

Diplomarbeit

**Expressionsmuster und epigenetische Regulation von
Immunreaktion-assoziierten Genen im
Nierenzellkarzinom**

eingereicht von

Jennifer Monika Moritz

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde

(Dr.ⁱⁿ med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Onkologie

Universitätsklinik für Innere Medizin

unter der Anleitung von

Assoz. Prof.ⁱⁿ Priv.-Doz.ⁱⁿ Mag.^a Dr.ⁱⁿ rer.nat. Nadia Dandachi

und

Assoz.-Prof. Priv.-Doz. Mag.rer.nat. Dr.med.univ. Martin Pichler

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 14.02.2018

Jennifer Monika Moritz eh

Danksagungen

Zu Beginn möchte ich mich herzlich bei meinen beiden Betreuern bedanken, Assoz. Prof.ⁱⁿ Priv.-Doz.ⁱⁿ Mag.^a Dr.ⁱⁿ Nadia Dandachi und Assoz. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr. Martin Pichler, die mir die Möglichkeit geboten haben, meine Diplomarbeit an der klinischen Abteilung für Onkologie zu verfassen, und ohne deren Hilfe und Bemühungen diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Ganz besonderer Dank gebührt Frau Dr. Dandachi, die mich sowohl bei der Durchführung der Laborarbeiten als auch beim Verfassen der Diplomarbeit stets mit ihrer ausgezeichneten fachlichen und didaktischen Kompetenz unterstützt hat und mir bei Fragen jederzeit helfend zur Seite stand.

Außerdem bedanke ich mich auch bei Dr.ⁱⁿ Verena Tiran und Jacqueline Truskaller MSc, ohne deren Einschulung und Hilfe im Labor diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte diese Diplomarbeit auch nutzen, um mich bei meinen Eltern zu bedanken, die mich immer in allen Entscheidungen unterstützt und mir durch ihre finanzielle Hilfe und ihren seelischen Beistand das Medizinstudium überhaupt erst ermöglicht haben.

Des Weiteren danke ich meinem Freund Lucas Rösler, nicht nur für das Korrekturlesen, sondern auch für die motivierenden und ermutigenden Worte beim Verfassen dieser Diplomarbeit, und die emotionale Unterstützung in meiner Studienzeit.

Zusammenfassung

Hintergrund

In vielen Karzinomarten wurden tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) als prognostische histologische Marker vorgeschlagen. Es existieren keine standardisierten Analysen zur Beurteilung von TIL, was die Wichtigkeit der Suche nach immunassoziierten verlässlichen Biomarkern im Karzinomgewebe verdeutlicht. Daher war es Ziel unserer Arbeit die epigenetische Regulation von immunassoziierten Genexpressionsmustern im Nierenzellkarzinom (RCC) sowie die mögliche prognostische Relevanz der Expression dieser Gene für RCC PatientInnen zu bestimmen.

Material und Methoden

Die Zelllinien RCC-FG1 und RCC-MF des klarzelligen Nierenzellkarzinoms wurden für 72 Stunden mit 5µM und 10µM der demethylierenden Substanz 5-Azacytidin behandelt. Anschließend wurde im Rahmen einer Real time PCR die Expression der immunassoziierten Gene CD3G, CD3D, CXCR1, CCRL2, LAX1, Sit1 und ICOS auf diesen behandelten Zelllinien bestimmt und mit der Expression auf nicht behandelten Zellen verglichen. Zusätzlich wurden Daten aus dem The Cancer Genome Atlas (TCGA) verwendet, um die Methylierungs- und Expressionsmuster der einzelnen Gene zwischen Nierenkarzinomgewebe und normalem Nierengewebe zu vergleichen. Die prognostische Relevanz der Expressionshöhe dieser Gene wurde mittels Kaplan Meier Kurven untersucht.

Ergebnisse

Sowohl RCC-FG1 als auch RCC-MF zeigten eine signifikant höhere Expression von CD3G, CD3D und CCRL2 nach der 5-AZA Behandlung, während die Expression von CXCR1, LAX1, Sit1 und ICOS durch 5-AZA nicht gesteigert wurde. Durch die Analyse der TCGA Methylierungsprofile von RCC PatientInnen zeigte sich, dass die DNA der Promoterregion dieser immunassoziierten Gene höher methyliert war als die in normalem Nierengewebe. Passend zum Methylierungsstatus wurde auch eine höhere Genexpression im Tumorgewebe festgestellt. Zusätzlich zeigte die Analyse der TCGA Daten ein signifikant besseres Überleben für RCC PatientInnen mit hoher Expression der Gene CCRL2, LAX1 und CD3G.

Konklusion

Die gesteigerte Expression von CD3G, CD3D und CCRL2 zeigte eine in einem gewissen Ausmaß Methylierungs-abhängige Regulation dieser Gene in Karzinomzellen. Die höhere Genexpression der Immungene im Tumorgewebe könnte durch eine Tumorinfiltration mit Lymphozyten bedingt sein. Eine höhere Expression des Gens CCRL2 ist bei RCC

PatientInnen mit einem signifikant besseren Überleben verbunden und könnte im Rahmen weiterer Forschung eventuell gemeinsam mit anderen signifikanten immunassoziierten Genen als histologisch-prognostischer Marker eingesetzt werden.

Abstract

Background

Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) have been proposed as a prognostic histological hallmark in many types of cancer. The analysis and interpretation of TILs are not standardized, making the search for immune-related reliable biomarkers in cancer tissue important. Therefore, our study aims to determine epigenetic regulation of immune-related gene expression patterns in renal cell carcinoma (RCC) and prognostic relevance of immune-related gene expression in RCC patients.

Material and methods

The clear cell RCC cell lines RCC-FG1 and RCC-MF were treated for 72 hours with 5 μ M and 10 μ M of the demethylating agent 5-azacytidine. Real-time quantitative PCR was performed to compare the expression of the immune-related genes CD3G, CD3D, CXCR1, CCRL2, LAX1, Sit1 and ICOS between 5-AZA-treated cells and untreated cells. In addition, data from the Cancer Genome Atlas (TCGA) was used to compare methylation and expression patterns of these genes between RCC cancerous tissue and matched pairs of normal renal tissue. The prognostic relevance of these genes was examined using Kaplan Meier curves.

Results

Both RCC-FG1 and RCC-MF showed significantly increased expression of CD3G, CD3D and CCRL2 after 5-AZA treatment, whereas CXCR1, LAX1, Sit1 and ICOS were not induced by 5-AZA. Using TCGA genome-wide methylation profiles from RCC patients, we found the DNA of the promoter region of these immune-related genes to be higher methylated in normal tissue compared to tumor tissue. In line with the methylation status, we found a higher gene expression in tumor tissue compared to normal tissues. Finally, analysis of the TCGA dataset also revealed a significant better overall survival for RCC patients with high expression of CCRL2, LAX1 and CD3G.

Conclusion

The increased expression of CD3G, CD3D and CCRL2 indicated to some extent a methylation-dependent regulation of these genes in cancer cells. The higher gene expression of immune genes in tumor tissue could be explained by tumor infiltration with lymphocytes and may be linked to better overall survival in RCC patients.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNGEN.....	II
ZUSAMMENFASSUNG.....	III
ABSTRACT	V
INHALTSVERZEICHNIS	VI
GLOSSAR UND ABKÜRZUNGEN.....	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IX
TABELLENVERZEICHNIS	X
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 NIERENZELLKARZINOM	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Ätiologie	1
1.1.3 Pathogenese.....	1
1.1.4 Morphologie	2
1.1.5 Klinische Symptomatik	4
1.1.6 Bildgebende Diagnostik.....	4
1.1.7 Biopsie und histologische Diagnostik.....	6
1.1.8 Labordiagnostik.....	7
1.1.9 Metastasierungsverlauf	8
1.1.10 Tumorklassifizierung	8
1.1.11 Therapieoptionen.....	11
1.1.12 Prognostische Faktoren.....	14
1.2 DNA-METHYLIERUNG.....	15
1.3 5-AZACYTIDIN	16
1.4 IMMUNREAKTION-ASSOZIIERTE GENE	17
1.4.1 Genaktivität in Karzinomen.....	17
1.4.2 CCRL2	18
1.4.3 CD3D.....	18
1.4.4 CD3G.....	18
1.4.5 CXCR1.....	19
1.4.6 LAX1	19
1.4.7 Sit1.....	20
1.4.8 ICOS	20
1.5 ZIELSETZUNG.....	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 VERWENDETE ZELLINIE UND KULTURBEDINGUNGEN	22
2.1.1 RCC FGI	22
2.1.2 RCC MF.....	22
2.2 BEHANDLUNG DER ZELLINIEN MIT 5-AZACYTIDIN	22
2.3 ISOLIERUNG VON GESUNDEN LEUKOZYTEN	23
2.4 RNA ISOLIERUNG	23
2.5 RNA MESSUNG	24
2.6 REVERSE TRANSKRIPTASE-POLYMERASE-KETTENREAKTION (RT-PCR)	24
2.7 REAL TIME PCR	25
2.7.1 Durchführung	25
2.7.2 Primer.....	26
2.7.3 Haushaltsgene	28
2.7.4 Verdünnungsreihen.....	29
2.7.5 Expression der immunassoziierten Gene auf Leukozyten	29
2.7.6 Gelelektrophorese.....	30
2.7.7 Berechnung des Genexpressionsgrades.....	30
2.7.8 In silico Klarzelliges Nierenzellkarzinom Kollektiv (TCGA).....	31
2.7.9 In silico TCGA Überlebensdaten.....	31
2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	31
3 ERGEBNISSE – RESULTATE.....	32

3.1	EFFIZIENZBESTIMMUNG DER PRIMER.....	32
3.2	GELELEKTROPHORESE	34
3.3	EXPRESSION AUF LEUKOZYTEN	35
3.4	5-AZACYTIDIN-BEHANDLUNG	36
3.4.1	<i>RCC FGI</i>	36
3.4.2	<i>RCC MF</i>	38
3.5	IN SILICO-VERGLEICH DER METHYLIERUNG IN NORMALEN NIERENZELLEN UND NIERENKARZINOMZELLEN.....	40
3.6	IN SILICO ANALYSE DES ZUSAMMENHANGS ZWISCHEN GENEXPRESSION UND ÜBERLEBENSDAUER .	43
4	DISKUSSION.....	46
4.1	KLINISCHE BEDEUTUNG VON 5-AZACYTIDIN IN DER TUMORTHERAPIE	49
4.2	IN SILICO VERGLEICH DER METHYLIERUNG UND EXPRESSION VON IMMUNGENEN ANHAND VON TCGA DATEN	51
5	FAZIT UND AUSBLICK.....	53
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	54

Glossar und Abkürzungen

VHL-Protein	Von-Hippel-Lindau-Protein
HIF	Hypoxie induzierende Faktoren
VEGF	Vascular endothelial growth factor
PDGF	Platelet derived growth factor
RCC	Renal cell carcinoma
UICC	Union internationale contre le cancer
mTOR	Mammalian target of rapamycin
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
PD1-Rezeptor	Programmed-death-Rezeptor
DNMT	DNA-Methyltransferase
CCRL2	C-C Motif Chemokine Receptor Like 2
CMKLR	Chemokine-like receptor
CD3D	T-Cell Receptor T3 Delta Chain
CD3G	T-Cell Receptor T3 Gamma Chain
CXCR	C-X-C Motif Chemokine Receptor
LAX	Linker For Activation Of X Cells
Sit	Suppression-Inducing Transmembrane Adapter
ICOS	Inducible T-Cell Co-Stimulator
AZA	5-Azacytidin
PBS	Phosphate buffered saline
DMSO	Dimethylsulfoxid
RBC	Red blood cell
BCP	1-Brom-3-Chloropropan
NAC	Non amplification control
dnTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
NTC	Non amplification control
YWHAZ	Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
IRS1-Protein	Insulin-receptor substrate protein
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Bp	Basenpaare

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.: Zellwachstum RCC FG1 und RCC MF	22
Abbildung 2.: Verdünnungsreihen	33
Abbildung 3: Gelelektrophorese.....	34
Abbildung 4: Immungenexpression auf Leukozyten.....	35
Abbildung 5: Relative Immungenexpression RCC FG1	37
Abbildung 6: Relative Immungenexpression auf RCC MF.....	39
Abbildung 7: Methylierungsvergleich Karzinomzellen und gesunde Zellen.....	41
Abbildung 8: Expressionsvergleich Karzinomzellen und gesunde Zellen.....	42
Abbildung 9: In silico Analyse TCIA	43
Abbildung 10: In silico Analyse TCIA	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mutationen beim RCC.....	3
Tabelle 2: TNM-Klassifikation: Tumorausbreitung.....	9
Tabelle 3: TNM-Klassifikation : Lymphknotenbefall.....	9
Tabelle 4: TNM-Klassifikation: Fernmetastasen	9
Tabelle 5: WHO-Grading	10
Tabelle 6: Fuhrmann-Grading	10
Tabelle 7: ISUP-Grading	11
Tabelle 8: Primersequenzen.....	27

1 Einleitung

1.1 Nierenzellkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Beim Nierenzellkarzinom handelt es sich um einen bösartigen epithelialen Tumor des Nierenparenchyms. Mit einer Inzidenz von 4-5/100.000 in Europa zählt die Tumorentität zu den eher selten auftretenden Karzinomen. Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung findet sich um das 60. Lebensjahr. Ein frühes Erkrankungsalter um das 40. Lebensjahr ist oft mit einer familiären Form der Erkrankung vergesellschaftet, die jedoch deutlich seltener auftritt als die sporadische Form. Männer sind von Nierenzellkarzinomen etwa zwei bis drei Mal so häufig betroffen wie Frauen. (Böcker et al., 2012)

1.1.2 Ätiologie

Nikotinabusus, Adipositas und Karzinogen-Exposition, beispielsweise in Form von Asbest, und Nierenzysten bei chronischer Niereninsuffizienz gelten als Risikofaktoren für die Entstehung eines Nierenzellkarzinoms (Keller and Geberth, 2010).

Ebenso variiert die Inzidenz je nach ethnischer Zugehörigkeit, so sind in den Vereinigten Staaten vorwiegend Einheimische, amerikanische UreinwohnerInnen und AfroamerikanerInnen betroffen, während das Nierenzellkarzinom bei Amerikanern asiatischen Ursprungs am seltensten auftritt. Andere Risikofaktoren wie zum Beispiel der übermäßige Konsum von rotem Fleisch sind nach wie vor umstritten. Des Weiteren wurde von Tavani et al. ein Zusammenhang zwischen verminderter körperlicher Aktivität und einem erhöhten Nierenzellkarzinomrisiko gefunden (Tavani et al., 2007). So könnten neun Prozent der Nierenkarzinomfälle mit gesteigerter sportlicher Aktivität verhindert werden, jedoch könnte dieses Studienergebnis durch die mit dem Aktivitätsgrad der ProbandInnen zusammenhängenden BMI beeinflusst worden sein (Hsieh et al., 2017).

1.1.3 Pathogenese

Des Weiteren spielen genetische Faktoren eine Rolle. Bisher konnte ein Zusammenhang zwischen Chromosomenaberrationen in Form einer Deletion 3p-, einer Translokation t(3;8) und t(3;11) sowie Mutationen der Onkogene c-myc, c-fms und c-erbB und der Entstehung renaler Karzinome festgestellt werden. Die häufigste festgestellte genetische Veränderung ist eine Fehlfunktion des Tumorsuppressorgens VHL (3p25-3p26) (Keller and Geberth, 2010). Tatsächlich zeigt sich ein VHL-Verlust in 60-90% der sporadisch auftretenden klarzelligen Nierenkarzinome. Entweder durch Mutation oder durch Methylierung des

Tumorsuppressorgens kommt es zu einer vermehrten Aktivierung der Hypoxie-induzierten Faktoren (HIF) (Jonasch et al., 2014). Das VHL-Protein bildet mit Elongin B, Elongin C, Cul2 und Rbx1 einen Komplex, der als Ligand vor allem an der α -Untereinheit des HIF bindet (Brugarolas, 2014).

Aufgabe des VHL Proteins ist es als Teil des E3 Ubiquitin Ligase Komplexes unter anderem, bei Normoxie die Transkriptionsfaktoren HIF1 α und HIF2 α zu reduzieren. Beide Transkriptionsfaktoren sind dafür verantwortlich, bestimmte Gene bei vorliegender Hypoxie zu aktivieren. Liegt eine Funktionsstörung des VHL Proteins vor, fällt die VHL-assoziierte Proteolyse von HIF1 und HIF2 bei Normoxie weg, sodass die beiden Transkriptionsfaktoren auch unter normalen Sauerstoffbedingungen pathologischerweise voll aktiv sind. Dadurch kommt es zu einer vermehrten Expression von Proteinen, die die Angiogenese regulieren, wie zum Beispiel der Vascular endothelial growth factor (VEGF) oder der platelet-derived growth factor B chain (PDGF-B). Durch die vermehrte Expression der beiden Proteine ergibt sich die bekannte Hypervaskularität des klarzelligen Nierenkarzinoms. Spezielle zielgerichtete Therapien des bösartigen Tumors nutzen diesen Mechanismus als Angriffspunkt (Gudas et al., 2014).

1.1.4 Morphologie

Nierenzellkarzinome entstammen histologisch meist aus Zellen des distalen Tubulus, können ihren Ursprung aber auch aus dem proximalen Tubulus oder den Sammelrohren nehmen. Je nach Histologie kann folgende Einteilung der Karzinome getroffen werden:

- Klarzellig (80%)
- Papillär (15%)
- Chromophob (5%)
- Ductus-Bellini Karzinom (0,6%)

Das klarzellige Nierenkarzinom ist der häufigste Subtyp und nimmt seinen Ursprung aus den Zellen des proximalen Tubulus. Bei einem großen Teil der Betroffenen findet sich eine Veränderung des Von-Hippel-Lindau-Gens. Auch der papilläre Subtyp entsteht aus proximalen Tubuluszellen, während das chromophobe Karzinom dem distalen Tubulus und das Onkozytom den Sammelrohren entstammt (Hautmann and Gschwend, 2014).

1.1.4.1 Klarzelliges Nierenzellkarzinom

Bei mehr als 75% aller primären Nierenzelltumore handelt es sich um den klarzelligen Typ, dessen Tumorgewebe aufgrund von Lipid- und Glykogeneinlagerungen klar erscheint. Die Tumore sind meist durch eine Hypervaskularität gekennzeichnet, sowie von

Gewebsnekrosen. Außer des in bis zu 75% der Fälle nachweisbarem inaktivierten VHL-Tumorsuppressorgens treten auch andere, seltenere Mutationen auf, z.B. Inaktivierungen von Histon-modifizierenden Genen wie SETD2 (10-12%), PBRM1 (40%) und BAP1 (10%) (Bellmunt et al., 2014).

1.1.4.2 Papilläres Nierenzellkarzinom

Papilläre Nierenzellkarzinome weisen histologisch eine tubulopapilläre Morphologie auf, und können wiederum in zwei Subtypen unterteilt werden. Typ 1 ist durch kleine Zellen mit wenig Zytoplasma gekennzeichnet, während Typ 2 charakteristischerweise große pseudostratifizierte Zellen mit eosinophilem Zytoplasma besitzt und meist ein schlechteres Outcome aufgrund eines aggressiveren Krankheitsverlaufes aufweist. Im Gegensatz zu klarzelligen Nierenkarzinomen lassen sich beim papillären Subtyp andere Mutationen nachweisen. Hereditäre Formen des papillären Nierenzellkarzinoms sind mit folgenden Syndromen und Mutationen assoziiert:

Syndrom	Mutation	Assoziierte Karzinomsubtypen
Hereditäres papilläres Nierenzellkarzinom	MET/HGFR Hepatozyten-Wachstumsfaktorrezeptor	Papilläres Nierenzellkarzinom Typ 1
Hereditäres Leiomyomatose-Nierenzellkarzinom-Syndrom	Fumarathydratase	Papilläres Nierenzellkarzinom Typ 2
Tuberöse Sklerose	Hamartin Tuberin	Klarzelliges/ papilläres/chromophobes Nierenzellkarzinom/ Onkozytom
Birt-Hogg-Dube-Syndrom	Folliculin	Klarzelliges/ papilläres/chromophobes Nierenzellkarzinom/ Onkozytom

Tabelle 1 : Bekannte Mutationen bei den einzelnen Subtypen des Nierenzellkarzinoms, sowie damit assoziierte Syndrome (Courthod et al., 2015).

1.1.4.3 Chromophobes Nierenzellkarzinom

Das chromophobe Nierenzellkarzinom präsentiert sich mit einem soliden trabekulären Zellmuster mit hellem flockigem Zytoplasma und irregulären Kernformen. Makroskopisch ist der Tumor mit einer durchschnittlichen Größe von 6 cm größer als die anderen Typen der Nierenzellkarzinome. Oft ist das Karzinom von nekrotischen Läsionen umgeben, manchmal lässt sich auch eine zentrale Narbe im Tumorgewebe finden.

Zur Diagnostik des chromophoben Subtyps ist die Immunhistochemie von großer Bedeutung, da die Zellen eine positive Reaktion auf kolloidales Eisen und Keratin zeigen, aber eine negative Reaktion auf Vimentin. Dies dient als Hilfe zur Unterscheidung

zwischen dem klarzelligen und dem chromophobem Nierenzellkarzinom, da das klarzellige Nierenkarzinom eine positive Reaktion auf Vimentin zeigt (Badowska-Kozakiewicz et al., 2016).

1.1.4.4 Ductus Bellini Karzinom

Das Ductus Bellini Karzinom wird auch Sammelrohrkarzinom genannt und ist eine äußerst selten auftretende Tumorentität. Das Karzinom entsteht aus dem Sammelrohrepithel der Niere und ist durch ein schnelles Wachstum und einen aggressiven Krankheitsverlauf gekennzeichnet. Histologisch lassen sich tubuläre Strukturen nachweisen, sowie des Öfteren auch sarkomähnliche Tumorareale mit Spindelzellen (Böcker et al., 2012).

1.1.5 Klinische Symptomatik

Vor vielen Jahren wurde bei PatientInnen mit RCC die Diagnose meist erst gestellt, wenn sich diese mit Spätsymptomatik wie Flankenschmerz, Makrohämaturie oder einem palpablen Abdominaltumor vorstellten. Heutzutage sind der Großteil der festgestellten Nierenkarzinome Zufallsbefunde, die im Rahmen einer Abdomensonographie oder einer CT-Untersuchung entdeckt werden. Auch paraneoplastische Syndrome kommen beim RCC des Öfteren vor, unter anderem können Hyperkalzämie, Fieber und eine Erythrozytose durch die vom Tumor ausgeschütteten Hormone oder Zytokine verursacht werden. Das klarzellige Nierenzellkarzinom kann sich radiologisch variabel präsentieren, typisch sind aber ein exophytisches Tumorwachstum, heterogenes Tumorgewebe aufgrund von Nekrosen und starke Kontrastmittelaufnahme (Jones, 2012).

1.1.6 Bildgebende Diagnostik

1.1.6.1 Sonographie

Die Abdomensonographie eignet sich als einfache nicht-invasive und nicht-strahlenbelastende Untersuchung und durch die sonographisch gut darstellbaren Nieren sehr gut als diagnostische Methode für Nierenzellkarzinome. Der Großteil der bösartigen Neoplasien der Niere wird heute als Zufallsbefund im Rahmen einer durchgeführten Abdomensonographie gefunden (García Álvarez T. , et al., 2011).

Das sonographische Bild kann, je nachdem welche Unterform des Nierenzellkarzinoms vorliegt, variieren. Typischerweise präsentiert sich der Tumor aber als runde, isoechogene Struktur, die sich im Nierenparenchym vorwölbt. Die Karzinome können auch echoarm sein, und auch atypische hyperechogene Neoplasien kommen vor, vor allem bei

Frühstadien des RCC. Häufig findet man auch einen echofreien Randsaum um den Tumor, der durch verdrängte Gefäße entsteht. Da das RCC hämatogen in die Vena renalis und in die Vena cava inferior metastasiert, ist es bei der sonographischen Diagnostik obligat, auch die Nierenvenen, die Vena cava und die regionalen Lymphbahnen sonographisch zu untersuchen (Schmidt, 2002).

1.1.6.2 Computertomographie

Bei einem verdächtigen Ultraschallbefund ist das CT der Goldstandard zur weiteren Diagnostik. Die Untersuchung sollte immer einmal mit und einmal ohne Kontrastmittel erfolgen. Wird vor und nach der Kontrastmittelapplikation eine Differenz der Hounsfield unit von mehr als 15 gemessen, besteht dringender Malignitätsverdacht. Bei Vorliegen einer malignen Neoplasie liefert der CT-Befund wichtige Informationen zum weiteren Staging des Tumors, so können anhand der Bildgebung die Größe des Primärtumors, sein Vaskularisierungsgrad, der regionale Lymphknotenstatus, etwaige Lebermetastasen und die Morphologie und Funktion der kontralateralen Niere beurteilt werden (Bellmunt et al., 2014).

1.1.6.3 Bildgebende Verfahren zur Differentialdiagnose benigner Tumore

Gutartige Tumore in der Niere sind eher selten, die beiden häufigsten sind dabei das Onkozytom und das Angiomyolipom. Gerade bei kleinen Neubildungen unter vier cm kann es schwierig sein, zwischen benignen und malignen Neoplasien zu differenzieren, was aber essentiell für die weitere Behandlung ist. Eine falsche Diagnose führt unter Umständen dazu, dass ein eigentlich benigner Tumor mit einer Nephrektomie übertherapiert wird, oder aber ein maligner Tumor nicht sofort chirurgisch oder chemotherapeutisch adäquat therapiert wird (Woo and Cho, 2015). Die Tumore lediglich anhand ihrer Größe oder anatomischen Lage zu differenzieren, ist nicht möglich, weshalb zur Differentialdiagnostik primär auf radiologische Merkmale geachtet wird (Pierorazio et al., 2013).

1.1.6.3.1 DD Angiomyolipom

Angiomyolipome bestehen, wie der Name schon sagt, aus Blutgefäßen, glatter Muskulatur und Fettgewebe. Radiologisch können zwei Unterformen auftreten, das klassische Angiomyolipom mit hohem Anteil an Fettgewebe, oder aber derselbe Tumor mit minimalem Fettgewebsgehalt. Die klassische Form ist durch den hohen Gehalt an Fettgewebe radiologisch einfach vom Nierenzellkarzinom zu unterscheiden,

Schwierigkeiten in der Differentialdiagnostik können aber bei der zweiten Unterform entstehen. In Untersuchungen zeigte sich, dass sonographisch ein Unterschied in der Echogenität festgestellt werden kann, da auch das Angiomyolipom mit sehr geringem Fettanteil eine höhere Echogenität als alle Subtypen des Nierenzellkarzinoms zeigte. In CT-Untersuchungen zeigt sich beim Angiomyolipom typischerweise eine verstärkte Röntgenstrahlabschwächung, eine so genannte Hyperattenuation. Dieser Effekt zeigt sich deutlich öfter in Angiomyolipomen als in Nierenzellkarzinom, und kann darum zur Differentialdiagnostik herangezogen werden. Zusätzlich kann im MRT bei diesem Tumor oft eine schwache T2-gewichtete Signalintensität festgestellt werden (Woo and Cho, 2015).

1.1.6.3.2 DD Onkozytom

Das Onkozytom stellt die zweithäufigste benigne Neoplasie der Niere dar und tritt vorwiegend in der siebenten Lebensdekade bei Männern auf. Onkozytome präsentieren sich sonographisch mit sehr homogenem Gewebe, was bei Nierenzellkarzinomen nur sehr selten vorkommt. Sehr charakteristisch für den gutartigen Tumor ist eine zentrale Narbe in der Bildgebung, das so genannte Radspeichenphänomen, das aber in sehr kleinen Tumoren (<4 cm) meist nicht gesehen werden kann. Auf CT-Bildern stellt sich das Onkozytom meist als solitärer homogener Tumor dar, ohne Einblutung, Kalzifizierungen oder Nekrosen, wie sie oft bei Nierenzellkarzinomen zu finden sind (Woo and Cho, 2015).

1.1.7 Biopsie und histologische Diagnostik

Da gerade bei kleinen Tumormassen im Anfangsstadium die Differenzialdiagnostik zwischen einer benignen und einer malignen Neoplasie ausschließlich anhand der Klinik und Bildgebung schwierig sein kann, kommt hier auch eine zusätzliche Biopsie in Frage (Patel et al., 2016). Ist eine Tumormasse nämlich bildgebend nicht ausreichend beurteilbar, besteht die Gefahr der Übertherapie, wenn bei einer eigentlich benignen Raumforderung aufgrund einer falschen Beurteilung nephrektomiert wird. Außerdem bestehen bei sehr kleinen RCC als Alternative zur Nierenentfernung minimalinvasivere Methoden wie eine Radiofrequenzablation oder Kryotherapie zur Verfügung, die aber zuvor einer Biopsie bedürfen (Khan et al., 2007).

Generell muss immer Nutzen und Risiko einer Biopsie abgewogen werden. Die häufigste Komplikation stellen Hämatome dar, gefolgt von postinterventionellen Schmerzen, Hämaturie und Pneumothorax. Generell besteht auch das Risiko einer

Tumorzellverschleppung, was in der Praxis aber selten tatsächlich vorkommt (Patel et al., 2016).

Folgende Punkte stellen unter anderem eine Indikation zur perkutanen Biopsie der renalen Tumormasse dar:

1. Anhand der Bildgebung kann nicht beurteilt werden, ob es sich um eine benigne oder maligne Raumforderung handelt.
2. Renale Raumforderung bei bekanntem extrarenalem primärem Malignom: Hier wird eine Biopsie durchgeführt um festzustellen, ob in der Niere ein weiterer maligner oder benigner Primärtumor besteht oder es sich um eine Metastase der extrarenalen Neoplasie handelt.
3. Nicht resezierbare Raumforderung: In diesem Fall muss eine Biopsie erfolgen, um bei vorliegender Malignität eine systemische Therapie einleiten zu können.
4. Renale Raumforderung bei schwerwiegenden Komorbiditäten: In diesem Fall sollte primär eine Biopsie einer Nephrektomie vorgezogen werden, da die Operation für komorbide PatientInnen ein hohes Komplikationsrisiko bringt. Selbst wenn sich anschließend bei der Biopsie ein Malignom ergibt, kann abgewogen werden, ob ein kleines RCC in Anbetracht der Komorbiditäten unbehandelt die Lebenserwartung überhaupt senken würde.
5. Renale Raumforderung nach Infektion: In diesem Fall muss vor Nephrektomie unbedingt eine Biopsie erfolgen, um festzustellen, ob es sich bei der Raumforderung eventuell um eine bakterielle Pyelonephritis oder einen Abszess handelt, die mit Antibiotika behandelt werden können (Caoili and Davenport, 2014) (Scanga and Maygarden, 2014).

1.1.8 Labordiagnostik

Bei PatientInnen mit Nierenzellkarzinom zeigen sich in den Laborwerten unter Umständen einige Veränderungen wie eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit, ein anämisches Blutbild, erhöhte Enzymwerte als Zeichen einer Leberdysfunktion (erhöhte alkalische Phosphatase, verlängerte PTT und Thrombinzeit, erhöhte α 1-Globuline) sowie eine Hyperkalzämie. Des Weiteren kann des Öfteren ein erhöhter Tumor-M2-Pyruvat-Kinase-Wert gefunden werden, dies tritt jedoch auch bei anderen Karzinomen auf, und ist nicht zur spezifischen Diagnostik beim Nierenzellkarzinom geeignet (Paumgartner and Steinbeck, 2013).

1.1.9 Metastasierungsverlauf

Nierenzellkarzinome metastasieren primär hämatogen, und auf diesem Weg vorwiegend in Lunge (75%), Knochen (40%), Leber (30%), Nebennieren (20%) und Gehirn (15%). Eine lymphogene Metastasierung erfolgt seltener, hier vor allem in die regionären Lymphknoten am Nierenhilus sowie paraaortal und parakaval (Böcker et al., 2012).

1.1.10 Tumorklassifizierung

1.1.10.1 Staging

Zum Staging eines Tumors wird international das sogenannte TNM-System der UICC verwendet. Mithilfe des Systems kann eine anatomische Ausbreitung eines Karzinoms beschrieben werden. Mit dem Buchstaben T wird dabei die Ausbreitung des Primärtumors beschrieben, N steht für eventuell vorhandene Lymphknotenmetastasen, während M die möglicherweise vorhandenen Fernmetastasen kennzeichnet. Durch Hinzufügen der Ziffern 0-4 hinter diesen Buchstaben wird die jeweilige Ausbreitung des Tumors oder der Metastasen beschrieben (Wittekind et al., 2014). Des Weiteren finden sich vor dem T zur Primärtumorklassifikation weitere Buchstaben, die beschreiben, anhand welcher Anhaltspunkte das Staging durchgeführt wurde. Am häufigsten findet sich hierbei ein p (z.B. pT1), was bedeutet, dass das Staging auf einem histopathologischen Befund beruht. C steht für ein klinisches Staging, a für eine Tumorklassifizierung im Rahmen einer Autopsie, y wenn das histopathologische Staging erst nach einer neoadjuvanten Systemtherapie erfolgt ist, während ein vorgestelltes r ein Rezidiv bedeutet (Sobin et al., 2011).

Für jede Art von Karzinom existiert eine eigene TNM-Klassifikation, die in regelmäßigen Abständen anhand der neuesten Erkenntnisse verbessert wird.

TNM-Klassifikation des Nierenzellkarzinoms:

T (Ausbreitung des Primärtumors)
TX: Es ist keine Klassifizierung des Primärtumors möglich
T0: Kein Hinweis auf einen Primärtumor
T1: der Tumor ist auf die Niere begrenzt und ≤ 7 cm
T1a: der Tumor ist auf die Niere begrenzt und misst im größten Durchmesser nicht ≥ 4 cm
T1b: der Tumor ist auf die Niere begrenzt und misst im größten Durchmesser zwischen 4 und 7 cm

<p>T2: der Tumor ist auf die Niere begrenzt und misst im größten Durchmesser ≥ 7 cm</p> <p>T2a: größter Tumordurchmesser ≥ 7 cm aber ≤ 10 cm</p> <p>T2b: größter Durchmesser ≥ 10 cm</p> <p>T3: Der Tumor reicht bis in die Hauptvene oder wächst in das perirenale Fettgewebe oder die Nebenniere ein</p> <p>T3a: Tumor wächst in die Nebenniere und/oder das perirenale Fettgewebe ein</p> <p>T3b: Tumorgewebe ist auch in der Vena renalis oder der Vena cava kaudal des Diaphragmas nachweisbar</p> <p>T3c: Tumor wächst in die Gefäßwand der Vena cava ein oder der Thrombus dehnt sich bis kranial des Diaphragmas aus</p> <p>T4: der Tumor breitet sich über die Gerota-Faszie hinweg aus</p>
--

Tabelle 2: Beurteilung der Tumorausbreitung im Rahmen der TNM-Klassifikation (Rübben, 2014).

<p>N (Lymphknotenmetastasen)</p> <p>NX: keine Beurteilung der regionalen Lymphknoten möglich</p> <p>N0: Kein Hinweis auf regionale Lymphknotenmetastasen</p> <p>N1: Metastase in einem einzelnen LK mit ≤ 2cm in der Ausdehnung</p> <p>N2: Metastase in einem einzelnen LK mit ≥ 2cm aber ≤ 5cm in der Ausdehnung oder mehrere befallene LK (keiner ≥ 5cm im größten Durchmesser)</p> <p>N3: Metastasen in LK die ≥ 5cm im größten Durchmesser sind</p>

Tabelle 3: Einteilung der Lymphknotenmetastasen nach TNM (Hautmann and Gschwend, 2014).

<p>M (Fernmetastasen)</p> <p>MX: Keine Beurteilung von Fernmetastasen möglich</p> <p>M0: Kein Hinweis auf Fernmetastasen</p> <p>M1: Vorliegen von Fernmetastasen</p>
--

Tabelle 4: Einteilung von Fernmetastasen anhand TNM (Hautmann and Gschwend, 2014).

Nach UICC ergibt sich aus der TNM-Klassifikation folgende Stadieneinteilung für das Nierenzellkarzinom:

- Stadium I: T1 N0 M0
- Stadium II: T2 N0 M0
- Stadium III: T3 N0 M0 oder T1-T3 N1 M0
- Stadium IV: T4 oder N2 oder M1 (Gnant and Schlag, 2009)

1.1.10.2 Grading

Das Grading dient zur Bestimmung des Malignitätsgrades des Tumors, wobei die jeweilige histologische Differenzierung des Tumorgewebes beurteilt wird (Jocham and Miller, 2007).

Nach WHO gilt dabei folgende Einteilung:

<p>G1: geringe zelluläre Aplasie, die gerade als maligne diagnostiziert werden kann</p> <p>G2: Tumoren die weder den Kriterien von G1 noch G3 entsprechen</p> <p>G3: schwere zelluläre Aplasie</p>

Tabelle 5: WHO-Grading zur Beurteilung maligner Tumore (Wagner and Hermanek, 2013)

Ein G1 Stadium gilt also als gut differenziert, G2 als mäßig differenziert und G3 als schlecht differenziert, während ein G4 Stadium einen gänzlich undifferenzierten Tumor beschreibt (Dudeck et al., 2013).

Es existiert kein allgemein gültiges Grading für das Nierenzellkarzinom, unter vielen verschiedenen Systemen hat sich aber das Grading nach Fuhrman durchgesetzt, das die Grade G1 bis G3 anhand nukleärer Kriterien einteilt.

Grading nach Fuhrman				
Grad	Kerngröße	Kernform	Chromatin	Nucleoli
1	<10 µm	Rund	Dicht	Nicht sichtbar
2	15 µm	Rund	Fein granuliert	Klein, nicht sichtbar bei 10-facher Vergrößerung
3	20 µm	Rund/oval	Grob granuliert	Prominent, sichtbar bei 10-facher Vergrößerung
4	>20 µm	Pleomorph/ multilobulär	hyperchromatisch	Makronucleoli

Tabelle 6: Fuhrmann-Grading für das Nierenzellkarzinom (Campbell and Rini, 2012)

In den letzten Jahren kam jedoch zunehmend Kritik am Fuhrman Grading auf, da das System in vielen Fällen keine signifikante prognostische Relevanz mehr hatte. Die Anwendung des Gradingystems war kompliziert, da Fuhrman sein Grading auf drei Kriterien aufbaut: Zellgröße, Zellform und nukleoläre Prominenz. Das Problem dabei war, dass es keine Anleitung für Fälle gab, in welchen die drei Kriterien zueinander gegensätzliche Ergebnisse lieferten, was dazu führte dass viele PathologInnen sich nur auf

das nukleoläre Grading bezogen, wozu das Fuhrman Grading aber ursprünglich nicht gedacht war (Samaratunga et al., 2014).

Aus diesen Gründen wurde in den letzten Jahren ein neues System von der International Society of Urological Pathology (ISUP) entwickelt, das sich ausschließlich auf ein nukleoläres Grading bezieht, was laut Studien für ein Grading von klarzelligen und papillären RCC ausreichend sein soll. Für chromophobe RCC wird derzeit von der WHO empfohlen, kein Grading durchzuführen (Moch, 2016).

ISUP Grading Klassifikation
G1: Bei 400-facher Vergrößerung Nucleoli nicht sichtbar oder klein und basophil
G2: Tumorzellnucleoli bei 400-facher Vergrößerung deutlich sichtbar, aber bei 100-facher Vergrößerung nicht oder kaum sichtbar
G3: Tumorzellnucleoli sind eosinophil und auch bei 100-facher Vergrößerung klar sichtbar
G4: Der Tumor zeigt extreme Kernpleomorphien und/oder enthält Tumor-Riesenzellen und/oder ein Teil des Tumors zeigt eine sarkomatoide oder rhabdoide Differenzierung

Tabelle 7: ISUP-Grading: Einteilung ausschließlich anhand der nukleolären Prominenz (Samaratunga et al., 2014)

1.1.11 Therapieoptionen

1.1.11.1 Nicht-metastasiertes Nierenzellkarzinom

Nach dem Leitlinienprogramm für Onkologie 2017 soll beim lokalisierten Nierenkarzinom zur Kuration eine chirurgische Resektion erfolgen. Bei der Auswahl der chirurgischen Therapie soll möglichst auf eine Kuration als auch auf eine kleinstmögliche Lebensqualitätseinschränkung geachtet werden. Prinzipiell kann zwischen einer radikalen Nephrektomie und einem organerhaltenden minimalinvasiven Eingriff unterschieden werden. Bei der radikalen Nephrektomie werden neben der betroffenen Niere die Gerota-Faszie, das peritoneale Bindegewebe und die Nebennierenrinde vollständig entfernt. Über eine Sinnhaftigkeit der zusätzlichen Nebennierenentfernung wird diskutiert, da bei etwa 5% der PatientInnen mit RCC eine Tumordinfiltration in die Nebenniere gefunden werden kann (Paumgartner and Steinbeck, 2013). Eine prophylaktische Lymphadenektomie im Stadium I und II ist umstritten (Schmoll et al., 2013).

Da das Nierenkarzinom durch immer besser werdende diagnostische Bildgebung zunehmend in früheren Stadien diagnostiziert werden kann, bietet sich auch in einigen

Fällen eine organerhaltende Tumorenukleation an, wenn es sich um einen solitären Tumor handelt und das Karzinom im Durchmesser weniger als 4 cm aufweist, und außerdem die kontralaterale Niere nicht betroffen ist. Bei 15% der Patienten tritt jedoch ein multifokaler Tumorbefall auf, was eine alleinige Tumorenukleation ausschließt (Paumgartner and Steinbeck, 2013).

Die laparoskopische partielle Nephrektomie zeigt dabei gegenüber der offenen Nierenteilresektion einen geringeren intraoperativen Blutverlust und kürzere stationäre Aufenthalte (S3 Leitlinie Kurzversion S.18-22).

Trotz Nephrektomie mit primär kurativem Ansatz entwickeln ungefähr 30% der PatientInnen im weiteren Verlauf Metastasen, woraufhin eine systemische Therapie inidiziert ist (Hsieh et al., 2017).

1.1.11.2 Metastasiertes Nierenzellkarzinom

Beim metastasierten klarzelligem Nierenzellkarzinom sollte als Erstlinientherapie eine zielgerichtete Therapie mit Sunitinib, Pazopanib oder Bevacizumab + INF eingeleitet werden. Bei Versagen der Erstlinientherapie soll die Folgetherapie aus Nivolumab oder Cabozantinib bestehen. Zur Zweitlinientherapie können auch Lenvatinib und Everolimus kombiniert werden. Bei Versagen von Sunitinib oder Zytokinen kann Axitinib eingesetzt werden. Es können auch Sorafenib oder Pazopanib anstatt Axitinib eingesetzt werden. Wird auf einen mTOR-Inhibitor (mammalian target of rapamycin) nicht angesprochen, kann ein Tyrosinkinaseinhibitor als Folgetherapie eingesetzt werden. (S3 Leitlinie Kurzversion: Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Nierenzellkarzinoms, S.18-22).

Die Wirkmechanismen der oben genannten Wirkstoffe zur systemischen Therapie sollen im Folgenden genauer erläutert werden:

Nierenzellkarzinome gelten allgemein als nicht Chemotherapie-sensibel. Grund dafür sind unter anderem das Multiple-drug resistance protein und das P-Glykoprotein (Michel et al., 2016).

In der Vergangenheit bestand die Standardtherapie des metastasierten klarzelligem Nierenkarzinoms aus einer unspezifischen Immuntherapie mit Interleukin-2 und Interferon-alpha, deren Nutzen zwar in vielen Studien nachgewiesen wurde, aber womit kein stabiler Erkrankungsverlauf erreicht werden konnte. Durch die neuen zielgerichteten Therapieansätze verloren diese beiden Zytokine an Bedeutung.

Seit der Entdeckung des Zusammenhangs zwischen einem inaktivierten VHL-Protein und der Entstehung von klarzelligem Nierenkarzinomen wurde die systemische Therapie bei metastasierten Karzinomen vorwiegend auf diesen pathologischen Mechanismus

ausgerichtet, dabei kommen Tyrosinkinase-Inhibitoren, mTOR-Inhibitoren oder Antikörper zum Einsatz (Bedke et al., 2017).

1.1.11.2.1 Tyrosinkinaseinhibitoren

Axitinib, Pazopanib, Sunitinib und Sorafenib sind multi-targeted Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI). Ihre Aufgabe ist es, Signalkaskaden zu inhibieren, die von Membranrezeptor-Tyrosinkinasen wie z.B. dem VEGF Rezeptor aktiviert werden. Da VEGF beim Nierenzellkarzinom unter anderem dafür zuständig ist, die Proliferationsrate, Angiogenese und das Zellüberleben der Tumorzellen zu verbessern, sollen die VEGF-Inhibitoren eben diese Vorgänge hemmen (Bedke et al., 2017).

Cabozantinib zählt ebenfalls zu den Tyrosinkinaseinhibitoren und bewirkt über eine Bindung an den VEGF-Rezeptor eine Hemmung der Angiogenese (Tannir et al., 2017). Dieselbe Wirkung erzielt auch der TKI Lenvatinib (Leonetti et al., 2017).

1.1.11.2.2 m-TOR-Inhibitoren

Everolimus und Temsirolimus hingegen greifen in den mTOR Signalweg ein, der eine Rolle für die Regulation des Zellzykluses spielt. Die beiden Substanzen bewirken eine vermehrte Synthese des HIF-1 α Proteins, was in einer Unterbrechung des Zellzyklus der Krebszellen in der G1-Phase und damit einer Hemmung der Zellproliferation resultiert (Bedke et al., 2017).

1.1.11.2.3 Antikörper

Bei Nivolumab handelt es sich um einen humanen gentechnisch veränderten monoklonalen Antikörper, der die Fähigkeit hat, an einen PD1-Rezeptor (programmed death) der T-Lymphozytenoberfläche zu binden. Das Nierenzellkarzinom exprimiert, wie einige andere Malignome, PD-L1, den Liganden, der an den PD1-Rezeptor bindet, was eine verminderte Aktivität von T-Lymphozyten und somit eine Immuntoleranz des Tumors bewirkt. Nivolumab greift in diesen Mechanismus ein, indem es selbst an den PD1-Rezeptor bindet und damit verhindert, dass PD-L1 durch eine Bindung an den Rezeptor die T-Zelle inaktivieren kann. So bewirkt Nivolumab, dass das Immunsystem weiter gegen den Tumor arbeiten kann (Venur et al., 2017).

Bevacizumab, das laut Leitlinien ebenfalls ein Teil der Erstlinientherapie ist, ist ein monoklonaler Antikörper, an den der Wachstumsfaktor VEGF-A bindet, und somit verhindert, dass dieser an den VEGF Rezeptor bindet, womit der VEGF Signalweg wiederum unterbrochen wird (Bedke et al., 2017).

1.1.12 Prognostische Faktoren

Wichtige Faktoren zur Einschätzung der Prognose des Nierenzellkarzinoms sind das Tumorstadium, der Differenzierungsgrad, maximaler Durchmesser, histopathologischer Karzinomsubtyp, Tumornekrosen, sowie Allgemeinzustand und Komorbiditäten der PatientInnen (Michel et al., 2016).

Studien haben gezeigt, dass von allen histologischen Subtypen des Nierenzellkarzinoms, der klarzellige Typ die beste Prognose aufweist, während die mittleren Überlebensraten von PatientInnen mit papillären oder chromophoben RCCs deutlich geringer sind.

Des Weiteren zeigte sich, dass sofern Fernmetastasen vorhanden sind, die Lokalisation dieser ebenfalls eine prognostische Rolle spielt. So zeigen PatientInnen mit Knochen- und Lebermetastasen eine schlechtere Prognose als PatientInnen mit Lungen- oder Lymphknotenmetastasen. PatientInnen die einer Metastasektomie unterzogen werden, zeigen außerdem eine bessere Prognose als jene, die beim metastasierten RCC nur eine systemische Therapie erhalten (Shinohara N. et al., 2015).

Etwa 50% der PatientInnen werden im T1 oder T2 Stadium diagnostiziert. Sie besitzen nach Operation in Form einer partiellen oder vollständigen Nephrektomie eine ausgezeichnete Langzeitprognose mit Heilungsraten von mehr als 90%. Bei 25% wird die Tumordiagnose erst im T3 Stadium gestellt, wobei sich die 5-Jahres-Überlebensrate auf 80% reduziert. Sind bei den PatientInnen außerdem bereits Lymphknoten befallen, sinkt die Wahrscheinlichkeit auf Heilung drastisch, da nach 5 Jahren nur mehr 30-50% der PatientInnen frei von Tumorrezidiven sind. Bei PatientInnen mit Diagnose des Tumors im T4 Stadium liegt eine noch schlechtere Prognose vor. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei dieser Gruppe nur mehr 50%. Die schlechteste Prognose ist gegeben, wenn bereits Fernmetastasen vorhanden sind, da in diesem Stadium die Überlebensrate nach 5 Jahren nur mehr 16% ausmacht (Hiddemann et al., 2013).

1.2 DNA-Methylierung

Als epigenetischer Regulationsmechanismus spielt die DNA-Methylierung eine zentrale Rolle in der Aktivierung bzw. Inaktivierung von Genen. Die Reaktion erfolgt postreplikativ durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert und ist basen- und sequenzspezifisch. Der Vorgang der Methylierung findet bei eukaryotischen Zellen an der C-5-Position von Cytosin in der Basenabfolge 5'-CpG-3' statt. Dass die DNA-Methylierung von essentieller Bedeutung für die Lebensfähigkeit des Organismus ist, kann am Beispiel des ICF-Syndroms (immunodeficiency, centromeric instability, facial abnormalities) erkannt werden (Nordheim et al., 2015). Betroffene des Syndroms weisen fast nur unmethylierte Satelliten-DNA auf, was sich auf eine Mutation der DNMT-Methyltransferase-3B zurückführen lässt. Das Krankheitsbild äußert sich in Form eines Immundefektes mit Hypogammaglobulinämie und fehlerhafter T-Lymphozytenfunktion (Gadner et al., 2005).

Mehr als 50% der menschlichen Gene enthalten DNA-Abschnitte an den Promoterregionen, die sehr reich an CpG-Folgen sind, sogenannte CpG-Inseln. CpG-Inseln sind im Gegensatz zu kürzeren CpG-Sequenzen in anderen DNA-Regionen meist unmethyliert, da eine Methylierung an dieser Stelle mit einer Inaktivierung des betroffenen Gens gleichzusetzen ist. Ein Beispiel für eine dauerhafte Inaktivierung eines Gens durch Methylierung des Cytosins an den CpG-Inseln ist das zweite inaktive X-Chromosom bei Frauen (Knippers, 2006).

DNA-Methylierungen sind immer spezifisch für das jeweilige methylierte Gen und treten deshalb im gesamten Genom auf. DNA-Methyltransferasen können entweder Erhaltungs- oder aber De-novo-Methylierungen bewirken. Eine Erhaltungsmethylierung findet bei neu synthetisierten DNA-Strängen nach der Replikation statt. Parentale DNA-Stränge sind nach der Replikation noch nicht automatisch methyliert, weshalb erst von der DNA-Methyltransferase DNMT1 Methylgruppen auf die Stränge übertragen werden müssen, um das ursprüngliche Methylierungsmuster wiederherzustellen (Passarge, 2008). DNMT1 ist darum spezifisch auf halbseitig methylierte DNA konzentriert (Hennig and Graw, 2010). Bei der De-Novo-Methylierung hingegen werden an Stellen, die zuvor nicht methyliert waren, von den Methyltransferasen DNMT3a oder DNMT3b Methylgruppen an beide DNA-Stränge übertragen (Passarge, 2008).

Die folgende Repression eines Gens durch dessen stattgefundenen Methylierung wird unter anderem dadurch erreicht, dass durch die Methylgruppe am DNA-Strang die

Zugänglichkeit von Transkriptionsfaktoren, die zum Abschreiben und der folgenden Replikation des Gens notwendig wären, blockiert wird. Außerdem werden durch die Methylierung so genannte Histondeacetylasen aktiviert, die die Herstellung eines aktiven Chromatinzustandes verhindern (Jansohn and Rothhämel, 2012).

Methylierungen an Genen können aber nicht nur hinzugefügt, sondern auch wieder entfernt werden. Dies geschieht durch Demethylasen. Eine komplette Demethylierung findet in der Embryogenese statt, auf welche eine gewebsspezifische De-novo-Methylierung folgt (Ganten and Ruckpaul, 2006).

Warum bestimmte DNA-Abschnitte methyliert werden, hängt von mehreren zum Teil bekannten als auch unbekanntem Faktoren ab. Eine wichtige Rolle in der Regulation des Methylierungsmusters spielt unter anderem das Ernährungsverhalten der jeweiligen Person. Folsäure scheint dabei einen der einflussnehmenden Faktoren zu sein, da deren Derivate im Organismus einen der wichtigsten Methyllieferanten darstellen. So zeigt sich bei Menschen mit Folsäuremangel auch eine dementsprechende DNA-Hypomethylierung, die jedoch durch entsprechende Folsäure-Ergänzungspräparate wieder ausgeglichen werden kann. Studien zeigten aber, dass die Folsäure-Supplementierung mit Methylierungsmustern, die das Kolonkarzinomrisiko erhöhen, in Zusammenhang steht. Auch vermehrter Alkoholkonsum kann eine Hypomethylierung verursachen. Der Prozess findet einerseits über eine Hemmung der Synthese von S-Adenosyl-Methionin statt, und andererseits über die verringerte Resorptionsfähigkeit von Folsäure bei Alkoholkonsum (Knasmüller, 2014).

Dass sich Umweltfaktoren auf die epigenetische Regulation der DNA auswirken, konnte in Zwillingsstudien bestätigt werden. Es zeigte sich, dass 3-jährige eineiige Zwillinge noch ein quasi identisches Methylierungsmuster aufwiesen, während dieses durch den Einfluss von zunehmend unterschiedlichen Umweltfaktoren bei 50-jährigen eineiigen Zwillingen schon große Unterschiede zeigte (Siegler et al., 2016).

1.3 5-Azacytidin

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zelllinien eines klarzelligem Nierenkarzinoms mit 5-Azacytidin behandelt. Dabei handelt es sich um ein Zytostatikum, das außerdem noch eine schwache antibiotische Wirkung gegen Gram-positive Bakterien zeigt. Als Zytostatikum entfaltet es seine Wirksamkeit als Hemmstoff der Methylierung der DNA. 5-Azacytidin wird statt des Nucleosids Cytidin in die DNA eingebaut. Da bei 5-Azacytidin die Kohlenstoffatom-5 Stelle bereits durch ein Stickstoffmolekül besetzt ist, kann so keine Methylierung erfolgen und damit vorher methylierte und inaktive Gene wieder aktiviert

werden (Deckwer, 2014). Klinische Anwendung findet 5-Azacytidin in der Onkologie, da es in Europa für PatientInnen mit Hochrisiko-Myelodysplastischen Syndromen zugelassen ist, wenn für diese keine allogene Stammzelltransplantation in Frage kommt. Bei einer Studie konnte gezeigt werden, dass die zusätzlich mit 5-Azacytidin behandelten PatientInnen ein um durchschnittlich 9 Monate längeres Überleben aufwiesen als die Kontrollgruppe (Adamietz et al., 2016). Die Substanz wird bei der malignen Erkrankung also als Modulator der DNA-Methylierung eingesetzt, indem sich durch die Demethylierung von Genen reife Blutzellen aus abnormen MDS-Stammzellen differenzieren können. Durch die Therapie kommt es bei den PatientInnen verstärkt zu einer Anhebung der peripheren Blutzellzahl. Im Verlauf tritt jedoch bei vielen ein Therapieversagen auf, woraufhin die Blutzellzahl erneut absinkt (Pezzutto et al., 2017).

1.4 Immunreaktion-assoziierte Gene

1.4.1 Genaktivität in Karzinomen

Krebszellen weisen andere Methylierungsmuster auf als gesunde Zellen des Organismus. Da die Methylierung bei Zellteilung auf die neue Zelle ebenfalls übertragen wird, entsteht so eine Reihe von Krebszellen, die andere Genaktivitäten aufweisen als nicht veränderte Zellen. Im Vergleich mit normalen Körperzellen zeigt sich in den Tumorzellen eine Hypomethylierung. Tumorsuppressorgene hingegen sind an ihren Promotorregionen bei Krebspatienten vorwiegend hypermethyliert und somit in ihrer Funktion eingeschränkt oder ausgeschaltet (Knasmüller, 2014). Eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Entstehung eines Karzinoms ist dann gegeben, wenn beide Allele des Tumorsuppressorgens an der Promotorregion methyliert und damit inaktiviert werden. Bei hereditären Tumoren kann ein Allel bereits in der Keimbahn inaktiviert sein, das zweite Allel kann dann durch Methylierung oder Mutation abgeschaltet werden. Aber auch in sporadischen Tumoren finden sich häufig Methylierungen von Genen, die das Tumorstadium stören würden und wiederum gesteigerte Aktivität von jenen Genen, die die Tumorprogression unterstützen. Dass die Methylierung von Tumorsuppressorgenen sich auch auf die Malignität eines Tumors auswirkt, konnte in Versuchen mit demethylierenden Substanzen gezeigt werden: 5-Azacytidin kann in der Zellkultur die Methylierung von DNA rückgängig machen. Nachdem dieses eingesetzt wurde, zeigten sich durch die Reaktivierung gewisser tumorsupprimierender Gene phänotypische Veränderungen der Tumorzellen, die unter anderem eine geringere Proliferationsrate und vermehrte Zellapoptose umfassten (Wagener and Müller, 2010).

1.4.2 CCRL2

Das Protein CCRL2 ist Teil eines Chemokinrezeptors und ist mitverantwortlich für die Bereitstellung von Immunzellen bei Entzündungsreaktionen im Organismus. Das Gen wird vor allem in primären neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert. Die genaue Funktion des Gens ist nach wie vor nicht geklärt ("CCRL2 Gene - GeneCard"). Bisher konnte gezeigt werden, dass CCRL2 nicht unabhängig, sondern im Zusammenhang mit dem Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) arbeitet. Dies lässt sich dadurch erklären, dass Chemerin, also der Ligand für den CMKLR1, auch an CCRL2 bindet. Um zu untersuchen, ob CCRL2 so eine Rolle in der Immunantwort auf Entzündungen spielt, wurden in Tierversuchen die Auswirkungen eines Verlusts von CCRL2 getestet. Es wurden sowohl Mäusen mit CCRL2-Verlust als auch Mäusen ohne diese Veränderung Immunglobulin E zur Beurteilung einer IgE-vermittelten passiven anaphylaktischen Hautreaktion verabreicht. Dabei zeigte sich, dass die Mäuse ohne CCRL2-Protein eine verminderte passive anaphylaktische Hautreaktion zeigten, was die Vermutung nahe lässt, dass eine Bindung an den CCRL2-Rezeptor die Immunantwort auf Entzündung verstärkt (Yoshimura and Oppenheim, 2011).

1.4.3 CD3D

CD3D codiert für ein Protein, welches die Delta-Untereinheit des T-Zell-Rezeptors/CD3-Komplexes bildet und somit eine Rolle in der Signaltransduktion und der T-Zell-Entwicklung spielt. Wenn Mutationen des CD3D-Gens auftreten, führt dies zu einem schweren kombinierten Immundefekt ("CD3D Gene - GeneCards").

1.4.4 CD3G

Das vom CD3G-Gen codierte Protein ist ein CD3-gamma Polypeptid, das mit dem T-Zell-Rezeptor einen T-Zell-Rezeptor CD3-Komplex bildet, welcher wiederum dafür verantwortlich ist, intrazelluläre Signaltransduktionswege nach Antigen-Kontakt zu veranlassen. Defekte von CD3G führen zu einer T-Zell-assoziierten Immundefizienz ("CD3G Gene - GeneCards "). In einer 2010 durchgeführten Studie mit 291 chinesischen PatientInnen mit hepatozellulärem Karzinom und ebenso vielen gesunden PatientInnen zur Vergleichskontrolle, wurde die Auswirkung des Verlustes von Basenpaaren in der Promotorregion von CD3G auf die Anfälligkeit der PatientInnen auf HCC getestet. Dabei zeigte sich, dass die Personen mit der Insertion in der Promotorregion des Gens ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung eines Leberzellkarzinoms aufwiesen (Jiang

et al., 2012). Mutationen, die homozygot das CD3G Gen betreffen und zu einem absoluten Mangel von CD3G führen, verursachen eine Störung der T-Zell-Funktion und können sowohl leichte Formen von Autoimmunität als auch schwere Immundefizienzen bereits im Kindesalter verursachen (Rich et al., 2012). Auch in einer Untersuchung von Melanom-PatientInnen konnte eine Überexpression von CXCR1 festgestellt werden, was die Proliferation und Invasivität der Tumorzellen verstärkte (Singh et al., 2009).

1.4.5 CXCR1

CXCR1 codiert für ein Protein, das als Rezeptor für Interleukin 8 fungiert. Das Protein verfügt über eine hohe Affinität zu IL8, wobei bei Bindung an den Rezeptor das Signal über ein zweites G-Protein-vermitteltes System übertragen wird und eine Aktivierung von Neutrophilen verursacht ("CXCR1 Gene - GeneCards"). Des Weiteren ist bekannt, dass CXCR1 sowohl bei der Antwort auf Entzündungsreaktionen als auch bei der Tumorprogression und der Metastasenentstehung eine Rolle spielt. Auch bei der Entstehung von anderen Erkrankungen wie COPD, Asthma oder zystischer Fibrose konnte eine Beteiligung des Proteins festgestellt werden. Eine Erklärung wie CXCR1/2 mit Interleukin 8 in die Tumorprogression eingreift, ist, dass durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor die Proliferation von Krebs-Stammzellen reguliert wird. In den letzten Jahrzehnten wurde an vielen spezifischen Antikörpern gegen Interleukin bzw. CXCR1/2 gearbeitet, die laut einigen Studien in Kombination mit Chemo- und Immuntherapie bessere Ergebnisse in der Tumorbehandlung ergeben sollen (Ha et al., 2017).

1.4.6 LAX1

Das Gen LAX1 gehört zu den transmembralen Adapterproteinen und ist sowohl in B- und T-Lymphozyten als auch in Natürlichen Killerzellen und Monozyten exprimiert. Die Rolle der transmembralen Adapterproteine besteht in der positiven und negativen Regulierung von Lymphozytenreifung, -aktivierung und -differenzierung. LAX (linker for activation of X cells) ist im Speziellen für die Aktivierung von X-Zellen und damit in den Prozess der Immunantwort involviert. Des Weiteren ist das Protein an der Entstehung und Beibehaltung einer Immuntoleranz gegenüber Antigenen beteiligt. LAX hemmt die T-Zell Rezeptor Bindung, wie genau dieser Mechanismus bei LAX funktioniert, ist bisher noch unklar. Des Weiteren wurde in Versuchen mit Mäusen gezeigt, dass LAX als negativer Regulator in der Mastzellaktivierung fungiert.

LAX soll außerdem mit dem transmembralen Adapterprotein Sit in Lymphozyten interagieren. Es zeigte sich, dass der gleichzeitige Verlust von LAX und Sit die Funktion und Entwicklung von reifen B- und T-Zellen nicht beeinflusst, aber sich folglich im Organismus eine erhöhte Zahl von B1 B-Zellen, CD4+ T-Zellen und höhere Ig-Serumspiegel zeigen (Fuller and Zhang, 2009).

1.4.7 Sit1

Sit1 zählt wie LAX1 zu den transmembralen Adapterproteinen und spielt ebenso eine wichtige Rolle in der Modulierung der T-Lymphozytenfunktion (Arndt et al., 2011). Sit1 reguliert negativ den T-Zell-Antigenrezeptor-medierten Signalweg in T-Zellen und ist in die positive Selektion von T-Zellen involviert ("SIT1 Gene - GeneCards "). Des Weiteren ist das transmembrale Adapterprotein für die T-Zell Homöostase mitverantwortlich. Über die gesamte Lebenszeit eines Menschen wird die Zahl der reifen T-Zellen durch diesen Prozess der peripheren Homöostase in etwa konstant gehalten. In den letzten Jahren wurden viele Mechanismen aufgedeckt, die dazu beitragen, die Anzahl der peripheren T-Lymphozyten konstant zu halten. So zeigte sich dass die Homöostase teilweise über T-Zell-Rezeptoren und damit auch unter anderem über das transmembrale Adapterprotein Sit reguliert wird. In einer Tierversuchsstudie konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer verminderten Expression des Sit-Proteins auch eine verminderte Anzahl von naiven CD8+ T-Zellen, als auch eine vermehrte Ansammlung von CD8+ Gedächtniszellen besitzen. Wurde das Protein hingegen in den Lymphozyten gezielt vermehrt exprimiert, kam es zu einer homöostatischen Proliferation der naiven CD8+ T-Zellen (Posevitz et al., 2008).

1.4.8 ICOS

Das Protein ICOS gehört zu den CD28 und CTLA-4-Zelloberflächenrezeptoren. Es spielt eine wichtige Rolle in der interzellulären Signalübertragung, der Immunantwort und der Regulierung der Zellproliferation. Die Expression von ICOS verstärkt die Antwort der T-Zellen auf fremde Antigene, also die Proliferation und Sekretion von Lymphokinen sowie die Unterstützung der Antikörperbildung durch die B-Zellen. Die Produktion von Interleukin-2 wird durch das Protein nicht verstärkt, dafür aber die Synthese von Interleukin. Auch schützt ICOS vor der Apoptose von präaktivierten T-Zellen ("ICOS Gene - GeneCards"). ICOS ist vor allem an den T-Helferzellen exprimiert, die für die B-Zell Differenzierung verantwortlich sind. Im Tierversuch wirkte sich ein Verlust der Expression des Proteins auf die Homöostase und die Funktion der T-Helferzellen aus, was bei den Mäusen in einer verminderten Differenzierung von B-Lymphozyten in

Plasmazellen resultierte. Des Weiteren zeigte sich, dass ICOS bei PatientInnen mit systemischem Lupus erythematoses sowie auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie z.B. rheumatoider Arthritis auf den T-Helferzellen vermehrt exprimiert wird. Zielgerichtete Therapien, die den ICOS-Signalweg beeinflussen, könnten daher neue Möglichkeiten in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen bieten (Mittereder et al., 2016).

Des Weiteren kann die Antitumor-Immunität durch zielgerichtete ICOS-Therapien verbessert werden, wobei die genauen Mechanismen noch unklar sind (Metzger et al., 2016).

1.5 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, die Aktivität von Immunreaktion-assoziierten Genen auf Zellen eines klarzelligen Nierenzellkarzinoms zu untersuchen. Dabei sollte vor allem durch die Durchführung von Real time PCRs festgestellt werden, ob die Genexpression von sieben ausgewählten Immungenen über den Mechanismus der DNA-Methylierung reguliert wird. Dazu wurde die demethylierende Substanz 5-Azacytidin eingesetzt, um zu kontrollieren, ob dies die Genexpression erhöhen würde. Zusätzlich sollte verglichen werden, inwiefern sich die Genaktivität zwischen dem Nierenkarzinomgewebe und gesundem Nierengewebe unterscheidet. Außerdem war es ein Ziel mit Hilfe der Online Plattform „The Cancer Immunome Atlas“ zu untersuchen, ob die jeweilige Höhe der Genexpression eine signifikante Auswirkung auf das Überleben zeigt.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Zelllinie und Kulturbedingungen

2.1.1 RCC FG1

Die Zelllinie RCC FG1 entstammt vom klarzelligem Nierenzellkarzinom eines 69-jährigen männlichen Kaukasiers. Beim Tumorstadium handelte es sich um ein pT2a Stadium mit Fernmetastasen. Die Zellen zeigen eine hohe Expression des P-170 Glykoproteins und sind PAS (periodic-acid-shiff)-positiv (“RCC-FG1 growing - CLS Online Shop”).

2.1.2 RCC MF

Die RCC MF Zelllinie stammt vom klarzelligem Nierenzellkarzinom eines 63-jährigen kaukasischen Mannes im pT2 Tumorstadium mit Lymphknoten- und Fernmetastasen in der Lunge. Die Zellen sind G250 positiv (“RCC-MF - CLS Online Shop”). Die in dieser Studie verwendeten humanen Nierenkarzinom-Zelllinien wurden vom Cell lines service Webshop (Eppendorf, Germany) bezogen und gemäß den Angaben des Anbieters kultiviert.

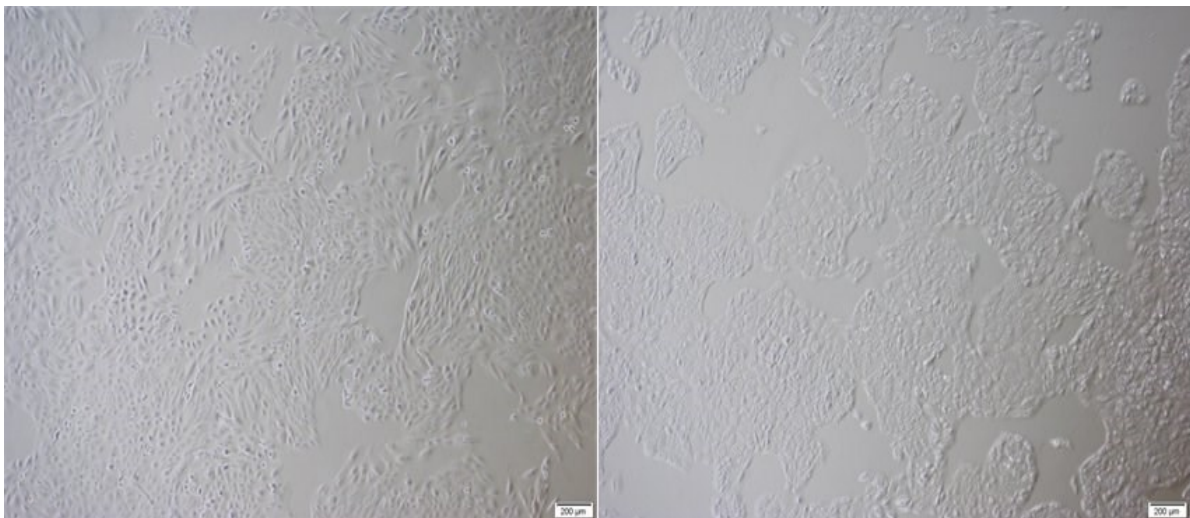


Abbildung 1: Adhärentes Zellwachstum der Zelllinien RCC FG1 (links) und RCC MF (rechts).

2.2 Behandlung der Zelllinien mit 5-Azacytidin

Am ersten Tag wurden die Zellen der RCC FG1 und RCC MF Zelllinien mit fünfminütigem Einwirken von TrypLE (Gibco, Life Technologies, Carlsberg, CA, USA) von den Flasks (Costar, Sigma Aldrich, Vienna, Austria) gelöst. Die Zellzählung ergab für die RCC FG1 eine Zahl von $1,9 \cdot 10^6$ Zellen, bei den RCC MF waren es $1,7 \cdot 10^6$ Zellen. Pro Zelllinie sollten sechs Wells mit jeweils 25000 Zellen ausgesät werden, was einen Gesamtbedarf von 150.000 Zellen jeder Zelllinie in 15 ml RPMI 1640 Medium (Gibco Life Technologies, Carlsberg, CA, USA) ergab. Nach ordentlichem Mischen wurden

jeweils 2,5 ml der Zellsuspension in ein Well einer 6-Well-Platte (Nunc, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) hinzugefügt. Am zweiten Tag wurden aus einer eingefrorenen 50 mM AZA-Probe durch Verdünnung mit PBS 500 μ M AZA hergestellt. Für die DMSO Kontrolle wurde durch Zugabe von PBS 1%iges DMSO hergestellt. Sowohl auf der Platte der RCC FG1, als auch auf jener der RCC MF wurden in jeweils zwei Wells 25 μ l des 500 μ M AZA hinzugefügt, um die 5 μ M AZA-Probe herzustellen. Um eine AZA Konzentration von 10 μ M zu erreichen, wurden wiederum in jeweils 2 Wells 50 μ l des 500 μ M AZA hinzugefügt. Für die Vehikelkontrolle wurden in die jeweils zwei verbleibenden Wells 50 μ l des 1%igen DMSO pipettiert.

An Tag drei und vier wurde die Vorgehensweise von Tag zwei wiederholt. Am fünften Tag wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen. Um die Zellen von den Wells herunter zu waschen, wurde 1 ml Trizol hinzugefügt. Die Zellen der zwei jeweils gleichen Wells wurden gepooled, und alle Proben bei -70°C eingefroren.

2.3 Isolierung von gesunden Leukozyten

Um die Effizienz der verwendeten Immungen-Primer testen zu können, wurden Leukozyten von einem gesunden Probanden aus einer frisch entnommenen Blutprobe isoliert. Zur Lyse der Erythrozyten wurden zu jeweils 8 ml der Blutprobe 35 ml Red blood cell Lysis Buffer (Stemcell Technologies, Grenoble, France) pipettiert und die Proben anschließend für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein zehnmütiger Zentrifugationsvorgang bei 600 g. Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet in 2 ml RBC Lysis Buffer resuspendiert. Die nachfolgende Inkubation bei Raumtemperatur betrug fünf Minuten, anschließend wurde die Probe für zwei Minuten auf 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 1ml PBS resuspendiert. Zum Waschen des Pellets wurde der Zentrifugationsschritt bei 3000 rpm zwei Mal wiederholt und am Ende der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 4000 μ l Trizol resuspendiert und gleichmäßig auf vier Eppendorf Röhren aufgeteilt. Die Leukozyten-RNA wurde anschließend laut dem Protokoll unter 2.4 weiter isoliert.

2.4 RNA Isolierung

Außer den bereits erwähnten Leukozyten wurde auch RNA aus den Nierenzellkarzinomlinien RCC FG1 und RCC MF isoliert. Von beiden Zelllinien wurden jeweils eine unbehandelte Vehikelkontroll-Probe isoliert, sowie zwei vorher mit 5-Azacytidin behandelte Proben, eine davon mit einer Konzentration von 5 μ M, die andere mit einer Konzentration von 10 μ M.

Für die Isolierung wurden die zuvor bei -80 °C eingefrorenen Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit einer Pipette gut gemischt. Pro Probe mit 1 ml Trizol wurden 100 µl BCP zur Phasentrennung hinzugefügt. Danach wurden die Proben durch 15-sekündiges Schütteln gemischt und für fünf Minuten inkubiert, bevor sie für 15 Minuten bei 12.000 g und 4 °C zentrifugiert wurden. Nach der Zentrifugation wurde zur RNA Präzipitation die jeweils obere durchsichtige Phase der Proben entnommen und in ein frisches Eppendorf Gefäß mit jeweils 500 µl Isopropyl Alkohol pipettiert. Die Proben wurden geschüttelt, fünf Minuten inkubiert und anschließend für dreißig Minuten bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Die RNA der Proben lag nach dem Zentrifugieren als Pellet an der Eppendorfgefäßwand an. Der Überstand wurde ab pipettiert. Um die RNA zu waschen wurde 75%iger Ethanol hergestellt, von welchem jeweils ein Milliliter pro Pellet hinzugefügt wurde. Die Probe wurde gevortext und anschließend für fünf Minuten bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Waschschrift wurde noch einmal wiederholt, der Überstand wiederum verworfen. Die Pellets wurden anschließend für ca. 20 Minuten luftgetrocknet. Danach wurden 20 µl RNase freies Wasser der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) zu jedem Pellet pipettiert und die Proben zum Auflösen der RNA für zehn Minuten in einem Thermocycler (MyCycler, Biorad, Hercules, USA) bei 58 °C inkubiert.

2.5 RNA Messung

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mithilfe eines Nanodrop-Spektrophotometers (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) gemessen. Dabei wurde das RNase freie Wasser, in dem die isolierten RNA-Proben eluiert wurden, als Blank-Wert für das Gerät verwendet. Anschließend wurde in jeweils einem µl einer Probe die enthaltene RNA-Konzentration gemessen. War die Konzentration niedriger als 50 ng/µl wurde sie nicht weiter verwendet. Für die nachfolgende RT PCR wurde die RNA Konzentration auf 100 ng/µl eingestellt.

2.6 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die isolierten RNA Proben wurden revers transkribiert, um die cDNA der isolierten Nierenzellkarzinom-Zelllinien bzw. Leukozyten für die anschließende Real Time PCR verwenden zu können.

Für die reverse Transkription der Proben wurde der Qiagen QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Hilden, Germany) sowie die Anleitung des QuantiTect® Reverse Transcription Handbook verwendet. Zu Beginn wurden die Proben je nach gemessener RNA Konzentration durch Zugabe von RNase-freiem Wasser und nach Entnahme eines Teils jeder Probe zur Herstellung einer non amplification control (NAC) auf eine

Konzentration von jeweils 1000 ng/10µl gebracht. Die NAC wurde pro durchgeführter RT-PCR aus gleichen Teilen von allen umzuschreibenden Proben zusammen pipettiert und ebenfalls auf eine Konzentration von 1000 ng/10 µl gebracht. Zu jeder Probe sowie zur NAC wurden 2 µl gDNA wipeout buffer und 2 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt. Anschließend wurden die Proben in einen Thermocycler (MyCycler, Biorad, Hercules, USA) gegeben und dort für zwei Minuten bei 42°C inkubiert, daraufhin sofort wieder auf Eis gelagert.

Es wurden zwei weitere Mastermixe hergestellt, wobei der Mastermix für die NAC aus 1 µl RT Primer Mix, 4 µl RT Buffer und 1 µl RNase freiem Wasser zusammen pipettiert wurde. Der Mastermix für die restlichen RNA Proben setzte sich ebenfalls pro Probe aus 1 µl RT Primer Mix und 4 µl RT Buffer zusammen, aber statt des RNase freien Wassers wurde 1 µl Reverse Transkriptase (Qiagen, Hilden, Germany) zugegeben, um die RNA so in cDNA umschreiben zu können. Der Mastermix für die non amplification control wurde ohne Reverse Transkriptase hergestellt um in der später durchgeführten Real Time PCR eine eventuelle Verunreinigung der Probe mit genomischer DNA feststellen zu können. Nach Zugabe der jeweiligen Mastermixe zu den Proben bzw. zur NAC wurden sie erneut in den Thermocycler gegeben und dieses Mal bei 42°C für 15 Minuten inkubiert um sie zu cDNA umzuschreiben. Darauf folgten noch 3 Minuten Inkubationszeit bei 95°C, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die cDNA wurde anschließend bei -20°C aufbewahrt, bis sie bei der Real Time PCR zum Einsatz kam.

2.7 Real Time PCR

2.7.1 Durchführung

Die PCR Läufe wurden im Light Cycler 480 der Firma Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Für jeden Versuch wurden als PCR-Ansatz pro Well folgende Materialien eingesetzt: 7 µl destilliertes Wasser, 10 µl Kapa Sybr Fast qPCR Mastermix (Kapa Biosystems, Wilmington, Massachusetts, USA) (enthält KAPA SYBR FAST DNA Polymerase, Reaction buffer, dNTPs, SYBR Green I dye und MgCL₂) und jeweils 0,5 µl Primer forward und Primer reverse mit einer Endkonzentration von 0,25 µM. Zu dem Ansatz wurden pro Well 2 µl DNA mit einer Konzentration von 10 ng/µl hinzugefügt. Jede Probe wurde als Duplikat pipettiert. Um eine Kontamination auszuschließen, wurden auf allen PCR Platten eine non amplification control und eine NTC (non template control) verwendet. Es wurden weiße Light Cycler 480 Multiwell Plates 96 (Roche, Mannheim, Germany) verwendet. Diese wurden nach dem Pipettieren mit einer Light Cycler 480 Sealing Foil (Roche, Mannheim, Germany) verschlossen und

die Platte bei 900rpm für eine Minute zentrifugiert. Danach wurde die PCR-Platte in den Light Cycler 480 gestellt, und das KAPA SYBR Fast Programm ausgewählt, dessen Program-Setup wie folgt aufgebaut war: Detection Format: SYBR Green I, Block Type: 96, Reaction Volume: 20 µl. Die Einstellungen enthielten des Weiteren: Präinkubation bei 95°C für 3 Minuten, anschließend 45 Amplifikationszyklen mit jeweils 10 Sekunden bei 95°C, 20 Sekunden bei 60°C und 1 Sekunde bei 72°C, danach Melting curves für 5 Sekunden bei 95°C, eine Minute bei 65°C und kontinuierlich bei 97°C, sowie Cooling für 10 Sekunden bei 40°C.

2.7.2 Primer

Für die Real time PCRs wurden Primer der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bestellt. Es wurden sieben immunassoziierte Gene, sowie zwei Haushaltsgene zum Vergleich verwendet. Bei den immunassoziierten Genen handelte es sich um CCRL2, CD2D, CD3G, CXCR1, LAX1, Sit1 und ICOS, als Haushaltsgene wurden YWHAZ und HPRT1 eingesetzt.

Um zu testen, ob die Primer für die Haushaltsgene funktionieren, wurde eine PCR mit HPRT1 und YWHAZ auf den Zelllinien SUM159, MDA-MB 231 und MCF10A durchgeführt. Die Primer der immunassoziierten Gene wurde in einer PCR mit gesunder Leukozyten-cDNA getestet.

Primer/ Gen	Name des Genprodukts	Primersequenz	Amplicon
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	Forward: GGCGTCGTGATTAGTGATGA Reverse: CAGTCCGTCCATAAATTAGTCCAT	121
YWHAZ	Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta	Forward: AGCCAGCAGAAACATCCAGTC Reverse: TGCCATGTCATCATATCGCTCAG	89
CCR12	C-C Motif Chemokine Receptor Like 2	Forward: CAGCCCAGTGGGCAGTCT Reverse: ATGGCTCTCCAGTTCACCTTC	91
CD3D	T-Cell Receptor T3 Delta Chain	Forward: GACCTGGCTTTATCTACTGGATGA Reverse: GGGCTCACTTGGCAGAGA	99
CD3G	T-Cell Receptor T3 Gamma Chain	Forward: GTATTACAGAATGTGTCAAGAACT Reverse: TGTCCAGCAATGAAAGTAGA	120
CXCR1	C-X-C Motif Chemokine Receptor 1	Forward: CTGTTAAGTCACTCTGATCTCTG Reverse: GCAATGGTTTGATCTAACTGAAG	82
LAX1	Linker For Activation Of X Cells	Forward: GCATCTTGTGGAATTGGAA Reverse: TGGCTCTTTGTCTGGTTT	102
Sit1	Suppression-Inducing Transmembrane Adapter 1	Forward: ATTATCTACAGACAGGACGG Reverse: AGGCTGGTATAGCACATC	109
ICOS	Inducible T-Cell Co-Stimulator	Forward: AGACTCACAGATGTGACCCCTAT Reverse: TCAGACTCTCCGTGGTCC	120

Tabelle 8 Primersequenzen aller verwendeten Primer(“GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search,”)

2.7.3 Haushaltsgene

Haushaltsgene sind dadurch charakterisiert, dass sie konstant mit einer niedrigen Expressionsrate abgelesen werden, da jede Zelle auf diese konstitutiven Genprodukte angewiesen ist. Von den etwa 30.000 menschlichen Genen sind circa 2.000 Haushaltsgene. Alle anderen Gene werden als induktiv bezeichnet und sind einer genauen Regulation unterworfen, sodass sie je nach Aktivierung exprimiert werden oder aber epigenetisch verpackt ruhen (Horn, 2009). Das Gegenteil zu den Haushaltsgenen bilden all jene Gene, die nur gewebsspezifisch exprimiert werden, also nur in speziellen Körperzellen vorkommen (Hennig and Graw, 2010). Typisch für Haushaltsgene sind die CpG-Inseln in deren Promotorregion, die durch fehlende Methylierung eine ständige Expression des Gens gewährleisten (Jansohn and Rothhämel, 2012).

2.7.3.1 YWHAZ

Das Gen YWHAZ codiert für eines der 14-3-3-Proteine, die in allen eukaryotischen Zellen exprimiert sind und für Signaltransduktionen verantwortlich sind, indem sie an Phosphoserin enthaltende Proteine binden. Durch Interaktion mit dem IRS1 Protein spielt YWHAZ eine Rolle in der Regulation der Insulinsensitivität ("YWHAZ Gene - GeneCards"). Von den 14-3-3 Proteinen existieren 7 Isoformen, wobei YWHAZ für das 14-3-3 Protein Zeta/Delta verantwortlich ist. Es zeigte sich, dass dieses onkogene Protein, das eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, des Proteintransports und der Apoptose eine Rolle spielt, bei verschiedenen Karzinomen konstant exprimiert wird (Kasinski et al., 2014). Eine Überexpression von YWHAZ konnte unter anderem mit schlechteren Prognosen bei Brustkrebs, Lungenkrebs und Magenkarzinomen assoziiert werden (Nishimura et al., 2013).

2.7.3.2 HPRT1

Auch HPRT1 zählt zu den Haushaltsgenen und wurde im Rahmen der durchgeführten PCRs als Vergleich zu den immunassoziierten Genen verwendet. Die hypoxanthine Phosphoribosyltransferase ist das Enzym, das vom HPRT1 Gen, welches sich am X-Chromosom befindet, codiert wird. Aufgabe des Enzyms ist es, Guanin zu Guanosin-Monophosphat wiederzuverwerten. Damit kann einerseits Energie in Form von ATP gespart werden und andererseits die Harnsäurebildung im Organismus stark reduziert werden. Ein bekanntes Beispiel für eine Fehlfunktion des HPRT1-Gens ist das Lesch-Nyhan-Syndrom (Lattime and Gerson, 2013). Bei dem Syndrom kommt es durch HPRT-

Mangel zu einem vermehrten Anfall von Harnsäure im Organismus. Die Kinder präsentieren sich mit Störungen des Zentralnervensystems in Form von Choreoathetosen, selbstverletzendem Verhalten und spastischen Bewegungen (Ganten and Ruckpaul, 2013).

2.7.4 Verdünnungsreihen

Um die Effizienzen der jeweiligen Primer festzustellen, wurden cDNA Verdünnungsreihen in der Real Time PCR angewandt. Dazu wurde die aus gesunden Leukozyten hergestellte cDNA mit cRNA Wasser (Qiagen, Hilden, Germany) verdünnt, sodass für die Verdünnungsreihe cDNA Gesamtkonzentrationen von 50ng, 10ng, 2ng, 0,4ng und 0,08ng pro zwei µl eingesetzter cDNA erreicht werden konnten.

Nach Durchführung der PCR wurden mithilfe der LightCycler 480 Software die Cp-Werte ermittelt. Der Cp-Wert gibt jenen Zyklus in der PCR an, in welchem erstmals das Fluoreszenz-Signal der Probe signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die so ermittelten Cp-Werte und die eingesetzten cDNA Konzentrationen wurden in Microsoft Excel® (Microsoft, Redmond, USA) übertragen, um mithilfe des Programms die Effizienz der Primer zu berechnen. Dies erfolgte anhand der Steigung der für jeden Primer erstellten Standardkurve. Es wurde der Logarithmus der jeweils eingesetzten cDNA-Konzentration gegen den Mittelwert des in der PCR ermittelten Cp-Wertes aufgetragen. Da für die Gene HPRT1 und YWHAZ die Konzentrationen jeweils in Triplets aufgetragen wurden, wurde auch der mediane Cp-Wert aus den drei sich ergebenden Werten berechnet, während für die übrigen Gene nur Duplikate der Konzentrationen pipettiert wurden. Aus diesen Werten ergab sich das Bestimmtheitsmaß (R^2) sowie die Effizienz ($E = 10^{-1/R^2}$) des Primers (Wiedemann und Weber, 2004).

2.7.5 Expression der immunassoziierten Gene auf Leukozyten

Um die Expression der immunassoziierten Gene auf Immunzellen wie Leukozyten und im Speziellen auf CD3-Zellen mit jener auf anderen Zelllinien zu vergleichen, wurde eine Real-time PCR durchgeführt, bei welcher die Primer für die Gene CCRL2, CD3D, CD3G und CCRL2 gleichzeitig auf Leukozyten, CD3-Zellen, A549-Zellen, NCI H23-Zellen, MCF 7-Zellen und BT474-Zellen verwendet wurden. Dabei handelt es sich bei A549 und NCI H23 um Zellen eines Adenokarzinoms der Lunge, MCF 7-Zellen entstammen einem Adenokarzinom der Mamma, BT474-Zellen sind Zellen eines duktales Mammakarzinoms. Für alle diese Zellreihen stand bereits isolierte RNA zur Verfügung.

2.7.6 Gelelektrophorese

Um zu kontrollieren, ob die DNA-Fragmente der PCR mit den immunassoziierten Genen CCRL2, CD2D, CD3G und CXCR1 die richtige Größe besitzen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

2 g Agarose (Biozym, Vienna, Austria) wurden in einen Glaskolben eingewogen und mit TBE Puffer auf ein Volumen von 110 ml aufgefüllt. Das Gemisch wurde unter gelegentlichem Schwenken für eineinhalb Minuten erhitzt. Der Kolbeninhalt wurde auf Zimmertemperatur abgekühlt und 10 µl PegGreen (Peqlab, Erlangen, Germany) wurden zugegeben. Die Gelmischung wurde auf der Elektrophoresekammer (Biorad, Vienna, Austria) ausgegossen und ausgehärtet. Anschließend wurden 5 µl aus den Wells der PCR Platte von jedem der vier Gene in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Dabei wurde von jedem Gen eine Probe mit Leukozyten-DNA, eine NAC und eine NTC Probe verwendet. In jedes Eppendorfgefäß kam anschließend 1 µl DNA loading dye (Nunc, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) hinzu. In die zwei seitlichen Kammern der Elektrophoreseplatte wurden jeweils 5 µl der GeneRuler 50bp DNA ladder (Thermo Scientific, Waltham, USA) pipettiert. In die dazwischen liegenden Kammern wurden 5 µl von jedem PCR Produkt pipettiert. Es wurde ein elektrisches Feld bei 110 Volt angelegt und die Gelelektrophorese für 35 Minuten laufen gelassen. Die DNA-Fragmente wurden nach ihrer Auftrennung mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Biorad, Vienna, Austria) visualisiert.

2.7.7 Berechnung des Genexpressionsgrades

Um die Genexpression der einzelnen untersuchten Gene feststellen zu können, wurde zuerst der Cp-Wert der einzelnen Proben bestimmt, der jenen Zyklus bezeichnet, in welchem das Fluoreszenzsignal der Probe erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Dazu wurde die Software des zur PCR verwendeten Light-Cyclers LC480 verwendet. Zur Berechnung wurde die Absolute Quantification/Second Derivate Maximum Methode ausgewählt. Diese Methode legt den Cp-Wert an dem Punkt fest, an dem die Fluoreszenzkurve der Probe die stärkste Steigung aufweist. Die mit dieser Methode ermittelten Cp-Werte konnten danach in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel exportiert werden. Dort wurde die $C\Delta\Delta$ -Methode angewandt um den relativen Expressionsgrad der immunassoziierten Gene in Bezug auf die Haushaltsgene YWHAZ und HPRT1 zu bestimmen (Livak K. and Schmittgen T., 2001). Im ersten Schritt wurde für jedes zu untersuchende Gen der Cp-Wert des Referenz-Haushaltsgens YWHAZ oder HPRT1 vom Cp-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert, daraus ergab sich der ΔC_p -Wert. Um nun den Expressionsunterschied zwischen behandelter und Kontrollprobe

feststellen zu können, wurde vom ΔCp -Wert der mit 5-Azacytidin behandelten Proben der ΔCp -Wert der vehicel control abgezogen, womit man zum $\Delta\Delta\text{Cp}$ -Wert gelangte. Der relative Expressionsunterschied zwischen der behandelten und nicht-behandelten Probe ergab sich folglich aus der Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Cp}}$. Um jedes untersuchte Immunreaktion-assoziierte Gen nicht nur auf ein, sondern auf zwei Haushaltsgene zu normieren, wurde zur Berechnung des ΔCp -Wertes immer der Mittelwert der beiden Cp-Werte von HPRT1 und YWHAZ verwendet und so in den Ergebnissen dargestellt.

2.7.8 In silico Klarzelliges Nierenzellkarzinom Kollektiv (TCGA)

Um den Methylierungsgrad der untersuchten immunassoziierten Gene in Nierenkarzinomzellen mit jenem in gesunden Nierenzellen zu vergleichen, wurden Daten aus dem „The cancer genome atlas (TCGA)“ Portal (<https://cancergenome.nih.gov/>) verwendet. Dabei wurden für die Tumorzellen 518 Methylierungswerte, und zum Vergleich 169 Werte von normalem Nierengewebe für die Methylierung herangezogen wurden. Die Illumina-HiSeq-Expressionsdaten und die Illumina-Infinium450k-Methylierungsdaten für die Immungene wurden über das cBio Cancer Genomics Portal (<http://cbioportal.org>) bezogen. Die Daten wurden in Microsoft Excel übertragen und dort in Boxplot Graphiken zusammengefasst.

2.7.9 In silico TCGA Überlebensdaten

Mithilfe der Online Plattform „The Cancer Immunome Atlas“ (“TCIA,” <https://tcia.at/home>) wurde durch Verwendung von TCGA Daten zu PatientInnen mit klarzelligem Nierenkarzinom der Zusammenhang zwischen der Genexpression der sieben verwendeten Immungene und der Überlebensdauer der PatientInnen untersucht. Dabei wurden in die Analyse Personen jeden Alters und Geschlechts, jedoch nur PatientInnen ohne Fernmetastasen (M0) miteinbezogen. Die Graphiken zur Überlebensanalyse wurden von der Website erstellt und heruntergeladen.

2.8 Statistische Auswertung

Für die Analyse der Daten und die daraus erstellten Diagramme zur Veranschaulichung der Ergebnisse wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel® (2013, Version 15.0) verwendet. Die Daten für die PCR-Ergebnisse wurden dabei aus der LC480-Software entnommen, Werte für den Methylierungsgrad der immunassoziierten Gene bei Nierenkarzinompatienten entstammten dem TCGA-Portal.

3 Ergebnisse – Resultate

3.1 Effizienzbestimmung der Primer

Es existieren unterschiedliche Methoden für die Effizienzbestimmung einer PCR-Reaktion. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu Verdünnungsreihen der cDNA erstellt, um so die Amplifikationsraten der verschiedenen Primer bei unterschiedlichen cDNA-Konzentrationen vergleichen zu können (Pfaffl, 2004). Anhand der Ergebnisse der PCR wurde im Excel eine Standardkurve erstellt, und anhand der Steigung die jeweilige Effizienz für den verwendeten Primer bestimmt. Dabei ergaben sich folgende Werte:

cDNA-Standardkurve

Primer	R²	PCR-Effizienz
HPRT1	1,000	1,942
YWHAZ	1,000	1,968
CD3D	0,983	2,101
CD3G	0,994	1,881
CXCR1	1,000	1,897
LAX1	0,994	2,052
Sit1	1,000	2,002
ICOS	0,984	1,709

Eine optimale Effizienz der PCR ergibt sich, wenn die Zahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus exakt verdoppelt wird, wodurch sich ein R²-Wert von 1,000 und eine PCR-Effizienz von 2 ergeben. Zeigt der Primer keine optimale Effizienz, können die Werte davon abweichen, umso stärker, je weniger effizient der Primer funktioniert. Da einige der Gene generell deutlich geringer auf den untersuchten Zelllinien exprimiert waren als andere, kann sich auch dadurch eine etwas geringere Effizienz ergeben. Andere mögliche Erklärungen für die geringe Abweichung von optimalen Effizienzen sind ungenaues Pipettieren des Mastermix oder Temperaturunterschiede zwischen den Wells.

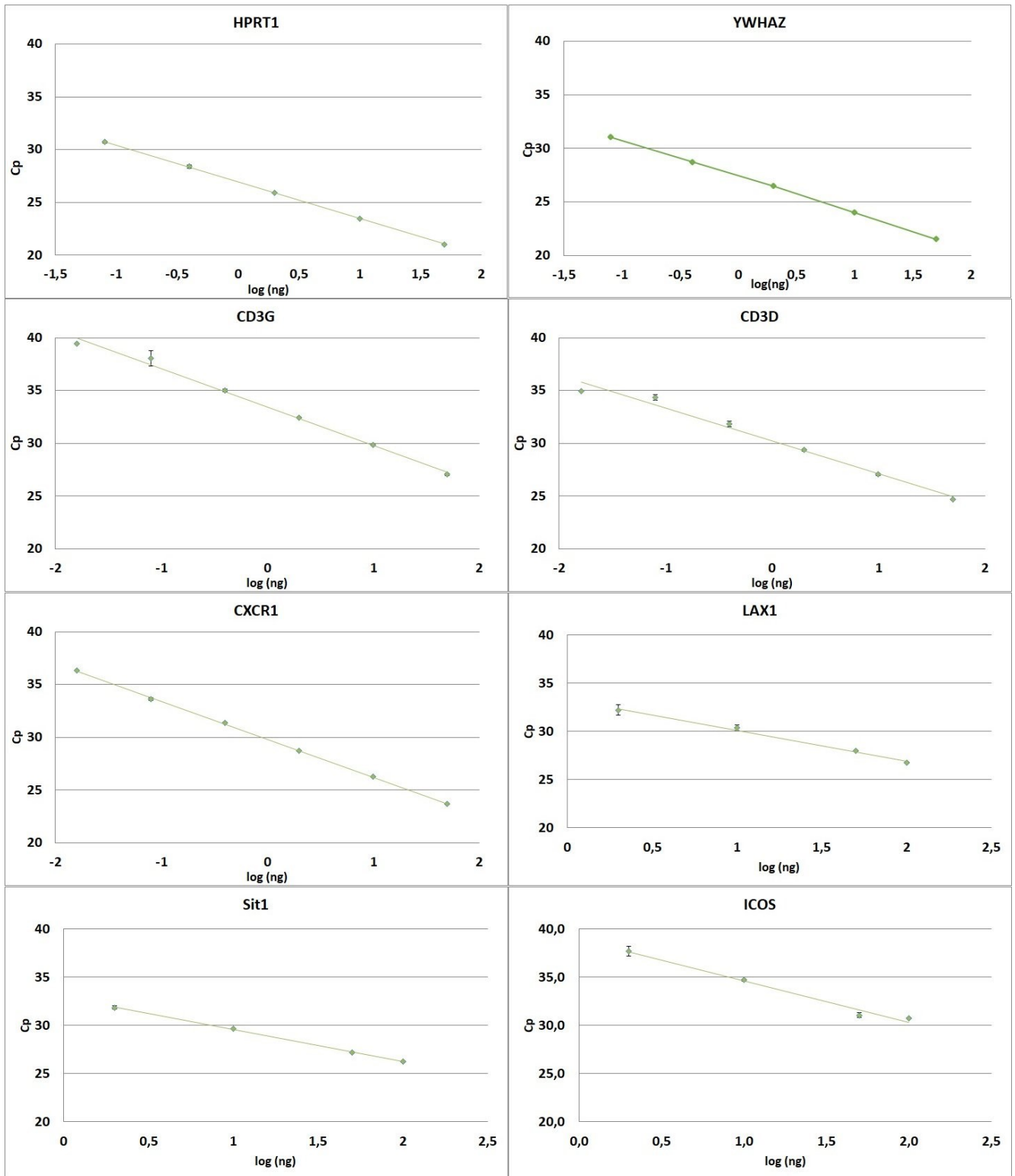


Abbildung 2: Standardkurven der PCRs mit cDNA-Verdünnungsreihen und den Primern HPRT1, YWHAZ, CD3G, CD3D, CXCR1, LAX1, Sit1 und ICOS. Durch Auftragen des Logarithmus der cDNA-Konzentrationen gegen den jeweiligen Cp-Wert der Probe ergibt sich die Steigung und jeweilige Effizienz des Primers. HPRT1 (E=1,942), YWHAZ (E=1,968), CD3D (E=2,101), CXCR1 (E=1,897), LAX1 (E=2,052) und Sit1 (E=2,002) zeigen beinahe optimale Effizienz. CD3G mit einer Effizienz von 1,881 und ICOS mit einer Effizienz von 1,709 weichen etwas von der gewünschten Effizienz (2,000) ab.

3.2 Gelelektrophorese

Zum Auswerten der Gelelektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet. Je weiter die Bande gelaufen war, desto kleiner war das jeweilige DNA-Fragment. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese passten mit der bekannten Größe der jeweiligen PCR-Produkte zusammen. Auf der unten angeführten Abbildung zeigt sich in den beiden äußeren Banden die DNA-Leiter zum Vergleich der Anzahl der Produktgrößen aus den PCR-Proben. Von links nach rechts finden sich jeweils die PCR-Produkte der vier untersuchten Gene aufgetragen, einmal auf Leukozyten-DNA, sowie darauf folgend jeweils die Non-amplification control und Nullkontrolle.

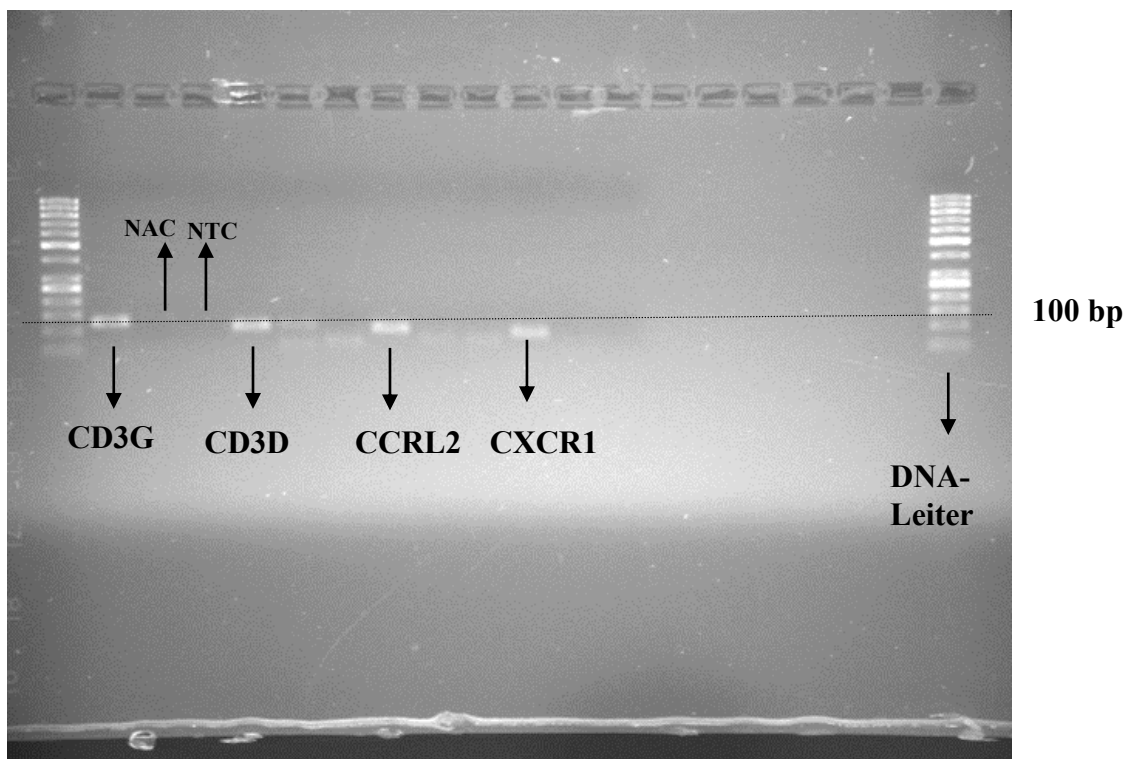


Abbildung 3: Repräsentatives Ergebnis der Gelelektrophorese anhand von vier ausgewählten Genen: Die PCR-Produkte von CD3G, CD3D, CCRL2 und CXCR1 zeigten im Vergleich mit der DNA-Leiter eine Laufweite entsprechend ihrer Produktgröße. Jede Bande der DNA-Leiter repräsentiert 50 Basenpaare. Die Produkte von CD3G mit 120 bp, CD3D mit 99 bp, CCRL2 mit 91 bp und CXCR1 mit 82 bp zeigen daher eine korrekte Laufweite und Produktgröße. Zur besseren Darstellung markiert die Linie die Laufweite der DNA-Leiter bei 100 Basenpaaren.

3.3 Expression auf Leukozyten

Um zu bestimmen, wie hoch die Gene CCRL2, CD3D, CD3G und CXCR1 in Leukozyten exprimiert sind, wurden die Primer der jeweiligen Gene sowohl auf Leukozyten als auch auf CD3-Lymphozyten eingesetzt, wobei bei beiden Zellen eine hohe Expression erwartet wurde, da diese immunassoziierten Gene vorwiegend in Lymphozyten exprimiert werden. Zum Vergleich wurden auch noch Karzinomzelllinien eingesetzt, wobei man sich bei diesen eine minimale bis keine Expression der genannten Gene erwarten würde. Die RNA aller im Rahmen dieser PCR verwendeten Zellreihen stand bereits isoliert zur Verfügung. Die im folgenden Diagramm dargestellten Ergebnisse entsprechen diesen Erwartungen. Während sich in den Leukozyten alle vier Gene, wenn auch in unterschiedlich starkem Ausmaß, exprimiert zeigen, lässt sich in den Karzinomzelllinien so gut wie keine Genexpression feststellen. In den CD3-Lymphozyten zeigten sich CD3D und CD3G stark exprimiert, während CCRL2 und CXCR1 hier kaum Genexpression zeigen, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass diese beiden Gene zwar auf anderen Leukozyten exprimiert sind, nicht aber speziell auf CD3-Lymphozyten. Bei den beiden Lungenadenokarzinom-Zelllinien A549 und NCI H23 ließ sich gar keine Expression der vier Gene feststellen, ebenso wie auf den Mammakarzinomzellen MCF 7. Eine sehr geringe Expression lässt sich allerdings auf den BT474 Zellen eines duktales Mammakarzinoms verzeichnen.

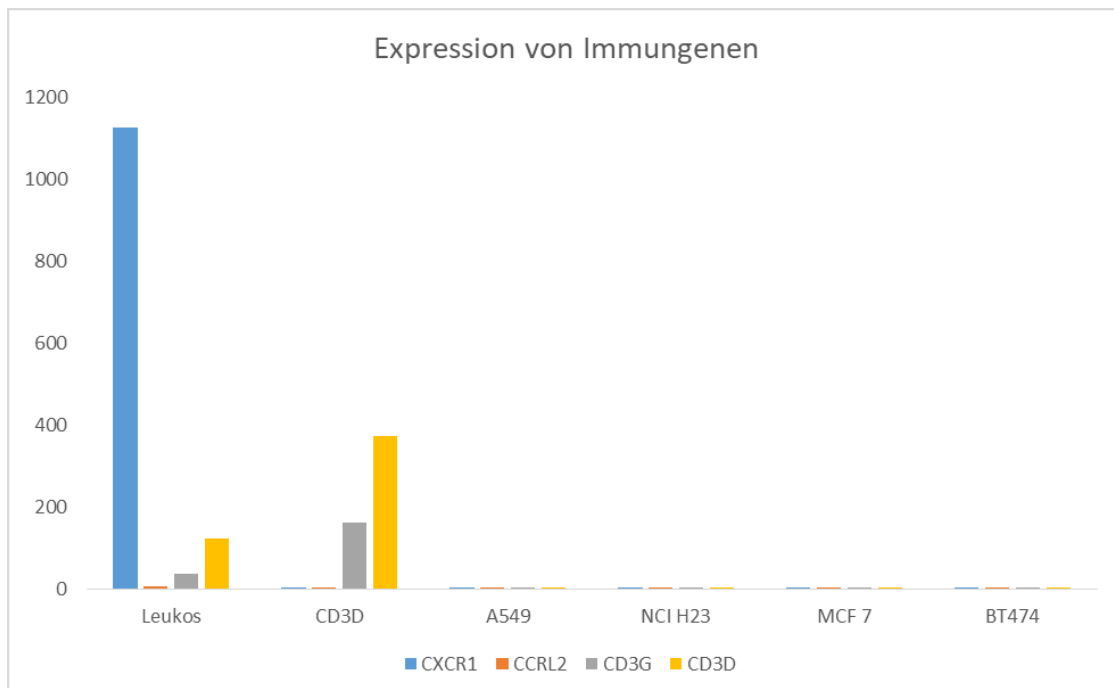


Abbildung 4: Relative Expression der Gene CCRL2, CD3D, CD3G, und CXCR1 normiert auf die Haushaltsgene HPRT1 und YWHAZ. In Leukozyten zeigen sich hohe Expressionsraten, während in den Krebszelllinien kaum Expression dieser Gene zu verzeichnen ist.

3.4 5-Azacytidin-Behandlung

Die Ergebnisse der Expressionsraten für jedes Gen wurden in der Zelllinie RCC FG1 für die 10 μM und 5 μM mit 5-Azacytidin behandelten Zellen getrennt berechnet, und anschließend im Vergleich zur unbehandelten Vehikelkontrolle in Form eines Diagramms im Excel dargestellt. Dasselbe Verfahren wurde für die Zelllinie RCC MF angewandt.

Um verwertbare Ergebnisse der ermittelten Expressionsdaten der einzelnen immunassoziierten Gene zu erhalten, wurden diese gegen die ebenfalls in den PCRs getesteten Haushaltsgene normalisiert. Da für eine Normalisierung stets Gene verwendet werden sollten, die in allen Zellen aktiviert sind, wurden Haushaltsgene verwendet. Da mittlerweile bekannt ist, dass auch bei diesen unterschiedliche Expressionsraten, abhängig vom Typ des untersuchten Gewebes, gefunden werden können, sollten immer mindestens zwei Haushaltsgene zur Normalisierung herangezogen werden. In diesem Fall wurden dazu HPRT1 und YWHAZ herangezogen (Wiedemann, C. et al.).

3.4.1 RCC FG1

In der Zelllinie RCC FG1 wurden Primer der Gene CD3G, CCRL2, CD3D, CXCR1, LAX1, ICOS, Sit1 und CXCR1 eingesetzt und diese jeweils wie beschrieben gegen YWHAZ und HPRT1 normiert. Die Ergebnisse wurden immer als Vergleich der Expressionsrate der mit 5 oder 10 μM AZA-behandelten cDNA mit der unbehandelten Vehikelkontrolle dargestellt. Die Diagramme veranschaulichen, wie stark das jeweilige Immunreaktion-assoziierte Gen generell auf RCC FG1 exprimiert ist, beziehungsweise, wie eine Behandlung mit AZA die Expression des jeweiligen Gens durch Demethylierung verändert hat. Die Ergebnisse zeigten, dass einige, aber nicht alle der Gene durch eine AZA-Behandlung der Nierenkarzinomzellen eine höhere Expression zeigen. CD3G, CD3D, CCRL2 und CXCR1 zeigen im Vergleich mit der Vehikelkontrolle höhere Expressionsraten in den mit AZA behandelten Zellen, was sich auf eine stattgefundene Demethylierung dieser Gene durch das 5-Azacytidin zurückführen lässt. Nicht jedes Gen jedoch lässt sich durch eine demethylierende Substanz aktivieren, was sich in den Ergebnissen der Gene LAX1, Sit1 und ICOS widerspiegelt. Diese zeigen auch in den mit AZA behandelten Proben keine Erhöhung der Expression.

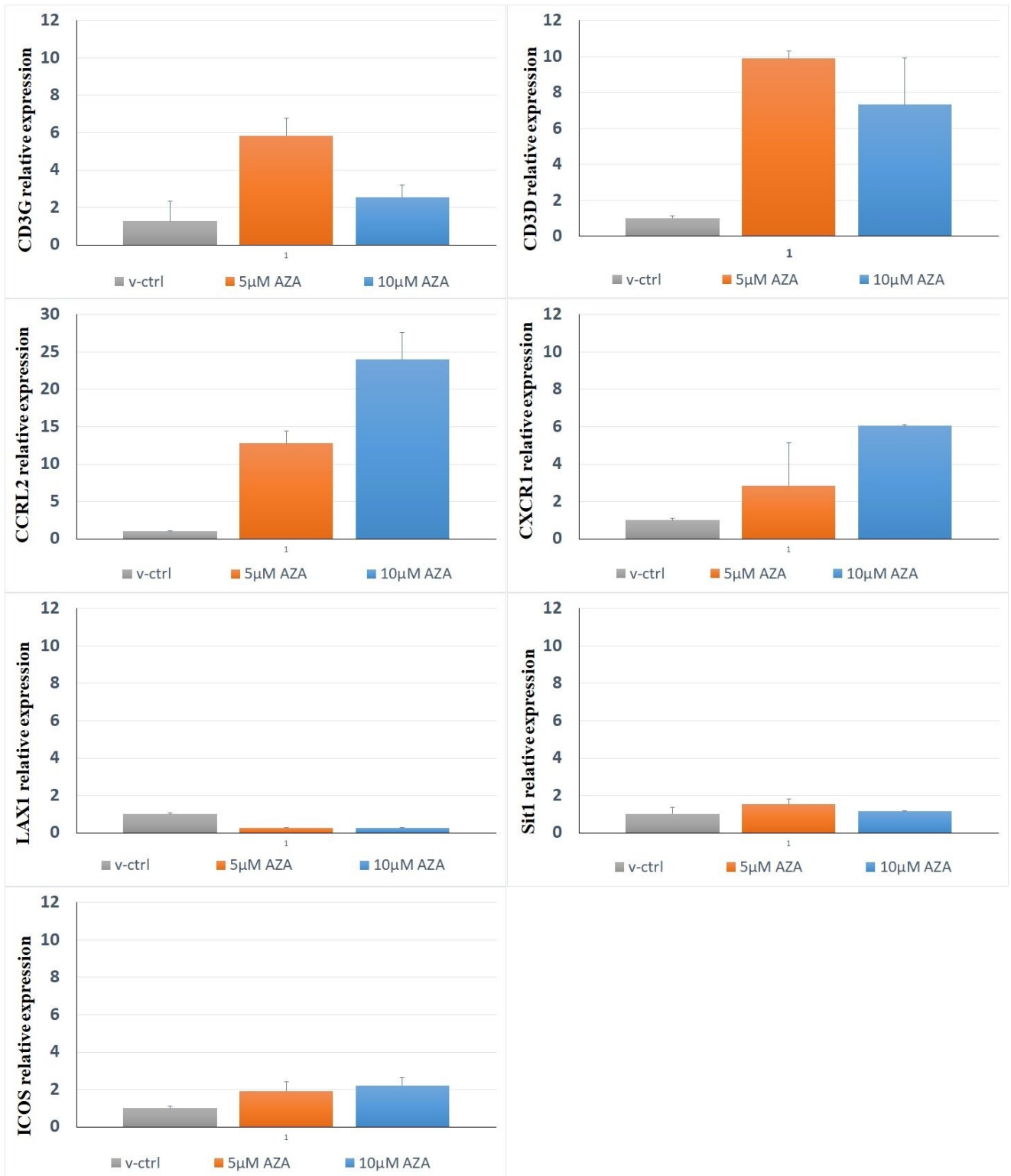


Abbildung 5: Relative Genexpression der Gene CD3G, CCRL2, CD3D, LAX1, ICOS und Sit1, normiert auf die Haushaltsgene YWHAZ und HPRT1. Bei CD3G, CCRL2 und CD3D zeigt sich bei den Proben mit AZA-Behandlung eine deutlich gesteigerte Genexpression durch Demethylierung. LAX1 weist bei der unbehandelten Vehikelkontrolle eine höhere Expressierung auf als die mit AZA-behandelten Vergleichsproben, jedoch liegen die Expressionswerte aller Proben in so niedrigem Bereich, dass dies unspezifisch ist. ICOS und Sit1 zeigen durch die AZA-Behandlung ebenfalls keine gesteigerten Expressionsraten.

3.4.2 RCC MF

In der Zelllinie RCC MF wurden ebenso die Gene CD3G, CCRL2, CD3D, LAX1, ICOS, Sit1 und CXCR1 getestet und gegen YWHAZ und HPRT1 normiert. Die Ergebnisse wurden immer als Vergleich der Expressionsrate der mit 5 oder 10 μ M AZA-behandelten cDNA mit der unbehandelten Vehikelkontrolle dargestellt. Die Diagramme veranschaulichen, wie stark das jeweilige Immunreaktion-assoziierte Gen generell auf RCC MF exprimiert ist, beziehungsweise, wie eine Behandlung mit AZA die Expression des jeweiligen Gens durch Demethylierung verändert hat. In den RCC MF Zellen zeigte sich dabei ein erhöhter Expressionsgrad der Gene CD3G, CD3D und CCRL2 in den mit 5-Azacytidin behandelten Karzinomzellen. CXCR1 zeigte in den RCC MF Zellen im Gegensatz zu RCC FG1 keine vermehrte Expression durch die AZA-Behandlung. Die Expression von LAX1, Sit1 und ICOS war wie bei RCC FG1 auch in den behandelten Proben nicht angestiegen.

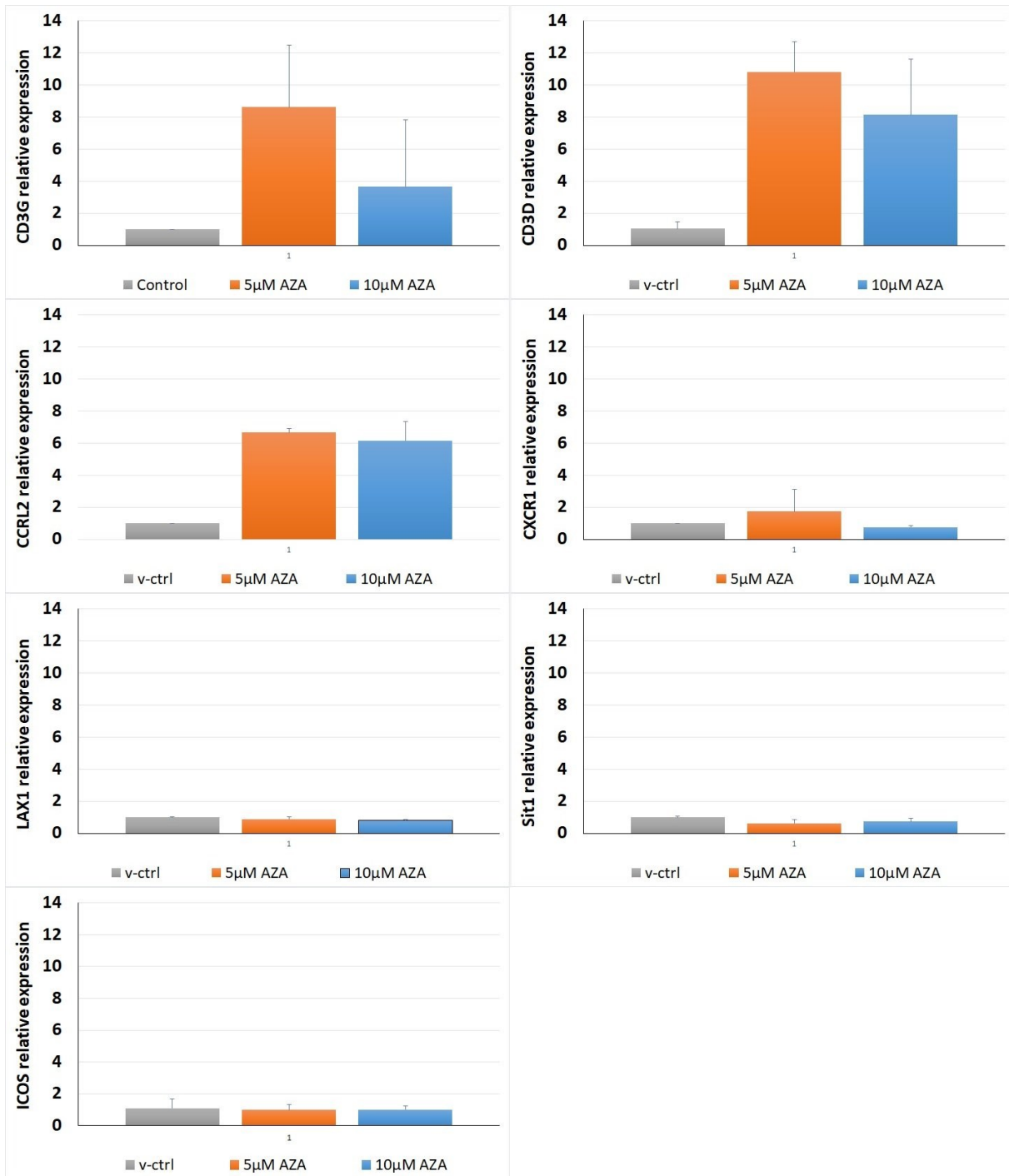


Abbildung 6; Relative Genexpression der Gene CD3G, CCRL2, CD3D, CXCR1, LAX1, ICOS und Sit1, normiert auf die Haushaltsgene YWHAZ und HPRT1. Bei CD3G, CCRL2 und CD3D zeigt sich dass die AZA-Proben durch die stattgefundenene Demethylierung deutlich höhere Expressionsraten zeigen als die unbehandelte Vehikelkontrollen. Bei CXCR1, LAX1, ICOS und Sit1 lässt sich keine Steigerung der Genexpression durch die Behandlung mit 5-Azacytidin verzeichnen.

3.5 *In silico*-Vergleich der Methylierung in normalen Nierenzellen und Nierenkarzinomzellen

Für jedes der sieben Immun-assoziierten Gene ergab sich dabei eine höhere Methylierung der Gene in den normalen Nierenzellen als in den Nierenkarzinomzellen. Die Graphen zeigen, dass die Methylierungswerte auf den Tumorzellen deutlichen Schwankungsbreiten unterliegen, während die Werte der Methylierungsgrade auf gesunden Nierenzellen deutlich weniger breit gestreut sind. Die Expressionsdaten der Gene zeigen, dass alle sieben untersuchten Immungene in den Nierenkarzinomzellen signifikant stärker exprimiert sind als in gesundem Gewebe, was mit dem höheren Methylierungsgrad in gesunden Nierenzellen zusammenpasst.

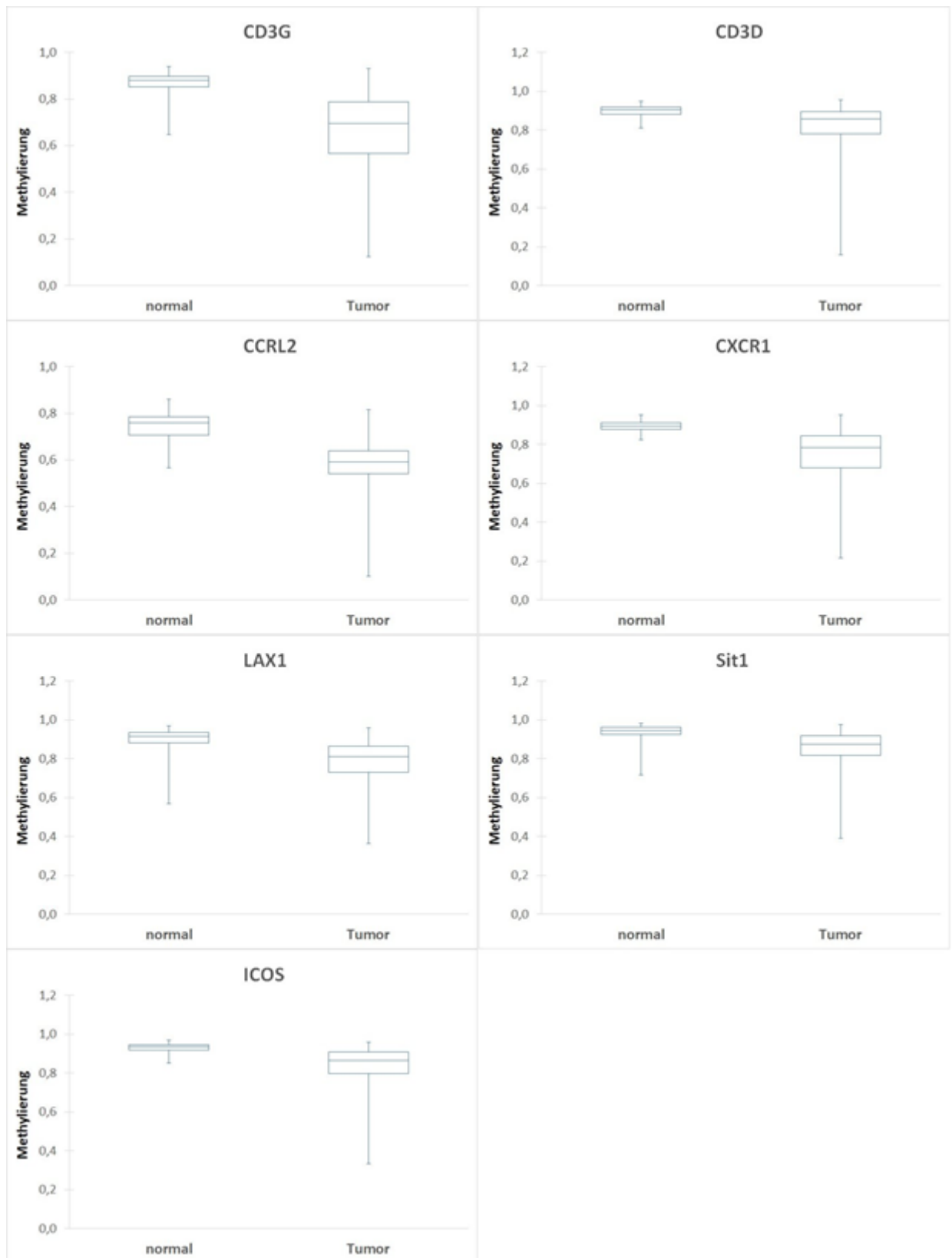


Abbildung 7: Vergleich des Methylierungsgrads der immunassoziierten Gene CD3G, CD3D, CCRL2, CXCR1, LAX1, Sit1 und ICOS in gesunden Nierenzellen und Nierenkarzinomzellen anhand von Werten aus dem TCGA Portal. Alle Gene zeigen einen niedrigeren Methylierungsgrad im Tumorgewebe. Darstellung der Daten als Boxplots, die horizontale Linie stellt den Median dar, vertikale Linien Minima und Maxima, Boxen 25% bis 75% Quartile.

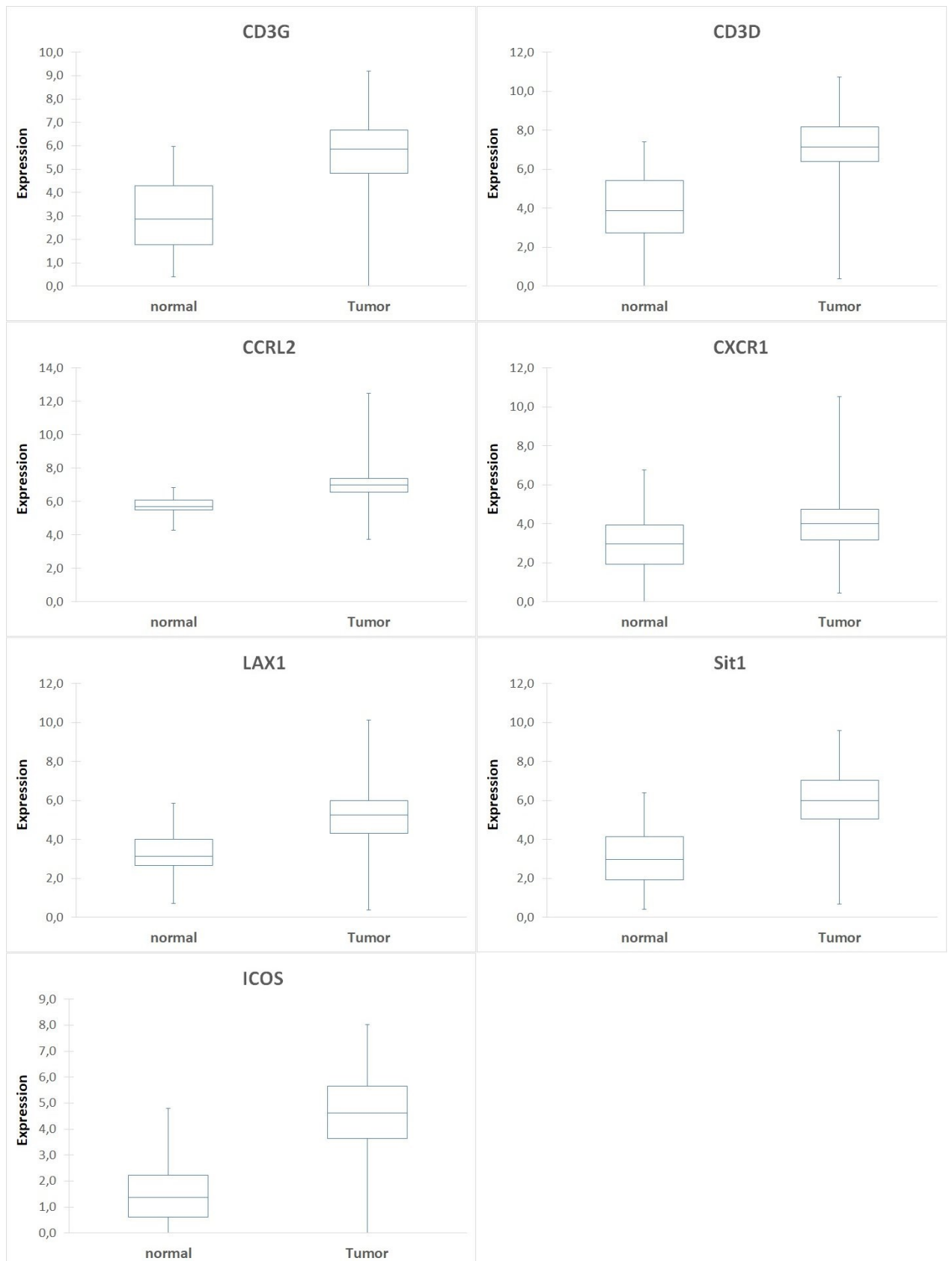


Abbildung 8: Vergleich der Expression der immunassoziierten Gene CD3G, CD3D, CCRL2, CXCR1, LAX1, Sit1 und ICOS in gesunden Nierenzellen und Nierenkarzinomzellen anhand von Werten aus dem TCGA Portal. Passend zu den oben unter Abb. 8 dargestellten Methylierungswerten zeigen die Tumorzellen mit niedrigeren Methylierungsraten eine höhere Immungenexpression im Vergleich zu gesunden Nierenzellen. Darstellung der Daten als Boxplots, die horizontale Linie stellt den Median dar, vertikale Linien Minima und Maxima, Boxen 25% bis 75% Quartile.

3.6 In Silico Analyse des Zusammenhangs zwischen Genexpression und Überlebensdauer

Die Analyse von Genexpressions- und Überlebensdaten aus dem „The Cancer Genome Atlas“ (TCGA) mithilfe der Online Plattform „The Cancer Immunome Atlas (TCIA)“ zeigte, dass bei drei der untersuchten immunassoziierten Gene eine höhere Genexpression mit einem längeren PatientInnenüberleben assoziiert ist. So zeigt sich bei LAX1 ein signifikant besseres Gesamtüberleben bei Patienten mit höherer Genexpression, CD3G und CCRL2 erreichen borderline-Signifikanz.

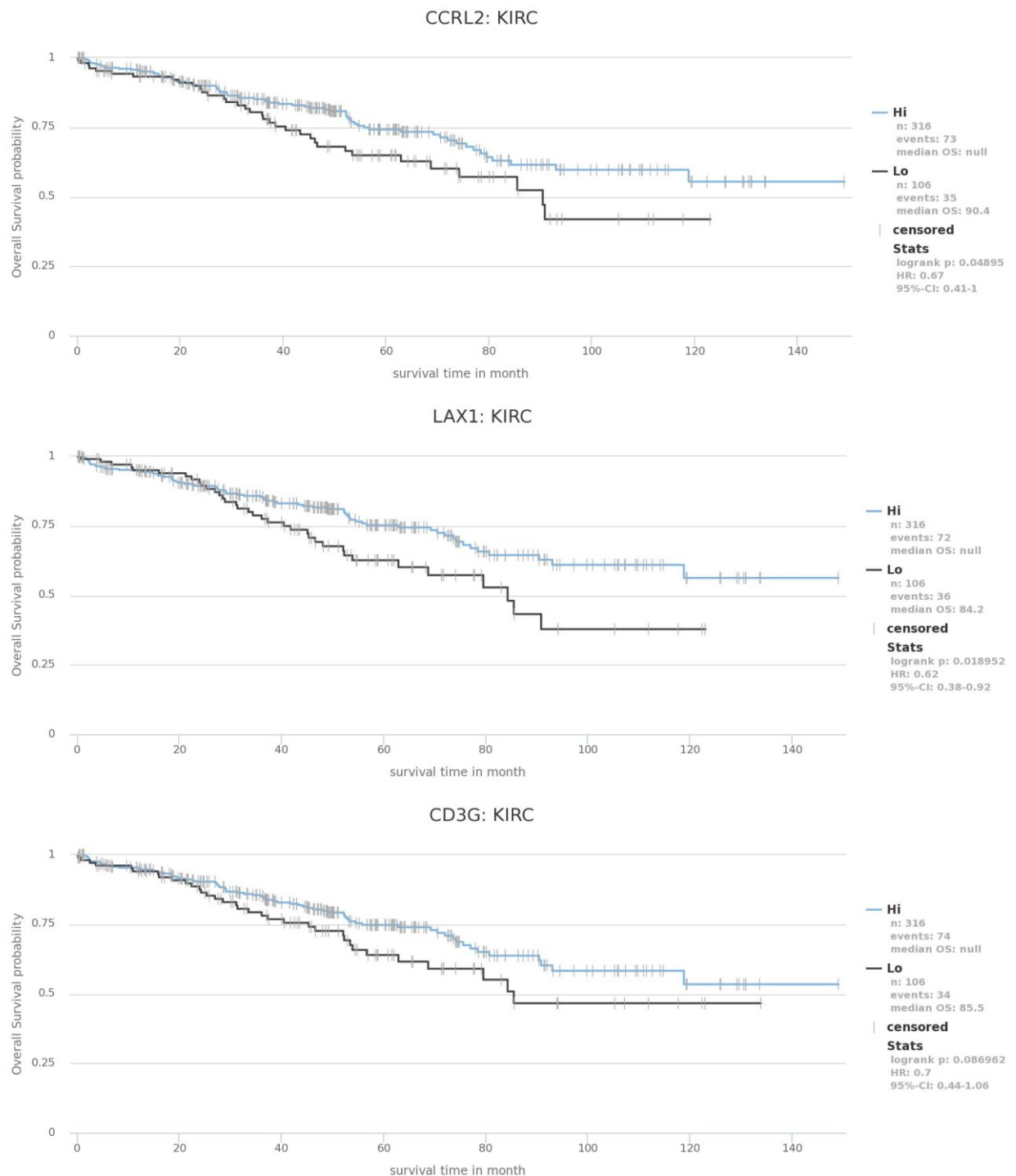


Abbildung 9: Zusammenhang zwischen Gesamtüberleben und der Höhe der Genexpression, ermittelt anhand der TCIA Plattform unter Verwendung der Daten des TCGA Portals (<https://tcia.at/expression>). Inkludiert wurden alle Daten von PatientInnen mit klarzelligem Nierenkarzinom ohne Fernmetastasen (M0), der Cut-off Wert für die Genexpression wurde bei 0,25 gewählt. LAX1 zeigt ein signifikant besseres survival (P=0,019) bei PatientInnen mit höherer Expression des Gens. CCRL2 (P=0,049) und CD3G (P= 0,086) zeigen ein borderline-signifikantes längeres Überleben bei hoher Expression des jeweiligen Gens.

Bei den Immungenen CD3D, CXCR1, Sit1 und ICOS lässt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Höhe der Genexpression und dem Gesamtüberleben zeigen.

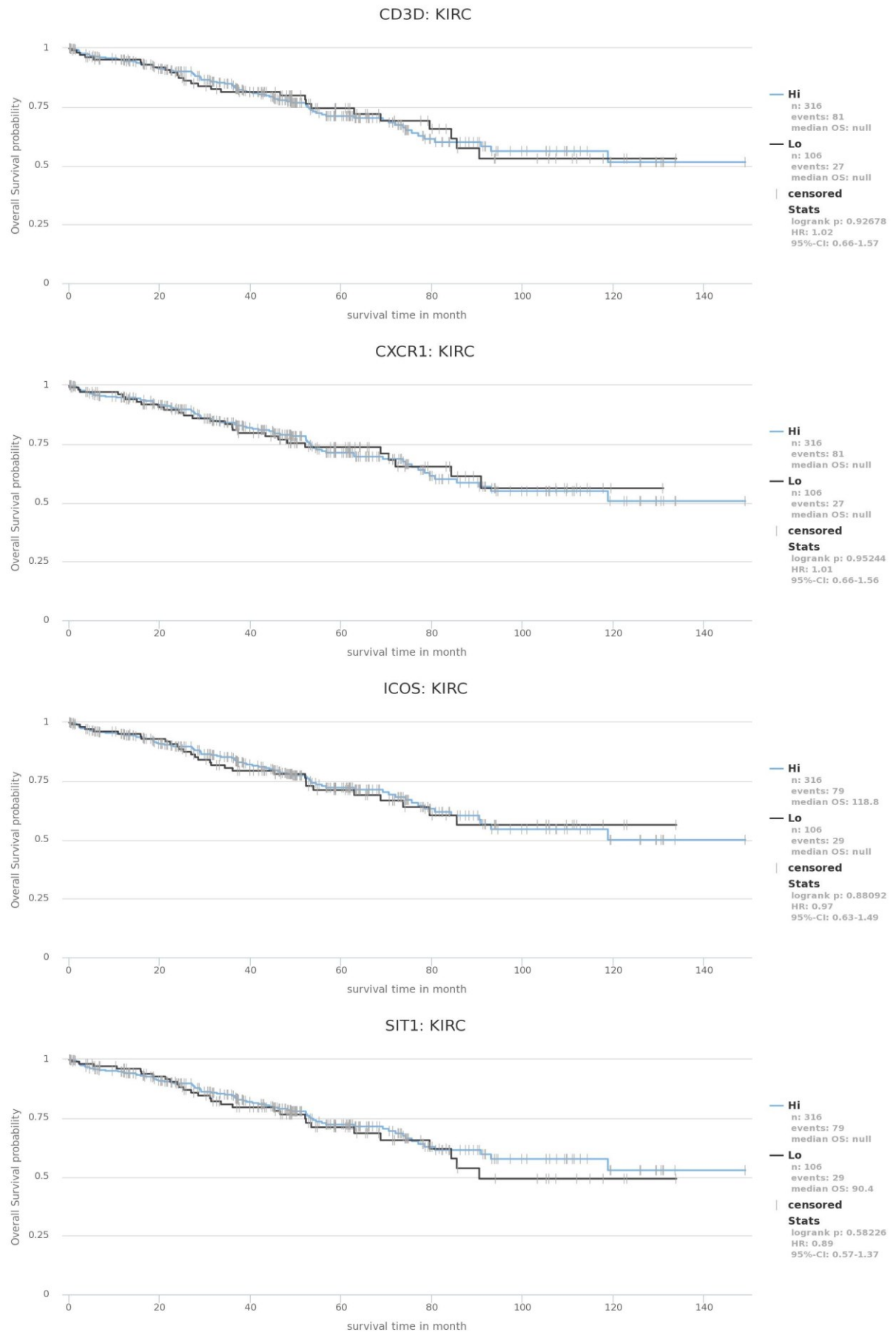


Abbildung 10: CD3D (p=0,927), CXCR1 (p= 0,952), ICOS (p=0,881) und Sit1 (p=0,582) zeigen kein signifikant längeres Gesamtüberleben bei höherer Genexpression. (<https://tcia.at/expression>)

4 Diskussion

Um die Expression von Genen zu regulieren, stehen unterschiedliche epigenetische Mechanismen zur Verfügung. Eine davon ist die DNA-Methylierung, die vor allem in der Karzinogenese eine herausragende Rolle zu spielen scheint. Während sich in Tumorgewebe insgesamt eine globale Hypomethylierung verzeichnen lässt, sind Promotoren der Tumorsuppressorgene häufig hypermethyliert und damit in ihrer Aktivität eingeschränkt. Des Weiteren können Onkogene durch Verlust der Methylierung aktiviert werden (Knasmüller, 2014).

Auch die Aktivität von Immungenen, die an der Ausübung von Immunantworten des Organismus beteiligt sind, kann sich in Karzinomen verändert zeigen. Durch unterschiedlichste Mechanismen der Genregulation können auch immunassoziierte Gene im Karzinomgewebe an- oder abgeschaltet werden (Passarge, 2008). Daher war es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob die Aktivität der ausgewählten Immungene über eine Demethylierung verändert werden kann und ob sich generell Methylierungs- bzw. Expressionsunterschiede dieser Gene im Vergleich zwischen gesunden und Karzinomzellen finden lassen.

Um die epigenetische Regulation von immunassoziierten Genen, die von Lymphozyten exprimiert werden, zu untersuchen, wurden Nierenkarzinomzelllinien mit 5-Azacytidin behandelt, was, sofern ein Gen durch (De-)Methylierung epigenetisch reguliert wird, eine vermehrte Expression des Gens hervorrufen würde. Es wurden dabei nicht direkt die Genmethylierungen nachgewiesen, sondern die Genexpression einzelner Gene vor und nach der 5-AZA-Behandlung untersucht, was somit nur einen indirekten Schluss auf eine eventuell stattgefundenene Demethylierung erlaubt. Nicht alle in dieser Arbeit untersuchten Gene zeigten jedoch eine methylierungs-abhängige Aktivierung. CD3G, CD3D und CCRL2 zeigten sowohl in der Zelllinie RCC FG1 als auch in RCC MF Zellen eine erhöhte Expression der Immungene nach 72-stündiger Behandlung mit 5-AZA. Das 5-Azacytidin dürfte also die Methylierung jener drei Gene entfernt haben, was zu einer Aktivierung dieser geführt hat. Tendenziell wäre zu erwarten gewesen, dass auf den mit 10 μM AZA behandelten Zellen eine noch höhere Expression der Gene zu verzeichnen wäre als auf jenen, die nur mit einer niedrigeren AZA-Konzentration von 5 μM behandelt wurden. Die Ergebnisse der Real-time PCR zeigten aber, dass auf der Zelllinie RCC FG1 die Gene

CD3G und CD3D und auf RCC MF die Gene CD3G, CD3D und CCRL2 auf den mit 5 μ M AZA behandelten Zellen eine höhere Expression zeigten als auf den mit 10 μ M AZA behandelten Proben. Es ist anzunehmen, dass die AZA-Konzentration von 10 μ M in diesen Zellen eventuell schon zu hoch war, und anstatt einer stärkeren demethylierenden Wirkung schon eine schädigende Wirkung auf die Zellen ausgeübt hat. Bei dem Gen CXCR1 zeigt sich in der Zelllinie RCC FG1 eine erhöhte Expression in den mit AZA behandelten Zellen, während bei demselben Gen in RCC MF Zellen keine Änderung der Expression festgestellt werden konnte. Sofern das Gen methylierungsabhängig reguliert wäre, müssten sich theoretisch in beiden Zelllinien erhöhte Expressionswerte finden, nachdem die Zellen mit einer demethylierenden Substanz behandelt wurden. Bei CXCR1 zeigt sich jedoch auch auf RCC FG1 nur eine geringe Steigerung der Expression in den AZA-behandelten Zellen im Vergleich zu CD3D, CD3G und CCRL2. Daher kann es sein, dass die Ergebnisse der RCC FG1 Zelllinie nicht wirklich aussagekräftig sind, und das Gen eventuell nur zu einem kleinen Teil über Methylierung und größtenteils über andere epigenetische Mechanismen reguliert ist.

Gene wie LAX1, Sit1 und ICOS, deren Expressionsgrad sich durch die Behandlung der Nierenkarzinomzellen mit 5-Azacytidin gar nicht steigern ließ, dürften gänzlich über andere Mechanismen reguliert sein.

Eine 2014 durchgeführte Studie von Li et al. untersuchte ebenfalls den Effekt der Applikation von 5-Azacytidin auf Karzinomzellen, wobei sie Zellen von Kolon-, Ovarial- und Mammakarzinomen für 72 Stunden mit der demethylierenden Substanz behandelten. Die nachfolgende Analyse der DNA-Methylierung und Genexpression ergab, dass 80 der untersuchten Gene-Sets in allen drei Karzinomtypen durch die Behandlung hochreguliert wurden. Untersucht wurden zahlreiche Gene, die entweder in der Zellzykluskontrolle, der DNA Replikation, mRNA Splicing und Translation oder bei Immunmechanismen eine Rolle spielen. Hervorhebenswert an dieser Studie ist auch, dass die Zelllinien lediglich mit einer niedrigen 5-AZA-Dosis von 500 nM behandelt wurden und trotzdem die oben genannten Veränderungen in der Genexpression aufwiesen. Dies könnte für den klinischen Einsatz der Substanz in der Therapie von Karzinomen eine wichtige Rolle spielen, da mit einer niedrigen Dosierung der epigenetischen Therapie auch die teilweise schweren Nebenwirkungen reduziert werden könnten (Li et al., 2014).

Fujikane et al. führten eine ähnliche Studie an Brustkrebszellen der Zelllinie MCF7 durch, und untersuchte dabei, wie sich die Genexpression auf diesen Zellen durch die Applikation von 5-Azacytidin verändert. Mithilfe des Agilent whole genome array untersuchten sie

44.000 Gene, wovon 288 unter AZA eine Hochregulierung sowie 29 eine geringere Expression zeigten. Bei den hochregulierten Genen handelte es sich vorwiegend um immunassoziierte Gene. Sie verwendeten die Bisulfit-Pyrosequenzierung um zu beweisen, dass die Aktivierung dieser Gene methylierungsabhängig erfolgte. Es zeigte sich, dass sich auf den inaktiven Genen besonders hohe Methylierungsdichten fanden. Sie kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass Gene wie LOXL₄, bei welchem in ihrer Arbeit keine Methylierung als Ursache der Genaktivität gefunden werden konnte, über andere epigenetische Mechanismen ausgeschaltet werden (Fujikane et al., 2010).

Zu den epigenetischen Regulationsmechanismen zählen außer der DNA-Methylierung noch die Histon-Methylierung, -Phosphorylierung, -Acetylierung und -Ubiquitinierung. Eine Acetylierung führt zur Auflockerung des dichten Chromatins und fördert daher die Transkription. Die Acetylgruppen werden dabei von Histon-Acetyltransferasen bereitgestellt und von Histon-Deacetylasen wieder von der DNA entfernt (Schmidt, 2017). Acetylierungen finden sich vorwiegend an den Promotorregionen von transkribierten Genen (Rong et al., 2016). Bezogen auf die Auswirkung einer Acetylierung ist folglich eine Deacetylierung von Tumorsuppressorgenen nicht erwünscht, da es deren Aktivität einschränkt, gleichzeitig wäre aber eine Deacetylierung von Proliferationsfaktoren wünschenswert (Knasmüller, 2014). Da der Acetylierungsgrad der DNA vom Verhältnis der Histon-Acetyltransferasen zu den Deacetylasen abhängig ist, konnte festgestellt werden, dass durch die Applikation von Histon-Deacetylase-Inhibitoren in Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* die Expression von Genen, die eine Rolle in der Immunantwort spielen, gesteigert werden kann (Khan and Tomasi, 2008). In einer Studie von Ramakrishnan et al. wurde bei PatientInnen mit RCC ein verminderter Acetylierungsgrad des Histons H3 im Vergleich mit gesunden ProbandInnen gefunden. Des Weiteren konnte ein niedrigerer Acetylierungsgrad auch mit einer schlechteren Tumordifferenzierung assoziiert werden (Ramakrishnan et al., 2013). Auch in Lungen- und Mammakarzinomen konnte ein Zusammenhang zwischen einer globalen Histon-Deacetylierung und einer schlechteren Prognose gefunden werden (Mosashvilli et al., 2010). Einige der untersuchten Gene, deren Expression sich durch die Behandlung mit 5-AZA nicht verändern ließ, könnten also beispielsweise auch über eine Histonmodifikation im Rahmen einer (De-)Acetylierung reguliert werden.

Eine weitere Möglichkeit der epigenetischen Regulation, die in Zusammenhang mit der Histon-Acetylierung steht, ist die Histon-Phosphorylierung. Diese findet an Serinresten statt. Für die Transkription eines Gens ist dafür vor allem das Histon H3 von Bedeutung.

Wird dort Serin10 phosphoryliert, führt dies zu einer gesteigerten Acetylierbarkeit des Lysin 9 sowie zu einer dort stattfindenden Umstrukturierung des Chromatins. Diese Veränderungen bewirken eine gesteigerte Transkription des sich dort befindenden Gens. Die Serin-Phosphorylierung wird unter anderem von der Proteinkinase A katalysiert, für die Dephosphorylierung ist die Proteinphosphatase PP1 verantwortlich.

Histonmethylierungen wiederum führen zu einer Inaktivierung der Genaktivität, indem sie die Anlagerung von Proteinen fördern, die eine Chromatinkondensation bewirken. Bis vor einigen Jahren wurde die Histonmethylierung für einen irreversiblen Inaktivierungsmechanismus von Genen gehalten, mittlerweile wurden aber Demethylasen entdeckt, die diese Reaktion wieder rückgängig machen und das Gen erneut aktivieren können. Eine Histonubiquitinierung gilt ebenfalls als epigenetischer Mechanismus zur Regulation der Genexpression. So bewirken mehrere Ubiquitinmoleküle an einem Protein dessen Abbau durch Proteasomen (Heinrich et al., 2014). Jene untersuchten Gene, die durch die 5-Azacytidin-Behandlung keine vermehrte Expression zeigten, dürften also durch einen oder auch mehrere dieser anderen epigenetischen Mechanismen reguliert werden.

4.1 Klinische Bedeutung von 5-Azacytidin in der Tumorthherapie

Aus dem Ergebnis, dass 5-Azacytidin einige der untersuchten immunassoziierten Gene beim RCC in vitro hochreguliert, entsteht die Überlegung, ob diese vermehrte Genexpression auch in vivo einen therapeutischen Vorteil für PatientInnen bringen kann.

5-Azacytidin wurde bereits vor mehr als 20 Jahren in der antineoplastischen Therapie eingesetzt, ohne dass damals dessen Wirkmechanismus als demethylierende Substanz bekannt war. Nachdem in Krebszellen vorwiegend Tumorsuppressorgene von Hypermethylierung betroffen sind, lässt sich daraus die antikanzerogene Wirkung ableiten, die eine Reexpression dieser Gene zur Folge hätte. Eine problematische Nebenwirkung der Substanz zeigt sich jedoch in der myelosuppressiven Wirkung (Herman and Baylin, 2009).

5-Azacytidin wird derzeit als Therapie bei myelodysplastischen Syndromen verwendet, welche weitere klinische Relevanz die demethylierende Substanz in der Therapie maligner Erkrankungen haben könnte, wird derzeit noch erforscht. In einer 2013 durchgeführten Studie von Wrangle et al. wurde die in vitro Wirkung von 5-Azacytidin auf Immungene von Zellen eines kleinzelligen Lungenkarzinoms untersucht. Dabei zeigte sich, dass viele der immunassoziierten Gene, die sich durch eine AZA Behandlung hochregulieren lassen, beim kleinzelligen Lungenkarzinom methyliert sind. Sie nehmen an, dass eine

epigenetische Therapie mit 5-Azacytidin in Kombination mit Immuncheckpoint-Inhibitoren die Immunreaktion auf das Karzinom verbessern könnte (Wrangle et al., 2013). Im Rahmen der Studie von Fujikane et al., in welcher die demethylierende Wirkung von 5-Azacytidin auf 44.000 Gene untersucht wurde, zeigte sich auch, dass AZA vor allem die gesteigerte Expression von immunassoziierten Genen bewirkt, die in die Immunantwort oder den Interferon-Signalweg involviert sind. Besonders die gesteigerte Aktivität dieser Gene könnte darum ein weiterer positiver Faktor in der Karzinomtherapie mit Azacytidin sein, da dies die Immunreaktion des menschlichen Organismus gegen die maligne Neoplasie durch Hochregulierung von Immungenen unterstützen könnte (Fujikane et al., 2010).

In der 2014 durchgeführten Studie zeigte sich im Rahmen der 5-AZA Beandlung von 63 Krebszelllinien aus Ovarial-, Mamma- und kolorektalen Karzinomen mit 5-Azacytidin dass vor allem jene Gene, die eine Rolle in der Immunreaktion spielen, hochreguliert wurden. Dabei zeigten 15 der 16 untersuchten immunassoziierten Gene eine Hochregulierung durch die AZA-Behandlung. Diese Gene waren unter anderem für Interferon-, Chemokin- oder Cytokin-Signalwege verantwortlich, oder auch in Antigen-Präsentation oder Inflammationsreaktionen involviert. Um zu untersuchen, ob Azacytidin die Genexpression auch in vivo erhöht, wurden PatientInnen mit AZA behandelt, und vor und nach der epigenetischen Therapie jeweils eine Biopsie entnommen. In den Proben zeigte sich ebenfalls eine Hochregulierung von Genen, wobei davon beim kolorektalen Karzinom 11,9% und beim Mammakarzinom 32,7% immunassoziiert waren (Li et al., 2014). Zusätzlich wäre es hier noch notwendig zu untersuchen, ob die PatientInnen mit epigenetischer Therapie im weiteren Verlauf auch ein besseres Outcome aufwiesen, und somit von einer Behandlung mit AZA profitieren würden.

2015 wurde der Effekt von 5-Azacytidin auf solide Tumore untersucht, unter anderem auch auf das Nierenzellkarzinom. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung bei den PatientInnen eine signifikante Hypomethylierung induzierte und deren Überlebensdauer verlängerte, die Tumorgröße sich jedoch unter der Behandlung nicht verringerte. Ein großes Problem in all diesen Studien war jedoch die toxische Wirkung des AZA, die vor allem Myelosuppression, aber auch Sepsis oder intrakranielle Blutungen bei PatientInnen auslöste. Auch scheint der Effekt von 5-Azacytidin als alleinige epigenetisch wirksame Substanz zu gering zu sein, weshalb die Kombination von mehreren auf diese Weise wirksamen Mitteln eher zu empfehlen sein könnte (Cheishvili et al., 2015).

4.2 *In silico* Vergleich der Methylierung und Expression von Immungenen anhand von TCGA Daten

Des Weiteren war es ein Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, inwiefern sich die Expression der Immungene in Nierenkarzinomgewebe von jener in normalem Nierengewebe unterscheidet. Anhand von Daten aus dem TCGA Portal konnte gezeigt werden, dass alle der sieben untersuchten immunassoziierten Gene bei PatientInnen mit Nierenkarzinom höher exprimiert waren, als bei Gesunden. Auch Dedeurwaerder et al. führten eine Studie an Brustkrebszellen durch, wo das Methylierungsmuster bzw. die Expression von einigen immunassoziierten Genen mit jener von gesunden Brustzellen verglichen wurde. Im Rahmen der Studie zeigte sich ebenfalls eine höhere Expression von immunassoziierten Genen in Brustkrebszellen im Vergleich mit gesundem Brustgewebe. Eine Ursache für diese vermehrte Expression von immunassoziierten Zellen im Tumorgewebe, die sich auch bei unseren Auswertungen der TCGA Daten beim Nierenzellkarzinomgewebe zeigte, könnte eine Infiltration des Tumorgewebes mit Immunzellen wie T-Lymphozyten sein. Dedeurwaerder et al. erstellten anhand der Ergebnisse der Methylierungsmuster der Brustkrebsproben sechs unterschiedliche Methylierungsmuster. Bei zwei dieser Methylierungsprofile zeigte sich eine Hypomethylierung von immunassoziierten Genen. Daraufhin wurde eine histologische Analyse aller sechs Tumortypen durchgeführt, die sich anhand des Methylierungsprofils unterscheiden ließen. Dabei ergab sich, dass jene beiden Tumortypen mit Hypomethylierung von immunassoziierten Genen eine deutlich höhere lymphozytäre Infiltration des Tumorgewebes aufwiesen. Geht man also nach den Ergebnissen dieser Studie davon aus, dass das DNA-Methylierungsprofil eines Tumors Aufschluss über die Tumormikroumgebung geben kann, könnte angenommen werden, dass sich auch in unserem Fall aufgrund von lymphozytärer Infiltration höhere Expressionswerte immunassoziiertter Gene in den Nierenkarzinomzellen zeigten (Dedeurwaerder and Fuks, 2012). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Real-time PCR durchgeführt, die die Expression der immunassoziierten Gene auf Leukozyten bzw. CD3-Lymphozyten mit der Expression auf Karzinomzellen vergleichen sollte (siehe Kapitel 3.3). Nachdem sich auf den Tumorzellen so gut wie keine Expression, auf Leukozyten jedoch sehr hohe Genexpressionen nachweisen ließen, würde dies mit der Hypothese, dass das Nierenkarzinomgewebe aufgrund von Infiltration mit Immunzellen höhere Expressionswerte dieser Gene zeigt, zusammenpassen.

Lasseigne et al. untersuchten ebenfalls das Methylierungsverhalten von Genen auf Zellen des Nierenzellkarzinoms. Sie untersuchten die Proben von 96 PatientInnen und konnten feststellen, dass im Tumorgewebe vor allem Gene mit Immunfunktion sowie Gene, die an

den G-Protein-Rezeptor-Signalweg gekoppelt sind, eine Hypomethylierung zeigten. Außerdem wäre es auch möglich, das Methylierungsmuster des Nierenzellkarzinoms als diagnostischen Marker zu verwenden. Es konnten 5 CpG-Inseln identifiziert werden, deren Methylierungsgrad sich am signifikantesten zwischen Tumorgewebe und normalem Nierengewebe unterschied. Diese wurden an Daten aus dem TCGA-Portal getestet, wobei für das klarzellige Nierenkarzinom 96,1% der Tumorproben korrekt als solche identifiziert werden konnten (Lasseigne et al., 2014).

Des Weiteren wurde in unserer Studie versucht, mithilfe der online Plattform „The Cancer Immunome Atlas“ und TCGA Daten zu bestimmen, ob die jeweilige Höhe der Expression eines Gens prognostische Relevanz für das Überleben der PatientInnen mit klarzelligem Nierenkarzinom besitzt. Der Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad von immunassoziierten Genen und dem klinischen Outcome der PatientInnen mit Mammakarzinom wurde auch von Dedeurwaerder et. al. in ihrer Studie untersucht. Sie untersuchten 55 Gene, wovon 32 signifikant prognostische Relevanz zeigten. 11 dieser 32 Gene waren immunassoziierte Gene, unter welchen sich unter anderem auch CD3D, CD3G, LAX1, Sit1 und ICOS befanden, die auch im Rahmen dieser Arbeit auf Nierenkarzinomzellen untersucht wurden. In unserem Fall konnte ergab die Analyse der TCGA Profile von PatientInnen mit RCC für drei der sieben Gene einen Zusammenhang zwischen einer höheren Genexpression und einer längeren Überlebensdauer. PatientInnen mit hoher Expression von CCRL2 zeigten den TCGA Daten zufolge ein signifikant besseres Überleben, hohe Expressionsraten von LAX1 und CD3G zeigten im Zusammenhang mit dem Überleben Borderline-Signifikanz. Diese Ergebnisse entsprechen unseren Erwartungen, dass PatientInnen mit höherer Immungenexpression auch ein besseres Überleben zeigen. Die Studie an Brustkrebspatientinnen von Dedeurwaerder et al. zeigt, dass die Höhe der Expression ausgewählter Immungene als prognostischer Marker für das PatientInnenüberleben herangezogen werden kann (Dedeurwaerder and Fuks, 2012). Um möglicherweise auch für das Nierenkarzinom solche prognostischen Marker identifizieren zu können, müsste der Zusammenhang zwischen zahlreichen weiteren Immungenen und dem Gesamtüberleben der PatientInnen untersucht werden.

5 Fazit und Ausblick

Die Behandlung der Nierenkarzinomzellen mit der demethylierenden Substanz 5-Azacytidin hat gezeigt, dass einige Immunreaktion-assoziierte Gene über Methylierung reguliert sind, andere Gene sich wiederum gänzlich anderer epigenetischer Regulationsmechanismen bedienen.

Die Untersuchung der Methylierungsgrade der einzelnen Immungene im Nierenzellkarzinom kann Rückschlüsse auf die Zellzusammensetzung der Tumormikroumgebung liefern. So wirft eine verringerte Methylierung dieser Gene in Nierenkarzinomzellen im Vergleich mit gesunden Nierenzellen die Hypothese auf, dass eine vermehrte Infiltration des Gewebes mit Leukozyten für diese verstärkte Genexpression verantwortlich ist.

Tumore anhand ihrer individuellen Methylierungsprofile weiter zu kategorisieren, könnte neue Wege für die Antitumortherapie öffnen. Wenn die Therapie an die jeweiligen hypermethylierten Tumorsuppressorgene angepasst werden könnte, könnte dies eine Möglichkeit sein, den Organismus dabei zu unterstützen, eine verstärkte Immunreaktion gegen den malignen Tumor aufzubringen. Einige Versuche erfolgten dabei bereits mit 5-Azacytidin, wo versucht wurde, die demethylierende Wirkung der Substanz zu Gunsten der Reaktivierung Immunreaktion-assoziiierter Gene bei TumorpatientInnen einzusetzen. In Zukunft wird wohl auch daran gearbeitet werden, die Toxizität der Substanz weitestgehend zu vermindern, beziehungsweise deren Wirkungsgrad in Kombination mit anderen epigenetisch wirksamen Substanzen zu verbessern.

6 Literaturverzeichnis

- Adamietz, I.A., Bechstein, W.O., Christiansen, H., Doehn, C., Hochhaus, A., Hofheinz, R.-D., Lichtenegger, W., Lordick, F., Schadendorf, D., Untch, M., Wittekind, C.F., 2016. Weiterbildung Onkologie: CME-Beiträge aus: Der Onkologe Juli 2014 - Dezember 2015. Springer-Verlag.
- Arndt, B., Krieger, T., Kalinski, T., Thielitz, A., Reinhold, D., Roessner, A., Schraven, B., Simeoni, L., 2011. The Transmembrane Adaptor Protein SIT Inhibits TCR-Mediated Signaling. *PLOS ONE* 6, e23761.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023761>
- Badowska-Kozakiewicz, A.M., Budzik, M.P., Koczkodaj, P., Przybylski, J., 2016. Selected tumor markers in the routine diagnosis of chromophobe renal cell carcinoma. *Arch. Med. Sci. AMS* 12, 856. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.51188>
- Bedke, J., Gauler, T., Grünwald, V., Hegele, A., Herrmann, E., Hinz, S., Janssen, J., Schmitz, S., Schostak, M., Tesch, H., Zastrow, S., Miller, K., 2017. Systemic therapy in metastatic renal cell carcinoma. *World J. Urol.* 35, 179.
<https://doi.org/10.1007/s00345-016-1868-5>
- Bellmunt, J., Puente, J., Muro, J.G. de, Lainez, N., Rodríguez, C., Duran, I., 2014. SEOM clinical guidelines for the treatment of renal cell carcinoma. *Clin. Transl. Oncol.* 16, 1043. <https://doi.org/10.1007/s12094-014-1219-1>
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U., Moch, H., Höfler, G., Kreipe, H., 2012. Pathologie: Mit StudentConsult-Zugang, 5th ed. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München.
- Brugarolas, J., 2014. Molecular Genetics of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 32, 1968–1976. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2003>
- Campbell, S.C., Rini, B.I., 2012. Renal Cell Carcinoma: Clinical Management. Springer Science & Business Media.
- Caoili, E.M., Davenport, M.S., 2014. Role of Percutaneous Needle Biopsy for Renal Masses. *Semin. Interv. Radiol.* 31, 20. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1363839>
- CCRL2 Gene - GeneCards | CCRL2 Protein | CCRL2 Antibody [WWW Document], n.d. URL <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCRL2> (accessed 10.14.17).
- CD3D Gene - GeneCards | CD3D Protein | CD3D Antibody [WWW Document], n.d. URL <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD3D&keywords=cd3d> (accessed 11.2.17).
- CD3G Gene - GeneCards | CD3G Protein | CD3G Antibody [WWW Document], n.d. URL <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CD3G&keywords=cd3g> (accessed 10.15.17).
- Cheishvili, D., Boureau, L., Szyf, M., 2015. DNA demethylation and invasive cancer: implications for therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* 172, 2705.
<https://doi.org/10.1111/bph.12885>
- Courthod, G., Tucci, M., Di Maio, M., Scagliotti, G.V., 2015. Papillary renal cell carcinoma: A review of the current therapeutic landscape. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 96, 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.05.008>
- CXCR1 Gene - GeneCards | CXCR1 Protein | CXCR1 Antibody [WWW Document], n.d. URL <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXCR1&keywords=cxcr1> (accessed 10.15.17).
- Deckwer, M., 2014. RÖMPP Lexikon Biotechnologie und Gentechnik, 2. Auflage, 1999. Georg Thieme Verlag.

- Dedeurwaerder, S., Fuks, F., 2012. DNA methylation markers for breast cancer prognosis: Unmasking the immune component. *Oncoimmunology* 1, 962. <https://doi.org/10.4161/onci.19996>
- Dudeck, J., Wagner, G., Grundmann, E., Hermanek, P., 2013. Basisdokumentation für Tumorkranke: Prinzipien und Verschlüsselungsanweisungen für Klinik und Praxis. Springer-Verlag.
- Fujikane, T., Nishikawa, N., Toyota, M., Suzuki, H., Nojima, M., Maruyama, R., Ashida, M., Ohe-Toyota, M., Kai, M., Nishidate, T., Sasaki, Y., Ohmura, T., Hirata, K., Tokino, T., 2010. Genomic screening for genes upregulated by demethylation revealed novel targets of epigenetic silencing in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 122, 699–710. <https://doi.org/10.1007/s10549-009-0600-1>
- Fuller, D.M., Zhang, W., 2009. Regulation of Lymphocyte Development and Activation by the LAT Family of Adaptor Proteins. *Immunol. Rev.* 232, 72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00828.x>
- Gadner, H., Gaedicke, G., Niemeyer, C., Ritter, J., 2005. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Springer-Verlag.
- Ganten, D., Ruckpaul, K., 2013. Monogen bedingte Erbkrankheiten 1. Springer-Verlag.
- Ganten, D., Ruckpaul, K., 2006. Molekularmedizinische Grundlagen von fetalen und neonatalen Erkrankungen. Springer-Verlag.
- García Álvarez T. , et al., G.Á.T., et, 2011. Early diagnosis and treatment of renal cell carcinoma of native kidney in kidney transplantation. - PubMed - NCBI [WWW Document]. URL <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pubmed/21959723> (accessed 10.1.17).
- GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search [WWW Document], n.d. URL <http://www.genecards.org/> (accessed 10.10.17).
- Gnant, M., Schlag, P.M., 2009. Chirurgische Onkologie: Strategien und Standards für die Praxis. Springer-Verlag.
- Gudas, L.J., Fu, L., Minton, D.R., Mongan, N.P., Nanus, D.M., 2014. The Role of HIF1 α in Renal Cell Carcinoma Tumorigenesis. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 92, 825. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1180-z>
- Ha, H., Debnath, B., Neamati, N., 2017. Role of the CXCL8-CXCR1/2 Axis in Cancer and Inflammatory Diseases. *Theranostics* 7, 1543. <https://doi.org/10.7150/thno.15625>
- Hautmann, R., Gschwend, J.E., 2014. Urologie. Springer-Verlag.
- Heinrich, P.C., Müller, M., Graeve, L., 2014. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag.
- Hennig, W., Graw, J., 2010. Genetik, 5th ed. Springer, Dordrecht Heidelberg London New York.
- Herman, J.G., Baylin, S.B., 2009. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation [WWW Document]. [Httpdx-1doi-1org-1pubmedhanmedunigrazat101056NEJMra023075](http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra023075). <https://doi.org/10.1056/NEJMra023075>
- Hiddemann, W., Bartram, C.R., Huber, H., 2013. Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie - Pathogenese - Grundprinzipien der Therapie; Teil 2: Solide Tumoren - Lymphome - Leukämien. Springer-Verlag.
- Horn, F., 2009. Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium. Georg Thieme Verlag.
- Hsieh, J.J., Purdue, M.P., Signoretti, S., Swanton, C., Albiges, L., Schmidinger, M., Heng, D.Y., Larkin, J., Ficarra, V., 2017. Renal cell carcinoma. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, nrdp20179. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.9>

- ICOS Gene - GeneCards | ICOS Protein | ICOS Antibody [WWW Document], n.d. URL <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ICOS&keywords=icos> (accessed 10.13.17).
- Jansohn, M., Rothhämel, S., 2012. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Springer-Verlag.
- Jiang, L., Xu, J., Ni, J., Gao, X., Zhu, Z., Dong, D., Wang, X., Shi, C., Tao, X., Dong, W., Gao, Y., 2012. A Functional Insertion/Deletion Polymorphism in the Proximal Promoter of CD3G Is Associated with Susceptibility for Hepatocellular Carcinoma in Chinese Population. *DNA Cell Biol.* 31, 1480. <https://doi.org/10.1089/dna.2012.1706>
- Jocham, D., Miller, K., 2007. *Praxis Urologie*. Georg Thieme Verlag.
- Kasinski, A., Dong, X., Khuri, F.R., Boss, J., Fu, H., 2014. Transcriptional Regulation of YWHAZ, the Gene Encoding 14-3-3ζ. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093480>
- Keller, C., Geberth, S., 2010. *Praxis der Nephrologie*. Springer-Verlag.
- Khan, A.A., Shergill, I.S., Quereshi, S., Arya, M., Vandal, M.T., Gujral, S.S., 2007. Percutaneous needle biopsy for indeterminate renal masses: a national survey of UK consultant urologists. *BMC Urol.* 7, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2490-7-10>
- Khan, A.N.H., Tomasi, T.B., 2008. Histone deacetylase regulation of immune gene expression in tumor cells. *Immunol. Res.* 40, 164. <https://doi.org/10.1007/s12026-007-0085-0>
- Knasmüller, S., 2014. *Krebs und Ernährung: Risiken und Prävention - wissenschaftliche Grundlagen und Ernährungsempfehlungen*. Georg Thieme Verlag.
- Knippers, R., 2006. *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag.
- Lasseigne, B.N., Burwell, T.C., Patil, M.A., Absher, D.M., Brooks, J.D., Myers, R.M., 2014. DNA methylation profiling reveals novel diagnostic biomarkers in renal cell carcinoma. *BMC Med.* 12. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0235-x>
- Lattime, E.C., Gerson, S.L., 2013. *Gene Therapy of Cancer: Translational Approaches from Preclinical Studies to Clinical Implementation*. Academic Press.
- Leonetti, A., Leonardi, F., Bersanelli, M., Buti, S., 2017. Clinical use of lenvatinib in combination with everolimus for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Ther. Clin. Risk Manag.* 13, 799. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S126910>
- Li, H., Chiappinelli, K.B., Guzzetta, A.A., Easwaran, H., Yen, R.-W.C., Vataapalli, R., Topper, M.J., Luo, J., Connolly, R.M., Azad, N.S., Stearns, V., Pardoll, D.M., Davidson, N., Jones, P.A., Slamon, D.J., Baylin, S.B., Zahnow, C.A., Ahuja, N., 2014. Immune regulation by low doses of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacitidine in common human epithelial cancers. *Oncotarget* 5, 587. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1782>
- Livak, Kenneth, Schmittgen, Thomas, 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-ΔΔCT Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- LL_Nierenzell_Kurzversion_1.1.pdf, n.d.
- Metzger, T.C., Long, H., Potluri, S., Pertel, T., Bailey-Bucktrout, S.L., Lin, J.C., Fu, T., Sharma, P., Allison, J.P., Feldman, R.M.R., 2016. ICOS Promotes the Function of CD4+ Effector T Cells during Anti-OX40-Mediated Tumor Rejection. *Cancer Res.* 76, 3684–3689. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3412>
- Michel, M.S., Thüroff, J.W., Janetschek, G., Wirth, M., 2016. *Die Urologie*. Springer-Verlag.

- Mittereder, N., Kuta, E., Bhat, G., Dacosta, K., Cheng, L.I., Herbst, R., Carlesso, G., 2016. Loss of Immune Tolerance Is Controlled by ICOS in Sle1 Mice. *J. Immunol.* Author Choice 197, 491. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502241>
- Moch, H., 2016. [WHO classification 2016 and first S3 guidelines on renal cell cancer: What is important for the practice?]. - PubMed - NCBI [WWW Document]. URL <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pubmed/26942728> (accessed 10.3.17).
- Mosashvilli, D., Kahl, P., Mertens, C., Holzapfel, S., Rogenhofer, S., Hauser, S., Büttner, R., Von Ruecker, A., Müller, S.C., Ellinger, J., 2010. Global histone acetylation levels: Prognostic relevance in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 101, 2664–2669. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01717.x>
- Nishimura, Y., Komatsu, S., Ichikawa, D., Nagata, H., Hirajima, S., Takeshita, H., Kawaguchi, T., Arita, T., Konishi, H., Kashimoto, K., Shiozaki, A., Fujiwara, H., Okamoto, K., Tsuda, H., Otsuji, E., 2013. Overexpression of YWHAZ relates to tumor cell proliferation and malignant outcome of gastric carcinoma. *Br. J. Cancer* 108, 1324. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.65>
- Nordheim, A., Knippers, R., Dröge, P., Meister, G., Schiebel, E., 2015. *Molekulare Genetik*, 10th ed. Thieme, Stuttgart.
- Passarge, E., 2008. *Taschenatlas Humangenetik*. Georg Thieme Verlag.
- Patel, H.D., Johnson, M.H., Pierorazio, P.M., Sozio, S.M., Sharma, R., Iyoha, E., Bass, E.B., Allaf, M.E., 2016. Diagnostic Accuracy and Risks of Biopsy in the Diagnosis of a Renal Mass Suspicious for Localized Renal Cell Carcinoma: Systematic Review of the Literature. *J. Urol.* 195, 1340. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.11.029>
- Paumgartner, G., Steinbeck, G., 2013. *Therapie innerer Krankheiten*. Springer-Verlag.
- Pezzutto, A., Keilholz, U., Ries, H., Sehoul, J., Longo, D.L., 2017. *Harrisons Hämatologie und Onkologie*. ABW Wissenschaftsverlag.
- Pfaffl, M.W., 2004. *Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung*. BIOSpektrum.
- Pierorazio, P.M., Hyams, E.S., Tsai, S., Feng, Z., Trock, B.J., Mullins, J.K., Johnson, P.T., Fishman, E.K., Allaf, M.E., 2013. Multiphasic Enhancement Patterns of Small Renal Masses (≤ 4 cm) on Preoperative Computed Tomography: Utility for Distinguishing Subtypes of Renal Cell Carcinoma, Angiomyolipoma, and Oncocytoma. *Urology* 81, 1265. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2012.12.049>
- Posevitz, V., Arndt, B., Krieger, T., Warnecke, N., Schraven, B., Simeoni, L., 2008. Regulation of T Cell Homeostasis by the Transmembrane Adaptor Protein SIT. *J. Immunol.* 180, 1634–1642. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1634>
- Ramakrishnan, S., Ellis, L., Pili, R., 2013. Histone modifications: implications in renal cell carcinoma. *Epigenomics* 5. <https://doi.org/10.2217/epi.13.40>
- RCC-FG1 growing - CLS Online Shop [WWW Document], n.d. URL http://www.clsmbh.de/p1149_RCC-FG1_growing.html (accessed 8.10.17).
- Rich, R.R., Fleisher, T.A., Shearer, W.T., Jr, H.W.S., Frew, A.J., Weyand, C.M., 2012. *Clinical Immunology E-Book: Principles and Practice*. Elsevier Health Sciences.
- Rong, X., Qiu, X., Jiang, Y., Li, D., Xu, J., Zhang, Y., Lu, Y., 2016. Effects of histone acetylation on superoxide dismutase 1 gene expression in the pathogenesis of senile cataract. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep34704>
- Rübber, H., 2014. *Uroonkologie*. Springer-Verlag.
- Samaratunga, H., Gianduzzo, T., Delahunt, B., 2014. The ISUP system of staging, grading and classification of renal cell neoplasia. *J. Kidney Cancer VHL* 1, 26. <https://doi.org/10.15586/jkcvhl.2014.11>

- Scanga, L.R., Maygarden, S.J., 2014. Utility of fine-needle aspiration and core biopsy with touch preparation in the diagnosis of renal lesions. *Cancer Cytopathol.* 122, 182–190. <https://doi.org/10.1002/cncy.21371>
- Schmidt, G., 2002. *Sonographische Differenzialdiagnose: Lehratlas zur systematischen Bildanalyse mit über 2500 Befundbeispielen ; 90 Tabellen.* Georg Thieme Verlag.
- Schmidt, O., 2017. *Genetik und Molekularbiologie.* Springer-Verlag.
- Schmoll, H.-J., Höffken, K., Possinger, K., 2013. *Kompodium Internistische Onkologie: Teil 2: Therapie von Leukämien, Lymphomen, soliden Tumoren, Spezielle Therapiemodalitäten, Regionale Chemotherapie, Notfälle.* Springer-Verlag.
- Shinohara N. et al., S.N. and A., 2015. Prognostic factors and risk classifications for patients with metastatic renal cell carcinoma. - PubMed - NCBI [WWW Document]. URL <https://www-1ncbi-1nlm-1nih-1gov-1pubmed.han.medunigraz.at/pubmed/26147084> (accessed 10.4.17).
- Siegler, R., Eisenberg, N., DeLoache, J., Saffran, J., 2016. *Entwicklungspsychologie im Kindes- und Jugendalter.* Springer-Verlag.
- Singh, S., Nannuru, K.C., Sadanandam, A., Varney, M.L., Singh, R.K., 2009. CXCR1 and CXCR2 enhances human melanoma tumorigenesis, growth and invasion. *Br. J. Cancer* 100, 1638. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605055>
- SIT1 Gene - GeneCards | SIT1 Protein | SIT1 Antibody [WWW Document], n.d. URL <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SIT1> (accessed 10.13.17).
- Sobin, L.H., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, C., 2011. *TNM Classification of Malignant Tumours.* John Wiley & Sons.
- Tannir, N.M., Schwab, G., Grünwald, V., 2017. Cabozantinib: an Active Novel Multikinase Inhibitor in Renal Cell Carcinoma. *Curr. Oncol. Rep.* 19. <https://doi.org/10.1007/s11912-017-0566-9>
- Tavani, A., Zucchetto, A., Maso, L.D., Montella, M., Ramazzotti, V., Talamini, R., Franceschi, S., La Vecchia, C., 2007. Lifetime physical activity and the risk of renal cell cancer. *Int. J. Cancer* 120, 1977–1980. <https://doi.org/10.1002/ijc.22438>
- TCIA [WWW Document], n.d. URL <https://tcia.at/home> (accessed 1.5.18).
- The Cancer Genome Atlas Home Page [WWW Document], n.d. . Cancer Genome Atlas - Natl. Cancer Inst. URL <https://cancergenome.nih.gov/> (accessed 2.14.18).
- Venur, V.A., Joshi, M., Nepple, K.G., Zakharia, Y., 2017. Spotlight on nivolumab in the treatment of renal cell carcinoma: design, development, and place in therapy. *Drug Des. Devel. Ther.* 11, 1175. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S110209>
- Wagener, C., Müller, O., 2010. *Molekulare Onkologie: Entstehung, Progression, klinische Aspekte ; 95 Tabellen.* Georg Thieme Verlag.
- Wagner, G., Hermanek, P., 2013. *Organspezifische Tumordokumentation: Prinzipien und Verschlüsselungsanweisungen für Klinik und Praxis.* Springer-Verlag.
- Wiedemann, C., Weber, B., 2004. *Quantitative Real Time PCR - Eine Frage der Normalisierung.*
- Wittekind, C., Asamura, H., Sobin, L.H., 2014. *TNM Atlas.* John Wiley & Sons.
- Woo, S., Cho, J.Y., 2015. Imaging Findings of Common Benign Renal Tumors in the Era of Small Renal Masses: Differential Diagnosis from Small Renal Cell Carcinoma: Current Status and Future Perspectives. *Korean J. Radiol.* 16, 99. <https://doi.org/10.3348/kjr.2015.16.1.99>
- Wrangle, J., Wang, W., Koch, A., Easwaran, H., Mohammad, H.P., Vendetti, F., VanCriekinge, W., DeMeyer, T., Du, Z., Parsana, P., Rodgers, K., Yen, R.-W., Zahnow, C.A., Taube, J.M., Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Easton, K., Carvajal, R.D., Jones, P.A., Laird, P.W., Weisenberger, D.J., Tsai, S., Juergens, R.A., Topalian, S.L., Rudin, C.M., Brock, M.V., Pardoll, D., Baylin, S.B., 2013.

Alterations of immune response of non-small cell lung cancer with Azacytidine. *Oncotarget* 4, 2067. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1542>

Yoshimura, T., Oppenheim, J.J., 2011. Chemokine-like Receptor 1 (CMKLR1) and Chemokine (C-C motif) Receptor-like 2 (CCRL2); Two Multifunctional Receptors with Unusual Properties. *Exp. Cell Res.* 317, 674. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.10.023>

YWHAZ Gene - GeneCards | 1433Z Protein | 1433Z Antibody [WWW Document], n.d. URL <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=YWHAZ> (accessed 11.2.17).

