts. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Nierenkrebs/nierenkrebs_node.html (Zugriff am 06.08.2024).

Zhang, S.; Liu, M.; Yao, Y.; Yu, B.; Liu, H. Targeting LSD1 for Acute Myeloid Leukemia (AML) Treatment. *Pharmacological Research* 2021, 164, 105335. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105335>.

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Modifikation durch Histondemethylasen KDM2B und KDM2A	10
Abbildung 2: Struktur der Histondemethylasen KDM2A und KDM2B.	11
Abbildung 3: Veränderte Expression von Histondemethylasen in Tumorgewebe .	12
Abbildung 4: Erstellen eines Tissue Micro Arrays (TMAs).....	26
Abbildung 5: Expression von LSD1.	31
Abbildung 6: Die LSD1- Expression im Zellkern von Normal- und Tumorgewebe der Niere unterscheidet sich.....	32
Abbildung 7: Expression von KDM2B im Zellkern.	36
Abbildung 8: Expression von KDM2B im Zytoplasma.....	36
Abbildung 9: Expression von KDM2B im Zellkern von korrespondierendem Normalgewebe der Niere und Primärtumor.	37
Abbildung 10: Expression von KDM2B im Zytoplasma von korrespondierendem Normalgewebe der Niere und Primärtumor.	37
Abbildung 11: Expression von JARID1C im Zellkern.....	45
Abbildung 12: Expression von JARID1C im Zytoplasma.	45
Abbildung 13: Abweichung der Expression von JARID1C im Zellkern von Primärtumor und korrespondierendem Normalgewebe der Niere.....	46
Abbildung 14: Expression von JARID1C im Zytoplasma von Primärtumor und korrespondierendem Normalgewebe der Niere	47

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	20
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	20
Tabelle 3: Software	21
Tabelle 4: Antikörper	21
Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien	21
Tabelle 6: Charakteristika der Lübecker Kohorte.....	24
Tabelle 7: Verteilung der Färbeintensität von LSD1.	30
Tabelle 8: Verteilung der Anfärbung von KDM2B.	35
Tabelle 9: Expression von KDM2B in Zellkern und Zytoplasma.	39
Tabelle 10: Expression von JARID1C.	44
Tabelle 11: Expression von JARID1C in Zellkern und Zytoplasma.	48
Tabelle 12: Färbeprotokoll KDM2B	76
Tabelle 13: Färbeprotokoll Hämatoxylin- Eosin- Färbung	77

10 Anhänge

10.1 Arbeitsschritte der immunhistochemischen Anfärbungen

Die immunhistochemischen KDM2B- Anfärbungen wurden mittels des VENTANA® BenchMark ULTRA Färbeautomaten (Roche, Basel, Schweiz) angefertigt.

10.1.1 Färbeprotokoll KDM2B

Tabelle 12: Färbeprotokoll KDM2B

Färbeprotokoll Nr. 156	First Sequence
	Entparaffinierung
	Erwärme Objektträger auf 72°C und inkubiere für 8 Min (Zyklus 1)
	Inkubieren für 8 Min (Zyklus 2)
	Inkubieren für 8 Min (Zyklus 3)
	Vorbehandlung
	Hitzevorbehandlung
	CC1 Reservoir
	Erwärme Objektträger auf 98°C und inkubiere für 4 Min (Cell Conditioner Nr. 1)
	CC1 8 Min
	CC1 16 Min
	CC1 24 Min
	CC1 32 Min
	Inhibitor
	Inhibitor CM
	1 Tropfen Inhibitor CM auftragen und für 4 Min inkubieren
	Antikörper
	1st Antibody Manual Application
	Objektträger- Temperatur von 37°C auf sehr niedrige Temperaturen (Primär Antikörper) erhöhen
	Hand Apply (Primärantikörper) und inkubiere für 60 Min
	Linking Antibody
	Sekundärantikörper
	Objektträger- Temperatur von 37°C auf sehr niedrige Temperaturen (Sekundärantikörper) erhöhen

	1 Tropfen Anti-Rabbit HQ und für 20 Min inkubieren
	Enzymkonjugat
	1 Tropfen Anti- HQ HRP (Konjugat 1) und für 16 Min inkubieren
	Gegenfärbung
	Use RB for counterstain
	1 Tropfen Hematoxylin II (Gegenfärbung) und für 8 Min inkubieren
	Nach- Gegenfärbung
	Use RB for post- counterstain
	1 Tropfen Bluing Reagent (Nach- Gegenfärbung) und für 8 Min inkubieren
	Objektträgerreinigung

10.1.2 Färbeprotokoll Hämatoxylin- Eosin- Färbung nach Gill

Die Hämatoxylin- Eosin- Färbungen (HE) nach Gill wurden mit dem Färbeautomaten Leica ST 4040 (Leica, Wetzlar, Deutschland) angefertigt.

Tabelle 13: Färbeprotokoll Hämatoxylin- Eosin- Färbung

Arbeitsschritt	Reagenz	Zeit/min
1.- 4.	Xylol	4
5.- 7.	Alkohol (100%)	3
8.	Alkohol (96%)	1
9.	Leitungswasser	1
10.	Hämatoxylin nach Gill	1
11.	Leitungswasser und Gill ($\frac{1}{2} + \frac{1}{2}$)	1
12.- 15.	Leitungswasser	4
16.	Acid Rinse	1
17.- 18.	Eosin	2
19.	Alkohol (100%)	1
20.- 21.	Alkohol (100%) Iso	2
22.- 25.	Xylol	4

10.2 Ethikvotum der Universität zu Lübeck

In diese Studie wurden keine tierexperimentellen Versuche oder die Beteiligung von Probanden eingeschlossen. Ein **positives Ethikvotum** für diese Studie liegt vor (**AZ 17- 341, Universität zu Lübeck, 29. Dezember 2017**).

10.3 Vorstellung des Projekts als Kongressbeitrag

102. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie e.V. 2018, Berlin

Mündliche Präsentation des Projekts *Expression and function of Histone Lysine Demethylases KDM2A and KDM2B in Renal Cell Carcinoma* der AG Kirfel, Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

10.4 Stipendium

Diese Dissertationsarbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der *Monika Kutzner Stiftung, Rechtsfähige Stiftung des privaten Rechts zur Förderung der Krebsforschung, Bayerische Str. 8, 10707 Berlin* gefördert.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ausdrücklich bei folgenden Personen bedanken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran danke ich meiner Doktormutter Frau Professor Jutta Kirfel für die Überlassung eines so interessanten und bisher wenig erforschten Themas für die Anfertigung meiner Promotionsarbeit. Da Frau Professor Jutta Kirfel gleichzeitig auch als Betreuerin dieser Arbeit fungiert, gilt ihr mein aufrichtiger Dank in ganz besonderem Maße: Ohne ihre stetige Unterstützung, Ermutigung und konstruktive Kritik wäre eine erfolgreiche Umsetzung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ich danke Frau Professor Jutta Kirfel ganz herzlich dafür, mir in jeder Phase des Projekts mit Rat und Tat zur Seite gestanden zu haben!

Frau Doktor Anne Offermann danke ich für ihre kreativen Ideen beim Erstellen der Grafiken sowie ihre fachliche Unterstützung beim Mikroskopieren. Ihre Anregungen waren mir im Rahmen der statistischen Auswertung eine große Hilfe.

Ein großer Dank gilt zudem den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors des Instituts für Pathologie in Lübeck. Bedanken möchte ich mich für die Unterstützung bei der Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen und Schnittpräparate.

Ich danke der Monika Kutzner Stiftung Berlin, die meine Arbeit mit einem Promotionsstipendium gefördert hat.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danke ich in besonderem Maße für ihre bedingungslose und unabdingbare Unterstützung zu jedem Zeitpunkt. Meinem Ehemann danke ich für seine Ermutigungen und seine verständnisvolle Rücksichtnahme in den arbeitsintensiven Phasen dieser Arbeit.

12 Versicherung an Eides Statt

Gemäß §9 Abs. 1 der Promotionsordnung der Universität zu Lübeck, UKSH Campus Lübeck:

Bei der von mir vorgelegten Dissertation mit dem Titel „*Expressionsanalyse von histonmodifizierenden Enzymen und deren Rolle im Nierenzellkarzinom*“ handelt es sich um eine von mir eigenständig erbrachte Leistung.

Ich versichere, diese Arbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt zu haben. Inhalte, die sinngemäß oder wörtlich aus Werken anderer Urheber stammen, habe ich als solche gekennzeichnet.

Weder die von mir vorgelegte Arbeit noch Auszüge davon wurden bereits zuvor oder gleichzeitig andernorts im In- oder Ausland als Dissertation vorgelegt oder hierfür ein Zulassungsantrag gestellt.

Mit meiner Unterschrift bestätige ich die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen.

Hamburg, im Oktober 2024

Alexandra Bourguignon