

## 6 Diskussion

Die ungenügende Sauerstoffversorgung des Gewebes stellt ein Problem für alle Arten von Tumoren dar. Durch das schnelle und expansive Wachstum entsteht ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -versorgung. Um das Tumorstadium gewährleisten zu können, muß eine ausreichende Oxygenierung der Zellen stattfinden. Dies geschieht zum Einen durch Angiogenese und zum Anderen durch genetische Veränderungen der Tumorzellen, durch die die Tumorzellen einen veränderten, an Hypoxie angepassten Stoffwechsel bekommen. Der Hypoxie kommt somit in der Tumorforschung eine große Bedeutung zu. Neben der Bildung von neuen Blutgefäßen ist die ungenügende Sauerstoffversorgung ein Auslöser zur Bildung von Metastasen [2]. Da die mangelnde Sauerstoffversorgung eine zentrale Rolle in der Entwicklung maligner Tumore und Metastasen bildet, stellt die Beeinflussung der Hypoxie einen guten therapeutischen Angriffspunkt dar. Dabei besteht einerseits die Möglichkeit, die Sauerstoffversorgung des Gewebes durch vermehrte Oxygenierung zu steigern. Andererseits kann diese spezifische Eigenschaft der Tumore als therapeutischer Ansatzpunkt genutzt werden. Dies ist von besonderer Bedeutung, da gerade die an hypoxische Bedingungen adaptierten Tumorzellen eine höhere Resistenz gegenüber den herkömmlichen Therapiemodellen, wie Radiotherapie und Chemotherapie, besitzen [26]. Zusätzlich ist die Hypoxie mit hoher Malignität, erhöhtem Potential zur Metastasierung und einer besonders schlechten Prognose assoziiert [3]. Diese Tatsachen unterstreichen die Wichtigkeit, neuer therapeutischer Strategien. Es existieren bereits Therapiemodelle auf gentherapeutischer Grundlage [13]. Neben der therapeutischen Bedeutung der hypoxieassoziierten Faktoren, können diese Faktoren auch von diagnostischem Nutzen sein, da die genetischen Veränderungen als Antwort auf hypoxische Bedingungen spezifisch für Tumorzellen sind. Ließen sich hypoxieassoziierte Gene und ihre Genprodukte identifizieren, könnten diese als Tumormarker in der Verlaufskontrolle oder der Diagnostik verwendet werden.

Ein Mechanismus durch den Tumorzellen auf Hypoxie reagieren, ist die Aktivierung von hypoxia-inducible transcription factors (HIFs) [42]. Bisher konnten mehr als 40 Gene identifiziert werden, die durch HIF reguliert werden. Die durch diese Gene kodierten Proteine sind an wichtigen Prozessen (Angiogenese/vaskuläres Remodelling, Erythropoese, Glucose Transport, Glykolyse, Zellproliferation usw.) beteiligt [49]. Bei HIF handelt es sich um eine Gruppe von heterodimeren Transkriptionsfaktoren. Bislang sind drei Untergruppen, HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  und HIF-3 $\alpha$  bekannt. HIFs bestehen aus einer der drei  $\alpha$ -Ketten (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  oder HIF-3 $\alpha$ ) und einer  $\beta$ -Kette. Sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Kette gehören zur basic helix-loop-helix-(bHLH)Protein Superfamilie [20]. HIF-1 $\alpha$  war Gegenstand mehrerer Untersuchungen. So wurde festgestellt, dass in der Mehrzahl der Glioblastome und anaplastischen Astrozytome eine erhöhte Expression von HIF-1 $\alpha$  nachzuweisen ist [51]. Besonders hoch ist die Expression in Gebieten um die Nekrosezonen in Glioblastomen [57]. Es bestehen bereits Möglichkeiten, HIF-1 $\alpha$  als therapeutisches Ziel zu nutzen. Dabei handelt es sich um die Versuche eines Gentransfers von antisense HIF-1 $\alpha$  und die Identifikation von HIF-1 $\alpha$ -Inhibitoren [42]. So kann in den hypoxieinduzierten Regelkreis eingegriffen werden, der charakteristisch für Tumorgewebe ist. Es handelt sich dabei um eine Therapie, die sehr gezielt nur das Tumorgewebe angreift und wenig Einfluß

auf das übrige Gewebe hat.

HIF-3 $\alpha$  hat große Ähnlichkeit mit HIF-1 $\alpha$  und HIF-2 $\alpha$ . Es unterscheidet sich von den beiden anderen Proteinen am C-terminalen Ende, wo sich Strukturen zur Transaktivierung befinden [15].

HIF-3 $\alpha$  wird bei genügendem Sauerstoffangebot an der oxygen-dependent degradation domain (ODD), der sich auf der  $\alpha$ -Kette befindet, hydroxyliert [35]. Durch die Hydroxylierung kann das von-Hippel-Lindau Tumor Suppressorprotein (VHL) an HIF binden. Durch VHL wird HIF für eine Ligase erkennbar und von dieser degradiert. So kommt es zu einem Verlust der Transkriptionsaktivität von HIF [49]. Veränderungen in der Sauerstoffspannung führen daher zu einer unterschiedlichen Expression der  $\alpha$ -Kette, jedoch zu keiner anderen Expression der  $\beta$ -Kette [45]. HIF-3 $\alpha$  trägt durch den beschriebenen Mechanismus der sauerstoffabhängigen Hydroxylierung zur Adaptation an zu geringe Sauerstoffversorgung bei. Durch die Hydroxylierung an der ODD wird HIF-3 $\alpha$  degradiert. Es wurde ein weiterer Faktor identifiziert, der die Aktivität von HIF-3 $\alpha$  beeinflusst. Dabei handelt es sich um einen Faktor, der durch alternatives Splicen des Genprodukts vom HIF-3 $\alpha$ -Gen entsteht. Dieses Protein heißt Inhibitory PAS Domain Protein (IPAS) [31]. HIF-3 $\alpha$  ist in einen Regelkreis eingebunden, der eine Anpassung des Gewebes an Hypoxie ermöglicht. Da Hypoxie im Gewebe zu einer Inaktivierung von HIF-3 $\alpha$  führt, können unter diesen Bedingungen nachfolgende Gene nicht aktiviert werden. Bei denen von HIF-3 $\alpha$  aktivierten Gene handelt es sich unter anderem um VEGF, PDGF, tumor-growth-factor  $\alpha$  (TGF $\alpha$ ), Glucosetransporter 1 (GLUT1) und Erythropoetin (EPO)[45].

Da diese Proteine eine wichtige Rolle im Zellmetabolismus, der Angiogenese und der Zellproliferation spielen, handelt es sich bei HIF-3 $\alpha$  um einen der bedeutendsten Faktoren in der physiologischen Reaktion auf Gewebhypoxie,

An den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen ist zunächst bemerkenswert, dass das Gen für HIF-3 $\alpha$  in allen Tumorproben (sowohl in den Metastasen, als auch in den GBMs) hochreguliert wird. Es findet sich kein Fall, in dem eine Gensuppression festgestellt werden kann. HIF-3 $\alpha$  kann daher als tumorassoziiertes Gen betrachtet werden. Die vermehrte Expression von HIF-3 $\alpha$  in Hirntumoren ist mit der geringeren Oxygenierung des Tumorgewebes zu erklären. Aus dem starken und schnellen Wachstum der Tumore resultiert eine relative Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff, da die Angiogenese langsamer fortschreitet. Höhere Level an HIF-3 $\alpha$  mRNA in Geweben mit geringerer Sauerstoffspannung wurde auch in anderen Untersuchungen festgestellt [20].

Die Werte sind im Vergleich zu Proben von Normalhirn gemessen worden und daher auch in diesem Zusammenhang zu interpretieren. Es kann somit festgestellt werden, dass es sich bei HIF-3 $\alpha$  um ein tumorspezifisches Gen handelt. Auch die prozentualen Anteile der signifikanten Expressionssteigerungen, die bei den Metastasen bei 33% und bei GBMs sogar bei 58,92% liegt, weisen darauf hin, dass es sich bei HIF-3 $\alpha$  um ein Gen handelt, dass für die allgemeine Entwicklung von intrakraniellen Raumforderungen charakteristisch ist. Eine Spezifität von HIF-3 $\alpha$  für eine Tumorentität läßt sich allerdings nicht zweifelsfrei nachweisen, da in allen untersuchten Tumoren eine vermehrte Expression von HIF-3 $\alpha$  nachzuweisen ist. Allerdings weisen die primären Hirntumore im Vergleich zu den Hirnmetastasen einen höheren prozentualen Anteil der Expressionssteigerung von HIF-3 $\alpha$  auf.

Bei den primären Tumoren beträgt der Anteil einer signifikanten Steigerung mit einem Expressionsfaktor  $>2$  58,92%. Die Metastasen weisen nur einen Anteil von 33% auf. Dabei ist auch zu berücksichtigen, dass die Expressionssteigerung bei den meisten Primärtumoren verglichen mit den Metastasen höher liegt. Diese Ergebnisse unterstreichen die Feststellung, dass HIFs in verschiedenen Organen unter physiologischer Sauerstoffspannung unterschiedlich stark exprimiert werden. So wird die höchste mRNA-Konzentration von HIF im Gehirn und in der Lunge gefunden. Niedrigere Konzentrationen findet man hingegen im Herz und in der Leber [16]. Damit bleibt die Frage offen, inwieweit HIF-3 $\alpha$  in der Entwicklung der Primärtumore eventuell eine wichtigere Rolle spielt, als bei der intrakraniellen Metastasierung. Des weiteren bleibt zu klären, ob Primärtumore aus Geweben mit einer höheren Expression von HIF bereits bei normaler Sauerstoffversorgung bei der Metastasierung eine höhere Affinität zum Gehirn haben, dahier ebenfalls eine höhere HIF-Konzentration zu finden ist. In diesem Fall würde HIF im Sinne der Hypothese von "seed and soil" einen Boden für die intrakranielle Metastasierung bieten. Um diese Frage zu klären, müssten die Expressionshöhe von HIF in den unterschiedlichen Organen untersucht werden. Ein Vergleich der Organe untereinander im Zusammenhang mit ihrer Eigenschaft ins Gehirn zu metastasieren, wäre eventuell aufschlußreich. Allerdings handelt es sich bei HIF-3 $\alpha$  um einen Faktor, der im Zusammenhang mit den pathologischen Bedingungen bei Hypoxie eine wichtige Rolle spielt. Die Sauerstoffversorgung stellt maligne Gewebe aus allen Organgeweben vor besondere Herausforderungen. Durch das Mißverhältnis von schnellem Wachstum und unzureichender Blutversorgung sind Tumore auf spezielle Adaptationsmechanismen, wie die Angiogenese, angewiesen. HIF-3 $\alpha$  ist in einen Regelkreis eingebunden, der eine Anpassung an hypoxische Bedingungen darstellt. Von daher ist es zu erklären, dass HIF-3 $\alpha$  wenig spezifisch für eine Tumorentität ist. Vielmehr handelt es sich um ein Gen, das in vielen Neoplasien überexprimiert wird. Diese Annahme wird durch andere Arbeiten erhärtet, in denen ein Zusammenhang von HIF-3 $\alpha$  und multipler Tumorentstehung gezeigt werden konnte [45]. So läßt sich beim von Hippel-Lindau-Syndrom, einer autosomal-dominant erblichen Phakomatose, eine verstärkte HIF-3 $\alpha$ -Exprimierung feststellen. Dieses Krankheitsbild geht mit Tumorentstehung in multiplen Organen einher. Dabei handelt es sich im wesentlichen um Angiome der Netzhaut und des Kleinhirns, aber auch um Neoplasien in der Niere (Nierenzellkarzinom) und Phäochromozytome. Diese Untersuchungen im Zusammenhang mit dem von-Hippel-Lindau-Syndrom unterstützen die Vermutung, dass HIF-3 $\alpha$  in der vaskulären Neubildung eine wesentliche Rolle spielt.

Bei HIF-3 $\alpha$  handelt es sich also um ein Gen, das offensichtlich eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielt. Da HIF-3 $\alpha$  ein Aktivator einiger nachgeschalteter Proteine ist, die für eine genügende Sauerstoffversorgung des Gewebes sorgen, ist er von potentieller therapeutischer Bedeutung. Eine Einflußnahme auf die Expression von HIF-3 $\alpha$  könnte einen Ansatzpunkt für eine Behandlung maligner Tumore darstellen. Eine Inhibition von HIF-3 $\alpha$  würde auch die nachgeschalteten Proteine VEGF, PDGF, TGF $\alpha$ , GLUT1 und EPO negativ beeinflussen. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Tumorgewebes und damit das Tumorstadium wären so erschwert.

Ob sich HIF-3 $\alpha$  als Tumormarker anbietet, läßt sich nicht abschließend beantworten. Es

scheint sich nicht um einen spezifischen Marker zu handeln, da HIF-3 $\alpha$  in verschiedenen Neoplasien vermehrt exprimiert wird. An den gewonnenen Daten ist jedoch die wesentlich stärkere Expressierung von HIF-3 $\alpha$  bei den primären Hirntumoren gegenüber den Hirnmetastasen auffällig. Ob dies an einem schnelleren Wachstum der Tumore und dem größeren Volumen liegt oder ob es sich um Charakteristika der Gewebe handelt, aus denen die Tumore hervorgehen, bleibt offen.

Es stellt sich die Frage, ob eine Korrelation zwischen der Höhe der Expression von HIF-3 $\alpha$  und der Sauerstoffversorgung des Gewebes besteht. Da die Sauerstoffversorgung eines Tumors eng mit dessen Volumen verbunden ist, könnte ein Zusammenhang zwischen dem Tumolvolumen und dem Expressionslevel von HIF-3 $\alpha$  bestehen. HIF-3 $\alpha$  wird schon bei geringem Abfall der Sauerstoffspannung stark überexprimiert. Es scheint sich also um einen besonders sensiblen Marker für Hypoxie zu handeln [16]. Da neben der Regulation der Transkription auch andere Mechanismen die Aktivität von HIF beeinflussen, wie kann allein durch das Expressionsniveau der mRNA keine endgültige Aussage darüber gemacht werden, inwieweit HIF als Tumormarker herbeigezogen werden kann. Neben der erhöhten Expression auf mRNA-Ebene, muß daher auch ein Anstieg des Genprodukts in der Peripherie nachweisbar sein. So bestünde die Möglichkeit, HIF-3 $\alpha$  als potentiellen Tumormarker in der Kontrolle des Krankheitsverlaufs einzusetzen.