

Aus der Klinik für Nephrologie und internistische Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin zu Berlin

DISSERTATION

**Regulation der Erythropoietin-Expression in renalen
Tumoren und daraus etablierten Zell-Linien**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité
—
Universitätsmedizin zu Berlin

von

Anna Bettina Sobottka
aus
Frankfurt am Main

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. M. Wiesener

2. Prof. Dr. C. Dame

3. Prof. Dr. J. Fandrey

Datum der Promotion: 22. September 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Übersicht	1
1.2	Erythropoietin	2
1.2.1	Funktion und Entdeckung von Erythropoietin	2
1.2.2	Ort der Erythropoietin-Produktion	3
1.3	Das Erythropoietin-Gen und seine Regulation	4
1.3.1	Lokalisation, Größe und Aufbau des Erythropoietin-Gens	4
1.3.2	Mechanismen der Erythropoietin-Genregulation	4
1.4	Dysregulation der Erythropoietin-Expression	7
1.4.1	Bedeutung des Proteins von Hippel-Lindau (pVHL)	7
1.4.2	Dysregulation der EPO-Expression in Nierenzellkarzinomen	10
1.4.3	Paraneoplastische Erythropoietin-Produktion bei anderen Erkrankungen	11
2	Herleitung	13
3	Material und Methoden	14
3.1	Sammlung des humanen Nierengewebes	14
3.2	Tumorzellextraktion	14
3.3	Zellkultur	15
3.4	Proteinnachweis im Immunoblot	15
3.4.1	Proteinextraktion	15
3.4.2	Proteinquantifizierung	16
3.4.3	Immunoblotting	16
3.4.4	Auswertung der Signale im Immunoblot	17
3.5	RNA Protection Assay	17
3.5.1	RNA-Extraktion	17
3.5.2	Quantifizierung der RNA-Extrakte	18
3.5.3	Herstellung der radioaktiven Sonden	18
3.5.4	RNase Protection Assay	19
3.6	In-situ-Hybridisierung	21
3.7	Stabile Transfektion	22

4	Ergebnisse	23
4.1	Tumorkollektiv	23
4.1.1	EPO- und CA-9-mRNA Expression im Tumor- und gesunden Nierengewebe	23
4.1.2	Gegenüberstellung der EPO-Expression in NZK mit präoperativen Hämoglobin-Konzentrationen	25
4.2	Etablierung der Zell-Linien aus dem Tumormaterial	27
4.2.1	Erhebung des HIF-1 α und HIF-2 α Proteinstatus	28
4.2.2	Nachweis der EPO- und CA-9-mRNA Expression	32
4.3	Expressionsverhalten der EPO- und CA-9-mRNA in Zell-Linien und dem dazugehörigen Tumorgewebe	34
4.3.1	EPO-mRNA Expression in weiteren, publizierten Zell-Linien	35
4.3.2	In-situ-Hybridisierung für die EPO-mRNA Expression in Tumorzellen	36
4.4	Stabile Transfektion der „Chuvash“-Mutation	38
5	Diskussion	42
5.1	Unterschiede der EPO-Expression – Vergleich von Tumorgewebe und Zellkultur	42
5.2	Einfluss einer paraneoplastischen EPO-Expression auf Hämoglobinwerte	45
5.3	Expressionsverteilung der HIFα-Isoformen	47
5.4	Stabilisierung HIFs durch pVHL ist Bedingung, aber unzureichend für die EPO-Genexpression	48
5.5	Ausblick	50
6	Zusammenfassung	51
7	Literaturverzeichnis	53
8	Lebenslauf	63
9	Erklärung	64
10	Danksagung	65

1 Einleitung

1.1 Übersicht

Die Versorgung des peripheren Gewebes mit Sauerstoff stellt eine grundlegende physiologische Voraussetzung für die Aufrechterhaltung von Zellstruktur und Zellfunktion dar. Hypoxische Bedingungen rufen Veränderungen hervor, die eine Anpassung an Sauerstoffmangelsituationen ermöglichen. Dieses System der sauerstoff-abhängigen Adaptation basiert vor allem auf einer veränderten Genexpression und Proteinsynthese und ist daher durch eine generelle, zell- und organüberschreitende Wirkung gekennzeichnet.

In der Erforschung der sauerstoff-abhängigen Genregulation nahm die Expression von Erythropoietin (EPO) eine Schlüsselstellung ein. Nach Beschreibung des Erythropoietin-Genes mit seinem 5'-Promoter und 3'-Enhancer wurde bald der dimere „cis-agierende“-Transkriptionsfaktor HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) gefunden, der sich aus den Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β zusammensetzt. In Normoxie degradiert dessen α -Untereinheit durch proteasomalen Abbau, während Hypoxie zu ihrer Stabilisierung führt, so dass die Zielgene vermehrt transkribiert werden können. Für die Degradation unter Normoxie ist das Protein „von Hippel-Lindau“ (pVHL) massgeblich verantwortlich. In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff werden die HIF α -Untereinheiten durch pVHL über Polyubiquitinierung markiert, was zu deren Destruktion über das 26S Proteasom führt. VHL Genmutationen, die dessen Funktionsweise verändern, führen häufig zu einer Stabilisierung von HIF α und können dadurch eine vermehrte Transkription der meisten HIF-Zielgene bewirken.

Obwohl HIF für die sauerstoff-abhängige Expression von EPO essentiell ist, führt eine konstitutive Aktivierung HIFs nicht zwangsläufig zu einer erhöhten EPO-Expression. Einige Krankheiten, denen eine Funktionseinschränkung des pVHLs gemeinsam ist, zeigen eine EPO-Überexpression, die sich nicht alleine durch eine HIF-Stabilisierung erklären lässt. Bei manchen dieser Erkrankungen kann ausserdem eine EPO-Expression in Zellen beobachtet werden, die ursprünglich nicht die Fähigkeit besitzen, das EPO-Gen zu induzieren. Dieses legt nahe, dass repressive Mechanismen für die gewebs- und zellspezifische Expression von EPO verantwortlich zu sein scheinen, die möglicherweise an eine korrekte Funktion des pVHLs gebunden sind.

Die Entschlüsselung dieser repressiven Elemente könnte zum einen die ausserordentlich gewebs- und zellspezifische Expression von EPO aufklären, zum anderen sollte sie von klinischem Interesse sein in Anbetracht der hohen Kosten, die bei der Behandlung von Patienten mit Niereninsuffizienz oder Tumoren mit rekombinantem Erythropoietin entstehen.

Um sich der Lösung der gewebs- und zellspezifischen EPO-Genregulation zu nähern, wurde in dieser Arbeit der Frage eines möglichen Einflusses des pVHLs auf die EPO-Expression nachgegangen. Dabei wurden zwei Aspekte gesondert betrachtet: einerseits wurde die EPO-Expression in prospektiv gesammelten, renalen Tumorgewebe analysiert, andererseits wurde aus diesem Tumorgewebe eine Primärkultur etabliert und vor dem Hintergrund des jeweiligen HIF-Status in diesen Zell-Linien die EPO-Expression untersucht. Schließlich wurde eine definierte Mutation des VHL-Gens, die zur familiären Polyzythämie unter anderem durch EPO-Überproduktion führt, mittels stabiler Transfektion in der Zellkultur untersucht.

1.2 Erythropoietin

1.2.1 Funktion und Entdeckung von Erythropoietin

Erythropoietin ist ein ca. 30,4 kDa schweres Glykoproteinormon, dessen Hauptaufgabe die Regulation der Erythropoese ist. Es verhindert die Apoptose der erythrogenen Vorläuferzellen und induziert dadurch die Reifung und Proliferation insbesondere der BFU-E (bursting-forming unit erythroid) und CFU-E (colony-forming unit erythroid) (Fisher, 2003). Die Sauerstoffversorgung des peripheren Gewebes, die wesentlich von dem zirkulierenden Erythrozytenvolumen abhängt, ist daher unmittelbar von der EPO-Konzentration beeinflusst.

Die Funktion eines zirkulierenden erythropoietischen Faktors wurde bereits um 1900 postuliert. Carnot und De Flandre sahen, dass das Plasma eines Kaninchens, das blutete, bei einem anderen, gesunden Artgenossen eine unmittelbare Retikulozytose auslöste. Sie schlossen daher auf einen hormonellen Faktor, der die Produktion der roten Blutzellen beeinflusste, und nannten ihn "Hämopoietin" (Carnot, 1906). Dieses Ergebnis wurde in den nachfolgenden Jahren von anderen Arbeitsgruppen bestätigt, die eine Retikulozytose nach Injektion von hämatopoietisch aktiviertem Plasma beobachteten (Hjort, 1936; Krumdieck, 1943; Erslev, 1953). 1948 etablierte Bonsdorff (Bonsdorff, 1948) für diesen humoralen Faktor den Namen „Erythropoietin“. Der

Zusammenhang zwischen atmosphärischem Sauerstoffgehalt und einer durch EPO ausgelösten Retikulozytose mit Hämoglobinerhöhung und Knochenmarkshyperplasie wurde von Reissmann aufgedeckt (Reissmann, 1950).

Das für das therapeutische Nutzen notwendige rekombinante Erythropoietin konnte erst nach Identifizierung und Charakterisierung der Aminosäuresequenz (Miyake, 1977) und erfolgreicher Klonierung des EPO-Gens (Lin, 1985) hergestellt werden.

1.2.2 Ort der Erythropoietin-Produktion

Während im fetalen Alter die Leber für die EPO-Expression verantwortlich ist, stellt beim Erwachsenen die Niere den Hauptproduktionsort für EPO dar. Mit Hilfe von in-situ-Hybridisierung (Bachmann, 1993) und Experimenten in transgenen Mäusen (Maxwell, 1993) konnte gezeigt werden, dass die peritubulären Fibroblasten im Bereich des Nierenkortex und des äußeren Nierenmarks bei Sauerstoffmangel EPO exprimieren. Diese Zellen liegen typischerweise zwischen zwei benachbarten Tubuli oder zwischen Blutgefäß und Tubulus (Bachmann, 1993). Selbst bei starker Anämie oder Hypoxie produzieren aber nur ca. 10% dieser Zellen messbare EPO-mRNA Signale.

Unter starker Anämie kann die EPO-Expression in der Leber wieder aktiviert werden. Dabei wurden EPO-Signale sowohl in den Hepatozyten als auch in den perisinusoidalen Ito-Zellen gefunden (Maxwell, 1994; Eckardt, 1996).

Daneben wurde auch in anderen Organen eine EPO-Expression beobachtet, wie unter anderem im Gehirn (Dame, 2000), in Zellen des weiblichen Genitaltraktes (Yasuda, 1998) und in Sertolizellen von Ratten (Magnanti, 2001).

Ebenso wurde der EPO-Rezeptor bisher nicht nur in den erythrogeneren Vorläuferzellen, sondern unter anderem im Gehirn, am Herzen und auch in einigen Nierenzellkarzinomen nachgewiesen (Westenfelder, 2000). Dies deutet neben der endokrinen Signalübermittlung auf eine zusätzlich para- und autokrine Wirkung EPOs hin.

Hinsichtlich der Hämatopoese zeigt sich allerdings, dass sich die physiologisch relevante Produktion von EPO auf eine begrenzte Anzahl von Zellen in der Niere beschränkt. Diese ausgesprochen gewebs- und zellspezifische Expression Erythropoietins bildet damit eine Ausnahme im Rahmen der Gene, die sauerstoffabhängig transkribiert werden.

1.3 Das Erythropoietin-Gen und seine Regulation

1.3.1 Lokalisation, Größe und Aufbau des Erythropoietin-Gens

Das EPO-Gen befindet sich auf Chromosom 7 q11-q22 (Law, 1986) und besteht aus ungefähr 8,7 kBp (Yin, 2000). Die meisten Regionen der fünf Exons des EPO-Gens von Mensch und Maus zeigen eine hohe Homologie und sind daher hochkonserviert.

1.3.2 Mechanismen der Erythropoietin-Genregulation

Entscheidend für die EPO-Expression ist die Genregulation auf transkriptioneller Ebene, die wiederum vom Sauerstoffangebot im Organismus abhängt. Nach Aufdeckung des inversen Zusammenhangs zwischen dem Sauerstoffgehalt im Blut und der EPO-Produktion wurde intensiv nach „cis-agierenden“-Faktoren gesucht, die an der Transkription und Stabilisierung der EPO-mRNA beteiligt sind. Experimente, in denen Proteine untersucht wurden, die an den 3'-Enhancer des EPO-Gens binden, konnten den sogenannten HIF-1 Komplex identifizieren, der für die hypoxische Induktion einer EPO-Expression essentiell ist (Semenza, 1992). In späteren Arbeiten wurden zudem die Interaktion des 3'-Enhancers mit dem EPO-Promoter (Blanchard, 1992), das Zusammenspiel von HIF mit HNF-4 (hepatic nuclear factor-4) (Galson, 1994), sowie die Bedeutung zytosolischer, an der EPO-mRNA-Stabilität beteiligter Proteine beschrieben. Anhand von systematischen Deletionsstudien und Reporter-gen-Assays wurde die Domäne im EPO-Gen entdeckt, die an der sauerstoffabhängigen EPO-Expression hauptsächlich beteiligt ist: der 3'-Enhancer mit seinem HRE („hypoxia responsive element „) (Semenza, 1991/1; Pugh, 1991; Madan, 1993).

Der Enhancer befindet sich 120 Bp weiter 3' des Poly-Adenylations-Signals (Poly-A-site) des EPO-Gens (Beck, 1991) und ist ca. 256 Bp lang. Deletions- und Mutationsexperimente identifizierten innerhalb dieses Enhancers einen Bereich von ca. 40-50 Bp, der bei der Hypoxie-induzierten Transkription von EPO eine wichtige Rolle spielt und auch minimaler Enhancer genannt wird. Er besteht aus drei interagierenden Teilen, die jeweils Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren aufweisen.

3' der Poly-A-site befindet sich zunächst der hochkonservierte HIF-1 Bindungsbereich 5'-TACGTGCT-3' (Wang, 1993), das HRE. Der mittlere Teil wird von 3CA Wiederholungen gebildet. Bislang wurden noch keine für diesen Abschnitt spezifischen Bindungsproteine gefunden. Es gibt jedoch Beobachtungen, dass Mutationen in diesem Bereich die hypoxische EPO-Geninduktion beeinträchtigen (Huang, 1995). Die 3'-Stelle

des minimalen Enhancers besteht aus einem hochkonservierten Consensus-Motiv, das von zwei Basen getrennt wird (Blanchard, 1992). Seine Sequenz entspricht fast dem 5'-AGGTCA-3' Motiv, das typischerweise den Steroidhormonen der Zinkfinger-Superfamilie als Rezeptor dient. Abhängig von der Basenzahl, die das sich wiederholende Consensus-Motiv trennt, binden dort spezifische Faktoren, wie unter anderem HNF-4 (hepatic nuclear factor-4) (Galson, 1994).

1.3.2.1 Der Transkriptionsfaktor HIF (hypoxia-inducible factor)

Der Transkriptionsfaktor HIF (hypoxia-inducible factor) besteht aus zwei Untereinheiten, und zwar HIF α und HIF β . Zunächst wurden dabei die Isoformen HIF-1 α und HIF-1 β mittels DNA-affinitätschromatographischer Experimente beschrieben, wobei HIF-1 α mit 826 Aminosäuren ca. 120-130 kDa und HIF-1 β ca. 91-94 kDa groß ist (Wang, 1995). Vergleiche der kodierenden DNA des menschlichen HIF-1 α mit dem der Maus und Ratte zeigten eine über 90%ige Übereinstimmung (Luo, 1997; Wenger, 1996). Seit 1998 wurde von mehreren Arbeitsgruppen unabhängig eine zweite HIF α -Isoform beschrieben, HIF-2 α , welche ein Molekulargewicht von ca. 110 kDa aufweist. Diese HIF α -Isoform ist auch unter den Bezeichnungen EPAS-1 (endothelial PAS domain protein-1), da sie zunächst in Endothelzellen gefunden wurde (Tian, 1997), sowie unter HLF (HIF-1 α -like factor) (Ema, 1997), HRF (HIF-related factor) (Flamme, 1997) sowie MOP2 (member of PAS superfamily 2) (Hogenesch, 1997) bekannt.

Für eine erfolgreiche Transkriptionsinitiation müssen die Partner HIF α und HIF β dimerisieren und in dieser Form an den HRE ihrer Zielgene binden. Ähnlich ist den beiden Partnern, dass sie sowohl eine basic-Helix-Loop-Helix (bHLH)-Domäne, als auch ein PAS-Motiv besitzen (Wang, 1995). PAS steht für die Proteine PER, ARNT und SIM, bei denen diese Sequenz zuerst entdeckt wurde. Zu der PAS-Familie gehört neben HIF-1 α und HIF-2 α die weitere Isoform HIF-3 α (Ema, 1997; Gu, 1998). Sie zeigen alle eine hohe Übereinstimmung in den Aminosäuresequenzen wichtiger funktioneller Domänen (bHLH, PAS, Prolin-Serin-Threonin-reiche Protein-Stabilisierungs-Domänen und Transaktivierungs-Domänen (N-TAD, C-TAD)), und zumindest HIF-1 α und HIF-2 α werden gleichartig reguliert (Ema, 1997; Wiesener, 1998; O'Rourke, 1999).

Die HIF-1 β Untereinheit war zuvor als Bindungspartner anderer bHLH-PAS-Proteine identifiziert worden und ist daher auch als ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear

translocator) bekannt. Die bHLH-PAS Domänen sind in erster Linie für die Dimerisierung und DNA-Bindung verantwortlich.

Für die sauerstoff-abhängige Regulation von HIF α ist dessen posttranslationale Modifikation notwendig. Unter Normoxie erkennt das Protein „von Hippel-Lindau“ (pVHL), das konstitutiv exprimiert wird und Teil eines Ubiquitin-E3-Ligase-Komplexes ist, HIF α und sorgt mittels Polyubiquitinierung für dessen Abbau durch das 26S Proteasom.

Während feststeht, dass HIF für die sauerstoff-abhängige Regulation der EPO-Expression essentiell ist, bleibt bislang unklar, welche der unterschiedlichen HIF α -Isoformen in vivo für die EPO-Expression verantwortlich sind und ob überhaupt eine klare Trennung erfolgen kann. Um die spezifischen Aufgaben und Funktionen von HIF-1 α und HIF-2 α zu beschreiben, wurden zunächst Untersuchungen an HIF-1 α bzw. HIF-2 α homozygoten Knockout-Mäusen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass beide HIF α -Isoformen im Verlauf einer regelrechten Embryogenese essentiell sind. Während bei einem Fehlen von HIF-1 α die Embryonen bereits nach Hälfte der Tragzeit an cerebro- und kardiovaskulären Fehlbildungen sowie Neuralrohrdefekten verstarben (Iyer, 1998; Ryan, 1998), ließ sich bei einer HIF-2 α Defizienz der Tod im Laufe der Gestation oder kurz nach Geburt feststellen (Compernelle, 2002; Peng, 2000; Tian, 1998), wobei sich HIF-2 α insbesondere auf die Gefäßumwandlung (Peng, 2000) und die Regulation der Katecholamin-Homöostase auswirkte (Tian, 1998). Diese Untersuchungen konnten allerdings keine Aussage über die Funktion der HIF α -Isoformen hinsichtlich einer EPO-Expression treffen. Erst eine Untersuchung an Mäusen, die nur ein verändertes HIF-1 α Allel trugen, deutete auf eine wichtigere Rolle von HIF-1 α gegenüber HIF-2 α in der EPO-Expression in vivo hin (Yu, 1999).

Diese Unklarheit, welche der HIF α -Isoformen den entscheidenden Einfluss auf die EPO-Expression ausübt, wurde durch kürzlich veröffentlichte Arbeiten nochmals bestätigt. Studien in hypoxischen Rattennieren zeigten eine alleinige Expression von HIF-2 α in den peritubulären, EPO-produzierenden Fibroblasten, so dass hier eine dominantere Rolle von HIF-2 α gegenüber HIF-1 α angenommen wurde (Rosenberger, 2002). Diese Beobachtung bestätigen auch weitere Arbeiten (Warnecke, 2004; Raval, 2005).

Trotz dieser Kontroverse steht fest, dass -zumindest in vitro- eine Überexpression und Aktivierung von HIF-1 α und HIF-2 α über den HIF-Komplex den EPO-Enhancer aktivieren und eine EPO-Expression hervorrufen können.

Die in dieser Arbeit neben dem EPO-Gen untersuchte Carboanhydrase-9 (CA-9) ist ein membranständiges Enzym, das zinkabhängig mit folgender Reaktion $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ den intrazellulären pH-Haushalt steuert. Interessanterweise hat sich herausgestellt, dass eine CA-9-Expression nur durch HIF-1 und nicht durch die weiteren HIF α -Isoformen hervorgerufen werden kann (Wykoff, 2000). Der pH-Regulation kommt insbesondere beim Tumorwachstum und der Tumورprogression eine Bedeutung zu, indem unter anderem Proteasen aktiviert, die Immunfunktion eingeschränkt oder die Aufnahme von Zytostatika erschwert werden können (Fukumara, 2001).

1.3.2.2 Weitere regulative Elemente

Neben der Identifikation des Transkriptionsfaktors HIF und der HRE-Domäne im Enhancer des EPO-Gens als wesentliche Faktoren der EPO-Genregulation wurden noch weitere regulative Elemente nachgewiesen. Zum einen konnten dabei mit Hilfe von Untersuchungen an EPO transgenen Mäusen (Semenza 1989, 1990 und 1991/2) Regionen am 5' gelegenen Transkriptionsstartpunkt des EPO-Promoters identifiziert werden, die für die zellspezifische EPO-Expression im allgemeinen, aber auch in Niere und Leber verantwortlich zu sein scheinen. Für diese spezifische EPO-Expression sind unterschiedliche Domänen verantwortlich. So wird einem Bereich, lokalisiert zwischen -0,4 bis -6 kB „upstream“ des Transkriptionsstartpunktes, eine repressive Wirkung in den meisten Geweben außer der Niere zugeschrieben. Daneben zeigten sich Bereiche, die die EPO-Expression in der Niere (zwischen -6 und -14 kB) oder in der Leber (oberhalb von -14 kB) kontrollieren.

Neben dieser Beteiligung des Promoters an der gewebespezifischen EPO-Expression stellte sich heraus, dass zum anderen das Methylierungsmuster CpG reicher Regionen, die am EPO-Promoter auffällig häufig vertreten sind, eine entscheidende Rolle spielt (Wenger, 1998; Yin, 2000). Welche Faktoren den Methylierungsstatus der CpG reichen Regionen im EPO-Promoter beeinflussen und welche Auswirkung sie auf die gewebes- und zellspezifische EPO-Expression ausüben, bleibt aber bislang unklar.

1.4 Dysregulation der Erythropoietin-Expression

1.4.1 Bedeutung des Proteins von Hippel-Lindau (pVHL)

Entscheidend für die sauerstoff-abhängige Regulation des Erythropoietin-Gens ist ein unter Hypoxie stabilisiertes HIF α , das nach Dimerisation mit HIF β in den Kern

transloziert, um dort eine vermehrte Transkription seiner Zielgene hervorzurufen. In diesem Prozess kommt dem pVHL eine Schlüsselfunktion bei der proteasomalen Degradation von HIF α unter Normoxie zu.

Das pVHL gehört zu den Tumorsuppressorgenen und weist unterschiedliche funktionelle Domänen auf, eine α - und β -Domäne. Während die α -Domäne mit dem Ubiquitin-E3-Ligase-Komplex interagiert und somit die Erkennung für das 26S Proteasom ermöglicht (Stebbins, 1999), bindet die β -Domäne an die HIF α -Untereinheiten (Ohh, 2000; Tanimoto, 2000).

Der molekulare Mechanismus, auf welche Weise ein intrazellulär erniedrigtes Sauerstoffangebot zu einer Stabilisierung von HIF α führt, blieb lange unklar. Als Sauerstoffsensoren wurden u.a. ein Häm-Protein (Goldberg, 1988) und die Bildung reaktiver O₂ Intermediate (ROI) (Fandrey, 1997; Ehleben, 1998) angenommen. Mittlerweile hat sich herausgestellt, dass in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff im HIF-1 α und HIF-2 α Molekül zwei in deren ODDD (oxygen dependent degradation domain) gelegene Prolylreste (Pro402 und Pro564) durch Prolyl-4-Hydroxylasen hydroxyliert werden. Prolyl-4-Hydroxylasen gehören zu der Familie der 2-oxoglutarat-abhängigen, eisenabhängigen Dioxygenasen, welche Sauerstoff als Ko-Substrat benötigen (Bruick, 2001; Epstein 2001). Daneben gibt es noch einen Asparagylrest im C-terminalen Bereich der HIF α Moleküle (Asn803 für HIF-1 α und Asn851 für HIF-2 α), der von einer spezifischen Asparagylhydroxylase sauerstoff- und eisenabhängig hydroxyliert wird. Diese Reaktion verhindert die Rekrutierung des transkriptionellen Ko-Faktors CBP/ p300 und mindert daher die transkriptionelle Aktivität in Anwesenheit von Sauerstoff. Alle diese Hydroxylasen sind eisen- und 2-oxoglutaratabhängige Dioxygenasen und gelten seit ihrer Identifizierung als entscheidende intrazelluläre Sauerstoffsensoren für die Regulation von HIF (Schofield, 2004).

Nur in hydroxyliertem Zustand erkennt die β -Domäne des pVHL die Prolylreste in der ODDD und sorgt somit für die kontinuierliche, proteasomale Degradation von HIF α unter normoxischen Bedingungen. In diesem Zusammenhang wurde auch klar, dass Substanzen wie Kobaltchlorid oder DFO (Desferrioxamin) unter normoxischen Bedingungen HIF stabilisieren und daher die Transkription von EPO initiieren können, in dem sie mit dem Eisen interferieren und dadurch die spezifischen Prolyl- und Asparagylhydroxylasen inhibieren (Ivan, 2001, Jaakola, 2001, Lando, 2002). Gibt es in der Zelle kein oder nur ein funktionsbeeinträchtigt pVHL, kann dies nicht mehr an HIF α binden. Dies führt über die konstitutive Aktivierung von HIF in den meisten Fällen

zu einer erhöhten Transkription der HIF-Zielgene (Maxwell, 1999). Diese beschriebene Interaktion von HIF α und pVHL in der Zelle unter Normoxie, Hypoxie und bei pVHL-Inaktivierung wird im nachfolgenden Schema, in Abbildung 1, veranschaulicht.

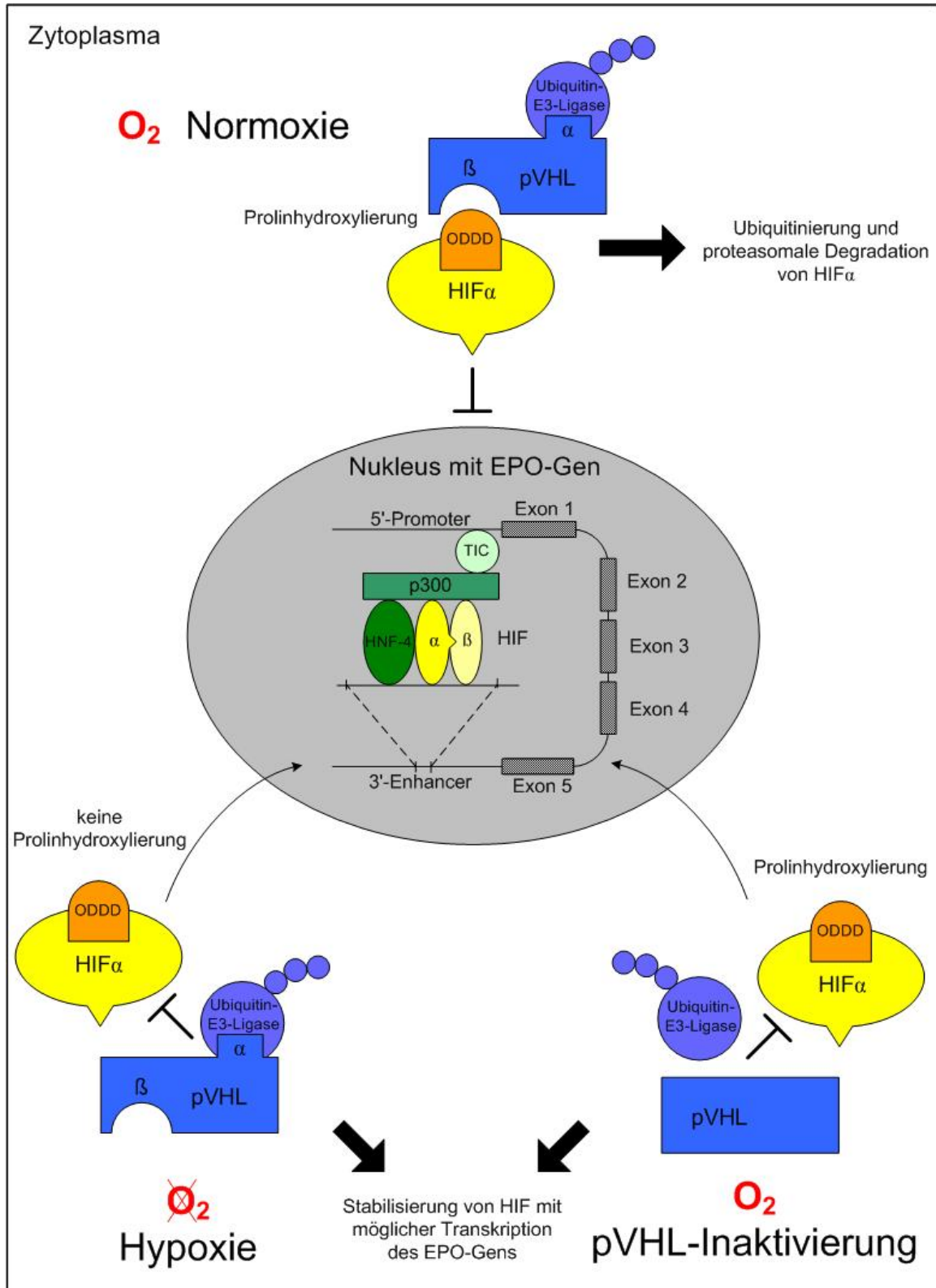


Abb.1 Schema der Interaktion von HIF α und pVHL

Abb.1 In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff werden die Prolylreste in der ODDD von HIF α hydroxyliert und vom pVHL-E3-Ligase-Komplex erkannt. Dies führt zur proteasomalen Degradation von HIF α . Unter Hypoxie hingegen kann HIF α aufgrund fehlender Hydroxylierung der Prolylreste in der ODDD nicht an den pVHL-E3-Ligase-Komplex assoziiert werden. HIF α kann somit in den Kern translozieren, wo es mit HIF β zu HIF dimerisiert. Dort kann es unter anderem an den 3'-Enhancer des abgebildeten EPO-Gens binden, welches fünf Exons umfasst. Am Enhancer interagiert HIF sowohl mit HNF-4 als auch mit p300. Das ermöglicht die sauerstoff-abhängige Transkription des EPO-Gens.

Eine pVHL-Inaktivierung führt zu einer Stabilisierung von HIF α und initiiert somit den Mechanismus der Hypoxie (HIF= hypoxia-inducible factor, ODDD= oxygen dependent degradation domain, pVHL= Protein von Hippel-Lindau, HNF-4= hepatic nuclear factor-4, TIC= Transkriptioninitiationskomplex).

1.4.2 Dysregulation der EPO-Expression in Nierenzellkarzinomen

Bei ca. 1-2% der an einem Nierenzellkarzinom erkrankten Patienten tritt eine Erythrozytose auf, die sich durch die paraneoplastische Erythropoietinproduktion des Tumors erklären lässt (Motzer, 1996). Das Nierenzellkarzinom stellt mit ca. 85% den häufigsten malignen Tumor der Niere dar. Zytogenetische Untersuchungen zeigen insbesondere bei der familiären Form eine Veränderung am kurzen Arm des Chromosoms 3, auf dem unter anderem das von-Hippel-Lindau Gen lokalisiert ist (Seizinger, 1988).

Für die Klassifikation der Nierenkarzinome setzt sich im deutschsprachigen Raum zunehmend die von Thoenes (Thoenes, 1990) begründete „Mainz-Klassifikation“ durch, die zytomorphologische Kriterien und das Wachstumsmuster unterscheidet.

Am häufigsten findet sich der klarzellige Typ (80%), der immunhistochemische Merkmale der proximalen Tubuli aufweist und seinen Namen durch den hohen Lipid- und Glykogengehalt erhalten hat (Mostofi, 1981).

Es ist bemerkenswert, dass die klarzelligen Nierenzellkarzinome vermutlich dem Gewebe des proximalen Tubulus entspringen und daher epithelialen Ursprungs sind (Wallace, 1972; Terreros, 1986). Für die paraneoplastische EPO-Produktion sind diese Tumorzellen verantwortlich. Das bedeutet, dass hier ein anderer Zelltyp als die physiologischerweise EPO-exprimierenden peritubulären Fibroblasten des Nierenkortex die Fähigkeit zur EPO-Expression erlangt hat (Da Silva, 1990, Noguchi, 1999).

Die Beobachtung des Auftretens paraneoplastischer Polyzythämien bei Nierenzellkarzinomen erweckte bereits in der Vergangenheit das Interesse, Nierentumorgewebe hinsichtlich der EPO-Genregulation zu untersuchen. Bisher konnte aber nur in Einzel-Kasuistiken eine Überproduktion von EPO in den Tumorzellen beschrieben werden (Da Silva, 1990, Noguchi, 1999).

Während die Kultivierung EPO produzierender, renaler Fibroblasten misslang und eine EPO-Expression in Zellkultur nie erreicht werden konnte (Fandrey, 2004), gelang es hingegen einigen Arbeitsgruppen, Zellkulturen aus Nierentumorgewebe zu etablieren, bei denen auch nach mehrfachen Passagen EPO nachgewiesen werden konnte. Die EPO-exprimierenden Zell-Linien wurden entweder direkt aus dem Tumor gewonnen (Sytkowski, 1983) oder der Tumor wurde zunächst in Nacktmäuse transplantiert und dann daraus eine Zell-Linie etabliert (Sherwood, 1986). Neben der Kultivierung von Zellkulturen wurden auch Nierenzellkarzinome direkt (Toyama, 1979) oder eine Zell-Linie (Shouval, 1988), die zuvor aus Nierentumorgewebe entstanden war, in Nacktmäuse transplantiert. In beiden Fällen konnte eine durch Erythropoietin verursachte Polyzythämie bei den Versuchstieren induziert werden. Auffällig ist bei all diesen Zell-Linien, dass bereits die Patienten vor Nephrektomie erhöhte Hämoglobin- und Hämatokritwerte aufwiesen, die durch die paraneoplastische Erythropoietin-Produktion hervorgerufen wurden.

1.4.3 Paraneoplastische Erythropoietin-Produktion bei anderen Erkrankungen

Eine paraneoplastischen Produktion von EPO wird nicht nur bei sporadischen Nierenzellkarzinomen, sondern unter anderem auch bei dem familiären von Hippel-Lindau Syndrom und der Chuvash-Polyzythämie beobachtet.

Das von Hippel-Lindau Syndrom, das in Anteilen von von Hippel (Hippel, 1904) und Lindau (Lindau, 1927) beschrieben wurde, ist ein hereditäres Karzinom-Syndrom, das einem autosomal-dominanten Erbgang folgt. Zu der Keimzellmutation (Stolle, 1998) ist die eigentliche Tumorentstehung an die zusätzliche, somatische Inaktivierung oder den Funktionsverlust des gesunden Allels (Shuin 1999; Murgia, 2000), dem Wildtyp-VHL, gebunden, wie es Knudson in seiner "two-hit-theory" über die Karzinogenese beschrieben hat (Knudson, 1993).

Klinisch stehen tumoröse, hämangioblastische Veränderungen im ZNS, v.a. im Kleinhirn, im Rückenmark und an der Retina im Vordergrund. Daneben treten Tumore auch in anderen Organen auf, wie beispielsweise Inselzelltumoren im Pankreas,

Phäochromozytome Typ II in der Nebenniere und klarzellige Nierenkarzinome. Alle diese Tumoren können mit einer Polyzythämie einhergehen (Prchal, 2001). Die meisten Patienten sterben mittleren Alters häufig an den Nierenzellkarzinomen oder an Hämangioblastomen im ZNS (Iliopoulos, 2001).

Die Chuvash-Polyzythämie ist eine regional gehäuft auftretende Erkrankung in der mittleren Wolgaregion Russlands. Ursache für die autosomal-rezessive Erkrankung ist eine Punktmutation im VHL-Genlocus. Die betroffenen Patienten weisen den Basenaustausch 598 C->T auf. Erkrankte sind homozygot für T. Auf Proteinebene bedeutet dies, dass Arginin200 durch Tryptophan im pVHL ersetzt wird. Das mutierte pVHL ruft daher eine ineffiziente Degradation von HIF α hervor, da es nur eingeschränkt an HIF α binden kann. Die daraus resultierende Verlangsamung der Ubiquitinierung und Degradation von HIF α führt somit zu einer erhöhten HIF-Aktivität unter normoxischen Bedingungen (Ang, 2002/1).

Trotz der erhöhten Hämatokritwerte haben die Patienten häufig normale EPO-Serumwerte. Zusätzlich zeigen sich Merkmale sowohl der primären, als auch der sekundären Polyzythämie. Daher sterben die Patienten meistens an Blutungen oder Thrombenbildung (Ang, 2002/1 und 2, Pastore, 2003/1). Interessanterweise zeigen diese Familien jedoch keine Häufung von Tumormanifestationen. Mittlerweile wurden ausserdem noch weitere nicht-tumorigene VHL-Mutationen in Fällen von kongenitaler Polyzythämie identifiziert (Pastore, 2003/2; Bento, 2005; Cario, 2005). Hinsichtlich ihrer EPO-Dysregulation stellen Erkrankungen wie das Nierenzellkarzinom, das von Hippel-Lindau Syndrom und die VHL-assoziierten kongenitalen Polyzythämien eine Besonderheit dar: ihnen ist eine Veränderung im pVHL gemeinsam.

Die weitere Erforschung dieser Erkrankungen könnte daher dazu beitragen, die sauerstoffabhängige EPO-Regulation und gewebs- und zellspezifische EPO-Expression aufzuklären sowie einen möglichen Einfluss des pVHLs auf die EPO-Expression zu überprüfen.

2 Herleitung

Die Mechanismen der gewebe- und zellspezifischen Genexpression Erythropoietins bleiben auch nach Kenntnis der sauerstoffabhängigen Transkription durch HIF unklar. Obwohl die Anwesenheit HIFs für die EPO-Genexpression essentiell ist, zeigten Arbeiten an transgenen Mäusen, dass noch weitere regulatorische Faktoren an der EPO-Genregulation in Leber und Niere beteiligt sind, welche selbst bei erhöhter HIF-Aktivität die EPO-Expression unterdrücken können (Maxwell, 1997).

Bei Betrachtung der Dysregulation der EPO-Expression, wie sie unter anderem in Nierenzellkarzinomen, dem von Hippel-Lindau Syndrom, der Chuvash-Polyzythämie sowie einigen kongenitalen Polyzythämien auftritt, fällt auf, dass bei all diesen Erkrankungen eine Veränderung im pVHL vorliegt. Die dabei beobachtete Überexpression von EPO lässt sich nicht allein durch eine erhöhte HIF-Aktivierung erklären. Dies weckt die Frage, ob pVHL unabhängig von HIF in der Regulation und Expression des Erythropoietin-Gens eine Bedeutung zukommt.

Charakteristische Veränderungen des VHL-Gens scheinen mit einer EPO-Überexpression zu korrelieren. Dieser mögliche Mechanismus könnte nicht nur von Interesse hinsichtlich der Expression und Funktion von EPO in Tumoren sein, sondern darüber hinaus einen möglichen Einfluss des pVHLs auf die gewebe- und zellspezifische Genregulation von Erythropoietin aufdecken.

Um Arbeiten durchführen zu können, die es ermöglichen, die Regulationsmechanismen der gewebe- und zellspezifischen Erythropoietin-Genexpression grundlegend zu untersuchen, wurden aus renalem Tumorgewebe Primärkulturen gewonnen, mit dem Ziel, eine EPO-exprimierende Zell-Linie zu etablieren. Vor dem Hintergrund des jeweiligen HIF und pVHL-Status werden dadurch Untersuchungen der EPO-Expression möglich: zum einen unter verschiedenen Bedingungen wie Normoxie und Hypoxie, zum anderen können EPO-Expressionsveränderungen, die gegebenenfalls nach Durchführung stabiler Transfektionen mit dem Wildtyp-VHL und der Chuvash-Mutation auftreten, beobachtet und interpretiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Sammlung des humanen Nierengewebes

Vor Verwendung des Nierengewebes zu wissenschaftlichen Zwecken wurden vor den geplanten Tumornephrektomien Einverständniserklärungen von den Patienten unterzeichnet (Ethik-Kommission (Antrag-Nr.: 7/2000, Titel der Studie: "Bedeutung des von Hippel-Lindau Gens für die Regulation Hypoxie-abhängiger Transkriptionsfaktoren in Nierentumoren")). Insgesamt wurden Proben von 22 Patienten nach radikaler Tumornephrektomie aus dem Universitätsklinikum Charité zu Berlin gesammelt. Unmittelbar nach Entnahme der Niere wurden sowohl zwei makroskopisch erkennbare Tumorgewebsstücke, als auch eine Probe gesunden Gewebes derselben Niere entnommen. Für die Gewebeuntersuchungen wurden eine Probe des Tumors und eine der gesunden Niere in flüssigen Stickstoff überführt, um sofort zu gefrieren. Bis zur weiteren Analyse verblieb das Material auf -80°C .

Unabhängig von den Untersuchungen dieser Arbeit wurde das Nierengewebe in der Pathologie des Universitätsklinikums Charité zu Berlin histopathologisch beschrieben. Für die Etablierung einer Zellkulturlinie aus dem gewonnenen Tumormaterial wurde diese Gewebeprobe sofort steril in 4°C kaltem PBS (Dulbeccos's Phosphat Buffered Saline, enthält kein Mg^{2+} und kein Ca^{2+} ; PAA Laboratories GmbH, Österreich) bis zur anschließenden Tumorzelleextraktion verwahrt (weiteres Verfahren siehe 3.2).

3.2 Tumorzelleextraktion

Zur Etablierung einer Zellkulturlinie aus den gewonnenen Tumorgewebeproben wurden makroskopisch sichtbare bindegewebige Anteile weggeschnitten und der Tumor mechanisch zerkleinert. Nachfolgend wurde ein Enzymverdau (100U/ml DNaseI, 50U/ml CollagenaseIII, 150U/ml CollagenaseIV und 200U/ml Hyaluronidase (alle Enzyme von Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in einem Finalvolumen von 20ml PBS für zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad durchgeführt.

Zur Aufreinigung der Zellen wurde das Material anschließend 5 Minuten bei 800U/min zentrifugiert (Heraeus Instruments, Biofuge fresco, Deutschland). Nach Zurückgeben des Überstandes in den Enzymmix folgte die Erythrozytenlyse, da diese in der Primärkultur unerwünscht waren. Zu der Lyse wurde steriles Wasser (Delta Select) auf

das Pellet gegeben und 30 Sekunden geschwenkt, bis durch Zugabe einer 3,5% Natriumchlorid-Lösung wieder ein isotones Milieu hergestellt worden war.

Nach erneuter Zentrifugation (5 Minuten, 800U/min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in Leibovitz-Nährmedium aufgenommen (enthält zusätzlich 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FKS), 1mM Glutamin, 100µg/ml Penicillin/Streptomycin (beides von Biochrom KG, Berlin), 1g/l Glukose, 1% MEM-Vitamine, 80IE Insulin, 2,5mg/l Transferrin und 1g/l Natriumbicarbonat, (alle von Sigma-Aldrich, Deisenhofen).

Nach 24h wurde das Medium gewechselt, um nicht-haftende und zerstörte Zellen zu entfernen. Das Medium der Primärkulturen wurde 2-3mal in der Woche erneuert. Da das Zellwachstum und die Zelldichte anfangs zu gering waren, konnte meistens erst nach 28 Tagen passagiert werden. Sobald sich eine gut wachsende Zell-Linie etabliert hatte, wurde RPMI-Nährmedium (Biochrom, Berlin) (10% FKS, 2mM Glutamin, 100µg/ml Penicillin/Streptomycin) eingesetzt.

3.3 Zellkultur

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz gezüchtet, wobei das Nährmedium je nach Wachstumsgeschwindigkeit gewechselt wurde, sodass immer optimale Ernährungsbedingungen und pH-Verhältnisse herrschten. Anschließend wurden die Zellen entweder durch Trypsinierung in neue Zellkulturflaschen überführt oder zur Lagerung bei -170°C vorbereitet.

Für den Einfriervorgang wurde nach der Trypsinierung eine Einfrierlösung bestehend aus supplementiertem Nährmedium mit 5% DMSO (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) zugegeben. DMSO verhindert beim Einfrieren durch seine detergierende Wirkung ein Zerreißen der Zellmembranen, die sonst durch die Wasserexpansion in den Zellen auftreten würde. Um die toxische Wirkung des DMSO auf den Zellstoffwechsel zu reduzieren, wurden die Zellen sukzessive auf -80°C eingefroren und dann auf flüssigen Stickstoff transferiert.

3.4 Proteinnachweis im Immunoblot

3.4.1 Proteinextraktion

Um die Degradation der Proteine zu minimieren, wurden alle Schritte der Proteinextraktion auf Eis und mit gekühlten Reagenzien durchgeführt.

Zwei subkonfluente Zellkulturschalen (15cm Durchmesser) wurden jeweils vier Stunden in einer hypoxischen (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) oder normoxischen Umgebung inkubiert (NuAire Inkubator, Zapf, Sarstedt). Nach Verwerfen des Mediums wurden die mechanisch mit dem Zellkulturschaber gelösten Zellen in 4°C kaltes PBS überführt und bei 4°C, 5 min, 2000U/min zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 4503). Das Pellet wurde in 500µl Extraktionspuffer aus 7M Harnstoff, 10% Glycerol, 1% Sodiumdodecylsulfat (SDS), 10mM Tris pH 6,8, 5mM Dithiothreitol (DTT) und 0,5mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und jeweils 1mg/ml der Proteinaseinhibitoren Aprotinin, Pepstatin und Leupeptin (alle Reagenzien von Sigma-Aldrich, Deisenhofen) aufgenommen und mit dem Ultra-Turrax (IKA, Staufen) mechanisch homogenisiert. Anschließend wurden die Proben bei 4°C, 5 min, 2000U/min (Eppendorf Zentrifuge 4503) zentrifugiert und der Überstand abgenommen

3.4.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung erfolgte mit Hilfe des BioRad DC Protein Assay (Bio-Rad, München) nach Anweisung des Herstellers. Die Absorption wurde mit dem Photometer (DYNATECH, Guernsey Channel Islands) bei $\lambda = 750\text{nm}$ gemessen. Anschließend wurden die Proben mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf -80°C gelagert.

3.4.3 Immunoblotting

Für den Nachweis der Proteine HIF-1 α und HIF-2 α (Molekulargewicht ca. 120 kDa und ca. 110kDa) wurden die Proteinextrakte in einem SDS/6%igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE).

Es wurden 60µg der Proteinextrakte, jeweils paarweise das Extrakt der Normoxie und das dazugehörige der Hypoxie, zusammen mit 5xLadepuffer (250µM Tris, 50% Glycerol, 10% SDS, 500µM DTT, 0,5% Bromophenol Blau) auf das Gel gegeben.

Als interne Kontrolle der hypoxischen HIF α Induktion dienten Proteinextrakte der humanen Hepatom-Zell-Linie Hep3B. Das Mitführen eines Proteinmarkers (Rainbow TM, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) auf jedem Gel ermöglichte es, die Position der Banden einem Molekulargewicht zuordnen zu können.

Nach ca. zweistündiger Elektrophorese in Elektrophoresepuffer (25mM Tris-Base, 200mM L-Glycin, 0,1% SDS) bei 12mA pro Gel erfolgte der Transfer (Transferpuffer mit 10mM L-Tris, 100mM L-Glycin, 10% Methanol (Merck, Darmstadt), 0,05% SDS) der

Proteine auf eine Immobilon P-Membran aus PVDF (Millipore, Bedford, USA) bei 20 Volt über Nacht.

Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurden die Membranen anschließend drei Stunden in einer PBS/0,1%Tween 20 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) enthaltenden 5%igen Milch geblockt. Danach erfolgte eine 90 minütige Inkubation mit einem anti-HIF-1 α monoklonalem Antikörper (Transduction Laboratories, Lexington, USA) oder einem anti-HIF-2 α monoklonalen Antikörper (NOVUS Biologicals, Littelton, USA) in einer Konzentration von 1 μ g/ml. Nach Waschen in PBS/0,1%Tween 20 wurde der sekundäre HRP (horseradish peroxidase)-konjugierte Antikörper Ziege-anti-Maus für HIF-1 α und Schwein-anti-Hase für HIF-2 α (beide von DAKO, Ely, UK) für 60 Minuten dazugegeben. Die Signale wurden nach erneutem, gründlichem Waschen mittels Chemilumineszenznachweis (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, Pierce, Rockford, USA) nach Angaben des Herstellers auf Röntgenfilmen (Kodak X-OMT LS 35x43 cm, Kodak) detektiert.

Nach dem Nachweis wurden die Membranen mit Coomassie Blue (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gefärbt, um gleichmäßige Proteinladungen und regelrecht stattgefundenen Proteintransfer kontrollieren zu können.

3.4.4 Auswertung der Signale im Immunoblot

Die Expression des Proteins HIF-1 α wurde semiquantitativ bestimmt und mit dem Signal des hypoxischen Hep3B-Standards verglichen. Keine Expression wurde mit (\emptyset), ein konstitutives Signal mit (\rightarrow) und eine induzierbare Expression mit (\uparrow) bewertet.

3.5 RNA Protection Assay

3.5.1 RNA-Extraktion

3.5.1.1 RNA-Extraktion aus Zellkultur

Nach Inkubation je zweier subkonfluenten großer (15cm Durchmesser) Zellkulturschalen in Hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) und Normoxie (NuAire Inkubator, Zapf, Sarstedt) für 16 h wurden die Zellen durch Trypsinierung gelöst und bei 4°C, 5 Minuten, 2000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet nach Angaben des Herstellers in 1ml RNazol B (Biogenesis, Poole, UK) gelöst. Das weitere Verfahren der RNA-Extraktion aus Zellkulturen entspricht der RNA-Gewinnung aus Gewebestücken, siehe 3.5.1.2.

3.5.1.2 RNA-Extraktion aus Gewebe

RNA wurde nach Angaben des Herstellers mit RNAzol B extrahiert. Für die Extraktion aus Gewebe wurden die Gewebebrocken unter flüssigem Stickstoff zerkleinert, gewogen, in zehnfachem Volumenanteil RNAzol B aufgenommen und anschließend 30 Sekunden elektrisch homogenisiert (IKA Ultra-Turrax T8, Staufen). Nach Hinzufügen eines Zehntel Volumenanteils Chloroform mit nachfolgendem elektrischen Mischen wurden die Proben bei 4°C, 15 Minuten, 13000U/min zentrifugiert (Methode nach Chomczynski und Sacchi, 1987, bei der durch das saure Phenolthioisocyanat nach Chloroformzugabe die DNA in die Interphase gedrückt wird). Die obere wässrige Phase mit der darin gelösten RNA wurde dann abgenommen und eine gleiche Menge Isopropanol dazugegeben. Zur anschließenden Präzipitation verblieben die Proben nach gründlichem elektrischen Mischen für mindestens eine Stunde bei 4°C.

Nach erneutem Zentrifugieren bei 4°C, 15 Minuten bei 13000U/min wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat nach Waschvorgängen mit 70%igem Ethanol erneut durch Zentrifugation aufgereinigt. Das weitgehend trockene RNA-Pellet wurde dann je nach Größe in 50 bis 100µl Hybridisationspuffer (80% Formamid, 40mM Pipes pH 6,8, 400mM Natriumchlorid und 1mM EDTA) aufgenommen. Um das Pellet darin aufzulösen wurden die Proben 10 Minuten auf 95°C erhitzt.

3.5.2 Quantifizierung der RNA-Extrakte

Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch nach einer 1:100 Verdünnung der RNA mit destilliertem Wasser. Die Absorption wurde bei den Wellenlängen $\lambda = 260\text{nm}$ und 280nm bestimmt, wobei der Quotient $A_{260}:A_{280}$ der Beurteilung einer möglichen Proteinkontamination der RNA-Extrakte diente und zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollte. Die RNA-Konzentration wurde bei einer Absorption mit $\lambda = 260\text{nm}$ bestimmt, mit $A_{260}=1$ entspricht $40\mu\text{g RNA/ml}$.

3.5.3 Herstellung der radioaktiven Sonden

Im nephrologischen Forschungslabor lagen Plasmide mit einer definierten Sequenz der Gene für CA-9 und EPO vor. Die integrierten Genabschnitte der verschiedenen Gene haben unterschiedliche Längen: 146 Basenpaare für CA-9 (Accession Nr.: Z54349, geschütztes Fragment Nukleotid 3631-3777), 151 Basenpaare für EPO (Accession Nr.: X02157, geschütztes Fragment Nukleotid 358-391) und 107 Basenpaare für die U6 kleine nukleäre RNA (U6sn) (Accession Nr.: X01366, geschütztes Fragment Nukleotid

1-107). Die U6sn ist ein in der Evolution konserviertes Strukturgen, das als interne Kontrolle jeder einzelnen Probe benutzt wurde.

Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte in einem Transkriptionsansatz mit finalem Volumen von 20 μ l (1x Transkriptionspuffer, 10mM DTT, je 0,5M CTP, ATP, UTP, 20 Einheiten Human Placenta RNase Inhibitor (alle Roche, Mannheim), 4 μ l ³²P GTP (Amersham, Freiburg), 1 μ g des als Matrize dienenden Plasmids und entweder 20 Einheiten SP6 Polymerase oder, für die U6sn, T7 Polymerase (Boehringer), der zur Herstellung der RNA-Stränge für 90 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert wurde.

Für die DNA-Elimination wurden anschließend 20 Einheiten DNaseI (Roche, Mannheim) dazugegeben und für weitere 30 Minuten inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion dann durch Zugabe eines vierfachen Volumens an Säulenpuffer (100 μ M Tris pH7,5, 50nM EDTA, 0,0005% SDS). Um nicht inkorporierte Nukleotide zu entfernen, wurde das Gemisch zur Aufreinigung durch G-50 Sephadex Säulen (Roche, Mannheim) filtriert.

Die Fällung der in dem durch die Säule aufgereinigten Volumen enthaltenen Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe einer 2,5 fachen Menge absoluten Ethanol und 1/10 Volumenanteils 3M Natriumazetat pH 5,5, Gefrieren auf Trockeneis, Auftauen bei -20°C und anschließendem Zentrifugieren bei 4°C, 15 Minuten, 15000 U/min. Die Präzipitate wurden dann in 100 μ l Hybridisationspuffer (80% Formamid, 40mM Pipes pH 6,4, 400mM Natriumchlorid und 1mM EDTA) aufgenommen und durch zehnmütiges Erhitzen auf 95°C und wiederholtem elektrischen Mischen in Lösung gebracht.

Die Radioaktivität der Sonden wurde nach Abkühlung in einem Szintillationszähler (Wallac, Boston, USA) gemessen.

3.5.4 RNase Protection Assay

Für die Hybridisierung der RNA-Extrakte mit den radioaktiven Sonden CA-9 und EPO wurden 20 μ g für die CA-9 Sonde und 50 μ g für die EPO Sonde totaler RNA eingesetzt. Die RNA-Menge der zu untersuchenden Zielgene wurde in 50 μ l Hybridisationspuffer gegeben. Diesem Ansatz wurde als interne Kontrolle je 1 μ g RNA für die Hybridisierung mit der U6sn Sonde entnommen und anschließend auch in 50 μ l Hybridisationspuffer aufgenommen.

Um den RNase Verdau zu kontrollieren, wurde für jede Sonde ein Ansatz aus purem Hybridisationspuffer ohne RNA mitgeführt und im weiteren Verlauf identisch zu den anderen Proben behandelt.

Die radioaktiv markierten Sonden wurden nun in einem mindestens zehnfachem Überschuss hinzugegeben, sodass alle zu detektierenden Genabschnitte von den Sonden gebunden werden konnten.

Die nachfolgende RNA Denaturation erfolgte durch Erhitzen des Hybridisationsansatzes bei 95°C für 15 Minuten. Anschließend verblieben die Proben zur Bindung des zu analysierenden Genabschnitts an die markierte Sonde bei 55°C für die U6sn RNA und 58°C für CA-9 und EPO für 16 Stunden im Wasserbad. Die unterschiedlich gewählte Temperatur sollte dazu beitragen, bei der Bildung des RNA-Doppelstrangs unspezifische Bindungen zu verringern, die u.a. bei zu niedrigen Temperaturen abhängig vom Basenanteil in der Sequenz auftreten können.

Überschüssige Sonden-Anteile sowie restliche einzelsträngige mRNA wurden danach mit RNase A (40µg/ml) und T1 (2µg/ml) (Roche, Mannheim) in 350µl RNase Puffer (10mM Tris-Cl pH 7,5, 5mM EDTA, 300mM Natriumchlorid) gegeben, elektrisch gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

1/10 des Kontrollansatzes, d.h. 100ng RNA, wurde dann zur internen Kontrolle aus dem Gemisch der U6sn RNA entnommen und zu dem äquivalenten Ansatz des Zielgens gegeben.

Zur Extraktion wurden die Proben anschließend mit einer zum Probenansatz entsprechenden Menge Phenol/Chloroform aufgereinigt. Nach gründlichem elektrischen Mischen und Zentrifugation bei 4°C, 15 Minuten, 13000U/min bildeten sich drei Phasen aus: dabei befand sich in der unteren Schicht die organische Phase mit Phenol/Chloroform, in der Interphase Proteine und in der oberen Schicht die wässrige Phase mit der RNA.

Diese wurde abpipettiert und die RNA mit Hilfe eines 2,5 fachen Volumenanteils von absolutem Ethanol und 40µg tRNA (Roche, Mannheim) auf Trockeneis gefällt. Nach Auftauen der Proben bei -20°C konnte die RNA bei 4°C, 15 Minuten, 13000U/min zentrifugiert werden. Jedes Pellet wurde dann in 5µl Ladepuffer (80% Formamid, 1x TBE, < 0,1% Bromophenol blue und < 0,1% Xylene Cyanol) gegeben und durch Vortexen und Erhitzen auf 95°C in Lösung gebracht, sodass eine RNA-Ladung des Polyacrylamidgels in Einzelstrangform möglich war.

Anschließend wurden die Proben auf ein 8%iges Polyacrylamidgel (Kit der Firma Sequagel, National Diagnostics Inc., Hessele Hull, GB) aufgetragen. Um im Anschluß die Position der Banden bestimmen zu können, wurde in die erste Bahn ein radioaktiver Marker (pBR322 DNA-Mspl Digest, New England Biolabs, Frankfurt) und in die letzten Bahnen die radioaktiven Sonden geladen.

Bei 65 Watt lief die denaturierende Elektrophorese über ca. zwei Stunden. Danach wurde das Gel vorsichtig entnommen und über zwei Stunden auf einem Filterpapier (Whatman) bei 80°C im Vakuum getrocknet. Anschließend erfolgte die Exposition des getrockneten Gels auf einen Röntgenfilm (Kodak X-OMT LS 35x43 cm, Kodak) über Nacht bei -80°C. Nach Filmentwicklung konnten Signale als geschwärzte Banden detektiert werden.

3.6 In-situ-Hybridisierung

(in Kooperation mit der wissenschaftlichen Arbeitsgruppe von Professor Ratcliffe in Oxford, England)

Für die In-situ-Hybridisierung wurden Tumorgewebsproben anhand der zuvor durchgeführten RNase Protection Assays (RPA) ausgewählt. Dabei wurden Tumore eingesetzt, die im RPA entweder ein sehr deutliches, ein weniger deutliches und ein schwaches EPO-Signal zeigten.

Von den eingefrorenen Tumorgewebsproben wurden dann im Kryotom bei -20°C 2-5µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Silan-beschichteten Objektträgern fixiert und anschließend in das Labor von Professor Ratcliffe in Oxford geschickt, um weiterbearbeitet zu werden.

Da die in-Situ Hybridisierung daher nicht im eigenen Labor durchgeführt wurde, sei sie hier nur in den Grundzügen dargestellt. Die angewandte Technik wurde unter anderem von dem kooperierenden Labor vorbeschrieben ([Maxwell, 1997](#)).

Zur Detektion der EPO-mRNA wurde ein mit ³⁵S-UTP (Amersham Biosciences, Freiburg) markierter RNA-Strang des gesamten kodierenden Bereichs des EPO-Gens generiert. Nach Andau der Gewebsschnitte mit Proteinase K und Hydrolysierung des ³⁵S-UTP markierten RNA-Strangs wurde dieser mit den Gewebeschnitten inkubiert. Daraufhin ließen sich die markierten Zellen in der Dunkelfeldmikroskopie erkennen.

3.7 Stabile Transfektion

Um die Auswirkung von mutiertem pVHL auf die EPO-Expression zu untersuchen, wurden VHL und EPO negative RCC4-Zellen ([Maxwell, 1999](#)) mit der Cuvash-Mutante des VHL-Gens stabil transfiziert. Dazu wurde ein Expressionsplasmid (pSP72) mit der cDNA für VHL eingesetzt, welches zuvor einer gezielten Mutagenese (598C>T) unterzogen worden war. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Professor Maxwell (Imperial College, G.B.) zur Verfügung gestellt. Zur besseren Erkennung des Transgens in den Zell-Lysaten wurde die VHL-cDNA zusätzlich mit einem „Hämagglutinin-Tag“ (HA) versehen. Die Klone ließen sich daher spezifisch mit einem anti-HA Antikörper 12CA5 (Roche, Mannheim) mit einer Lösung von 0,5µg/ml analysieren.

Die Transfektion in die RCC-4 Zellen erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenz FuGene6 (Roche, Mannheim) gemäss der Empfehlung des Herstellers. Für die Klonierung positiver Zellen wurde nach 24 Stunden dem Kulturmedium ein Selektionsmarker zugesetzt, und zwar Neomycin (PAA, Coelbe, Deutschland), mit der in vorherigen Arbeiten ermittelten, optimalen Konzentration von 1mg/ml. Neomycin führt zum Zelltod von Zellkulturen, sofern kein Resistenz-Gen transfiziert wurde. Das pSP72 Plasmid verfügte daher über ein Neomycin Resistenz-Gen. Nach erfolgreicher und stabiler Integration des Transgens in das Genom der RCC-4 Zellen konnten die Zellen durch ihre Resistenz gegenüber Neomycin im Verlauf von ungefähr 2-3 Wochen klonal herangezüchtet werden. Bei makroskopisch sichtbaren Kolonien wurden diese mittels Klonierungszylinder (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) trypsiniert und getrennt aufgezüchtet.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, die Besonderheit der gewebs- und zellspezifischen EPO-Genregulation vor dem Hintergrund eines möglichen Einflusses des pVHL auf die EPO-Expression zu erklären. Für die Untersuchungen des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus wurden 22 Tumorgewebsproben gesammelt, aus denen nach erfolgreicher Etablierung und Hinzunahme extern gewonnener Nierenzellkarzinom-Zellkulturen 24 Zell-Linien zur Verfügung standen, von denen ausreichend Material für die Protein- und mRNA-Nachweise gewonnen werden konnte.

4.1 Tumorkollektiv

Für die Etablierung einer EPO-produzierenden Zell-Linie waren 22 Tumorgewebsproben von Patienten mit Nierenzellkarzinomen (NZK) gesammelt worden. Diese wurden unabhängig von der Fragestellung dieser Arbeit histopathologisch am Universitätsklinikum Charité zu Berlin aufgearbeitet und entsprechend der „Mainz-Klassifikation“ nach Thoenes ([Thoenes, 1990](#)) eingeteilt. Dabei fanden sich 20 (ca. 91%) vom klarzelligen, einer vom papillären und einer vom chromophilen Typ. Dieses Ergebnis entspricht ungefähr der in der Literatur beschriebenen prozentualen Verteilung der histopathologischen Typen des NZKs ([Kovacs, 1997](#)).

4.1.1 EPO- und CA-9-mRNA Expression im Tumor- und gesunden Nierengewebe

Um die mRNA Expression des HIF Zielgens EPO darzustellen, wurde die quantitative Methode des RNase Protection Assays (RPA) gewählt. Für die jeweils abgebildeten Tumoren wurde die mRNA Expression der Carboanhydrase-9 (CA-9) zusätzlich untersucht, da sie als charakteristischer Marker von NZK beschrieben wurde ([Wykoff, 2000](#)). Sie wird daher in den meisten Tumorproben exprimiert und ist, im weiteren Gegensatz zu EPO, als ein spezifisches Zielgen von HIF-1 α identifiziert worden ([Raval, 2005](#); [Warnecke, 2004](#)).

In keinem der gesunden Nierengewebsproben konnte eine EPO-mRNA Expression detektiert werden. In den dazugehörigen, untersuchten Tumorgeweben konnte in allen Proben eine deutliche CA-9-mRNA Expression gefunden werden, deren Nachweis auf die Aktivierung des HIF-Transkriptionskomplexes in den Tumorgewebsproben hindeutete. Im ausserordentlichen Gegensatz dazu zeigten aber nur 9 (ca. 40%) der 22

untersuchten Proben eine EPO-mRNA Expression im Tumorgewebe, trotz offensichtlicher Aktivierung des HIF-Transkriptionskomplexes. Bemerkenswerterweise gehörten alle diese 9 EPO-exprimierenden Proben dem klarzelligen Typen an. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden mittlerweile annähernd 100 Nierenzellkarzinome auf EPO untersucht, bei denen ebenfalls ca. 40% eine EPO-Expression zeigten und damit im grossen Kollektiv das Ergebnis bestätigen konnten (Daten nicht gezeigt). Das sehr unterschiedliche EPO- und CA-9-mRNA Expressionsverhalten demonstriert Abbildung 2 beispielhaft anhand eines RNase Protection Assays.

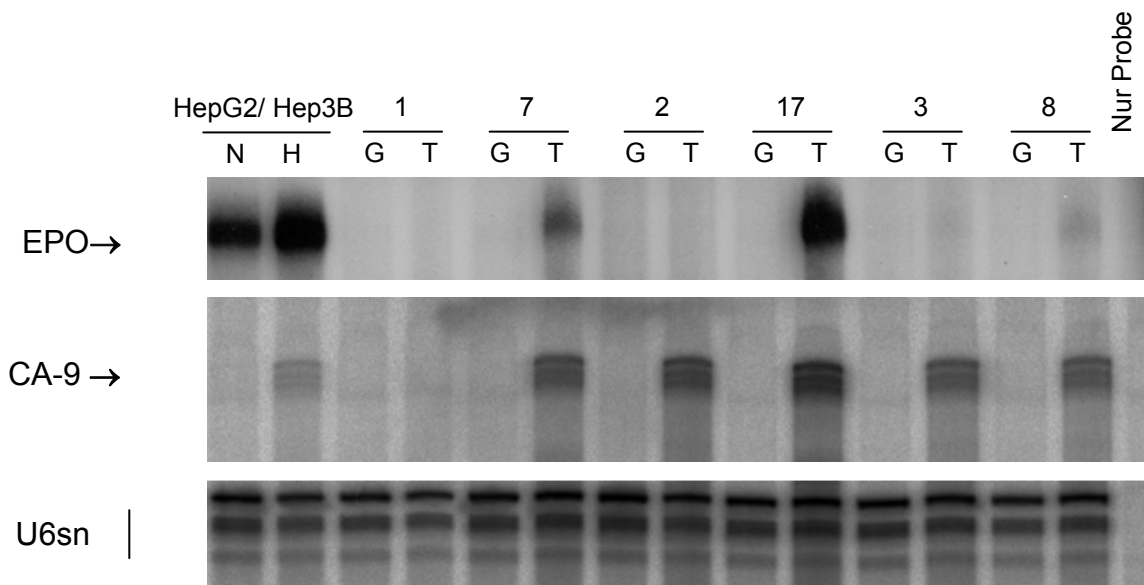


Abb.2 EPO- und CA-9-mRNA Expression bei einer repräsentativen Auswahl klarzelliger Nierenzellkarzinome

Abb.2 Dargestellt ist die EPO- und CA-9-mRNA Expression mittels RNase Protection Assay (RPA) bei sechs klarzelliger Nierenzellkarzinomen derselben Patienten und RNA Extrakte. Hervorgehoben wird dabei, dass eine deutliche Induktion der CA-9-mRNA Expression bei fünf der dargestellten Gewebeproben vorhanden war, weshalb eine Aktivierung des HIF-Transkriptionskomplexes angenommen werden kann. Eine EPO-mRNA Expression im Tumorgewebe konnte dagegen nur bei ca. 40% der untersuchten Gewebeproben nachgewiesen werden. Die Signale waren hier zum Teil wesentlich schwächer als bei der CA-9-mRNA Expression. Als Kontrolle jeder einzelnen Probe diente das Strukturgen U6sn (U6 small nuclear RNA). Für das RPA von EPO wurden HepG2-Zellen, für das RPA von CA-9 Hep3B-Zellen als Standard benutzt nach einer hypoxischen Stimulation über 16 h bei 1% O₂. Die benutzten Gewebeproben

entsprechen den Patienten mit X= Patientenummer (G= gesundes Nierengewebe, T= Tumor, N= Normoxie, H= Hypoxie).

4.1.2 Gegenüberstellung der EPO-Expression in NZK mit präoperativen Hämoglobin-Konzentrationen

Über die funktionelle Auswirkung der EPO-Expression in Nierenzellkarzinomen hinsichtlich der Hämatopoiese herrscht bislang noch Unklarheit. In ungefähr 40% der untersuchten Proben ließ sich in dieser Arbeit eine EPO-mRNA Expression im Tumorgewebe nachweisen. In dem Patientenkollektiv gab es keinen mit einer paraneoplastischen Polyzythämie, welche allerdings insgesamt nur bei weniger als 5% der an einem Nierenzellkarzinom erkrankten Patienten gefunden werden können (Motzer, 1996). In dem grossen Kollektiv der gesamten Arbeitsgruppe (100 Tumoren) konnte auch nur ein Patient mit einer paraneoplastischen Polyzythämie gefunden werden.

Um einen möglichen Einfluss der EPO-Expression im Tumorgewebe auf die Hämatopoiese zu untersuchen, wurden die präoperativ erhobenen Hämoglobin-Konzentrationen des Patientenkollektivs vor dem Hintergrund der jeweiligen EPO-Expression in den Nierenzellkarzinomen betrachtet. Dabei streuten bei den Patienten mit einer positiven EPO-mRNA Expression die präoperativ erhobenen Hämoglobinwerten um einen Mittelwert von 14,4g/dl und bei denen, die keine EPO-mRNA Expression zeigten, um 13,2g/dl, sodass sich hier insgesamt eine Tendenz zu höheren Hämoglobin-Werten bei den Patienten mit einer positiven EPO-mRNA Expression abzeichnete. Eingebettet in das grössere Tumorkollektiv, das der Arbeitsgruppe zur Verfügung stand, konnte diese Tendenz bestätigt werden. Die Auswertung dieser Daten erreichte dabei jedoch gerade nicht statistische Signifikanz ($p=0,06$; Daten nicht gezeigt).

Um eine Übersicht über die bisher dargestellten EPO-Expressionsergebnisse sowie die im Patientenkollektiv erhobenen klinischen Daten zu erlangen, fasst Tabelle 1 diese zusammen und vervollständigt sie mit den entsprechenden Daten des insgesamt untersuchten Patientenkollektivs.

Patientendaten				Histopathologische Daten				EPO-mRNA
Patientennummer	Alter	G	Hb (g/dl)	Histologie	Größe (mm)	Grading	Staging	Tumor
1	46	w	12,5	klarzellig	50x30	G2	T3a N1 MX	neg.
2	65	m	9,6	klarzellig	95x80x60	G2	T3a NX MX	neg.
3	38	w	13	klarzellig	45x40x30	G2	T1 NX MX	neg.
4	61	m	14,4	klarzellig	60x55x50	G2	T1 NX MX	neg.
5	79	w	13	klarzellig	62x35x45	G1	T1 N0 MX	neg.
6	74	m	14,6	klarzellig	35 (d)	G2	T1 NX MX	neg.
7	62	w	14,2	klarzellig	35x35x25	G2	T3a N0 MX	pos.
8	50	w	15,1	klarzellig	30x30x40	G2	T1 NX MX	pos.
9	59	m	14,1	klarzellig	30x40x40	G2	T1 N0 MX	neg.
10	71	m	15,6	klarzellig	27x27x25	G2	T3b NX MX	pos.
11	65	m	11,3	papillär	45x45x40	G2	T1 NX MX	neg.
12	41	m	10,2	klarzellig	130x70x70	G4	T3b N2M1	pos.
13	60	m	14,3	klarzellig	60x50x42	G2	T3 NX MX	pos.
14	35	m	15,5	klarzellig	25x25x20	G2	T1 NX MX	pos.
15	60	m	12,7	chromophil	95x95x90	G2	T3b N0 MX	neg.
16	63	m	15,2	klarzellig	58x50x40	G3	T3b NX MX	neg.
17	65	m	14,2	klarzellig	70x55x40	G2	T3b N0 MX	pos.
18	79	m	15,1	klarzellig	45x40x40	G2	T1 NX MX	pos.
19	63	m	13,5	klarzellig	30x20x20	G2	T4 N2 MX	neg.
20	69	m	15,2	klarzellig	40x27x30	G2	T1 NX MX	n.b.
21	51	m	15,8	klarzellig	70x65x55	G2	T1 NX MX	pos.
22	68	m	13,5	klarzellig	80x60x60	G2	T3b NX MX	neg.

Tab.1: Klinische Charakteristika und EPO-mRNA Expression der 22 untersuchten Nierentumorgewebsproben

Tab.1 Tabelle 1 stellt die EPO-mRNA Ergebnisse des Tumorgewebes der 22 untersuchten Patienten dar und gibt darüber hinaus Auskunft über klinische und histopathologische Daten der Patienten (diese Daten wurden am Universitätsklinikum Charité zu Berlin erhoben). Die einzelnen Patienten wurden willkürlich einer Nummer zugeordnet und sind daher verschlüsselt. Die TNM-Klassifikation der Nierentumore erfolgte nach der Fassung von 1997 (Sobin, 1997) (Hb= Hämoglobin-Konzentration, d= Durchmesser, G= Geschlecht, n.b.= nicht bestimmt, da RNA Extrakt unzureichend).

4.2 Etablierung der Zell-Linien aus dem Tumormaterial

Um die zugrunde liegenden, molekularen Mechanismen der gewebs- und zellspezifischen EPO-Expression untersuchen zu können, war ein Ziel dieser Arbeit, eine EPO-exprimierende Zell-Linie zu etablieren. Bereits in der Vergangenheit war es einigen Arbeitsgruppen gelungen (Sytkowski, 1983 und siehe Einleitung), aus Nierentumorgewebe polyzythämischer Patienten eine EPO-exprimierende Zell-Linie zu gewinnen. In Anbetracht der ungefähr 40% EPO-mRNA positiven gesammelten Tumoren schien es möglich, aus diesen die gewünschte Zell-Linie zu gewinnen.

Eine ausreichend wachsende Zell-Linie, die genug Material für die Protein- oder für die mRNA-Nachweise zur Verfügung stellte, konnte in 11 (50%) der 22 aus den Tumorgewebsproben angelegten Zellkulturen erfolgreich etabliert werden. Die übrigen Zell-Linien stellten entweder frühzeitig ihr Wachstum ein oder lieferten aufgrund mangelnden Wachstums nur unzureichend Material für die vorhergesehenen Untersuchungen, sodass sie wegen ihrer Unvollständigkeit in der Auswertung nicht berücksichtigt werden konnten. Unter den selbst etablierten Zell-Linien befand sich nur eine Zell-Linie (RCC-L15), die nicht klarzelliger Ursprungs war.

Um die Chancen der Untersuchung einer EPO-exprimierenden Zell-Linie zu erhöhen, konnten die 11 erfolgreich etablierten mit weiteren 13 aus Nierenzellkarzinomen entstandenen Zell-Linien zu einem größeren Kollektiv ergänzt werden, sodass für die Studien insgesamt 24 Zell-Linien zur Verfügung standen. Diese 13 hinzugefügten Zell-Linien wurden für diese Arbeit freundlicherweise von der Arbeitsgruppe des Herrn Dr. Ingo Schmidt (Klinik für Hämatologie/Onkologie, Virchow-Klinikum, Charité zu Berlin) überlassen. Die klinischen und histopathologischen Daten dieses zur Verfügung gestellten Patientenkollektivs waren, soweit vorhanden, denen des selbst erhaltenen ähnlich. Das Patientendurchschnittsalter betrug 62 Jahre, das männliche Geschlecht überwog und der durchschnittlich präoperative Hämoglobinwert lag bei 13,8g/dl. Die

meisten Tumoren entstammten auch hier dem klarzelligen Typen des Nierenzellkarzinoms und nur einer war als nicht klarzellig, ein weiterer als unklassifizierbar (nach Thoenes) registriert worden. Tumor- oder dazugehöriges gesundes Nierengewebe war zu diesen 13 Zell-Linien nicht vorhanden. Angesichts der Daten des grossen Patientenkollektivs der Arbeitsgruppe kann aber vermutet werden, dass auch hier ca. 40% eine EPO-mRNA Expression im Tumorgewebe zeigen würden.

4.2.1 Erhebung des HIF-1 α und HIF-2 α Proteinstatus

Parallel zu den Untersuchungen der EPO-mRNA Expression wurde ausserdem eine Erhebung des HIF-1 α und HIF-2 α Proteinstatus in den Zell-Linien anhand einer Immunoblot-Analyse durchgeführt. Dabei konnte mittels der unterschiedlichen Expressionsmuster von HIF-1 α und HIF-2 α indirekt auf die Funktion des pVHL geschlossen werden: bei einer physiologisch induzierbaren Expression unter Hypoxie wurde ein funktionsfähiges pVHL, bei einer konstitutiven Expression in Normoxie und Hypoxie ein Funktionsverlust des pVHLs angenommen.

Im Immunoblot wurden daher die HIF α -Isoformen HIF-1 α und HIF-2 α in den Zellkulturen unter norm- und hypoxischen Bedingungen nachgewiesen. Dabei wurde eine physiologisch induzierbare, eine konstitutive und keine Expression von HIF-1 α und HIF-2 α in der jeweiligen Zell-Linie beobachtet. Zusammenfassend konnte bei diesen Untersuchungen eine deutlich höhere Anzahl an Tumoren gefunden werden, bei denen eine konstitutive Expression beider HIF α -Isoformen in der Zellkultur nachweisbar war, und nur wenige schienen über eine physiologisch induzierbare HIF α -Expression zu verfügen. Diese Verteilung deckt sich wiederum mit den zuvorbeschriebenen Daten: die überwiegende Mehrzahl der NZK sind klarzellig und von diesen weisen mehr als 70% eine Inaktivierung des VHL Genes auf ([Clifford, 1998](#)). Eine HIF α Überexpression konnte zudem in einem ähnlichen Verhältnis auch in den eigentlichen Nierentumoren beschrieben werden ([Wiesener 2001; Turner, 2002](#)).

Bei genauerer Betrachtung zeigte sich bei 17 (ca. 70%) der 24 untersuchten Zell-Linien eine konstitutive, bei den restlichen 7 (ca. 30%) eine physiologisch induzierbare Expression der HIF α -Isoformen.

Eine weitere Aufschlüsselung dieser beiden Gruppen liess bei der Gruppe der 17 Zell-Linien zum einen 9 (ca. 53%) erkennen, bei denen eine konstitutive HIF-Expression für beide HIF α -Isoformen und zum anderen 8 (ca. 47%), die eine konstitutive Expression nur für eine HIF α -Isoform demonstrierten. Dieses Ergebnis deckt sich daher nicht mit

der Beobachtung, dass die Isoform HIF-2 α in pVHL-assoziierten Nierenzellkarzinomen häufiger als HIF-1 α exprimiert würde (Raval, 2005).

Bei den weiteren 7 Zell-Linien mit physiologisch induzierbarer Expression konnten gleichermassen zwei Gruppen beschrieben werden. Eine physiologisch induzierbare Expression beider HIF α -Isoformen wurde bei 3 (ca. 42%) dieser 7 Zell-Linien beobachtet. Die verbliebenen 4 (ca. 58%) zeigten dagegen eine physiologisch induzierbare Expression nur einer HIF α -Isoform.

Da sich HIF-1 α und HIF-2 α in ihrer Regulation immer gleichsinnig verhielten, bestätigte dieses Ergebnis das heutige Verständnis, dass HIF-1 α und HIF-2 α in gleicher Weise von pVHL reguliert werden.

Diese Expressionsverteilung der HIF α -Isoformen ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

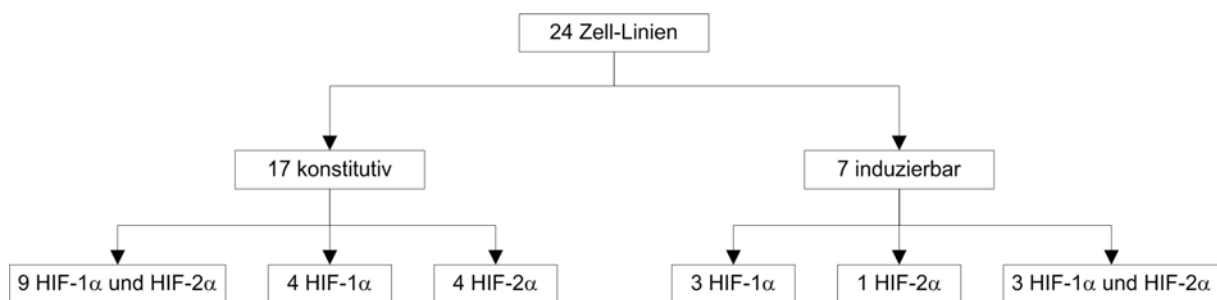


Abb.3 Expressionsverteilung der HIF α -Isoformen

Abb.3 Im vorliegenden Diagramm wird das Verhalten der HIF α -Isoformen unter Norm- und Hypoxie in den 24 Zell-Linien gezeigt. Dabei wird durch die Einteilung in eine konstitutive, eine induzierbare sowie keine Expression eine Übersicht des Verteilungsmusters möglich. Prozentual gegliedert wird deutlich, dass sich bei den meisten (17 von 24) Zelllinien eine konstitutive Expression der HIF α -Isoformen nachweisen ließ. Dabei ist zu sehen, dass eine konstitutive Expression bei der Mehrzahl (9 von 17) bei beiden HIF α -Isoformen vorlag. Physiologische Verhältnisse mit einer induzierbaren HIF α -Expression konnten dagegen nur bei sieben Zell-Linien gefunden werden. Am ehesten hat daher bei den meisten (17) der hier untersuchten Zell-Linien eine Inaktivierung im pVHL stattgefunden.

Anhand eines Immunoblots zeigt Abbildung 4 die unterschiedliche Expressionsverteilung der HIF α -Isoformen.

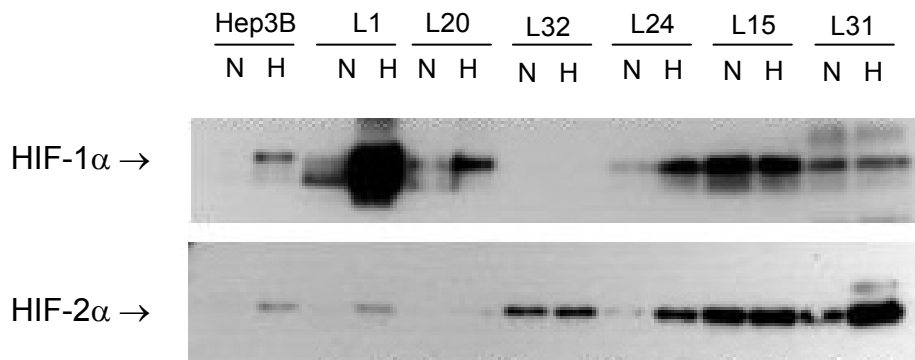


Abb.4 Heterogener HIF α -Expressionsstatus in den Zell-Linien

Abb.4 Anhand zweier Immunoblots ist die HIF-1 α oder HIF-2 α bei sechs ausgewählten Zell-Linien (LX=RCC-LX mit X= jeweilige Nummer der Zell-Linie) dargestellt. Diese Zell-Linien waren zuvor primär aus renalem Tumorgewebe etabliert und für den Nachweis jeweils 4 Stunden unter Normoxie (N) und Hypoxie (H, 1% O₂) stimuliert worden. Auffallend ist dabei, dass sich diese Zell-Linien wesentlich in ihrem HIF α -Expressionsverhalten unterschieden: nachweisen ließ sich bei manchen nur eine, bei anderen beide HIF α -Isoformen. Bemerkenswert ist zudem, dass bei einigen Zell-Linien eine konstitutive, bei anderen eine induzierbare oder gar keine Expression der HIF α -Isoformen vorlag. Bei der Mehrzahl wurde aber ein konstitutiver HIF α -Expressionstatus gefunden, was auf die Inaktivierung des pVHL hindeutet. Als Standard wurden Hep3B-Zellen benutzt.

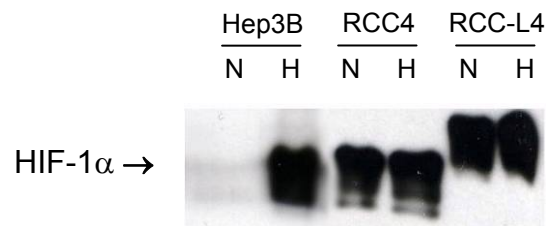
4.2.1.1 Veränderte Migration von HIF-1 α der Zell-Linie RCC-L4 in der SDS-PAGE

Beim Nachweis der HIF-1 α und HIF-2 α Expression im Immunoblot zeigte die Zell-Linie RCC-L4 für beide Proteine eine konstitutive Expression unter norm- und hypoxischen Bedingungen. Interessanterweise stellte sich dabei aber eine stark verzögerte Migration für HIF-1 α in der Gelelektrophorese heraus: es konnte ein HIF-1 α Protein nachgewiesen werden, dass sich deutlich oberhalb der 120 kDa Bande des Markers befand und somit auf ein grösseres Proteinprodukt hindeutete. Um auszuschließen, dass es sich dabei um ein kreuzreaktives Protein handelte, welches bei diesem Patienten zu finden wäre, wurde das Ergebnis des Immunoblots mit einem zweiten,

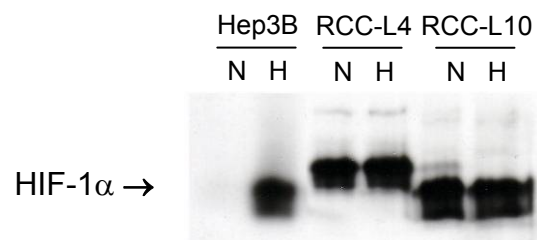
monoklonalen Antikörper bestätigt. Das HIF-2 α Protein zeigte in dieser Zell-Linie eine regelrechte Wanderung in der SDS-PAGE.

In Abbildung 5 kann dieses Vorfinden einer verlangsamten Migration des HIF-1 α Proteins betrachtet werden.

A



B



C

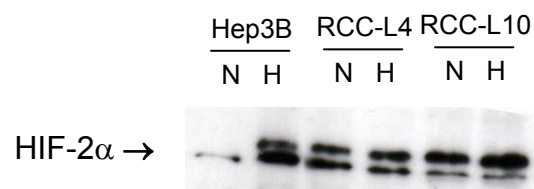


Abb.5 Verzögerte Migration von HIF-1 α in der Zell-Linie RCC-L4

Abb.5 Dargestellt sind drei Immunoblots (**A**, **B**, **C**), die die HIF-1 α und HIF-2 α Expression in der Zell-Linie RCC-L4 unter Normoxie (N) und Hypoxie (H, 1% O₂) zeigen. Insbesondere im Vergleich mit den Zell-Linien RCC4 (**A**) und RCC-L10 (**B**) wird die verlangsamte Migration von HIF-1 α in der Zell-Linie RCC-L4 deutlich. Die HIF-2 α Expression ist dagegen unauffällig (**C**). Als Standard dienten Hep3B-Zellen. Für den HIF α -Nachweis wurden für **A** der Klon 54 (Tansduction-Laboratories) HIF-1 α monoklonale Antikörper, für **B** der Klon alpha67 (Novus-Laboratories) HIF-1 α monoklonale Antikörper und für **C** der Klon 190b (Novus-Laboratories) HIF-2 α monoklonale Antikörper benutzt.

4.2.2 Nachweis der EPO- und CA-9-mRNA Expression

Für die Nachweise der mRNA Expression der HIF-Zielgene EPO und CA-9 unter Normoxie und Hypoxie stand gleichfalls das Kollektiv der 24 erfolgreich etablierten Zell-Linien zur Verfügung. Wie bereits bei den Gewebsuntersuchungen war dazu das quantitative Verfahren des RNase Protection Assays gewählt worden. Es konnte damit bei der stichprobenartig durchgeführten Analyse der CA-9-mRNA Expression eine strenge Korrelation zu dem entsprechenden HIF α -Status der jeweiligen Zell-Linie gefunden werden, das heißt, dass entweder keine, eine konstitutive oder eine unter Hypoxie induzierbare Expression vorlag. Trotz offensichtlicher Aktivierung des HIF-Transkriptionskomplexes entweder physiologisch oder konstitutiv konnte aber in keiner dieser 24 Zell-Linien eine EPO-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Diese Diskrepanz der mRNA Expression zwischen den untersuchten HIF-Zielgenen EPO und CA-9 unter Normoxie und Hypoxie veranschaulicht exemplarisch Abbildung 6.

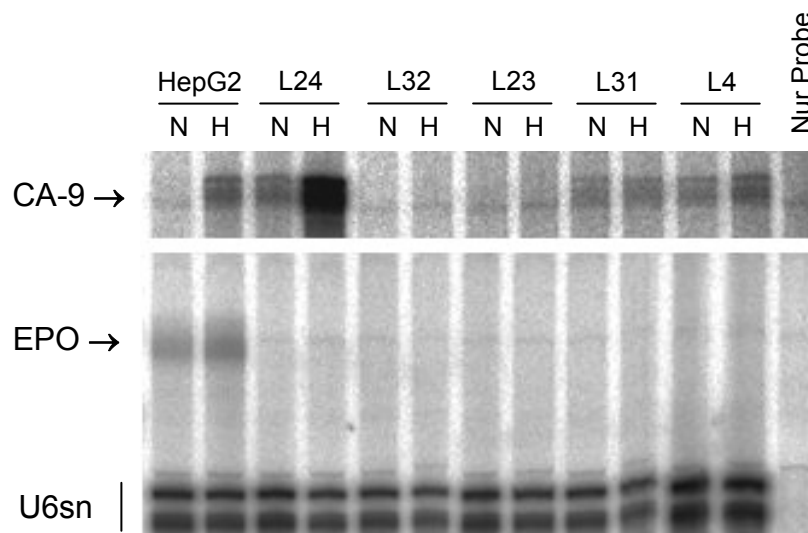


Abb.6 Fehlen der EPO-mRNA Expression in den primär etablierten Zell-Linien

Abb.6 Mittels RNase Protection Assay wird die EPO-mRNA Expression bei fünf Zell-Linien (LX=RCC-LX mit X=jeweilige Nummer der Zell-Linie) gezeigt, die zuvor in Normoxie (N) und Hypoxie (H, 1% O₂ für 16 Stunden) stimuliert worden waren. Trotz hypoxischer Stimulation ist bei keiner der untersuchten Zell-Linien eine EPO-mRNA Expression zu sehen. Im Vergleich dazu wurde erneut das weitere HIF-Zielgen, die Carboanhydrase-9 (CA-9) dargestellt, die sich im Gegensatz zu EPO in drei der fünf Zell-Linien nachweisen ließ. Als Kontrolle jeder einzelnen Probe diente das Strukturgen U6sn (U6 small nuclear RNA). HepG2-Zellen wurden als Standard benutzt.

Einen vollständigen Überblick über die bisher beschriebenen Zellkulturergebnisse für die Protein- und mRNA Expression ermöglicht Tabelle 2. In Ergänzung zu diesen Daten sind ausserdem die dazugehörigen EPO-mRNA Expressionen in den untersuchten Tumorgewebsproben hinzugefügt.

Zell-Linie	Ergebnisse in der Zellkultur			Tumorgewebe
	HIF-1 α	HIF-2 α	EPO-mRNA	EPO-mRNA
RCC-L1	↑	↑	neg.	neg
RCC-L3	→	∅	neg.	neg.
RCC-L4	→	→	neg.	neg.
RCC-L5	→	→	neg.	neg.
RCC-L6	→	∅	neg.	neg.
RCC-L10	→	→	neg.	pos.
RCC-L12	→	→	neg.	pos.
RCC-L13	→	→	neg.	pos.
RCC-L15	→	→	neg.	neg.
RCC-L18	↑	∅	neg.	pos.
RCC-L20	→	∅	neg.	n.b.
RCC-L23	∅	→	neg.	n.b.
RCC-L24	↑	↑	neg.	n.b.
RCC-L25	→	→	neg.	n.b.
RCC-L26	↑	∅	neg.	n.b.
RCC-L27	→	∅	neg.	n.b.
RCC-L28	∅	↑	neg.	n.b.
RCC-L29	→	→	neg.	n.b.
RCC-L30	↑	∅	neg.	n.b.
RCC-L31	→	→	neg.	n.b.
RCC-L32	∅	→	neg.	n.b.
RCC-L33	∅	→	neg.	n.b.
RCC-L34	↑	↑	neg.	n.b.
RCC-L35	∅	→	neg.	n.b.

Tab2: HIF α und EPO-mRNA Expression in den Zell-Linien

Tab2. Tabelle 2 zeigt die HIF-1 α und HIF-2 α -Expression der 24 untersuchten Zellkulturlinien. Zusätzlich ist die EPO-mRNA Expression dieser Zell-Linien im Vergleich zu der EPO-mRNA Expression des dazugehörigen Tumorgewebes dargestellt (\uparrow = physiologische Induzierbarkeit von HIF-1 α /HIF-2 α ; \rightarrow = Überexpression von HIF-1 α /HIF-2 α ; \emptyset = keine HIF-1 α /HIF-2 α Expression; neg.= keine EPO-mRNA Expression nachweisbar im RPA, pos.= EPO-mRNA Expression nachweisbar im RPA; n.b.= nicht bestimmt: entweder unzureichendes RNA-Extrakt oder kein Gewebe vorhanden).

4.3 Expressionsverhalten der EPO- und CA-9-mRNA in Zell-Linien und dem dazugehörigen Tumorgewebe

Keine der 24 untersuchten Zell-Linien zeigte eine EPO-mRNA Expression, obwohl in bis zu 40% der Tumoren eine Expression zu finden war. Diese Häufigkeit vorausgesetzt, wäre bei etwa 10 Tumoren dieses Kollektivs eine EPO-Expression zu erwarten. Aufgrund von eingeschränkt vorhandenem Tumormaterial konnten jedoch nicht alle Gewebeproben untersucht werden, so dass nur in vier Tumoren, aus denen eine Zell-Linie etabliert werden konnte, eine EPO-Expression nachgewiesen wurde. Dabei ist festzuhalten, dass bei keinem dieser vier Tumoren eine EPO-Expression in die Zell-Linie gefunden werden konnte. Um dieses zu veranschaulichen, sind in der Abbildung 7 die zu zwei Patienten gehörigen Proben der gesunden Niere, des Tumors und der entsprechenden Zell-Linie aufgetragen und für EPO und CA-9 analysiert. Während das Auftreten einer EPO-mRNA Expression im Tumorgewebe beobachtet werden konnte, hatte die daraus entstandene Zell-Linie die Fähigkeit dazu verloren.

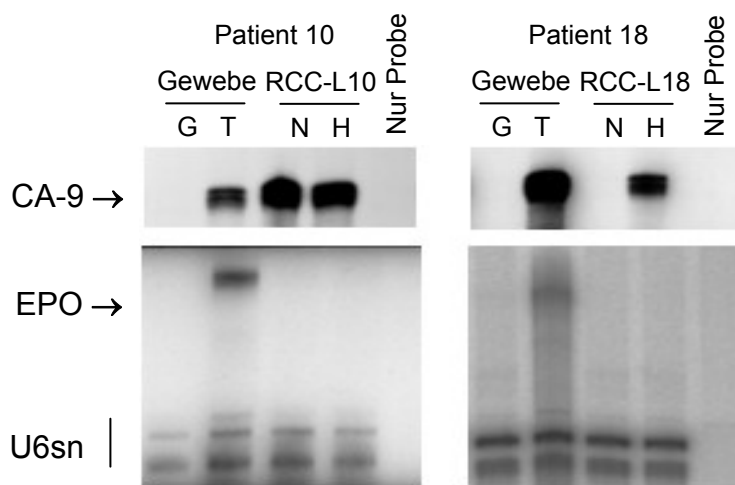


Abb.7 EPO-Expressionsverlust in den Zell-Linien im Vergleich zu dem dazugehörigen Tumorgewebe

Abb.7 Ein Verlust der EPO-mRNA Expression in den primär etablierten Zell-Linien konnte anhand eines Vergleichs mit ihrem dazugehörigen Tumorgewebe verdeutlicht werden. Mittels RNase Protection Assay wurde an zwei Zell-Linien, RCC-L10 und RCC-L18 der Verlust gezeigt. Während eine EPO-mRNA Expression bei beiden Tumorgewebsproben nachgewiesen werden konnte, war in keiner der Zell-Linien eine EPO-mRNA Expression zu sehen. Ein induzierbares CA-9 Expressionsmuster war interessanterweise in der Zell-Linie RCC-L18 zu beobachten, was auf ein intaktes pVHL mit nachfolgender HIF α Degradation hindeutet. Als Kontrolle jeder einzelnen Probe diente das Strukturgen U6sn (U6 small nuclear RNA). Hep3B-Zellen wurden als Standard benutzt (nicht gezeigt) (N= Normoxie, H=Hypoxie (1% O₂ für 16 Stunden), G= gesundes Nierengewebe, T= Tumor).

4.3.1 EPO-mRNA Expression in weiteren, publizierten Zell-Linien

Eine Aufklärung des molekularen Mechanismus der EPO-Genexpression schien aufgrund der negativen EPO-mRNA Resultate unter Zellkulturbedingungen nicht möglich. Um trotzdem eine EPO-exprimierende Zell-Linie untersuchen zu können, wurden daher weitere Zell-Linien hinzugezogen. Zum einen wurden die Arbeitsgruppen angeschrieben, die in der Vergangenheit die Etablierung einer EPO-exprimierenden Zell-Linien beschrieben hatten (Sytkowski, 1983; Sherwood 1985; Okabe 1985; Shouval 1988).

Als einzige konnte freundlicherweise die zuvor beschriebene Zell-Linie GKA (Sytkowski, 1984) zur Verfügung gestellt werden. Zum anderen wurden bereits publizierte, aus Nierentumorgewebe etablierte Zell-Linien hinsichtlich der EPO-mRNA Expression untersucht: die beiden VHL-defizienten Zell-Linien 786-0 und RCC-4 sowie die Zell-Linie CAKI-1 mit Wildtyp VHL (Maxwell, 1999). Bei keinen konnte eine EPO-Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Bei der Zell-Linie GKA konnte trotz konstitutiver Expressionsverhältnisse der HIF α -Isoformen und zuvor beschriebener EPO-mRNA Expression in vitro in den Assays keine EPO-Expression unter norm- oder hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden. Die Zell-Linie GKA schien daher die Fähigkeit verloren zu haben, EPO zu exprimieren. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 8 zu betrachten.

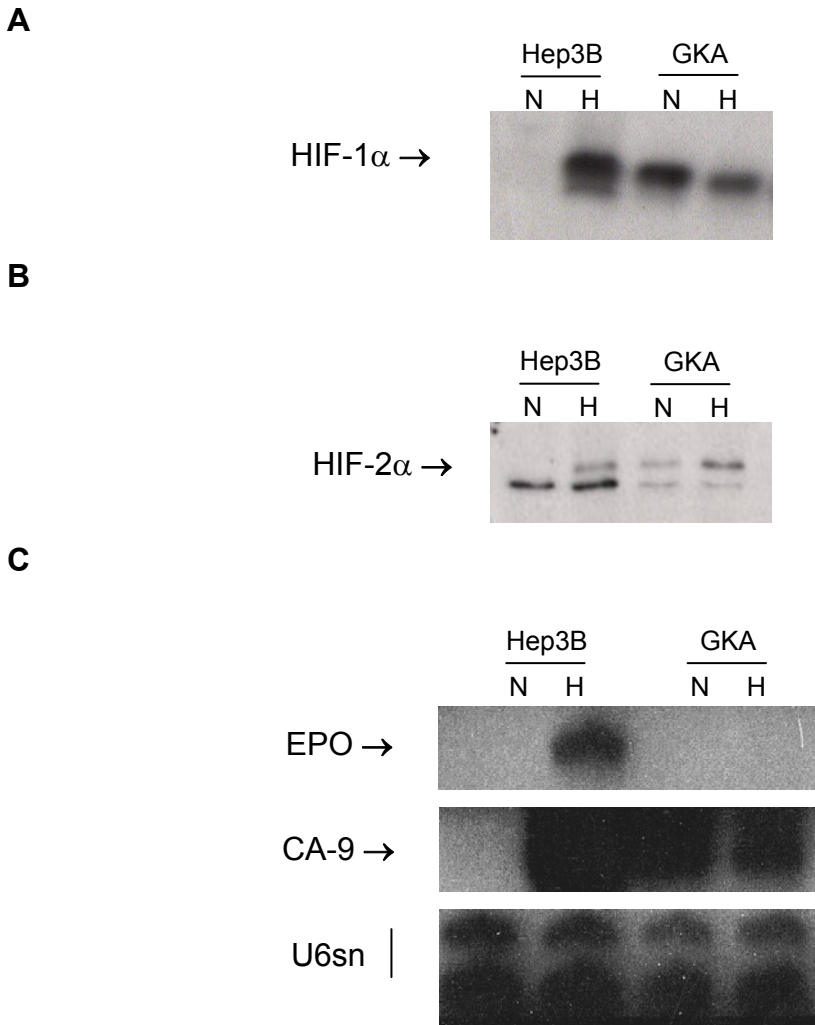


Abb.8 Fehlen einer EPO-Expression in der Zell-Linie GKA

Abb.8 Die Immunoblots (**A** und **B**) zeigen eine konstitutive Expression beider HIF α -Isoformen (N= Normoxie, H=Hypoxie (4 Stunden H, 1% O₂), als Standard dienten Hep3B-Zellen), während im RPA (**C**) keine EPO-Expression, jedoch eine HIF-1 konforme CA-9-Expression nachzuweisen war. Als Kontrolle jeder einzelnen Probe diente das Strukturgen U6sn (U6 small nuclear RNA). Hep3B-Zellen wurden als Standard benutzt (N= Normoxie, H=Hypoxie (1% O₂ für 16 Stunden)).

4.3.2 In-situ-Hybridisierung für die EPO-mRNA Expression in Tumorzellen

(in Kooperation mit der wissenschaftlichen Arbeitsgruppe von Professor Ratcliffe in Oxford, England; siehe Material- und Methodenteil)

Für dieses negative Resultat der EPO-mRNA Expression in allen Zell-Linien bei offensichtlicher Aktivierung des HIF-Transkriptionskomplexes gab es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Neben der Hypothese, dass eine Dedifferenzierung der

Tumorzellen unter Zellkulturbedingungen stattgefunden haben könnte, musste in Betracht gezogen werden, dass die im Tumorgewebe nachgewiesene EPO-mRNA Expression nicht von den Tumorzellen, sondern ähnlich wie im gesunden Nierengewebe, von den interstitiellen Fibroblasten exprimiert worden sein könnte. Diese dann nicht-malignen Zellen hätten unter Zellkulturbedingungen ihr Wachstum eingestellt.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden von einem Teil des Tumorkollektivs Schnitte angefertigt und eine in-situ-Hybridisierung freundlicherweise von der wissenschaftlichen Arbeitsgruppe von Professor Ratcliffe in Oxford durchgeführt. Anzumerken ist dabei, dass das untersuchte Tumorkollektiv klein war und methodische Schwierigkeiten vorlagen. Obwohl bei den meisten Tumoren kein spezifisches EPO-Signal nachgewiesen werden konnte, konnte doch anhand einiger Gewebeproben mit sehr deutlichem EPO-Signal im RPA demonstriert werden, dass die Tumorzellen und nicht interstitielle Zellen im Tumorgewebe für die EPO-mRNA Expression im RNase Protection Assay verantwortlich waren. Ein repräsentatives Bild dieses Nachweises liefert Abbildung 6 und deckt sich mit Ergebnissen früherer Arbeiten ([Da Silva, 1990](#)), die zeigten, dass die EPO-mRNA Expression auf die Tumorzellen zurückzuführen war, aus denen Zellkulturen etabliert wurden.

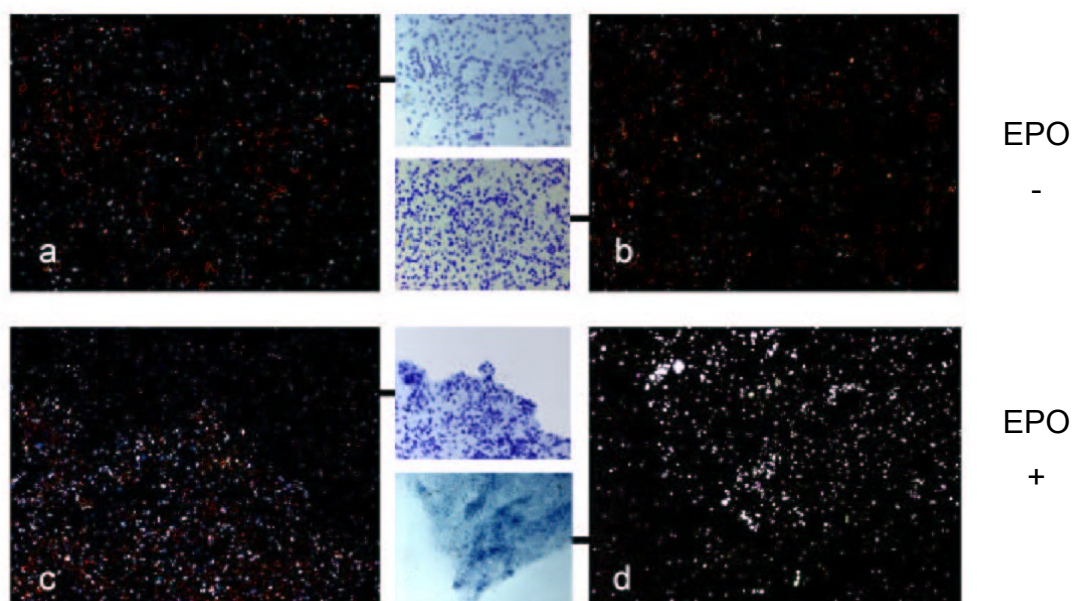


Abb.9 Tumorzellen sind Ort der EPO-Expression

Abb.9 Dargestellt ist das Ergebnis einer EPO-in-situ-Hybridisierung von vier Gewebeproben, von denen eine der gesunden Niere und drei den unterschiedlichen Tumorgewebeproben entsprechen. Während im gesunden Nierengewebe (a) kein EPO-Signal detektiert werden konnte, zeigten die Tumorgewebeproben entweder (b) keine oder (c, d) deutlich positive EPO-Signale. Das nachgewiesene EPO entstammte dabei eindeutig den Tumorzellen.

Dieses Ergebnis ist auf den vier großen Abbildungen in Dunkelfeldmikroskopie und in den kleineren Darstellungen mit demselben Ausschnitt unter normaler Lichtmikroskopie zu sehen.

4.4 Stabile Transfektion der „Chuvash“-Mutation

Nach diesem Ergebnis der in-situ-Hybridisierung blieb allerdings weiterhin die Frage unbeantwortet, was die Etablierung einer EPO-mRNA exprimierenden Zell-Linie verhinderte. Die in der Literatur zuvor beschriebenen, erfolgreich EPO-mRNA exprimierenden Zell-Linien waren auffallenderweise alle von Patienten mit einer Polyzythämie gewonnen worden. Dieses Kriterium wurde aber von keinem Patienten des hier untersuchten Patientenkollektivs erfüllt.

Es führte daher die Kenntnis, dass nur Tumorgewebe polyzythämer Patienten zu Erfolg geführt hatte, zu der Überlegung, dass die Art der Veränderung des VHL-Gens von Bedeutung hinsichtlich einer EPO-mRNA Expression sein könnte. Dabei wurde eine Veränderung des VHL-Gens im Sinne einem „gain-of-function“, also einem Zugewinn an Funktion, angenommen, die dann eine EPO-Expression hervorrufen könnte. Eine weitere Möglichkeit, um eine EPO-mRNA exprimierende Zell-Linie zu etablieren, schien daher eine stabile Transfektion mit der sogenannten „Chuvash“-Mutation des VHL-Gens zu erlauben. Dabei handelt es sich um eine Punktmutation C>T des VHL-Gens, die nachfolgend zu einem Arg200Trp Austausch im pVHL führt ([Ang, 2002/2](#)). Diese Mutation wiederum ruft unter anderem eine familiäre Polyzythämie hervor, die sich zumindest teilweise durch eine EPO-Überexpression erklären lässt. An dieser Stelle ist eine Besonderheit der „Chuvash“-Mutation hervorzuheben, wobei HIF-1 α zwar noch ubiquitiniert wird und nachfolgend degradiert, jedoch wesentlich langsamer als in VHL-Wildtyp Zellen, sodass die Expression der HIF-Zielgene unter normoxischen Bedingungen – wenn auch in geringem Maße- ansteigt ([Ang, 2002/1](#)).

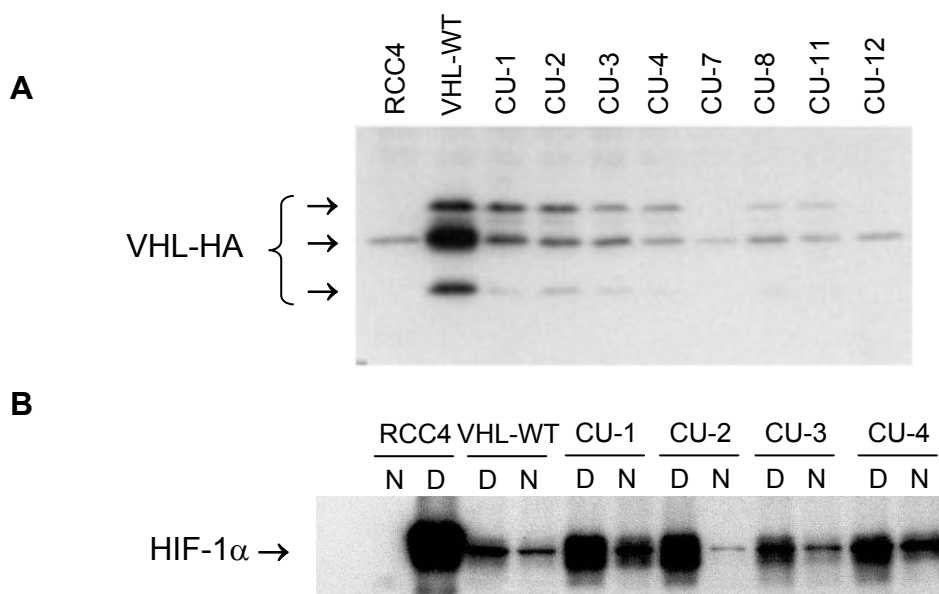
RCC-4 Zellen wurden daher mit einer Hämagglutinin (HA)-markierten cDNA, Trägerin der „Chuvash“-Mutation, stabil transfiziert. Nach Selektion der Zellklone konnte im

Immunoblot gegen die HA-Markierung bei den meisten Klonen die erfolgreiche Etablierung des Transgens festgestellt werden. Nur solche Zellklone mit nachweisbarer HA-Markierung wurden für die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt. Zunächst wurde die Expression der HIF-Isoformen unter Norm- und Hypoxie vor und nach stabiler Transfektion nachgewiesen. Der hypoxische Stimulus wurde dabei mit dem Eisenchelator Desferrioxamin initiiert, der die eisen- und 2-oxoglutaratabhängigen intrazellulären Sauerstoffsensoren, die Prolyl- und Asparagylhydroxylasen, unter normoxischen Bedingungen inhibiert. Dabei zeigte sich nach Transfektion eine neu aufgetretene Degradation unter Normoxie sowie eine hypoxische Stimulierbarkeit der HIF-Isoformen, wenn auch das Ausmaß dieser wiedererlangten Fähigkeit der hypoxischen HIF-Induzierbarkeit unter den einzelnen Klonen sehr schwankte.

Ein ähnliches Bild bot sich im Nachweis der CA-9-mRNA Expression mittels RPA. Auch hier war nach stabiler Transfektion der „Chuvash“-Mutation eine erneute hypoxische Induzierbarkeit der CA-9 Expression zu beobachten, wiederum mit unterschiedlicher Intensität unter den einzelnen Zellklonen. Das Auftreten dieser unterschiedlichen Intensität der Signale deutet zum einen auf den zufälligen Einbau des transfizierten Genkonstruktes in die genomische DNA der Empfängerzelle hin, zum anderen ist zu beachten, dass der Einbau des transfizierten Genkonstruktes mit unterschiedlicher Rate verlaufen kann.

Eine EPO-mRNA Expression konnte trotz vorliegender Stimulierbarkeit des HIF-Transkriptionskomplexes in keinem der Zellklone nachgewiesen werden.

Diese bisher dargestellten Ergebnisse nach der „Chuvash“-Mutation sind in Abbildung 10 zu ersehen.



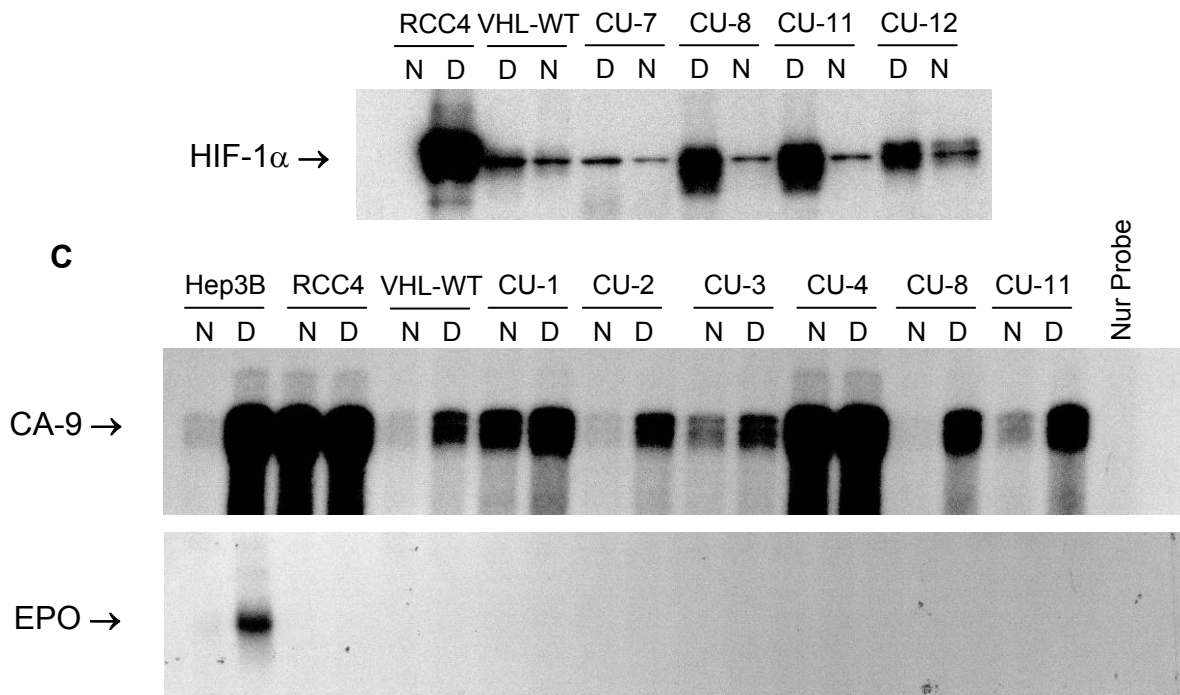


Abb.10 Keine EPO-mRNA Expression nach stabiler Transfektion der „Chuvash“-Mutation

Abb.10 Nach stabiler Transfektion der VHL inkompetenten Zell-Linie RCC-4 mit sowohl Wildtyp-VHL, als auch mit der „Chuvash“-Punktmutation (R200W) wurde zunächst ein Immunoblot gegen die Hämagglutinin (HA)-markierte cDNA (**A**), dann ein Immunoblot für die HIF-1 α Expression (**B**) und schließlich ein RNase Protection Assay (**C**) für die CA-9 und EPO-mRNA Expression durchgeführt. Die aufgeführten Nummern (Cu-X= „Chuvash“-Klon-X) beschreiben dabei die unterschiedlichen untersuchten Zellklone.

A Im Immunoblot gegen HA zeigt das VHL-Transgenprodukt drei verschiedene Molekulargewichte, wobei die mittlere Bande eine kreuzreaktive Bande überlagert. Ein negatives Resultat kann hier nur bei RCC4 (VHL^{-/-}) und den Klonen Cu 7 und Cu 12 beobachtet werden.

B Der Immunoblot gegen HIF-1 α der oben beschriebenen Zellklone wurde nach Stimulation in Normoxie (N) und dem Eisenchelator Dipyridil (DP 100 μ M über sechs Stunden) durchgeführt. Nach Transfektion konnte dabei in allen Klonen eine normoxische Suppression der HIF-Expression und nach Hypoxie-Imitation mit DP eine HIF-1 α Expression nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass das VHL-Transgen die normoxische Degradation HIF1 α vermittelt.

C Im RNase Protection Assay konnte in keinem der Klone eine EPO-mRNA Expression beobachtet werden, wohingegen die CA-9 Expression der erneuten HIF-1 α

Induzierbarkeit entspricht. Als Kontrolle jeder einzelnen Probe diene das Strukturgen U6sn (U6 small nuclear RNA). Hep3B-Zellen wurden als Standard benutzt.

Nach Betrachtung dieser Ergebnisse ist festzustellen, dass bei der „Chuvash“-Mutation mit dem Austausch Arg200Trp keine Mutation vorliegt, die unter Zellkulturbedingungen zu einem „Funktionsgewinn“ hinsichtlich der EPO-mRNA Expression führt. Für die EPO-mRNA Expression unter Zellkulturbedingungen scheinen dagegen weitere, bisher nicht bekannte Besonderheiten von Bedeutung zu sein.

5 Diskussion

5.1 Unterschiede der EPO-Expression – Vergleich von Tumorgewebe und Zellkultur

Ein charakteristisches Merkmal Erythropoietins ist seine ausserordentlich gewebs- und zellspezifische Genregulation. Unter physiologisch relevanten Verhältnissen zeichnet sie sich durch eine sehr restriktive EPO-Expression aus, die sich auf wenige Zellen im Niereninterstitium beschränkt. Um regulative Mechanismen im Rahmen der EPO-Expression zu beschreiben, wurden in dieser Arbeit zunächst die 22 gesammelten Nierentumorgewebsproben hinsichtlich einer EPO-mRNA Expression untersucht. Dazu wurde die Methode des quantitativen Nachweises mittels RNase Protection Assay (RPA) gewählt und nicht die einer hochsensitiven Polymerase Kettenreaktion (PCR), da bei einem Nachweis im RNase Protection Assay eher eine physiologische Relevanz anzunehmen war.

Bei ca. 40% dieser Gewebsproben konnte eine EPO-Expression nachgewiesen werden. Vor dem Hintergrund der histopathologischen Einteilung stellte sich interessanterweise heraus, dass diese 40% EPO-mRNA positiven Tumoren alle dem klarzelligem Typ der Nierenzellkarzinome zugeordnet worden waren. Eine mögliche Rolle der VHL-Inaktivierung hinsichtlich der paraneoplastischen EPO-Expression scheint daher nicht vernachlässigbar.

Um die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der EPO-Genexpression untersuchen zu können, sollte eine EPO-produzierende Zell-Linie aus den gesammelten Nierentumorgewebsproben primär etabliert werden. Grundlage dafür bot zum einen die Beobachtung, dass 40% des Gewebekollektivs eine EPO-mRNA Expression zeigte, zum anderen die in der Literatur beschriebenen Zell-Linien, die aus Nierenzellkarzinomen gewonnen worden waren und eine stabile EPO-Expression aufwiesen (Sytkowski, 1983; Sherwood, 1986; Toyama, 1979; Shouval, 1988). Zudem war anzunehmen, dass eine EPO-Expression einen Überlebensvorteil dieser Zellen hervorrufen würde, denn es war zuvor beobachtet worden, dass renale Tumorgewebszellen den EPO-Rezeptor exprimieren können, während sie gleichzeitig EPO sezernieren, wobei diese auto- und parakrine Sekretion zu einem schnelleren Tumorwachstum führen kann (Westenfelder, 2000).

Trotzdem konnte in keiner der 24 untersuchten, primär etablierten Zell-Linien eine EPO-Expression nachgewiesen werden.

Um dieses Ergebnis zu erklären, müssen unterschiedliche, mögliche Ursachen in Betracht gezogen werden.

Erstens muss betont werden, dass die in der Vergangenheit beschriebenen, erfolgreich etablierten EPO-sezernierenden Zell-Linien alle von Patienten mit einer Polyzythämie stammten. In dem hier untersuchten Patientenkollektiv erfüllte allerdings kein Patient diese Kriterien.

Zweitens finden in Zellen, die aus ihrem Gewebsverband gelöst und anschließend in vitro gezüchtet werden, Veränderungen statt, die zumindest teilweise für das Auftreten unterschiedlicher in vivo und in vitro Ergebnisse verantwortlich zu sein scheinen. Zu diesen Veränderungen zählen insbesondere Selektionsvor- und -nachteile sowie veränderte Methylierungsmuster. Dabei scheint ein Selektionsnachteil EPO-sezernierender Zellen in vitro aufgrund des mitogenen Stimulus eines auto- oder parakrinen EPO-Effekts unwahrscheinlich (Westenfelder, 2002). Eine mögliche Veränderung insbesondere CpG reicher Regionen im Promoterbereich des EPO-Gens könnte über die Methylierung eines Cytosins an Position 5 des Rings, sodass ein Methyl-CpG entsteht, zu einer Transkriptionseinschränkung führen. Dabei kann die Methylierung zum einen selbst verhindern, dass notwendige Partner binden, zum anderen sind an diesen Stellen häufig Methyl-CpG bindende Proteine, z.B. MeCP1, anzutreffen, die direkt mit den Transkriptionsaktivatoren interferieren. Zudem ist zu beachten, dass auch die Methylierung zu weniger Cytosine in CpGs über ein weiteres Protein, das MeCP2, die Transkription verhindern kann. In diesem Fall werden Ko-Repressoren wie die Histondeacetylase aktiviert sowie gleichzeitig die Stabilität des Nukleosoms durch die hohe Affinität des Histons H1 zu diesen Bereichen erhöht (Tate, 1993).

Die EPO-Expression kann daher durch Methylierung dieser CpG reichen Regionen im Promoter unterdrückt werden. Eine verminderte Methylierung im EPO-Gen wurde bei den in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes gelegenen CpGs beobachtet, die teilweise durch hypoxische Bedingungen beeinflusst wird. Trotz dieser Beobachtungen ist aber der Einfluss der Methylierung auf die EPO-Expression nicht abschließend geklärt (Wenger, 1998; Yin, 2000).

Ob eine Methylierungsveränderung in den 24 hier untersuchten Zell-Linien vorlag und ob diese dann eine EPO-Expression unter Zellkulturbedingungen verhinderte, ist unklar.

Eine Möglichkeit, die Bedeutung und den Einfluss der Methylierung auf die EPO-Expression der 24 Zell-Linien zu untersuchen, könnten Demethylierungsversuche mit anschließendem EPO-Expressionsnachweis darstellen.

Drittens musste sichergestellt werden, dass die Tumorzellen, aus denen die Zell-Linien primär etabliert wurden, auch Ort der EPO-Expression waren und nicht etwa die peritubulären Fibroblasten des Niereninterstitiums im Sinne einer physiologischen Expression. Da EPO in erster Linie auf RNA Ebene, das heisst sowohl über die Transkriptionsinitiation als auch über die mRNA-Stabilität reguliert wird (Fandrey, 2004), wurden in dieser Arbeit EPO-mRNA Transkripte anhand einer in-situ-Hybridisierung untersucht. Andere Arbeitsgruppen hatten zuvor eine EPO-Expression in den Tumorzellen mittels Immunhistochemie nachgewiesen (Acs, 2001; Dagnon, 2005; Vogel 2005). Zu beachten ist dabei aber, dass die EPO-Sekretion, wenn ein Stimulus vorliegt, von einer *de novo* Synthese abhängt und EPO nicht intrazellulär gespeichert wird (Jelkmann, 1992). Daher ist die Immunhistochemie in diesem Zusammenhang schwer zu interpretieren. Die hier ausgewählten und mittels in-situ-Hybridisierung untersuchten Nierentumorgewebsproben bestätigten, dass die im RPA nachgewiesene EPO-Expression tatsächlich von den Tumorzellen und nicht von den peritubulären Fibroblasten stammte. Eine EPO-Expression in klarzelligem Nierenzellkarzinomen war bereits den Zellen tubulären Epithelursprungs zugeschrieben worden (Maynard, 2004). Diese Beobachtung war insofern auffallend, da hier der Verlauf der Tumorigenese mit der Aktivierung des EPO-Gens assoziiert sein musste. Das in dieser Arbeit mittels in-situ-Hybridisierung erhobene Ergebnis bestätigte damit frühere Arbeiten, dass die Tumorzellen Ort der EPO-Expression sind (Da Silva, 1990; Noguchi, 1999).

Trotz dieser genannten Möglichkeiten bleibt die Diskrepanz zwischen positiver EPO-Expression im Nierentumorgewebe und negativer EPO-Expression in allen untersuchten Zell-Linien unklar. Besonders eindrücklich konnte diese Differenz anhand zweier Zell-Linien-Tumorgewebsproben-Paare demonstriert werden. Das zusätzlich nachgewiesene HIF-Zielgen, die CA-9, zeigte dagegen eine HIF konforme Expression. Die Frage nach einem bislang unbekanntem Mechanismus der EPO-Genregulation wirft daher einige Vermutungen auf, wobei Besonderheiten des EPO-Gens hervorgehoben werden sollten: offensichtlich reicht die Aktivierung des HIF-Transkriptionskomplexes alleine nicht aus, auch wenn ein hypoxischer Stimulus bzw. seine Imitation unabdingbar zu sein scheint. In diesem Zusammenhang waren in der Vergangenheit weitere, für die EPO-Expression notwendige Beobachtungen beschrieben worden. Dabei konnte zum

einen eine für die Expression notwendige Kooperation zwischen EPO-Promoter und -Enhancer gezeigt werden (Blanchard, 1992), zum anderen eine zusätzliche Interaktion der Transaktivationsdomänen HIFs (Jiang, 1997, Pugh 1997) mit den Ko-Aktivatoren der Transkription. Zu letzteren zählt neben CBP (CREB-binding protein) (Kallio, 1998) der bereits in der Einleitung eingeführte Transkriptionsfaktor HNF-4 (hepatic nuclear factor-4). Dieser zeichnet sich durch sein gewebespezifisches Vorkommen aus, da er nur in Niere, Leber und Darm gebildet wird. Für die EPO-Transkription ist es nötig, dass HIF zusätzlich mit HNF-4 interagiert (Zhang, 1999), wobei unter Hypoxie diese Interaktion von HNF-4 sowohl mit HIF- α als auch mit HIF- β stattfindet (Tsuchiya, 2002). Die Bedeutung HNF-4s wurde insbesondere an HeLa Zellen deutlich. Diese aus einem Zervixkarzinom entstandenen Zellen können erst nach Transfektion eines HNF-4 Reportergenkonstruktes, das den minimalen EPO-Promoter und EPO-Enhancer enthält, EPO exprimieren (Huang, 1995; Galson, 1994). Nach Transfektion einer Zell-Linie nur mit dem Enhancer Element kann EPO nicht exprimiert werden, sofern die Zelle nicht bereits die Fähigkeit zur EPO-Expression besaß. Dies deutet darauf hin, dass das Hypoxiesignal alleine nicht ausreicht, sondern dass noch weitere Faktoren für die gewebespezifische EPO-Expression notwendig sind (Semenza, 1991/1; Semenza, 1992; Galson, 1994). Da HNF-4 nur in bestimmten Organen zu finden ist, könnte er als Ko-Regulator an der gewebes- und zellspezifischen Expression von EPO beteiligt sein. Ob sich in der vorliegenden Arbeit Veränderungen in Bereichen wie den Promoter- oder Enhancer-Regionen des EPO Gens ereignet haben, bleibt spekulativ. Zudem wurden die Zell-Linien nicht auf eine HNF-4 Expression untersucht. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass auf die EPO-Expression unter in vitro Bedingungen bislang unbekannte regulative Elemente Einfluss zu nehmen scheinen.

5.2 Einfluss einer paraneoplastischen EPO-Expression auf Hämoglobinwerte

Ein weiterer Befund dieser Arbeit wurde bei der Gegenüberstellung der paraneoplastischen EPO-Expression in Nierenzellkarzinomen und den präoperativ ermittelten Hämoglobinwerten erhoben. Nachdem bei ca. 40% der gesammelten Nierentumoren ein EPO-positives Signal detektiert werden konnte, befand sich im untersuchten Patientenkollektiv keiner mit einer Polyzythämie. Es konnte aber bei den Patienten mit EPO-positiven Nierentumorgewebe eine Tendenz hin zu präoperativ höheren Hämoglobinkonzentrationen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis

entsprach der Auswertung eines Vergleichs der präoperativen Hämoglobinkonzentration mit dem EPO-Expressionsstatus im entsprechenden Tumor von 101 Patienten innerhalb der Arbeitsgruppe. Dabei konnte ein Mittelwert von 12,88g/dl bei den Patienten mit EPO-negativem Tumor und bei der Gruppe mit EPO-positiven Tumor ein Mittelwert von 13,57g/dl festgestellt werden, wobei allerdings keine statistische Signifikanz erreicht wurde ($p=0,06$).

Insgesamt stellen paraneoplastische Polyzythämien ein seltenes Ereignis dar. Im Rahmen von Nierenzellkarzinomen können nur weniger als 5% der Patienten als polyzythäm beschrieben werden (Motzer, 1996), während sich paraneoplastische Polyzythämien in anderen Tumoren wie Karzinomen des Uterus, des Magens, der Hoden, der Leber sowie des Gehirns (Suzuki, 2001; Matsuo, 2003; Kaito, 2004; Cheng, 2002; Wang, 2003) bloß in Einzelfällen finden lassen.

Es ist daher zu betonen, dass die EPO-Genexpression sowie der hämatopoietische Effekt von EPO im Knochenmark unter entzündlichen oder tumorigenen Bedingungen ein komplexes Zusammenspiel zwischen repressiv wirkenden und aktivierenden Faktoren darstellt. Proinflammatorische Zytokine und einige Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise TNF- α (Tumornekrosefaktor- α), IL-1 β (Interleukin-1 β) (beide Hellwig-Burgel, 1999; Faquin, 1992), NF κ B (La Ferla, 2002) oder GATA-2 (Tsuchiya, 1997; Imagawa, 1996), die sich häufig bei Tumorpatienten nachweisen lassen, wirken auf die EPO-Genexpression repressiv. Die dafür verantwortlichen Mechanismen sind bislang aber kaum oder nur ansatzweise verstanden. Ein relativer EPO-Mangel, der die Entstehung einer Anämie bei Patienten fördert, die an chronisch entzündlichen Erkrankungen, an einem malignen Tumor oder an AIDS leiden, könnte teilweise durch proinflammatorische Enzyme oder die Entwicklung einer metabolischen Azidose erklärt werden. Daneben tragen ein Eisendefizit, Immunsuppressiva oder Chemotherapeutika (Horiguchi, 2000; Wolff, 1993) gleichfalls zu der Anämiegenese bei.

Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass das Fehlen eines polyzythäm Patienten nicht auf ein einziges Ereignis reduziert werden darf und dass dessen Deutung entsprechend schwierig ist, da alle oben beschriebenen Möglichkeiten als Gegenspieler eines paraneoplastisch erhöhten EPOs auf die Hämatopoiese gewirkt haben könnten. Eine tatsächliche, signifikante Differenz zwischen Patienten, die an einem Nierenzellkarzinom und solchen, die an einer anderen malignen Erkrankung leiden, könnte in einem umfassenden Vergleich der Anämien dieser beiden Gruppen gezeigt werden. Hier kann daher nur vermutet werden, dass die in ca. 40% der

Tumorgewebsproben nachgewiesene EPO-Expression die Patienten nicht anämisch werden ließ, die paraneoplastische EPO-Expression aber nicht für eine Polyzythämie ausreichte.

5.3 Expressionsverteilung der HIF α -Isoformen

Für die EPO-Genexpression ist die HIF-Aktivierung essentiell, sodass der HIF-1 α und HIF-2 α Proteinstatus der 24 etablierten Zell-Linien untersucht wurde. Dabei zeigte sich eine konstitutive Expression der HIF α -Isoformen in ca. 70%, wohingegen eine physiologische Induzierbarkeit nur bei ca. 30% vorlag. Wichtig ist es in diesem Zusammenhang, die Expressionsverteilung der HIF α -Isoformen zu betrachten, denn erst kürzlich wurde die Abhängigkeit der EPO-Geninduktion von der Isoform HIF-2 α und nicht HIF-1 α in vitro ([Warnecke, 2004](#)) und in vivo ([Scortegagna, 2005](#)) beschrieben.

Zudem konnten weitere Eigenschaften der HIF α -Isoformen in renalen Karzinomzellen nachgewiesen werden, die Einfluss auf das Wachstum der etablierten Zell-Linien nahmen. Hier ist ausserdem die kontroverse und bislang nicht abschließend geklärte Diskussion über die Funktion der HIF α -Isoformen von Bedeutung, denn im Hinblick auf einen möglichen Tumortherapieansatz, der in das HIF-System eingreift, ist deren Kenntnis und ihr Vorkommen von großem Interesse. Während bisher HIF-1 α eine zentrale Bedeutung im Tumorwachstum zugeschrieben wurde ([Sowter, 2003](#)), da es sich besonders in schnell wachsenden Tumoren mit vermehrt hypoxischen Arealen nachweisen ließ ([Maxwell, 1997](#)) und eine erhöhte HIF-Zielgenexpression in klarzelligen Nierenzellkarzinomen gefunden wurde ([Wiesener, 2001](#)), sprechen neuere Ergebnisse eher für eine zentrale Rolle von HIF-2 α . Grundlage dafür war der Nachweis einer spezifischen Transkriptionsinitiation HIF-2 α s auf Gene, die Cyclin D, TGF- α (Tumor-Growth-Faktor- α) und VEGF kodieren und als protumorigen angesehen werden, während HIF-1 α eine spezifische Wirkung unter anderem auf die Transkription des BNip3-Gens auszuüben scheint, dessen Protein proapoptotisch wirkt. Zusätzlich konnte eine offenbar reziprok supprimierende Wirkung der HIF α -Isoformen aufeinander beschrieben werden ([Raval, 2005](#)).

In dieser Arbeit ließ sich eine annähernd gleich verteilte Expression beider HIF α -Isoformen feststellen. Eine HIF α spezifische Untersuchung hinsichtlich der EPO-Expression war aufgrund der genannten HIF α -Konstellation nicht durchführbar. Ein schnelleres oder besseres Wachstum von Zell-Linien, die ausschließlich eine konstitutive Expression HIF-2 α s aufwiesen, konnte nicht beobachtet werden. Insofern

erlauben die hier erhobenen HIF α Ergebnisse keine Aussage über die Bedeutung der HIF-Expression im Tumorwachstum und der Tumorigenese.

Bei den Proteinuntersuchungen zeigte ausserdem die Zell-Linie RCC-L4 eine auffallend verlangsamte Migration von HIF-1 α in der SDS-PAGE, die sich auch mit zwei unterschiedlichen Antikörpern gerichtet gegen verschiedene Epitope im HIF-1 α Protein bestätigen ließ. Diese Verlangsamung könnte durch eine Vergrößerung von HIF-1 α , beispielsweise hervorgerufen durch einen veränderten Phosphorylierungsstatus oder eine Spleißvariante, erklärt werden, weniger wahrscheinlich scheint die Möglichkeit der Assoziation eines weiteren Proteins, da die Denaturierung vor einem Immunoblot alle nicht-kovalenten Bindungen intra- und intermolekular zerstört. Ob diese Veränderung nur sporadisch im Tumor aufgetreten ist oder sich in jeder Zelle des Körpers befindet, bleibt unbekannt. Es kann daher nur spekuliert werden, ob diese Veränderung des HIF-1 α Proteins von tumorigener Relevanz ist.

5.4 Stabilisierung HIFs durch pVHL ist Bedingung, aber unzureichend für die EPO-Genexpression

Die Bedeutung des pVHL und seine Rolle im Rahmen von Nierenkarzinomen sowie einer paraneoplastischen EPO-Expression muss besonders hervorgehoben werden.

Bis zu 75% der sporadischen, klarzelligem Nierenzellkarzinome weisen eine Inaktivierung beider Kopien des VHL-Gens auf, hervorgerufen durch Mutation oder Hypermethylierung (Gnarra, 1994; Herman, 1994; Clifford, 1998). In dieser Arbeit ließ sich bei ca. 40% der Tumorgewebsproben eine EPO-m-RNA Expression nachweisen, wobei all diese positiven Tumoren dem klarzelligem Typ entsprachen. Diese vorzufindende EPO-Expression kann daher über eine zugrunde liegende pVHL-Defizienz erklärt werden, die in 40% zu einer Stabilisierung der HIF α -Isoformen mit nachfolgender Transkriptionsinitiation des EPO-Gens führte.

Dieser Einfluss des pVHLs auf die EPO-Expression wird anhand der familiären Polyzythämien nochmals deutlich. Neben der in dieser Arbeit stabil transfizierten „Chuvash“-Mutation wurden bislang noch neun weitere Mutationen identifiziert, die sich alle durch eine Punktmutation im VHL-Gen auszeichnen. Auf Proteinebene führt dies zum Austausch einer einzigen Aminosäure, wobei der Bereich der α/β Interphase des pVHL hauptsächlich betroffen ist (Randi, 2005; Pastore, 2003/1 und 2; Bento, 2005, Cario, 2005). Bemerkenswerterweise konnte aber bei keiner dieser Keimzellmutationen im VHL-Gen eine Tumorentwicklung beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein defizientes pVHL über die konstitutive HIF-Aktivierung in ca. 71% der Zell-Linien indirekt vermutet werden. Eine EPO-Expression ließ sich im Gegensatz zu den 40% EPO-positiven Tumorgewebsproben trotzdem in keiner der Zellkulturen detektieren. Daher führte die Kenntnis, dass die in der Literatur beschriebenen EPO-exprimierenden Zell-Linien alle von Patienten stammten, bei denen präoperativ eine Polyzythämie vorlag, zu der Annahme, dass in dieser Population ein grundlegender Unterschied vorhanden war. Es wurden daher weitere, bereits publizierte EPO-exprimierende Zell-Linien, wie „GKA“ (Sytkowski, 1983 und 1984), hinzugezogen. Aufgrund der oben genannten Beobachtungen wurden RCC-4 Zellen ausserdem mit der „Chuvash“-Mutation stabil transfiziert. Enttäuschend war in der vorliegenden Arbeit allerdings, dass trotz Hinzunahme der Zell-Linie „GKA“ und der stabilen Transfektion mit der „Chuvash“-Mutation keine EPO-Expression nachzuweisen war. Unter in vitro Bedingungen scheint daher der bisher beschriebene Mechanismus einer pVHL-Defizienz mit nachfolgender HIF α Stabilisierung für eine EPO-Expression nicht auszureichen.

Vor dem Hintergrund des pVHL-Status eröffnet die Beobachtung dieser Differenz der EPO-Expression in vitro und in vivo erneut die Frage nach einer möglichen Ursache. Es ist deshalb wichtig, sich weiteren Funktionen des pVHL zuzuwenden, auch wenn ihre Kenntnis innerhalb dieser Arbeit und hinsichtlich eines Einflusses auf die EPO-Expression spekulativ bleiben muss.

Ein wesentlicher Unterschied der sich unter in vivo Bedingungen finden läßt, ist zum einen der Zellverband, zum anderen der Einfluss des Extrazellularraums. Bemerkenswerterweise muss das pVHL gleich in beiden Zusammenhängen genannt werden. Über seinen Einfluss auf Vinculin, einem Membran-stabilisierenden Protein, oder auch Aktin wirkt es sich auf die Zellbeweglichkeit und Zellform aus (Kamada, 2001; Davidowitz, 2001). Im Rahmen seiner Interaktion mit Fibronectin erlaubt es der extrazellulären Matrix -über die Wirkung der Integrine- Einfluss auf grundsätzliche Zellphänomene wie Proliferation und Differenzierung beispielsweise während der Embryogenese zu nehmen. Dabei wird diskutiert, dass das pVHL falsch gebildetes Fibronectin mittels Ubiquitinierung abbaut (Sommer, 1997), dies aber nur, solange es selbst nicht defekt ist. Bei renalen Tumorzellen, die ein defektes pVHL besitzen, konnte zwar Fibronectin nachgewiesen, jedoch keine adäquate extrazelluläre Matrix ausgebildet werden (Ohh, 1998). Ein möglicher Zusammenhang zwischen der EPO-Expression, einer pVHL-Defizienz und der extrazellulären Matrix kann daher nicht

ausgeschlossen werden, wobei pVHL noch über einen HIF unabhängigen Mechanismus Einfluss auf die EPO-Expression nehmen könnte.

5.5 Ausblick

Wie wichtig die Aufklärung des molekularen Mechanismus der EPO-Genregulation ist, lässt sich anhand zweier Aspekte besonders verdeutlichen. Weltweit steht rekombinantes EPO mit an erster Stelle des an Arzneimitteln benötigten Geldbudgets, selbst wenn die mit rekombinantem EPO insgesamt behandelte Anzahl an Patienten momentan relativ klein erscheint. Zugleich wurde die Indikationsstellung für EPO in den letzten Jahren immer weiter gefasst. Neue interventionelle Strategien, die durch die Aufklärung dieser ausserordentlich gewebs- und zellspezifischen EPO-Genexpression begonnen werden könnten, eröffneten die Möglichkeit, beispielsweise wieder eine endogene EPO-Expression in der Leber oder auch in anderen Zellen hervorzurufen.

Im Hinblick auf die Bedeutung einer paraneoplastischen EPO-Expression bei der Tumorprogression konnte ein eindrucksvoller mitogener Effekt durch EPO beobachtet werden (Westenfelder, 2002). Außerdem wurde festgestellt, dass das pVHL über verschiedene Mechanismen Einfluss auf das Tumorstadium ausübt, wobei sich allerdings zeigte, dass Wildtyp VHL die Tumorentstehung der Nierenzellkarzinome verhindern kann (Iliopoulos, 1995). Ähnlich wie bei der Adenomatosis Polyposis Coli (APC) der kolorektalen Karzinomen, sollte eine pVHL-Mutation des klarzelligen Nierenkarzinoms als ein früher Schritt in der Tumorphogenese betrachtet werden (Lubensky, 1996), denn für die Tumorentstehung müssen noch andere Genloci verändert sein (Kinzler, 1996).

Daher ist es von großem Interesse, die zugrunde liegenden Mechanismen der ausserordentlichen zell- und gewebspezifischen EPO-Expression aufzuklären. Die Beobachtung der Differenz der Expression von EPO und weiteren HIF-Zielgenen, wie der CA-9, bekräftigt die Vermutung, dass für die EPO-Expression weitere Faktoren notwendig sind. Um abzuklären, ob und wo weitere Faktoren an das EPO-Gen binden, könnten DNA-Hypersensitivitätsexperimente oder Chromatin-Präzipitationsversuche durchgeführt werden. Im Rahmen einer EPO vermittelten Tumorprogression sollte EPO als prognostischer Marker und als Angriffspunkt einer antitumorösen Therapie erwogen werden.

6 Zusammenfassung

Die Genexpression Erythropoietins (EPO) ist durch ihre ausserordentliche Gewebe- und Zellspezifität gekennzeichnet. Für die Expression notwendig ist die Aktivierung des HIF (hypoxia-inducible factor)-Transkriptionskomplexes, der durch das pVHL (Protein von Hippel-Lindau) reguliert wird. Ungeachtet dessen ist der Mechanismus dieser restriktiven EPO-Expression bislang aber unklar und ist daher Gegenstand intensiver Forschung, insbesondere im Hinblick auf die hohen Kosten, die klinisch bei der Behandlung mit rekombinantem Erythropoietin entstehen.

In dieser Arbeit zeigten 9 (ca. 40%) der 22 untersuchten, renalen Tumorgewebsproben im RNase Protection Assay (RPA) eine EPO-Expression. Aus diesen 22 Tumorgewebsproben wurden primäre Zell-Linien etabliert, die, ergänzt mit weiteren, extern gewonnenen Zellkulturen, 24 Zell-Linien für diese Arbeit zur Verfügung stellten. Im Immunoblot konnte hier das Muster einer konstitutiven Expression der HIF α -Isoformen bei einer deutlichen Überzahl (17/24) nachgewiesen werden. Damit wurde indirekt eine Funktionseinschränkung im pVHL angenommen, zudem schienen die Voraussetzungen für eine EPO-Expression erfüllt. Trotzdem konnte im RPA bei keiner dieser Zell-Linien eine EPO-Expression gefunden werden. Dies war insofern unerwartet, als dass die 40% EPO-positiven Tumore auch eine EPO-Expression in der Zell-Linie hatten vermuten lassen, die notwendige HIF-Aktivierung gezeigt war und vorherige Arbeitsgruppen das erfolgreiche Etablieren einer stabil EPO-exprimierenden Zell-Linie beschrieben hatten. Konträr zu diesem Ergebnis zeigte der Nachweis im RPA der CA-9 (Carboanhydrase-9) mRNA-Expression in denselben Zell-Linien eine HIF-1 konforme Expression.

Bei der Abklärung möglicher Ursachen konnte mittels in-situ-Hybridisierung bestätigt werden, dass die Tumorzellen Ort der EPO-Expression waren, aus denen die Zell-Linien etabliert wurden. Einen weiteren Versuch, eine EPO-exprimierende Zell-Linie zu etablieren, schien die in der Literatur beschriebene familiäre Polyzythämie mit der „Chuvash“-Mutation des VHL-Gens zu erlauben. Aber auch nach stabiler Transfektion der bereits publizierten Zell-Linie RCC-4 mit dieser „Chuvash“-Mutation konnte unter in vitro Bedingungen keine EPO-Expression detektiert werden.

Es ist daher festzuhalten, dass das Vermögen, EPO zu exprimieren, offensichtlich in vitro verloren geht trotz Aktivierung des notwendigen HIF-Transkriptionskomplexes. Auch das Erzeugen eines stabilen VHL-Transgens konnte in vitro keine EPO-

Expression hervorrufen. Auf die EPO-Expression in vitro scheinen daher weitere, bislang unbekannte Faktoren repressiven Einfluss auszuüben. Ob diese auch an der ausserordentlich gewebs- und zellspezifischen Expression in vivo beteiligt sind, bedarf weiterer Forschung.

7 Literaturverzeichnis

Acs G, Acs P, and Beckwith SM. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. *Can. Res.* 2001;61:3561-65.

Ang SO, Chen H, Hirota K, et al. Disruption of oxygen homeostasis underlies congenital Chuvash polycythemia. *Nature Genetics* 2002/1;32:614-21.

Ang SO, Chen H, Gordeuk VR, et al. Endemic polycythemia in Russia: mutations in the VHL gene. *Blood Cells Mol. Dis.* 2002/2;1:57-62.

Bachmann S, Le Hir M, and Eckardt K-U. Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin. *J. Histochem. and Cytochem.* 1993; 1:335-41.

Beck I, Ramirez S, Weinmann R, and Caro J. Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *J. Biol. Chem.* 1991;266:15563-66.

Bento MC, Chang K-T, Guan Y, et al. Congenital polycythemia with homozygous and heterozygous mutations of von Hippel-Lindau gene: five new Caucasian patients. *Haematologica* 2005;90:129-131.

Blanchard KL, Acquaviva AM, Galson DL, and Bunn F. Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements. *Mol. Cell. Biol.* 1992;12:5373-85.

Bonsdorff E, and Jalavisto E. A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiol. Scand.* 1948;16:150-170.

Bruick RK, and McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001;294:1337-1340.

Cario H, Schwarz C, Jorch N, et al. Mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene and VHL-haplotype analysis in patients with presumable congenital erythrocytosis. *Haematologica* 2005; 90:19-24.

Carnot P, and De Flandre C. Sur l'activité hemopoietique de serum au cours de la régénération du sang. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 1906;143:384-86.

Cheng TI, Tsou MH, Yang PS, Sung SM, Chuang VP, and Sung JL. Dermatomyositis and erythrocytosis associated with hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2002;17:1239-1240.

Chomczynski P, and Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid Guanidinium-Thioisocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987;162:156-59.

Clifford SC, Prowse A, Affara NA, Buys CH, and Maher ER. Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumorigenesis. *Gen. Chrom. Can.* 1998;22:200-09.

Compernelle V, Brusselmans K, Acker T, et al. Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat. Med.* 2002;8:702-710.

Dagnon K, Pacary E, Commo F, et al. Expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in non-small cell lung carcinomas. *Clin. Can. Res.* 2005;11:993-999.

Dame C, Bartmann P, Wolber E, Fahnenstich H, Hofmann D, and Fandrey J. Erythropoietin gene expression in different areas of the developing human central nervous system. *Dev. Brain Res.* 2000;125:69-74.

Da Silva J-L, Lacombe C, Bruneval P, et al. Tumor cells are site of erythropoietin synthesis in human renal cancers associated with polycythemia. *Blood* 1990;75:577-82.

Davidowitz EJ, Schoenfeld AR, and Burk RD. VHL induces renal cell differentiation and growth arrest through integration of cell-cell and cell-extracellular matrix signaling. *Mol. Cell. Biol.* 2001;21:865-74.

Eckardt K-U. Erythropoietin production in liver and kidneys. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 1996;1:28-34.

Ehleben W, Bolling B, Merten E, Porwol T, Strohmaier AR, and Acker H. Cytochromes and oxygen radicals are putative members of the oxygen sensing pathway. *Resp. Physiol.* 1998;114:25-36.

Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, and Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor-1 alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:4273-4278.

Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, et al. *C.elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001;107:43-54.

Erslev AJ. Humoral regulation of red cell production. *Blood* 1953;8:349-357.

Fandrey J, Frede S, Ehleben W, Porwol T, Acker H, and Jelkmann W. Cobalt chloride and desferrioxamine antagonize the inhibition of erythropoietin production by reactive oxygen species. *Kid. Intern.* 1997;51:492-96.

Fandrey J. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004;286:R977-988.

Faquin WC, Schneider TJ, and Goldberg MA. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood* 1992;79:1987-94.

Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 2003; 228:1-14.

Flamme I, Fröhlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A, and Risau W. HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels. *Mech. Dev.* 1997;63:51-60.

Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed B., and Jain RK. Hypoxia and acidosis independently upregulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Can. Res.* 2001;61:6020-24.

Galson DL, Tsuchiya T, Tendler D, et al. The orphan receptor hepatic nuclear factor-4 functions as a transcriptional activator for tissue-specific and hypoxia-specific erythropoietin gene expression and is antagonized by EAR3/COUP-TF1. *Mol. Cell. Biol.* 1994;15:2135-44.

Gnarra JR, Tory K, Weng Y, et al. Mutations of the VHL tumor suppressor gene in renal carcinoma. *Nat. Gen.* 1994;7:85-90.

Goldberg MA, Dunning SP, and Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988;242:1412-15.

Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, and Bradfield CA. Molecular characterization and chromosomal localization of a third α -class hypoxia inducible factor subunit, HIF-3 α . *Gene Expr.* 1998;7:205-213.

Herman JG, Latif F, Weng Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994;91:9700-04.

Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, and Jelkmann W. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999;94:1561-67.

Hippel v E. Über eine sehr seltene Erkrankung der Netzhaut. *Graefe Arch. Ophthalmol.* 1904;59:83-106.

Hjort E. Reticulocyte increase after injection of anemic serum. *Mag. F. Laegividsensk* 1936;97:270-277.

Hogenesch JB, Chan WK, Jackiw VH, Brown RC, and Gu Y-Z. Characterization of a subset of the basic helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signalling pathway. *J. Biol. Chem.* 1997;272:8581-93.

Horiguchi H, Kayama F, Oguma E, Willmore WG, Hradecky P, and Bunn HF. Cadmium and platinum suppression of erythropoietin production in cell culture: clinical implications. *Blood* 2000;96: 3743-47.

Huang LE, and Bunn HF. Regulation of erythropoietin gene expression. *Curr. Opin. Hem.* 1995;2:125-131.

Iliopoulos O, Kibel A, Gray S, and Kaelin Jr WG. Tumor suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat. med.* 1995;1:822-826.

Iliopoulos O. Von Hippel-Lindau disease – genetic and clinical observations. *Front Her. Res.* 2001;28:131-66

Imagawa S, Yamamoto M, Ueda M, and Miura Y. Erythropoietin gene expression by hydrogen peroxide. *Int. J. Hematol.* 1996;64:189-195.

Ivan M, and Kaelin Jr WG. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Curr. Opin. in Gen. Develop.* 2001;11:27-34.

Iyer NV, Kotch LE, Agani F, et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor-1. *Genes Dev.* 1998;12:149-162.

Jaakkola P, Mole DR, Tian Y-M, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001;292:468-472.

Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev.* 1992;72:449-489.

Jiang B-H, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, and Semenza GL. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor-1 α : modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J. Biol. Chem.* 1997;272:19253-60.

Kaito K, Otsubo H, Usui N, and Kobayashi M. Secondary polycythemia as a paraneoplastic syndrome of testicular seminoma. *Ann. Hematol.* 2004;83:55-57.

Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, and Makino Y. Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear localization and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO J.* 1998;17:6573-86.

Kamada M, Suzuki K, Kato Y, Okuda H, and Shuin T. Von Hippel-Lindau protein promotes the assembly of actin and vinculin and inhibits cell motility. *Can. Res.* 2001;61:4184-89.

Kinzler K, and Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-70.

Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;90:10914-21.

Kovacs G, Akhtar M, Beckwith B J, et al. The Heidelberg classification of renal cell tumours. *J. Pathol.* 1997;183:131-133.

Krumdieck N. Erythropoietic substance in the serum of anemic animals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1943;54:14-17.

La Ferla K, Reimann C, Jelkmann W, and Hellwig-Bürgel T. Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF- κ B. *FASEB* 2002;16:1811-1813.

Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ, and Whitelaw ML. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain: a hypoxic switch. *Science* 2002;295:858-861.

Law ML, Cai G-Y, Lin F-K, et al. Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986;83:6920-24.

Lin FK, Suggs S, Lin CH, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985;82:7580-84.

Lindau A. Zur Frage der Angiomatosis Retinae und ihrer Hirnkomplikationen. *Acta Ophthalmol.* 1927;4:193-226.

Lubensky IA, Gnarr JR, Bertheau P, Walther MM, Linehan WM, and Zhuang Z. Allelic deletions of the VHL gene detected in multiple microscopic clear cell renal lesions in von Hippel-Lindau disease patients. *Am. J. Pathol.* 1996;149:2089-2094.

Luo G, Gu Y-Z, Jain S, Chan WK, and Carr KM. Molecular characterization of the murine HIF-1 α locus. *Gene Expr.* 1997;6:287-99.

Madan A, and Curtin PT. A 24-base pair sequence 3' to the human erythropoietin gene contains a hypoxia-responsive transcriptional enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;90:3928-3932.

Magnanti M, Gandini O, and Giuliani L. Erythropoietin expression in primary rat Sertoli and peritubular myoid cells. *Blood* 2001;98:2872-74.

Matsuo M, Koga S, Kanetake H, et al. EPO-producing gastric carcinoma in a hemodialysis patient. *Am. J. Kid. Dis.* 2003;42:E3-4.

Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW, et al. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney International* 1993;44:1149-62.

Maxwell PH, Ferguson DJ, Osmond MK, et al. Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV 40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito-cells. *Blood* 1994;84(6):1823-30.

Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:8104-09.

Maxwell PH, Wiesener MS, Chang G-W, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399:271-75.

Maynard MA, Ohh M. Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia-inducible factor in kidney cancer. *Am. J. Nephrol.* 2004;24:1-13.

Miyake T, Kung CK, and Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 1977;252:5558-5564.

Mostofi FK. Histological typing of kidney tumors. *Int. Histo. Class. Tum. No. 25.* 1981; World Health Organization, Geneva.

Motzer RJ, Bander NH, and Nanus DM. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 1996;335:865-875.

Murgia A, Martella M, Vinanzi C, Polli R, Perilongo G, and Opocher G. Somatic mosaicism in von Hippel-Lindau disease. *Hum. Mutat.* 2000;15:114.

Noguchi Y, Goto T, Yufu Y, et al. Gene expression of erythropoietin in renal cell carcinoma. *Intern. Med.* 1999;38:991-994.

Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, et al. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol. Cell.* 1998;1:959-68.

Ohh M, Park CW, Ivan M, et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β -domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat. Cell Biol.* 2000;2:423-27.

Okabe T, Urabe A, Kato T, Chiba S, and Takaku F. Production of erythropoietin-like activity by human renal and hepatic carcinomas in cell culture. *Cancer* 1985;55:1918-1923.

O'Rourke JF, Tian YM, Ratcliffe PJ, and Pugh CW. Oxygen-regulated and transactivating domains in endothelial PAS protein-1: comparison with hypoxia-inducible factor-1 alpha. *J. Biol. Chem.* 1999;274:2060-2071.

Pastore YD, Jelinek J, Ang S, et al. Mutations in the VHL Gene in sporadic apparently congenital polycythemia. *Blood* 2003;1;4:1591-5.

Pastore YD, Jedlickova K, Guan Y, et al. Mutations of von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene and congenital polycythemia. *Am. J. Hum. Genet.* 2003;2;73:412-419.

Peng J, Zhang L, Drysdale L, and Fong GH. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor-2 α plays an important role in vascular remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;97:8386-8391.

Prchal JT. Pathogenetic mechanisms of polycythemia vera and congenital polycythemic disorders. *Semin. Hematol.* 2001;38:10-20.

Pugh CW, Tan CC, Jones RW, and Ratcliffe PJ. Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991;88:10553-10557.

Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, Gleadle JM, and Ratcliffe PJ. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the α subunit. *J. Biol. Chem.* 1997;272:11205-14.

Randi ML, Murgia A, Putti MC, et al. Low frequency of VHL gene mutations in young individuals with polycythemia and high serum erythropoietin. *Haematologica* 2005;90:689-691.

Raval RR, Lau KW, Tran MG, et al. Contrasting properties of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol. Cell. Biol.* 2005;13:5675-86.

Reissmann KR. Studies on the mechanisms of erythropoietin stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood* 1950;5:347-380.

Rosenberger C, Mandriota S, Jurgensen JS, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α and -2 α in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002;13:1721-1732.

Ryan HE, Lo J, and Johnson RS. HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* 1998;17:3005-15.

Schofield CJ, and Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2004;5:343 -354.

Scortegagna M, Ding K, Zhang Q, et al. HIF-2 α regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood* 2005;105:3133-3140.

Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, et al. Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature* 1988;332:268-69.

Semenza GL, Traystman MD, Gearhart JD, and Antonarakis SE. Polycythemia in transgenic mice expressing the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989;86:2301-05.

Semenza GL, Dureza RC, Traystman MD, Gearhart JD, and Antonarakis SE. Human erythropoietin gene expression in transgenic mice: multiple transcription initiation sites and cis-acting regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* 1990;Mar. 930-38.

Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, and Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factor binds to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991/1;88:5680-84.

Semenza GL, Koury ST, Nejfelt MK, Gearhart JD, and Antonarakis SE. Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991/2;88:8725-29.

Semenza GL, and Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 1992;12:5447-54.

Sherwood JB, and Shouval D. Continuous production of erythropoietin by an established human renal carcinoma cell line: Development of the cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986;83:165-69.

Shouval D, Anton M, Galun E, and Sherwood JB. Erythropoietin-induced polycythemia in athymic mice following transplantation of a human renal carcinoma cell line. *Can. Res.* 1988;48:3430-34.

Shuin T, Kondo K, Ashida S, et al. Germline and somatic mutations in von Hippel-Lindau disease gene and its significance in the development of kidney cancer. *Contrib. Nephrol.* 1999;128:1-10.

Sobin LH, and Fleming ID. *TNM Classification of Malignant Tumors*, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 1997;80:1803-1804.

Sommer T, and Wolf D. Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *FASEB J.* 1997;11:1227-33.

Sowter HM, Raval R, Moore J, Ratcliffe PJ, and Harris AL. Predominant role of hypoxia-inducible transcription factor (HIF)-1 α versus HIF-2 α in regulation of the transcriptional response to hypoxia. *Can. Res.* 2003;19:6130-4.

Stebbins CE, Kaelin Jr WG, and Pavletich NP. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 1999;284:455-461.

Stolle C, Glenn G, Zbar B, et al. Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum. Mutat.* 1998;12:417-23.

Sytkowski AJ, Jerome PR, and Bicknell KA. New human renal carcinoma cell line established from a patient with erythrocytosis. *Can. Res.* 1983;43:1415-19.

Sytkowski AJ, Bicknell KA, Smith GM, and Garcia JF. Secretion of erythropoietin-like activity by clones of human renal carcinoma cell line GKA. *Can. Res.* 1984;44:51-54.

Suzuki M, Takamizawa S, Nomaguchi K, et al. Erythropoietin synthesis by tumour tissues in a patient with uterine myoma and erythrocytosis. *Br. J. Haematol.* 2001;113:49-51.

Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, and Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1- α by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.* 2000;19:4298-309.

Tate PH, and Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 1993;3:226-231.

Terreros DA, Behbehani A, and Cuppage FE. Evidence for proximal tubular cell origin of a sarcomatoid variant of human renal cell carcinoma. *Virchows Arch.* 1986;408:623.

Tian H, McKnight SL, and Russell DW. Endothelial PAS domain protein-1 (EPAS-1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Gen. Develop.* 1997;11:72-82.

Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, and McKnight SL. The hypoxia-responsive transcription factor EPAS-1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Gen. Dev.* 1998;12:3320-24.

Thoenes W, Strkel S, Rumpelt HJ, and Moll R. Cytomorphological typing of renal cell carcinoma - a new approach. *European Urology* 1990;18(suppl.2): 6-9.

Toyama K, Fujiyama N, Suzuki H, Chen TP, Tamaoki N, and Ueyama Y. Erythropoietin levels in the course of a patient with erythropoietin-producing renal cell carcinoma and transplantation of this tumor in nude mice. *Blood* 1979;54:245-53.

Tsuchiya T, Okada M, Ueda M, and Yasukochi Y. Activation of erythropoietin promoter by a point mutation from GATA to TATA in the -30 region. *J. Biochem. (Tokyo)* 1997;121:193-196.

Tsuchiya T, Kominato Y, and Ueda M. Human hypoxic signal transduction through a signature motif in hepatocyte nuclear factor-4. *J. Biochem. (Tokyo)* 2002;132(1):37-44.

Turner KJ, Moore JW, Jones A, et al. Expression of hypoxia-inducible factors in human renal cancer: relationship to angiogenesis and to the von Hippel-Lindau gene mutation. *Can. Res.* 2002;62:2957-2961.

Vogel TW, Brouwers FM, Lubensky IA, et al. Differential expression of erythropoietin and its receptor in von Hippel-Lindau-associated and multiple endocrine neoplasia type 2-associated pheochromocytomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005;90:3747-3751.

Wallace AC, and Nairn RC. Renal tubular antigens in kidney tumors. *Cancer* 1972;29:977.

Wang GL, and Semenza GL. Characterization of hypoxia-inducible factor-1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 1993;268:21513-18.

Wang GL, and Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor-1. *J. Biol. Chem.* 1995;270:1230-37.

Wang LY, Shih LY, Chen SH, Liu HC, Chai IJ, and Liang DC. Neuroblastoma with expression of erythropoietin resulting in erythrocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2003;25:649-650.

Warnecke C, Zarborowska Z, Kurreck J, et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by the use of RNA interference:

erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J.* 2004;18:1462-1464.

Wenger RH, Rolfs A, Marti HH, Guenet J-L, and Gassmann M. Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mRNA expression of mouse hypoxia-inducible factor-1 α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996;223:54-59.

Wenger RH, Kvietikkova I, Rolfs A, Camenisch G, and Gassmann M. Oxygen-regulated erythropoietin gene expression is dependent on a CpG methylation free hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding site. *Eur.J.Biochem.* 1998;235:771-777.

Westenfelder C, and Baranowski RL. Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells. *Kidney International* 2000;58:647-57.

Westenfelder C. Unexpected renal actions of erythropoietin. *Exp. Nephrol.* 2002;10:294-298.

Wiesener MS, Turley H, Allen WE, et al. Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 α . *Blood* 1998;92:2260-68.

Wiesener MS, Münchenhagen PM, Berger I, et al. Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1 α in clear cell renal carcinomas. *Can. Res.* 2001;61:5215-22.

Wolff M, and Jelkmann W. Effects of chemotherapeutic and immunosuppressive drugs on the production of erythropoietin in human hepatoma cultures. *Ann. Hematol.* 1993;66:27-31.

Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Can. Res.* 2000;60:7075-83.

Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, Inoue K, Nagao M, and Sasaki R. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 1998;273:25381-87.

Yin H, and Blanchard KL. DNA methylation represses the expression of the human erythropoietin gene by two different mechanisms. *Blood* 2000;95:111-19.

Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, et al. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor-1 α . *J. Clin. Invest.* 1999;103:691-696.

Zhang W, et al. Transitional change in interaction between HIF-1 and HNF-4 in response to hypoxia. *J. Hum. Genet.* 1999;44:293-99.

8 Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen stelle ich meinen Lebenslauf nur in der gedruckten Version zur Verfügung.

9 Erklärung

„Ich, Anna Bettina Sobottka, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Regulation der Erythropoietin-Expression in renalen Tumoren und daraus etablierten Zell-Linien“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Freiburg, den 25. Januar 2006

Anna Bettina Sobottka

10 Danksagung

Herrn PD Dr. M. Wiesener und Herrn Professor Dr. K.-U. Eckardt danke ich sehr herzlich dafür, mir das anspruchsvolle Thema gestellt und mich bei der Durchführung der Arbeit intensiv unterstützt zu haben.

Insbesondere möchte ich Herrn PD Dr. M. Wiesener meinen besonderen Dank aussprechen. Er hat mich in das experimentelle Arbeiten eingeführt und mich bis zur Fertigstellung dieser Dissertationsschrift intensiv betreut.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Frau Dr. C. Warnecke sowie den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. K.-U. Eckardt für die anregenden Diskussionen und die kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. I. Schmidt und U. Lohmann danken für die mir zur Verfügung gestellten Zell-Linien, primär etabliert aus renalem Tumorgewebe. Für die großzügige Gabe der RCC-4 Zellen und den HA-markierten Plasmiden für Wildtyp VHL und der „Chuvash“-Mutation bedanke ich mich bei den Professoren P. Ratcliffe und P. Maxwell (Department of Cellular Science, John Radcliffe Hospital, Oxford, Grossbritannien). Ihre kooperative Zusammenarbeit im Rahmen der in-situ-Hybridisierung war für mich eine große Hilfe.

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders für ihre immerwährende Unterstützung und Motivation im Verlauf des Studiums und bei dieser Dissertation danken.