

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Diagnostik

Institut für Pathologie mit Molekularpathologie und Zytopathologie

Direktor: Prof. Dr. med. Guido Sauter

**Prävalenz und prognostische Bedeutung der „Enhancer of Zeste
Homolog 2“ Expression beim Nierenzellkarzinom**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Luca Malte Simmendinger
aus Hamburg

Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 11.09.2019

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

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

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Clemens Rosenbaum

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Epidemiologie.....	1
1.2	Ätiologie.....	2
1.3	Symptome und Diagnostik.....	3
1.4	Pathologie.....	3
1.5	Therapie	9
1.6	Prognosemarker.....	10
1.7	Enhancer von Zeste Homolog 2	11
1.8	Arbeitshypothese und Fragestellung.....	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Patienten	18
2.2	Tissue Micro Array	18
2.3	Klinische Verlaufsdaten	19
2.4	Immunohistochemie.....	20
2.5	Statistik	21
3	Resultate.....	21
3.1	Beziehung zu klassischen Prognosefaktoren	21
3.2	EZH2 Expression	22
3.3	EZH2 Expression und histologischer Tumorphänotyp.....	26
3.4	EZH2 Expression und Prognose bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen	29
3.5	EZH2 Expression und Prognose bei papillären Nierenzellkarzinomen.....	32
3.6	EZH2 Expression und Prognose bei chromophoben Nierenzellkarzinomen	34
4	Diskussion.....	35
4.1	Prävalenz der Expression in Bezug zu früheren Studien	35
4.2	Klinische Relevanz der Expression in Bezug zu früheren Studien	47
5	Zusammenfassung/ Summary	1
6	Abbildungsverzeichnis.....	1
7	Literaturverzeichnis	1
8	Danksagung.....	1

9	Lebenslauf	2
10	Eidesstattliche Erklärung	1

1 Einleitung

Das unzureichende Ansprechen auf klassische Chemotherapeutika stellt eine Herausforderung in der Therapie von metastasierten Malignomen der Niere dar. Nierentumoren zählen weltweit zu den zehn häufigsten malignen Entartungen, sodass die Etablierung von sensitiven Früherkennungsverfahren, beispielsweise mittels sogenannter Biomarker, sowie die Entwicklung von zielgerichteten Therapien für zukünftige Behandlungskonzepte bedeutsam sind (Kabaria et al., 2016). Diese Dissertation hat zum Ziel, die Prävalenz und prognostische Bedeutung des immunhistochemischen Markers „Enhancer of Zeste Homolog 2“ (EZH2) bei den verschiedenen Entitäten der malignen Nierentumoren zu klären.

1.1 Epidemiologie

Die klinische Relevanz der Nierenkarzinome wird in den epidemiologischen Kennzahlen deutlich. Für das Jahr 2018 prognostizierte das Robert-Koch-Institut 15100 Neuerkrankungen in Deutschland, womit es nach dem Prostata- und Urothelkarzinom der Harnblase die dritthäufigste maligne Entität des urogenitalen Systems darstellt (Robert-Koch-Institut, 2017). In den letzten Dekaden ist die Inzidenz stetig angestiegen. Dies wird überwiegend mit der Verfügbarkeit moderner Bildgebungsverfahren, die asymptomatische Läsionen meist zufällig detektieren, aber auch durch den Einfluss modifizierbarer Risikofaktoren erklärt (Kabaria et al., 2016). In der Betrachtung der 5-Jahresprävalenz des Nierenzellkarzinoms im Zeitraum von 1990 bis 2004 zeigte sich eine Verdoppelung bei Männern und ein Anstieg um 50 Prozent (%) bei Frauen. Der geschlechtsspezifische Unterschied ist beim Nierenzellkarzinom besonders deutlich. Vom Nierenzellkarzinom sind Männer doppelt so häufig wie Frauen betroffen. Es steht somit bei der männlichen an siebter und bei weiblichen Bevölkerung an zehnter Stelle der häufigsten Krebserkrankungen. Das mittlere Erkrankungsalter bei Männern ist 68 Jahre und bei Frauen 72 Jahre (Leitlinienprogramm Onkologie (AWMF, 2017). Insbesondere die flächendeckende Nutzung nicht-invasiver radiologischer Methoden wie der Sonographie, Computertomographie (CT) und Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) ermöglicht es, bereits kleine, asymptomatische Läsionen in frühen Tumorstadien zu detektieren, wodurch die Patienten einer potentiell kurativen Therapie zugeführt werden können (Escudier et al., 2016). Die Mortalität wird maßgeblich vom Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung beeinflusst. Die Fünfjahresüberlebensraten haben sich

durch die verbesserten Früherkennungsmethoden zwar verbessert, sinken aber von 92 % im lokalisierten Stadium auf 65 % im nodalpositiven Stadium sowie auf 12 % im (fern-) metastasierten Stadium (Kabaria et al., 2016).

1.2 Ätiologie

Beim Nierenzellkarzinom sind bereits eine Reihe von Risikofaktoren identifiziert worden, wobei generell zwischen nicht-modifizierbaren und modifizierbaren Risikofaktoren unterschieden werden kann. Zu den modifizierbaren Faktoren gehören in erster Linie der inhalative Konsum von Zigaretten, Adipositas und die arterielle Hypertonie. Insbesondere das Rauchen von Zigaretten ist mit einem ungünstigeren Verlauf und fortgeschrittenem Tumorstadium (T3 Stadium, Lymphknotenbefall oder initiale Fernmetastasierung) assoziiert. Dabei erhöht sich das Risiko in Abhängigkeit der Dauer und der kumulativen Dosis des Rauchens (Tsivian et al., 2011). Der durch das Rauchen verursachte oxidative Stress durch freie Radikale erhöht das Entartungsrisiko und führt zu aggressiveren Karzinomen und somit zu einer signifikant schlechteren Prognose (Kabaria et al., 2016).

Ab einem „Body-Mass-Index“ (BMI) $\geq 30\text{kg/m}^2$ erhöht sich das Risiko für die Entstehung der Erkrankung geschlechtsunspezifisch. Diesem Risikofaktor kommt insbesondere durch die steigende Prävalenz in den Industrieländern eine wichtige Rolle zu. Die arterielle Hypertonie kann das Risiko verdreifachen, vorausgesetzt die Hypertonie wird nicht frühzeitig protektiv medikamentös gesenkt (Kabaria et al., 2016, Weikert et al., 2008) .

Zu den nicht-modifizierbaren Faktoren zählen die terminale Niereninsuffizienz, die erworbene zystische Nierendegeneration und die Gruppe der hereditären Tumorsyndrome (Escudier et al., 2016).

Die terminale Niereninsuffizienz kann bei Erkrankten das Risiko vervierfachen. Dabei sind die Ursachen für die Niereninsuffizienz unterschiedlich und umfassen unter anderem die Einnahme von nephrotoxischen Analgetika oder die Belastung mit karzinogenen Stoffen wie Asbest, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Silizium und Kadmium (Kabaria et al., 2016). Die zystischen Nierenerkrankungen, zu denen die autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankungen gehört, sind eher mit bilateralen oder multifokalen Befall der Niere vergesellschaftet. 4 % der Nierenzellkarzinome werden den hereditären Tumorsyndromen zugeordnet, insbesondere zählen hierzu das Von-Hippel-Lindau Syndrom, das Birt-Hogg-Dubé

Syndrom, die hereditäre Leiomyomatose und Nierenzellkarzinom, das hereditäre-papilläre Nierenzellkarzinom und der tuberöse Sklerose-Komplex (Leitlinienprogramm Onkologie (AWMF, 2017).

1.3 Symptome und Diagnostik

Die klassische Symptomtrias schmerzlose Hämaturie, Flankenschmerz und palpabler abdomineller Tumor als Leitsymptom für die Diagnose eines Nierenzellkarzinoms besitzt heute kaum noch Gültigkeit. Die meisten Nierenzellkarzinome werden im Rahmen von bildgebenden Untersuchungen bei theoretisch nierengesunden Patienten zufallsbefundlich entdeckt. Dementsprechend ist in den letzten Jahren ein Rückgang der durchschnittlichen Tumorgöße bei Diagnosestellung zu vermerken und es bestehen häufiger zum Zeitpunkt der Diagnose lokalisierte Frühstadien (Leitlinienprogramm Onkologie (AWMF, 2017). Wird die Tumorerkrankung nicht frühzeitig detektiert, bleibt ein Großteil der Patienten bis zum Erreichen eines fortgeschrittenen Tumorstadiums beschwerdefrei. Im Rahmen von paraneoplastischen Syndromen treten in circa 30 % der Fälle eine Erythrozytose, Hyperkalzämie oder Fieber unklaren Ursprungs auf. Es sollte diagnostisch eine laborchemische Blutuntersuchung mit Bestimmung des Serumkreatinins, Hämoglobins, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Verhältnis der Lymphozyten zu neutrophilen Granulozyten, Laktatdehydrogenase, c-reaktives Protein (CRP) und Serumkalziums erfolgen. Ergänzend sollte ein Gerinnungsstatus erhoben werden und eine Urinanalyse durchgeführt werden. Eine Bildgebung mittels Sonographie, CT oder MRT hinsichtlich der Therapieplanung werden empfohlen. Eine Nierenzintigrafie kann in Einzelfällen bei auffälligem Serumkreatinin, suspekter glomerulärer Filtrationsrate, Einzelniere oder im Falle bilateraler Läsionen zur Bestimmung der seitengetrenten Nierenfunktionstestung durchgeführt werden (Ljungberg et al., 2015).)

1.4 Pathologie

Die Typisierung und Graduierung von Nierenzellkarzinomen wurde in den letzten Jahrzehnten weiterentwickelt. Bereits 1982 konnte das Fuhrman-Graduierungssystem prognostische Aussagen bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen demonstrieren. Definiert wurden vier Grade nukleärer Veränderungen unter Berücksichtigung der Größe des Zellkerns sowie der Anwesenheit und Größe von

Nukleoli (Fuhrman et al., 1982). Eine Erweiterung erfolgte 1986 durch Thoenes et al., indem die Einteilung auch andere Entitäten anhand zytologischer, histologischer und nukleärer Atypien berücksichtigt (Thoenes et al., 1986). Durch die Entdeckung und Beschreibung neuer Entitäten mit unterschiedlichen klinischen, histopathologischen und genetischen Veränderungen wurde im Jahr 2012 von der „International Society of Urological Pathology“ (ISUP) ein angepasstes Graduierungssystem eingeführt, welches auch als „2012 ISUP Vancouver classification“ geführt wird (Hes, 2014). Es orientiert sich zur Einstufung an vier Grade der nukleären Veränderungen des Tumors. Als Nachfolger der Einteilung nach Fuhrmann gilt die ISUP Graduierung allerdings nur für das klarzellige und papilläre Nierenzellkarzinom, sodass im Jahr 2016 die Weltgesundheitsorganisation (engl. World-Health-Organisation (WHO)) eine neue histologische Klassifikation entwickelt hat, die Histologie, chromosomale Aberrationen und molekulare Signalwege einer Vielzahl auch neu definierter Tumore berücksichtigt (Moch, 2016).

Nach wie vor sind die häufigsten Tumorarten das klarzellige Nierenzellkarzinom (circa 70 %), das papilläre Nierenzellkarzinom (15 %) und das chromophobe Nierenzellkarzinom (5 %) (Doehn et al., 2016).

Das klarzellige Nierenzellkarzinom entsteht aus entarteten Zellen des proximalen Tubulus und ist typischerweise ein solider Tumor mit heller, gelbbrauner Schnittfläche, welcher stark vaskularisiert ist. Insbesondere finden sich Deletionen auf Chromosom 3p und in 75 % der Fälle kann eine Mutation des von-Hippel-Lindau-Gens (VHL) nachgewiesen werden (Hes, 2014, Reuter und Tickoo, 2010).

Das papilläre Nierenzellkarzinom wird in den (basophilen) Typ 1 und den (eosinophilen) Typ 2 eingeteilt, welche sich makroskopisch nicht unterscheiden lassen aber in Bezug auf ihre genetischen Veränderungen und der klinischen Präsentation verschieden sind. Das papilläre Nierenzellkarzinom weist im lokalisierten Stadium eine günstigere Prognose als das klarzellige Nierenzellkarzinom auf. Das papilläre Nierenzellkarzinom vom Typ 1 hat im Vergleich zu Typ 2 eine bessere Prognose. Wie auch das klarzellige Nierenzellkarzinom entsteht das papilläre Nierenzellkarzinom aus den Zellen des proximalen Tubulus der Niere (Hes, 2014).

Zur Gruppe der chromophoben Nierenzellkarzinome zählt die WHO Klassifikation 2016 das klassische, das eosinophile chromophobe Nierenzellkarzinom und einen im Rahmen des Birt-Hogg-Dubé Syndroms auftretenden Hybridtumor. Aufgrund der großen und pleomorphen Zellkerne, sollte das ISUP Grading für chromophobe

Nierenzellkarzinome nicht angewendet werden. Die chromophoben Nierenzellkarzinome weisen pathophysiologisch eine Hochregulation der KIT-Onkogene der Zellmembran auf. In der neuen 2016 WHO Klassifikation werden sogenannte „hybrid oncocytic/ chromophobe tumors“ beschrieben, die über morphologische Kriterien des chromophoben Nierenzellkarzinoms und des Onkozytoms verfügen (Srigley et al., 2013). Die Ursprungszellen des chromophoben Nierenzellkarzinoms sind die Verbindungszellen der Sammelrohre. Im Vergleich zu den oben genannten Nierenzellkarzinomen hat das chromophobe Nierenzellkarzinom eine günstigere Prognose, wobei negative prognostische Faktoren wie der pT-, pN-, M-Status, das Vorliegen sarkomatoider Veränderungen, Nekrosen oder Gefäßinvasion zu berücksichtigen sind (Hes 2014).

Während diese Tumorarten Pathologen und Klinikern geläufig sind, gibt es eine Vielzahl weiterer, teilweise neu definierter Tumorentitäten, welche teilweise erst in den letzten Jahren mit in die Klassifikation der Nierentumoren aufgenommen wurden. Dazu gehören das klarzellige-tubulo-papilläre Nierenzellkarzinom, die multilokulär-zystische-Nierenzellneoplasie von niedrigem Malignitätspotential (vormals multilokuläres-zystisches Nierenzellkarzinom), das Nierenzellkarzinom assoziiert mit erworbener zystischer Nierenerkrankung, das undifferenzierte Karzinom, das sarkomatoide Nierenzellkarzinom, das Xp11.2 Translokationsnierenzellkarzinom, das Sammelrohrkarzinom, das muzinös-tubuläre Spindelzellkarzinom und das tubulär-zystische Nierenzellkarzinom. Darüber hinaus werden unklassifizierte Nierenzellkarzinome (engl. non-other-specified (NOS)) definiert als Karzinome, welche sich keiner der oben genannten Kategorien einteilen lassen (Moch, 2016). Eine ausführliche Auflistung der durch die WHO definierten Nierentumore findet sich in Tabelle 1.

Neben den erwähnten malignen Tumoren werden auch andere Tumorarten gelegentlich bei der Entfernung von Nierentumoren diagnostiziert, wie das gutartige Onkozytom, das Nephroblastom (ein Tumor, der vor allem bei Kindern aber seltenerweise auch bei Erwachsenen diagnostiziert wird), metanephrogene Adenome oder auch Angiomyolipome. Eine weitere Differentialdiagnose bei der Entfernung von Nierentumoren ist das Urothelkarzinom und Metastasen anderer Primärtumoren (Hes, 2014).

	<p>Multikuläre zystische Neoplasie mit niedrigem Malignitätspotenzial</p> <p>Papilläres Nierenzellkarzinom</p> <p>Hereditäre-Leiomyomatose- und Nierenzellkarzinom-assoziiertes Nierenzellkarzinom</p> <p>Chromophobes Nierenzellkarzinom</p> <p>Sammelrohrkarzinom</p> <p>Medulläres Karzinom der Niere</p> <p>MiT-Familie der Translokationskarzinome</p> <p>Succinat-Dehydrogenase-defizientes Nierenzellkarzinom</p> <p>Muzinöses tubuläres und spindelzelliges Karzinom</p> <p>Erworbene Zystennieren-assoziiertes Nierenzellkarzinom</p> <p>Klarzelliges papilläres Nierenzellkarzinom</p> <p>Nierenkarzinom, nicht klassifiziert</p> <p>Papilläres Adenom</p> <p>Onkozytom</p>
Metanephrische Tumoren	<p>Metanephrisches Adenom</p> <p>Metanephrisches Adenofibrom</p> <p>Metanephrischer Stromatumor</p>
Nephroblastische und zystische Tumoren im Kindesalter	<p>Nephrogene Reste</p> <p>Nephroblastom</p> <p>Zystisches partiell differenziertes Nephroblastom</p> <p>Pädiatrisches zystisches Nephrom</p>
Mesenchymale Tumoren	<p><i>Hauptsächlich im Kindesalter:</i></p> <p>Klarzellsarkom</p> <p>Rhabdoidtumor</p> <p>Kongenitales mesoblastisches Nephrom</p> <p>Ossifizierender Nierentumor des Kindesalters</p> <p><i>Hauptsächlich bei Erwachsenen:</i></p> <p>Leiomyosarkom</p> <p>Angiosarkom</p> <p>Rhabdomyosarkom</p> <p>Osteosarkom</p> <p>Synoviales Sarkom</p> <p>Ewing-Sarkom</p> <p>Angiomyolipom</p> <p>Epitheloides Angiomyolipom</p> <p>Leiomyom</p> <p>Hämangiom</p> <p>Lymphangiom</p> <p>Hämangioblastom</p> <p>Juxtaglomerulärer Tumor</p> <p>Renomedullärer interstitieller Tumor</p> <p>Solitärer fibröser Tumor</p>
Gemischte Epithel- und Stromatumorfamilie	<p>Adultes zystisches Nephrom</p> <p>Gemischter Epithel- und Stromatumor</p>
Neuroendokrine Tumoren	<p>Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor</p> <p>Großzelliges neuroendokrines Karzinom</p> <p>Kleinzelliges neuroendokrines Karzinom</p> <p>Paragangliom</p>
Verschiedene Tumoren	<p>Hämatopoetische Tumoren der Niere</p> <p>Keimzelltumoren</p>

Metastasen

Tabelle 1: WHO Klassifikation der Nierentumore (angepasst nach (Moch, 2016))

Die histopathologische Untersuchung erlaubt in circa 80 % eine einfache und klare Einteilung der Nierentumoren, in 20 % muss aber bei teilweise überlappenden morphologischen Befunden zur Tumoreinteilung eine Zusatzuntersuchung erfolgen, meistens durch eine Kombination von immunohistochemischen Untersuchungen. Die exakte Klassifikation der Nierentumore ist für die Planung einer systemischen Therapie nötig, die nur bei bestimmten histologischen Tumortypen zur Anwendung kommen können, beziehungsweise für diese zugelassen sind. Bei einigen Karzinomarten bestimmt der Pathologe zusätzlich den Differenzierungsgrad. Dies kann nach der Methode von Fuhrmann, Thoenes oder nach der ISUP Klassifikation erfolgen (Hes, 2014). In der Vancouver Konferenz der ISUP wurde beschlossen, eine vereinfachte Klassifikation anhand nukleärer Veränderungen (Tabelle 2) einzuführen, die die Gradierung nach Fuhrmann abgelöst hat (Ljungberg et al., 2015, Srigley et al., 2013).

Grad	Beschreibung
Grad 1	Nucleoli sind abwesend oder unauffällig und bei einer Vergrößerung x400 mit basophiler Anfärbung
Grad 2	Nucleoli sind auffällig mit eosinophiler Anfärbung bei einer Vergrößerung x400 und sichtbar aber nicht prominent bei einer Vergrößerung x100
Grad 3	Nucleoli sind auffällig und eosinophil bei einer Vergrößerung x100
Grad 4	Starke nukleäre Pleomorphie mit mehrkernigen Riesenzellen und/ oder rhabdoider und/oder sarkomatoider Differenzierung

Tabelle 2: World Health Organization/ International Society of Urological Pathology (ISUP) Graduierungssystem für klarzellige und papilläre Nierenzellkarzinome (Moch, 2016)

Für alle Gradierungssysteme gilt, dass die Prognose mit steigendem Malignitätsgrad umso ungünstiger wird. Die Stadieneinteilung von Nierentumoren unterliegt wie auch die Bestimmung des Lymphknotenstatus den Regeln der Tumor-Nodus-Metastasen-Klassifikation (TNM) (Ljungberg et al., 2015, Escudier et al., 2016). Die Kriterien für die Bestimmung des pT Stadiums und für die Bestimmung des pN Stadiums sind in Tabelle 3 dargestellt.

T- Stadium des Primärtumors	
Tx	Keine Aussage über den Primärtumor möglich
T0	Kein Nachweis eines Primärtumors
T1	Tumorausdehnung ≤ 7 cm im größten Durchmesser und auf Niere beschränkt T1a: Tumorausdehnung ≤ 4 cm T1b: Tumorausdehnung > 4 cm aber ≤ 7 cm
T2	Tumorausdehnung > 7 cm im größten Durchmesser und auf Niere beschränkt T2a: Tumorausdehnung >7 cm aber < 10 cm T2b: Tumorausdehnung > 10 cm auf die Niere beschränkt
T3	Tumorausdehnung in große Venen oder umliegendes Gewebe aber kein Befall der Nebenniere oder über die Gerota-Faszie hinaus T3a: Tumorausdehnung in Nierenvene, Invasion in perirenales und/ oder Nierenmark aber nicht über die Gerota-Faszie hinaus T3b: Tumorausdehnung in Vena Cava unterhalb des Diaphragmas T3c: Tumorausdehnung in die Vena Cava oberhalb des Diaphragmas oder in die Gefäßwand
T4	Tumorausdehnung über die Gerota-Faszie hinaus, einschließlich kontinuierlicher Ausbreitung in ipsilaterale Nebenniere
N- regionale Lymphknoten	
NX	Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine Lymphknotenmetastasierung
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasierung
N2	Mehr als ein Lymphknoten befallen
M- Fernmetastasierung	
cM0	Klinisch keine Fernmetastasen
cM1	Klinische Fernmetastasen
pM1	Pathologisch bestätigte Fernmetastasierung, zum Beispiel durch Biopsie
TNM Stadium Einteilung	
Stadium I	T1 N0 M0
Stadium II	T2 N0 M0
Stadium III	T3 N0 M0 T1,2,3 N1 M0
Stadium IV	T4 jedes N M0 Jedes T jedes N M1

Tabelle 3: TNM-Klassifikation für Nierenzellkarzinome nach American-Joint-Committee-on-Cancer (AJCC) (angepasst nach (Escudier et al., 2016))

Differenzierungsgrad, pT und pN Stadium sind statistisch signifikant mit der Patientenprognose assoziiert, doch ist die Prognose im Einzelfall schwierig vorauszusagen. Metastasen, insbesondere Spätmetastasen (Aufreten nach 5, 10 oder mehr Jahren), sind auch bei Grad 1 Tumoren, beziehungsweise pT1 bis T2, möglich. Auch bei Grad 3 oder pT3 Karzinomen kommen durch die chirurgische Therapie erzielbare Heilungen vor (Escudier et al., 2016).

1.5 Therapie

Die Therapie der Wahl ist zumindest bei fehlendem Nachweis einer ausgedehnten Fernmetastasierung die Nephrektomie, wobei im lokalisierten Stadium und in Abhängigkeit der Tumorgöße stets eine partielle organerhaltende Nephrektomie angestrebt werden sollte. Für den Fall, dass eine operative Entfernung nicht möglich ist, können kortikal gelegene Tumore mit einem Durchmesser < 3 cm auch mittels minimalinvasiver ablativer Verfahren wie Radiofrequenzablation oder Kryoablation therapiert werden (Escudier et al., 2016).

Im lokal-fortgeschrittenem Stadium (T3 und T4) ist die radikale Nephrektomie die Therapie der Wahl. Eine Lymphadenektomie und Nebennierenresektion sollte bei gegebenem klinischen Verdacht oder radiologischen Nachweis in entsprechendem Ausmaß durchgeführt werden (Escudier et al., 2016).

Die entnommenen Nephrektomiepräparate werden dann in Pathologie-Instituten zur Festlegung vom histologischen Tumortyp, Tumorstadium, Differenzierungsgrad und Resektionsstatus untersucht und im Falle von entnommenen Lymphknoten wird der Nodalstatus bestimmt. Die Schwierigkeiten bei der individuellen Bestimmung der Patientenprognose sind beim Nierenzellkarzinom deswegen ein großes Problem, weil in den letzten Jahren immer mehr neue therapeutische Optionen eingeführt wurden, die es erlauben, fortgeschrittene und metastasierende Nierenzellkarzinome effizient zu behandeln. Insbesondere durch die Entwicklung zielgerichteter Therapien (engl. targeted-therapy) wurden die Therapiemöglichkeiten für neoadjuvante und adjuvante Konzepte erweitert. Sie zeigten im Vergleich zur Zytokin-basierten Immuntherapie mit Interleukin-2 und Interferon-alpha verbesserte Überlebenszeiten (Doehn et al., 2016). Der Erfolg dieser Therapien beim sehr fortgeschrittenen Karzinom spricht dafür, dass die gleichen Medikamente zumindest bei bestimmten Patienten in einem frühen Erkrankungsstadium auch adjuvant gegeben werden könnten. Dies ist von Bedeutung, denn theoretisch sollte eine systemische Therapie, insbesondere dann kurativ sein, wenn die Tumormasse im Patienten so gering ist, dass die Tumorzellen durch die Therapie tatsächlich komplett eradiziert werden, bevor eine molekulare Progression eintreten kann, die eine Resistenz der Tumorzellen induziert. Eine Therapie, die beim metastasierten Nierenzellkarzinom für Monate oder Jahre zu einer teil- oder kompletten Remission führt, könnte somit bei einem Karzinom, welche nur minimale, klinisch noch nicht erkennbare Metastasen erzeugt hat, zu einer Heilung führen. Angesichts der doch signifikanten Nebenwirkungsrate der vorhandenen Therapien

und der schwierig vorhersehbaren Prognose, bestehenden Schwierigkeiten die richtigen Patienten für eine adjuvante Therapie auszuwählen. Deswegen sind regelmäßige Kontrollen im Rahmen der Nachsorge von entscheidender Bedeutung und eine adjuvante Therapie beim lokalisierten Nierenzellkarzinom bisher nur in Ausnahmefällen beziehungsweise in Studien durchzuführen (Escudier et al., 2016, Leitlinienprogramm Onkologie (AWMF, 2017). Einzig in der laufenden Phase 3 Studie S-TRAC (ClinicalTrials Nummer NCT00375674) konnte für eine adjuvante Therapie mit Sunitinib im Vergleich zu Placebo in der Subgruppe der lokalisierten Tumore mit hohem Rezidiv-Risiko ein Vorteil hinsichtlich des Krankheits-freien Überlebens gezeigt werden (Motzer et al., 2018).

1.6 Prognosemarker

Die klassischen, klinischen und pathologischen Prognoseparameter wie TNM-Status und Differenzierungsgrad haben zwar statistisch signifikante prognostische Bedeutung, sind aber zu wenig aussagekräftig um Entscheidungen zwischen den unterschiedlichen Therapien zu rechtfertigen. Heute besteht die Hoffnung, dass ein besseres Verständnis der molekularen Beschaffenheit der Tumoren letztlich dazu führen wird, dass die Prognose von Nierenzellkarzinomen in Zukunft besser bestimmt werden kann. Die Fortschritte der molekularen Untersuchungstechniken haben in letzten 20 Jahren zu einer erheblichen Zunahme unseres Verständnisses der molekularen Veränderungen in Nierenzellkarzinomen geführt. So konnten einige interessante, potentiell Prognose relevante molekulare Marker anhand von Genexpressionsprofilen oder durch Genom-Sequenzierungen identifiziert werden (Ngo et al., 2014). Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist allerdings kein spezifischer prädiktiver molekularer Marker routinemäßig im klinischen Einsatz. Es wird davon ausgegangen, dass molekulare Analysen in Zukunft einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn für die Einschätzung des individuellen Risikos liefern werden (Ljungberg et al., 2015, Leitlinienprogramm Onkologie (AWMF, 2017). Insbesondere die in den letzten Jahren verfügbarer gewordene Technik der sogenannten Sequenzierung der nächsten Generation (engl. next-generation-sequencing (NGS)) hat dazu geführt, dass mittlerweile die beim Nierenzellkarzinom vorkommenden genomischen und epigenetischen Veränderungen weitgehend bekannt sind. Die Gesamtheit dieser Studien hat gezeigt, dass Nierenzellkarzinome häufig chromosomale Aberrationen aufweisen, wie zum Beispiel eine 3p-Deletion (typischerweise mit assoziierter VHL-

Mutation), welche vor allem beim klarzelligen Nierenzellkarzinom auftritt. Weiter finden sich Trisomien der Chromosomen 7 und 17 beim papillären Nierenzellkarzinom, während das chromophobe Nierenzellkarzinom durch eine größere Anzahl von Chromosomenverlusten gekennzeichnet ist. Die systematische Suche nach Mutationen von tumorassoziierten Genen, zum Beispiel im Rahmen des „International-Cancer-Genome-Consortium“ oder des TCGA („The-Cancer-Genome-Atlas“) haben gezeigt, dass die Gene, deren Mutation neben VHL-Gen-Mutationen den stärksten Einfluss beim klarzelligen Nierenzellkarzinom haben, durch Mutationen in Chromatinmodellierenden Genen wie PBRM1 (polybromo 1), SETD2 (SET domain containing 2), TTN (Titin), BAP1 (BRCA 1 associated protein 1) und LRP2 (low density lipoprotein receptor-related protein 2) hervorgerufen werden (Escudier et al., 2016, International-Cancer-Genome-Consortium, 2018).

Nachdem die meisten beim Nierenzellkarzinom vorkommenden genetischen, epigenetischen und RNA-Expressions-relevanten Veränderungen beim Nierenzellkarzinom wahrscheinlich bekannt sind, ist die klinische Bedeutung dieser Veränderungen weniger klar, da ein Mangel an Tumorkollektiven besteht, welche für die Untersuchung potentiell relevanter molekularer Marker zur Verfügung stehen. Darüber hinaus wurde die Untersuchung von zahlreichen Tumoren auf die Veränderung eines bestimmten Gens durch die Entwicklung der sogenannten Gewebemikroarray-Technik (engl. Tissue-Micro-Array (TMA)) erleichtert. Sie stellt eine effiziente und standardisierte Methode dar und ermöglicht eine gleichzeitige Untersuchung von bis zu 1000 Tumorproben auf einem einzigen Objektträger (Sauter et al., 2003).

1.7 Enhancer von Zeste Homolog 2

Die humane genetische Information ist durch die Sequenz von Basenpaaren in der Desoxyribonucleinsäure (DNA) kodiert. Der DNA-Strang windet sich als linksgängige Helix zum Schutz und zur Komprimierung um Histonkomplexe, die als Oktamer aus je vier über Doppelbindungen verbundene Untereinheiten (H2A, H2B, H3 und H4) bestehen. Die Einheit aus DNA und Histonoktamer als erste Verpackungsstufe im Zellkern wird als Nukleosom bezeichnet. Die über Verbindungspartikel verbundenen Nukleosomen bilden als nächste Organisationseinheit das Chromatin (McGhee und Felsenfeld, 1980).

In der Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen sind unterschiedliche Mechanismen bekannt. Eine wesentliche Komponente in der Transformation einer Zelle sind Genfunktionsstörungen, die durch direkte Genveränderungen oder fehlregulierte Mechanismen der epigenetischen Kontrolle verursacht werden können. Die Aktivierung sogenannter Onkogene sowie die Inaktivierung sogenannter Tumorsuppressorgene resultiert in unkontrolliertem Zellwachstum und begünstigt die Tumorentstehung. Ursächlich kann eine direkte Veränderung der genetischen Information aufgrund einer abweichenden DNA-Basensequenz, beispielsweise durch Punktmutationen, Deletionen, chromosomale Translokationen oder Amplifikationen, sein (Vogelstein und Kinzler, 2004).

Anstatt einer in der Basensequenz kodierten Veränderung kann auch durch epigenetische Modifikationen die Chromatinarchitektur so verändert werden, dass die Expression von Genen beeinflusst wird. Zu diesen Regulationsmechanismen zählt die Methylierung bestimmter DNA Abschnitte, die RNA-abhängige Genstilllegung (engl. Gene-silencing) und die kovalente Histonmodifikation. Die biochemische Modifikation des Chromatins (engl. Chromatin modelling) an Lysin-Seitenketten der Histone zur Regulierung der Expressionsaktivität erfolgt durch kovalente Methylierung oder Acetylierung. In der Tumorentstehung nimmt insbesondere die Methylierung an Promoter-Regionen der Histonuntereinheiten H3 und H4 durch Inhibierung der Transkription von Tumorsuppressorgenen eine wichtige Rolle ein (Egger et al., 2004). Die Methylierung der Histone wird durch Enzyme der Polycomb Group Proteine katalysiert. Diese gliedern sich in zwei funktionelle Multiproteinkomplexe, den „Polycomb Repressive Complex 1“ (PRC1) und den PRC2. Die durch Methylierung verursachte Konformationsänderung des Chromatins führt zur Hemmung der Transkription (Sauvageau und Sauvageau, 2010).

Ein möglicherweise als molekularer Prognosefaktor beim Nierenzellkarzinom geeigneter Marker ist das Enzym „Enhancer of Zeste Homolog 2“ (EZH2) aus der Gruppe der SET Domän Familie von Lysin Methyltransferasen. Das EZH2-Gen liegt in der genomischen Kartierung auf Position 7q36.1 (The-Human-Protein-Atlas, 2018). Zusammen mit „zinc finger protein suppressor of zeste 12“ (SUZ12), „WD40-repeat protein embryonic ectoderm development“ (EED) und „Retinoblastoma-Binding Protein“ (RbAp46/48) bildet EZH2 die katalytische Einheit des PRC2. Hier fungiert EZH2 als enzymatisch aktive Untereinheit, die die Übertragung von Methylgruppen vom Kofaktor S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) an Lysin 27 des Histons 3 (H3K27)

katalysiert. In der Folge kommt es durch die epigenetische Veränderung zur Transkriptionshemmung, Chromatinkondensation und damit zur Gen-Inaktivierung (Sauvageau und Sauvageau, 2010). Diese Genrepression beeinflusst insbesondere Gene der Zelldifferenzierung und Zellteilung, hierzu zählen auch Gene der HOX-Gruppe (Bracken et al., 2006).

EZH2 verfügt somit über eine Zellzyklus-regulierende Funktion und beeinflusst direkt den Mechanismus zur transkriptionellen Kontrolle von Krebs-assoziierten Genen wie beispielsweise den Genen des Zelladhäsionsproteins E-Cadherin oder des Zellzyklus-regulierendem Proteins p16 (Kim und Roberts, 2016, Melling et al., 2015). Hereditäre Mutationen des EZH2 Gens stehen im Zusammenhang mit dem „Weaver-Syndrom“ (Gibson et al., 2012) und der Ataxia teleangiectatica (Li et al., 2013).

Die Regulation der EZH2-Aktivität unterliegt auf transkriptioneller, post-transkriptioneller und post-translationaler Ebene dem Einfluss unterschiedlicher Faktoren. Als Beispiel der vorgeschalteten transkriptionellen Kontrolle konnte gezeigt werden, dass MALAT1 aus der Gruppe der „long-non-coding-ribo-nucleic-acid“ (lncRNA) Einfluss auf die EZH2-Aktivität nimmt (Hirata et al., 2015). Weitere Modulatoren mit regulatorischen Einfluss auf das EZH2 Transkript sind die mikro-RNAs miR-26a und miR-101 (Chang und Hung, 2012, Sakurai et al., 2012). Die Proteine des PcG beeinflussen sich gegenseitig. Beispielsweise wurde in klarzelligem Nierenzellkarzinomen mit BAP1-Mutation eine erhöhte EZH2 Expression und damit eine einhergehende schlechtere Prognose beobachtet (Sun et al., 2018).

Das onkogene Potential von EZH2 ist bei zahlreichen Tumorentitäten beschrieben worden, wobei typischerweise im Rahmen von Tumorentstehung oder Progression eine Überexpression von EZH2 beobachtet wird (Simon und Lange, 2008). Dies führt zu vermehrter Zelldifferenzierung, erhöhter Proliferationsrate und genetischen Mutationen. Eine Überexpression ist bereits beim Mammakarzinom, Endometriumkarzinom, Ovarialkarzinom, Harnblasenkarzinom, Pankreaskarzinom, malignem Melanom, Glioblastom, Bronchialkarzinom, Non-Hodgkin Lymphom und T-Zell-Lymphom beschrieben worden (Sauvageau und Sauvageau, 2010, Kim und Roberts, 2016). Bei einigen Tumorarten wurde über eine prognostische Bedeutung der EZH2 Überexpression berichtet, wie zum Beispiel beim Mammakarzinom und Prostatakarzinom (Collett et al., 2006, Melling et al., 2015).

Von besonderem Interesse ist die Beobachtung, dass eine Überexpression von EZH2 unabhängig vom PRC2 zu einer Veränderung von „non-Histon“ Proteinen führen kann und eine Aktivierung Wachstums-induzierender Prozesse begünstigt. Es konnte gezeigt werden, dass EZH2 in Glioblastomen den Transkriptionsfaktor „signal transducer and activator of transcription 3“ (STAT3) und im Prostatakarzinom den Androgenrezeptor (AR) direkt methyliert. Außerdem wurde eine Veränderung des sogenannten „Kinoms“ (hierunter werden Zellzyklus-regulierende Proteinkinasen zusammengefasst) beschrieben (Kim und Roberts, 2016).

Frühere Berichte zu der EZH2 Expression beim Nierenzellkarzinomen sind vielversprechend. Insbesondere beim klarzelligen Nierenzellkarzinom haben verschiedene Arbeitsgruppen angeregt, dass die EZH2 Überexpression ebenfalls klinische Relevanz besitzen könnte und mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium beziehungsweise einer ungünstigen Prognose assoziiert sein könnte (Wagener et al., 2010, Lee und Choe, 2012, Liu et al., 2013). Hinz et al. beschrieben an 119 Patienten, dass hohe EZH2 Expressionsprofile mit einem statistisch signifikant erhöhten Risiko für tumor-assoziierten Tod verbunden waren ($p=0,029$). Wagener et al. untersuchten 520 Patienten und fanden, dass eine hohe nukleäre EZH2 Expression ein unabhängiger Prädiktor für eine ungünstige Prognose bei Patienten mit nicht-metastasiertem Nierenzellkarzinom war. Lee et al. und Liu et al. beschrieben bei 210 und 373 Patienten ebenfalls eine prognostische Relevanz (Lee und Choe, 2012, Liu et al., 2013).

In den letzten Jahren untersuchte eine Reihe von Studien Mechanismen der EZH2 Expression, die auf molekularpathologischer Ebene die erhöhte Aggressivität der Nierenzellkarzinome erklären könnten. Es konnte gezeigt werden, dass die EZH2 Expression mit einer erhöhten Expression des vaskulären Endothelwachstumsfaktors (engl. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)) in klarzelligen Nierenzellkarzinomen und einer niedrigeren Apoptose-Rate assoziiert war ($p<0,001$) (Xu et al., 2015). Weiter führte die EZH2 Expression zu einer epigenetischen Repression des Adhäsionsproteins E-Cadherin, wodurch eine Tumorzellmigration und -invasion begünstigt wird (Liu et al., 2016).

EZH2 ist auch deswegen von Interesse, weil sich die EZH2 Inhibition als möglicher therapeutischer Angriffspunkt im Nierenzellkarzinom eignen könnte. In Studien werden mittlerweile Inhibitoren getestet, die direkt gegen EZH2 gerichtet sind oder den PRC2 an anderer Stelle blockieren. Insbesondere die Entwicklung der EZH2 Inhibitoren

Tazemetostat (National-Cancer-Institute, 2018b) und CPI-1205 (National-Cancer-Institute, 2018a) erscheint vielversprechend und wird in klinischen Studien an unterschiedlichen Entitäten geprüft (Tabelle 4).

National Clinical Trial (NCT) Nummer	Titel	Tumor-Typ	Status
NCT02860286	Study of the EZH2 inhibitor Tazemetostat in Malignant Mesothelioma	Mesotheliom	Phase 2
NCT02601937	A Phase 1 Study of the EZH2 Inhibitor Tazemetostat in Pediatric Subjects With Relapsed or Refractory INI1-Negative Tumors or Synovial Sarcoma	Rhabdoide Tumore, INI1-negative Tumore, synoviale Sarkome, maligne rhabdoide Tumore des Ovars	Phase 1
NCT02601950	A Phase II, Multicenter Study of the EZH2 Inhibitor Tazemetostat in Adult Subjects With INI1-Negative Tumors or Relapsed/Refractory Synovial Sarcoma	Maligne rhabdoide Tumore (MRT), rhabdoide Tumore der Niere, atypische teratoide rhabdoide Tumore (ATRT), rhabdoide Tumore, synoviales Sarkom, INI1-negative Tumore, maligne rhabdoide Tumore des Ovars, medulläres Karzinom der Niere, epitheloides Sarkom, wenig differenziertes Chordom, solide Tumore mit EZH2 Gain-of-function Mutation	Phase 2
NCT03213665	Pediatric MATCH: Tazemetostat in Treating Patients with Relapsed or Refractory Advanced Solid Tumors, Non-Hodgkin Lymphoma, or Histiocytic Disorders With EZH2, SMARCB1, or SMARCA4 Gene Mutations	Fortgeschrittene solide Neoplasien, Ann Arbor Stadium III kindliches Hodgkin Lymphom, Ann Arbor Stadium III kindliches Non-Hodgkin Lymphom, Ann Arbor Stadium IV kindliches Lymphom, •Ann Arbor Stadium IV kindliches Non-Hodgkin Lymphom, Ewing Sarkom, periphere primitive neuroektodermale Tumore, EZH2 GOF, EZH2 Mutation, Histiozytose, Verlust von BRG1 Protein Expression, weitere 39 Entitäten	Phase 2
NCT01897571	Open-Label, Multicenter, Phase 1/2 Study of Tazemetostat (EZH2 Histone Methyl Transferase [HMT] Inhibitor) as a Single Agent in Subjects with Adv. Solid Tumors or With B-cell Lymphomas and Tazemetostat in Combination With Prednisolone in Subjects With DLBCL	B-Zell Lymphome (Phase 1), fortgeschrittene solide Tumore (Phase 1), diffuse-großzelliges B-Zell-Lymphom (Phase 2), follikuläres Lymphom (Phase 2), transformiertes follikuläres Lymphom, primär mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphom	Phase 2
NCT03456726	Study of Tazemetostat in Participants with Relapsed or Refractory B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma With EZH2 Gene Mutation	Rezidivierende oder refraktäre B-Zell Non-Hodgkin Lymphome	Phase 2
NCT02395601	A Study Evaluating CPI-1205 in Patients With B-Cell Lymphomas	B-Zell-Lymphom	Phase 1
NCT03525795	ORION-E: A Study Evaluating CPI-1205 in Patients with Advanced Solid Tumors	Fortgeschrittene solide Tumore: Malignes Melanom, metastasiertes Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, fortgeschrittenes Nierenzellkarzinom, metastasiertes Urothelkarzinom	Phase 1/ 2
NCT03480646	ProSTAR: A Study Evaluating CPI-1205 in Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer	Metastasiertes Kastrations-resistentes Prostatakarzinom (mCRPC)	Phase 1b/ 2

Tabelle 4: Übersicht laufender Studien mit Inhibition von EZH2 auf Clinicaltrials.gov (Status 06.12.2018)

Eine vielversprechende Rolle könnte die Hemmung der EZH2 Überexpression in denjenigen klarzelligem Nierenzellkarzinomen haben, die gegen „Rezeptor-Thyrosinkinase-Inhibitoren“ (RTKI) wie beispielsweise Sunitinib resistent sind. In ihrer Studie konnten (Adelaiye-Ogala et al., 2017) an einem Sunitinib-resistenten Xenograft-Modell für klarzellige Nierenzellkarzinome zeigen, dass eine Modulierung der EZH2 Expression die Phosphorylierung von bestimmten RTKIs hemmt, wodurch der hemmende Effekt von Sunitinib auf das Tumorstadium wiederhergestellt werden konnte. Somit könnte zukünftig ein Ansprechen auf eine EZH2 Hemmung als Indikator für die Anwendung eines RTKI genutzt werden.

1.8 Arbeitshypothese und Fragestellung

Am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) besteht eine große Sammlung von Nierenzellkarzinomen, welche in den letzten Jahren dort untersucht werden konnte. Alle Tumoren wurden kürzlich nach den neu erschienen Kriterien der WHO 2016 Klassifikation von Nierentumoren reklassifiziert, sodass auch die neuen und/ oder seltenen Tumorkategorien in der UKE Tumorsammlung vorkommen. Darüber hinaus sind die Tumoren für eine wissenschaftliche Aufarbeitung so vorbereitet, dass Gewebemikroarrays (engl. Tissue-Micro-Array (TMA)) erstellt werden konnten, welche Gewebeproben von insgesamt 1805 Tumoren beinhalten. Von insgesamt 1498 Patienten dieses Kollektivs waren auch klinische Daten erhoben worden. Die Kombination von nach neuesten Kriterien klassifizierten Tumoren und dem Vorhandensein eines TMAs mit für weitere Untersuchung bereitstehendem Gewebe, erlaubte zwei relevante Fragen zur EZH2 Expression beim Nierenzellkarzinom zu stellen. Diese Fragen sind:

Frage 1: Gibt es Unterschiede in der EZH2 Expression zwischen verschiedenen Subtypen des Nierenzellkarzinoms? Und damit verbunden: Hilft die Untersuchung der EZH2 Expression gegebenenfalls bei der schwierigen Klassifikation von Nierenzellkarzinomen, beziehungsweise charakterisiert die EZH2 Expression möglicherweise eine oder mehrere der neuen/ seltenen Tumorarten?

Frage 2: Ist die EZH2 Expression mit der Prognose von Nierenzellkarzinomen vergesellschaftet? Gibt es möglicherweise in einer relevanten histologischen Kategorie wie zum Beispiel dem klarzelligem oder dem papillären Nierenzellkarzinom eine prognostische Relevanz der EZH2 Expression?

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Zur Verfügung stand eine konsekutive Serie von Nierentumoren von 2289 Patienten, welche zwischen 1994 und 2016 am Institut für Pathologie des UKE untersucht wurden. Alle Tumoren wurden von spezialisierten Pathologen (Dr. Franziska Büschek, Dr. Christoph Fraune) nach den Kriterien der 2016 erschienen WHO-Klassifikation nachbefundet. Von allen Tumoren wurde der histologische Differenzierungsgrad nach Fuhrmann, Thoenes und ISUP bestimmt. Ferner wurden pT, pN, Tumordurchmesser, R-Status und Nodalstatus den zur Verfügung stehenden Akten des Instituts für Pathologie entnommen. Die klinischen und pathologischen Parameter der für die Untersuchung verwendeten Tumoren ist in Tabelle 5 zusammengestellt.

Variablen	Anzahl der Fälle	Variablen	Anzahl der Fälle
Tumorstadium		Grad nach Fuhrmann	
pT1	998	pG1	72
pT2	223	pG2	851
pT3	390	pG3	480
pT4	18	pG4	110
pTx	180	pGx	296
Lymphknotenbefall		Grad nach Thoenes	
N0	232	pG1	497
N1	20	pG2	839
N2	39	pG3	177
Nx	1518	pGx	296
Fernmetastasierung		Follow-up	
M0	220	Lebend	979
M1	148	Verstorben	212
Mx	1441	kein Follow-up	618
		Median (Monate)	48
		Mittelwert (Monate)	61,79

Tabelle 5: Tumor-Eigenschaften und Follow-up Informationen

2.2 Tissue Micro Array

Bei der Herstellung des Gewebemikroarrays wurde von jedem Patienten ein repräsentativer Tumorblock ausgewählt und es wurden auf dem entsprechenden Hämtoxylin-Eosin-Schnitt möglichst nekrosefreie, repräsentative Tumorareale mit Filzstift markiert. Von den entsprechenden Paraffinblöcken wurden mithilfe eines am Institut für Pathologie des UKE hergestellten Gewebearrays ein 0,6mm Zylinder

entnommen und in einen vorgestanzten Paraffinblock eingebracht. Die 1805 in der Studie verwendeten Tumoren wurden auf insgesamt vier TMA-Blöcke, welche 490, 382, 510 und 423 Tumoren enthielten, aufgeteilt. Einer der Blöcke war bereits zu einem früheren Zeitpunkt zusammengestellt worden (Protokoll 22009118). Der Herstellungs-Prozess der Anderen war einheitlich (Protokoll 9662379).

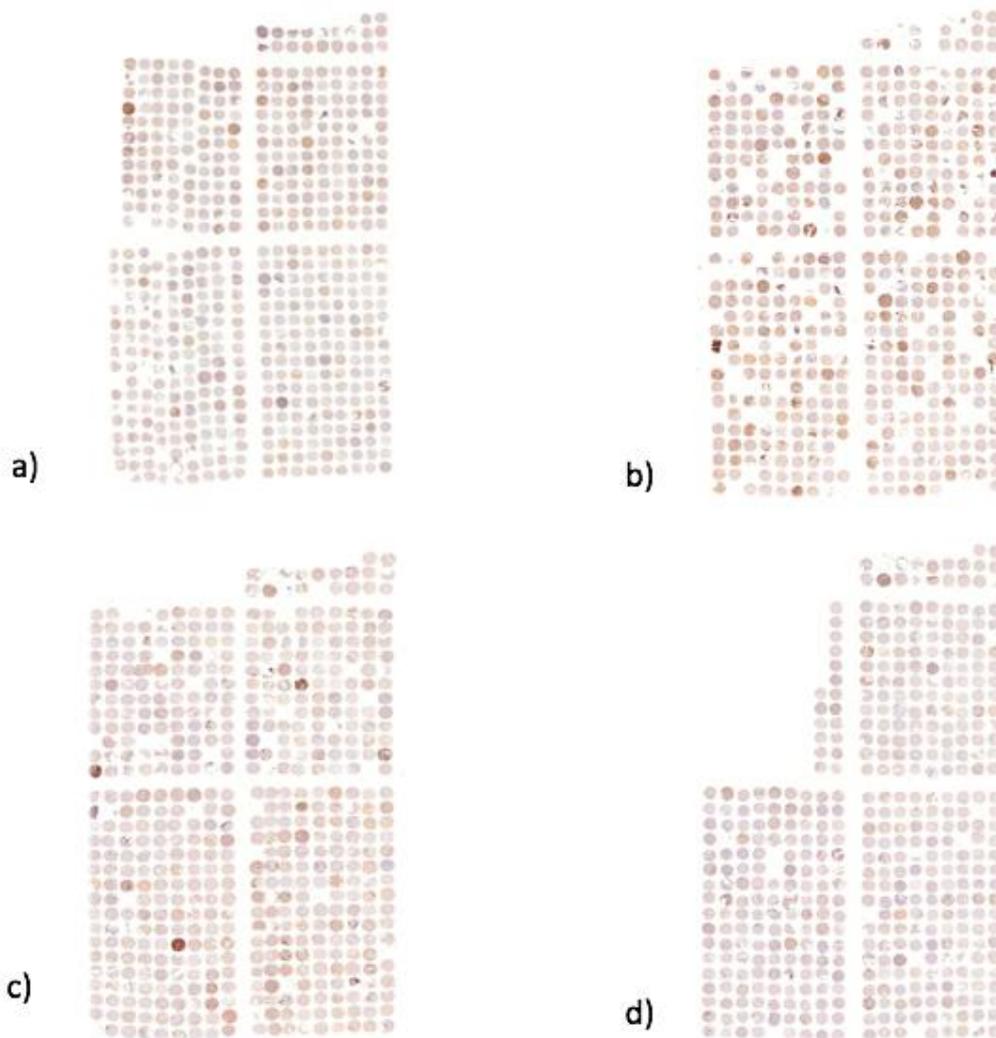


Abbildung 1: Die vier TMA Blocks nach immunohistochemischer Anfärbung gegen humanes EZH2

2.3 Klinische Verlaufsdaten

Von insgesamt 1498 Patienten konnten klinische Verlaufsdaten retrospektiv zusammengestellt werden. Als Quelle hierfür diente hierfür das klinische Dokumentationssystem des Universtitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Zur Erweiterung des Follow-up wurden zudem Patienten telefonisch kontaktiert. Punktuell wurden auch die zuweisenden Ärzte (Krankenhäuser) beziehungsweise die Patienten kontaktiert, um die Verläufe zu klären. Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 61,8

Monate. Tumorprogression wurde zum Zwecke dieser Studie definiert als das erstmalige Auftreten von Metastasen oder Lokalrezidiven bei Patienten, welche initial klinisch metastasefrei waren oder bei einer klinisch nachweisbaren Progression im Falle von Patienten, welche initial bereits Lymphknoten- oder Fernmetastasen hatten.

2.4 Immunohistochemie

Für die immunohistochemische Untersuchung wurden frisch geschnittene TMA Schnitte verwendet, welche an einem Tag und in einem einzigen Experiment gefärbt wurden. Hierfür wurden die Schnitte zunächst deparaffiniert und einer Hitze-induzierten Antigen-Retrieval Prozedur unterworfen. Diese erfolgte für 5 Minuten in einem Autoklaven bei 121° Celsius bei einem pH von 7,8 (pH 7,8 Tris-EDTA-Zitrat Puffer). Als Primärantikörper wurde ein EZH2 spezifischer monoklonaler Kaninchen-Antikörper (Clone SP129, Abnova, Taipeh, Taiwan, Kat. Nr. MAB11028) bei einer Verdünnung von 1:50 verwendet. In vorgeschalteten Versuchen zeigte der Antikörper mit der gewählten Verdünnung eine für die Auswertung geeignete klare nukleäre Färbung ohne Hintergrundfärbung. Anschließend wurden jeweils 150µl Antikörperlösung auf die Schnittpräparate gegeben. Die Antikörperinkubation erfolgte für 60 Minuten bei 37° Celsius. Der gebundene Antikörper wurde dann visualisiert unter Verwendung des EnVision Kit™ (Dako, Glostrup, Dänemark) wie vom Hersteller beschrieben. Die Färbung war überwiegend nukleär, wobei in normalen Nierengewebe typischerweise keine EZH2 Färbung gefunden wurde. Die Färbeintensität wurde für jeden Gewebespot semiquantitativ beurteilt und in negativ (0), schwach positiv (1+), moderat (2+) und stark positiv (3+) eingeteilt. Zudem wurde für jeden Gewebespot der Anteil EZH2-exprimierender (Tumor-) Zellen in Prozent (%) bestimmt. Aus der Intensität und der Fraktion positiver Zellen wurde das IHC-Ergebnis gemäß folgender Kriterien festgelegt.

Negativ: keine sichtbare Färbung

Schwach: 1+ Färbeintensität in $\leq 70\%$ der Tumorzellen oder 2+ in $\leq 30\%$ der Tumorzellen.

Moderat: 1+ Färbeintensität in $> 70\%$ der Tumorzellen oder 2+ in 30-70% der Tumorzellen oder 3+ in $\leq 30\%$ der Tumorzellen.

Stark: 2+ Färbeintensität in $> 70\%$ der Tumorzellen oder 3+ in $> 30\%$ der Tumorzellen.

2.5 Statistik

Für die statistischen Untersuchungen wurde JMP 10.0.2 Software (SAS Institute Inc, NC) verwendet. Für die Untersuchung der Beziehung zwischen der EZH2 Expression und klinisch-pathologischen Variablen wurde ein Chi-Quadrat Test beziehungsweise Kontingenztabelle verwendet. Kaplan-Meier Kurven wurden zur Darstellung der Beziehung zwischen der EZH2 Expression und dem Auftreten von Rezidiven hergestellt. Für alle Patienten wurden die folgenden Endpunkte erfasst: Gesamtüberleben (Fragestellung: Patient lebt oder lebt nicht mehr?), tumorspezifisches Überleben (Fragestellung: Patient ist am Tumor verstorben oder an anderer Ursache verstorben?) und progressionsfreies Überleben (Fragestellung: Progression aufgetreten oder Progression nicht aufgetreten?). Kaplan-Meier Kurven wurden erstellt um die Beziehung zwischen der EZH2 Expression und anderen klinisch-pathologischen Variablen mit dem klinischen Endpunkten darzustellen. Ein log-rank Test wurde dann verwendet um die statistische Signifikanz von Unterschieden im Zusammenhang mit den klinischen Endpunkten zu berechnen.

3 Resultate

3.1 Beziehung zu klassischen Prognosefaktoren

Die Beziehung zwischen den etablierten Prognosefaktoren pT-Stadium, pN-Stadium, pM-Stadium, Fuhrmann-Grad, Thoenes-Grad, ISUP-Grad und dem progressionsfreien Überleben ist in Tabelle 6 für alle Tumoren, in Tabelle 9 für klarzellige Nierenzellkarzinome, in Tabelle 10 für papilläre Nierenzellkarzinome und in Tabelle 11 für chromophobe Nierenzellkarzinome dargestellt. Die Daten zeigen, dass alle diese Parameter beim klarzelligen Nierenzellkarzinom hochsignifikant mit der Patientenprognose assoziiert waren ($p < 0.001$). Während die statistischen p-Werte beim kleineren Kollektiv der papillären Nierenzellkarzinome und insbesondere beim kleinen Kollektiv der chromophoben Karzinome deutlich weniger eindeutig waren. Die Abbildungen zeigen die Beziehung zwischen den klinisch-pathologischen Parametern und dem progressionsfreien Überleben. Prinzipiell waren die Befunde bezüglich Gesamtüberleben und tumorspezifischen Überleben ähnlich aus, werden aber hier nicht dargestellt.

Parameter	Analysierbar (n)	EZH2 Expression				p-Wert
		negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	
ISUP						
1	347	30,26	65,13	4,03	0,58	<0,0001
2	478	26,36	64,02	7,74	1,88	
3	431	15,78	67,29	10,90	6,03	
4	93	16,13	46,24	17,20	20,43	
Fuhrmann						
1	54	38,89	61,11	0,00	0,00	<0,0001
2	759	27,14	65,09	6,32	1,45	
3	440	15,91	66,82	12,05	5,23	
4	105	17,14	48,57	13,33	20,95	
Thoenes						
1	432	29,40	64,81	4,86	0,93	<0,0001
2	759	21,34	65,74	9,62	3,29	
3	167	15,57	55,69	12,57	16,17	
Tumorstadium						
pT1	870	23,33	67,36	7,82	1,49	<0,0001
pT2	204	26,96	60,29	6,37	6,37	
pT3	367	24,80	58,58	8,72	7,90	
pT4	17	17,65	29,41	29,41	23,53	
Lymphknotenstatus						
pN0	216	23,15	66,20	7,87	2,78	<0,0001
pN1	18	11,11	44,44	5,56	38,89	
pN2	35	17,14	45,71	22,86	14,29	
Fernmetastasierung						
pM0	198	22,73	70,20	6,06	1,01	<0,0001
pM1	140	23,57	49,29	11,43	15,71	

Tabelle 6: EZH2 versus Tumorphänotyp (alle Entitäten)

3.2 EZH2 Expression

Die EZH2 Expression konnte bei 1603 von 1805 auf dem TMA vorhandenen Gewebespot erfolgreich untersucht werden (88,8%). Bei 202 von 1805 Karzinomen (11,2%) konnte die Untersuchung nicht durchgeführt werden, da das zur Untersuchung verwendete Gewebestück entweder keinen Tumor aufwies oder an der

entsprechenden Stelle des TMA kein Gewebe nachweisbar war. Von den 1603 untersuchbaren Gewebespots zeigten 1012 (63,1%) eine schwache Expression, 128 (7,9%) eine mäßiggradige Expression und 66 (4,1%) eine starke Expression. Bei 397 von 1603 Tumoren (24,7%) war keine EZH2 Expression nachweisbar. Repräsentative Beispiele mit fehlender, schwacher, mäßig-gradiger und starker Expression sind in Abbildung 2 für klarzellige Nierenzellkarzinome, in Abbildung 3 für papilläre Nierenzellkarzinome und in Abbildung 4 für chromophobe Nierenzellkarzinome dargestellt.

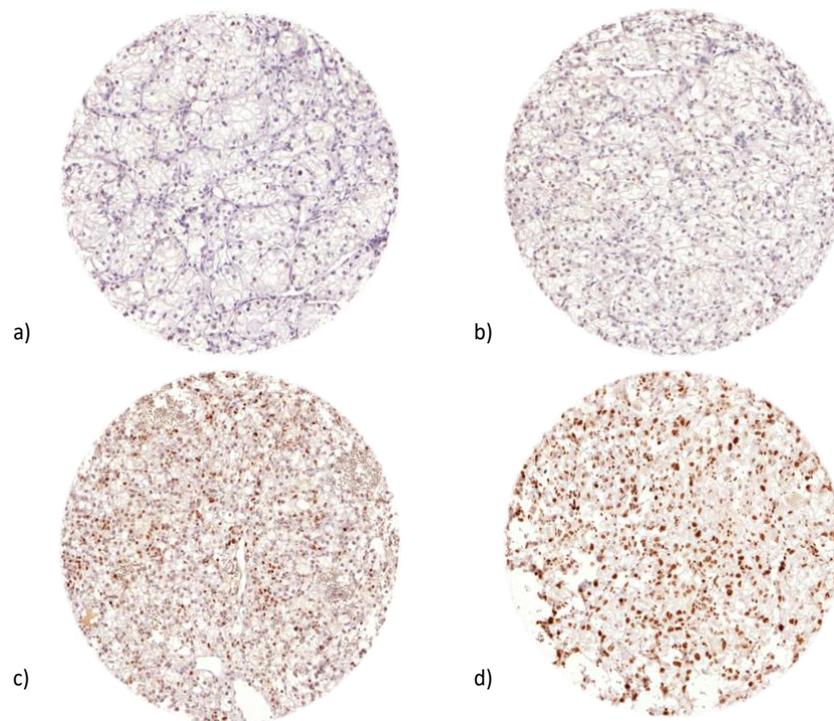


Abbildung 2: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen gegen EZH2 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen in 100x Vergrößerung mit (a) negativer, (b) schwacher, (c) moderater und (d) starker Färbeintensität

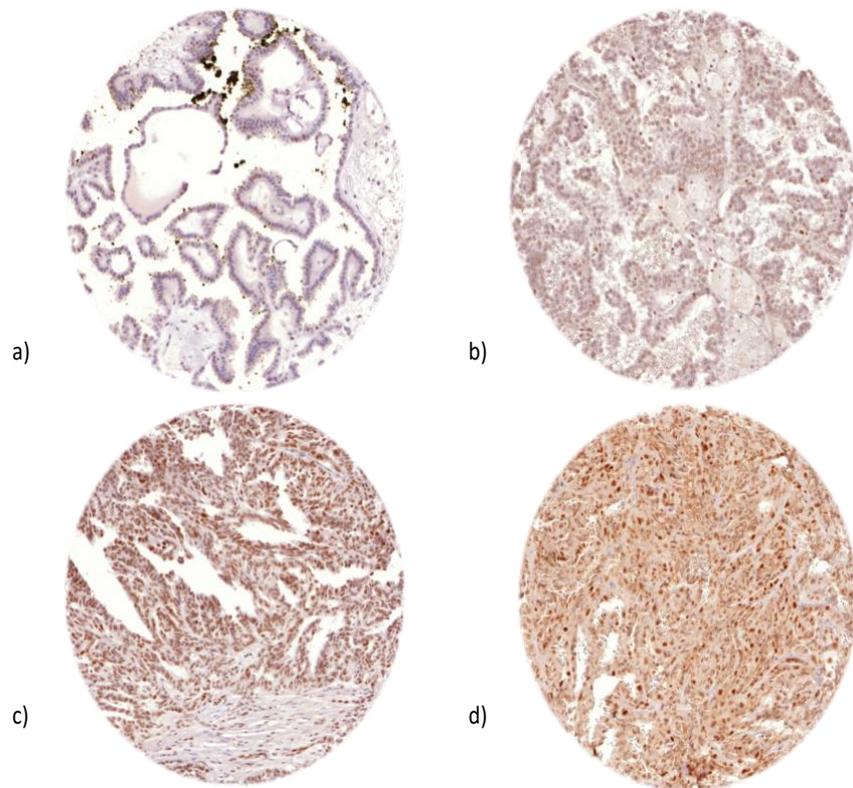


Abbildung 3: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen gegen EZH2 in papillären Nierenzellkarzinomen in 100x Vergrößerung mit (a) negativer, (b) schwacher, (c) moderater und (d) starker Färbeintensität

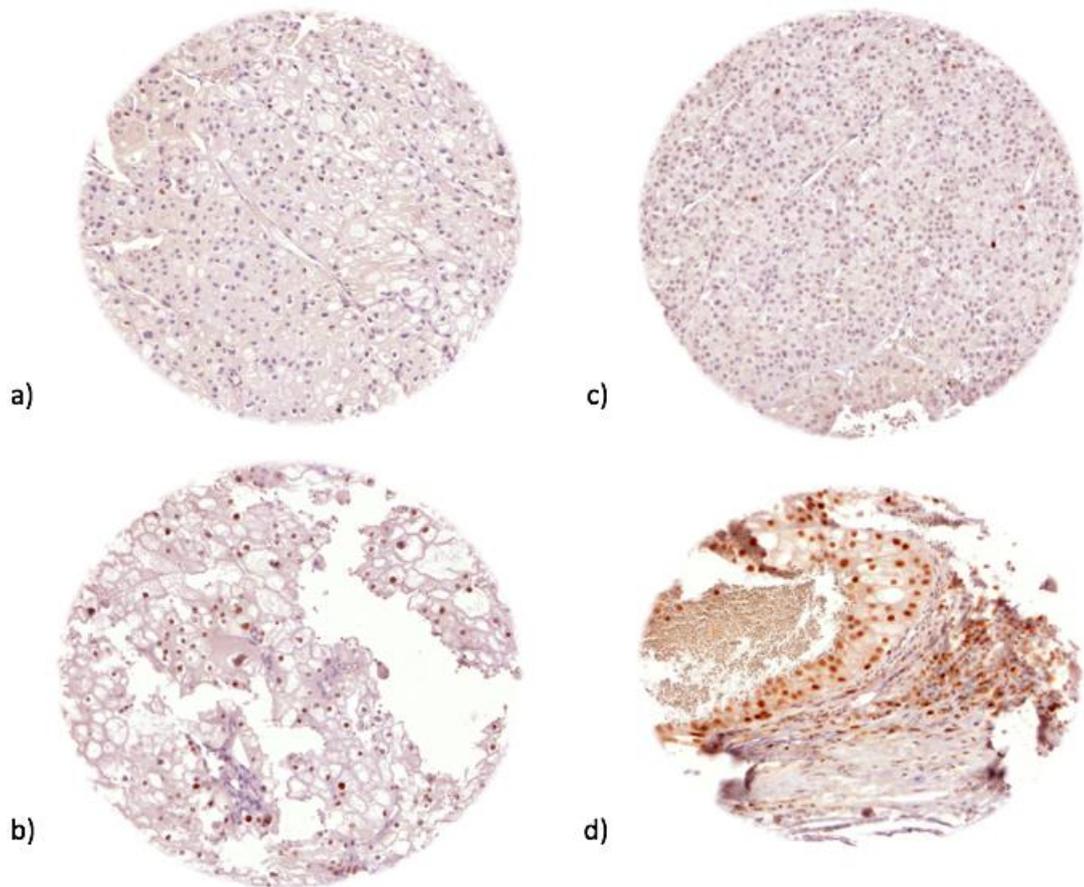
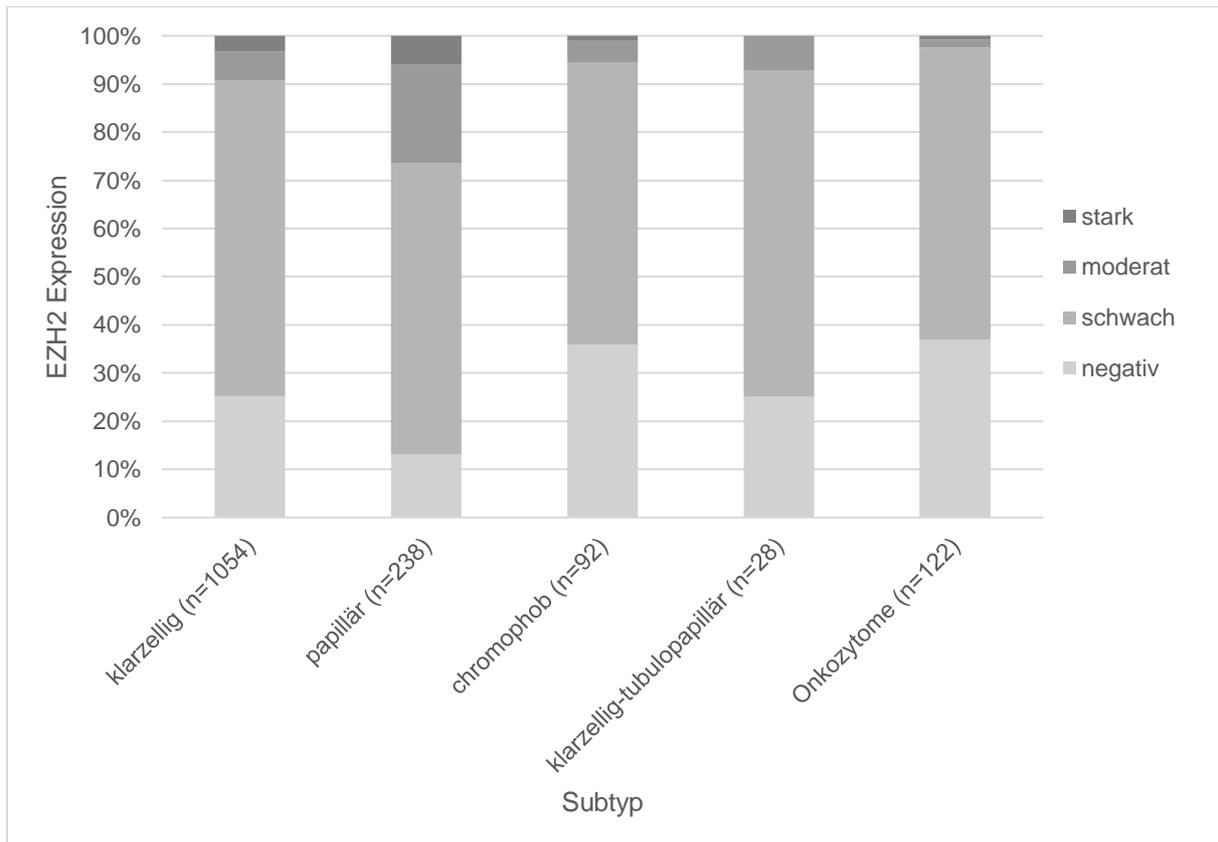


Abbildung 4: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen gegen EZH2 in chromophoben Nierenzellkarzinomen in 100x Vergrößerung mit (a) negativer, (b) schwacher, (c) moderater und (d) starker Färbeintensität

3.3 EZH2 Expression und histologischer Tumorphänotyp



Entitäten	Analysierbar (n)	Negativ (%)	EZH2 Expression		
			Schwach (%)	Moderat (%)	Stark (%)
Klarzelliges Nierenzellkarzinom	1054	25,24	65,56	5,98	3,23
Papilläres Nierenzellkarzinom	238	13,03	60,50	20,59	5,88
Chromophobes Nierenzellkarzinom	92	35,87	58,70	4,35	1,09
Klarzellig-tubulopapilläres Nierenzellkarzinom	28	25,00	67,86	7,14	0,00
Onkozytome	122	36,89	60,66	1,64	0,82

Tabelle 7: EZH2 Expression in den klassischen histologischen Nierentumorentitäten

Die Beziehung zwischen der EZH2 Expression und den klassischen, häufigen Nierentumorentitäten ist in Tabelle 7 dargestellt. Die Darstellung betrifft klarzellige, papilläre, chromophobe und klarzellige-tubulopapilläre Nierenzellkarzinome sowie Onkozytome, als Beispiel für den häufigsten benignen epithelialen Nierentumor. Der Vergleich dieser häufigen Tumorentitäten zeigt, dass die Expressionsunterschiede zwischen den Tumorentitäten gering sind. Auffällig ist, dass papilläre

Nierenzellkarzinome häufiger eine nachweisbare EZH2 Expression aufweisen als die anderen Tumorarten (20,59% moderat, 5,88 % stark).

Entität	Analysierbarer (n)	EZH2 Expression			
		negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)
Nierenzellkarzinom assoziiert mit einer erworbenen zystischen Nierenerkrankung	1,00	0,00	0,00	0,00	100,00
Sammelgang-Karzinom	3,00	0,00	33,33	33,33	33,33
Zystisches Nephrom/ Gemischter epithelialer Stromatumor (MEST)	2,00	50,00	50,00	0,00	0,00
Multilokulärer zystischer Nierenzelltumor mit niedrig malignem Potential	3,00	66,67	33,33	0,00	0,00
Renales medulläres Nierenzellkarzinom	1,00	0,00	100,00	0,00	0,00
Metanephrischer Tumor	4,00	75,00	25,00	0,00	0,00
Muzinöses tubuläres und spindelzelliges Nierenzellkarzinom	1,00	0,00	100,00	0,00	0,00
Nephroblastom	20,00	5,00	35,00	30,00	30,00
Neuroendokrines Karzinom	1,00	0,00	100,00	0,00	0,00
Nierenzellkarzinom, NOS	22,00	22,73	40,91	4,55	31,82
Tubulozystisches Nierenzellkarzinom	1,00	0,00	100,00	0,00	0,00
Xp11-Translokations-Nierenzellkarzinom	10,00	30,00	60,00	0,00	10,00

Tabelle 8: EZH2 Expression in den weiteren histologischen Nierentumorentitäten

Tabelle 8 zeigt die Zusammenstellung der EZH2 Expression bei den selteneren Nierentumorarten. Naturgemäß sind die seltenen Nierenkarzinomtumortypen auch in unserem großen Patientenkollektiv so selten, dass keine großen, statistisch sehr aussagekräftigen Gruppen gebildet werden können. Immerhin zeigt die Zusammenstellung, dass auch bei diesen Tumorarten das Spektrum der EZH2 Expression von negativ bis zu stark positiv geht. Zwar sind 100% der Nierenkarzinome, welche mit einer erworbenen multizystischen Nierenerkrankung assoziiert sind EZH2 positiv, doch handelt es sich hier nur um einen einzigen Fall.

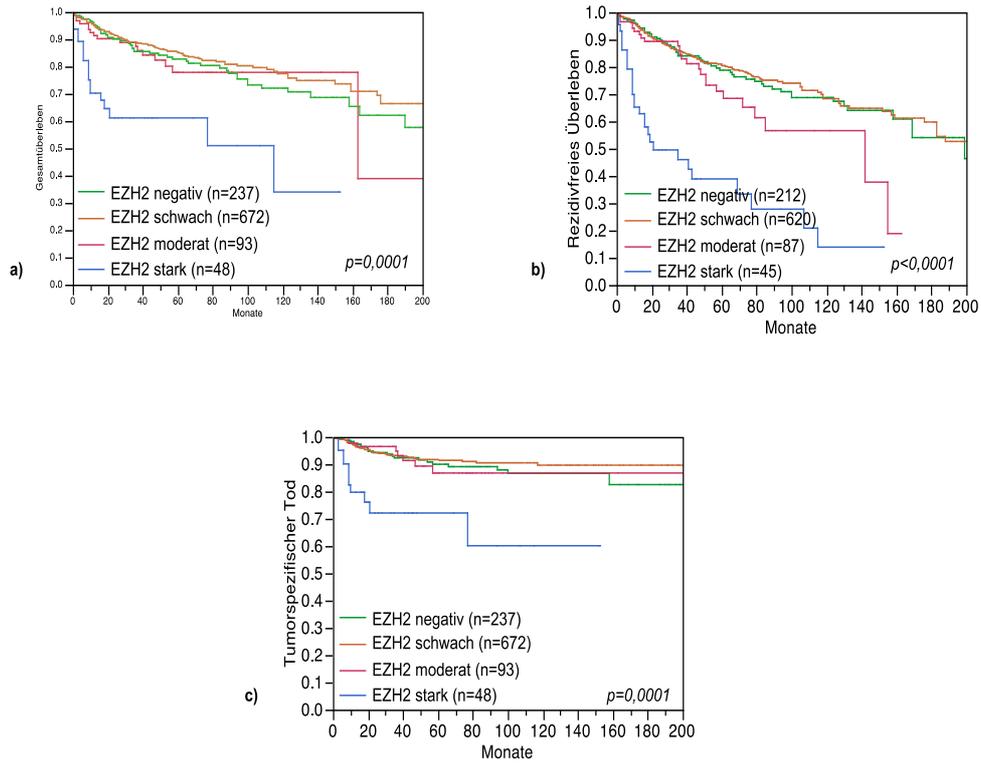


Abbildung 5: Assoziation zwischen EZH2 Expression und **allen Tumorentitäten** des Nierenzellkarzinoms in Bezug auf (a) Gesamtüberleben, (b) rezidivfreien Überleben und (c) tumorspezifischen Tod

3.4 EZH2 Expression und Prognose bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Parameter	Analysierbar (n)	EZH2 Expression				p-Wert
		negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	
ISUP						
1	275	31,27	66,18	1,82	0,73	<0.0001
2	353	30,03	65,72	3,40	0,85	
3	338	17,75	69,23	8,58	4,44	
4	78	16,67	44,87	20,51	17,95	
Fuhrmann						
1	42	35,71	64,29	0,00	0,00	<0.0001
2	574	30,14	66,38	2,61	0,87	
3	348	17,82	68,68	9,77	3,74	
4	89	17,98	48,31	15,73	17,98	
Thoenes						
1	342	30,99	64,91	3,22	0,88	<0.0001
2	572	23,95	68,18	5,59	2,27	
3	139	16,55	56,12	14,39	12,95	
Tumorstadium						
pT1	593	24,45	69,98	4,22	1,35	<0.0001
pT2	134	28,36	63,43	5,22	2,99	
pT3	307	25,73	59,28	8,79	6,19	
pT4	13	15,38	30,77	30,77	23,08	
Lymphknotenstatus						
pN0	164	22,56	68,90	6,10	2,44	0,019
pN1	10	10,00	60,00	10,00	20,00	
pN2	22	13,64	50,00	27,27	9,09	
Fernmetastasierung						
pM0	138	22,46	73,91	3,62	0,00	<0.0001
pM1	119	25,21	53,78	10,08	10,92	

Tabelle 9: EZH2 versus Tumorphänotyp (klarzellige Nierenzellkarzinome)

Die Beziehung der EZH2 Expression zum Tumorphänotyp ist für 1054 klarzellige Nierenzellkarzinome in Tabelle 9 dargestellt. Die Tabelle macht deutlich, dass eine eindeutige Assoziation zwischen dem Vorliegen einer EZH2 Überexpression und einem ungünstigen Tumorphänotyp besteht. Nur 1,35% der pT1 Tumoren oder 2,99%

der pT2 Karzinome wiesen eine starke EZH2 Expression auf, wohingegen der Anteil der pT4 mit starker EZH2 Expression bei 23,08% lag ($p < 0,0001$). 0 von 138 nicht-metastasierten Patienten aber 10,9% von 119 metastasierten Patienten wiesen eine starke EZH2 Expression auf ($p < 0,0001$). Besonders stark war der statistische Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad und der EZH2 Expression ($p < 0,0001$ für ISUP, Fuhrmann und Thoenes). Für das dreistufige Thoenes Grading waren beispielsweise nur 0,88% von 342 Grad 1 Tumoren aber immerhin 12,95% von 139 Grad 3 Tumoren stark EZH2 positiv. Die EZH2 Expression ist signifikant mit der Prognose der Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen assoziiert. Dies gilt sowohl bei Betrachtung des Gesamtüberlebens ($p = 0,0027$) als auch bei Betrachtung des Progressions-freien Überlebens ($p < 0,0001$). Die entsprechenden Zahlen erreichten nur für den Endpunkt tumor-spezifischen Tod keine Signifikanz ($p = 0,1028$). Für alle Endpunkte ergab sich eine besonders ungünstige Prognose für die stark positiven Tumoren, während die Unterschiede zwischen Tumoren mit fehlender, geringer oder mäßiger EZH2 Expression nur gering waren.

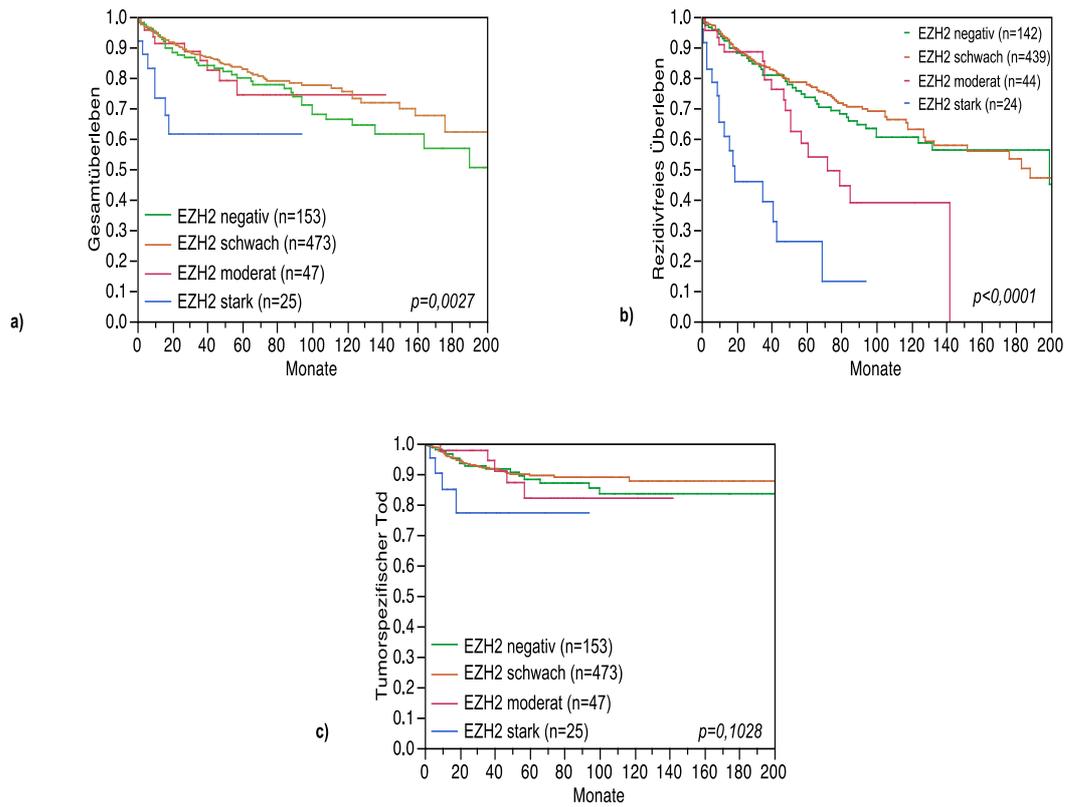


Abbildung 6: Assoziation zwischen EZH2 Expression und dem Tumorphänotyp des **klarzelligen Nierenzellkarzinoms** in Bezug auf (a) Gesamtüberleben, (b) rezidivfreies Überleben und (c) tumorspezifischen Tod

3.5 EZH2 Expression und Prognose bei papillären Nierenzellkarzinomen

Parameter	Analysierbar (n)	EZH2 Expression				p-Wert
		negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	
ISUP						
1	44	20,45	59,09	20,45	0,00	0.1425
2	108	14,81	60,19	20,37	4,63	
3	81	7,41	61,73	20,99	9,88	
4	2	0,00	100,00	0,00	0,00	
Fuhrmann						
1	2	50,00	50,00	0,00	0,00	0.0826
2	151	16,56	60,26	19,87	3,31	
3	78	5,13	62,82	23,08	8,97	
4	4	25,00	50,00	0,00	25,00	
Thoenes						
1	59	18,64	62,71	16,95	1,69	0.1139
2	163	11,04	60,74	22,70	5,52	
3	13	15,38	53,85	7,69	23,08	
Tumorstadium						
pT1	162	11,73	62,96	22,84	2,47	0.0187
pT2	45	20,00	53,33	13,33	13,33	
pT3	21	9,52	61,90	14,29	14,29	
pT4	3	33,33	0,00	33,33	33,33	
Lymphknotenstatus						
pN0	28	14,29	60,71	21,43	3,57	0,1611
pN1	2	50,00	0,00	0,00	50,00	
pN2	9	22,22	33,33	22,22	22,22	
Fernmetastasierung						
pM0	33	15,15	66,67	15,15	3,03	0.0243
pM1	10	20,00	20,00	30,00	30,00	

Tabelle 10: EZH2 versus Tumorphänotyp (papilläre Nierenzellkarzinome)

Die Beziehung zwischen der EZH2 Expression und dem Phänotyp des papillären Nierenzellkarzinoms ist in Tabelle 10 dargestellt. Wie bei den klarzelligen Nierenzellkarzinomen fand sich bei fortgeschrittenen Tumoren mit höherem Malignitätsgrad und Stadium eine höhere Rate stark EZH2 positiver Karzinome, doch

waren die Unterschiede statistisch nicht oder kaum signifikant, dies möglicherweise aufgrund der geringen Fallzahl. Dementsprechend war auch die Beziehung zwischen der EZH2 Expression und der Patientenprognose für die papillären Karzinome weniger klar als für die klarzelligen Nierenzellkarzinome. Ein statistisch signifikanter Unterschied fand sich allein bei Betrachtung der Beziehung zwischen EZH2 Expression und dem Rezidiv-freien Überleben (Abbildung 7b), $p=0,0029$. Auch hier war die statistische Signifikanz bedingt durch eine besonders ungünstige Prognose bei stark positiven Tumoren. Die Untersuchung der Beziehung EZH2 Expression mit dem Gesamtüberleben (Abbildung 7a) und dem Tumor-spezifischen Tod (Abbildung 7c) führte nicht zu statistisch signifikanten Befunden.

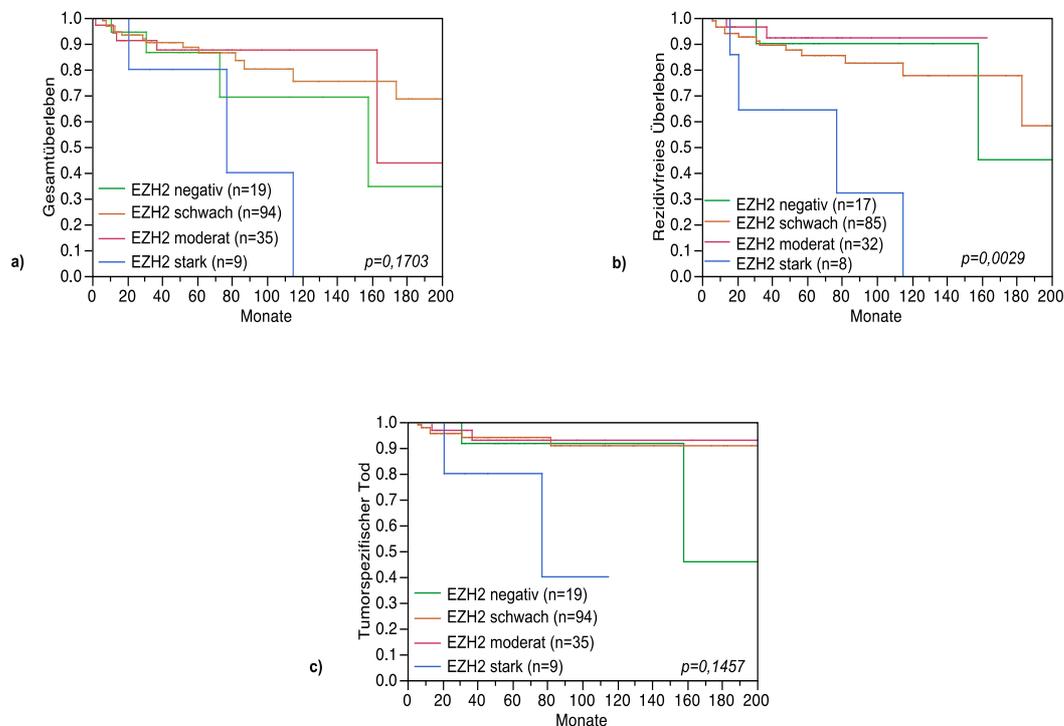


Abbildung 7: Assoziation zwischen EZH2 Expression und dem Tumorphänotyp des **papillären Nierenzellkarzinoms** in Bezug auf (a) Gesamtüberleben, (b) rezidivfreies Überleben und (c) tumorspezifischen Tod

3.6 EZH2 Expression und Prognose bei chromophoben Nierenzellkarzinomen

Parameter	Analysierbar (n)	EZH2				p- Wert
		negativ (%)	schwach (%)	moderat (%)	stark (%)	
Tumorstadium						
pT1	59	40,68	54,24	5,08	0,00	0.6122
pT2	15	33,33	66,67	0,00	0,00	
pT3	14	28,57	57,14	7,14	7,14	
pT4	1	0,00	100,00	0,00	0,00	
Lymphknotenstatus						
pN0	13	38,46	61,54	0,00	0,00	0.1752
pN1	3	0,00	66,67	0,00	33,33	
pN2	1	0,00	100,00	0,00	0,00	
Fernmetastasierung						
pM0	15	40,00	53,33	6,67	0,00	0.5482
pM1	1	0,00	100,00	0,00	0,00	

Tabelle 11: EZH2 versus Tumorphänotyp (chromophobe Nierenzellkarzinome)

Der Zusammenhang zwischen dem Tumorphänotyp und der EZH2 Expression ist für chromophobe Nierenzellkarzinome in Tabelle 11 dargestellt. Die Unterschiede sind hier nicht statistisch signifikant, was angesichts der geringen Zahl von chromophoben Nierenzellkarzinomen zu berücksichtigen ist. Ebenfalls überrascht es nicht, dass die Untersuchung bezüglich Prognoserelevanz für die insgesamt 92 Karzinome mit Verlaufsdaten keine signifikanten Assoziationen ergab. Dies weder bei Betrachtung des Gesamtüberlebens (Abbildung 8a) noch der Beziehung zur Tumorprogression (Abbildung 8b) oder des tumor-spezifischen Überlebens (Abbildung 8c). Mögliche Ursache für die fehlende statistische Signifikanz ist hier auch das Fehlen von stark EZH2 positiven Tumoren mit vorhandenen Verlaufsdaten. Auch bei den anderen Tumorarten waren die Prognoseunterschiede zwischen Tumoren mit fehlender, geringer oder mäßig-gradiger EZH2 Expression nur minimal gewesen.

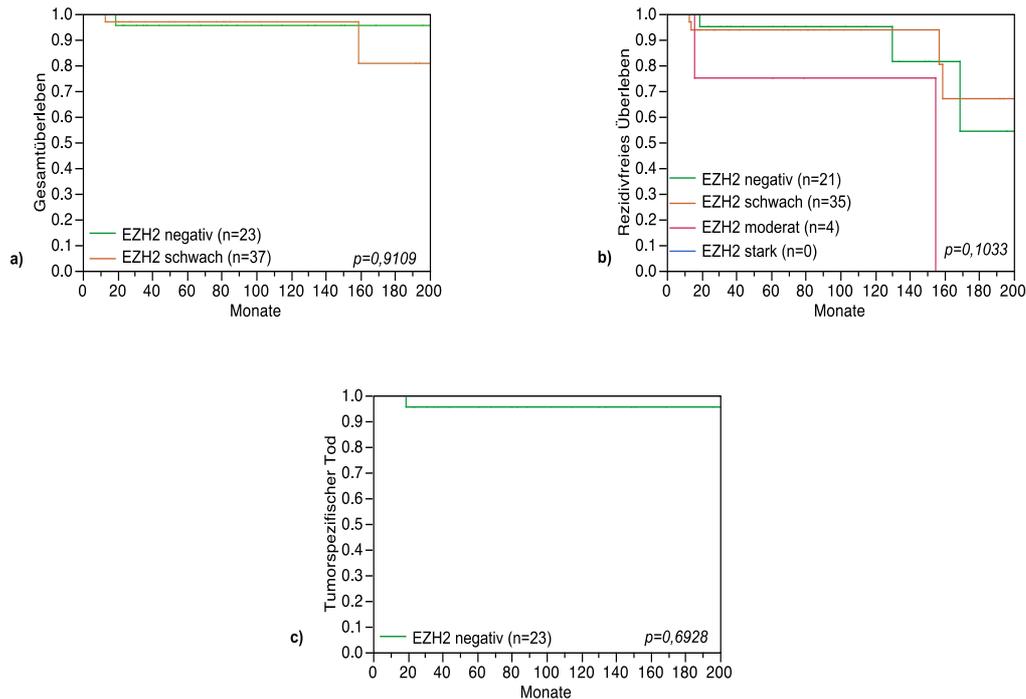


Abbildung 8: Assoziation zwischen EZH2 Expression und dem Tumorphänotyp des **chromophoben Nierenzellkarzinoms** in Bezug auf (a) Gesamtüberleben, (b) rezidivfreies Überleben und (c) tumorspezifischer Tod

4 Diskussion

4.1 Prävalenz der Expression in Bezug zu früheren Studien

Die Ergebnisse unserer Studie decken sich mit bisherigen Forschungsergebnissen zu der Expression von EZH2, vor allem beim klarzelligen Nierenzellkarzinom. Hinz et al. untersuchten 2009 die EZH2 Expression an einem kleinerem Patientenkollektiv von 119 Patienten mit klarzelligen Nierenzellkarzinomen. Dabei konnte bei einem erhöhten Expressionslevel ein Risikoanstieg für einen tumor-assoziierten Tod gezeigt werden ($p=0,029$). Aufgrund der geringen Fallzahl konnte zwar keine prognostische Relevanz demonstriert werden, allerdings vermuteten die Autoren, dass eine hohe EZH2 Expression mit einem weniger aggressiven Tumorphänotyp einhergeht. Dieser Vermutung widersprachen die Ergebnisse weiterer Studien. An einem größerem Patientenkollektiv mit 520 Patienten, bei denen 79 % der Tumore eine EZH2 Färbung aufwiesen, konnten Wagener et al. zeigen, dass die EZH2 Expression als selbstständiger Prognosefaktor geeignet ist und mit einem signifikant schlechterem krebsspezifischen Überleben bei Patienten mit nicht-metastasiertem Nierenzellkarzinomen assoziiert war (>25-50% vs. 0%: Hazard Ratio 2.72; $p=0,025$). Auf einen Zusammenhang zwischen EZH2 Expression und erhöhter

Tumoraggressivität ließen die Ergebnisse von Lee et al. schließen, die in 210 Tumoren eine signifikante Korrelation zu höherem pT Stadium ($p=0,001$) und häufigeren Fernmetastasen ($p=0,024$) zeigen konnten. Außerdem konnte Signifikanz in Bezug auf ein kürzeres krankheitsfreies Überleben bei starker Expression im Vergleich zu einer niedrigen Expression beobachtet werden ($p=0,019$).

In diesem Projekt wurden insgesamt 1603 Nierentumoren immunhistochemisch auf die Expression von EZH2 untersucht. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen fanden sich 397 Tumoren ohne Expression, 1012 Tumoren mit geringgradiger Positivität, 128 Tumoren mit mäßiggradiger Positivität und 66 Tumoren mit starker EZH2 Anfärbung. Für die größte Untergruppe, die klarzelligen Nierenzellkarzinome, fanden sich 25,24 % negative, 65,56 % geringgradig-positive, 5,98 % mäßiggradig-positive und 3,23 % stark-positive Tumoren. Frühere Studien haben ebenfalls die EZH2 Expression bei Nierenzelltumoren immunhistochemisch untersucht und dabei deutlich diskrepante Ergebnisse gefunden, sowohl untereinander als auch im Vergleich zu unserer Studie. Die früheren Daten sind bezogen auf jeweils alle in der Studie eingeschlossenen Nierentumoren und für die klarzelligen Karzinome in Tabelle 12 dargestellt. Die Tabelle macht deutlich, dass die Häufigkeit der EZH2 negativen Tumoren zwischen 16 und 22 % variiert.

Studie	Anzahl analysierbarer Tumoren		Verteilung der EZH2 Expression	
	Gesamt	Klarzellige Nierenzellkarzinome	Gesamt	Klarzellige Nierenzellkarzinome
Hinz et al. (2009)	119	119	Negativ (16%) Positiv (84%)	
Wagener et al. (2010)	520	422	Negativ (21%) Schwach-positiv (51%) Intermediär-positiv (19%) stark-positiv (7%) sehr stark-positiv (2%)	Negativ (21%) Schwach-positiv (54%) Intermediär-positiv (17%) stark-positiv (7%) Sehr stark-positiv (1%)
Lee et al. (2012)	210	171	k.A.	k.A.
Sakurai et al. (2012)	110	92	Negativ (56%) Postivi (44%)	Negativ (60%) Positiv (40%)
Liu et al. (2013)	257	241	Schwach-positiv (54%) Stark-positiv (46%)	Schwach-positiv (53%) Stark-positiv (47%)
Xu et al. (2014)	185	185	Schwach-positiv (52%) Stark-positiv (48%)	
Wang et al. (2015)	165	k.A.	Negativ (22%) Positiv (78%)	k.A.
Hirata et al. (2015)	50	50	Schwach-positiv (50%) Stark-positiv (50%)	
Adelaiye et al. (2017)	101	101	Niedrig-positiv (k.A.) Stark-positiv (k.A.)	
Ho et al. (2017)	1992	1992	k.A.	k.A.

Tabelle 12: EZH2 Expressionsprofile in bisherigen Studien

Die große Heterogenität in den beschriebenen Daten dürfte durch methodische Probleme bedingt sein. Bekanntermaßen variieren die Resultate unterschiedlicher immunhistochemischer Verfahren. Insbesondere Färbeprotokolle von in Formalin fixierten Gewebe weisen Unterschiede in den Teilschritten der Gewebepreparation, der Antikörperinkubation und in der Visualisierung der Antikörper-Antigen-Bindung auf. Hiermit können die für ein Genprodukt zum Teil deutlich diskrepanten Ergebnisse immunhistochemischer Messungen erklärt werden (Sauter et al., 2003).

Die hier erwähnten publizierten Studien verwendeten unterschiedliche Antikörper. Hinz et al. verwendeten den polyklonalen Ziegen-Antikörper AF4767 (R & D Systems Inc., MN, USA), Wagener et al. verwendeten den monoklonalen Maus-Antikörper

Clone 11 (BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA), Lee et al. verwendeten den polyklonalen Kaninchen-Antikörper Zymed36-6300 (ThermoFisher Scientific, San Francisco, CA, USA) und Ho et al. verwendeten den monoklonalen Kaninchen-Antikörper Ventana SP129 (Spring Bioscience, CA, USA). Die Publikationen von Liu et al. und Adelaiye et al. verwendeten immerhin den gleichen Antikörper (monoklonaler Kaninchen-Antikörper Nummer 5246, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA), doch unterschieden sich bei diesen Studien die benutzten Antikörperkonzentrationen (1:100 versus 1:000) beziehungsweise die Vorbehandlungsmethode (Erhitzen durch Mikrowellen versus Erhitzen im Dampfkochtopf).

Auch die Art der Vorbehandlung der Schnitte variierte zwischen den Studien. Hinz et al. verwendeten einen Dampfkochtopf bei pH 9, Adelaiye et al. verwendeten einen Dampfkochtopf bei pH 6. Liu et al. verwendeten Mikrowellen, allerdings fehlten Angaben zu Dauer oder Temperatur.

Es existieren verschiedene Methoden, die Antikörper Antigen Bindung zu visualisieren. Die jeweils optimale Methode für jeden Antikörper sollte zunächst in Testreihen standardisiert werden. Wie von Adelaiye-Ogala et al. durchgeführt, kann der indirekte Nachweis durch die zwei Schritt Methode mittels eines Sekundärantikörpers erfolgen, der mit Peroxidasemolekülen verbunden ist. Hinz et al. verwendeten die drei Schritt Methode, bei der mittels eines biotinylierten Sekundärantikörpers ein Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex gebunden wird. Bei beiden Methoden wird im letzten Schritt zur Visualisierung eine Chromogenlösung als Substrat hinzugegeben.

Ebenso unterschieden sich die Auswertungsverfahren zwischen den verschiedenen Studien. Xu et al. und Ho et al. definierten zwei unterschiedliche Kategorien von positiven Tumoren mit schwach- und stark-positiv. Wagener et al. definierten vier unterschiedliche Positivitätsgruppen als schwach-, intermediär-, stark- und sehr stark-positiv. Hinz et al. und Wang et al. unterschieden die Anfärbung nur in die Kategorien negativ und positiv. In den Studien erfolgte die Auswertung durch einen oder mehrere Pathologen, deren Erfahrung nicht spezifiziert wurde, mit Ausnahme der Studie von Ho et al., in der ein Pathologe mit Spezialisierung auf das urogenitale System erwähnt wird.

Es scheint wahrscheinlich, dass die Tatsache, dass nur sechs verschiedene Antikörper, von denen drei formalinängig sein sollen, für die erwähnten publizierten

Studien zum Nierenzellkarzinom verwendet wurden dadurch bedingt ist, dass die Zahl der Studien so gering war. Die Recherche bestätigt, dass der Vergleich und die Reproduzierbarkeit durch die verschiedenen immunhistochemischen Protokolle und Auswertungskriterien erschwert ist.

Studie	Typ	Spezies	Hersteller	Paraffin-Tauglichkeit	Verdünnung	Vorbehandlung	Nachweistechnik
Adelajye-Ogala et al. (2017)	Monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling Technology Inc.	Ja	1: 1000	DC pH= 6 Dauer: über Nacht	HRP
Hinz et al. (2009)	Polyklonal	Ziege	R&D Systems	k.A.	1: 400	DC pH= 9 Dauer: über Nacht	SABC
Ho et al. (2017)	Monoklonal	Kaninchen	Spring Bioscience	Ja	1: 2500	Autostainer	k.A.
Lee und Choe (2012)	Polyklonal	Kaninchen	Thermo Fisher Scientific	Ja	1: 300	Autostainer	HRP
Liu et al. (2013)	Monoklonal	Kaninchen	Cell Signaling Technology Inc.	Ja	1: 100	MW Dauer: k.A.	k.A.
Wagener et al. (2010).	Monoklonal	Maus	BD Biosciences	k.A.	1: 25	DC pH: k.A. Dauer: 10 Min.	SABC
Wang et al. (2015)	Polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Technology Inc.	k.A.	k.A.	DC Dauer: über Nacht	SABC
Xu et al. (2015)	Polyklonal	Maus	Cell Signaling Technology Inc.	k.A.	1: 50	DC pH = 6 Dauer: 10 Min.	SABC
DC = Dampfkochtopf, HRP = Horseradish peroxidase, MW = Mikrowelle, SABC = Streptavidin-Biotin-Chromogen-Methode, k.A. = keine Angabe							

Tabelle 13: Übersicht der unterschiedlichen Antikörperspezifitäten und Vorbehandlungsmethoden

Diese Antikörper wurden auch in Studien zu anderen Tumoren eingesetzt. Antikörper Kategorie Nummer 5246 (Cell Signaling Technology Inc.) bei Projekten an Tumorzellen des malignen Melanoms (Manning et al., 2015), an Prostatakarzinomen (Nolan et al., 2015) und beim kleinzelligen Lungenkrebs (Poirier et al., 2015); Antikörper Clon11 (BD Bioscience) an einem Projekt zur Erkennung präkanzeröser Veränderungen bei Mammakarzinomen (Ding et al., 2006) und Antikörper Ventana SP129 (Spring Bioscience) an einem Projekt an Prostata-Tumoren (Jacobs et al., 2015). Es handelt sich bei den Antikörpern um monoklonale Antikörper, welche nur ein einziges Epitop erkennen. Es ist davon auszugehen, dass die verwendeten Epitope unterschiedlich stark auf eine Formalinfixierung reagieren und deswegen auch unterschiedlich gut geeignet für Darstellung an Formalin fixiertem Gewebe sind.

Ein Studium der Kataloge von Antikörper-produzierenden Firmen in der online verfügbaren Datenbank www.antibodypedia.com erlaubte 606 verschiedene Antikörper gegen humanes EZH2-Protein von 37 verschiedenen Herstellern zu identifizieren. Nach Spezifizierung auf immunhistochemische Untersuchungen blieben 230 Antikörper (Tabelle 14). Die große Anzahl verfügbarer Antikörper mit unterschiedlichen Charakteristika veranschaulicht den Bedarf an standardisierten Untersuchungsprotokollen.

Hersteller	Antikörper	Spezies	Reaktivität	Typ
Abgent	AP2512d	Kaninchen	Human	Polyklonal
	AM1836A	Maus	Human	Monoklonal
Abnova Corp/Ratteion	MAB9542	Maus	Human	Monoklonal
Acris Antibodies GmbH	AM33207PU-M	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Affe	Polyklonal (Antigen gereinigt)
	AM33207PU-N	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Affe	Polyklonal (Antigen gereinigt)
	AM33207PU-S	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Affe	Polyklonal (Antigen gereinigt)
	AP12230PU-N	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	AP23212PU-M	Kaninchen	Human	Polyklonal
	AP23212PU-N	Kaninchen	Human	Polyklonal
	AP23212PU-S	Kaninchen	Human	Polyklonal
antibodies-online	ABIN2158767	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN2161066	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN2486993	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	ABIN2026310	Kaninchen	Human	Monoklonal

	ABIN2668956	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	ABIN438771	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1876720	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1858745	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN970654	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Rind, Hund, Huhn/Vogel, Krallenfrosch, Zebrafisch	Polyklonal
	ABIN1688284	Kaninchen	Human	Monoklonal
	ABIN1689244	Kaninchen	Human	Monoklonal
	ABIN1689245	Kaninchen	Human	Monoklonal
	ABIN337251	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1687877	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1687878	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1687879	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1687906	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1689256	Kaninchen	Human	Monoklonal
	ABIN1953461	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1954329	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1955548	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1956749	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1957866	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1959089	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN2263398	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN2263403	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN2263405	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN615589	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN615590	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN717641	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Rind, Hund, Huhn/Vogel, Schwein	Polyklonal
	ABIN747578	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Rind, Hund, Huhn/Vogel, Schwein	Polyklonal
	ABIN783029	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN959637	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1714918	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
	ABIN1813889	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN1894415	Kaninchen	Human	Monoklonal
	ABIN1894417	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1894418	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1894419	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1894420	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1894421	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1894422	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1953539	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN1954433	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN1955618	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN1956852	Maus	Human	Monoklonal

	ABIN1957904	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN1959168	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN2119450	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN2263382	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN2263394	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN2263399	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN2263404	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN2263406	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN2263419	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN2406547	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
	ABIN2600896	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN2600905	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN717643	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Rind, Hund, Huhn/Vogel, Schwein	Polyklonal
	ABIN717650	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Rind, Hund, Huhn/Vogel, Schwein	Polyklonal
	ABIN747580	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Rind, Hund, Huhn/Vogel, Schwein	Polyklonal
	ABIN747587	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Rind, Hund, Huhn/Vogel, Schwein	Polyklonal
	ABIN962164	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1101404	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1701416	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
	ABIN1712433	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
	ABIN1734197	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	ABIN1959425	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN2263395	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN2263397	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN2263420	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN925901	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN1894416	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ABIN2600902	Maus	Human	Monoklonal
	ABIN2600903	Maus	Human	Monoklonal
Arigo	ARG54703	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	ARG54700	Maus	Human	Monoklonal
	ARG53004	Kaninchen	Human	Polyklonal
	ARG53005	Kaninchen	Human	Polyklonal
Atlas Antibodies	HPA029131	Kaninchen	Human	Polyklonal
Aviva Systems Biology	OAAB01352	Kaninchen	Human	Polyklonal
	OAAB06686	Maus	Human	Monoklonal
	ARP38470_P05_Q	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Rind, Hund, Schwein, Pferd, Kaninchen, Zebrafisch	Polyklonal
Bethyl LaboRatteories	A304-197A	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	IHC-00388	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
Biorbyt	orb229775	Maus	Human	Monoklonal
	orb33913	Kaninchen	Human	Polyklonal

	orb97663	Maus	Human	Monoklonal
	orb178642	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
	orb305708	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	orb329985	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Hund, Schwein, Pferd, Kaninchen, Zebrafisch	Polyklonal
	orb5975	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
	orb227802	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
	orb95656	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	orb157761	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Schwein	Polyklonal
	orb192922	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
Bioss	bs-3521R	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
	bs-6529R	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
	bs-3521R-Biotin	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
	bs-3521R-HRP	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
	bs-6529R-Biotin	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
	bs-6529R-HRP	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
Bioworld Technology, Inc.	BS7830	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
Cell Signaling Technology, Inc.	5246	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Affe	Monoklonal
Creative Diagnostics	CPBT-38735RH	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	DPABH-25376	Kaninchen	Human	Polyklonal
EMD Millipore	MABS160	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Monoklonal
	MABE362	Maus	Human	Monoklonal
GeneTEX	GTX82503	Kaninchen	Human	Polyklonal
	GTX60811	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
Invitrogen Antibodies	36-6300	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	PA5-24594	Kaninchen	Human	Polyklonal
	MA5-18108	Maus	Human	Monoklonal
	14-9867-80	Maus	Human, Maus, Ratte	Monoklonal
	14-9867-82	Maus	Human, Maus, Ratte	Monoklonal
	50-9867-82	Maus	Human, Maus, Ratte	Monoklonal
	PA5-32398	Kaninchen	Human	Polyklonal
LifeSpan BioSciences, Inc.	LS-B7096	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	LS-C167873	Maus	Human	Monoklonal
	LS-C210372	Kaninchen	Human	Monoklonal
	LS-C334257	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
	LS-C336768	Maus	Human	Monoklonal
	LS-C338617	Maus	Human	Monoklonal
	LS-B2528	Kaninchen	Human	Polyklonal
	LS-C286624	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Rind, Hund, Huhn/Vogel, Krallenfrosch	Polyklonal
	LS-C416971	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
	LS-B6702	Kaninchen	Human	Polyklonal
	LS-C210577	Kaninchen	Human	Polyklonal

	LS-C212438	Maus	Human	Monoklonal
	LS-C212439	Maus	Human	Monoklonal
	LS-C212440	Maus	Human	Monoklonal
	LS-C212441	Maus	Human	Monoklonal
	LS-C212442	Maus	Human	Monoklonal
	LS-C214079	Kaninchen	Human	Polyklonal
	LS-C214080	Kaninchen	Human	Polyklonal
	LS-C214081	Kaninchen	Human	Polyklonal
	LS-C214082	Kaninchen	Human	Polyklonal
	LS-C214083	Kaninchen	Human	Polyklonal
	LS-C214084	Kaninchen	Human	Polyklonal
	LS-C221204	Maus	Human	Monoklonal
	LS-C321238	Kaninchen	Human	Polyklonal
	LS-C214085	Kaninchen	Human, Kaninchen	Polyklonal
	LS-C214086	Kaninchen	Human, Kaninchen	Polyklonal
	LS-C214087	Kaninchen	Human, Kaninchen	Polyklonal
	LS-C214088	Kaninchen	Human, Kaninchen	Polyklonal
	LS-C214091	Kaninchen	Human, Kaninchen	Polyklonal
	LS-C214093	Kaninchen	Human, Kaninchen	Polyklonal
	LS-C319151	Maus	Human	Monoklonal
	LS-C321240	Kaninchen	Human, Kaninchen	Polyklonal
	LS-C550558	Maus	Human	Monoklonal
	LS-C552989	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	LS-C570212	Maus	Human	Monoklonal
	LS-C572640	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	LS-C589862	Maus	Human	Monoklonal
	LS-C592295	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	LS-C609513	Maus	Human	Monoklonal
	LS-C611941	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	LS-C629165	Maus	Human	Monoklonal
	LS-C631595	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	LS-C151203	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Rind, Hund, Huhn/Vogel, Schwein, Hamster, Pferd, Schwein, Kaninchen, Affe, Krallenfrosch, Zebrafisch	Polyklonal
	LS-C347718	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	LS-C437051	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Rind, Hund, Huhn/Vogel, Schwein, Hamster, Pferd, Schwein, Kaninchen, Affe, Krallenfrosch, Zebrafisch	Polyklonal
	LS-C437052	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Rind, Hund, Huhn/Vogel, Schwein, Hamster, Pferd, Schwein, Kaninchen, Affe, Krallenfrosch, Zebrafisch	Polyklonal
	LS-C437053	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Rind, Hund, Huhn/Vogel, Schwein, Hamster, Pferd, Schwein, Kaninchen, Affe, Krallenfrosch, Zebrafisch	Polyklonal
	LS-C552992	Kaninchen	Human	Polyklonal

	LS-C572641	Kaninchen	Human	Polyklonal
	LS-C592294	Kaninchen	Human	Polyklonal
	LS-C611944	Kaninchen	Human	Polyklonal
	LS-C631596	Kaninchen	Human	Polyklonal
MyBioSource	MBS2005756	Kaninchen	Human	Polyklonal
	MBS9127489	Kaninchen	Human	Polyklonal
	MBS9200515	Maus	Human, Affe	Monoklonal
	MBS9211332	Kaninchen	Human, Maus, Affe, Krallenfrosch	Polyklonal
	MBS835503	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Rind, Hund, Huhn/Vogel, Zebrafisch	Polyklonal
	MBS302054	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Hund, Kaninchen	Polyklonal
Novus Biologicals	NBP2-52463	Maus	Human	Monoklonal
	23560002	Kaninchen	Human	Polyklonal
	NBP1-18935	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	NBP2-29965	Maus	Human	Monoklonal
	NBP2-52463AF405	Maus	Human	Monoklonal
	NBP2-52463AF488	Maus	Human	Monoklonal
	NBP2-52463AF647	Maus	Human	Monoklonal
	NBP2-52463AF700	Maus	Human	Monoklonal
	NBP2-52463C	Maus	Human	Monoklonal
	NBP2-52463FR	Maus	Human	Monoklonal
	NBP2-52463G	Maus	Human	Monoklonal
	NBP2-52463IR	Maus	Human	Monoklonal
	NBP2-52463R	Maus	Human	Monoklonal
	NBP2-52463UV	Maus	Human	Monoklonal
	NBP2-52463V	Maus	Human	Monoklonal
	23560002-0.1mg	Kaninchen	Human	Polyklonal
	NBP2-52463B	Maus	Human	Monoklonal
	NBP2-52463F	Maus	Human	Monoklonal
	NBP2-52463H	Maus	Human	Monoklonal
	NBP2-38143	Kaninchen	Human	Polyklonal
	NBP2-45547	Maus	Human	Monoklonal
NSJ Bioreagents	F48073	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
	F40221	Maus	Human	Monoklonal
	F53753	Kaninchen	Human, Maus, Ratte	Polyklonal
OriGene	AM33207PU-M	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Affe	Monoklonal
	AM33207PU-N	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Affe	Monoklonal
	AM33207PU-S	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Affe	Monoklonal
	TA324333	Maus	Human, Affe	Monoklonal
	TA353810	Kaninchen	Human	Monoklonal
	TA343463	Kaninchen	Human, Maus, Ratte, Rind, Hund, Schwein, Pferd, Kaninchen, Zebrafisch	Polyklonal

	TA802907	Maus	Human	Monoklonal
	TA803011	Maus	Human	Monoklonal
	CF802907	Maus	Human	Monoklonal
	CF803011	Maus	Human	Monoklonal
	AP23212PU-M	Kaninchen	Human	Polyklonal
	AP23212PU-N	Kaninchen	Human	Polyklonal
	AP23212PU-S	Kaninchen	Human	Polyklonal
	TA353809	Kaninchen	Human	Polyklonal
ProSci	28-874	Kaninchen	Human, Hund, Zebrafisch	Polyklonal
RabMAbs	3368-1		Human	Monoklonal
	ab109398		Human	Monoklonal
RayBiotech, Inc.	119-17274	Kaninchen	Human	Polyklonal
	119-16221	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
Rockland Immunochemicals, Inc.	200-401-W53	Kaninchen	Human, Maus	Polyklonal
Sigma-Aldrich	AV38470		Human	Polyklonal

Tabelle 14: Immunhistochemische Antikörper gegen humanes EZH2 (antibodypedia, 2018)

Die wesentliche Fragestellung unserer Untersuchung ist, ob die immunhistochemische Anfärbung von EZH2 beim Nierenzellkarzinom klinisch relevant sein könnte. Diese Fragestellung gliedert sich in zwei Unterfragen, nämlich in die diagnostische oder prognostische Relevanz. Eine diagnostische Relevanz bei der Abgrenzung der verschiedenen Nierenkarzinomentitäten konnten wir nicht erkennen. Zwar finden sich signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Tumorentitäten, doch sind diese zu wenig eindeutig, als dass die EZH2 Expression als Indiz für die eine oder andere Nierentumorentität verwendet werden könnte. Es gibt zahlreiche andere immunhistochemische Marker, welche alleine oder in bestimmten Pattern mit anderen Markern für den Zweck der Differenzierung von Nierentumoren besser geeignet sind. So findet sich eine c-Kit (CD117) Expression ausschließlich in chromophoben Karzinomen und Onkozytomen aber nicht in klarzelligen oder papillären Nierenzellkarzinomen (Shen et al., 2012). Zytokeratin 7 findet sich vornehmlich in chromophoben Karzinomen und kann zur Unterscheidung vom Onkozytom und klarzelligen Nierenzellkarzinom dienen (Zhao et al., 2015). Die charakteristische immunhistochemisch nachweisbare Anfärbung der membranständigen Carboanhydrase IX (CA-IX) in klarzelligen Nierenzellkarzinomen eignet sich hingegen zur diagnostischen Differenzierung von papillären und chromophoben Nierenzellkarzinomen und vom Onkozytom (Buscheck et al., 2018).

Zumindest bei klarzelligen Nierenzellkarzinomen findet sich eine eindeutige prognostische Relevanz der EZH2 Expression. Je mehr EZH2 exprimiert wird, desto ungünstiger ist der Phänotyp (höhere Entdifferenzierung, höherer Tumorgrad) und je ungünstiger ist die Prognose. Dieser Befund passt gut zu den Untersuchungen früherer Studien, welche zwar kleine Fallzahlen untersuchten aber prinzipiell ähnliche Ergebnisse erzielten (Lee und Choe, 2012, Wagener et al., 2010, Xu et al., 2015). Interessant ist die Frage, ob die Bestimmung der EZH2 Expression prognoserelevant genug ist um diese Untersuchung regelhaft, oder doch zumindest in begründeten Einzelfällen durchzuführen. Wahrscheinlich ist die Prognoserelevanz der EZH2 Expression zu gering um einzig aufgrund dieses Befundes eine adjuvante Therapie vorzunehmen oder nicht. Möglich ist aber, dass EZH2 Messungen in der Zukunft zusammen mit der Messung von anderen Prognosemarkern bessere, aussagekräftigere Voraussagen über den zu erwartenden klinischen Verlauf treffen könnten.

In anderen Tumorarten wie dem Mammakarzinom oder dem Prostatakarzinom gibt es bereits etablierte mehrparametrische Untersuchungen, wobei zwischen 21 (OncotypeDX®, GenomicHealth, Redwood City, CA, USA) und 70 Gene (MammaPrint®, Agendia, Irvine, CA, USA) auf der RNA Ebene gemessen werden können und die Resultate dieser Tests klinisch relevante Prognosevoraussagen ergeben (Schmidt, 2017). Die am weitesten verbreiteten Tests der Mammakarzinome wie Oncotype DX® und MammaPrint® wurden vor allem in den Vereinigten Staaten regelhaft zur Anwendung gebracht und haben die Zahl der adjuvant behandelten Mammakarzinom-Patientinnen signifikant reduziert (Cardoso et al., 2016).

Mittlerweile gibt es auch beim Prostatakarzinom derartige Tests wie der Prolaris® Test (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT, USA) oder der Oncotype DX Prostate®-Test der Firma GenomicHealth (Cucchiara et al., 2017). Die Nutzung dieser Tests ist noch wenig verbreitet, doch gibt es vielversprechende Studien, die darauf hindeuten, dass auch hier für die Patienten ein klinischer Nutzen besteht (Klein et al., 2014, Cuzick et al., 2012).

4.2 Klinische Relevanz der Expression in Bezug zu früheren Studien

Ein weiterer wesentlicher Befund dieser Studie ist die Tatsache, dass die klinische Relevanz, beziehungsweise die prognostische Bedeutung, der EZH2 Expression letztlich nur bei einer einzigen Nierentumorentität, dem klarzelligen

Nierenzellkarzinom, ausreichend getestet werden konnte. Für papilläre und chromophobe Karzinome, den beiden nächsthäufigsten Tumorentitäten, reichte die Zahl der Fälle auch in unserem Kollektiv nicht für signifikante Ergebnisse aus. Dies ist auch deswegen bedenklich, weil unser Kollektiv eines der größten an molekular untersuchten Nierenzellkarzinomen darstellt. Da diese nicht-klarzelligen Nierenzelltumoren aber doch fast 30% der Nierenzellkarzinome ausmachen, zeigen diese Daten indirekt, dass Strukturen geschaffen werden müssen, die derartige Untersuchungen erlauben, um die klinische Bedeutung molekularer Parameter bei nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinomen zu testen. In Frage kämen nationale Register, welche nicht nur klinische Daten, sondern auch Tumorgewebe sammeln oder aber große multinationale Studien. In den vergangenen Jahrzehnten sind solche Großprojekte oft daran gescheitert, dass sich große Institutionen nicht auf eine Zusammenarbeit einigen konnten. Zuletzt ist es gerade in den Vereinigten Staaten, aber auch International, vermehrt zu Großkollaborationen gekommen, zum Beispiel im Rahmen des „International Cancer Genome Projekt“, bei dem Gruppen aus zahlreichen Ländern in einem koordinierten Projekt Tumoren der wichtigsten Entitäten vergleichend mittels Sequenzierung der nächsten Generation untersuchen (International-Cancer-Genome-Consortium, 2018). Ein anderes beispielhaftes Projekt ist das Projekt „GENIE“ (Genomics Evidence Neoplasia Information Exchange), welches von der amerikanischen Krebsgesellschaft („American-Association-of-Cancer-Research“ (AACR)) lanciert wurde und die gemeinsame Sammlung von NGS-Daten von Tumoren beinhaltet, welche chemotherapiert wurden. Dieses Projekt verfolgt das Ziel, durch Poolen von Daten molekulare Veränderungen zu identifizieren, die das Ansprechen auf existierende Chemotherapien voraussagen können (AACR, 2018). Angesichts dieser zunehmenden Tendenz der nationalen und internationalen Vernetzung im Zusammenhang mit wichtigen Technologien, vor allem NGS, müsste es möglich sein, dass internationale Anstrengungen, Tumoren und Verlaufsdaten zu sammeln, alleine mit dem Ziel möglich gemacht würden, Tumoren, die eine Therapie benötigen und Tumoren, die neben der Chirurgie keine weitere Therapie benötigen durch Entwicklung molekularer Prognosemarker besser voneinander unterscheiden zu können.

Die wahrscheinlich bedeutendste Anwendung der EZH2 Messung wäre die Indikationsstellung für spezifische Therapien mit EZH2 als Target. Derartige Therapien

befinden sich in klinischer Entwicklung, wobei mittlerweile ein Präparat bereits in klinischen Phase 2 Studien getestet wird (Tabelle 4). Allerdings ist festzuhalten, dass für den Fall einer Wirksamkeit eines solchen Medikamentes die Frage entstehen wird, wie ein standardisierter EZH2 Test erfolgen sollte, mit welchem Antikörper und unter welchen Bedingungen. Die Individualität, die bei der Durchführung von immunhistochemischen Studien bisher besteht müsste dann ersetzt werden durch einen streng reglementierten von der „Federal Drug Administration“ (FDA) zugelassenen Test. Zur Entwicklung eines solchen Test wäre wahrscheinlich notwendig, die existierenden Antikörper systematisch zu vergleichen.

Zusammengefasst zeigen die Daten unserer Studie, dass bei verschiedenen Nierentumorentitäten eine unterschiedliche Häufigkeit einer gesteigerten EZH2 Expression besteht und dass die Expressionsunterschiede nicht prognostische genutzt werden können. Zumindest beim klarzelligen Nierenzellkarzinom ist die EZH2 Überexpression ein ungünstiger Prognosefaktor, der vielleicht in Zukunft, wohl aber zusammen mit anderen Markern, für die Identifikation von hoch Risiko- und niedrig Risiko-Nierentumoren genutzt werden könnte. Unser großes Tumorkollektiv von 1805 Patienten erwies sich als ausreichend um die klinische Relevanz dieses Prognosemarkers beim klarzelligen Nierenzellkarzinom zu evaluieren, war aber unzureichend für die Untersuchung aller anderen Tumorentitäten. Es besteht ein dringender Bedarf an deutlich größeren Tumorserien, um auch für die weniger häufigen Tumorentitäten Prognosemarker zu identifizieren.

5 Zusammenfassung/ Summary

Das Nierenzellkarzinom ist der acht häufigste maligne Tumor und wird in Deutschland jährlich mehr als 15000 Mal diagnostiziert. Circa 70 % aller malignen Nierentumoren sind klarzellige Karzinome, danach folgen das papilläre (15 %) und das chromophobe Nierenzellkarzinom (5 %). Zusätzlich sind zahlreiche weitere, teils sehr seltene Tumorentitäten definiert worden. Zuletzt wurde die Liste der offiziellen Tumorentitäten in der WHO Klassifikation von 2016 um die Entitäten des tubulozystischen Nierenzellkarzinoms, des Nierenzellkarzinoms assoziiert mit erworbener zystischer Nierenerkrankung, dem klarzellig-papillären Nierenzellkarzinom, dem Translokations-assoziierten Nierenzellkarzinomen und dem Nierenzellkarzinom assoziiert mit einer hereditären Leiomyomatose erweitert. Ein Teil der Nierenzellkarzinome weist eine vermehrte Expression von EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) auf, jedoch ist die Bedeutung dieser Expression nicht vollends verstanden. Diese Dissertation verfolgt deswegen das Ziel zu klären, ob der Nachweis einer gesteigerten EZH2 Expression dabei hilft, verschiedene Subtypen von Nierenzellkarzinomen voneinander zu unterscheiden oder ob die EZH2 Expression prognostisch relevant ist. Untersucht wurden 1805 Tumoren, welche nach den aktuellen Kriterien der WHO 2016 nachbeurteilt und teilweise reklassifiziert wurden. Zur immunhistochemischen Untersuchung wurde ein Gewebemikroarray, bestehend jeweils aus einem 0,6 mm messenden Gewebefragment von 1805 Tumoren erstellt. Die immunhistochemische Untersuchung ergab in 397 (24,7%) Tumoren keine Anfärbung, in 1012 (63,1%) Tumoren eine schwache Anfärbung, in 128 (7,9%) Tumoren eine mäßiggradige Anfärbung und in 66 (4,1%) Tumoren eine starke Anfärbung. Die Tumorentitäten unterschieden sich teilweise in der Expressionshäufigkeit, so fand sich eine starke EZH2 Expression in 5,88% der papillären aber nur in 3,23% der klarzelligen Nierenzellkarzinome, doch war das Ausmaß der Unterschiede nicht ausreichend um eine Unterscheidung dieser Tumorentitäten wirklich zu erleichtern. Die EZH2 Expression war bei der Gruppe der klarzelligen Nierenzellkarzinome signifikant mit einem ungünstigen Phänotyp (hoher Grad, hohes Tumorstadium, Fernmetastasen) und einer ungünstigen Patientenprognose assoziiert (jeweils $p < 0,0001$). Keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Malignitätsparametern und der EZH2 Expression konnten indessen bei papillären und chromophoben Nierenzellkarzinomen gefunden werden. Unser Kollektiv ist eine der größten in einem Gewebemikroarray auf Prognosemarker untersuchte Nierentumorsammlung. Die Befunde machen deutlich,

dass auch derart große Tumorkollektive nicht ausreichend sind um andere Tumorentitäten außer dem klarzelligem Nierenzellkarzinom zuverlässig auf Prognoserelevanz von einzelnen Biomarkern zu untersuchen. Insgesamt zeigten und bestätigten unsere Ergebnisse, dass EZH2 ein geeigneter Biomarker mit prognostischer Aussagekraft für klarzellige Nierenzellkarzinome ist.

Summary

Renal cell carcinoma is the eight most common malignant tumor in Germany and is diagnosed annually in more than 15000 cases. Approximately 70 % of renal tumors are clear cell renal cell carcinoma, followed by papillary (15 %) and chromophobe renal cell carcinomas (5 %). In addition, several new and rare tumor entities have been defined by the new 2016 WHO classification. Among these, tubulocystic renal cell carcinoma, renal cell carcinoma associated with acquired cystic renal disease, translocation-associated renal cell carcinoma and renal cell carcinoma associated with hereditary leiomyomatosis have been added. Some of these carcinomas show elevated expression of EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2), but the significance of the expression has yet not been fully understood. This dissertation aims to discuss whether elevated EZH2 expression is suitable to differentiate different subtypes of renal cell carcinomas or if EZH2 expression has reliable prognostic impact. In this study, 1805 tumor probes were reviewed and newly classified according to WHO 2016 criteria. To conduct immunohistochemical staining, a tissue microarray consisting of 0,6 mm fragments of each tumor probe was used. The immunohistochemical staining showed no staining in 397 (24,7 %) tumors, weak staining in 1012 (63,1 %) tumors, moderate staining in 128 (7,9%) and strong staining in 66 (4,1 %) tumors. The different tumor entities differ in their expression profile. The EZH2 staining was strong in 5,88 % of papillary but only 3,23 % of clear cell renal cell carcinoma. This difference in expression was not sufficient to differentiate the two entities from each other. EZH2 expression in the group of clear cell renal cell carcinoma was significantly linked to unfavourable tumor phenotype such as advanced tumor stage, metastasis and an unfavourable patient prognosis ($p < 0,0001$). There was no significant connection between EZH2 expression and parameters of malignancy in papillary and chromophobe renal cell carcinomas, mainly due to the small number of tumor samples. Our collective of tumor probes analysed for prognostic markers in tissue microarray format belongs to the largest collections of renal tumors. These data emphasize that even this largely sized tumor collections are not sufficient to show significant prognostic relevance in renal tumor entities other than clear cell renal cell carcinoma. Our results demonstrate and confirm that EZH2 is a useful biomarker providing prognostic information for renal cell carcinoma.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die vier TMA Blocks nach immunhistochemischer Anfärbung gegen humanes EZH2.....	19
Abbildung 2: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen gegen EZH2 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen in 100x Vergrößerung mit (a) negativer, (b) schwacher, (c) moderater und (d) starker Färbeintensität	23
Abbildung 3: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen gegen EZH2 in papillären Nierenzellkarzinomen in 100x Vergrößerung mit (a) negativer, (b) schwacher, (c) moderater und (d) starker Färbeintensität.....	24
Abbildung 4: Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen gegen EZH2 in chromophoben Nierenzellkarzinomen in 100x Vergrößerung mit (a) negativer, (b) schwacher, (c) moderater und (d) starker Färbeintensität	25
Abbildung 5: Assoziation zwischen EZH2 Expression und allen Tumorentitäten des Nierenzellkarzinoms in Bezug auf (a) Gesamtüberleben, (b) rezidivfreien Überleben und (c) tumorspezifischen Tod.....	28
Abbildung 6: Assoziation zwischen EZH2 Expression und dem Tumorphänotyp des klarzelligen Nierenzellkarzinoms in Bezug auf (a) Gesamtüberleben, (b) rezidivfreies Überleben und (c) tumorspezifischen Tod.....	31
Abbildung 7: Assoziation zwischen EZH2 Expression und dem Tumorphänotyp des papillären Nierenzellkarzinoms in Bezug auf (a) Gesamtüberleben, (b) rezidivfreies Überleben und (c) tumorspezifischen Tod	33
Abbildung 8: Assoziation zwischen EZH2 Expression und dem Tumorphänotyp des chromophoben Nierenzellkarzinoms in Bezug auf (a) Gesamtüberleben, (b) rezidivfreies Überleben und (c) tumorspezifischer Tod.....	35
Tabelle 1: WHO Klassifikation der Nierentumore (angepasst nach (Moch, 2016))	7
Tabelle 2: World Health Organization/ International Society of Urological Pathology (ISUP) Graduierungssystem für klarzellige und papilläre Nierenzellkarzinome (Moch, 2016).....	7
Tabelle 3: TNM-Klassifikation für Nierenzellkarzinome nach American-Joint-Committee-on-Cancer (AJCC) (angepasst nach (Escudier et al., 2016))	8
Tabelle 4: Übersicht laufender Studien mit Inhibition von EZH2 auf Clinicaltrials.gov (Status 06.12.2018).....	16
Tabelle 5: Tumor-Eigenschaften und Follow-up Informationen	18

Tabelle 6: EZH2 versus Tumorphänotyp (alle Entitäten).....	22
Tabelle 7: EZH2 Expression in den klassischen histologischen Nierentumorentitäten	26
Tabelle 8: EZH2 Expression in den weiteren histologischen Nierentumorentitäten...	27
Tabelle 9: EZH2 versus Tumorphänotyp (klarzellige Nierenzellkarzinome)	29
Tabelle 10: EZH2 versus Tumorphänotyp (papilläre Nierenzellkarzinome)	32
Tabelle 11: EZH2 versus Tumorphänotyp (chromophobe Nierenzellkarzinome).....	34
Tabelle 12: EZH2 Expressionsprofile in bisherigen Studien	37
Tabelle 14: Immunhistochemische Antikörper gegen humanes EZH2 (antibodypedia, 2018).....	46

7 Literaturverzeichnis

AACR. 2018. *Project GENIE* [Online]. American Association for Cancer Research. Available: <https://www.aacr.org/Research/Research/Pages/aacr-project-genie-data.aspx> [Accessed December 17 2018].

ADELAIYE-OGALA, R., BUDKA, J., DAMAYANTI, N. P., ARRINGTON, J., FERRIS, M. W., HSU, C. C., CHINTALA, S., ORILLION, A. R., MILES, K. M., SHEN, L., ELBANNA, M., CIAMPORCERO, E., ARISA, S., PETTAZZONI, P., DRAETTA, G. F., SESHADRI, M., HANCOCK, B. A., RADOVICH, M., KOTA, J., BUCK, M., KEILHACK, H., MCCARTHY, B. P., PERSOHN, S. A., TERRITO, P. R., ZANG, Y., IRUDAYARAJ, J., TAO, A. W., HOLLENHORST, P. & PILI, R. 2017. EZH2 modifies sunitinib resistance in renal cell carcinoma by kinome reprogramming. *Cancer Res.*

ANTIBODYPEDIA. 2018. Available: <https://www.antibodypedia.com/gene/32761/EZH2> [Accessed February 2 2018].

BRACKEN, A. P., DIETRICH, N., PASINI, D., HANSEN, K. H. & HELIN, K. 2006. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev*, 20, 1123-36.

BUSCHECK, F., FRAUNE, C., SIMON, R., KLUTH, M., HUBE-MAGG, C., MOLLER-KOOP, C., SHADANPOUR, N., BANNENBERG, C., EICHELBERG, C., HOFLMAYER, D., CLAUDITZ, T., WITTMER, C., WILCZAK, W., SAUTER, G., FISCH, M., RINK, M. & EICHENAUER, T. 2018. Aberrant expression of membranous carbonic anhydrase IX (CAIX) is associated with unfavorable disease course in papillary and clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol.*

CARDOSO, F., VAN'T VEER, L. J., BOGAERTS, J., SLAETS, L., VIALE, G., DELALOGUE, S., PIERGA, J. Y., BRAIN, E., CAUSERET, S., DELORENZI, M., GLAS, A. M., GOLFINOPOULOS, V., GOULIOTI, T., KNOX, S., MATOS, E., MEULEMANS, B., NEIJENHUIS, P. A., NITZ, U., PASSALACQUA, R., RAVDIN, P., RUBIO, I. T., SAGHATCHIAN, M., SMILDE, T. J., SOTIRIOU, C., STORK, L., STRAEHLE, C., THOMAS, G., THOMPSON, A. M., VAN DER HOEVEN, J. M., VUYLSTEKE, P., BERNARDS, R., TRYFONIDIS, K., RUTGERS, E., PICCART, M. & INVESTIGATORS, M. 2016. 70-Gene Signature as an Aid to Treatment Decisions in Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med*, 375, 717-29.

CHANG, C. J. & HUNG, M. C. 2012. The role of EZH2 in tumour progression. *Br J Cancer*, 106, 243-7.

COLLETT, K., EIDE, G. E., ARNES, J., STEFANSSON, I. M., EIDE, J., BRAATEN, A., AAS, T., OTTE, A. P. & AKSLEN, L. A. 2006. Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res*, 12, 1168-74.

CUCCHIARA, V., COOPERBERG, M. R., DALL'ERA, M., LIN, D. W., MONTORSI, F., SCHALKEN, J. A. & EVANS, C. P. 2017. Genomic Markers in Prostate Cancer Decision Making. *Eur Urol*.

CUZICK, J., BERNEY, D. M., FISHER, G., MESHER, D., MOLLER, H., REID, J. E., PERRY, M., PARK, J., YOUNUS, A., GUTIN, A., FOSTER, C. S., SCARDINO, P., LANCHBURY, J. S., STONE, S. & TRANSATLANTIC PROSTATE, G. 2012. Prognostic value of a cell cycle progression signature for prostate cancer death in a conservatively managed needle biopsy cohort. *Br J Cancer*, 106, 1095-9.

DING, L., ERDMANN, C., CHINNAIYAN, A. M., MERAJVER, S. D. & KLEER, C. G. 2006. Identification of EZH2 as a molecular marker for a precancerous state in morphologically normal breast tissues. *Cancer Res*, 66, 4095-9.

DOEHN, C., GRUNWALD, V., STEINER, T., FOLLMANN, M., REXER, H. & KREGE, S. 2016. The Diagnosis, Treatment, and Follow-up of Renal Cell Carcinoma. *Dtsch Arztebl Int*, 113, 590-6.

EGGER, G., LIANG, G., APARICIO, A. & JONES, P. A. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429, 457-63.

ESCUDIER, B., PORTA, C., SCHMIDINGER, M., RIOUX-LECLERCQ, N., BEX, A., KHOO, V., GRUENVALD, V., HORWICH, A. & COMMITTEE, E. G. 2016. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 27, v58-v68.

FUHRMAN, S. A., LASKY, L. C. & LIMAS, C. 1982. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 6, 655-63.

GIBSON, W. T., HOOD, R. L., ZHAN, S. H., BULMAN, D. E., FEJES, A. P., MOORE, R., MUNGALL, A. J., EYDOUX, P., BABUL-HIRJI, R., AN, J., MARRA, M. A., CONSORTIUM, F. C., CHITAYAT, D., BOYCOTT, K. M., WEAVER, D. D. & JONES, S. J. 2012. Mutations in EZH2 cause Weaver syndrome. *Am J Hum Genet*, 90, 110-8.

HES, O. 2014. [International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia 2012]. *Cesk Patol*, 50, 137-41.

HINZ, S., WEIKERT, S., MAGHELI, A., HOFFMANN, M., ENGERS, R., MILLER, K. & KEMPKENSTEFFEN, C. 2009. Expression profile of the polycomb group protein enhancer of Zeste homologue 2 and its prognostic relevance in renal cell carcinoma. *J Urol*, 182, 2920-5.

HIRATA, H., HINODA, Y., SHAHRYARI, V., DENG, G., NAKAJIMA, K., TABATABAI, Z. L., ISHII, N. & DAHIYA, R. 2015. Long Noncoding RNA MALAT1 Promotes Aggressive Renal Cell Carcinoma through Ezh2 and Interacts with miR-205. *Cancer Res*, 75, 1322-31.

HO, T. H., KAPUR, P., ECKEL-PASSOW, J. E., CHRISTIE, A., JOSEPH, R. W., SERIE, D. J., CHEVILLE, J. C., THOMPSON, R. H., HOMAYOUN, F., PANWAR, V., BRUGAROLAS, J. & PARKER, A. S. 2017. Multicenter Validation of Enhancer of Zeste Homolog 2 Expression as an Independent Prognostic Marker in Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol*, 35, 3706-3713.

INTERNATIONAL-CANCER-GENOME-CONSORTIUM. 2018. *ICGC Data Portal* [Online]. Available: <https://dcc.icgc.org/> [Accessed February 2 2018].

JACOBS, C., TUMATI, V., KAPUR, P., YAN, J., XIE, X. J., HANNAN, R., HSIEH, J. T., KIM, D. W. & SAHA, D. 2015. Pretreatment biopsy analysis of DAB2IP identifies subpopulation of high-risk prostate cancer patients with worse survival following radiation therapy. *Cancer Med*, 4, 1844-52.

KABARIA, R., KLAASSEN, Z. & TERRIS, M. K. 2016. Renal cell carcinoma: links and risks. *Int J Nephrol Renovasc Dis*, 9, 45-52.

KIM, K. H. & ROBERTS, C. W. 2016. Targeting EZH2 in cancer. *Nat Med*, 22, 128-34.

KLEIN, E. A., COOPERBERG, M. R., MAGI-GALLUZZI, C., SIMKO, J. P., FALZARANO, S. M., MADDALA, T., CHAN, J. M., LI, J., COWAN, J. E., TSIATIS, A. C., CHERBAVAZ, D. B., PELHAM, R. J., TENGGARA-HUNTER, I., BAEHNER, F. L., KNEZEVIC, D., FEBBO, P. G., SHAK, S., KATTAN, M. W., LEE, M. & CARROLL, P. R. 2014. A 17-gene assay to predict prostate cancer aggressiveness in the context of Gleason grade heterogeneity, tumor multifocality, and biopsy undersampling. *Eur Urol*, 66, 550-60.

LEE, H. W. & CHOE, M. 2012. Expression of EZH2 in renal cell carcinoma as a novel prognostic marker. *Pathol Int*, 62, 735-41.

LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (AWMF, D. K., DEUTSCHE KREBSHILFE). 2017. *S3- Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, Langversion 1.1* [Online]. Available: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Nierenzellkarzinom.85.0.html> [Accessed March 29 2017].

LI, J., HART, R. P., MALLIMO, E. M., SWERDEL, M. R., KUSNECOV, A. W. & HERRUP, K. 2013. EZH2-mediated H3K27 trimethylation mediates neurodegeneration in ataxia-telangiectasia. *Nat Neurosci*, 16, 1745-53.

LIU, L., XU, Z., ZHONG, L., WANG, H., JIANG, S., LONG, Q., XU, J. & GUO, J. 2013. Prognostic value of EZH2 expression and activity in renal cell carcinoma: a prospective study. *PLoS One*, 8, e81484.

LIU, L., XU, Z., ZHONG, L., WANG, H., JIANG, S., LONG, Q., XU, J. & GUO, J. 2016. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) promotes tumour cell migration and invasion via epigenetic repression of E-cadherin in renal cell carcinoma. *BJU Int*, 117, 351-62.

LJUNGBERG, B., BENSALAH, K., CANFIELD, S., DABESTANI, S., HOFMANN, F., HORA, M., KUCZYK, M. A., LAM, T., MARCONI, L., MERSEBURGER, A. S., MULDER, P., POWLES, T., STAEHLER, M., VOLPE, A. & BEX, A. 2015. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur Urol*, 67, 913-24.

MANNING, C. S., HOOPER, S. & SAHAI, E. A. 2015. Intravital imaging of SRF and Notch signalling identifies a key role for EZH2 in invasive melanoma cells. *Oncogene*, 34, 4320-32.

MCGHEE, J. D. & FELSENFELD, G. 1980. Nucleosome structure. *Annu Rev Biochem*, 49, 1115-56.

MELLING, N., THOMSEN, E., TSOURLAKIS, M. C., KLUTH, M., HUBE-MAGG, C., MINNER, S., KOOP, C., GRAEFEN, M., HEINZER, H., WITTMER, C., SAUTER, G., WILCZAK, W., HULAND, H., SIMON, R., SCHLOMM, T., STEURER, S. & KRECH, T. 2015. Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) characterizes an aggressive subset of prostate cancers and predicts patient prognosis independently from pre- and postoperatively assessed clinicopathological parameters. *Carcinogenesis*, 36, 1333-40.

MOCH, H. 2016. [The WHO/ISUP grading system for renal carcinoma]. *Pathologe*, 37, 355-60.

MOTZER, R. J., RAVAUD, A., PATARD, J. J., PANDHA, H. S., GEORGE, D. J., PATEL, A., CHANG, Y. H., ESCUDIER, B., DONSKOV, F., MAGHELI, A., CARTENI, G., LAGUERRE, B., TOMCZAK, P., BREZA, J., GERLETTI, P., LECHUGA, M., LIN, X., CASEY, M., SERFASS, L., PANTUCK, A. J. & STAEHLER, M. 2018. Adjuvant Sunitinib for High-risk Renal Cell Carcinoma After Nephrectomy: Subgroup Analyses and Updated Overall Survival Results. *Eur Urol*, 73, 62-68.

NATIONAL-CANCER-INSTITUTE. 2018a. *CPI-1205* [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/ezh2-inhibitor-cpi-1205> [Accessed December 06 2018].

NATIONAL-CANCER-INSTITUTE. 2018b. *Tazemetostat* [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/tazemetostat> [Accessed December 06 2018].

NGO, T. C., WOOD, C. G. & KARAM, J. A. 2014. Biomarkers of renal cell carcinoma. *Urol Oncol*, 32, 243-51.

NOLAN, K. D., FRANCO, O. E., HANCE, M. W., HAYWARD, S. W. & ISAACS, J. S. 2015. Tumor-secreted Hsp90 subverts polycomb function to drive prostate tumor growth and invasion. *J Biol Chem*, 290, 8271-82.

POIRIER, J. T., GARDNER, E. E., CONNIS, N., MOREIRA, A. L., DE STANCHINA, E., HANN, C. L. & RUDIN, C. M. 2015. DNA methylation in small cell lung cancer

defines distinct disease subtypes and correlates with high expression of EZH2. *Oncogene*, 34, 5869-78.

REUTER, V. E. & TICKOO, S. K. 2010. Differential diagnosis of renal tumours with clear cell histology. *Pathology*, 42, 374-83.

ROBERT-KOCH-INSTITUT. 2017. *Krebs in Deutschland 2013/2014* [Online]. Available: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/kid_2017_c64_niere.pdf?__blob=publicationFile [Accessed December 05 2018].

SAKURAI, T., BILIM, V. N., UGOLKOV, A. V., YUUKI, K., TSUKIGI, M., MOTOYAMA, T. & TOMITA, Y. 2012. The enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), a potential therapeutic target, is regulated by miR-101 in renal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 422, 607-14.

SAUTER, G., SIMON, R. & HILLAN, K. 2003. Tissue microarrays in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 962-72.

SAUVAGEAU, M. & SAUVAGEAU, G. 2010. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell*, 7, 299-313.

SCHMIDT, M. D. C. 2017. Multigentests zur Risikoabschätzung bei frühen Mammakarzinom. *Der Gynäkologe*, 7, 50:509-515.

SHEN, S. S., TRUONG, L. D., SCARPELLI, M. & LOPEZ-BELTRAN, A. 2012. Role of immunohistochemistry in diagnosing renal neoplasms: when is it really useful? *Arch Pathol Lab Med*, 136, 410-7.

SIMON, J. A. & LANGE, C. A. 2008. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res*, 647, 21-9.

SRIGLEY, J. R., DELAHUNT, B., EBLE, J. N., EGEVAD, L., EPSTEIN, J. I., GRIGNON, D., HES, O., MOCH, H., MONTIRONI, R., TICKOO, S. K., ZHOU, M., ARGANI, P. & PANEL, I. R. T. 2013. The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *Am J Surg Pathol*, 37, 1469-89.

SUN, C., ZHAO, C., LI, S., WANG, J., ZHOU, Q., SUN, J., DING, Q., LIU, M. & DING, G. 2018. EZH2 Expression is increased in BAP1-mutant renal clear cell carcinoma and is related to poor prognosis. *J Cancer*, 9, 3787-3796.

THE-HUMAN-PROTEIN-ATLAS. 2018. *EZH2* [Online]. Available: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000106462-EZH2/tissue> [Accessed February 2 2018].

THOENES, W., STORKEL, S. & RUMPELT, H. J. 1986. Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histopathological elements and their use for diagnostics. *Pathol Res Pract*, 181, 125-43.

TSIVIAN, M., MOREIRA, D. M., CASO, J. R., MOURAVIEV, V. & POLASCIK, T. J. 2011. Cigarette smoking is associated with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 29, 2027-31.

VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 10, 789-99.

WAGENER, N., MACHER-GOEPFINGER, S., PRITSCH, M., HUSING, J., HOPPE-SEYLER, K., SCHIRMACHER, P., PFITZENMAIER, J., HAFERKAMP, A., HOPPE-SEYLER, F. & HOHENFELLNER, M. 2010. Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is an independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *BMC Cancer*, 10, 524.

WANG, Y., CHEN, Y., GENG, H., QI, C., LIU, Y. & YUE, D. 2015. Overexpression of YB1 and EZH2 are associated with cancer metastasis and poor prognosis in renal cell carcinomas. *Tumour Biol*, 36, 7159-66.

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., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., VERSCHUREN, W. M., LJUNGBERG, B., HALLMANS, G., BERGLUND, G., GONZALEZ, 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.

2008. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol*, 167, 438-46.

XU, Z. Q., ZHANG, L., GAO, B. S., WAN, Y. G., ZHANG, X. H., CHEN, B., WANG, Y. T., SUN, N. & FU, Y. W. 2015. EZH2 promotes tumor progression by increasing VEGF expression in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Transl Oncol*, 17, 41-9.

ZHAO, W., TIAN, B., WU, C., PENG, Y., WANG, H., GU, W. L. & GAO, F. H. 2015. DOG1, cyclin D1, CK7, CD117 and vimentin are useful immunohistochemical markers in distinguishing chromophobe renal cell carcinoma from clear cell renal cell carcinoma and renal oncocytoma. *Pathol Res Pract*, 211, 303-7.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Guido Suter, für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die wertvollen Anregungen und stets freundliche Unterstützung bei der Entstehung und Umsetzung.

Besonders möchte ich mich auch für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei Herrn Dr. med. Till Eichenauer bedanken.

Für die freundliche Unterstützung gilt mein Dank Herrn PD Dr. Ronald Simon und Frau Dr. Martina Kluth aus dem Institut für Pathologie.

Ich danke meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und meinen Geschwistern und Freunden für die herzliche und tatkräftige Unterstützung.

9 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

10 Eidesstattliche Erklärung

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

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

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

Unterschrift: