

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Einfluss der KDM5B- und CBX5-Expression auf die Progression des triple-negativen
Mammakarzinoms

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Luisa Carolin Istengir
aus Landsberg am Lech

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion: 15.10.2024

Für meine Liebsten

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Zielgerichtete Therapien beim triple-negativen Mammakarzinom.....	3
2.1.1 Biomarker	3
2.1.2 Zytostatika	4
2.1.3 Zerstörung der Zellkernfunktionen.....	4
2.1.4 Signaltransduktionshemmung.....	5
2.1.5 Immuntherapie	5
2.2 CBX5 und KDM5B	10
2.2.1 CBX5	10
2.2.2 KDM5B	16
3 Material und Methoden	24
3.1 Material	24
3.1.1 Chemikalien	24
3.1.2 Puffer und Lösungen.....	25
3.1.3 Kits.....	25
3.1.4 Antikörper	28
3.1.5 Geräte.....	28
3.1.6 Verbrauchsmaterialien	29
3.1.7 Gebrauchsmaterialien	29
3.1.8 Gewebeproben (Herkunft).....	29
3.2 Methoden.....	31
3.2.1 Immunhistochemische Antigendetektion an korrespondierenden TNBC- Paraffinschnitten	31
3.2.2 IRS-Auswertung.....	33
3.2.3 Statistische Auswertung.....	36
4 Ergebnisse	37
4.1 Expression von CBX5 im Tumorgewebe	37
4.1.1 Expression von CBX5 - einzeln	37
4.1.2 Expression von CBX5 - gruppiert	39

4.1.3	Expression von CBX5 - binär	39
4.2	Expression von KDM5B im Tumorgewebe	40
4.2.1	Expression von KDM5B - einzeln	40
4.2.2	Expression von KDM5B - gruppiert	42
4.2.3	Expression von KDM5B - binär	43
4.3	Gleichzeitige Expression von CBX5 und KDM5B im Tumorgewebe	43
4.4	Expression in Bezug auf das Alter	44
4.4.1	Expression von CBX5 in Bezug auf das Alter	45
4.4.2	Expression von KDM5B in Bezug auf das Alter	45
4.4.3	Gleichzeitige Expression von CBX5 und KDM5B in Bezug auf das Alter..	46
4.5	Expression in Bezug auf das kumulative Überleben	47
4.5.1	Expression von CBX5 in Bezug auf das kumulative Überleben	47
4.5.2	Expression von KDM5B in Bezug auf das kumulative Überleben	49
4.5.3	Gleichzeitige Expression von CBX5 und KDM5B in Bezug auf das kumulative Überleben.....	51
4.6	Expression in Bezug auf die Tumorgröße	53
4.6.1	Expression von CBX5 in Bezug auf die Tumorgröße.....	53
4.6.2	Expression von KDM5B in Bezug auf die Tumorgröße.....	54
4.6.3	Gleichzeitige Expression von CBX5 und KDM5B in Bezug auf die Tumorgröße	55
4.7	Expression in Bezug auf den Lymphknotenstatus	55
4.7.1	Expression von CBX5 in Bezug auf den Lymphknotenstatus	56
4.7.2	Expression von KDM5B in Bezug auf den Lymphknotenstatus	56
4.7.3	Gleichzeitige Expression von CBX5 und KDM5B in Bezug auf den Lymphknotenstatus	57
4.8	Expression in Bezug auf die Metastasierung.....	58
4.8.1	Expression von CBX5 in Bezug auf die Metastasierung	58
4.8.2	Expression von KDM5B in Bezug auf die Metastasierung	58
4.8.3	Gleichzeitige Expression von CBX5 und KDM5B in Bezug auf die Metastasierung.....	59
4.9	Expression in Bezug auf das Grading	59
4.9.1	Expression von CBX5 in Bezug auf das Grading	59
4.9.2	Expression von KDM5B in Bezug auf das Grading.....	60

4.9.3 Gleichzeitige Expression von CBX5 und KDM5B in Bezug auf das Grading
61

5 Diskussion	61
5.1. Expression von CBX5 und KDM5B im Tumorgewebe	62
5.2. Expression von CBX5 und KDM5B und das Alter.....	63
5.3. Expression von CBX5 und KDM5B und das kumulative Überleben.....	63
5.4. Expression von CBX5 und KDM5B und die Tumorgröße	63
5.5. Expression von CBX5 und KDM5B und der Lymphknotenstatus.....	65
5.6. Expression von CBX5 und KDM5B und die Metastasierung.....	65
5.7. Expression von CBX5 und KDM5B und das Grading	69
6 Fazit	70
7 Ausblick	70
8 Zusammenfassung	71
9 Literaturverzeichnis	73
10 Anhang	88
Danksagung	91
Tabellarischer Lebenslauf	92

Abkürzungsverzeichnis

ADC	Antibody-drug conjugates
ADP	Adenosindiphosphat
AKT	Genloci der Proteinkinasen B
AMPK	Adenosinmonophosphat abhängige Kinase
AR	Androgenrezeptor
ARID	AT-rich interactive domain
BCSC	Breastcancer stem cells
BL	Basal like
BRCA	Breast cancer gene
BTLA	B- and T-lymphocyte attenuator
CAR-T	Chimerische Antigen-Rezeptor-T-Zellen
CBX	Chromobox
CD	Chromodomain
CDK1	Cyclin-abhängige Kinase 1
CNV	Copy number variations
CPC	Chromosomal passenger complex
CR	Complete Remission
CSC	Cancer stem cells
CSD	Chromoshadow domain
CTC	Circulating tumor cellcs
CTE	C-terminal extension
CUX2	CUT-like homeobox 2
CtDNA	Plasma circulating tumor dna
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
Cys	Cystein
DAB	3.3.Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAC	Docetaxel/Doxorubicin/Cyclophosphamid
DDR	DNA-damage response
DFS	Disease-free survival
DNA	Deoxyribonucleic acid
DRFS	Distant recurrence-free survival

EC-P	Epirubicin/Cyclophosphamid/Paclitaxel
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISpot	Enzyme-Linked Immunospot
ER	Estrogenrezeptor
FDA	Food and Drug Administration
GEP	Gene expression profiles = Genexpressionsanalysen
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HP1	Heterochromatinprotein 1
HR	Hinge region
IHC	Immunhistochemie
IMiDs	Immunomodulatory imide drugs
IMP α	Importin α
IMP321	Eftilagimod alpha
INCENP	Inner centromere protein
IRS	Immunreaktiver Score
LAG-3	Lymphocyte-activation gene 3
LINP1	Long non-coding RNA in non-homologous end joining pathway 1
lncRNA	Long non-coding RNA
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen
MHC	Major Histocompatibility Complex
miRNA	MicroRNA
mRNA	Messenger RNA
mTor	Mechanistic target of rapamycin
NAD	Nicotinamid
NC	No change
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing
NLS	Nuclear localization signal
NSCLC	Non small cell lung carcinoma
NTE	N-terminal extension
NuRD	Nucleosome remodeling and deacetylase

OS	Overall Survival
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PcG	Polycomb group
PD	Progressive Disease
PD-1	Programmed cell death protein 1
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
PDL-1	Programmed cell death 1 ligand
PEV	Position effect variegation
PFS	Progression-free survival
PHD	Plant homeodomain/leukemia-associated protein domain
Phe	Phenylalanin
PI3K	Phosphoinositid 3-kinase
PR	Partial remission; Progesteronrezeptor
pRB	Retinoblastom-Protein
PRC	Polycomb repressive complex
PR-DUB	Polycomb Repressive DeUBiquitinase
PRIMA	p53 reactivation and induction of massive apoptosis
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
RNA	Ribonucleic acid
RR	Remission rate
SD	Stable Disease
STING	Stimulator of interferon genes
SUMO	Small Ubiquitin-Related Modifier
SZT	Stammzelltherapie
TILs	Tumoinfiltrierende Lymphozyten
TIM	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing
TKI	Tyrosinkinaseinhibitoren
TNBC	Triple-negative breast cancer
TNM	Tumor/Lymphknoten/Metastasen
T _{Reg}	Regulatorische T-Zellen
TROP2	tumor-associated calcium signal transducer 2
Trp	Tryptophan
TS	Tumorschnitt
TTF	Time to treatment failure

Tyr

VEGF

VISTA

ZIP6

Tyrosin

Vascular Endothelial Growth Factor

V-domain Ig suppressor of T cell activation

Zinktransporter 6

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: HP1-Struktur angelehnt an Kumar et al., 2020.....	11
Abbildung 2: Dimerisierung von HP1 angelehnt an Kumar et al. 2020.....	12
Abbildung 3: Interaktion zwischen H3K9me3 und HP1 angelehnt an Kumar et al., 2020.	14
Abbildung 4: Struktur der Demethylase KDM5B angelehnt an Yamane et al., 2007.	18
Abbildung 5: Tumorschnitt (TS)-Nr.28 nach immunhistochemischer Färbung.	34
Abbildung 6: TS-Nr.15 nach immunhistochemischer Färbung.	34
Abbildung 7: TS-Nr. 17 nach immunhistochemischer Färbung.	35
Abbildung 8: TS-Nr. 34 nach immunhistochemischer Färbung.	35
Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der IRS-Einzelwerte für die CBX5-Expression (N=36).	38
Abbildung 10: Histogramm der IRS-Einzelwerte für CBX5 mit Normalverteilung (N=36).	38
Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung der IRS-Werte für die CBX5-Expression (gruppiert, N=36).	39
Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung der IRS-Einzelwerte für die Expression von KDM5B.	41
Abbildung 13: Histogramm der IRS-Einzelwerte für KDM5B (N=36).....	42
Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der gruppierten IRS-Werte für KDM5B (N=36).	43
Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung des Alters bei Erstdiagnose mit Normalverteilung.	44
Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve binäre Expression CBX5 (N=36).....	48
Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve binäre Expression KDM5B (N=36).....	50
Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve binäre Expression CBX5 + KDM5B (N=36).	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangabe	24
Tabelle 2: Verwendete Puffer und Lösungen in deren Zusammensetzung	25
Tabelle 3: Verwendeter Kit für IHC mit Anti-CBX5 mit Herstellerangabe	25
Tabelle 4: Verwendeter Kit für IHC mit Anti-KDM5B mit Herstellerangabe	26
Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper, deren Spezies und Anwendung	28
Tabelle 6: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe	28

Tabelle 7: Verwendete Gebrauchsmaterialien mit Herstellerangabe	29
Tabelle 8: Verwendete Gebrauchsmaterialien mit Herstellerangabe	29
Tabelle 9: TNBC-Kollektiv	30
Tabelle 10: Immunreaktiver Score.....	33
Tabelle 11: Übersicht der absoluten und der relativen Häufigkeiten (Prozent) der IRS-Werte von CBX5 (N=36).....	37
Tabelle 12: Absolute und relative Häufigkeiten (Prozent) der gruppierten CBX5-Expression (N=36)	39
Tabelle 13: Absolute und relativen Häufigkeiten (Prozent) der einzelnen IRS-Werte für KDM5B (N=36).....	40
Tabelle 14: Übersicht über die gruppierte KDM5B-Expression (N=36)	42
Tabelle 15: Relative und absolute Häufigkeiten für das Vorliegen beider Merkmale (nicht positiv/positiv für CBX5 und KDM5B) (N=36)	43
Tabelle 16: Gruppiertes IRS-Wert für CBX5 und Alter in Perzentilen (N=36)	45
Tabelle 17: Gruppiertes IRS-Wert für KDM5B und Alter in Perzentilen (N=36)	46
Tabelle 18: Binärer IRS-Wert für CBX5 und KDM5B und Alter in Perzentilen (N=36)....	46
Tabelle 19: Übersicht binäre CBX5-Expression mit Ereignis (N=36).....	47
Tabelle 20: Übersicht gruppierte CBX5-Expression mit Ereignis (N=36)	47
Tabelle 21: Übersicht binäre KDM5B-Expression mit Ereignis	49
Tabelle 22: Übersicht gruppierte KDM5B-Expression mit Ereignis (N=36).....	49
Tabelle 23: Cox-Regression mit Hazard Ratio Expression KDM5B	51
Tabelle 24: Übersicht binäre CBX5- + KDM5B-Expression mit Ereignis (N=36)	51
Tabelle 25: Cox-Regression mit Hazard Ratio Expression CBX5 + KDM5B	53
Tabelle 26: Expression CBX5 und Tumorgroße (N=36).....	54
Tabelle 27: Expression KDM5B und Tumorgroße (N=36).....	54
Tabelle 28: Gleichzeitige Expression von CBX5 + KDM5B und Tumorgroße (N=36).....	55
Tabelle 29: Expression CBX5 und Klassifikation Nodus (N=36)	56
Tabelle 30: Expression von KDM5B und Klassifikation des Nodus (N=36)	57
Tabelle 31: gleichzeitige Expression CBX5 und KDM5B und Klassifikation Nodus (N=36)	57
Tabelle 32: Expression von CBX5 und Vorliegen von Fernmetastasen (N=36)	58
Tabelle 33: Expression von KDM5B und Vorliegen von Fernmetastasen (N=36)	58
Tabelle 34: Expression von CBX5 und KDM5B und Vorliegen von Fernmetastasen (N=36)	59

Tabelle 35: Expression CBX5 und Grading (N=36)	60
Tabelle 36: Expression KDM5B und Grading (N=36)	60
Tabelle 37: Gleichzeitige Expression CBX5 und KDM5B und Grading (N=36)	61
Tabelle 38: IRS Anti-CBX5 der Tumorschnitte (TS) (N=36).....	88
Tabelle 39: IRS KDM5B der Tumorschnitte (TS) (N=36)	89

1 Einleitung

Das triple-negative Mammakarzinom (TNBC) zeichnet sich dadurch aus, dass weder Progesteron (PR)-, Östrogen (ER)- noch HER2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2*)-Rezeptoren vermehrt exprimiert werden, welche als Charakteristika anderer Formen von Brustkrebs gelten und Zielstrukturen bereits etablierter Therapien darstellen (1). Progesteron-, Östrogen- und HER2/neu-positive Tumoren weisen luminaire Genexpressionsmuster auf, wohingegen TNBC-Tumoren sowohl luminaire als auch basale Muster aufweisen (2). Die Prävalenz des TNBC liegt bei circa 10-15% (3) aller Brustkrebserkrankungen und ist durch eine schlechte Prognose und schlechteres Gesamtüberleben (3), besondere Aggressivität und einer höheren Inzidenz bei jungen und insbesondere afro-amerikanischen, afrikanischen und lateinamerikanischen Frauen gekennzeichnet (1, 3, 4). Das 5-Jahres-Überleben beläuft sich auf ca. 77% im Vergleich zu ca. 93% bei anderen Brustkrebsarten (5). Außerdem werden früh auftretende Rezidive (10-15% pro Jahr, im Vergleich zu 3-5% bei anderen Formen von Brustkrebs) (5), bestimmte Genmutationen (z. B. *BRCA1*), und ein fortgeschrittenes Stadium bei Erstdiagnose mit dieser bestimmten Form des Brustkrebs in Verbindung gebracht (1). Weitere Auffälligkeiten bei Erstdiagnose sind größere Primärtumoren, bereits befallene axiale Lymphknoten und schlechter ausfallende Prognoseindizes (3). Die Tumoren metastasieren überwiegend in Lunge, Leber und das zentrale Nervensystem (3). Das triple-negative Mammakarzinom weist verschiedene Subtypen auf ("*Basal like (BL)-1*", "*BL-2*", "*immune-modulatory*", "*luminal androgen receptor*", "*mesenchymal*", "*mesenchymal/stem like subtype*" und "*claudin low subtype*"), die ein Ausdruck des hohen Maßes an Heterogenität dieser Erkrankung sind (6, 7). Die molekulare Charakterisierung dieser Subtypen wurden von einigen Forschern u.a. mithilfe von Genexpressionsanalysen (GEP = "*gene expression profiles*") vorgenommen. Für die Forschung nach einer geeigneten spezifischen, individuellen Therapie spielt die Unterscheidung in diese Subgruppen eine große Rolle (3). Aufgrund dieser ausgeprägten Heterogenität zeigt es sich als schwierig geeignete, effektive Behandlungen zu etablieren. Die Therapie der ersten Wahl besteht aktuell aus einer neoadjuvanten Chemotherapie (auch adjuvant angewandt), einer darauffolgenden Operation (partielle bzw. vollständige Mastektomie) und einer anschließenden Radiotherapie, sowie ggf. einer postneoadjuvanten Therapie (8). Die Tumoren des triple-negativen Mammakarzinoms weisen, aufgrund von

genetischen Veränderungen, eine gewisse Immunogenität auf, was eine Immunantwort des körpereigenen Immunsystems zur Folge hat (8, 9). Es kommt zu einer Infiltration des Tumors mit Immunzellen und einer entsprechenden Immunantwort des Körpers (5). Somit liegt die Erforschung einer bisher noch nicht etablierten, targetspezifischen Therapie nahe und ist deshalb Gegenstand aktueller Forschung, wie auch dieser Arbeit. Das Ziel des Projekts ist die Identifizierung von tumorspezifischen, immunogenen Antigenen als therapeutische Zielstruktur bei triple-negativem Mammakarzinom.

Im Vorfeld wurde die Spezifität zirkulierender Antikörper in Blutproben von 36 TNBC-Patientinnen mittels Phage Display durch TRON Mainz analysiert. Anhand der Analyse wurden Antikörper gegen zwei Antigenstrukturen der Moleküle KDM5B und CBX5 identifiziert, deren Konzentration im Blut der TNBC-Patientinnen erhöht war, nicht jedoch im Blut von gesunden Probandinnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels immunhistochemischer Färbung an 36 zu den analysierten Blutproben korrespondierenden TNBC-Paraffinschnitten untersucht, ob und wie stark die entsprechenden Antigene in den Tumoren des genannten Kollektivs exprimiert werden. Eine Auswertung der gefärbten Schnitte wurde mittels des immunreaktiven Scores (IRS) vorgenommen. Durch diesen Score konnte eine Aussage über die Farbintensität und den Anteil positiver Zellen und somit über die Expression des detektierten Antigens getroffen werden. Des Weiteren wurden statistische Tests zur Aufdeckung bestehender Korrelationen der Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit Daten eines bereits bestehenden *Follow-ups* durchgeführt. Hierbei sollen für diese Arbeit folgende wichtige Fragestellungen beantwortet werden: Sind die Antigene CBX5 und KDM5B in den korrespondierenden TNBC-Paraffinschnitten nachweisbar und in welcher Ausprägung? Gibt es eine Korrelation zwischen Antigenexpression und Tumor, bezüglich seiner Größe, seiner Metastasierung oder des Lymphknotenbefalls? Hängt die Expression mit dem Alter und dem kumulativen Überleben der Patientinnen zusammen? Hat der Grad der Expression der Antigene einen Einfluss auf die Aspekte der Tumorprogression?

Die Proteine CBX5 und KDM5B spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression, sodass der Einfluss auf eine Tumorentstehung bei einer Dysfunktion der Proteine naheliegt. Somit stellt diese Arbeit einen Baustein für die Identifizierung von CBX5 und KDM5B als potenzielle therapeutische Zielstrukturen dar.

2 Literaturdiskussion

2.1 Zielgerichtete Therapien beim triple-negativen Mammakarzinom

Im Folgenden wird die aktuelle Forschung bezüglich des triple-negativen Mammakarzinoms, insbesondere zielgerichteter Therapien, dargestellt. Im Allgemeinen gibt es zahlreiche Moleküle, die Einfluss auf die Entstehung und Progression des triple-negativen Mammakarzinoms haben und Ansatzpunkte für zielgerichtete Therapien sind. In den folgenden Kapiteln werden einige von ihnen diskutiert. Eine umfassende Zusammenfassung liefert Alam et al. (10, 11). Eine Übersicht über aktuelle Therapiemöglichkeiten bietet Yin et al. (12), sowie Borri et al. (13) und Bianchini et al. (14).

2.1.1 Biomarker

Studien konnten zeigen, dass Androgen-Rezeptor (AR)-positive TNBC-Patientinnen¹ ein besseres *Outcome* haben, als Androgen-Rezeptor-negative TNBC-Patientinnen. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten eine Expression von AR bei TNBC zwischen 10 und 90%. AR-positive-Patientinnen wiesen eine Risikoreduktion einer Tumorprogression oder zu sterben um 48% auf im Vergleich zu AR-negativen Patientinnen. Eine Korrelation zum Gesamtüberleben konnte jedoch nicht gezeigt werden. Außerdem verhalten sich AR-positive Tumoren resistenter gegenüber Chemotherapien. Therapien mit Antiandrogenen, wie z. B. Bicalutamid und Enzalutamid, konnten die klinische Benefitrate in Studien erhöhen (3).

Besonders microRNAs, sowie lncRNAs (*“long non-coding RNAs”*) konnten in Studien als potenzielle Biomarker präsentiert werden. *microRNAs* enthalten nur wenig Nukleotide und spielen eine Rolle bei der Regulierung der Expression von Genen. Für TNBC wurden vor allem miRNAs der *miR-34*-Gruppe (*miR-34a*, *miR-34b*, *miR-34c*) als Biomarker untersucht. Nachdem festgestellt wurde, dass *miR-34a* als Tumorsuppressor agiert und somit eine negative Wirkung auf das Tumorwachstum hat, Zellzyklusarrest und Apoptose einleitet und die Zellteilung stoppt, wurde eine liposomale Kopie, MRX34, zur zielgerichteten Therapie entwickelt und wird aktuell erprobt. Es konnte herausgefunden werden, dass z. B. die lnc-RNA *“Long non-coding RNA in non-homologous end joining pathway 1”* (*LINP1*) die DNA-Reparatur bei DNA-Doppelstrangbrüchen unterstützt,

¹ Die im gesamten Text verwendete weibliche Form bezieht auch die männliche Form mit ein.

woraus geschlossen wurde, dass eine Blockierung dieses Moleküls eine Sensitivierung für Radiotherapie zur Folge haben könnte. Weitere miRNAs und lncRNAs werden bezüglich ihrer Eigenschaften und Eignung zur Therapie in der aktuellen Forschung untersucht (3).

Weitere Moleküle, die aktuell als potentielle Biomarker untersucht werden, sind ctDNA (*“plasma circulating tumor dna”*), *“circulating tumor cells” (CTC)*, *“DNA methylation loci”*, Notch-Rezeptoren und der Phosphoinositid 3-kinase-*“(PI3K)/protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent-Signalweg”* (3).

2.1.2 Zytostatika

Die Therapie des TNBCs bestand in den USA in den letzten 40 Jahren aus verschiedenen Chemotherapien. Anthracycline in den 1970ern, Gemcitabine, Vinorelbine und Taxane in den 1990er Jahren, sowie Capecitabine und Nab-paclitaxel in den Jahren von 2000-2009. Ab dem Jahr 2010 kamen Medikamente wie Carboplatin/Cisplatin (BRCA+) und Eribulin hinzu (5). Heutzutage gilt eine Zytostatika-Therapie bei TNBC mit Anthrazyklinen und Taxanen als Grundlage für eine adjuvante oder primäre Chemotherapie und platinhaltige Chemotherapeutika bei einer neoadjuvanten Indikation (15).

2.1.3 Zerstörung der Zellkernfunktionen

Auch der Transkriptionsfaktor p53 spielt eine Rolle in der bisherigen TNBC-Forschung. Das Protein wird bei beschädigter DNA stärker exprimiert und führt zum Arrest der Zelle, bis der Defekt repariert ist oder die Zelle in Apoptose geht. Somit unterdrückt es normalerweise die Tumorzellentstehung. Ein mutiertes p53-Gen tritt bei circa 30% aller Brustkrebsarten und in circa 80-90% bei TNBC auf und führt zu einer Fehlfunktion des p53-Proteins zugunsten des Tumorwachstums. Die Unterdrückung des Wachstums wird aufgehoben, die Zellen proliferieren und gelangen nicht in Apoptose. Hierbei wird zwischen einer *missense* Mutation (geringe bis hohe Expression) und einer Deletion (keine Expression) des Gens unterschieden, wobei die *missense* Mutation mit einer geringen Expression eine schlechtere Prognose als eine *missense* Mutation mit einer hohen Expression des p53-Gens zeigte (*“5-years-DRFS [=distant recurrence-free survival]: low vs high, 50.0% vs 87.8%”* (3)). Die Deletion wiederum konnte nicht mit einer schlechteren Prognose assoziiert werden. Eine hohe p53-Expression bei N0-TNBC-Patientinnen zeigte ein signifikant höheres Gesamtüberleben als bei geringer p53-Expression (3).

Einen Ansatz für eine zielgerichtete Therapie zeigte u. a. (16) der Mechanismus des Moleküls PRIMA-1/ PRIMA-1^{MET} (methyliertes PRIMA-1 (*“p53 reactivation and induction of massive apoptosis”*)), das an das mutierte p53-Protein bindet, eine Reaktivierung des Proteins induziert und dieses daraufhin wieder eine Apoptose einleiten kann (3). Wang et al. stellten fest, dass eine Inhibition der Histon-Demethylase KDM5B eine erhöhte p53-Konzentration und eine vermehrte Apoptoserate von Brustkrebszellen zur Folge hat (17).

2.1.4 Signaltransduktionshemmung

Tyrosinkinasen wie EGFR (*“epidermal growth factor receptor”*) und c-KIT, die in TNBC möglicherweise ebenfalls stärker exprimiert werden oder mutiert vorliegen, sind mit einer schlechteren Prognose (EGFR), kürzerem Gesamtüberleben (EGFR, c-KIT), höherem Grading (EGFR) und Metastasierung (EGFR) assoziiert. Wobei sich die Ergebnisse der Studien stark unterscheiden und die Thematik kontrovers diskutiert wird. Eine Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) ist naheliegend, jedoch konnte bisher weder eine TKI-Therapie noch eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern signifikante Ergebnisse erzielen (EGFR) (17).

2.1.5 Immuntherapie

Die Erforschung einer zielgerichteten Therapie im Sinne einer Immuntherapie gegen Brustkrebs wurde erst in den letzten Jahren forciert, da lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass diese Krebsart keine ausreichende Immunogenität aufweise. Ende 2019 gab es insgesamt ca. 300 klinische Studien, die sich mit Immuntherapien bei TNBC, überwiegend bereits metastasiert, beschäftigten. Davon befanden sich die meisten in Phase 1 und 2 (5).

Mittlerweile ist jedoch klar, dass TNBC, aufgrund vermehrt auftretender somatischer Mutationen, Neoantigene und einer erhöhten Expression von *Immunecheckpoint*-Genen, eine hohe Immunogenität aufweist, insbesondere im Vergleich zu anderen Formen von Brustkrebs. Ebenso konnten Transkripte bestimmter Immunzell-Proteine und tumorinfiltrierende Lymphozyten (TILs) als prognostische und prädiktive Marker identifiziert werden. Eine erhöhte Konzentration an TILs in TNBC-Tumoren wird u.a. mit einer besseren Prognose und einem besseren Ansprechen auf neoadjuvante Chemotherapie in Verbindung gebracht. Es wurden jedoch ebenso inverse Korrelationen zwischen dem Auftreten somatischer Mutationen und immuninfiltrierenden Zellen

beobachtet. In diesem Bereich besteht also weiterhin Forschungsbedarf, um die Bedeutung der unterschiedlichen Ausprägungen aufzuklären (18).

Im Bereich der zielgerichteten Therapie begann die Forschung zunächst mit PARP-Inhibitoren, wie Talazoparib (5). PARP-Inhibitoren hemmen das Enzym Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP), das wiederum eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur spielt, indem es Einzelstrangbrüche erkennt und die DNA-Reparatur, insbesondere Basenexzisionsreparaturen, mit Hilfe von mono-/poly-ADP-Ribosylierung initiiert. Hierfür benötigt es Nicotinamid (NAD⁺) als Substrat, dessen Bindestelle am Enzym durch einen PARP-Inhibitor (PARPi) blockiert und somit die Funktionalität des Enzyms eingeschränkt wird. Aus nicht-reparierten Einzelstrangbrüchen resultieren im weiteren Verlauf Doppelstrangbrüche. In *BRCA*-mutierten Zellen führt dies zu einer Apoptose der Zelle, nicht aber in nicht-*BRCA*-mutierten Zellen (19). PARP-Inhibitoren sind deshalb in Zellen (Tumoren) mit einer *BRCA*-Mutation effektiver, was zu einer EU-weiten Zulassung der Medikamente Talazoparib (2019) (20) und Olaparib (2019) (21) bei einer zusätzlichen *BRCA1/2*-Mutation führte. Dadurch kann aber nur eine kleine Subgruppe von Brustkrebs, bzw. TNBCs behandelt werden (19). Eine Therapie mit Talazoparib zeigte im Vergleich zur Standardtherapie mit Capecitabin, Eribulin, Gemcitabin und Vinorelbin ein längeres progressionsfreies Überleben (*“progression-free survival”* (PFS)), ein längeres medianes Gesamtüberleben (*“median overall survival”*) und ein komplettes Verschwinden aller bekannten Tumorparameter bei 5,5% aller Patientinnen (*“complete response”* (CR)). Außerdem führte die Therapie mit PARP-Inhibitoren zu einem besseren Outcome bezüglich der Lebensqualität (Studie Embraca) (22). Studien mit Olaparib (Studie Olympiad) (23) zeigten ähnliche Ergebnisse (5). Die Kombination von PARP-Inhibitoren mit Checkpoint-Inhibitoren ist Gegenstand aktueller Forschung (24).

Die Erforschung von Checkpoint-Inhibitoren wie CTLA-4-Inhibitoren (*“cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4”*) und PD-1-Inhibitoren (*“programmed cell death protein 1”*), die beim Malignen Melanom und Lungenkarzinom bereits vielversprechend waren, zeigten im Einsatz gegen Brustkrebs zunächst keine relevanten Ergebnisse (5). Weitere Forschungen ergaben, dass PDL-1 (*“programmed cell death 1 ligand”*), ein Ligand, der an den PD-1-Rezeptor auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen bindet, auch in TNBC stark exprimiert wird und potenziell als prädiktiver Marker bei fortgeschrittenem TNBC genutzt werden kann (5, 18). Der durch die Bindung ablaufende PD1/PDL1-*Pathway* führt zu einer

Unterdrückung der T-Zell-vermittelten Immunreaktion (5). Tumoren machen sich die Unterdrückung des körpereigenen Immunsystems zunutze, indem sie viel PDL-1 exprimieren. Durch die Hemmung des PDL-1 wird das Immunsystem somit wieder aktiviert (5). PDL-1 gilt mittlerweile als wichtigster *Immunecheckpoint* bei Brustkrebs, und zeigte vielversprechende therapeutische Ergebnisse bei fortgeschrittenem Stadium in Kombination mit Chemotherapie oder PARP-Inhibitoren. Die Effektivität in frühem Stadium ist Gegenstand aktueller Forschung (18). Die Behandlung mit PDL-1-Inhibitoren kann jedoch im Rahmen von Autoimmunreaktionen gravierende Nebenwirkungen, wie z. B. Entzündungen der inneren Organe (Hypophysitis, Colitis, Thyreoiditis, Hepatitis), verursachen, die lebensbedrohlich sein können (18, 25). Pembrolizumab, ein PD-1-Inhibitor, wurde in Kombination mit Chemotherapie bereits im Juli 2021 von der FDA (*Food and Drug Administration*) als Therapie für Patientinnen mit *“high-risk”* TNBC genehmigt (14). Auch in Deutschland ist Pembrolizumab zugelassen und in der Leitlinie etabliert (26). Ebenso wurde der PDL-1-Inhibitor Atezolizumab in der Kombination mit Nab-Paclitaxel, ein Taxan, bei nicht resezierbarem, da lokal fortgeschrittenem, oder metastasiertem Tumor zugelassen (24).

Ein weiteres Target für *Immunecheckpoint*-Inhibitoren ist das CTLA-4. Hierbei handelt es sich um einen Rezeptor auf den Oberflächen von aktivierten CD4+ und CD8+ T-Zellen, der wiederum eine inhibierende Wirkung auf T-Zellen hat. Der Effekt von PD-1-Inhibitoren (Pembrolizumab, Nivolumab, Atezolizumab (27) u. a.), PDL-2-Inhibitoren (Durvalumab, Atezolizumab) und CTLA-4-Inhibitoren (Ipilimumab, Tremelimumab) und anderen Checkpoint-Inhibitoren, wie z. B. IMP321, BTLA, VISTA, TIM3 und CD47 (5), in Kombination mit verschiedenen Chemo- und Radiotherapien, ist Gegenstand der aktuellen TNBC-Forschung (28).

VEGF (*“vascular endothelial growth factor”*) spielt eine wichtige Rolle bei der Angiogenese des Tumors. In ca. 30-60% der TNBC-Patientinnen wird das *VEGF*-Gen stärker exprimiert und ist außerdem mit einer schlechteren Prognose und Überleben assoziiert. Für die verstärkte Expression sind vor allem Hypoxie, Stickstoffmonoxid, Onkogene und Tumorsuppressorgene verantwortlich. Es existiert bereits eine Antikörpertherapie mit Bevacizumab, die gegen das VEGF-Antigen gerichtet ist. Auch wenn die Ansprechraten durch die Therapie nachweislich stiegen, konnten entsprechende Studien keinen signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben feststellen (3).

Weitere immuntherapeutische Ansätze bestehen in der Entwicklung von Impfstoffen mit tumorspezifischen Antigenen oder Viren (29), um das körpereigene Immunsystem sensibler gegen den Tumor zu machen. Hierbei stellt die Instabilität des TNBC-Genoms eine Problematik dar (28).

Ziel ist es die Antigenpräsentierung mittels Impfung zu optimieren. Bisher zeigten sich Ansätze in der Impfstoffforschung bei Brustkrebs als nicht besonders effektiv. Die als Zielstruktur forcierten Tumorantigene, wie z. B. HER-2, sind dem Immunsystem bereits bekannt, woraus eine geringe Immunantwort resultiert. Erfolgsversprechender sind hingegen Neoantigene, detektiert durch "*Next Generation Sequencing*" (NGS), die dem Immunsystem noch nicht in dem Maße bekannt sind und somit zu einer ausreichenden Immunreaktion führen können. Es gibt Ansätze das Immunsystem mit besonders immunogenen, individuellen Neoantigenen mittels RNA-Impfstoffen zu aktivieren und somit z. B. eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren effektiver zu machen (18). Die Tumorantigene CBX5 und KDM5B, die den experimentellen Schwerpunkt dieser Arbeit darstellen, könnten möglicherweise solche Neoantigene darstellen und als Zielstrukturen einer targetspezifischen Therapie dienen.

Eine neuartige Therapieoption stellen ADCs ("*Antibody-drug conjugates*") dar. Es handelt sich hierbei um einen rekombinanten monoklonalen Antikörper, der mit einer zytotoxischen Komponente verlinkt ist, somit nur spezifisch Krebszellen angreift und gesunde Zellen verschont. Angriffspunkte sind beispielsweise TROP2 ("*tumor-associated calcium signal transducer 2*") und der Zinktransporter ZIP6, Transmembranproteine, die sich auch in TNBC-Zellen befinden (14).

Große Unterschiede in atypischen Mustern klinischer Ansprechraten und die damit einhergehende variierende Effektivität der Therapie stellen die Forschung für zukünftige Therapiekonzepte und klinisch praktizierende Ärzte und Ärztinnen bei der Wahl der richtigen Therapie für jedes Individuum vor eine große Herausforderung. Weitere noch nicht ausreichend erforschte Hürden der Immuntherapie sind unerwünschte Nebenwirkungen durch die Hochregulierung des Immunsystems, und der Umgang mit diesen. Außerdem zeigten Studien, dass eine Immuntherapie, die zusätzlich zu einer Chemotherapie eingesetzt wurde, die Nebenwirkungen der Chemotherapie erhöhen können, was ein zusätzliches und weitreichenderes Monitoring erfordert (5). Letztlich wird

in der TNBC- Forschung große Hoffnung auf die Immuntherapie gesetzt – der große Durchbruch blieb aber bisher aus (28). Ziel weiterer Studien sollte es sein das Mikromilieu der Tumoren besser zu verstehen und neue Biomarker zu identifizieren (5). Grundlagenforschung im Labor, wie auch für diese Arbeit, bieten sich hierfür an.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde die Spezifität zirkulierender Antikörper in Blutproben von 36 TNBC-Patientinnen mittels Phage Display analysiert. Bei diesem Verfahren werden bestimmte Peptide auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert. Hierfür wird die DNA eines bestimmten Peptids mit der eines Phagenhüllproteins verknüpft und in die DNA des Bakteriophagen integriert. Somit synthetisiert der Bakteriophage ein moduliertes Phagenhüllprotein und transportiert dieses an seine Oberfläche, um es dort zu präsentieren. Eine Wiederholung dieses Vorgangs mit Millionen verschiedener Proteine führt zu einer Bakteriophagen-Bibliothek mit entsprechender Diversität. Anschließend werden beim sog. *“Biopanning-Verfahren”* (Nobelpreis für Chemie 2018) die Antikörper aus dem Blut der TNBC-Patientinnen immobilisiert und mit der Phagen-Bibliothek inkubiert. Die passenden Bakteriophagen binden mit ihren modulierten Phagenhüllproteinen an den entsprechenden Zielmolekülen, den Antikörpern; die nicht-passenden werden im folgenden Waschvorgang entfernt. Die übrig gebliebenen Bakteriophagen werden eluiert, in Bakterien amplifiziert und vermehrt und für eine weitere Selektionsrunde verwendet. Durch viele aufeinander folgende Selektionsrunden kann eine hohe Affinität zu den Bindungspartnern sichergestellt und die Antikörper im Blut identifiziert werden, indem ihre Aminosäuresequenz mit einer Proteinsequenzdatenbank (*“NCBI blastp program”*) verglichen wird (30). Es zeigte sich, dass insbesondere Antikörper, die gegen die Antigene KDM5B und CBX5 gerichtet sind, in den Blutproben nachweisbar waren.

In der zweiten Phase, deren Schwerpunkt diese Arbeit darstellt, wurden die Antigene KDM5B und CBX5 an korrespondierenden TNBC-Paraffinschnitten immunhistochemisch detektiert. Die Genprodukte KDM5B und CBX5 sind auch unter JARID1B und HP1 α bekannt. In dieser Arbeit werden überwiegend die Bezeichnungen KDM5B und CBX5 verwendet.

2.2 CBX5 und KDM5B

2.2.1 CBX5

Bisher sind acht Subtypen der CBX-Proteine (CBX1-8), auch bezeichnet als *Chromobox protein family*, bekannt und werden in zwei Gruppen aufgeteilt: CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 und CBX8 sind Bestandteile des *polycomb repressive complex 1* (PRC 1), der wiederum als einer von drei enzymatischen Komplexen zur *Polycomb group* (PcG) gezählt wird. CBX1, CBX3 und CBX5 gelten als Isoformen des Heterochromatin-Protein 1 (HP1) (31, 32).

Die PcG spielt eine wichtige Rolle bei der epigenetischen Modifikation und der Regulation der Transkription, insbesondere in der embryonalen Entwicklung, der Differenzierung von Stammzellen und der Gewebshomöostase. Es ist bereits bekannt, dass eine Dysfunktion des Komplexes zu verschiedensten Malignitäten führen kann. Bei den drei Komplexen handelt es sich um das bereits genannte PRC1, PRC2 und *polycomb repressive deubiquitinase* (PR-DUB). PRC1 sind Ubiquitinligasen, die das Lysin 119 des Histons H2A monoubiquitinieren, durch Ubiquitinierung zur Verdichtung des Chromatins beitragen und direkt in die Transkription eingreifen. PR-DUB hat die gegenteilige Funktion, indem es das Lysin 119 des Histons H2A deubiquitiniert. PRC2 sind Methyltransferasen, die das Lysin 27 des Histons H3 mono-, di- und trimethylieren. Durch gegenseitige Aktivierung können Signale zur Transkriptionsregulierung über große Abschnitte des Genoms weitergeleitet werden (33-35).

Das Heterochromatin 1 mit seinen Isoformen HP1 α (CBX5), HP1 β (36, 37) (CBX1) und HP1 γ (CBX3) hat ebenfalls Einfluss auf die Regulation der Genexpression und ist entscheidend für eine normale embryonale Entwicklung (38). Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Zellzykluskontrolle, Apoptose und DNA-Reparatur. Wichtige Prozesse, deren Alteration mit einer Tumorentstehung assoziiert ist, werden durch das Heterochromatinprotein 1 beeinflusst (32). Es ist bekannt, dass die HP1-Proteine Einfluss auf bestimmte Tumorsuppressoren, wie das Retinoblastom-Protein (pRB) und das p53-Protein haben (39).

HP1 und seine Isoformen werden als "*chromatin architectural proteins*" (40) bezeichnet, da sie für die Reproduktion und Aufrechterhaltung von Chromatinstrukturen höherer Ordnung verantwortlich sind, indem sie Einfluss auf die Chromosomensegregation, -

kondensation, den Zusammenhalt der Schwesterchromatiden, die DNA-Replikation, die DNA-Reparatur und das Gen-*Silencing* nehmen. Zudem wird angenommen, dass sie an der Bewahrung der Telomere, der Regulierung der Transkription und am *RNA-Splicing* beteiligt sind. Unterschiede im Aufbau des Proteins sowie viele verschiedene Möglichkeiten der Bindung an DNA und posttranslationale Modifikationen sind Gründe für dieses breitgefächerte Wirkspektrum (40-51). Eine Etablierung zielgerichteter Therapien gegen CBX5 ist naheliegend (52).

2.2.1.1 Struktur

Um die Funktionen des HP1 besser verstehen zu können, soll zunächst der Aufbau des Proteins erklärt werden. Es besteht aus den Elementen *N-terminal extension* (NTE), die über eine gefaltete *chromodomain* (CD; Chromodomains = *chromatin organization modifier (chromo) domains*) (32) mit der *hinge region* (HR) verbunden ist. Die ebenfalls gefaltete *chromoshadow domain* (CSD), das Charakteristikum für HP1 (32), verbindet weiter die HR mit der *C-terminal extension* (CTE) (Abbildung 1).



Abbildung 1: HP1-Struktur angelehnt an Kumar et al., 2020.

Die schematische Darstellung zeigt den strukturellen Aufbau des Proteins HP1 (40).

Die CSD beinhaltet ein bestimmtes Muster einer Aminosäureabfolge: PXVXL (Prolin-X-Valin-X-Leucin; X steht für eine beliebige Aminosäure) (53, 54). Diese Abfolge findet sich auch in anderen Proteinen wieder und ist mit einer Interaktion der Proteine untereinander assoziiert (53). Die strukturierten Anteile CD und CSD ähneln sich innerhalb der Isoformen sehr in ihrem sequenziellen Aufbau, wohingegen die unstrukturierten Proteinanteile NTE, HR und CTE, die dem Protein Flexibilität verleihen, eine geringe Ähnlichkeit aufweisen. Es ergeben sich überwiegend gleiche Funktionen der Isoformen, wobei, aufgrund von minimalen sequenziellen Unterschieden auch unterschiedliche Funktionen entdeckt werden konnten (40). U.a. wirkt HP1 α im Bereich des Gen-*Silencing* – es wird hauptsächlich in konstitutivem Heterochromatin vorgefunden (32, 55, 56) – während HP1 β

und HP1 γ sowohl genaktivierend als auch -hemmend wirken, da sie ihre Wirkung sowohl in Hetero- als auch Euchromatin entfalten (32).

Das Protein kann als Monomer, Dimer (Abbildung 2), Tetramer oder Oligomer vorliegen. Dadurch wird die Bindung an viele andere chromosomale Proteine, die die Transkription und den Zellzyklus regulieren, oder Chromatin modifizieren, möglich gemacht. Bei HP1 α konnte beobachtet werden, dass durch Mutationen Dimerisierungen verhindert oder die Affinität zur Bindung an Heterochromatin herabgesetzt werden können und es somit zu einer Funktionseinschränkung kommt. Eine Bindung der Isoformen untereinander ist möglich (40, 57).

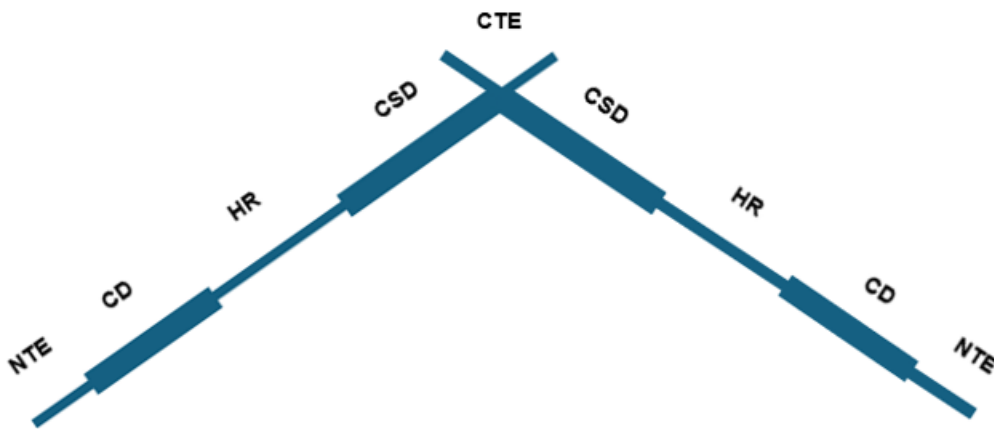


Abbildung 2: Dimerisierung von HP1 angelehnt an Kumar et al. 2020.

Für eine Dimerisierung des Proteins HP1 binden die Domänen CSD aneinander (40).

2.2.1.2 Posttranslationale Modifikationen

Für HP1 α sind 35 Orte innerhalb der Aminosäurestruktur bekannt, an denen posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung, Formylierung, SUMOylierung (SUMO = *small ubiquitin-related modifier*) und Citrullinierung vorgenommen werden können. Diese Modifikationen haben Auswirkungen auf die Funktion des Proteins (32, 58-63). Eine Phosphorylierung von HP1 α erhöht die Bindungsaffinität zu Nukleosomen, wichtige Bindungspartner bei der Ausbildung von Heterochromatin (48, 62, 64-66). Phosphoryliertes HP1 α hat außerdem Auswirkungen auf den Ablauf des Zell-Zyklus (48-50, 67). Eine HypoSUMOylierung von

HP1 α ist beispielsweise mit einer gesteigerten Invasivität von Brustkrebszellen assoziiert. Hierbei wird das *Gen-Silencing* von Genen, die das epitheliale Wachstum fördern, aufgehoben (68, 69).

Zimmermann et al. konnten zeigen, dass HP1 α einen Komplex mit dem Protein importin α (IMP α) eingeht, das HP1 α in den Zellkern, wo es seine Funktion erfüllt, transportiert. Die Komplexbildung erfolgt durch eine NLS-Sequenz über den *Linker*, die *hinge region*, und ist abhängig von posttranslationaler Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung. Die Untersuchungen ergaben, dass die Voraussetzung für eine korrekte Bindung ein nicht-phosphorylierter *Linker* ist. Eine phosphorylierte *Linker*-Region, so bei Varianten des Proteins zu beobachten, die durch krebsassoziierte *Missense*-Mutationen der Hinge-Region entstanden sind, führt zu einer veränderten Konformation von HP1 α . Die Konsequenz ist keine oder nur eine unspezifische Bindung von HP1 α an IMP α und somit ein insuffizienter Transport in den Kern. Eine verringerte Konzentration von HP1 α im Kern und dessen Folgen wäre zu erwarten (70).

2.2.1.3 Bindungspartner

Weitere wichtige Bindungspartner sind Nukleosome, die aus einem Histon-Oktamer und DNA bestehen und ebenfalls zur Architektur des Chromatins beitragen. Diese ist um das Nukleosom Core Partikel, bestehend aus H2A, H2B, H3 und H4 gewunden. Die Nukleosome sind untereinander über eine *Linker*-DNA und ein *Linker*-Histon (H1) miteinander verbunden (40). Histonmethyltransferasen markieren die Histone mittels Methylierung für Genaktivierung und Histon-demethylasen erkennen und entfernen Methylgruppen entsprechend für *Gen-Silencing* – das Chromatin formiert sich entsprechend zu Eu- oder Heterochromatin (71, 72). Eine Dysfunktion genannter Enzyme kann zur Störung der Methylierung und Genaktivierung/*Gen-Silencing* mit pathologischen Folgen führen (73). HP1 bindet an Nukleosome über eine CD-H3K9me3-Verbindung, also am neunten trimethylierten Lysin des H3-Histons und kommt dadurch überhaupt erst in Berührung mit Heterochromatin (40, 56, 62, 64-66, 74-76).

H3K9me3, das posttranslational gebildet wird, ist ein Marker für Heterochromatin mit vielen nicht-kodierenden, repetitiven Sequenzen im Bereich der Telomere und Zentromere, das auch als konstitutives Heterochromatin bezeichnet wird und in allen Zelltypen vorkommt. Im Gegensatz dazu steht das fakultative Heterochromatin, das

kodierende Gene enthält und zellspezifisch zu Euchromatin umgewandelt werden kann. Durch H3K9me3 wird innerhalb des konstitutiven Heterochromatins eine Rekombination konservierter Genabschnitte zwischen Chromosomen, eine Bindung von Transkriptionsfaktoren und eine Aktivierung und Expression von Genen repetitiver Sequenzen verhindert. Die Bindung von HP1 an H3K9me3 induziert durch Kettenbildung (Abbildung 3) eine Stabilisierung des Heterochromatins und trägt somit zur Repression und Gen-Silencing bestimmter Genabschnitte bei (77).

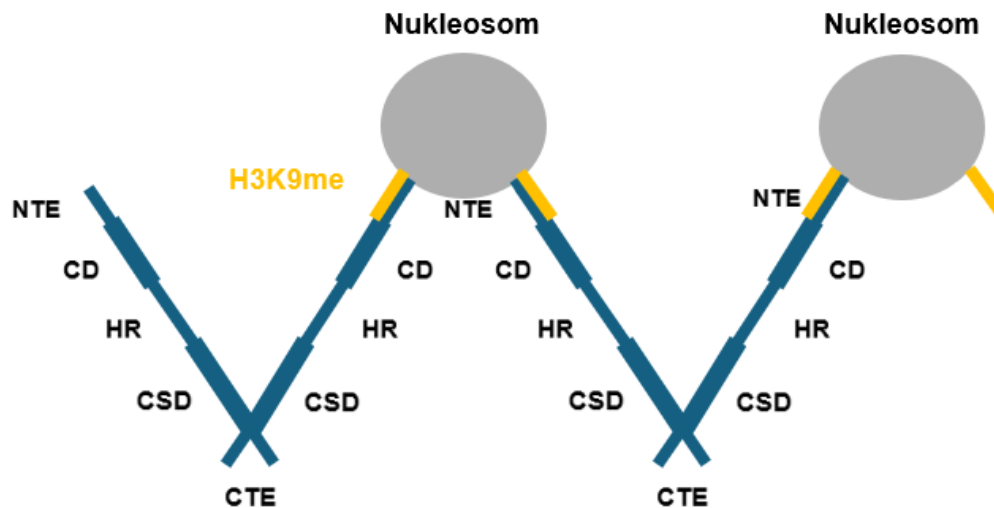


Abbildung 3: Interaktion zwischen H3K9me3 und HP1 angelehnt an Kumar et al., 2020.

Durch Bindungen zwischen der CD-Domäne von HP1 und H3K9me3 und einer CSD-CSD-Verbindung kommt es zur Ausbildung von Heterochromatin (40).

Durch die Bindung von HP1 an methyliertes H3K9 erfolgt die Rekrutierung der Methyltransferase SUV39h1, wodurch es zu einer weiteren Methylierung von H3K9 kommt, woran wiederum erneut HP1 binden kann. So kommt es zur Umwandlung von benachbartem Euchromatin zu Heterochromatin. Dieser Prozess nennt sich *position effect variegation* (PEV). Bei einer erhöhten HP1-Expression kommt es vermehrt zur PEV (78-82).

Eine Regulierung der Bindungsaffinität von HP1 α an H3K9me3, z. B. durch eine Tyrosinphosphorylierung mittels Tyrosinkinasen innerhalb der *chromodomain*, die die Affinität herabsetzt, wird diskutiert. Bei einer erhöhten Kinaseaktivität in Tumorzellen könnte die veränderte Phosphorylierung von HP1 α somit zu einer Freilegung bestimmter

Genabschnitte führen und eine pathologische Transkription möglich machen, oder zu einem ungewollten Gen-*Silencing* von Euchromatin und wichtige Transkriptionen verhindern (83).

Eine Trennung des HP1 vom Chromatin wiederum tritt während der Mitose auf (84). Durch die Beteiligung von HP1 α an einem funktionierenden Ablauf des Zellzyklus können sowohl eine Über- als auch eine Unterexprimierung des Proteins eine fehlerhafte Zellteilung zur Folge haben (32). Ein Fehlen von HP1 α führt zu einer fehlerbehafteten Trennung der Chromosomen, da es für den Zusammenhalt der Schwesterchromatiden und einem Austreten der Zelle aus dem Zellzyklus verantwortlich ist (85).

Eine weitere Möglichkeit für HP1 α an H3 zu binden ist die Bindung der *chromoshadow domain* an H3Y41, möglicherweise an Stellen, an denen kein H3K9 vorhanden ist. Durch die Phosphorylierung von H3Y41 durch die Tyrosinkinase JAK2 kommt es zu einer Trennung von HP1 α von H3. Durch Dysregulation der JAK2-Kinase in Tumorzellen kann es durch die verminderte Bindung von HP1 α an H3 zu einer Destabilisierung des Chromatins und tumorinduzierenden Prozessen kommen. Studien konnten zeigen, dass eine Überexprimierung von HP1 α positiven Einfluss auf Leukämien hat, bei denen die JAK2-Kinase überaktiv ist (86, 87).

HP1 kann außerdem über die *chromodomain* an das *Linker*-Histon H1.4. methyliert an Lysin 26, binden (88, 89). Dies führt zu einer zusätzlichen Komprimierung der DNA (78).

Es werden Verbindungen zwischen H4, H2A (90), H2B, dem *Linker*-Histon H1 (88, 89) und DNA (HR-DNA; NTE-DNA), sowie dem *chromosomal passenger complex* (CPC) (49, 91), dem *inner centromere protein* (INCENP) und den regulatorischen Proteinen Survivin und Borealin (32, 45) beschrieben. Alle Bindungen sind von einer Vielzahl an Faktoren aller Bindungspartner abhängig und noch nicht vollständig erforscht (40).

HP1 α geht zudem einen Komplex mit dem Tumorsuppressor PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), der in Tumorzellen häufig eine Mutation aufweist, und dem Histon H1 ein, was zu einer weiteren Kondensation des Heterochromatins führt. Mutationen von PTEN können in einer Dekondensation und einer Expression der vorher verpackten und nicht zugänglichen DNA resultieren (92).

Fest steht, dass HP1 eine wichtige Rolle in der Dynamik von Chromatin einnimmt, sodass bei einer Dysfunktion des Proteins, entstanden u.a. durch Genmutationen, CNVs (*copy number variations*) und Überexprimierung, oder auch einer posttranslationalen Modifikation, von einer Veränderung der Chromatinstruktur und daraus resultierenden Malignitäten auszugehen ist (40, 70).

2.2.1.4 DNA-Reparatur

Es konnte gezeigt werden, dass die Isoformen von HP1 bei der Reparatur von DNA insofern eine wichtige Rolle spielen – besonders in ihrer phosphorylierten Form –, dass deren Anwesenheit für die Rekrutierung anderer DNA-Reparatur-Proteine ausschlaggebend ist. Bei diesen Proteinen handelt es sich im Fall von HP1 α beispielsweise um 53BP1 und RAD51 (93).

Eine weiteres Forschungsprojekt konnte aufdecken, dass die Abwesenheit von HP1 (alle Isoformen) bei Doppelstrangbrüchen zu einer verzögerten Reparatur der DNA-Abschnitte und einer erhöhten Apoptoserate führte. Außerdem kam es zu einer abgeschwächten Rekrutierung von *BRCA1*, ein Gen, das u.a. DNA-Reparatur-Proteine kodiert, und es somit zu einer gestörten DNA-Reparatur kommt. HP1 beeinflusst den *DNA-damage response (DDR)-pathway*, kontrolliert den Ablauf des Zellzyklus und kann zur Induktion der Apoptose führen. Die genauen Mechanismen sind noch nicht hinreichend erforscht (52, 94).

Eine Auswirkung von SUMOyliertem HP1 α auf die DNA-Reparatur in Brustkrebszellen wird diskutiert. Eine HyperSUMOylierung erhöhe die Sensitivität von Brustkrebszellen auf DNA-schädigende Chemotherapie, indem das Protein in dieser Form an die Promotorregionen von DDR-Gene bindet (68).

2.2.2 KDM5B

KDM5B (JARID1B) wird den Histondemethylasen (HDM) zugeordnet und befindet sich aufgrund seiner Funktion im Zellkern (95). Diese werden in zwei Gruppen aufgeteilt: die LSD1-Familie (KDM1A, KDM1B) (96) und die *Jumonji C/ARID-domain-containing*-Familie. JARID1 gehört mit sechs anderen Subgruppen (JHDM1-3, PHF2/PHF8, UTX/UTY, JmjC domain only) zu letztgenannter Familie. Sie sind alle Fe²⁺- und α -Ketoglutarat-abhängige Hydroxylasen und fähig ein-, zwei- und dreifache Methylgruppen

von Histonen oder auch anderen Proteinen (96) zu entfernen (im Gegensatz zur LSD1-Familie) (97). JARID1B (auch bekannt als PLU-1) gilt als starker Gen-Repressor (98), da es (neben anderen Funktionen) (99) insbesondere H3K4me3, das ein Marker für aktiv transkribierte Gene ist (100), demethyliert. Das Protein fiel durch erhöhte Expression in unterschiedlichen Krebsarten auf, beispielsweise im Mamma- (JARID1B konnte in 90% aller duktalem Mammakarzinome nachgewiesen werden) (100), Lungen-, Prostata-, Blasenkarzinom, Leukämien und im Melanom (98, 101-105). Aufgrund der Annahme, dass KDM5B eine Schlüsselrolle in der Tumorgenese (106) spielen könnte, intensivierte sich die Forschung in den letzten zwei Jahrzehnten im Bereich der Demethylasen und auch insbesondere bezüglich KDM5B, stark (107).

Während Histon-Methyltransferasen und ihre Funktionen schon länger Bestandteil der Forschung sind, wurde die Untersuchung von Demethylasen und ihrer Eigenschaften vernachlässigt und deren Existenz zunächst in Frage gestellt. Den Auswirkungen einer Methylierung von Histonen hingegen wurde sich ausführlich gewidmet. Diese umfassten u.a. Chromatinstruktur-Modifikationen, X-Chromosom-Aktivierung und die Regulation der Transkription (108).

Demethylasen modifizieren als Gegenspieler der Methyltransferasen ebenfalls die Chromatinstruktur posttranslational und beeinflussen Transkription, Zellzyklus-Kontrolle und DNA-Reparatur. Ein Zusammenspiel von Methyltransferasen und Demethylasen regulieren genannte Prozesse. Demethylasen haben erheblichen Einfluss auf pathologische Prozesse durch Genaktivierung und *Gen-Silencing* (97). Durch die Demethylierung von H3K4me3 (beispielsweise in Promotor-Bereichen) (109) durch JARID1B wird die *Gen-Silencing*-Wirkung von H3K4 aufrechterhalten. Eine Assoziation von demethyliertem H3K4 mit malignen Prozessen wird diskutiert (100). In *Enhancer*-Bereichen hat JARID1B möglicherweise eine genaktivierende Wirkung (109). Lukasak et al. konnten anhand von KDM5B zeigen, dass eine Veränderung der Symmetrie von Nukleosomen, hervorgerufen durch Mutationen von Histonen, die mit einer Krebsentstehung assoziiert sind, den *Remodeling*-Prozess von Chromatin und die Stabilität der Nukleosomen verändert (110).

KDM5B spielt außerdem eine Rolle in der Differenzierung und Proliferation von embryonalen Stammzellen (100, 111-118), und der Entwicklung gesunder Brustdrüsenzellen (119, 120).

2.2.2.1 Struktur

Bisher sind vier JARID-Proteine bekannt: RBP2/JARID1A, PLU-1/JARID1B, SMCX/JARID1C und SMCY/JARID1D. Diese bestehen aus den Domänen JmjN/JmjC (N \triangleq N-terminal; C \triangleq C-terminal) (98, 121), ARID/BRIGHT (DNA-Bindestelle) (121), PHD 1-3 (*plant homeodomain/leukemia-associated protein domains* (98) \triangleq Bindestelle für endständige Histon-Arme *histone tails*) (121, 122), C5HC2-zinc-finger (ZF) und PLU (Trp/Tyr/Phe/Cys-Domäne), wobei die JmjC-Domäne das katalytische Zentrum für die Demethylierung enthält (Abbildung 4) (100, 123, 124).

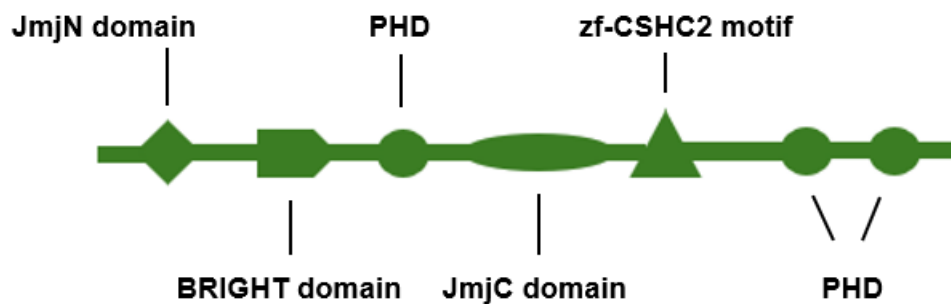


Abbildung 4: Struktur der Demethylase KDM5B angelehnt an Yamane et al., 2007.

KDM5B besteht aus den Domänen JmjN, BRIGHT, PHD 1-3, JmjC und zf-CSHC2 (100).

Eine Bindung an GC-reiche Abschnitte der DNA erfolgt über AT-reiche Domänen von KDM5B (*AT-rich interactive domain* = ARID \triangleq BRIGHT) (98, 125). Die Ähnlichkeit im Aufbau der JARID-Proteine legt eine ähnliche Funktion nahe. Dennoch finden sich einige Unterschiede. JARID1A wurde durch seine Interaktion mit dem Tumorsuppressor pRB bekannt, wirkt sowohl genaktivierend als auch geninhibierend und ist ubiquitär vorhanden. JARID1B findet sich im gesunden Organismus besonders in Hoden- und Ovarialgewebe (121, 123) wieder. Eine Mutation von JARID1C ist bei X-chromosomaler mentaler Retardierung bekannt. JARID1D ist ein Gen auf dem Y-Chromosom (100).

2.2.2.2 Posttranslationale Modifikationen

Dass KDM5B in die Regulation der Genexpression in Brustkrebszellen involviert ist, konnte in mehreren Studien bereits erarbeitet werden. Die Möglichkeit zur Differenzierung oder Entdifferenzierung von CSCs stehen in Zusammenhang mit dem Methylierungsstatus von H3K4 und somit auch mit der Aktivität von KDM5B. Wie genau

jedoch KDM5B reguliert wird, ist bisher nicht im Detail bekannt. Forscher sehen eine Möglichkeit dafür in der posttranslationalen Modifikation von KDM5B. Yeh et al. konnten feststellen, dass eine Phosphorylierung von KDM5B durch die Cyclin-abhängige Kinase 1 (CDK1) die Bindungsaffinität von KDM5B an Promotorregionen pluripotenter Gene vermindert, was zu einer verstärkten Expression dieser Gene führt. Dies hat eine erhöhte CSC-Population zur Folge (126). Eine weitere Theorie, die bei Untersuchungen mit Mäusen bereits bestätigt werden konnte, ist, dass CSCs die Fähigkeit haben, sich für das körpereigene Immunsystem „unsichtbar“ zu machen, und so einem Angriff immunologischer Zellen entgehen können. CSCs mit inhibiertem KDM5B führen zu einer geringeren Tumorprogression (127).

Bueno und Richard analysierten die SUMOylierung von KDM5B und zeigten, dass genannte Modifikation die Anwesenheit von KDM5B an durch das Protein regulierten Zell-Zyklus-assoziierten Zielgenen verringert und dadurch die Expression dieser Gene beeinflusst wird. SUMOylierung von KDM5B verhindert eine Ubiquitinierung des Proteins und dessen daraus resultierenden proteasomalen Abbau, z. B. als Reaktion auf DNA-Schäden (128).

Zhou et al. konnten feststellen, dass KDM5B im Rahmen einer Hypoxie, ein häufiger Zustand in soliden Tumoren, mittels SUMOylierung stabilisiert wird, um die Unterversorgung mit Sauerstoff zu kompensieren. Die Stabilisierung führt zu einer vermehrten Transkription von HIF1 α , einem Hypoxie-induziertem Faktor, der zu Anpassung an die Hypoxie führt. Hypoxie in Tumoren führt zu einer vermehrten Angiogenese, daraus resultierender Proliferation und einer möglichen Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Radiotherapie. Durch die Inhibierung von KDM5B zeigte sich eine verminderte Adaption an die bestehende Hypoxie und somit eine Verhinderung von Angiogenese und Tumorprogression, was eine unterstützende Maßnahme bei Angiogenese-verhindernder Therapien darstellen könnte (129).

2.2.2.3 Interaktionspartner

Interaktionen von KDM5B mit anderen Molekülen sind bekannt. Beispielsweise kommt es zu Verbindungen mit Transkriptionsfaktoren (PAX9, FOXG1 und FOXC2) und Rezeptoren (Östrogenrezeptor alpha (ER α), Androgenrezeptor und Progesteronrezeptor). Diese Verbindungen führen zu einer Inhibierung oder Aktivierung entsprechender Gene (121).

Mögliche Interaktionen von KDM5B und Tumorsuppressoren sind Gegenstand aktueller Forschung (17, 130-132). Zhao und Liu beispielsweise untersuchten den Zusammenhang zwischen der Expression von KDM5B und dem Tumorsuppressor p16 im invasiven duktalen Mammakarzinom und fanden heraus, dass die p16-Expression bei erhöhter KDM5B-Expression erniedrigt war und andersherum (130). Hayami et al. analysierten Einflüsse von KDM5B auf das retinoblastom Protein (pRb) in Bezug auf die RB-E2F-Signalkaskade, und stellten fest, dass eine erhöhte KDM5B-Expression mit einer erhöhten E2F-Expression einhergeht (131). Eine inverse Expressions-Korrelation konnte von Montano et al. zwischen KDM5B und dem Tumorsuppressor HEXIM1 festgestellt werden. Inhibition von KDM5B hatte eine erhöhte Expression des Tumorsuppressors zur Folge (132). Tumorsuppressoren sind wichtige Proteine für eine funktionierende Zellzykluskontrolle und Apoptoseeinleitung. Alterationen können das physiologische Gleichgewicht durcheinanderbringen und maligne Prozesse begünstigen. Eine Beteiligung von KDM5B an diesen Prozessen ist naheliegend.

Scibetta et al. fanden 100 Gene, mit denen KDM5B interagiert, von denen die meisten bei einer Überexpression von KDM5B supprimiert werden. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Metallothioneine (cystinreiche, metallbindene Proteine mit Einfluss auf Zellproliferation und Apoptose) (98), Gene, die an der Regulation der M-Phase des Zellzyklus beteiligt sind und BRCA1, ebenfalls ein Tumorsuppressor. Eine Veränderung der KDM5B-Expression beeinflusst den *G₂/M-Checkpoint* (98). Eine Komplexbildung von KDM5B mit dem Transkriptionsfaktor TFAP2C und dem Onkoprotein Myc, führt zu einem Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus. Bei einer Überexpression der drei genannten Proteine wird die Aktivität des Zell-Zyklus-Inhibitors CDKN1A negativ beeinflusst und es kommt zu einem Voranschreiten der Tumorgenese (133).

Durch die Bindung der PHD1-Domäne von JARID1B an H3K4me0 wird die Bindung der PHD3-Domäne an ein benachbartes H3K4me3 ermöglicht, wodurch es zu einer Demethylierung dieses Lysins kommt. Durch diesen fortlaufenden Prozess erfolgt eine Inaktivierung der benachbarten Genabschnitte (121).

Weitere Bindungspartner im Rahmen einer Genrepression sind Histondeacetylasen (134).

2.2.2.4 DNA-Reparatur

Welche Rolle KDM5B im Bereich der DNA-Reparatur spielt, wurde erst in den letzten Jahren zunehmend intensiver untersucht. Die vermehrte Anwesenheit von KDM5B bei Doppelstrangbrüchen scheint der Annahme zugrunde zu liegen, dass durch KDM5B demethyliertes H3K4 ein Marker zur Rekrutierung von DNA-Reparaturproteinen, wie BRCA1 oder Ku70/80 sei. Besonders nach Schädigung durch Bestrahlung, kann eine Akkumulation von KDM5B an entsprechend geschädigten DNA-Abschnitten festgestellt werden. Bei einer Inhibierung von KDM5B konnte eine erhöhte Rate an DNA-Schäden festgestellt werden, was man sich in therapeutischem Hinblick möglicherweise für eine erhöhte Radiosensitivität zu Nutze machen kann. KDM5B nimmt also eine wichtige Rolle in der Regulation von DNA-Reparaturmechanismen ein (101, 135-137).

KDM5B wird in Poly-ADP-ribolysiertem Zustand (PARylation) an Doppelstrandbrüchen im Bereich der Histon-Variante macroH2A1.1 rekrutiert. Dessen Demethylierung ist ebenfalls wichtig für die Funktionen von BRCA1 und Ku70, die an entsprechenden Reparaturmechanismen beteiligt sind. Der exakte Mechanismus ist jedoch noch unbekannt (109).

2.2.2.5 KDM5B und Brustkrebs

Im Vergleich zu CBX5 wurde zu KDM5B und Brustkrebs bereits deutlich mehr geforscht. Eine erhöhte Expression von KDM5B in Mammakarzinomzellen, u. a. reguliert durch eine HER2-Signalvermittlung, ist bereits seit über 20 Jahren bekannt. Außerdem wird eine erhöhte Expression mit der Proliferation und Invasivität von Mammakarzinomzellen in Zusammenhang gebracht (95, 100, 119, 134).

Epigenetische Regulatoren, wie KDM5B (138), und Transkriptionsfaktoren weisen in Mammakarzinomen häufig Mutationen auf. Yamamoto et al. konnten zeigen, dass heterozygote *KDM5B*-Mutationen in *basal-like cells* zu einer erhöhten Bindungsaffinität gegenüber *luminal genes* führen. KDM5B kann in dem Fall möglicherweise als Onkogen in luminalen Mammakarzinomen (ER⁺-Mammakarzinom) fungieren (111).

Doch auch der Einfluss epigenetischer Regulatoren, der nicht auf genetische Veränderungen zurückzuführen ist, wie beispielsweise DNA-Methylierung und veränderte Histon-Modifikationen (96), die wiederum neoplastische, entdifferenzierende Prozesse

aktivieren (96, 101), spielt zunehmend eine Rolle. Als posttranslativ Modifikator von Histonen hat KDM5 einen entscheidenden Einfluss auf die Chromatinstruktur und somit auf die Genexpression. In Östrogenrezeptor-positivem Mammakarzinom (ER⁺-Mammakarzinom) (70% aller Mammakarzinome) zeigte eine erhöhte Expression und Aktivität von KDM5B bei einer endokrinen Therapie ein verkürztes krankheitsfreies Intervall. Dies wird auf eine verminderte Sensitivität auf eine endokrine Therapie durch Modulation der Östrogenrezeptor-Signalvermittlung bei erhöhtem Vorkommen von KDM5B zurückgeführt. Eine Deletion oder Inhibition von KDM5B verringert den Einfluss auf den epigenetischen Status epithelialer Brustzellen, vermindert die transkriptom Heterogenität und erhöht das Ansprechen auf eine endokrine Therapie. Eine hohe KDM5B-Konzentration wird mit einer Therapieresistenz gegenüber einer endokrinen Therapie und mit einem kürzeren Gesamtüberleben beim ER⁺-Mammakarzinom assoziiert (139).

KDM5B wird außerdem mit der Inhibierung von TGF β ("Transforming Growth Factor β "), ein Zell-Zyklus-Repressor, in Zusammenhang gebracht. *Missense*-Mutationen in *KDM5B* in Mammakarzinomzellen (HCC2157) führen möglicherweise zu einer erhöhten Demethylase-Aktivität des Proteins (111).

Auch in Bezug auf eine auslösende Immunantwort durch KDM5B gibt es bereits einige Ergebnisse: Wu et al. fanden heraus, dass KDM5 zu einer verminderten Aktivität der STING (*stimulator of interferon genes*)-Immunantwort in Krebszellen führt, u. a. auch bei Brustkrebs. STING erkennt veränderte DNA im Zytosol und induziert die Expression von Interferon-assoziierten-Genen. Durch die Demethylierung von H3K4me3 am STING-Genlokus durch KDM5B kommt es zu einer verringerten Expression von STING und zu einer erniedrigten Immunantwort. Eine Inhibition von KDM5 hingegen führt zu einer erhöhten Immunantwort über den STING-Signalweg und zu einer vermehrten Infiltration von B-Lymphozyten in das Tumorgewebe. Diese Ergebnisse können im Rahmen einer targetspezifischen Therapie von KDM5 bezüglich einer Immuntherapie, beispielsweise als Verstärker der Therapie, Anwendung finden. Eine Immuntherapie mit STING-Agonisten wird bereits in klinischen Studien etabliert (140).

Coleman et al. untersuchten die Immunogenität von KDM5B, indem sie Epitope des Proteins identifizierten, die eine T-Zell-Antwort hervorrufen. Im Blut von Brustkrebspatientinnen konnten sie eine erhöhte Konzentration an CD8⁺-T-Zellen,

insbesondere T-Gedächtniszellen, im Vergleich zu Material gesunder Probandinnen, feststellen. Es gelang ihnen mittels T-Zell-spezifischer KDM5B-Peptide sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine erhöhte reaktive T-Zell-Antwort hervorzurufen. Diese Erkenntnisse eröffnen neue Perspektiven auf die Untersuchung der Immunogenität von Mammakarzinomen und ermöglichen neue immuntherapeutische Ansätze (141).

Die Etablierung von KDM5-Inhibitoren als Therapieoption hat bereits begonnen, jedoch bedarf es hier noch weitreichender Forschung (96, 142-148). α -Ketoglutarat und Fe(II) fungieren als Cofaktoren bei der Demethylierung von KDM5B. Dies wird insofern genutzt, dass Moleküle untersucht werden, die diese Cofaktoren imitieren oder binden, und somit die Demethylierung inhibieren (z. B. 2,4-PDCA, GSK-J1, GSK467, 54j, 54k, CPI-455). Ebenso wurden Nukleosidderivate als potenzielle Inhibitoren mit vielversprechendem Ergebnis untersucht (z. B. Decitabin, Entecavir, Abacavir, Penciclovir, and 3-Deazaneplanocin A), die bereits bei anderen Erkrankungen klinische Anwendung finden (149).

Interessanterweise konnten He et al. nach Depletion von KDM5B in Brustkrebszellen, in denen KDM5B stark exprimiert war, eine erhöhte Proliferation der Tumoren feststellen. Zudem zeigte sich bei einem Verlust von KDM5B eine verzögerte Zelldifferenzierung, sowohl bei normalen Zellen wie auch bei Tumorzellen, die dann möglicherweise weniger auf antiproliferative Therapien reagieren (150).

Es konnte ein positiver synergistischer Effekt zwischen den Chemotherapeutika Trastuzumab und Lapatinib und KDM5-Inhibitoren (KDM5-Inh1) im Rahmen der HER2+-Brustkrebstherapie festgestellt werden (151). Durch die Inhibition von KDM5B mittels AS-8351 konnte eine verminderte Aktivierung des AMPK-Signalwegs als Teil des Lipidstoffwechsels festgestellt werden. Dies hatte eine Inhibition der Proliferation und Migration von Brustkrebszellen (MCF-7 und MDA-MB-231) zur Folge (152). Teil der aktuellen Forschungen sind ebenfalls Untersuchungen bezüglich der medikamentösen Therapieresistenz bei einer Überexpression von KDM5B durch Regulation der Replikation von Tumorzellen (153).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien mit Herstellerangabe

Chemikalie	Hersteller
Citronensäure	Carl Roth, Karlsruhe
Dako REAL™ Hämatoxylin	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ethanol 96 %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol 96 %	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn
Ethanol 99%	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn
Ethanol 99,8 %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Eukitt®	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe
Hico-Mic Mikroskopier-Einschlussmittel	Hico, Köln
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Carl Roth, Karlsruhe
Xylol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Xylol	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn

3.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Verwendete Puffer und Lösungen in deren Zusammensetzung

Puffer und Lösung	Zusammensetzung
Ethanol 70%	99,8% Ethanol-Verdünnung mit vollentsalztem Wasser
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	0,2 g KCl 0,2 g KH ₂ PO ₄ wasserfrei 8 g NaCl 0,9 g Na ₂ HPO ₄ wasserfrei pH 7,4 einstellen und auf 1 l mit vollentsalztem Wasser auffüllen
Puffer pH 6	Stammlösung A: 4,2 g Citronensäure 200 ml dest. Wasser Stammlösung B: 29.0 g Natriumcitrat 1000 ml dest. Wasser Gebrauchslösung: 4,5 mL Stammlösung A 20,5 mL Stammlösung B 250 ml dest. Wasser

3.1.3 Kits

Tabelle 3: Verwendeter Kit für IHC mit Anti-CBX5 mit Herstellerangabe

Kit	Hersteller
Dako REAL™ EnVision™ Detection Systems, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse ○ Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV) 100 mL, gebrauchsfertig mit	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA

<p>Peroxidasemolekülen und sekundären Ziegenantikörpermolekülen gegen Kaninchen- und Mausimmunglobuline gekoppeltes Dextran. In gepufferter Lösung mit stabilisierendem Protein und Konservierungsmittel</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Dako REAL™ DAB+ Chromogen 5 mL, 50fach konzentriert 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in organischem Lösungsmittel ○ Dako REAL™ Substrate Buffer 250 mL in gepufferter Lösung mit Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel 	
--	--

Tabelle 4: Verwendeter Kit für IHC mit Anti-KDM5B mit Herstellerangabe

Kit	Hersteller
<p>Dako REAL™ EnVision™ FLEX+, Mouse, High pH (Link)</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Dako EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent: wasserstoffperoxidhaltiger Phosphatpuffer, 15 mmol/L NaN₃ und Detergenz ○ Dako EnVision FLEX/HRP Mit Peroxidasemolekülen und sekundären Ziegenantikörpermolekülen gegen Kaninchen- und Maus-Immunglobuline gekoppeltes Dextran. In gepufferter Lösung mit 	<p>Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA</p>

<p>Stabilisationsprotein und Konservierungsmittel</p> <ul style="list-style-type: none">○ Dako EnVision FLEX DAB+ Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in organischem Lösungsmittel. Farbschwankungen bei diesem Reagenz (kräftig violett bis farblos) haben keinerlei Einfluss auf die Leistung des Kits○ E Dako EnVision FLEX Substrate Buffer Gepufferte Lösung mit Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel.○ Dako EnVision FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) Tris/EDTA-Puffer, pH 9○ Dako EnVision FLEX Wash Buffer (20x) Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20, pH 7.6 (± 0.1)○ Dako EnVision FLEX+, Mouse (LINKER) Gepufferte Lösung mit Stabilisierungsprotein und antimikrobieller Substanz○ Dako EnVision FLEX Antibody Diluent Tris-Puffer, pH 7.2, mit 15 mmol/L NaN_3 und Protein	
---	--

3.1.4 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Primärantikörper, deren Spezies und Anwendung

Antikörper	Spezies	Anwendung
Anti-CBX5, #2616S, LOT: 4; Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	rabbit polyclonal	Immunhistochemie, 1:100
Anti-KDM5B, Clone 15G8.1; REF: MABE150; LOT: '3170177; Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	mouse monoclonal	Immunhistochemie, 1:50

3.1.5 Geräte

Tabelle 6: Verwendete Geräte mit Herstellerangabe

Gerät	Hersteller
Brand accu-jet® pro-Pipettierhelfer	Brand, Wertheim
Dampfgarer MultiGourmet	Braun, Kronberg im Taunus
Feuchtkammer	selbsthergestellt
Gefrierschrank (-20 °C)	Bosch, Gerlingen
Gefrierschrank (-80 °C)	Nalge Nunc Int, Waltham, Massachusetts, USA
Heratherm™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kühlschrank (4 °C)	Bosch, Gerlingen
LabVision Autostainer 480S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Nano-Zoomer 2.0HT	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan
Sicherheitswerkbank Heraeus HeraSafe	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Vortex-Schüttler VF2	IKA-Werke, Staufen im Breisgau

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1.000 µl graduiert TipOne® Pipettenspitze	StarLab, Hamburg
200 µl UltraPoint® graduiert TipOne® Pipettenspitze	StarLab, Hamburg
Deckgläschen 24 x 50 mm	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
Eppendorf Research® plus (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Objekträger SUPERFROST-plus	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Pipette Tip, 0.1-20µl	Sarstedt, Nümbrecht
Sempercure® nitrile Einmalhandschuhe	Semperit, Wien, Österreich

3.1.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verwendete Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe

Gebrauchsmaterial	Hersteller
Fettstift	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Objekträgergestell für Immunhistochemie	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pinzetten	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.8 Gewebeproben (Herkunft)

Die TNBC-Gewebeproben stammen von 36 Patientinnen, die in der Universitätsmedizin im Zeitraum von 2009 bis 2016 mit triple-negativem Mammakarzinom diagnostiziert wurden (Tabelle 9). Das Gewebe wurde jeweils im Rahmen einer Operation zur Tumorentfernung gewonnen. Die Paraffinschnitte der Tumoren, sowie die verwendeten Paraffinschnitte des gesunden Nieren-, Hoden- und Mammagewebes, wurden von der Gewebe-Biobank des pathologischen Instituts der Universitätsmedizin Mainz aufbereitet und zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung gestellt. Die Entnahme

der Gewebeproben erfolgte nach Einverständniserklärung der Patientinnen. Im Rahmen eines *Follow-ups* wurde der Status der Patientinnen evaluiert. Das Ethikvotum wurde entsprechend der Deklaration von Helsinki von der Landesärztekammer Rheinlandpfalz mit der Bearbeitungsnummer 837.287.05 (4945) erteilt. Jede Patientin erteilte schriftlich ihr Einverständnis.

Tabelle 9: TNBC-Kollektiv

	Anzahl Patientinnen (N=36)	in Prozent [%]
Alter bei Erstdiagnose		
≤50	11	30,6
>50	25	69,4
Tumor Größe		
T1	9	25,0
T2	24	66,7
T3	3	8,3
T4	0	0
Tumorgrad		
G1	0	0
G2	6	16,7
G3	30	83,3
Lymphknotenstatus		
N0	24	66,7
N1	8	22,1
N2	2	5,6
N3	2	5,6
Metastasierung		
M0	34	94,4
M1	2	5,6
Entität		
Invasiv-duktral	34	94,4
Invasiv-lobulär	2	5,6
Tumor Typ		

DCIS	17	47,2
LIN	1	2,8
Lokalisation		
rechts unifokal	19	52,8
links unifokal	13	36,1
rechts multizentrisch	1	2,8
links multizentrisch	3	8,3
beidseits	0	0

3.2 Methoden

3.2.1 Immunhistochemische Antigen-detektion an korrespondierenden TNBC-Paraffinschnitten

Als Kontrollgewebe wurden folgende Materialien verwendet:

- Positiv-Kontrolle: Niere (CBX5); Testes (KDM5B) (bestätigte hohe natürliche Expression von CBX5 und KDM5B im Normalgewebe Niere, bzw. Hoden)
- Negativ-Kontrolle:
 - o inhaltlich: gesundes Brustdrüsengewebe (bestätigte sehr geringe Konzentration von CBX5 und KDM5B in Normalgewebe)
 - o technisch: Mammakarzinom ohne Primärantikörper

3.2.1.1 CBX5-Färbung

Zur Vorbereitung einer immunhistochemischen Färbung mussten die entsprechenden Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert werden. Hierfür wurden die Schnitte 3x10 Minuten in Xylol, 2x2 Minuten in 99,8%iges Ethanol, 1x2 Minuten in 96%iges Ethanol, 1x2 Minuten in 70%iges Ethanol (Mischung aus 99,8%iges Ethanol und Aqua dest.) und 1x1 Minute in destilliertes Wasser getaucht. Im Anschluss daran folgte die Demaskierung. Die Struktur der zu untersuchenden Proteine wird durch die Fixierung verändert, weswegen sie durch die Demaskierung in ihre ursprünglichen Raumstrukturen zurückgeführt werden müssen. Hierfür wurden sie in Puffer pH 6 und im Anschluss 30 Minuten in den Dampfgerar gestellt. Nach Ablauf der Zeit folgten eine 30-minütige Abkühlung, das Tauchen in destilliertes Wasser und die Umrandung der Gewebefläche mit einem Fettstift. Als nächstes erfolgte der Peroxidaseblock. Hierfür wurde 3%-iges H₂O₂ in H₂O frisch angesetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur auf die Gewebeprobe aufgebracht.

Die Schnitte wurden anschließend durch H₂O gezogen. Danach wurde der primäre Antikörper gegen das Protein CBX5 mit einer Konzentration von 1:100 auf das Gewebe gegeben und über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C ca. 15 Stunden in der Feuchtkammer belassen.

Am nächsten Tag folgte eine Spülung mit PBS (3x2 Minuten), sodass der Sekundärantikörper (Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV)) aufgetragen werden konnte. Dieser wirkte 30 Minuten ein und die Schnitte wurden nach der Einwirkzeit ebenfalls in 3x2 Minuten in PBS gewaschen.

Im Anschluss wurde Dako REAL™ DAB+ Chromogen (3.3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid) verwendet, das an den Sekundärantikörper, der mit einer Peroxidase gekoppelt ist, bindet und dadurch eine braune Farbreaktion produziert. Dies führte zu einer spezifischen Färbung der CBX5-exprimierenden Kerne. Mit Hilfe einer Gegenfärbung mit Hämalaun (100%), das die nicht spezifisch angefärbten Gewebeteile, v.a. Kerne, gegenfärbt, wurde somit eine Kontrastbildung hergestellt.

Danach wurden die Schnitte wieder mittels Ethanol und Xylol in einer aufsteigenden Reihe entwässert (je 2 Minuten 70%iges Ethanol, 96%iges Ethanol, 2x 99,8%iges Ethanol, 3x Xylol). Nach Abschluss dieses Vorgangs wurden die Schnitte mit Hilfe des Hico-Mic Mikroskopier-Einschlussmittels eingedeckelt.

Für die immunhistochemische Färbung von CBX5 wurde Ethanol und Xylol von AppliChem GmbH, Darmstadt verwendet.

3.2.1.2 KDM5B-Färbung

Die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper Anti-KDM5B erfolgte mit dem LabVision Autostainer 480S von Thermo Scientific. Die Vorbereitung der Schnitte erfolgte nach 30-minütigem Aufenthalt im Heratherm™ (60 °C) mittels Xylol zur Entparaffinierung drei Mal fünf Minuten. Daraufhin wurde die Rehydrierung durch eine absteigende Alkoholreihe (99%-, 96%-, 70%-, 50%iges Ethanol, zwei Mal drei Minuten) und eine abschließende dreiminütige Waschung in destilliertem H₂O, durchgeführt. Der 70%- und 50%ige Ethanol wurde mit Aqua dest. aus 99%igem Ethanol hergestellt. Für das Antigen-Retrieval befanden sich die Schnitte 20 Minuten im Dampfgerar in Dako EnVision FLEX Target Retrieval Solution. Die Schnitte kühlten anschließend unter Gebrauch von fließendem Wasser ab. Im weiteren Verlauf wurden die Objektträger einmal fünf Minuten in einer Küvette mit Dako EnVision FLEX Wash Buffer gewaschen und zusammen mit dem Reagentien-Rack in den Autostainer überführt. Die Verdünnung des Antikörpers

erfolgte in einer Konzentration von 1:50. Die Einwirkzeit betrug 30 Minuten. Die anschließende Einwirkzeit von Dako EnVision FLEX+, Mouse (LINKER) betrug 15 Minuten, des Zweitantikörpers (Dako EnVision FLEX/HRP) 20 Minuten und des Dako EnVision FLEX DAB+ Chromogen zwei Mal fünf Minuten. Das Real Dako Hämatoxylin wurde in einer Verdünnung mit Aqua dest. von 3+1 verwendet und wirkte ebenfalls fünf Minuten ein. Nach einer Gesamtlaufzeit von 2:15 Stunden erfolgte die Bläuung mit Leitungswasser, eine fünfminütige Waschung in destilliertem H₂O, die Dehydrierung der Paraffinschnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe (50%-, 70%-, 96%- und 99%iges Ethanol für jeweils 2 Minuten) und Xylol (3x3 Minuten). Abschließend erfolgte das Eindeckeln der Schnitte mit Eukitt.

Für die immunhistochemische Färbung von KDM5B wurde Ethanol und Xylol von SAV Liquid Production GmbH verwendet.

3.2.2 IRS-Auswertung

Die Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgte mittels IRS (immunreaktiver Score). Hierbei wird mittels Multiplikation des Wertes der Farbintensität mit dem Wert für die Anzahl der positiven Zellen ein Wert errechnet, aus dem sich der IRS ergibt (Tabelle 10, Abbildung 5, Abbildung 6, Abbildung 7, Abbildung 8). Bei der immunhistochemischen Färbung von CBX5 kam es zu einer ausschließlichen Anfärbung der Kerne, sodass nur die angefärbten Kerne ausgewertet wurden (Anhang, Tabelle 38). Bei der Auswertung der mit KDM5B-gefärbten Schnitte fiel auf, dass nicht nur eine Anfärbung der Kerne, sondern auch des Zytosols erfolgte, sodass hier eine separate Auswertung vorgenommen wurde. Die Schnitte wurden separat bezüglich der Expression im Zytosol und im Zellkern ausgewertet, so dass für jeden Schnitt zunächst zwei IRS-Werte vorlagen (IRS Kerne und IRS Zytosol). Für die statistische Auswertung wurde ein kombinierter Wert (IRS Kerne+Zytosol) generiert, indem der jeweils höhere Wert der beiden IRS-Werte ausgewählt wurde (Anhang, Tabelle 39).

Tabelle 10: Immunreaktiver Score

Farbintensität: 0 = keine Reaktion 1 = schwache Reaktion 2 = mäßige Reaktion 3 = starke Reaktion	Positive Zellen: 0 = keine 1 = weniger als 10% 2 = zwischen 10 und 50% 3 = zwischen 51 und 80% 4 = mehr als 80%	IRS: 0-2 = negativ 3-4 = schwach positiv 6-8 = mäßig positiv 9-12 = stark positiv
Farbintensität	x	Positive Zellen
		= IRS

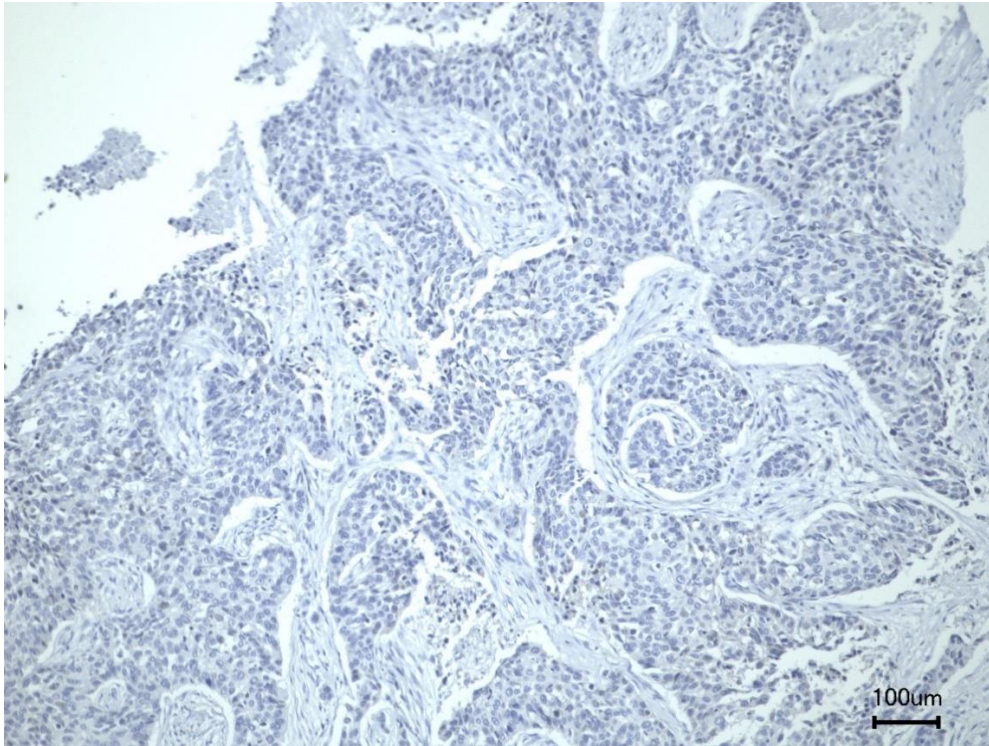


Abbildung 5: Tumorschnitt (TS)-Nr.28 nach immunhistochemischer Färbung.

Nach IHC zeigt sich ein negativer IRS. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 100 μm .

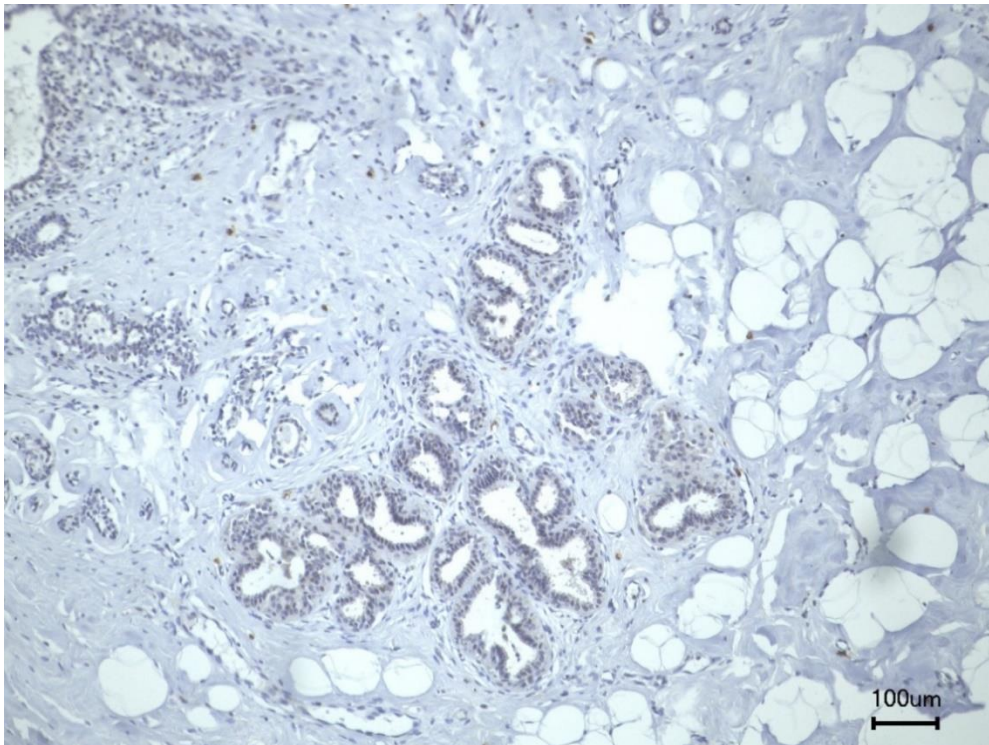


Abbildung 6: TS-Nr.15 nach immunhistochemischer Färbung.

Nach IHC zeigt sich ein schwach positiver IRS. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 100 μm .

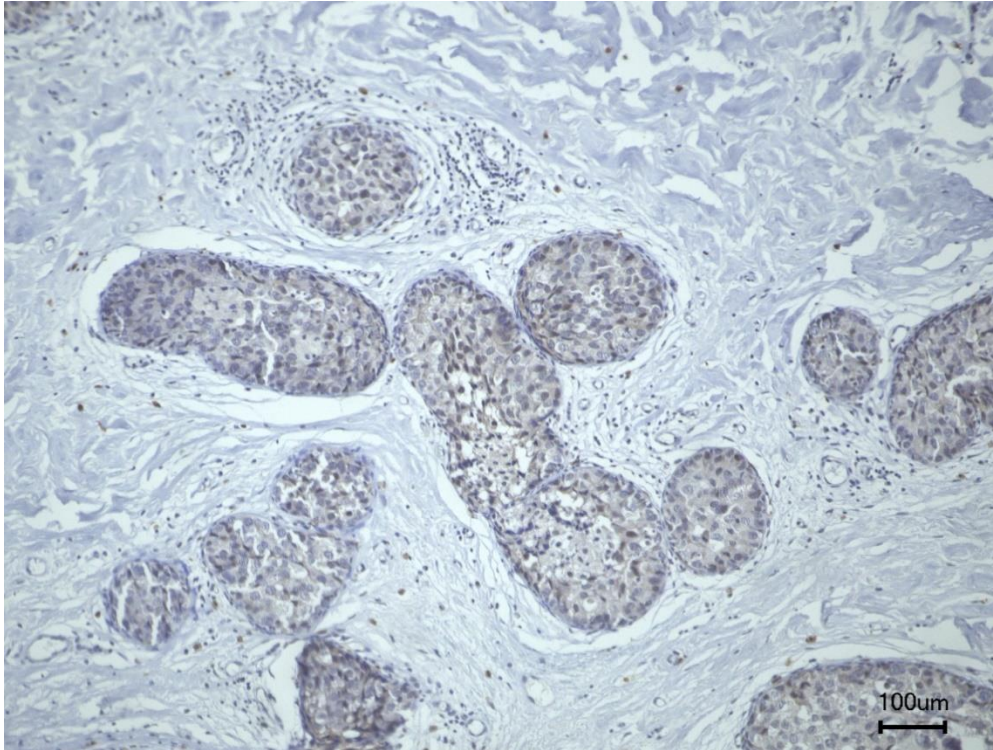


Abbildung 7: TS-Nr. 17 nach immunhistochemischer Färbung.

Nach IHC zeigt sich ein mäßig positiver IRS. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 100 µm.

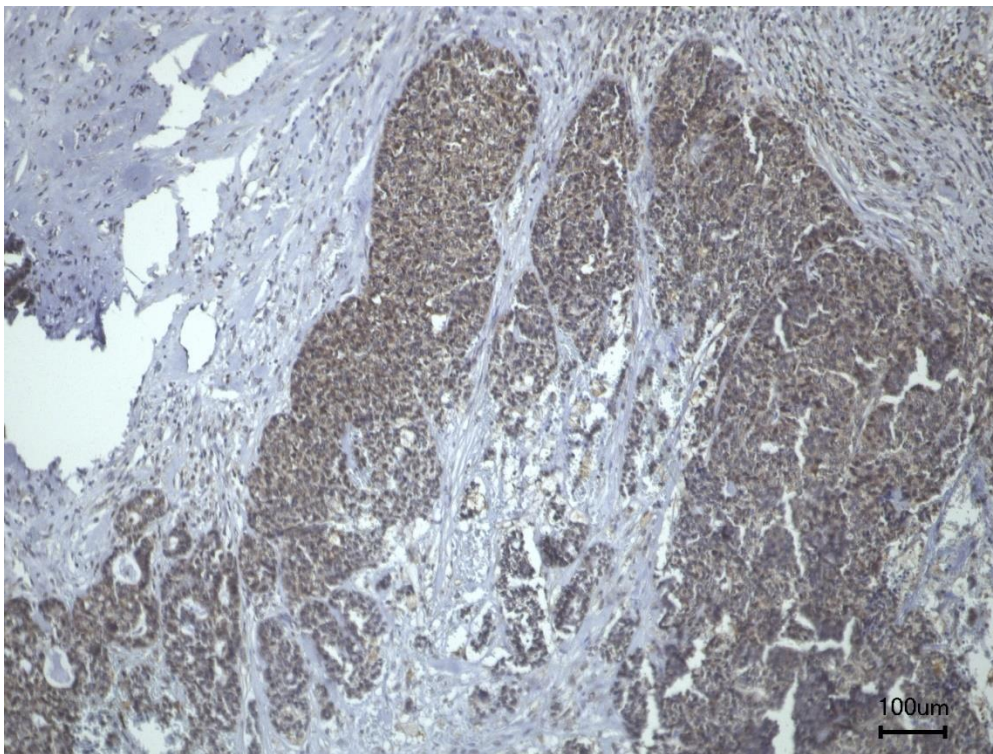


Abbildung 8: TS-Nr. 34 nach immunhistochemischer Färbung.

Nach IHC zeigt sich ein stark positiver IRS. Der Maßstabsbalken entspricht einer Länge von 100 µm.

3.2.3 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm IBM SPSS Statistics 27 verwendet. Es handelt sich um eine explorative Vorgehensweise mit einem Fokus auf deskriptiver Statistik. Das Signifikanzniveau α wurde auf lokal 5% festgesetzt.

Grundlage für die statistische Auswertung sind Daten zu den gefärbten Paraffinschnitten, sowie Tumor- und anonymisierte, patientenbezogene Daten (z. B. Erstdiagnose, TNM-Klassifikation, Todesdatum). Die Daten wurden im Zeitraum von 2009 bis 2021 erhoben u.a. mittels *Follow-up*, durchgeführt durch die Unimedizin Mainz, sowie mithilfe der Patientenakten. Der längste (maximale) Beobachtungszeitraum beträgt 10,95 Jahre, der kürzeste (minimale) Beobachtungszeitraum beträgt 0,48 Jahre. Insgesamt ergibt sich ein mittlerer Beobachtungszeitraum von 5,36 Jahren.

Wegen des niedrigen Skalenniveaus (hauptsächlich binär, nominal und ordinal) konnte nur eine begrenzte Anzahl an statistischen Tests durchgeführt werden. Für die Untersuchung des kumulativen Überlebens fanden Überlebenstabellen mit Kaplan-Meier-Kurve, der Spearman-Korrelations-Test, der Mann-Whitney-U-Test und die Cox-Regression mit Hazard Ratio Anwendung. Für statistische Beobachtungen des Status (lebt/verstorben) und der Expression von CBX5 und KDM5B in Bezug auf Tumorgroße, Lymphknotenbefall, Metastasierung, Grading und Alter, wurden Kreuztabellen mit Chi-Quadrat-Test und Exaktem Test nach Fisher (insbesondere bei binärem Skalenniveau), sowie Spearman-Korrelation-Test, Pearson-Korrelations-Test und Mann-Whitney-U-Test verwendet. Zusätzlich wurde der Zusammenhang zwischen dem Status (lebt/verstorben) und dem Alter, der Tumorgroße, des Lymphknotenstatus, der Metastasierung und dem Grading durchgeführt. Bei geringer Fallzahl und somit geringer Aussagekraft, sowie fehlender Relevanz für das Thema dieser Arbeit, werden die Ergebnisse nicht aufgeführt.

Die statistische Auswertung der Expression von CBX5 und KDM5B wurde einzeln, gruppiert und binär durchgeführt (Tabelle 10). In der einzelnen Betrachtung wurden die einzelnen IRS-Werte (IRS 0-12) dargestellt. In der gruppierten Betrachtung erfolgte die Darstellung sowie die Durchführung und Auswertung der statistischen Tests mit den vier Gruppen „negativ“ (IRS 0-2), „schwach positiv“ (IRS 3-4), „mäßig positiv“ (IRS 6-8) und „stark positiv“ (IRS 9-12). In der binären Betrachtung erfolgte die Darstellung sowie die

Durchführung und Auswertung der statistischen Tests mit den zwei Gruppen „negativ“ (IRS 0-2) und „positiv“ (IRS 3-12).

4 Ergebnisse

4.1 Expression von CBX5 im Tumorgewebe

4.1.1 Expression von CBX5 - einzeln

25% der Schnitte (9 Schnitte) wurden als negativ eingestuft (IRS 0-2). Die restlichen 75% waren positiv (IRS 3-12). Am häufigsten trat ein IRS von 6, mäßig positiv, auf (30,6%). Der niedrigste und der höchstmögliche IRS-Wert, 0 und 12, traten mit einer relativen Häufigkeit von jeweils 5,6% am seltensten auf. Die Werte 5 und 7, sowie 10 und 11 konnten aufgrund der Multiplikation nicht erreicht werden (Tabelle 10, Tabelle 11, Abbildung 9).

Tabelle 11: Übersicht der absoluten und der relativen Häufigkeiten (Prozent) der IRS-Werte von CBX5 (N=36)

IRS-Werte	Häufigkeit CBX5	Prozent [%]
0	2	5,6
1	3	8,3
2	4	11,1
3	3	8,3
4	5	13,9
6	11	30,6
8	3	8,3
9	3	8,3
12	2	5,6
Gesamt	36	100,0

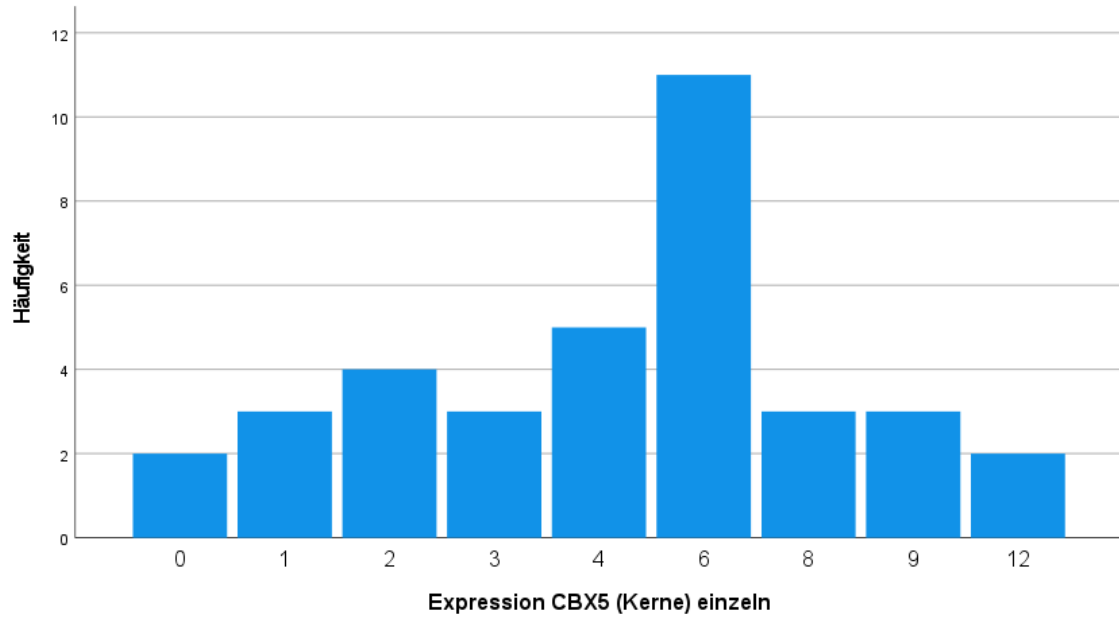


Abbildung 9: Häufigkeitsverteilung der IRS-Einzelwerte für die CBX5-Expression (N=36).

Am häufigsten trat ein IRS von 6 (mäßig positiv) auf. Die Auswertung bezieht sich auf die Färbung der Kerne.

Der Mittelwert der Einzelwerte lag bei 5,03. Der Median betrug 6. Die Werte zeigten annähernd eine Normalverteilung (Abbildung 10).

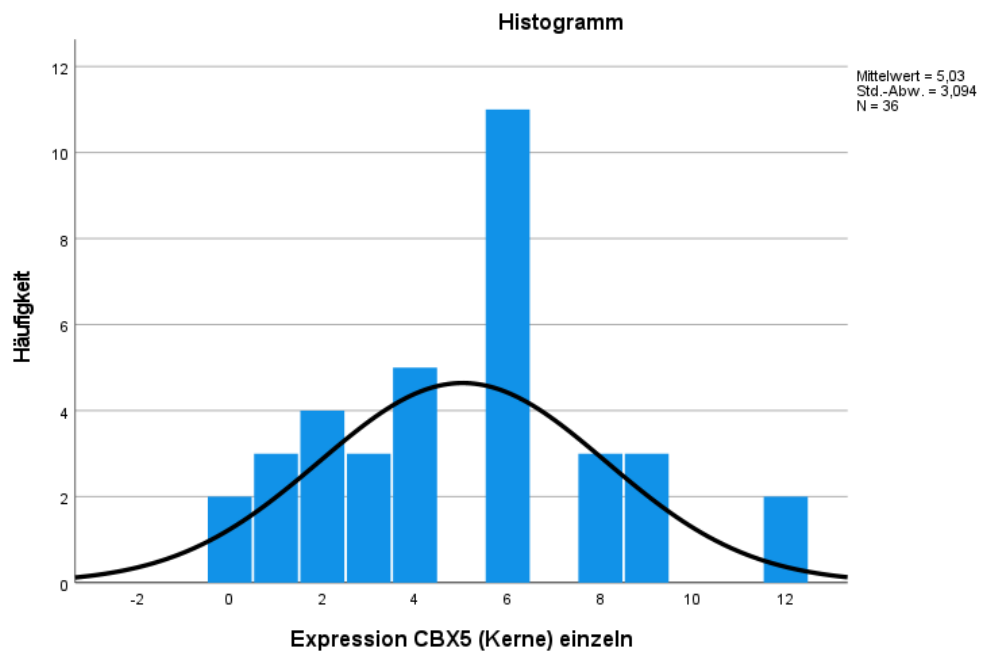


Abbildung 10: Histogramm der IRS-Einzelwerte für CBX5 mit Normalverteilung (N=36).

Übersicht über die Häufigkeitsverteilung der einzelnen IRS-Werte. Die schwarze Linie stellt die theoretische Normalverteilung dar. Die Häufigkeitsverteilung für die IRS-Einzelwerte für CBX5 stellt keine Normalverteilung dar. Die Auswertung bezieht sich auf die Färbung der Kerne.

4.1.2 Expression von CBX5 - gruppiert

Bei der gruppierten Betrachtung des IRS (Tabelle 10) trat am häufigsten eine mäßig positive Färbung auf. 22,2% aller Schnitte zeigten eine schwach positive, 38,9% eine mäßig positive und 13,9% eine stark positive Färbung (Tabelle 12, Abbildung 11).

Tabelle 12: Absolute und relative Häufigkeiten (Prozent) der gruppierten CBX5-Expression (N=36)

IRS	Häufigkeit	Prozent
IRS 0-2 (negativ)	9	25,0
IRS 3-4 (schwach pos.)	8	22,2
IRS 6-8 (mäßig pos.)	14	38,9
IRS 9-12 (stark pos.)	5	13,9
Gesamt	36	100,0

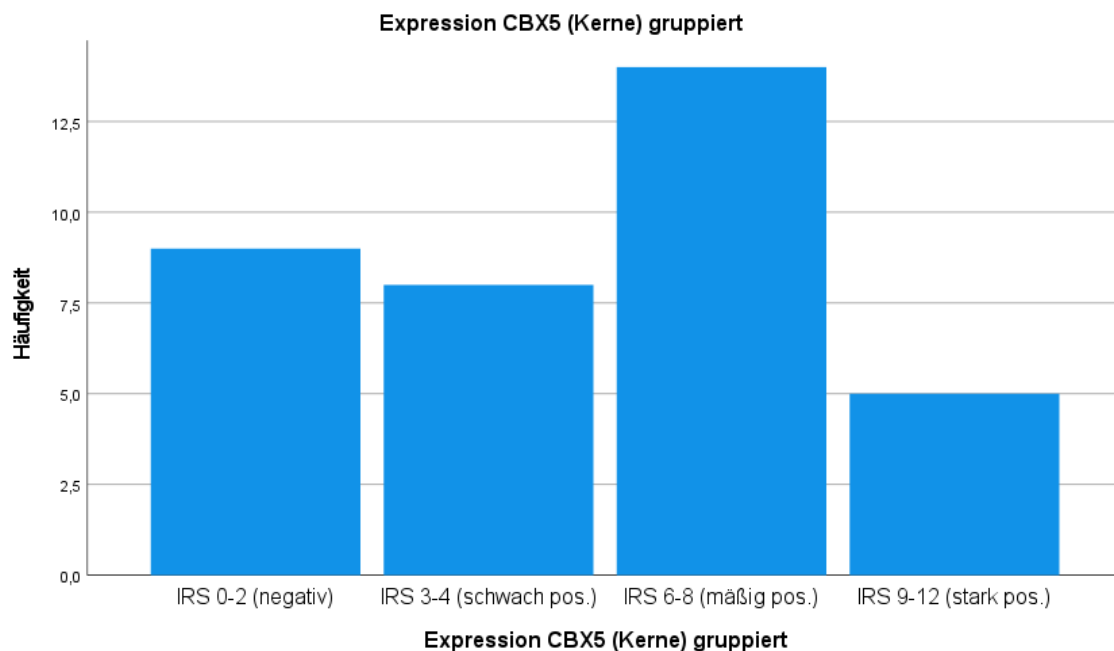


Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung der IRS-Werte für die CBX5-Expression (gruppiert, N=36).

Am häufigsten trat ein IRS von 6-8 auf. Die Auswertung bezieht sich auf die Färbung der Kerne.

4.1.3 Expression von CBX5 - binär

75% der Schnitte waren nach immunhistochemischer Färbung positiv (IRS 3-12) und 25% negativ (IRS 0-2).

4.2 Expression von KDM5B im Tumorgewebe

4.2.1 Expression von KDM5B - einzeln

33,3% der 36 Schnitte wurden als negativ eingestuft (IRS 0-2). Die restlichen 66,7% waren positiv (IRS 3-12). Am häufigsten trat ein IRS von 2 (negativ) auf. Darauf folgte mit 19,4 % ein IRS von 6 (mäßig positiv), gefolgt von einem IRS von 12 (stark positiv) in 16,7% der Fälle. Die anderen IRS-Werte zeigten relative Häufigkeiten zwischen 2,8% und 13,9% (Tabelle 13, Abbildung 12).

Tabelle 13: Absolute und relativen Häufigkeiten (Prozent) der einzelnen IRS-Werte für KDM5B (N=36)

IRS-Werte	Häufigkeit KDM5B	Prozent [%]
0	2	5,6
1	1	2,8
2	9	25,0
3	3	8,3
4	5	13,9
6	7	19,4
8	2	5,6
9	1	2,8
12	6	16,7
Gesamt	36	100,0

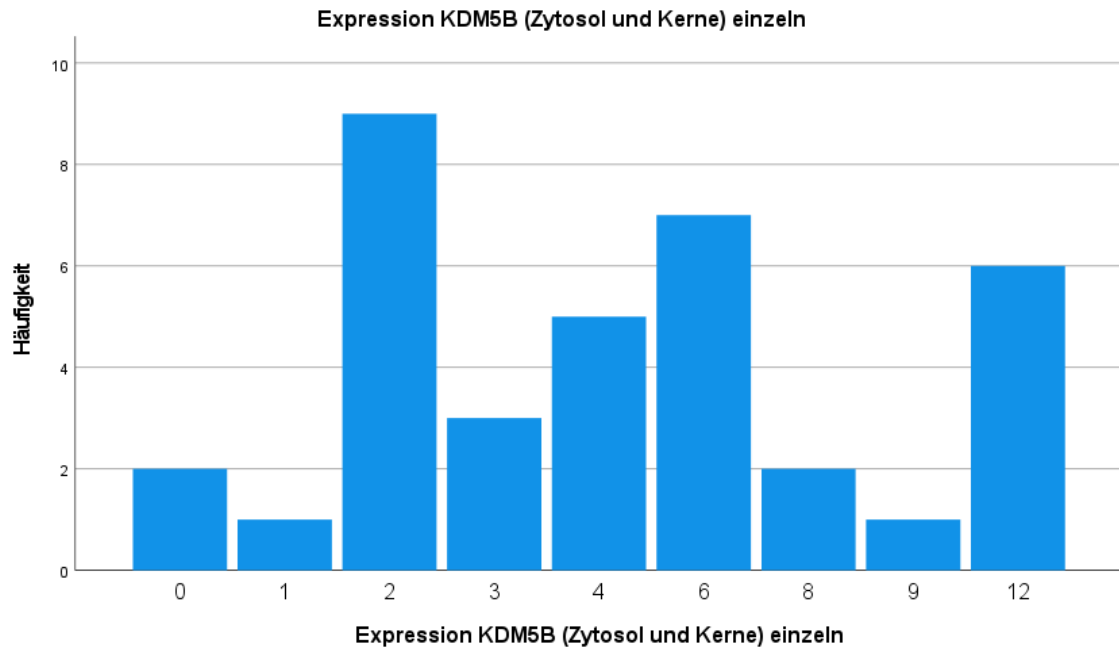


Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung der IRS-Einzelwerte für die Expression von KDM5B.

Am häufigsten trat ein IRS von 2 auf (negativ), gefolgt von einem IRS von 6 (mäßig positiv) und einem IRS von 12 (stark positiv). Die Auswertung bezieht sich auf die kombinierte Färbung des Zytosols und der Kerne.

Der Mittelwert der Einzelwerte liegt bei 5,19, der Median bei 4. Die Werte entsprechen keiner Normalverteilung (Abbildung 13).

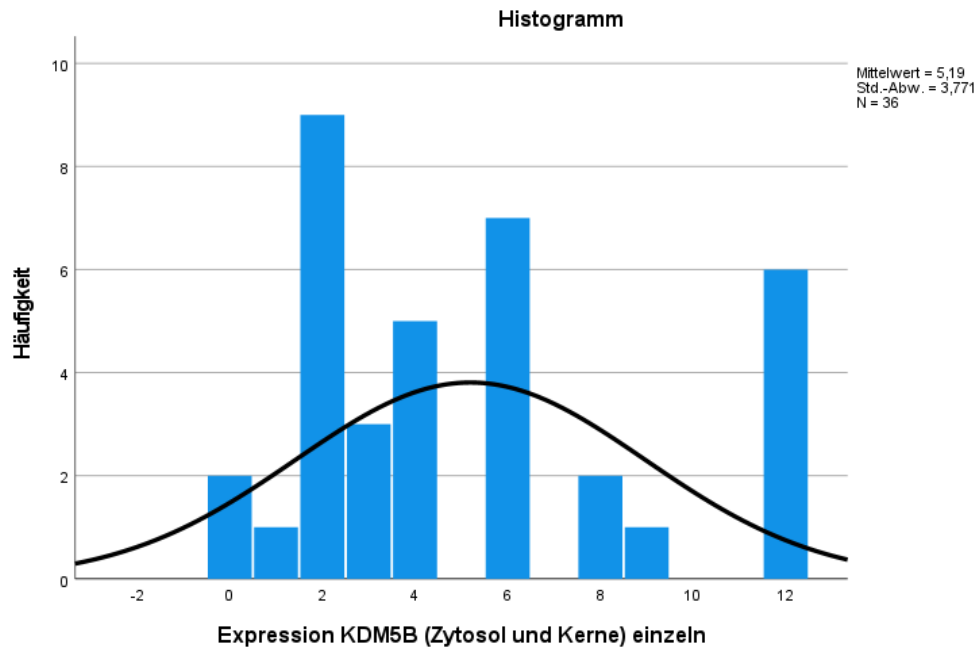


Abbildung 13: Histogramm der IRS-Einzelwerte für KDM5B (N=36).

Übersicht über die Häufigkeitsverteilung der einzelnen IRS-Werte. Am häufigsten trat ein IRS von 2, 6 und 12 auf. Die schwarze Linie stellt die theoretische Normalverteilung dar. Die Häufigkeitsverteilung für die IRS-Einzelwerte für KDM5B stellt keine Normalverteilung dar. Die Auswertung bezieht sich auf die kombinierte Färbung des Zytosols und der Kerne.

4.2.2 Expression von KDM5B - gruppiert

Bei der gruppierten Betrachtung des IRS (Tabelle 10) trat am häufigsten eine negative Färbung auf. 22,2% aller Schnitte zeigten eine schwach positive, 25% eine mäßig positive und 19,4% eine stark positive Färbung (Tabelle 14, Abbildung 14).

Tabelle 14: Übersicht über die gruppierte KDM5B-Expression (N=36)

IRS	Häufigkeit	Prozent [%]
IRS 0-2 (negativ)	12	33,3
IRS 3-4 (schwach pos.)	8	22,2
IRS 6-8 (mäßig pos.)	9	25,0
IRS 9-12 (stark pos.)	7	19,4
Gesamt	36	100,0

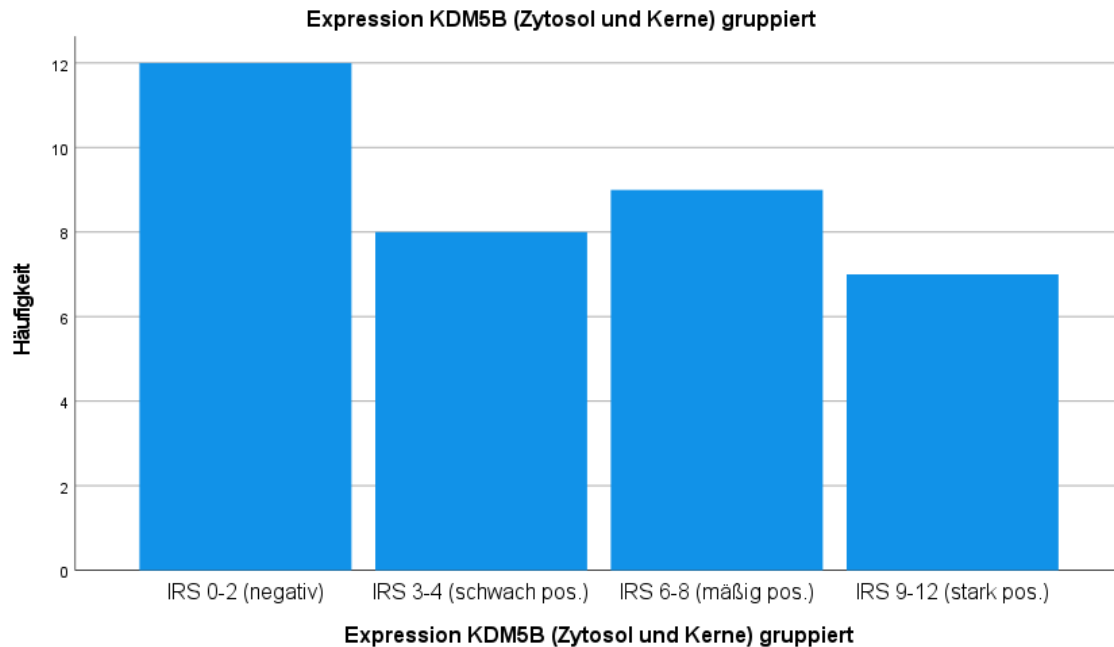


Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der gruppierten IRS-Werte für KDM5B (N=36).

Am häufigsten trat eine negative Färbung (IRS 0-2) auf. Die Auswertung bezieht sich auf die kombinierte Färbung des Zytosols und der Kerne.

4.2.3 Expression von KDM5B - binär

Bei der immunhistochemischen Färbung der 36 Schnitte mit Anti-KDM5B waren 66,7% positiv (IRS 3-12) und 33,3% negativ (IRS 0-2).

4.3 Gleichzeitige Expression von CBX5 und KDM5B im Tumorgewebe

55,6% aller Schnitte waren positiv für beide Merkmale, also positiv sowohl für CBX5 als auch für KDM5B. 44,4% der Schnitte waren nicht positiv für beide Merkmale (Tabelle 15).

Tabelle 15: Relative und absolute Häufigkeiten für das Vorliegen beider Merkmale (nicht positiv/positiv für CBX5 und KDM5B) (N=36)

	Häufigkeit CBX5+KDM5B	Prozent [%]
Nicht positiv für beide Merkmale	16	44,4
Positiv für beide Merkmale	20	55,6
Gesamt	36	100

Es konnte eine positive, statistisch signifikante Korrelation zwischen der Expression von CBX5 und KDM5B sowohl in der Betrachtung der Einzelwerte (Spearman-Korrelationstest: $p=0,036$; Korrelationskoeffizient r^2 : 0,350) als auch der gruppierten Werte (Spearman-Korrelationstest: $p=0,036$; Korrelationskoeffizient r : 0,351) festgestellt werden. Der Korrelationskoeffizient r von 0,350 bzw. 0,351 ergibt einen mittleren Zusammenhang (154). In Tumoren die beide Antigene exprimierten, korrelierte die Stärke der Expression von CBX5 und KDM5B positiv miteinander.

4.4 Expression in Bezug auf das Alter

Die jüngste Patientin der Kohorte erhielt die Erstdiagnose mit 33 Jahren. Die Älteste war 81 Jahre alt. Der Mittelwert des Alters bei Erstdiagnose betrug 58,28 Jahre, der Median 60 Jahre. Die Verteilung entspricht keiner Normalverteilung (Abbildung 15).

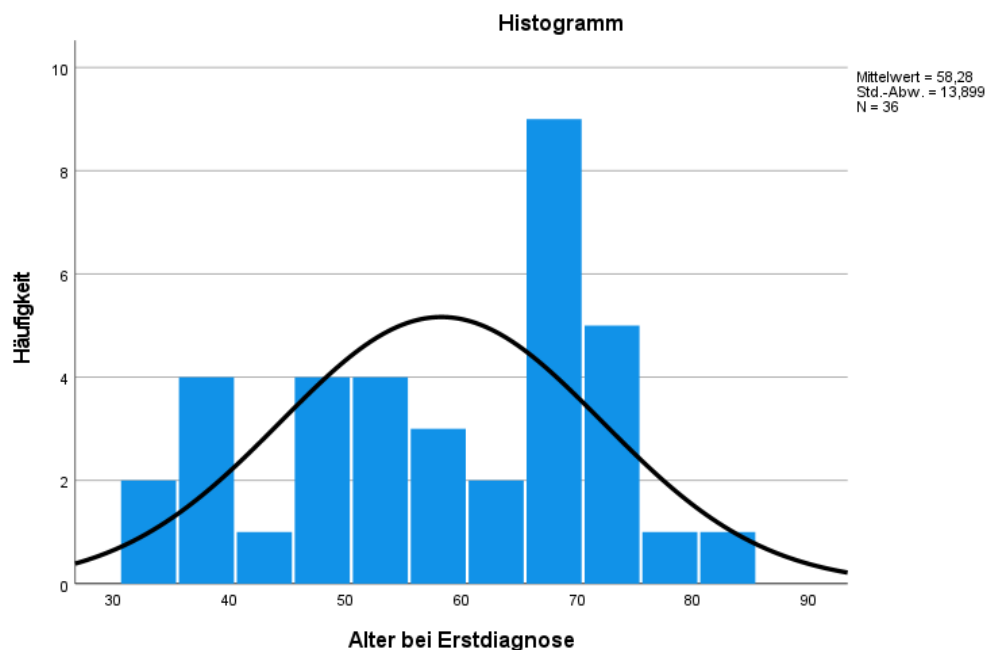


Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung des Alters bei Erstdiagnose mit Normalverteilung.

Die schwarze Linie stellt die theoretische Normalverteilung dar. Die Häufigkeitsverteilung für das Alter bei Erstdiagnose stellt keine Normalverteilung dar.

² Stärke des Zusammenhangs: $0,00 \leq r < (-) 0,10$ = kein Zusammenhang; $(-) 0,10 \leq r < (-) 0,30$ = geringer Zusammenhang; $(-) 0,30 \leq r < (-) 0,50$ = mittlerer Zusammenhang; $(-) 0,50 \leq r < (-) 0,70$ = hoher Zusammenhang; $(-) 0,70 \leq r < (-) 1,00$ = sehr hoher Zusammenhang.

4.4.1 Expression von CBX5 in Bezug auf das Alter

Personen im 25%-Perzentil waren 33-46,75 Jahre alt. In dieser Gruppe traten die meisten Schnitte mit stark positiver Expression von CBX5 auf. Je älter die Patientinnen waren, desto geringer war der Grad der Expression (Tabelle 16). Die negative Korrelation bestätigte diese Beobachtung, war jedoch nicht statistisch signifikant (Pearson-Korrelationstest: $p=0,124$; Korrelationskoeffizient $r: -0,261$). Der Korrelationskoeffizient r von $-0,261$ ergibt einen geringen Zusammenhang (154).

Tabelle 16: Gruppiertes IRS-Wert für CBX5 und Alter in Perzentilen (N=36)

		Perzentile 25 = 33 - 46,75 Jahre	Perzentile 50 = 46,75 - 60 Jahre	Perzentile 75 = 61 - 69 Jahre	Perzentile 100 = > 69 Jahre	Gesamt
Expression CBX5 (Kerne) gruppiert	IRS 0-2 (negativ)	2	2	3	2	9
	IRS 3-4 (schwach pos.)	1	3	2	2	8
	IRS 6-8 (mäßig pos.)	3	3	4	4	14
	IRS 9-12 (stark pos.)	3	1	1	0	5
Gesamt		9	9	10	8	36

4.4.2 Expression von KDM5B in Bezug auf das Alter

Die Anzahl der Schnitte mit einem IRS von 9-12 (stark positiv) war auch hier in der jüngsten Altersgruppe am höchsten (Tabelle 17), jedoch in geringerer Ausprägung als bei der Färbung von CBX5. Die Korrelation (statistisch nicht signifikant) fiel hier geringer aus (Spearman-Korrelationstest: $p=0,514$; Korrelationskoeffizient $r: -0,113$).

Tabelle 17: Gruppiertes IRS-Wert für KDM5B und Alter in Perzentilen (N=36)

		Perzentile 25 = 33 - 46,75 Jahre	Perzentile 50 = 46,75 - 60 Jahre	Perzentile 75 = 61 - 69 Jahre	Perzentile 100 = > 69 Jahre	Gesamt
Expression KDM5B (Zytosol und Kerne) gruppiert	IRS 0-2 (negativ)	4	2	4	2	12
	IRS 3-4 (schwach pos.)	0	4	2	2	8
	IRS 6-8 (mäßig pos.)	2	2	2	3	9
	IRS 9-12 (stark pos.)	3	1	2	1	7
Gesamt		9	9	10	8	36

4.4.3 Gleichzeitige Expression von CBX5 und KDM5B in Bezug auf das Alter

In jeder Altersgruppe gab es ca. gleich viele Schnitte, die positiv für beide Merkmale waren (Tabelle 18). Hier ließ sich keine altersabhängige Tendenz bzw. Korrelation ableiten (Spearman-Korrelationstest: $p=0,617$; Korrelationskoeffizient $r: -0,086$).

Tabelle 18: Binärer IRS-Wert für CBX5 und KDM5B und Alter in Perzentilen (N=36)

		Perzentile 25 = 33 - 46,75 Jahre	Perzentile 50 = 46,75 - 60 Jahre	Perzentile 75 = 61 - 69 Jahre	Perzentile 100 = > 69 Jahre	Gesamt
Expression CBX5 und KDM5B kombiniert binär	Nicht positiv für beide Merkmale	4	3	6	3	16

Ergebnisse

	Positiv für beide Merkmale	5	6	4	5	20
Gesamt		9	9	10	8	36

4.5 Expression in Bezug auf das kumulative Überleben

4.5.1 Expression von CBX5 in Bezug auf das kumulative Überleben

Von 36 Patientinnen verstarben sieben (19,4%) im Beobachtungszeitraum. Das Tumorgewebe aller verstorbenen Patientinnen war CBX5-positiv (Tabelle 19).

Tabelle 19: Übersicht binäre CBX5-Expression mit Ereignis (N=36)

Expression CBX5 (Kerne) binär	Gesamtzahl	Anzahl von Ereignissen (Tod)
Negativ (IRS 0-2)	9	0
Positiv (IRS 3-12)	27	7
Gesamt	36	7

43% der positiven Schnitte, der im Beobachtungszeitraum Verstorbenen, konnten einem IRS von 3-4 (schwach positiv) zugeordnet werden, weitere 43% einem IRS von 6-8 (mäßig positiv), 14% einem IRS von 9-12 (stark positiv) (Tabelle 20).

Tabelle 20: Übersicht gruppierte CBX5-Expression mit Ereignis (N=36)

Expression CBX5 (Kerne) gruppiert	Gesamtzahl	Anzahl von Ereignissen (Tod)
IRS 0-2 (negativ)	9	0
IRS 3-4 (schwach pos.)	8	3
IRS 6-8 (mäßig pos.)	14	3
IRS 9-12 (stark pos.)	5	1
Gesamt	36	7

Für den kumulierten Anteil Überlebender nach 5,6 Jahren ergibt sich ein Kaplan-Meier-Schätzer von 0,710 (71%) aller Patientinnen mit CBX5 positivem Tumorschnitt.

Anhand einer Überlebensfunktion ließ sich für die Expression von CBX5 ein Gesamtüberleben von 92,6% nach zwei Jahren, 80% nach drei Jahren, 75,8% nach vier

Jahren und 71% nach sechs Jahren ableiten. Da in der Gruppe ohne CBX5-Expression niemand verstarb, blieb der Kaplan-Meier-Schätzer konstant bei 1 (Abbildung 16).

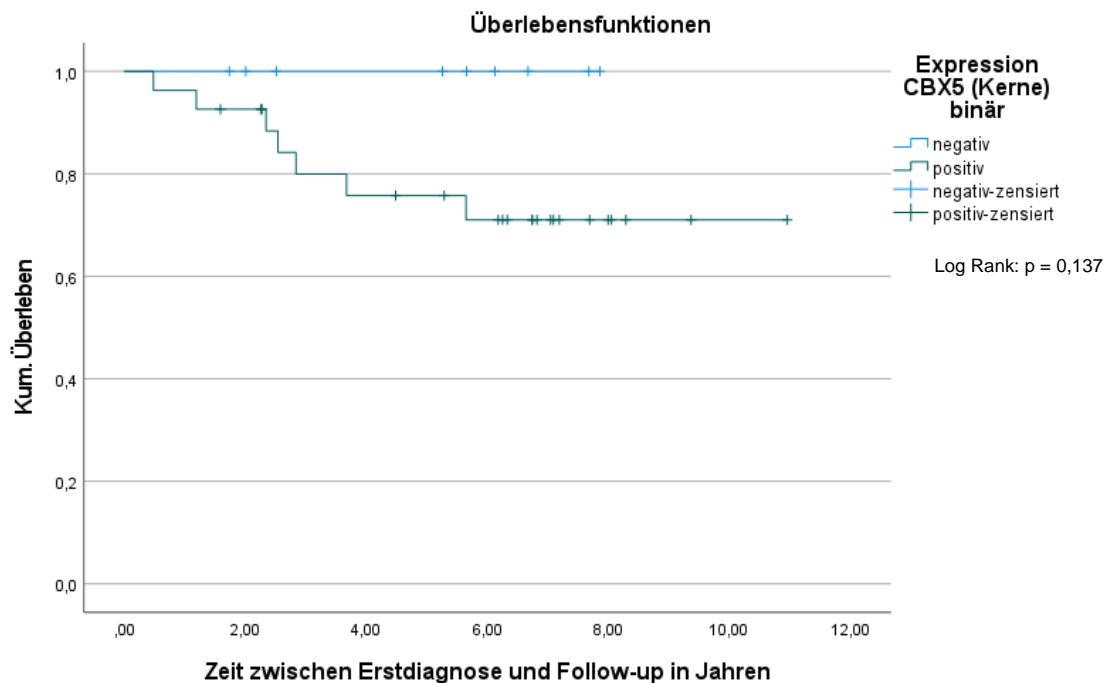


Abbildung 16: Kaplan-Meier-Kurve binäre Expression CBX5 (N=36).

Überlebensfunktion in Hinblick auf das Gesamtüberleben (in Jahren) anhand negativer und positiver Expression von CBX5. Der Log Rank-Test war nicht statistisch signifikant ($p=0,137$).

Der Spearman-Korrelationstest zwischen Status (lebt/verstorben) und der Expression von CBX5 zeigte sich als statistisch nicht signifikant ($p=0,094$). Dennoch zeigte der positive Korrelationskoeffizient von 0,284, dass in der Studienpopulation bei steigendem Grad der Expression mehr Todesfälle beobachtet wurden. Ein Korrelationskoeffizient zwischen 0,1 und 0,3 bedeutet eine geringe Korrelation (154). Für die Expression von CBX5 ließ sich keine Cox-Regression anwenden, da es nur in der Gruppe der Patientinnen mit positiven Schnitten zu Ereignissen (Tod) kam. Der Log Rank-Test war ebenfalls nicht statistisch signifikant ($p=0,137$).

Der Status lebt/verstorben wird als gewöhnliche binäre Variable verwendet. Dies birgt ein Bias-Risiko, dass die beiden Gruppen möglicherweise nicht gleich lange nachbeobachtet wurden. Es werden die medianen Nachbeobachtungszeiten beider Gruppen (positiv/negativ) miteinander verglichen, um zu prüfen, ob die beiden Gruppen im Mittel ähnlich lange nachbeobachtet wurden und daher ähnlich viel Zeit hatten zu versterben

und der Status lebt/verstorben nicht aufgrund unterschiedlich langer Beobachtungszeiten zustande gekommen ist.

Die Patientinnen, deren Schnitte negativ auf CBX5 getestet wurden, hatten eine mediane Nachbeobachtungszeit von 5,65 Jahren. Die Patientinnen, deren Schnitte positiv getestet wurden, hatten eine mediane Nachbeobachtungszeit von 6,25 Jahren. Dies ergibt einen Gesamtmedian von 6,15. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Nachbeobachtungszeiten ($p=0,441$).

4.5.2 Expression von KDM5B in Bezug auf das kumulative Überleben

Bei der Färbung der 36 Schnitte mit Anti-KDM5B waren 67% positiv und 33% negativ. 25% der Patientinnen, deren Tumorschnitt positiv gefärbt war, verstarben über den Beobachtungszeitraum. Bei den negativen Schnitten waren es 8,3% (Tabelle 21).

Tabelle 21: Übersicht binäre KDM5B-Expression mit Ereignis

Expression KDM5B (Zytosol und Kerne) binär	Gesamtzahl	Anzahl von Ereignissen (Tod)
Negativ (IRS 0-2)	12	1
Positiv (IRS 3-12)	24	6
Gesamt	36	7

33% aller positiven Schnitte zeigten eine schwach positive, 38% eine mäßig positive und 29% eine stark positive Färbung. 29% der Schnitte der im Beobachtungszeitraum Verstorbenen konnten einem IRS von 3-4 (schwach positiv) zugeordnet werden, weitere 29% einem IRS von 6-8 (mäßig positiv), und ebenso 29% einem IRS von 9-12 (stark positiv). 14% der Verstorbenen hatten einen negativen Schnitt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Übersicht gruppierte KDM5B-Expression mit Ereignis (N=36)

Expression KDM5B (Zytosol und Kerne) gruppiert	Gesamtzahl	Anzahl von Ereignissen (Tod)
IRS 0-2 (negativ)	12	1
IRS 3-4 (schwach pos.)	8	2
IRS 6-8 (mäßig pos.)	9	2
IRS 9-12 (stark pos.)	7	2
Gesamt	36	7

Ergebnisse

Von 36 Patientinnen verstarben sieben (19,4%) im Beobachtungszeitraum. Sechs von diesen sieben Patientinnen (86%) hatten auf Anti-KDM5B positiv gefärbte Tumorschnitte. Wie bereits o.g. verstarben demnach 25% der Patientinnen, deren Tumorschnitt positiv gefärbt war (Tabelle 22).

Anhand einer Überlebenszeitanalyse lässt sich für die Expression von KDM5B ein Kaplan-Meier-Schätzer von 95,8% nach zwei Jahren, 80,7% nach drei Jahren, ca. 75,7% nach vier Jahren und 70,3% nach sechs Jahren ableiten. In der Gruppe mit negativer Expression von KDM5B betrug der Kaplan-Meier-Schätzer 91,7% nach einem halben Jahr. Da keine weiteren Personen aus dieser Gruppe verstarben, bleibt die Überlebensfunktion und damit der Kaplan-Meier-Schätzer über ihren weiteren Verlauf konstant (Abbildung 17).

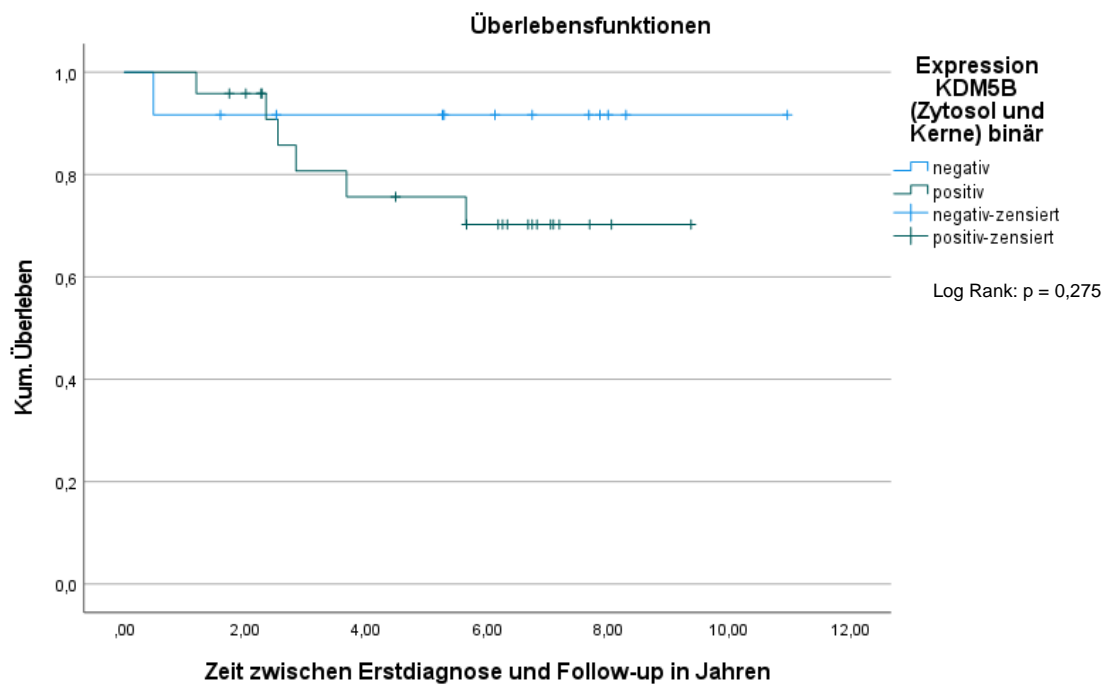


Abbildung 17: Kaplan-Meier-Kurve binäre Expression KDM5B (N=36).

Überlebensfunktion in Hinblick auf das Gesamtüberleben (in Jahren) anhand negativer und positiver Expression von KDM5B. Der Log Rank-Test war nicht statistisch signifikant ($p=0,275$).

Der Spearman-Korrelationskoeffizient zwischen dem Status (lebt/verstorben) und dem Grad der Expression von KDM5B war nicht signifikant (Korrelationskoeffizient $r: 0,199$, $p=0,246$). In der Literatur wird ein Korrelationskoeffizient von $0,199$ als geringe Korrelation eingeordnet (154). Der Log Rank-Test zeigte ebenfalls keine statistische Signifikanz ($p=0,275$). Bei Anwendung einer Cox-Regression ergab sich ein Hazard Ratio von $0,326$,

welches ebenfalls nicht signifikant war ($p=0,300$) (Tabelle 23). Daraus lässt sich ableiten, dass Patientinnen, deren Tumoren KDM5B nicht exprimierten, ein bis zu 33% geringeres Risiko hatten, zu versterben.

Tabelle 23: Cox-Regression mit Hazard Ratio Expression KDM5B

	p	Hazard Ratio	95,0% Konfidenzintervall für Hazard Ratio	
			Untere	Obere
Expression KDM5B (Zytosol und Kerne) binär	0,300	0,326	0,039	2,712

Die Patientinnen, deren Schnitte negativ auf KDM5B getestet wurden, haben eine mediane Nachbeobachtungszeit von 6,43 Jahren. Die Patientinnen, deren Schnitte positiv getestet wurden, hatten eine mediane Nachbeobachtungszeit von 5,92 Jahren. Dies ergibt einen Gesamtmedian von 6,15. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Nachbeobachtungszeiten ($p=0,724$).

4.5.3 Gleichzeitige Expression von CBX5 und KDM5B in Bezug auf das kumulative Überleben

Bei der Färbung der 36 Schnitte mit Anti-CBX5 und Anti-KDM5B waren 56% positiv für beide Merkmale und 44% negativ für beide Merkmale. 86% der Verstorbenen waren positiv für beide Merkmale. 30% der Patientinnen, deren Tumorschnitt positiv gefärbt war, verstarben über den Beobachtungszeitraum. Bei den negativen Schnitten waren es 8,3% (Tabelle 24).

Tabelle 24: Übersicht binäre CBX5- + KDM5B-Expression mit Ereignis (N=36)

Expression CBX5 und KDM5B binär	Gesamtzahl	Anzahl von Ereignissen (Tod)
Nicht positiv für beide Merkmale	16	1
Positiv für beide Merkmale	20	6
Gesamt	36	7

Von 36 Patientinnen verstarben sieben (19,4%) im Beobachtungszeitraum. Sechs von diesen sieben Patientinnen (86%) hatten für beide Merkmale positiv gefärbte

Tumorschnitte. Wie bereits o.g. verstarben demnach 25% der Patientinnen, deren Tumorschnitt positiv gefärbt war (Tabelle 24). Der Kaplan-Meier-Schätzer betrug nach 5,6 Jahren 0,666 (69%) für Patientinnen mit auf beide Merkmale positivem Tumorschnitt. Anhand einer Überlebensfunktion lässt sich für die Expression beider Merkmale ein Gesamtüberleben von 95% nach zwei Jahren, 78,2% nach drei Jahren, 72,6% nach vier Jahren und 66,6% nach sechs Jahren ableiten (Abbildung 18).

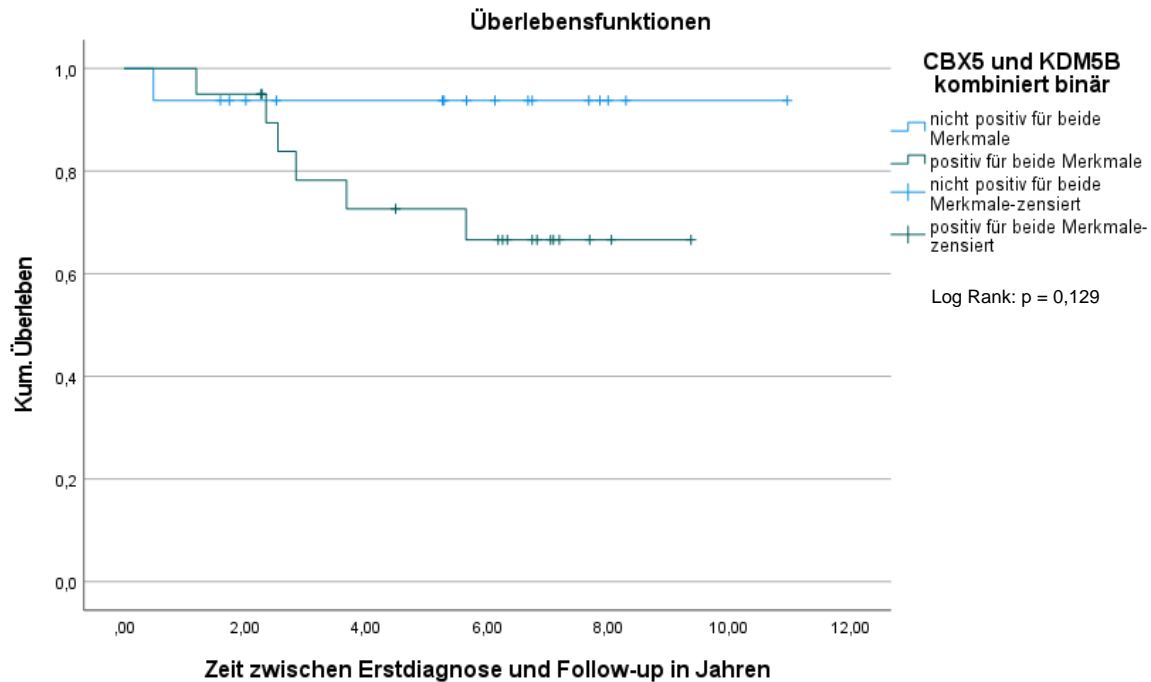


Abbildung 18: Kaplan-Meier-Kurve binäre Expression CBX5 + KDM5B (N=36).

Überlebensfunktion in Hinblick auf das Gesamtüberleben (in Jahren) anhand negativer und positiver Expression beider Merkmale (CBX5 + KDM5B). Der Log Rank-Test war nicht statistisch signifikant ($p=0,129$).

Der Exakte Test nach Fisher, zwischen dem Status (lebt/verstorben) und dem gleichzeitigen Vorliegen der Expression von KDM5B und CBX5, war nicht signifikant ($p = 0,104$). Der Log Rank-Test zeigte keine statistische Signifikanz ($p=0,129$).

Bei Anwendung einer Cox-Regression ergab sich ein Hazard Ratio von 0,224, welches nicht signifikant war ($p=0,166$) (Tabelle 25). Daraus lässt sich ableiten, dass Patientinnen, deren Tumoren weder CBX5 noch KDM5B exprimierten, ein bis zu 22,4% geringeres Risiko hatten, zu versterben.

Tabelle 25: Cox-Regression mit Hazard Ratio Expression CBX5 + KDM5B

			95,0% Konfidenzintervall für Hazard Ratio	
	p	Hazard Ratio	Untere	Obere
Expression CBX5 und KDM5B kombiniert binär	0,166	0,224	0,027	1,860

Die Patientinnen, deren Schnitte nicht positiv auf CBX5 und KDM5B getestet wurden, haben eine mediane Nachbeobachtungszeit von 5,89 Jahren. Die Patientinnen, deren Schnitte positiv auf beide Merkmale getestet wurden, hatten eine mediane Nachbeobachtungszeit von 6,21 Jahren. Dies ergibt einen Gesamtmedian von 6,15. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Nachbeobachtungszeiten ($p=0,737$).

4.6 Expression in Bezug auf die Tumorgroße

Die Verteilung der Tumorklassifikation³ (155) stellte sich wie folgt dar: 2,8% wiesen ein T1b-Stadium auf. 22,2% ein T1c-Stadium. 66,7% ein T2-Stadium, sowie 8,3% ein T3-Stadium. T1a und T4 waren nicht vorhanden.

4.6.1 Expression von CBX5 in Bezug auf die Tumorgroße

Der Anteil an Schnitten mit einem IRS von 6-12 und Tumorstadium T2 oder T3 an allen Schnitten lag bei 41,7%. Der Anteil an Schnitten mit einem IRS von 6-12 und Tumorstadium T2 oder T3 an allen positiven Schnitten lag bei 55,6%. Zuzüglich der Gruppe IRS 3-4 waren es 81,5% aller positiven Schnitte und 61,1% aller Schnitte mit Tumorstadium T2 und T3. 44,4 % der negativen Schnitte wurden dem Stadium T1b oder T1c zugeordnet. Kein positiver Schnitt wies das niedrigste Stadium, Stadium T1b, auf (Tabelle 26). Der Spearman-Korrelationskoeffizient war positiv, wenn auch nicht signifikant (Korrelationskoeffizient $r: 0,188$, $p=0,219$).

³ T1a = > 0,1 - 0,5 cm; T1b = > 0,5 - 1 cm; T1c = > 1 - 2 cm; T2 = 2 - 5 cm; T3 = > 5 cm; T4 = Brustwand/Hautinfiltration.

Tabelle 26: Expression CBX5 und TumorgroÙe (N=36)

		T1b	T1c	T2	T3	Gesamt
Expression CBX5 (Kerne) gruppiert	IRS 0-2 (negativ)	1	3	4	1	9
	IRS 3-4 (schwach pos.)	0	1	6	1	8
	IRS 6-8 (mÙig pos.)	0	4	10	0	14
	IRS 9-12 (stark pos.)	0	0	4	1	5
Gesamt		1	8	24	3	36

4.6.2 Expression von KDM5B in Bezug auf die TumorgroÙe

Der Anteil an Schnitten mit einem IRS von 6-12 und Tumorstadium T2 oder T3 an allen Schnitten lag bei 33%. Der Anteil an Schnitten mit einem IRS von 6-12 und Tumorstadium T2 oder T3 an allen positiven Schnitten lag bei 50%. 25% aller Schnitte und 20,8% aller positiven Schnitte wiesen ein Tumorstadium von T1c oder geringer auf (Tabelle 27). Es bestand eine geringe Korrelation. Dies implizierte auch die errechnete Korrelation im Spearman-Test (Korrelationskoeffizient $r: 0,212$), auch wenn auch diese ebenfalls nicht statistisch signifikant war ($p=0,214$).

Tabelle 27: Expression KDM5B und TumorgroÙe (N=36)

		T1b	T1c	T2	T3	Gesamt
Expression KDM5B (Zytosol und Kerne) gruppiert	IRS 0-2 (negativ)	1	3	8	0	12
	IRS 3-4 (schwach pos.)	0	1	7	0	8

Ergebnisse

IRS 6-8 (mäßig pos.)	0	2	6	1	9
IRS 9-12 (stark pos.)	0	2	3	2	7
Gesamt	1	8	24	3	36

4.6.3 Gleichzeitige Expression von CBX5 und KDM5B in Bezug auf die Tumorgröße
 44,4% aller Schnitte, die positiv für beide Merkmale waren, wiesen eine Tumorklassifikation von T2 und höher auf. 30,5% der gleichen Tumorklassifikationen waren nicht positiv für beide Merkmale. Der einzige Schnitt, der im Kollektiv der niedrigsten Kategorie T1b zugeordnet war, war nicht positiv für beide Merkmale. Für eine Aussage über eine mögliche Korrelation handelt es sich um eine zu geringe Fallzahl. Abzuleiten ist jedoch, dass mehr Tumoren höheren Kategorien (T2, T3) zugeordnet werden konnten, die positiv für beide Merkmale waren (Tabelle 28). Der Spearman-Korrelationstest ergab keine bzw. eine geringe Korrelation (Korrelationskoeffizient r : 0,149) bei fehlender statistischer Signifikanz ($p=0,387$).

Tabelle 28: Gleichzeitige Expression von CBX5 + KDM5B und Tumorgröße (N=36)

		T1b	T1c	T2	T3	Gesamt
CBX5 und KDM5B kombiniert und binär	Nicht positiv für beide Merkmale	1	4	10	1	16
	Positiv für beide Merkmale	0	4	14	2	20
Gesamt		1	8	24	3	36

4.7 Expression in Bezug auf den Lymphknotenstatus

Die meisten Patientinnen (66,7%) hatten keine Lymphknotenbeteiligung (=pN0). Ein Fall von 36 wies Mikrometastasen auf. 19,4% der Fälle befanden sich im Nodusstadium pN1a. Die Nodusstadien pN2a gab es in zwei Fällen. Die Nodusstadien N3a und N3b traten jeweils einmal auf.

4.7.1 Expression von CBX5 in Bezug auf den Lymphknotenstatus

Der Tumor des Schnittes mit Mikrometastasen zeigte eine mäßig positive Expression von CBX5. Von den Fällen im Nodusstadium pN1a waren 71,4% der Primärtumoren positiv auf CBX5, davon 57% mit einem IRS > 6. Die Schnitte der Nodusstadien pN2a waren einmal negativ und einmal schwach positiv für CBX5. Der zum Nodusstadium N3a zugehörige Tumor war stark positiv auf CBX5, der zu N3b mäßig positiv. Die Verteilung bei pN0 ist ausgeglichen: 50% waren negativ, oder schwach positiv, die andere Hälfte war mäßig positiv, oder stark positiv. Der Spearman-Korrelationskoeffizient war nicht signifikant und sehr gering (Korrelationskoeffizient r: 0,065, p=0,707) (Tabelle 29).

Tabelle 29: Expression CBX5 und Klassifikation Nodus (N=36)

	pN0	pN1mi	pN1a	pN2a	N3a	N3b	Gesamt
Expression IRS 0-2 CBX5 (negativ) (Kerne) gruppiert	6	0	2	1	0	0	9
IRS 3-4 (schwach pos.)	6	0	1	1	0	0	8
IRS 6-8 (mäßig pos.)	9	1	3	0	0	1	14
IRS 9-12 (stark pos.)	3	0	1	0	1	0	5
Gesamt	24	1	7	2	1	1	36

4.7.2 Expression von KDM5B in Bezug auf den Lymphknotenstatus

54,2% der Fälle mit Stadium pN0 hatten eine negative oder schwach positive Expression von KDM5B. Eine Expression von mäßig oder stark positiv zeigten nur 45,8% aller pN0-Fälle. Der Tumor des Schnittes, dessen Fall eine Mikrometastase bildete, zeigte eine schwach positive Expression von KDM5B. Unter den Schnitten der Patientinnen mit Stadium pN1a, gab es zwei Negative, zwei schwach Positive, zwei mäßig Positive und einen stark Positiven. Es konnte (im Spearman-Korrelationstest) keine Korrelation festgestellt werden (Korrelationskoeffizient r: 0,049, p=0,776) (Tabelle 30).

Tabelle 30: Expression von KDM5B und Klassifikation des Nodus (N=36)

	pN0	pN1mi	pN1a	pN2a	N3a	N3b	Gesamt
Expression IRS 0-2 KDM5B (negativ) (Zytosol und Kerne) gruppiert	9	0	2	1	0	0	12
IRS 3-4 (schwach pos.)	4	1	2	0	0	1	8
IRS 6-8 (mäßig pos.)	6	0	2	1	0	0	9
IRS 9-12 (stark pos.)	5	0	1	0	1	0	7
Gesamt	24	1	7	2	1	1	36

4.7.3 Gleichzeitige Expression von CBX5 und KDM5B in Bezug auf den Lymphknotenstatus

58,3% der Fälle mit pN0-Stadium waren positiv für beide Merkmale. 41,7% waren nicht positiv für beide Merkmale. Die Primärtumoren der beiden Stadien N3a und N3b waren beide positiv für beide Merkmale. Eine Korrelation (im Spearman-Korrelationstest) war nicht vorhanden (Korrelationskoeffizient $r: -0,077$, $p=0,654$) (Tabelle 31).

Tabelle 31: gleichzeitige Expression CBX5 und KDM5B und Klassifikation Nodus (N=36)

	pN0	pN1mi	pN1a	pN2a	N3a	N3b	Gesamt
CBX5 und nicht KDM5B positiv für kombiniert beide binär Merkmale	10	0	4	2	0	0	16
positiv für beide Merkmale	14	1	3	0	1	1	20
Gesamt	24	1	7	2	1	1	36

4.8 Expression in Bezug auf die Metastasierung

In dem untersuchten Kollektiv von 36 Patientinnen traten insgesamt zwei Fälle mit Fernmetastasierung auf (5,6%). Eine Fernmetastase manifestierte sich im ZNS, die andere pulmonal.

4.8.1 Expression von CBX5 in Bezug auf die Metastasierung

Die Tumorschnitte der Patientinnen, die Fernmetastasen entwickelten, wiesen beide einen IRS von 6-8 auf, zeigten also eine mäßig starke Expression von CBX5 (Tabelle 32). Der Korrelationskoeffizient war nicht signifikant (Spearman-Korrelationstest: $p=0,393$; Korrelationskoeffizient $r: 0,147$).

Tabelle 32: Expression von CBX5 und Vorliegen von Fernmetastasen (N=36)

		Fernmetastasen		Gesamt
		nein	ja	
Expression CBX5 (Kerne) gruppiert	IRS 0-2 (negativ)	9	0	9
	IRS 3-4 (schwach pos.)	8	0	8
	IRS 6-8 (mäßig pos.)	12	2	14
	IRS 9-12 (stark pos.)	5	0	5
Gesamt		34	2	36

4.8.2 Expression von KDM5B in Bezug auf die Metastasierung

Die beiden Fälle, die Fernmetastasen entwickelten, hatten Primärtumoren mit einer schwachen Expression von KDM5B (IRS 3-4) (Tabelle 33). Der Spearman-Korrelationstest zeigte keine statistische Signifikanz und keine Korrelation (Korrelationskoeffizient $r: -0,048$, $p=0,779$).

Tabelle 33: Expression von KDM5B und Vorliegen von Fernmetastasen (N=36)

		Fernmetastasen		Gesamt
		nein	ja	
Expression KDM5B (Zytosol)	IRS 0-2 (negativ)	12	0	12

Ergebnisse

und Kerne) gruppiert			
IRS 3-4 (schwach pos.)	6	2	8
IRS 6-8 (mäßig pos.)	9	0	9
IRS 9-12 (stark pos.)	7	0	7
Gesamt	34	2	36

4.8.3 Gleichzeitige Expression von CBX5 und KDM5B in Bezug auf die Metastasierung
Beide Fälle mit Metastasierung waren positiv für beide Merkmale

Tabelle 34). Es bestand keine statistische Signifikanz eines Zusammenhangs zwischen gleichzeitiger Expression und dem Vorliegen von Fernmetastasen im Exakten Tests nach Fisher ($p = 0,492$).

Tabelle 34: Expression von CBX5 und KDM5B und Vorliegen von Fernmetastasen (N=36)

		Fernmetastasen		Gesamt
		nein	ja	
CBX5 und KDM5B kombiniert binär	nicht positiv für beide Merkmale	16	0	16
	positiv für beide Merkmale	18	2	20
Gesamt		34	2	36

4.9 Expression in Bezug auf das Grading

Sechs von 36 Patientinnen (16,7%) wiesen ein Grading von G2 auf. 83,3% ein G3-Stadium. Somit handelte es sich in den meisten Fällen um schlecht differenzierte Tumorzellen.

4.9.1 Expression von CBX5 in Bezug auf das Grading

Die meisten Schnitte mit G2 Stadium waren einem IRS von 6-8 (50%) zuzuordnen, entsprechend einer mäßig starken Expression von CBX5. Ähnlich verhielt es sich mit Schnitten mit dem Stadium G3: am häufigsten trat eine mäßig starke Expression auf

(36,7%) (Tabelle 35). Es konnte keine Korrelation festgestellt werden (Spearman-Korrelationskoeffizient $r: -0,049$, $p=0,777$).

Tabelle 35: Expression CBX5 und Grading (N=36)

		Grading		Gesamt
		G2	G3	
Expression CBX5 (Kerne) gruppiert	IRS 0-2 (negativ)	2	7	9
	IRS 3-4 (schwach pos.)	0	8	8
	IRS 6-8 (mäßig pos.)	3	11	14
	IRS 9-12 (stark pos.)	1	4	5
Gesamt		6	30	36

4.9.2 Expression von KDM5B in Bezug auf das Grading

50% der Schnitte mit G2-Grading exprimierten KDM5B nicht. 33,3% exprimierten KDM5B mäßig (IRS 6-8) und 16,7% stark (IRS 9-12). Schnitte im G3-Stadium waren am häufigsten negativ auf Anti-KDM5B (30%). 26,7% zeigten eine schwach, 23,3% eine mäßig und 20% eine stark positive Expression von KDM5B (Tabelle 36). Es bestand keine statistisch signifikante Korrelation im Spearman-Test (Korrelationskoeffizient $r: 0,063$; $p=0,714$).

Tabelle 36: Expression KDM5B und Grading (N=36)

		Grading		Gesamt
		G2	G3	
Expression KDM5B (Zytosol und Kerne) gruppiert	IRS 0-2 (negativ)	3	9	12
	IRS 3-4 (schwach pos.)	0	8	8

IRS 6-8 (mäßig pos.)	2	7	9
IRS 9-12 (stark pos.)	1	6	7
Gesamt	6	30	36

4.9.3 Gleichzeitige Expression von CBX5 und KDM5B in Bezug auf das Grading

Die Aufteilung des Gradings auf die beiden Kategorien „nicht positiv für beide Merkmale“ und „positiv für beide Merkmale“ war relativ ausgeglichen. Die Tumoren, die dem G2-Stadium zugeordnet wurden, exprimierten zur Hälfte beide Merkmale und zur anderen Hälfte nicht beide Merkmale gleichzeitig. Im G3 Stadium waren 43,3% nicht positiv für beide Merkmale und 56,7% positiv für beide Merkmale. Eine Tendenz ließ sich hier also nicht ableiten. Entsprechend ergab sich keinerlei Korrelationen zwischen den Parametern (Exakter Tests nach Fisher ($p = 1,000$) (Tabelle 37).

Tabelle 37: Gleichzeitige Expression CBX5 und KDM5B und Grading (N=36)

		Grading		Gesamt
		G2	G3	
CBX5 und KDM5B kombiniert binär	nicht positiv für beide Merkmale	3	13	16
	positiv für beide Merkmale	3	17	
Gesamt		6	30	36

5 Diskussion

Diese Doktorarbeit beschäftigt sich mit der übergeordneten Fragestellung, ob die Antigene CBX5 und KDM5B als potenzielle tumorspezifische therapeutische Zielstrukturen oder als prognostische Marker geeignet sind. Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, ob ein Zusammenhang zwischen quantitativer Antigenpräsentation im Tumorgewebe und dem Alter der Patientinnen, dem kumulativen Überleben, der Tumorprogression und -migration, sowie dem Schweregrad besteht. Diese Fragestellung ergibt sich daraus, dass in den Blutproben von an TNBC-erkrankten Patientinnen

Antikörper nachgewiesen werden konnten, die gegen CBX5 und KDM5B gerichtet waren. In Blutproben von gesunden Patientinnen konnten diese nicht nachgewiesen werden.

Aufgrund der geringen Fallzahl (N=36) waren die Ergebnisse selten statistisch signifikant. Dennoch ist es möglich eine Tendenz abzuleiten und diese Studie als Grundlage für explizite Fragestellungen weiterer Studien mit größeren Fallzahlen zu verwenden.

5.1. Expression von CBX5 und KDM5B im Tumorgewebe

Eine wichtige Fragestellung und Voraussetzung für die weiterführenden Untersuchungen war ob und in welcher Ausprägung die Antigene CBX5 und KDM5B in den TNBC-Tumorschnitten vorhanden sind. In den bisherigen Forschungsarbeiten zeigte sich, dass CBX5 in Brustkrebszellen stärker exprimiert ist als in gesunden Zellen und Einfluss auf Klinik und *Outcome* hat. Es konnte bisher nicht festgestellt werden, dass sich die Expression von CBX5 in den verschiedenen Subtypen des Brustkrebses (z. B. hormonrezeptorpositiver Brustkrebs oder TNBC) signifikant unterscheidet (31). Bisher gibt es kaum Forschungsarbeiten zu dieser expliziten Fragestellung beim triple-negativen Mammakarzinom.

Bezüglich eines Zusammenhangs zwischen KDM5B und Brustkrebs gibt es bereits mehr Untersuchungen. Eine erhöhte Expression von KDM5B wird mit der Proliferation und Invasivität von Mammakarzinomzellen in Zusammenhang gebracht (95, 100, 119, 134). In dieser Arbeit konnte eine erfolgreiche Methode zur Detektion der Antigene etabliert werden. Beide Moleküle konnten nachgewiesen werden. Erst dadurch konnten Untersuchungen bzgl. der Korrelationen zwischen Expression und bereits genannten klinischen *Follow-up*-Daten durchgeführt werden.

Es konnte außerdem eine statistisch signifikante, positive Korrelation zwischen der Expression von CBX5 und KDM5B in den Tumoren festgestellt werden. Interessant wären weiterführende Untersuchungen bezüglich der gleichzeitigen Inhibierung der beiden Moleküle im Vergleich zur einzelnen Inhibierung. Möglicherweise wäre eine gleichzeitige Inhibierung effektiver.

5.2. Expression von CBX5 und KDM5B und das Alter

Es konnte beobachtet werden, dass der Grad der Expression des CBX5-Antigens geringer war, je älter die Patientinnen waren. Bezüglich des KDM5B-Antigens zeigte sich diese Tendenz ebenfalls, jedoch nicht so deutlich. Wenn angenommen wird, dass eine hohe Expression der Antigene mit einer Tumorprogression einhergeht, stellt sich die Frage, ob eine abnehmende Expression im Alter eine verminderte Krankheitsaktivität bedeutet. Hier sollten weitere Untersuchungen mit höherer Fallzahl folgen, die zusätzlich Begleiterkrankungen, Lebensumstände etc. mit einbeziehen. Die Abnahme der Expression mit dem Alter lässt die Hypothese aufstellen, dass das Alter sogar ein protektiver Faktor sein könnte, bzw. dass es Faktoren gibt, die zum Erreichen hohen Alters trotz TNBC führen.

5.3. Expression von CBX5 und KDM5B und das kumulative Überleben

Eine stärkere Expression der Antigene CBX5 und KDM5B im Tumorgewebe ging tendenziell mit einer erhöhten Sterblichkeit einher. Patientinnen mit einer hohen Expression verstarben eher als Patientinnen mit einer geringen Expression. Die Tendenz der Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass Patientinnen mit CBX5-negativem Tumor einen Überlebensvorteil gegenüber Patientinnen mit CBX5-positivem Tumor haben. In der Studienpopulation hatten die Patientinnen, deren Tumoren KDM5B nicht exprimierten, ein geringeres relatives Risiko zu versterben als Patientinnen mit positiver KDM5B-Expression. Patientinnen, deren Tumoren weder CBX5 noch KDM5B exprimierten, hatten in der Studienpopulation ein geringeres Risiko zu versterben als Patientinnen mit positiver Expression.

Es zeigt sich also, dass das Vorliegen einer starken Antigenexpression im Tumor mit einem schlechteren *Outcome* einhergeht. Somit könnte die Antigenexpression möglicherweise als prognostischer Marker genutzt werden. Nach derzeitigem Wissensstand ist dies bisher noch nicht erprobt worden. Dies sollte weiter anhand eines größeren Kollektivs untersucht werden.

5.4. Expression von CBX5 und KDM5B und die Tumorgroße

Tendenziell fand sich eine starke Expression von CBX5 in den Tumorschnitten, die ein höheres T-Stadium aufwiesen. Dies könnte darauf hinweisen, dass sich die Expression

von CBX5 positiv auf das Tumorwachstum auswirkt, also eine Größenzunahme, eine Tumorproliferation, begünstigt und CBX5 somit eine onkogene Wirkung hat. Eine positive Assoziation zwischen Expressionsstärke und Tumorgröße zeichnet sich auch in Bezug auf KDM5B ab, jedoch nicht so deutlich. Zwischen der gleichzeitigen Expression beider Antigene und der Tumorgröße besteht kein bzw. nur ein geringer Zusammenhang.

Die hier dargestellten Ergebnisse bestätigen die der aktuellen Literatur, dass eine hohe Expression von CBX5 und KDM5B mit einer erhöhten Tumorproliferation in Zusammenhang stehen. Bisher gibt es wenig Studien bzgl. der Expression von CBX5 und der Tumorproliferation. Eine erhöhte Konzentration von CBX5 in Brustkrebszellen führt zu einer veränderten Organisation bestimmter Regionen des Heterochromatins, besonders perizentrisch. In Zellen, die sich in einem Zellzyklus-Arrest befinden, konnte eine geringere Konzentration des Proteins nachgewiesen werden als in sich teilenden Zellen. Die Proliferation der Tumoren scheint also in Zusammenhang mit der Expression von CBX5 zu stehen. CBX5 führt zu einem Gen-*Silencing* der Gene, die eine Proliferation der Zellen inhibieren (39, 85).

In Bezug auf KDM5B könnte eine Förderung der Zellproliferation in Zusammenhang mit dem Einfluss von KDM5B auf den E2F/RB1-Signalweg stehen, wie Hayami et al. herausgefunden haben (131). E2F1 und E2F2 sind Transkriptionsfaktoren, reguliert durch KDM5B, die wiederum die Transkription des Tumorsuppressors Retinoblastom-Protein, neben anderen Zell-Zyklus-Kontroll-Genen, beeinflussen. Das Zusammenspiel der genannten Proteine kontrolliert den Zell-Zyklus-Ablauf. Die proliferationsfördernden Transkriptionsfaktoren E2F1 und E2F2 konnten in verschiedenen Krebsarten in erhöhter Expression nachgewiesen werden. Durch Inhibition von KDM5B konnte eine verringerte Proliferation der Zellen erreicht werden. Dies könnte aufgrund der Regulation von E2F1 und E2F2 durch KDM5B zu erklären sein (131).

Yamane et. al untersuchten den Zusammenhang zwischen KDM5B und der Proliferation und Tumorwachstum von Brustkrebszellen (MCF-7-Zelllinie) (100). Hierbei zeigte sich, dass sowohl die Proliferation der Zellen als auch die Fähigkeit Kolonien zu bilden, bei einem Knockdown von KDM5B vermindert wird. Die Zellen befanden sich häufiger in der G1-Phase des Zellzyklus als in der S-Phase, im Vergleich zur Kontrollzelllinie. Möglicherweise ist dies auf eine repressive Wirkung von KDM5B auf wachstumsinhibierende Gene zurückzuführen. KDM5B hat folglich einen Einfluss auf die

Regulation des Zellzyklus mit einer proliferierenden Wirkung. Des Weiteren ergaben die Untersuchungen der Arbeitsgruppe eine Hochregulation von Tumorsuppressoren, wie z.B. BRCA-1, oder tumorsuppressor-assoziierten Genen, in den Zelllinien, in denen KDM5B inhibiert wurde (100).

CUX2 (*CUT-like homeobox 2*), ein Protein, das u.a. eine Rolle in der DNA-Reparatur und Apoptose spielt, interagiert aktivierend mit KDM5B, welches daraufhin wiederum SOX17, ein Transkriptionsfaktor, inhibiert, und zu einer erhöhten Tumorprogression und einer schlechteren Prognose bei Brustkrebs führt (*CUX2/KDM5B/SOX17 axis*). Bei Inhibierung von CUX2 konnte eine verminderte Expression von KDM5B und eine Aktivierung von SOX17 festgestellt werden, was zu einer Einschränkung in malignen Prozessen bei Brustkrebs führte (156, 157). Weitere Studien befassen sich mit dem Zusammenhang und der gegenseitigen Regulierung von lnc-RNAs, miRNAs und KDM5B und deren Einfluss auf die Tumorprogression (101, 158-161).

5.5. Expression von CBX5 und KDM5B und der Lymphknotenstatus

Es lässt sich keine Tendenz ableiten, dass je stärker die Expression von CBX5 beziehungsweise KDM5B oder eine gleichzeitige Expression beider Antigene ist, das Nodusstadium höher ist. Bei Patientinnen mit einer höheren Expression der Antigene, ist die Migration der Tumorzellen also nicht stärker.

45,8 % aller pN0-Fälle zeigten eine mäßig oder stark positive Expression von KDM5B, 50% aller pN0-Fälle eine mäßig oder stark positive Expression von CBX5. Ob eine hohe Expression von KDM5B bzw. CBX5 möglicherweise sogar eine Abschwächung der Migration der Zellen begünstigt, muss mit einer höheren Fallzahl neu eruiert werden.

5.6. Expression von CBX5 und KDM5B und die Metastasierung

In der Literatur gibt es widersprüchliche Aussagen bzgl. des Zusammenhangs zwischen der Expression von CBX5 und dem Auftreten von Metastasen:

Es wird einerseits angenommen, dass CBX5 als Metastasensuppressor fungiert. Welcher Mechanismen dem zugrunde liegt ist bisher weitgehend unbekannt. Es besteht die Annahme, dass CBX5 eine Schlüsselrolle in der Regulation von Krebsstammzellen (*Cancer Stem Cells = CSC*) einnimmt. Krebsstammzellen sind multipotente Tumorzellen mit Differenzierungspotential und der Fähigkeit zur Selbsterneuerung, und werden in

Zusammenhang mit Therapieresistenz und Metastasierung gebracht (162). Möglicherweise stabilisiert das Protein eine normale Transkriptionsaktivität bei nicht-migrierenden CSCs. Bei einer hohen Konzentration an CBX5 konnte eine hohe Dichte an nicht-migrierenden CSCs nachgewiesen werden. Eine geringere Konzentration könnte folglich zu einer alternierten Transkription mit verändertem Gen-*Splicing* und einer Überexpression invasiver Gene und somit zu einer Vermehrung von migrierenden, invasiven CSCs führen, die eine Metastasierung begünstigen (39, 73).

In den invasiven Brustkrebszelllinien HS578T und MDA-MB-231 konnte von Thomsen et al. eine niedrige CBX5-Konzentration nachgewiesen werden, wohingegen Brustkrebszelllinien wie T47D und MCF-7, die eine geringe Migration aufweisen, eine hohe Konzentration an CBX5 zeigten. Eine Erniedrigung der CBX5-Konzentration in der MCF-7-Zelllinie führte zu einer Erhöhung des invasiven Potentials der Zellen, während eine Erhöhung der CBX5-Konzentration in MDA-MB-231-Zellen eine Erniedrigung eben dieses induzierten. Ein möglicher Mechanismus für die variierende Expression ist eine mutierte Bindestelle für Transkriptionsfaktoren (c-myc) in der Promotorregion des Gens, wodurch es zu einer verringerten Transkription des Gens kommt. Die Bindung des Transkriptionsfaktor yin yang (YY1) als Aktivator der Transkription soll hierbei ebenfalls eine Rolle spielen. Die Ursache für die unterschiedliche Expression des Proteins geschieht also auf mRNA-Level. Es kann angenommen werden, dass CBX5 einen Gen-*Silencing*-Effekt auf Gene hat, die zu einer Migration der Krebszellen führen (39). Pradhan et al. brachten das erhöhte Metastasierungspotential bei CBX5-Knockdown in MCF-7-Zelllinien mit einer Veränderung der Membranspannung in Zusammenhang (163).

Andere Forschungsarbeiten konnten zeigen, dass HP1 α mit weiteren Proteinen (z. B. RRP1B (*ribosomal RNA processing 1 homolog B*)) interagiert und dadurch eine Metastasierung unterdrückt wird (164, 165).

Yu et al. untersuchten die *SNHG11/miR-2355-5p/CBX5-axis* und stellten hingegen fest, dass die lncRNA *SNHG11*, die in TNBC vermehrt exprimiert wird und mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist, mittels der microRNA *2355-5p (miR-2355-5p)* eine erhöhte CBX5-Expression induziert. Bei *Silencing* von *SNHG11* kommt es zu einer verminderten CBX5-Expression. Eine hohe Expression an *SNHG11* wird mit einer erhöhten Tumorprogression, -migration und -invasion in Verbindung gebracht, was durch ein *SNHG11-Knockdown* verhindert werden kann. Da eine hohe *SNHG11*-Expression

aber auch eine hohe CBX5-Expression zur Folge hat, und CBX5 eigentlich eine unterdrückende Wirkung bezüglich Migration zugeschrieben wird, widerspricht dies den Ergebnissen anderer o.g. Studien (166). Auch De Koning et al. haben immunhistochemische Färbungen mit Anti-CBX5 an Brustkrebsgewebe durchgeführt und zeigten, dass eine Metastasierung mit einer hohen Expression von CBX5 korreliert, sowie mit einem verringerten Überleben (85).

Die Tumorschnitte der beiden Patientinnen, die Fernmetastasen entwickelten zeigten eine mäßig starke Expression von CBX5. Hier zeigte sich, dass eine Metastasierung tendenziell mit einer vermehrten Expression einhergeht. Ob hier ein Zusammenhang zwischen Metastasierung und hoher Expression von CBX5 im Primärtumor besteht kann ob der geringen Fallzahl und der kleinen Zahl an Fällen mit Metastasierung nicht bestätigt werden.

In triple-negativen Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231) verhindert KDM5B die Transkription von Genen, die mit entzündlichen Prozessen, Zellproliferation, Zelladhäsion und Migration assoziiert sind (121). Klein et al. konnten in triple-negativen Mammakarzinomen eine geringere Expression von KDM5B nachweisen als in ER⁺/PR⁺-Tumoren. Dies fördere die Migration und Metastasierung der Tumorzellen (121). Das würde bedeuten, dass eine hohe Expression an KDM5B die Tumormigration verlangsamt.

Hingegen stellten Bamodu et al. eine Abschwächung von Migration und Invasivität bei einem KDM5B-*Knockdown* in der triple-negativen Zellreihe MDA-MB231 fest. Sie schlussfolgerten daraus, dass eine erhöhte KDM5B-Expression mit gesteigerter Migration und Invasivität einhergeht. In gesunden Brustzellen (MCF-10A) hatte eine erhöhte KDM5B-Expression ebenfalls eine gesteigerte Fähigkeit der Migration der Zellen zur Folge. Wie auch CBX5 hat KDM5B einen Einfluss auf die Bildung und Aufrechterhaltung von Brustkrebsstammzellen (BCSCs). Außerdem konnten sie feststellen, dass eine Inhibition der KDM5B-Expression mit der Folge einer *hsa-miR-448*-Erhöhung zu einer verminderten *MALAT-1*-Expression führt und eine Zellproliferation abschwächt. *hsa-miR-448* ist eine micro-RNA deren Funktion noch nicht hinreichend erforscht ist, jedoch eine Rolle in der Genregulation zu spielen scheint. *MALAT-1* ist eine lncRNA, beteiligt an der Regulation der mRNA-Expression und an posttranskriptionalen Modulationen. *hsa-miR-*

448 könnte demnach Anwendung in der targetspezifischen Tumorthherapie bei TNBC finden (167).

Eine Verbindung von KDM5B mit dem NuRD-Komplex (*“nucleosome remodeling and deacetylase complex”*) führt zu einer Transkriptionsrepression (121). Die Bindung von KDM5B an den LSD1/NuRD-Komplex ist außerdem Gegenstand aktueller Forschung in Hinblick auf eine Unterdrückung von Angiogenese und Metastasierung (168). Es zeigte sich, dass in Zelllinien des triple-negativen Brustkrebs (MDA-MB-231) die Unterdrückung von KDM5B eine erhöhte Proliferation, Entzündungsreaktion, Adhäsion, sowie Migration, zur Folge hatte, im Gegensatz zur Inhibition in der MCF7-Zelllinie, wo das Gegenteil der Fall war (169, 170).

Die Widersprüchlichkeit der Ergebnisse mehrerer Studien zeigt die Komplexität der unterschiedlichen Funktionen der Histondemethylasen und betont die Herausforderung der Entwicklung *target*-spezifischer Therapien, sodass hier weiterhin ein hoher Bedarf an weiterführenden Forschungen besteht. Eine Erklärung für die Widersprüchlichkeit der Forschungsergebnisse bietet De Nisio et al.: Gegenstand ihrer Forschung ist die Entdeckung verschiedener Isoformen von KDM5B. Die katalytisch inaktive Isoform KDM5B-NTT konnte vermehrt in der MCF7-Zelllinie detektiert werden (40%). Einen noch höheren Anteil (57%) nahm die Isoform in der triple-negativen-Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB-231 ein. Somit zeigt sich in triple-negativen Tumoren eine geringere Anzahl an aktivem KDM5B und folglich eine geringere Inhibition des Tumorwachstums, wie es bei hoher Expression der aktiven Form gezeigt wurde (121). Es scheint also naheliegend, dass KDM5B weitere Funktionen als nur rein katalytische (als aktive Form), einnimmt. Die sowohl tumorfördernde als auch tumorrepressive Eigenschaft könnte somit auf das Vorliegen verschiedener Isoformen zurückzuführen sein (169).

In dieser Arbeit wurde nicht zwischen den Isoformen von KDM5B unterschieden. Die immunhistochemische Färbung wurde vor der Entdeckung der Isoformen abgeschlossen. Der ausgewählte Antikörper richtet sich gegen die Region zwischen ARID und JmjC, ein grundsätzliches Merkmal von KDM5B. Es wird davon ausgegangen, dass der Antikörper an alle Isoformen von KDM5B binden kann.

Eine weitere *microRNA*, *miR-137*, konnte mit KDM5B in Zusammenhang gebracht werden. Es zeigte sich, dass *miR-137* eine verringerte Proliferation und Migration in

Brustkrebszellen zur Folge hat und in Mammakarzinomen geringer vertreten ist als in gesundem Gewebe. *miR-137* scheint eine regulierende Wirkung auf KDM5B zu haben (171).

Die Bindung von PHD1 (eine von drei PHD-Finger-Domänen) von KDM5B an unmethyliertes H3K4(me0) inhibiert Migrationsprozesse bei einer hohen Konzentration von KDM5B. Das Protein fungiert also auch mit tumorsuppressiven Eigenschaften in triple-negativen Mammakarzinomzellen (121). Wie die tumorsuppressiven und tumorfördernden Eigenschaften reguliert werden, ist unklar (121).

In dieser Arbeit hatten beide Fälle, die Fernmetastasen entwickelten, Primärtumoren mit einer schwachen Expression von KDM5B. Gegebenenfalls geht also eine geringe Expression von KDM5B mit einer erhöhten Migration der Zellen einher. Eine valide Aussage kann hierzu aber nur mit einer höheren Fallzahl getroffen werden.

Der Zusammenhang zwischen der gleichzeitigen Expression von CBX5 und KDM5B in Tumoren des triple-negativen Mammakarzinoms wurde in dieser Arbeit erstmalig untersucht. Beide Fälle mit Metastasierung waren positiv für beide Merkmale. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass ein Vorhandensein beider Merkmale eine Metastasierung begünstigt. Dies gibt Anlass zu weiteren Nachforschungen mit höherer Fallzahl.

5.7. Expression von CBX5 und KDM5B und das Grading

Es besteht keine Korrelation zwischen der Expression der Antigene und dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen. Bei KDM5B besteht am ehesten eine negative Korrelation insofern, als dass eine höhere Expression von KDM5B mit einer besseren Differenzierung der Tumorzellen einhergeht.

Im Gegensatz hierzu konnten He et al. bei einem Verlust von KDM5B eine verzögerte Zelldifferenzierung sowohl bei normalen Zellen als auch bei Tumorzellen zeigen. Dies erfordert weitere Untersuchungen in Hinblick auf Depletion und Inhibierung von KDM5B als Therapiekonzept (150).

Yeh et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen der Differenzierung und Entdifferenzierung von CSCs aufgrund des Methylierungsstatus von H3K4 durch KDM5B (126). CSCs mit inhibiertem KDM5B führen zu einer geringeren Tumorprogression (127).

Insgesamt lassen sich folgende Schwächen und Stärken der Arbeit zusammenfassen:

Ungünstig zeigt sich, wie bereits mehrfach erwähnt die niedrige Fallzahl, sowie der retrospektive Charakter der Arbeit, woraus eine geringere Aussagekraft resultiert.

Die Stärke liegt darin, dass es sich um eine Arbeit der Grundlagenforschung als Basis der zielgerichteten Therapie handelt. Bisher gibt es zur prognostischen Bedeutung der ausgewählten Proteine nur wenig Daten. Im Rahmen dieser Arbeit gelang eine erstmalige Analyse, vor allem auch in Bezug auf das gleichzeitige Vorliegen der Proteine. Es konnte eine reproduzierbare immunhistochemische Methode zur Detektion der Antigene etabliert werden. Die Schwächen der Arbeit lassen sich durch weiterführende Forschung, ob CBX5 und KDM5B als prognostische Marker und therapeutische Zielstrukturen fungieren können, mit einem größeren Kollektiv minimieren.

6 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich eine immunhistochemische Methode zur Detektion der Antigene etabliert werden. Diese Arbeit zeigte bezüglich des kumulativen Überlebens bei stärkerer Expression der Antigene CBX5 und KDM5B im Tumorgewebe tendenziell eine erhöhte Sterblichkeit. Es konnte außerdem dargestellt werden, dass eine höhere Expression der Antigene mit der TumorgroÙe korrelierte, also mit einer vermehrten Proliferation einherging. Bezüglich der Metastasierung zeichnete sich kein deutliches Ergebnis ab. Die Tumoren, die metastasierten, zeigten eine mäßig starke Expression von CBX5 und eine schwache Expression von KDM5B. Eine hohe Expression von CBX5 und eine schwache Expression von KDM5B ging tendenziell mit einer erhöhten Metastasierung einher.

7 Ausblick

Die hier dargestellten Versuche sollten mit einer größeren Fallzahl wiederholt werden, um bessere Aussagen über die statistische Signifikanz treffen zu können. Als Fortführung dieser Arbeit, werden im Rahmen einer weiteren Dissertationsschrift bereits weiterführende Versuche durchgeführt. Dabei wird die Expression und der funktionelle

Einfluss von KDM5B und CBX5 in TNBC-Zelllinien, insbesondere in Bezug auf Proliferation, Adhäsion, Migration und Vitalität mit und ohne Knockdown von CBX5 und KDM5B, untersucht. Dies ist eine perfekte Ergänzung, um die Ergebnisse dieser Arbeit zu verifizieren.

Des Weiteren soll mit TRON Mainz als Partner festgestellt werden, ob eine Korrelation zwischen der Menge der Antikörper im Blut der Patientinnen mit der Expression der Antigene in den Tumoren besteht. Dies soll zeigen, ob die Antikörper Anti-KDM5B und Anti-CBX5 gegebenenfalls als prognostische Marker genutzt werden können. Die Ergebnisse hierzu sind noch ausstehend.

8 Zusammenfassung

Das triple-negative Mammakarzinom ist aufgrund seiner Komplexität und Heterogenität und der vielen Patientinnen, die durch diese Erkrankung betroffen sind, ein wichtiges Forschungsthema. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde die Spezifität zirkulierender Antikörper in Blutproben von 36 TNBC-Patientinnen analysiert. Anhand der Analyse wurden Antikörper gegen zwei Antigenstrukturen der Moleküle KDM5B und CBX5 identifiziert, deren Konzentration im Blut der TNBC-Patientinnen erhöht war, nicht jedoch im Blut von gesunden Probandinnen. CBX5 und KDM5B spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression, Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Zellzykluskontrolle, Apoptose und DNA-Reparatur und sind somit Bestandteil wichtiger Prozesse im Rahmen der Tumorentstehung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels immunhistochemischer Färbung an 36 zu den analysierten Blutproben korrespondierenden TNBC-Paraffinschnitten untersucht, ob und wie stark die entsprechenden Antigene in den Tumoren des genannten Kollektivs exprimiert wurden. Eine Auswertung der gefärbten Schnitte bezüglich der Expression der Antigene wurde mittels des immunreaktiven Scores (IRS) vorgenommen. Des Weiteren wurden statistische Tests zur Aufdeckung bestehender Korrelationen zwischen der Expression der Antigene mit Daten eines bereits bestehenden *Follow-ups* der 36 Patientinnen durchgeführt. Untersucht wurden insbesondere der Zusammenhang der Expression mit dem Alter, dem kumulativen Überleben, der Tumorgroße, dem Lymphknotenstatus, der Metastasierung und dem Grading. Es zeigte sich, dass die Stärke der Expression beider Antigene mit dem Alter der Patientinnen abnahm. Eine hohe Expression beider Antigene ging tendenziell mit einem schlechteren Überleben und einer erhöhten Proliferation einher. Bezüglich der

Metastasierung und dem Differenzierungsgrad ließ sich keine aussagekräftige Tendenz ableiten.

Die Gene *CBX5* und *KDM5B*, die die Proteine CBX5 und KDM5B kodieren, sind nur ein Bruchteil des umfassenden Spektrums, das mit TNBC in Zusammenhang steht. Dennoch ist es vor allem auch die Grundlagenforschung, die die Basis für zukünftige Diagnostik und Therapie bestimmter Erkrankungen liefert. Mittels weiterführender Studien kann und sollte diesen Erkenntnissen weiter nachgegangen werden, um der individuellen, targetspezifischen Therapie tausender Erkrankten ein Stück näher zu kommen.

9 Literaturverzeichnis

1. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2016;293(2):247-69.
2. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
3. da Silva JL, Cardoso Nunes NC, Izetti P, de Mesquita GG, de Melo AC. Triple negative breast cancer: A thorough review of biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020;145:102855.
4. Howard FM, Olopade OI. Epidemiology of Triple-Negative Breast Cancer: A Review. *Cancer J.* 2021;27(1):8-16.
5. Mina LA, Lim S, Bahadur SW, Firoz AT. Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer: Emerging New Data. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2019;11:321-8.
6. Ali AM, Ansari JAK, El-Aziz NMA, Abozeed WN, Warith AMA, Alsaleh K, et al. Triple Negative Breast Cancer: A Tale of Two Decades. *Anticancer Agents Med Chem.* 2017;17(4):491-9.
7. Derakhshan F, Reis-Filho JS. Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. *Annu Rev Pathol.* 2022;17:181-204.
8. Katz H, Alsharedi M. Immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Med Oncol.* 2017;35(1):13.
9. Yu LY, Tang J, Zhang CM, Zeng WJ, Yan H, Li MP, et al. New Immunotherapy Strategies in Breast Cancer. *Int J Environ Res Public Health.* 2017;14(1).
10. Alam MS, Sultana A, Wang G, Haque Mollah MN. Gene expression profile analysis to discover molecular signatures for early diagnosis and therapies of triple-negative breast cancer. *Front Mol Biosci.* 2022;9:1049741.
11. Alam MS, Sultana A, Sun H, Wu J, Guo F, Li Q, et al. Bioinformatics and network-based screening and discovery of potential molecular targets and small molecular drugs for breast cancer. *Front Pharmacol.* 2022;13:942126.
12. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res.* 2020;22(1):61.
13. Borri F, Granaglia A. Pathology of triple negative breast cancer. *Semin Cancer Biol.* 2021;72:136-45.

14. Bianchini G, De Angelis C, Licata L, Gianni L. Treatment landscape of triple-negative breast cancer - expanded options, evolving needs. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022;19(2):91-113.
15. Bernhard Wörmann, Aebi S, Balic M, Decker T, Fehm T, Greil R, et al. Mammakarzinom der Frau [Internet] 2018 [Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mammakarzinom-der-frau/@@guideline/html/index.html>].
16. Kaur RP, Vasudeva K, Kumar R, Munshi A. Role of p53 Gene in Breast Cancer: Focus on Mutation Spectrum and Therapeutic Strategies. *Curr Pharm Des.* 2018;24(30):3566-75.
17. Wang J, Wu X, Wang J, Shan L. JARID1B modulates breast cancer cell apoptosis by regulating p53 expression. *Int J Clin Exp Pathol.* 2018;11(9):4529-36.
18. Heimes A-S, Schmidt M. Immuno-oncology in triple-negative breast cancer. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment.* 2021;7(9).
19. Jerez Y, Marquez-Rodas I, Aparicio I, Alva M, Martin M, Lopez-Tarruella S. Poly (ADP-ribose) Polymerase Inhibition in Patients with Breast Cancer and BRCA 1 and 2 Mutations. *Drugs.* 2020;80(2):131-46.
20. Agency EM. Talzenna [Internet] [updated 13.11.2020. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/talzenna>].
21. Krebsforschungszentrum D. Olaparib bei BRCA-abhängigem Brustkrebs [Internet] 2019 [updated 06.05.2019 Available from: <https://www.krebsinformationsdienst.de/fachkreise/nachrichten/2019/fk10-zulassung-olaparib-lynparza-brustkrebs-brca.php>].
22. Medicine NIoHNLo. A Study Evaluating Talazoparib (BMN 673), a PARP Inhibitor, in Advanced and/or Metastatic Breast Cancer Patients with BRCA Mutation (EMBRACA Study) (EMBRACA) [Internet] [updated Februar 2021. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01945775>].
23. Medicine NIoHNLo. Assessment of the Efficacy and Safety of Olaparib Monotherapy Versus Physicians Choice Chemotherapy in the Treatment of Breast Cancer Patients With Germline BRCA1/2 Mutations. (OlympiAD) [Internet] [updated Januar 2021. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02000622?term=olympiad&cond=breast+cancer&draw=2&rank=1>].
24. Lyons TG. Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2019;20(11):82.

25. Fuxius S. Systemische/medikamentöse Tumorthherapie. In: Alt-Epping B, Fuxius S, Wedding U, Urban-&-Fischer-Verlag, editors. Elsevier Essentials Onkologie das wichtigste für Ärzte aller Fachrichtungen. 1. Auflage ed. München: Elsevier; 2017. p. 73–84.
26. Onkologie DGfHuM. Stellungnahme zur Nutzenbewertung gemäß § 35a SGB V. Pembrolizumab in Kombination mit Chemotherapie (Mammakarzinom, triple-negativ). 2022 [Available from: <https://www.dgho.de/publikationen/stellungnahmen/fruehe-nutzenbewertung/pembrolizumab/pembrolizumab-dgho-mamma-stellungnahme-20220309.pdf>].
27. Heimes AS, Schmidt M. Atezolizumab for the treatment of triple-negative breast cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2019;28(1):1-5.
28. Vikas P, Borcharding N, Zhang W. The clinical promise of immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Cancer Manag Res*. 2018;10:6823-33.
29. Keenan TE, Tolaney SM. Role of Immunotherapy in Triple-Negative Breast Cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2020;18(4):479-89.
30. Biologie H-H-UDIfp. In vitro-Selektion durch Phagendisplay [Internet] [Available from: <https://www.ipb.hhu.de/forschung-ipb/methoden/phagendisplay-selektion.html>].
31. Liang YK, Lin HY, Chen CF, Zeng. Prognostic values of distinct CBX family members in breast cancer. *Oncotarget*. 2017;8(54):92375-87.
32. Sales-Gil R, Vagnarelli P. How HP1 Post-Translational Modifications Regulate Heterochromatin Formation and Maintenance. *Cells*. 2020;9(6).
33. Chittock EC, Latwiel S, Miller TC, Muller CW. Molecular architecture of polycomb repressive complexes. *Biochem Soc Trans*. 2017;45(1):193-205.
34. Ma RG, Zhang Y, Sun TT, Cheng B. Epigenetic regulation by polycomb group complexes: focus on roles of CBX proteins. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2014;15(5):412-28.
35. Vincenz C, Kerppola TK. Different polycomb group CBX family proteins associate with distinct regions of chromatin using nonhomologous protein sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(43):16572-7.
36. Lee YH, Liu X, Qiu F, O'Connor TR, Yen Y, Ann DK. Correction: HP1beta is a biomarker for breast cancer prognosis and PARP inhibitor therapy. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124853.
37. Lee YH, Liu X, Qiu F, O'Connor TR, Yen Y, Ann DK. HP1beta is a biomarker for breast cancer prognosis and PARP inhibitor therapy. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121207.

38. Ruddock-D'Cruz NT, Prashadkumar S, Wilson KJ, Heffernan C, Cooney MA, French AJ, et al. Dynamic changes in localization of Chromobox (Cbx) family members during the maternal to embryonic transition. *Mol Reprod Dev.* 2008;75(3):477-88.
39. Thomsen R, Christensen DB, Rosborg S, Linnet TE, Blechingberg J, Nielsen AL. Analysis of HP1alpha regulation in human breast cancer cells. *Mol Carcinog.* 2011;50(8):601-13.
40. Kumar A, Kono H. Heterochromatin protein 1 (HP1): interactions with itself and chromatin components. *Biophys Rev.* 2020;12(2):387-400.
41. Singh PB. HP1 proteins--what is the essential interaction? *Genetika.* 2010;46(10):1424-9.
42. Fanti L, Berloco M, Piacentini L, Pimpinelli S. Chromosomal distribution of heterochromatin protein 1 (HP1) in *Drosophila*: a cytological map of euchromatic HP1 binding sites. *Genetica.* 2003;117(2-3):135-47.
43. Lomberk G, Wallrath L, Urrutia R. The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biol.* 2006;7(7):228.
44. Ainsztein AM, Kandels-Lewis SE, Mackay AM, Earnshaw WC. INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1. *J Cell Biol.* 1998;143(7):1763-74.
45. Liu X, Song Z, Huo Y, Zhang J, Zhu T, Wang J, et al. Chromatin Protein HP1 α Interacts with the Mitotic Regulator Borealin Protein and Specifies the Centromere Localization of the Chromosomal Passenger Complex. *Journal of Biological Chemistry.* 2014;289(30).
46. Inoue A, Hyle J, Lechner MS, Lahti JM. Perturbation of HP1 localization and chromatin binding ability causes defects in sister-chromatid cohesion. *Mutat Res.* 2008;657(1):48-55.
47. Hayakawa T, Haraguchi T, Masumoto H, Hiraoka Y. Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: distinct molecular domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 16):3327-38.
48. Nishibuchi G, Machida S, Nakagawa R, Yoshimura Y, Hiragami-Hamada K, Abe Y, et al. Mitotic phosphorylation of HP1alpha regulates its cell cycle-dependent chromatin binding. *J Biochem.* 2019;165(5):433-46.
49. Williams MM, Mathison AJ, Christensen T, Greipp PT, Knutson DL, Klee EW, et al. Aurora kinase B-phosphorylated HP1alpha functions in chromosomal instability. *Cell Cycle.* 2019;18(12):1407-21.

50. Chakraborty A, Prasanth KV, Prasanth SG. Dynamic phosphorylation of HP1alpha regulates mitotic progression in human cells. *Nat Commun.* 2014;5:3445.
51. Strom AR, Biggs RJ, Banigan EJ, Wang X, Chiu K, Herman C, et al. HP1alpha is a chromatin crosslinker that controls nuclear and mitotic chromosome mechanics. *Elife.* 2021;10.
52. Lee YH, Ann DK. Bi-phasic expression of Heterochromatin Protein 1 (HP1) during breast cancer progression: Potential roles of HP1 and chromatin structure in tumorigenesis. *J Nat Sci.* 2015;1(7):e127.
53. Nielsen AL, Ortiz JA, You J, Oulad-Abdelghani M, Khechumian R, Gansmuller A, et al. Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family. *EMBO J.* 1999;18(22):6385-95.
54. Thiru A, Nietlispach D, Mott HR, Okuwaki M, Lyon D, Nielsen PR, et al. Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *EMBO J.* 2004;23(3):489-99.
55. Strom AR, Emelyanov AV, Mir M, Fyodorov DV, Darzacq X, Karpen GH. Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature.* 2017;547(7662):241-5.
56. Sanulli S, Trnka MJ, Dharmarajan V, Tibble RW, Pascal BD, Burlingame AL, et al. HP1 reshapes nucleosome core to promote phase separation of heterochromatin. *Nature.* 2019;575(7782):390-4.
57. Wang G, Ma A, Chow CM, Horsley D, Brown NR, Cowell IG, et al. Conservation of heterochromatin protein 1 function. *Mol Cell Biol.* 2000;20(18):6970-83.
58. Larson AG, Elnatan D, Keenen MM, Trnka MJ, Johnston JB, Burlingame AL, et al. Liquid droplet formation by HP1alpha suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature.* 2017;547(7662):236-40.
59. LeRoy G, Weston JT, Zee BM, Young NL, Plazas-Mayorca MD, Garcia BA. Heterochromatin protein 1 is extensively decorated with histone code-like post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(11):2432-42.
60. Maison C, Bailly D, Roche D, Montes de Oca R, Probst AV, Vassias I, et al. SUMOylation promotes de novo targeting of HP1alpha to pericentric heterochromatin. *Nat Genet.* 2011;43(3):220-7.
61. Eisenberg JC, Ge YW, Hartnett T. Increased phosphorylation of HP1, a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*, is correlated with heterochromatin assembly. *J Biol Chem.* 1994;269(33):21315-21.

62. Nishibuchi G, Machida S, Osakabe A, Murakoshi H, Hiragami-Hamada K, Nakagawa R, et al. N-terminal phosphorylation of HP1alpha increases its nucleosome-binding specificity. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(20):12498-511.
63. Bryan LC, Weilandt DR, Bachmann AL, Kilic S, Lechner CC, Odermatt PD, et al. Single-molecule kinetic analysis of HP1-chromatin binding reveals a dynamic network of histone modification and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(18):10504-17.
64. Hiragami-Hamada K, Shinmyozu K, Hamada D, Tatsu Y, Uegaki K, Fujiwara S, et al. N-terminal phosphorylation of HP1{alpha} promotes its chromatin binding. *Mol Cell Biol.* 2011;31(6):1186-200.
65. Shimojo H, Kawaguchi A, Oda T, Hashiguchi N, Omori S, Moritsugu K, et al. Extended string-like binding of the phosphorylated HP1alpha N-terminal tail to the lysine 9-methylated histone H3 tail. *Sci Rep.* 2016;6:22527.
66. Shimada A, Dohke K, Sadaie M, Shinmyozu K, Nakayama J, Urano T, et al. Phosphorylation of Swi6/HP1 regulates transcriptional gene silencing at heterochromatin. *Genes Dev.* 2009;23(1):18-23.
67. Chakraborty A, Prasanth SG. Phosphorylation-dephosphorylation cycle of HP1alpha governs accurate mitotic progression. *Cell Cycle.* 2014;13(11):1663-70.
68. Lin FM, Kumar S, Ren J, Karami S, Bahnassy S, Li Y, et al. SUMOylation of HP1alpha supports association with ncRNA to define responsiveness of breast cancer cells to chemotherapy. *Oncotarget.* 2016;7(21):30336-49.
69. Bawa-Khalfe T, Lu LS, Zuo Y, Huang C, Dere R, Lin FM, et al. Differential expression of SUMO-specific protease 7 variants regulates epithelial-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(43):17466-71.
70. Zimmermann MT, Williams MM, Klee EW, Lomberk GA, Urrutia R. Modeling post-translational modifications and cancer-associated mutations that impact the heterochromatin protein 1alpha-importin alpha heterodimers. *Proteins.* 2019;87(11):904-16.
71. Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature.* 2001;410(6824):116-20.
72. Jacobs SA, Khorasanizadeh S. Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science.* 2002;295(5562):2080-3.
73. Vad-Nielsen J, Nielsen AL. Beyond the histone tale: HP1alpha deregulation in breast cancer epigenetics. *Cancer Biol Ther.* 2015;16(2):189-200.

74. Luger K, Hansen JC. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr Opin Struct Biol.* 2005;15(2):188-96.
75. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, et al. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature.* 2001;410(6824):120-4.
76. Jang SM, Azebi S, Soubigou G, Muchardt C. DYRK1A phosphorylates histone H3 to differentially regulate the binding of HP1 isoforms and antagonize HP1-mediated transcriptional repression. *EMBO Rep.* 2014;15(6):686-94.
77. Nicetto D, Zaret KS. Role of H3K9me3 heterochromatin in cell identity establishment and maintenance. *Curr Opin Genet Dev.* 2019;55:1-10.
78. Vad-Nielsen J, Jakobsen KR, Daugaard TF, Thomsen R, Brugmann A, Sorensen BS, et al. Regulatory dissection of the CBX5 and hnRNPA1 bi-directional promoter in human breast cancer cells reveals novel transcript variants differentially associated with HP1alpha down-regulation in metastatic cells. *BMC Cancer.* 2016;16:32.
79. Wallrath LL. Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8(2):147-53.
80. Eissenberg JC, Morris GD, Reuter G, Hartnett T. The heterochromatin-associated protein HP-1 is an essential protein in *Drosophila* with dosage-dependent effects on position-effect variegation. *Genetics.* 1992;131(2):345-52.
81. Eissenberg JC, James TC, Foster-Hartnett DM, Hartnett T, Ngan V, Elgin SC. Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(24):9923-7.
82. Dimitri P, Pisano C. Position effect variegation in *Drosophila melanogaster*: relationship between suppression effect and the amount of Y chromosome. *Genetics.* 1989;122(4):793-800.
83. Irving-Hooper BK, Binda O. A Phosphotyrosine Switch Controls the Association of Histone Mark Readers with Methylated Proteins. *Biochemistry.* 2016;55(11):1631-4.
84. Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, et al. Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature.* 2005;438(7071):1116-22.
85. De Koning L, Savignoni A, Boumendil C, Rehman H, Asselain B, Sastre-Garau X, et al. Heterochromatin protein 1alpha: a hallmark of cell proliferation relevant to clinical oncology. *EMBO Mol Med.* 2009;1(3):178-91.

86. Dawson MA, Bannister AJ, Gottgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature*. 2009;461(7265):819-22.
87. Sattler M, Griffin JD. JAK2 gets histone H3 rolling. *Cancer Cell*. 2009;16(5):365-6.
88. Hale TK, Contreras A, Morrison AJ, Herrera RE. Phosphorylation of the linker histone H1 by CDK regulates its binding to HP1alpha. *Mol Cell*. 2006;22(5):693-9.
89. Daujat S, Zeissler U, Waldmann T, Happel N, Schneider R. HP1 binds specifically to Lys26-methylated histone H1.4, whereas simultaneous Ser27 phosphorylation blocks HP1 binding. *J Biol Chem*. 2005;280(45):38090-5.
90. Ryan DP, Tremethick DJ. The interplay between H2A.Z and H3K9 methylation in regulating HP1alpha binding to linker histone-containing chromatin. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(18):9353-66.
91. Ruppert JG, Samejima K, Platani M, Molina O, Kimura H, Jeyaprakash AA, et al. HP1alpha targets the chromosomal passenger complex for activation at heterochromatin before mitotic entry. *EMBO J*. 2018;37(6).
92. Gong L, Govan JM, Evans EB, Dai H, Wang E, Lee SW, et al. Nuclear PTEN tumor-suppressor functions through maintaining heterochromatin structure. *Cell Cycle*. 2015;14(14):2323-32.
93. Bartova E, Malyskova B, Komurkova D, Legartova S, Suchankova J, Krejci J, et al. Function of heterochromatin protein 1 during DNA repair. *Protoplasma*. 2017;254(3):1233-40.
94. Lee YH, Kuo CY, Stark JM, Shih HM, Ann DK. HP1 promotes tumor suppressor BRCA1 functions during the DNA damage response. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(11):5784-98.
95. Lu PJ, Sundquist K, Baeckstrom D, Poulsom R, Hanby A, Meier-Ewert S, et al. A novel gene (PLU-1) containing highly conserved putative DNA/chromatin binding motifs is specifically up-regulated in breast cancer. *J Biol Chem*. 1999;274(22):15633-45.
96. D'Oto A, Tian QW, Davidoff AM, Yang J. Histone demethylases and their roles in cancer epigenetics. *J Med Oncol Ther*. 2016;1(2):34-40.
97. Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet*. 2006;7(9):715-27.
98. Scibetta AG, Santangelo S, Coleman J, Hall D, Chaplin T, Copier J, et al. Functional analysis of the transcription repressor PLU-1/JARID1B. *Mol Cell Biol*. 2007;27(20):7220-35.

99. Blair LP, Liu Z, Labitigan RL, Wu L, Zheng D, Xia Z, et al. KDM5 lysine demethylases are involved in maintenance of 3'UTR length. *Sci Adv.* 2016;2(11):e1501662.
100. Yamane K, Tateishi K, Klose RJ, Fang J, Fabrizio LA, Erdjument-Bromage H, et al. PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. *Mol Cell.* 2007;25(6):801-12.
101. Mocavini I, Pippa S, Licursi V, Paci P, Trisciuglio D, Mannironi C, et al. JARID1B expression and its function in DNA damage repair are tightly regulated by miRNAs in breast cancer. *Cancer Sci.* 2019;110(4):1232-43.
102. Wang GG, Song J, Wang Z, Dormann HL, Casadio F, Li H, et al. Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger. *Nature.* 2009;459(7248):847-51.
103. Li L, Wang L, Song P, Geng X, Liang X, Zhou M, et al. Critical role of histone demethylase RBP2 in human gastric cancer angiogenesis. *Mol Cancer.* 2014;13:81.
104. Zeng J, Ge Z, Wang L, Li Q, Wang N, Bjorkholm M, et al. The histone demethylase RBP2 is overexpressed in gastric cancer and its inhibition triggers senescence of cancer cells. *Gastroenterology.* 2010;138(3):981-92.
105. Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, Zabierowski SE, Brafford PA, Vultur A, et al. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell.* 2010;141(4):583-94.
106. Blair LP, Cao J, Zou MR, Sayegh J, Yan Q. Epigenetic Regulation by Lysine Demethylase 5 (KDM5) Enzymes in Cancer. *Cancers (Basel).* 2011;3(1):1383-404.
107. Yoo J, Kim GW, Jeon YH, Kim JY, Lee SW, Kwon SH. Drawing a line between histone demethylase KDM5A and KDM5B: their roles in development and tumorigenesis. *Exp Mol Med.* 2022;54(12):2107-17.
108. Martin C, Zhang Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(11):838-49.
109. Dimitrova E, Turberfield AH, Klose RJ. Histone demethylases in chromatin biology and beyond. *EMBO Rep.* 2015;16(12):1620-39.
110. Lukasak BJ, Thompson RE, Mitchener MM, Feng VJ, Bagert JD, Muir TW. A Genetically Encoded Approach for Breaking Chromatin Symmetry. *ACS Cent Sci.* 2022;8(2):176-83.
111. Yamamoto S, Wu Z, Russnes HG, Takagi S, Peluffo G, Vaske C, et al. JARID1B is a luminal lineage-driving oncogene in breast cancer. *Cancer Cell.* 2014;25(6):762-77.

112. Dey BK, Stalker L, Schnerch A, Bhatia M, Taylor-Papadimitriou J, Wynder C. The histone demethylase KDM5b/JARID1b plays a role in cell fate decisions by blocking terminal differentiation. *Mol Cell Biol.* 2008;28(17):5312-27.
113. Frankenberg S, Smith L, Greenfield A, Zernicka-Goetz M. Novel gene expression patterns along the proximo-distal axis of the mouse embryo before gastrulation. *BMC Dev Biol.* 2007;7:8.
114. Kidder BL, Hu G, Yu ZX, Liu C, Zhao K. Extended self-renewal and accelerated reprogramming in the absence of Kdm5b. *Mol Cell Biol.* 2013;33(24):4793-810.
115. Schmitz SU, Albert M, Malatesta M, Morey L, Johansen JV, Bak M, et al. Jarid1b targets genes regulating development and is involved in neural differentiation. *EMBO J.* 2011;30(22):4586-600.
116. Xie L, Pelz C, Wang W, Bashar A, Varlamova O, Shadle S, et al. KDM5B regulates embryonic stem cell self-renewal and represses cryptic intragenic transcription. *EMBO J.* 2011;30(8):1473-84.
117. You JS, Jones PA. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer Cell.* 2012;22(1):9-20.
118. Kidder BL, Hu G, Zhao K. KDM5B focuses H3K4 methylation near promoters and enhancers during embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Genome Biol.* 2014;15(2):R32.
119. Catchpole S, Spencer-Dene B, Hall D, Santangelo S, Rosewell I, Guenatri M, et al. PLU-1/JARID1B/KDM5B is required for embryonic survival and contributes to cell proliferation in the mammary gland and in ER+ breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2011;38(5):1267-77.
120. Zou MR, Cao J, Liu Z, Huh SJ, Polyak K, Yan Q. Histone demethylase jumonji AT-rich interactive domain 1B (JARID1B) controls mammary gland development by regulating key developmental and lineage specification genes. *J Biol Chem.* 2014;289(25):17620-33.
121. Klein BJ, Piao L, Xi Y, Rincon-Arango H, Rothbart SB, Peng D, et al. The histone-H3K4-specific demethylase KDM5B binds to its substrate and product through distinct PHD fingers. *Cell Rep.* 2014;6(2):325-35.
122. Guo X, Xu Y, Wang P, Li Z, Xu Y, Yang H. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a PHD domain of human JARID1B. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2011;67(Pt 8):907-10.

123. Barrett A, Madsen B, Copier J, Lu PJ, Cooper L, Scibetta AG, et al. PLU-1 nuclear protein, which is upregulated in breast cancer, shows restricted expression in normal human adult tissues: a new cancer/testis antigen? *Int J Cancer*. 2002;101(6):581-8.
124. Horton JR, Engstrom A, Zoeller EL, Liu X, Shanks JR, Zhang X, et al. Characterization of a Linked Jumonji Domain of the KDM5/JARID1 Family of Histone H3 Lysine 4 Demethylases. *J Biol Chem*. 2016;291(6):2631-46.
125. Christensen J, Agger K, Cloos PA, Pasini D, Rose S, Sennels L, et al. RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri- and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell*. 2007;128(6):1063-76.
126. Yeh IJ, Esakov E, Lathia JD, Miyagi M, Reizes O, Montano MM. Phosphorylation of the histone demethylase KDM5B and regulation of the phenotype of triple negative breast cancer. *Sci Rep*. 2019;9(1):17663.
127. Galassi C, Vitale I, Galluzzi L. Using epigenetic modifiers to target cancer stem cell immunoevasion. *Cancer Cell*. 2021;39(12):1573-5.
128. Bueno MT, Richard S. SUMOylation negatively modulates target gene occupancy of the KDM5B, a histone lysine demethylase. *Epigenetics*. 2013;8(11):1162-75.
129. Zhou B, Zhu Y, Xu W, Zhou Q, Tan L, Zhu L, et al. Hypoxia Stimulates SUMOylation-Dependent Stabilization of KDM5B. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:741736.
130. Zhao LH, Liu HG. Immunohistochemical detection and clinicopathological significance of JARID1B/KDM5B and P16 expression in invasive ductal carcinoma of the breast. *Genet Mol Res*. 2015;14(2):5417-26.
131. Hayami S, Yoshimatsu M, Veerakumarasivam A, Unoki M, Iwai Y, Tsunoda T, et al. Overexpression of the JmJc histone demethylase KDM5B in human carcinogenesis: involvement in the proliferation of cancer cells through the E2F/RB pathway. *Mol Cancer*. 2010;9:59.
132. Montano MM, Yeh IJ, Chen Y, Hernandez C, Kiselar JG, de la Fuente M, et al. Inhibition of the histone demethylase, KDM5B, directly induces re-expression of tumor suppressor protein HEXIM1 in cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2019;21(1):138.
133. Wong PP, Miranda F, Chan KV, Berlato C, Hurst HC, Scibetta AG. Histone demethylase KDM5B collaborates with TFAP2C and Myc to repress the cell cycle inhibitor p21(cip) (CDKN1A). *Mol Cell Biol*. 2012;32(9):1633-44.
134. Barrett A, Santangelo S, Tan K, Catchpole S, Roberts K, Spencer-Dene B, et al. Breast cancer associated transcriptional repressor PLU-1/JARID1B interacts directly with histone deacetylases. *Int J Cancer*. 2007;121(2):265-75.

135. Faucher D, Wellinger RJ. Methylated H3K4, a transcription-associated histone modification, is involved in the DNA damage response pathway. *PLoS Genet.* 2010;6(8).
136. Li X, Liu L, Yang S, Song N, Zhou X, Gao J, et al. Histone demethylase KDM5B is a key regulator of genome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(19):7096-101.
137. Pippa S, Mannironi C, Licursi V, Bombardi L, Colotti G, Cundari E, et al. Small Molecule Inhibitors of KDM5 Histone Demethylases Increase the Radiosensitivity of Breast Cancer Cells Overexpressing JARID1B. *Molecules.* 2019;24(9).
138. Trevino V. Integrative genomic analysis identifies associations of molecular alterations to APOBEC and BRCA1/2 mutational signatures in breast cancer. *Mol Genet Genomic Med.* 2019;7(8):e810.
139. Hinohara K, Wu HJ, Vigneau S, McDonald TO, Igarashi KJ, Yamamoto KN, et al. KDM5 Histone Demethylase Activity Links Cellular Transcriptomic Heterogeneity to Therapeutic Resistance. *Cancer Cell.* 2018;34(6):939-53 e9.
140. Wu L, Cao J, Cai WL, Lang SM, Horton JR, Jansen DJ, et al. KDM5 histone demethylases repress immune response via suppression of STING. *PLoS Biol.* 2018;16(8):e2006134.
141. Coleman JA, Correa I, Cooper L, Bohnenkamp HR, Poulosom R, Burchell JM, et al. T cells reactive with HLA-A*0201 peptides from the histone demethylase JARID1B are found in the circulation of breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2011;128(9):2114-24.
142. Sayegh J, Cao J, Zou MR, Morales A, Blair LP, Norcia M, et al. Identification of small molecule inhibitors of Jumonji AT-rich interactive domain 1B (JARID1B) histone demethylase by a sensitive high throughput screen. *J Biol Chem.* 2013;288(13):9408-17.
143. Nie Z, Shi L, Lai C, O'Connell SM, Xu J, Stansfield RK, et al. Structure-based design and discovery of potent and selective KDM5 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2018;28(9):1490-4.
144. Wang L, Chang J, Varghese D, Dellinger M, Kumar S, Best AM, et al. A small molecule modulates Jumonji histone demethylase activity and selectively inhibits cancer growth. *Nat Commun.* 2013;4:2035.
145. Liang J, Labadie S, Zhang B, Ortwine DF, Patel S, Vinogradova M, et al. From a novel HTS hit to potent, selective, and orally bioavailable KDM5 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017;27(13):2974-81.
146. Liang J, Zhang B, Labadie S, Ortwine DF, Vinogradova M, Kiefer JR, et al. Lead optimization of a pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one scaffold to identify potent, selective

and orally bioavailable KDM5 inhibitors suitable for in vivo biological studies. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016;26(16):4036-41.

147. Laukka T, Myllykoski M, Looper RE, Koivunen P. Cancer-associated 2-oxoglutarate analogues modify histone methylation by inhibiting histone lysine demethylases. *J Mol Biol.* 2018;430(18 Pt B):3081-92.

148. Leadem BR, Kagiampakis I, Wilson C, Cheung TK, Arnott D, Trojer P, et al. A KDM5 Inhibitor Increases Global H3K4 Trimethylation Occupancy and Enhances the Biological Efficacy of 5-Aza-2'-Deoxycytidine. *Cancer Res.* 2018;78(5):1127-39.

149. Jose A, Shenoy GG, Sunil Rodrigues G, Kumar NAN, Munisamy M, Thomas L, et al. Histone Demethylase KDM5B as a Therapeutic Target for Cancer Therapy. *Cancers (Basel).* 2020;12(8).

150. He R, Xhabija B, Gopi LK, Kurup JT, Xu Z, Liu Z, et al. H3K4 demethylase KDM5B regulates cancer cell identity and epigenetic plasticity. *Oncogene.* 2022;41(21):2958-72.

151. Paroni G, Bolis M, Zanetti A, Ubezio P, Helin K, Staller P, et al. HER2-positive breast-cancer cell lines are sensitive to KDM5 inhibition: definition of a gene-expression model for the selection of sensitive cases. *Oncogene.* 2019;38(15):2675-89.

152. Zhang ZG, Zhang HS, Sun HL, Liu HY, Liu MY, Zhou Z. KDM5B promotes breast cancer cell proliferation and migration via AMPK-mediated lipid metabolism reprogramming. *Exp Cell Res.* 2019;379(2):182-90.

153. Gaillard S, Charasson V, Ribeyre C, Salifou K, Pillaire MJ, Hoffmann JS, et al. KDM5A and KDM5B histone-demethylases contribute to HU-induced replication stress response and tolerance. *Biol Open.* 2021;10(5).

154. Kuckartz U, Rädiker S, Ebert T, Schehl J. *Statistik eine verständliche Einführung.* 2., überarbeitete Auflage ed. Wiesbaden: Springer VS; 2013. 313 Seiten p.

155. Seitz S. *Gynäkologie und Geburtshilfe.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg

Imprint: Springer; 2023. Available from: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-59164-2>.

156. Li L, Zhu G, Tan K, Jiang L, Li Y, Zhu X, et al. CUX2/KDM5B/SOX17 Axis Affects the Occurrence and Development of Breast Cancer. *Endocrinology.* 2022;163(9).

157. Correction to "CUX2/KDM5B/SOX17 Axis Affects the Occurrence and Development of Breast Cancer". *Endocrinology.* 2022;164(1).

158. Liang D, Liu H, Yang Q, He Y, Yan Y, Li N, et al. Long noncoding RNA RHPN1-AS1, induced by KDM5B, is involved in breast cancer via sponging miR-6884-5p. *J Cell Biochem.* 2020.

159. Vire E, Curtis C, Davalos V, Git A, Robson S, Villanueva A, et al. The Breast Cancer Oncogene EMSY Represses Transcription of Antimetastatic microRNA miR-31. *Mol Cell*. 2014;54(1):203.
160. Mulrane L, Gallagher WM, O'Connor DP. A novel mechanism of regulation of the anti-metastatic miR-31 by EMSY in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2014;16(6):467.
161. Mitra D, Das PM, Huynh FC, Jones FE. Jumonji/ARID1 B (JARID1B) protein promotes breast tumor cell cycle progression through epigenetic repression of microRNA let-7e. *J Biol Chem*. 2011;286(47):40531-5.
162. Frank NY, Schatton T, Frank MH. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest*. 2010;120(1):41-50.
163. Pradhan S, Williams MAK, Hale TK. Changes in the properties of membrane tethers in response to HP1alpha depletion in MCF7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022;587:126-30.
164. Lee M, Dworkin AM, Lichtenberg J, Patel SJ, Trivedi NS, Gildea D, et al. Metastasis-associated protein ribosomal RNA processing 1 homolog B (RRP1B) modulates metastasis through regulation of histone methylation. *Mol Cancer Res*. 2014;12(12):1818-28.
165. Crawford NP, Yang H, Mattaini KR, Hunter KW. The metastasis efficiency modifier ribosomal RNA processing 1 homolog B (RRP1B) is a chromatin-associated factor. *J Biol Chem*. 2009;284(42):28660-73.
166. Yu L, Zhang W, Wang P, Zhang Q, Cong A, Yang X, et al. LncRNA SNHG11 aggravates cell proliferation and migration in triple-negative breast cancer via sponging miR-2355-5p and targeting CBX5. *Exp Ther Med*. 2021;22(2):892.
167. Bamodu OA, Huang WC, Lee WH, Wu A, Wang LS, Hsiao M, et al. Aberrant KDM5B expression promotes aggressive breast cancer through MALAT1 overexpression and downregulation of hsa-miR-448. *BMC Cancer*. 2016;16:160.
168. Li Q, Shi L, Gui B, Yu W, Wang J, Zhang D, et al. Binding of the JmjC demethylase JARID1B to LSD1/NuRD suppresses angiogenesis and metastasis in breast cancer cells by repressing chemokine CCL14. *Cancer Res*. 2011;71(21):6899-908.
169. Di Nisio E, Licursi V, Mannironi C, Buglioni V, Paiardini A, Robusti G, et al. A truncated and catalytically inactive isoform of KDM5B histone demethylase accumulates in breast cancer cells and regulates H3K4 tri-methylation and gene expression. *Cancer Gene Ther*. 2023.

170. Mandumpala JJ, Baby S, Tom AA, Godugu C, Shankaraiah N. Role of histone demethylases and histone methyltransferases in triple-negative breast cancer: Epigenetic mnemonics. *Life Sci.* 2022;292:120321.
171. Denis H, Van Grembergen O, Delatte B, Dedeurwaerder S, Putmans P, Calonne E, et al. MicroRNAs regulate KDM5 histone demethylases in breast cancer cells. *Mol Biosyst.* 2016;12(2):404-13.

10 Anhang

Tabelle 38: IRS Anti-CBX5 der Tumorschnitte (TS) (N=36)

Einzelwerte der 36 Tumorschnitte bezüglich der Farbintensität, der positiven Zellen und des IRS nach immunhistochemischer Färbung mit Anti-CBX5.

CBX5	Farbintensität (0-3)	Positive Zellen (0-4)	IRS (0-12)
TS-Nr.1	2	3	6
TS-Nr.2	2	2	4
TS-Nr.3	1	2	2
TS-Nr.4	3	2	6
TS-Nr.5	3	3	9
TS-Nr.6	3	2	6
TS-Nr.7	1	3	3
TS-Nr.8	2	3	6
TS-Nr.9	2	3	6
TS-Nr.10	0	0	0
TS-Nr.11	2	4	8
TS-Nr.12	3	2	6
TS-Nr.13	2	2	4
TS-Nr.14	2	3	6
TS-Nr.15	1	3	3
TS-Nr.16	2	4	8
TS-Nr.17	1	1	1
TS-Nr.18	3	4	12
TS-Nr.19	3	4	12
TS-Nr.20	3	3	9
TS-Nr.21	0	0	0
TS-Nr.22	2	4	8
TS-Nr.23	1	2	2
TS-Nr.24	1	3	3
TS-Nr.25	3	3	9
TS-Nr.26	1	2	2
TS-Nr.27	2	2	4
TS-Nr.28	2	2	4

TS-Nr.29	3	2	6
TS-Nr.30	2	2	4
TS-Nr.31	2	3	6
TS-Nr.32	1	1	1
TS-Nr.33	2	3	6
TS-Nr.34	1	2	2
TS-Nr.35	3	2	6
TS-Nr.36	1	1	1

Tabelle 39: IRS KDM5B der Tumorschnitte (TS) (N=36)

Einzelwerte der 36 Tumorschnitte bezüglich der Farbintensität, der positiven Zellen und des IRS nach immunhistochemischer Färbung mit Anti-KDM5B.

KDM5B	Farbintensität (0-3)	Positive Zellen (0-4)	IRS Kerne (0-12)	IRS Zytosol (0-12)	IRS Kerne + Zytosol (0-12)
TS-Nr.1	2	2	4	6	6
TS-Nr.2	2	1	2	2	2
TS-Nr.3	2	1	2	2	2
TS-Nr.4	1	2	2	1	2
TS-Nr.5	3	4	12	12	12
TS-Nr.6	2	2	4	1	4
TS-Nr.7	1	1	1	6	6
TS-Nr.8	1	1	1	2	2
TS-Nr.9	3	4	12	8	12
TS-Nr.10	2	1	2	1	2
TS-Nr.11	0	0	0	3	3
TS-Nr.12	1	1	1	4	4
TS-Nr.13	1	1	1	2	2
TS-Nr.14	2	2	4	1	4
TS-Nr.15	2	2	4	2	4
TS-Nr.16	1	1	1	3	3
TS-Nr.17	2	1	2	6	6

TS-Nr.18	3	4	12	2	12
TS-Nr.19	2	2	4	6	6
TS-Nr.20	3	3	9	12	12
TS-Nr.21	2	3	6	6	6
TS-Nr.22	2	3	6	8	8
TS-Nr.23	2	1	2	2	2
TS-Nr.24	1	1	1	3	3
TS-Nr.25	3	3	9	9	9
TS-Nr.26	3	2	6	2	6
TS-Nr.27	2	3	6	3	6
TS-Nr.28	0	0	0	0	0
TS-Nr.29	0	0	0	0	0
TS-Nr.30	3	3	9	12	12
TS-Nr.31	2	2	4	8	8
TS-Nr.32	1	1	1	1	1
TS-Nr.33	2	2	4	4	4
TS-Nr.34	3	4	12	12	12
TS-Nr.35	1	2	2	2	2
TS-Nr.36	2	1	2	2	2

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Beteiligten für die ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Zeit der Doktorarbeit, insbesondere auch in schwierigen Phasen, bedanken.

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei meiner Familie, meinem Mann und meinen Freunden und Freundinnen, die mir jederzeit bedingungslos Rückhalt gaben.

Danke!

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Istengir
Vornamen: Luisa Carolin

Akademische Laufbahn:

11/2022	Approbation als Ärztin
PJ Tertial Chirurgie 21/22	DRK Krankenhaus Alzey
PJ Tertial Innere Medizin 21/22	DRK Krankenhaus Alzey
PJ Tertial Anästhesie 21/22	DRK Krankenhaus Alzey
10/2016-10/2022	Studium der Humanmedizin als Zweitstudium an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
09/2018	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2021	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2022	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2012-09/2016	Studium der Geschichte (B.A.) als Hauptfach und der Turkologie (B.A.) als Beifach an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
10/2014-01/2015	Studium der türkischen Sprache und Literatur an der Anadolu Üniversitesi Eskişehir, Türkei (Erasmus)