

## 4 DISKUSSION

Seit langem wird diskutiert, daß Nierenzellkarzinome eine sehr heterogene Tumorentität mit zum Teil unterschiedlichem Wachstumsverhalten und unterschiedlicher Prognose darstellen [Reese 1992; Franklin et al. 1996; Paulson 1996; Delahunt 1998; Godley und Escobar 1998]. Diese Heterogenität wird deutlich in unterschiedlichen genomischen Alterationen, wie 3p Verlusten, oder unterschiedlicher histologischer Subklassifizierung [Thoenes et al. 1986a und 1986b]. Trotz individueller Schwankungen bezüglich der jährlichen Wachstumsrate, kann man sagen, daß Nierenzellkarzinome mit jährlich durchschnittlich 0,5 cm im Durchmesser ein eher langsames Wachstum zeigen [Birnbaum et al 1990]. Nierenzellkarzinome verursachen dabei jedoch keine Frühsymptome und werden somit oft erst entdeckt, wenn sie symptomatisch geworden sind, d. h. wenn der Tumor das Hohlsystem der Niere infiltriert und oftmals schon metastasiert hat. Kann der Tumor frühzeitig erkannt und behandelt werden, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten bei fast 100 %, bei fortgeschrittenem Tumorleiden und bei Vorliegen von Metastasen hingegen, beträgt sie weniger als 20% [Bassil et al. 1985]. Da die einzige kurative Therapie bisher die Operation ist und sich die Prognose bei fortgeschrittenem Tumorleiden dramatisch verschlechtert, wäre es wichtig das Nierenzellkarzinom in einem frühen, auf die Niere beschränkten Stadium diagnostizieren zu können. Klinisch relevante Tumormarker für das Nierenzellkarzinom sind bisher jedoch nicht bekannt [Ebert et al. 1990a]. Neue Ansätze zu Diagnose und Therapie des Nierenzellkarzinoms sind somit dringend erforderlich. Mittels Untersuchungen der Telomeraseaktivität von Nierenzellkarzinomen können neue Erkenntnisse über das biologische Verhalten dieser Tumoren gewonnen werden.

Die Telomerase ist ein Enzym, dessen Aktivität in ca. 85 % aller malignen Tumoren nachgewiesen werden konnte, wohingegen dies bei benignen Tumoren nahezu nie der Fall war [Shay und Wright 1996a; Kim N.W. 1997b; Shay und Bacchetti 1997]. Die Telomerase ermöglicht die de novo-Synthese der Telomere. Durch Vorliegen von aktiver Telomerase kann der Mechanismus der „molecular clock“ umgangen werden, was für die Immortalisierung von Tumorzellen von besonderer Bedeutung ist. Neben diesem Hauptmechanismus, der Telomerverlängerung mittels Telomeraseaktivität, wird seit kurzem in Ausnahmefällen ein alternativer Weg diskutiert, der ebenfalls zu einer Verlängerung von

Telomeren führen kann. Dieser Mechanismus wird ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) oder ASP (Alternative Senescence Pathway) genannt [Bryan et al. 1995; Bryan et al. 1997a und 1997b]. Untersuchungen an diesen Zellen, die ohne nachweisbare Telomeraseaktivität immortal sind, haben gezeigt, daß sie ein untereinander sehr ähnliches, typisches TRF-Muster bieten und sich mit einer TRF-Länge von ca. 20-25 kbp [Bryan et al. 1995] deutlich von Telomerase-positiven Zellen, die zwar stabile, aber deutlich kürzere TRFs aufweisen, unterscheiden. TRF-Messungen an Telomerase-negativen Nierenzellkarzinomen geben Hinweise darauf, daß ALT bei Nierenzellkarzinomen eine Rolle spielen könnte [Mehle et al. 1994; Mehle et al. 1996].

Unterstützt wird diese Theorie durch Erkenntnisse, die anhand von Untersuchungen an Nierenzellkarzinom-Zelllinien mit 3p Verlust gewonnen wurden. Dabei wurde mittels Mikrozell-vermitteltem Chromosomen-Transfer ein normales Chromosom 3 in die Nierenzellkarzinom-Zelllinien RCC23 [Ohmura et al. 1995; Oshimura und Barrett 1997; Horikawa et al. 1998; Olson et al. 1998] und KC12 [Tanaka et al. 1998] eingebracht. Vor Transfer des normalen Chromosoms waren die Zelllinien RCC23 und KC12, die einen 3p Verlust aufweisen, immortalisiert und zeigten Telomeraseaktivität. Nach Hinzufügen des normalen Chromosoms 3 war keine Telomeraseaktivität mehr nachweisbar und die Zellen wurden sterblich. Diese Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, daß ein potentieller Repressor der Telomeraseaktivität auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (3p14.2-3p21.1) liegt [Olson et al. 1998; Tanaka et al. 1998]. Dieser potentielle Repressor der Telomeraseaktivität scheint die Genexpression der hTERT zu kontrollieren [Horikawa et al. 1998]. Bei Nierenzellkarzinomen ohne 3p Verlust und somit intaktem Telomerase-Repressor müßte also ein alternativer Weg zur Verlängerung der Telomere existieren.

Vor kurzem wurde von Mehle et al. [Mehle et al. 1998] untersucht, ob bei Nierenzellkarzinomen ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines 3p-Verlusts und dem Auftreten von Telomeraseaktivität besteht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gewebeproben von 45 Nierenzellkarzinomen sowohl mittels TRAP (telomeric repeat amplification protocol)-Assay auf Telomeraseaktivität, als auch mittels Mikrosatellitenanalysen auf das Vorliegen von 3p-Verlusten untersucht. Mehle et al. konnten dabei eine signifikante Korrelation zwischen einem LOH (loss of heterozygosity) in den Regionen 3p14.2-3p21.2 bzw. 3p24.1-3p24.3 und der Telomeraseaktivität in Nierenzellkarzinomen nachweisen.

Wir untersuchten Gewebeproben von 44 malignen Nierentumoren, 8 benignen Nierentumoren und 52 normalen Nierengewebe mittels TRAP-Assay auf Telomeraseaktivität. TRAP ist eine von Kim et al. entwickelte, hochempfindliche Methode, die die Standardtechnik zum Nachweis der Telomeraseaktivität darstellt [Kim N.W. et al. 1994].

Bei 63% der untersuchten 40 Nierenzellkarzinome konnte Telomeraseaktivität nachgewiesen werden. In keinem Fall fand sich Telomeraseaktivität in normalem Nierengewebe. Dies ist ein deutlich geringerer Prozentsatz mit nachweisbarer Telomeraseaktivität als bei anderen Malignomen, die in der Regel in fast 90% der Fälle Telomeraseaktivität zeigen [Shay und Bacchetti 1997; Kim N.W. 1997b]. Aufgrund der sofortigen Aufarbeitung von frischen Gewebeproben, der histologischen Kontrolle der untersuchten Areale, der Untersuchung von unterschiedlichen Tumorarealen sowie der Verwendung eines internen Standards können falsch negative Ergebnisse durch Degradation des Enzyms oder Inhibitoren auf ein Minimum reduziert werden. Zudem konnte in allen 4 untersuchten Urothelkarzinomen der Niere, die eine gänzlich andere Tumorentität als Nierenzellkarzinome darstellen, Telomeraseaktivität nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden auch acht benigne Nierentumore untersucht. Die vier Angiomyolipome hatten keine nachweisbare Telomeraseaktivität. Dies ist eine Übereinstimmung mit Rohde et al., die in 2 Angiomyolipomen ebenfalls keine Telomeraseaktivität nachweisen konnten [Rohde et al. 1998]. Von besonderem Interesse sind die vier Onkozytome, da diese Tumoren erstmals auf Telomeraseaktivität untersucht wurden. Onkozytome sind Tumore, die nicht eindeutig benigne oder maligne sind. Zwar werden sie meist als gutartig eingestuft, doch es sind Fälle mit infiltrativem Tumorwachstum und sogar Fernmetastasen beschrieben worden. Die 4 Onkozytome hatten keine nachweisbare Telomeraseaktivität. Das Fehlen von Telomeraseaktivität könnte ein zusätzlicher Hinweis sein, daß Onkozytome als benigne zu klassifizieren sind.

Die von uns erzielten Ergebnisse bezüglich der Telomeraseaktivität in Nierenzellkarzinomen (63 %) sind in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Mehle et al. [Mehle et al. 1996; Mehle et al. 1998], Rohde et al. [Rohde et al. 1998], Kinoshita et al. [Kinoshita et al. 1998], Yoshida et al. [Yoshida et al. 1998] Sugimura et al. [Sugimura et al. 1999] und Schlichter et al. [Schlichter et al. 1999], die von einer nachweisbaren Telomer

asektivität zwischen 56% und 77% der untersuchten Nierenzellkarzinome berichten. Im Kontrast dazu berichtet nur Fiedler et al. von einer nachweisbaren Telomeraseaktivität bei 93% ihrer untersuchten Nierenzellkarzinome [Fiedler et al. 1996].

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kinoshita et al., die nur bei 17% ihrer untersuchten chromophoben Nierenzellkarzinome Telomeraseaktivität nachwiesen [Kinoshita et al. 1998], konnten wir Telomeraseaktivität bei chromophoben Nierenzellkarzinomen im Vergleich zu anderen histologischen Subtypen ebenfalls besonders selten nachweisen (25%).

Im Gegensatz zu den anderen Autoren [Mehle et al. 1996; Fiedler et al. 1996; Mehle et al. 1998; Rohde et al. 1998; Sugimura et al. 1999] ergeben unsere Daten [Müller M. et al. 1999] und die Ergebnisse von Yoshida et al. [Yoshida et al. 1998] Hinweise auf eine Stadienabhängigkeit der Telomeraseaktivität. Bei der momentan noch zu geringen Fallzahl ist diese jedoch nicht statistisch signifikant. Bemerkenswert ist jedoch, daß alle vier untersuchten Proben von fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen mit bereits nachweisbarer Metastasierung Telomeraseaktivität zeigten. Da die untersuchten Proben zur Gewährleistung einer frischen Probenaufbereitung prospektiv gesammelt wurden und nicht retrospektiv auf eine Tumorbank zurückgegriffen wurde, sind die Nachbeobachtungszeiten der Patienten und somit Aussagen über eine prognostische Relevanz des Nachweises der Telomeraseaktivität derzeit noch nicht möglich. Im weiteren Follow up ist diese Fragestellung jedoch von besonderem Interesse. 60-70% nachweisbare Telomeraseaktivität bei Nierenzellkarzinomen korreliert zahlenmäßig gut mit der in der Literatur berichteten Anzahl an 3p-Verlusten bei Nierenzellkarzinomen [Brooks et al. 1993]. Bei Bestätigung dieser Korrelation und Nachweis einer Stadienabhängigkeit in einem weitaus größeren Patientenkollektiv mit langer Nachbeobachtungszeit könnte das Vorhandensein von Telomeraseaktivität bei Nierenzellkarzinomen einen wichtigen Prognosefaktor darstellen. Für Magenkarzinome und Neuroblastome konnte die prognostische Bedeutung der Telomeraseaktivität bereits nachgewiesen werden [Hiyama E. et al. 1995; Tahara E. et al. 1996].

Außer dem diagnostischen bzw. prognostischen Aspekt könnte die Inhibierung der Telomerase neue therapeutische Möglichkeiten in der Behandlung fortgeschrittener Nierenzellkarzinome mit nachweisbarer Telomeraseaktivität bieten.