

3. Ergebnisse

3.1. Klinische Daten

3.1.1 Tumorkollektiv

Unabhängig von der Fragestellung in der hier dargestellten Arbeit, wurde das gewonnene Tumorgewebe histologisch in den pathologischen Instituten der beteiligten Kliniken (Universitätsklinikum Charité in Berlin, Krebsforschungszentrum in Heidelberg) untersucht und der histologischen Klassifikation von Thoenes et al. folgend eingeteilt [78].

Insgesamt wurde eine Anzahl von 70 Nierentumoren gesammelt. Dabei gehörten 53/70 (75,8%) zu der Gruppe der klarzelligen Nierentumoren und 17/70 (24,2%) zu der Gruppe der nicht-klarzelligen Nierentumoren. Die Tumoren der zweiten Gruppe stellen sich histologisch wie folgt dar: chromophiler Typ 3/17 (17,6%), spindelzellig-pleomorpher Typ 3/17 (17,6%), Onkozytom 2/17 (11,8%), chromophober Typ 1/17, sarkomatoider Typ 1/17, Plattenepithelkarzinom 1/17, papillär-chromophiler Typ 1/17, Polyzysten 1/17 (Tabelle 8, siehe Anhang).

Diese Angaben entsprechen in etwa der prozentuellen Verteilung der einzelnen histologischen Typen, welche in der Literatur beschrieben sind [68;78;79].

Für die 39 gesammelten Nierentumoren aus der Charité war es möglich die Patientenakten zu studieren und so nähere Informationen über klinische Daten bezüglich Alter, Geschlecht, Staging, Grading sowie Laborwerte (Hb-Wert) zu erhalten. Hierbei folgt das Staging nach der TNM-Klassifikation für Nierentumoren nach der Fassung von Sobin et al. 1997 [79].

Für die verbleibenden Tumoren, aus den auswärtigen Zentren, kann nur eine Aussage bezüglich des histologischen Typs getroffen werden.

Tabelle 2 führt die histopathologischen und klinischen Daten der 39 Charité Patienten auf.

Tabelle 2:

Patientendaten-Charité

Pat.	Alter (J)	Geschl.	Histo.	Staging	Grading	Tumorgröße (mm)
1.	56	w	KZ	T2 N0 MX	G2	75x60x50
2.	57	m	KZ	T3b NX M1	G2	97x85x95
3.	71	w	KZ	T3b NX M1	G3	62x62x62
4.	70	m	KZ	T1 NX M0	G2	60x50
5.	66	m	KZ	T3c N0 M1	G2	90x55x50
6.	64	m	KZ	T3b N1 M0	G2	100x70x40
7.	72	m	Pap	T3a NX MX	G2	90x60x55
8.	42	w	KZ	T2 N0 M0	G2	30 (Durchmesser)
9.	56	m	KZ	T1 NX M0	G2	25 (Durchmesser)
10.	70	m	Onk	fehlt	fehlt	20 (Durchmesser)
11.	67	w	KZ	T3c N0 MX	G2	82x50x37
12.	50	w	KZ	T2 N0 M0	G2	75 (Durchmesser)
13.	72	m	KZ	T1 NX M0	G2	45x45x30
14.	69	m	KZ	T1 NX M0	G1	25x23x23
15.	59	w	KZ	T3b N0 MX	G3	110x90x50
16.	69	w	KZ	T1 NX M1	G2	55x40x40
17.	58	m	KZ	T3a N0 MX	G2	20 (Durchmesser)
18.	65	m	KZ	T1 NX MX	G2	38x26x33
19.	63	w	Onk	fehlt	fehlt	22 (Durchmesser)
20.	77	m	KZ	T3a NX MX	G2	65x55x45
21.	48	m	PZ	fehlt	fehlt	28x22x20
22.	64	m	KZ	T3a NX MX	G2	100x70x80
23.	49	m	KZ	T3b N0 M1	G2	fehlt
24.	66	m	KZ	T1 NX MX	G2	fehlt
25.	71	w	KZ	T1 NX MX	G2	35x35x30
26.	66	m	Chro	T3a NX MX	G2	40x35x35
27.	71	m	Sar	T3b N2 MX	G4	70x50x50
28.	73	w	KZ	T1 NX MX	G2	40x30x35
29.	64	m	Chr	T2 N1 MX	G2	90x90x80
30.	67	w	Chr	T3a N0 MX	G2	25 (Durchmesser)
31.	49	m	KZ	T3a N1 MX	G2	70x60x60
32.	74	m	KZ	T3b NX MX	G2	45 (Durchmesser)
33.	52	m	KZ	T1 NX MX	G2	35x35x27
34.	74	m	KZ	T1 N0 MX	G2	28x27x20
35.	63	m	KZ	fehlt	fehlt	45x40x20
36.	61	w	KZ	T2 N0 M1	G2	76x65x58
37.	45	m	KZ	T1 NX MX	G2	60x50x50
38.	61	m	KZ	T2 N0 MX	G2	80x77x65
70.	50	m	KZ	T3a N0 M0	G3	80x70x70

Pat.=Patient; Alter (J)= Alter in Jahren; Geschl.=Geschlecht (m=männlich; w=weiblich); Histo.=Histologie

KZ=klarzellig; Pap=papillär; Onk=Onkozytom; PZ=Polyzysten; Chro=Chromophob; Sar=Sarkomatoid;

Chr=Chromophil

Anhand der Tabelle zeigt sich ein erhöhtes Auftreten der Erkrankung beim männlichen Geschlecht, 27/39 (**69,2%**), im Verhältnis zum weiblichen Geschlecht, 12/39 (**30,8%**). Diese Verteilung entspricht den beschriebenen Angaben in der Literatur [63; 64; 80].

Das mittlere Erkrankungsalter lag bei 62,5 Jahren, wobei es keine großen geschlechtsspezifischen Unterschiede gab (mittleres Erkrankungsalter der Frauen 63,0 Jahre; mittleres Erkrankungsalter der Männer 62,2 Jahre).

3.2. Expression der Transkriptionsfaktoren HIF-1 α und HIF-2 α in menschlichen Nierentumoren

Der Nachweis der HIF-1 α /HIF-2 α Protein Expression erfolgte mit Hilfe des Immunoblot (Material&Methoden). Dabei wurden sowohl die Proteinextrakte des Tumorgewebes als auch die des gesunden Nierengewebes des gleichen Patienten aufgetragen.

Im gesunden Nierengewebe zeigten sich nur schwache bis kaum erkennbare Signale für HIF-1 α /2 α . Im Gegensatz dazu war im Tumorgewebe ein vollkommen anderes Muster zu erkennen. So wiesen von den insgesamt 70 Tumoren 58 (**82,9%**) für HIF-1 α und 54 (**77,2%**) für HIF-2 α eine hohe Expression für das jeweilige Protein auf.

Betrachtete man die HIF-1 α /2 α Überexpression in Abhängigkeit vom histologischen Typ so ergab sich folgendes Verteilungsmuster: Von den 53 klarzelligen Nierenzellkarzinomen zeigten 49 eine verstärkte Expression des HIF-1 α Proteins und 44 eine verstärkte Expression des HIF-2 α Proteins, während dies bei den nicht klarzelligen Nierenzellkarzinomen für HIF-1 α nur in 9 von 17 und für HIF-2 α nur in 10 von 17 der Fall war.

Ein Überblick der Proteinexpression für HIF-1 α /HIF-2 α ist nachfolgend in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3:

Proteinexpression von HIF-1 α /HIF-2 α

	HIF-1α		HIF-2α	
	positiv	negativ	positiv	negativ
Nierentumoren n=70	58 82,9%	12 17,1%	54 77,2%	16 22,8%
Klarzeller n=53	49 92,5%	4 7,5%	44 83,0%	9 17,0%
Nichtklarzeller n=17	9 53,0%	8 47,0%	10 58,8%	7 41,2%

Die Expression des HIF-1 α /HIF-2 α Proteins wurde semiquantitativ mit Hilfe des Vergleiches mit hypoxischen Hep3B-Zellen bestimmt (Material&Methoden-2.3.4.).

Es ergaben sich auch hier Unterschiede bezüglich der Signalintensität zwischen den klarzelligen und den nicht klarzelligen Nierenzellkarzinomen. Klarzellige Nierenzellkarzinome zeigten im Durchschnitt eine höhere Expression von HIF-1 α /HIF-2 α als nicht klarzellige Tumoren, wie aus Tabelle 4 deutlich erkennbar ist.

Tabelle 4:

Quantifizierung der Proteinexpression von HIF-1 α /HIF-2 α in klarzelligen und nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinomen

	HIF-1α				HIF-2α		
	-	+	++	+++	-	+	++
Klarzeller n=53	4 7,5%	19 35,8%	23 43,5%	7 13,2%	9 17,0%	24 45,2%	20 37,8%
Nichtklarzeller n=17	8 47,0%	6 35,3%	2 11,7%	1	7 41,2%	7 41,2%	3 17,6%

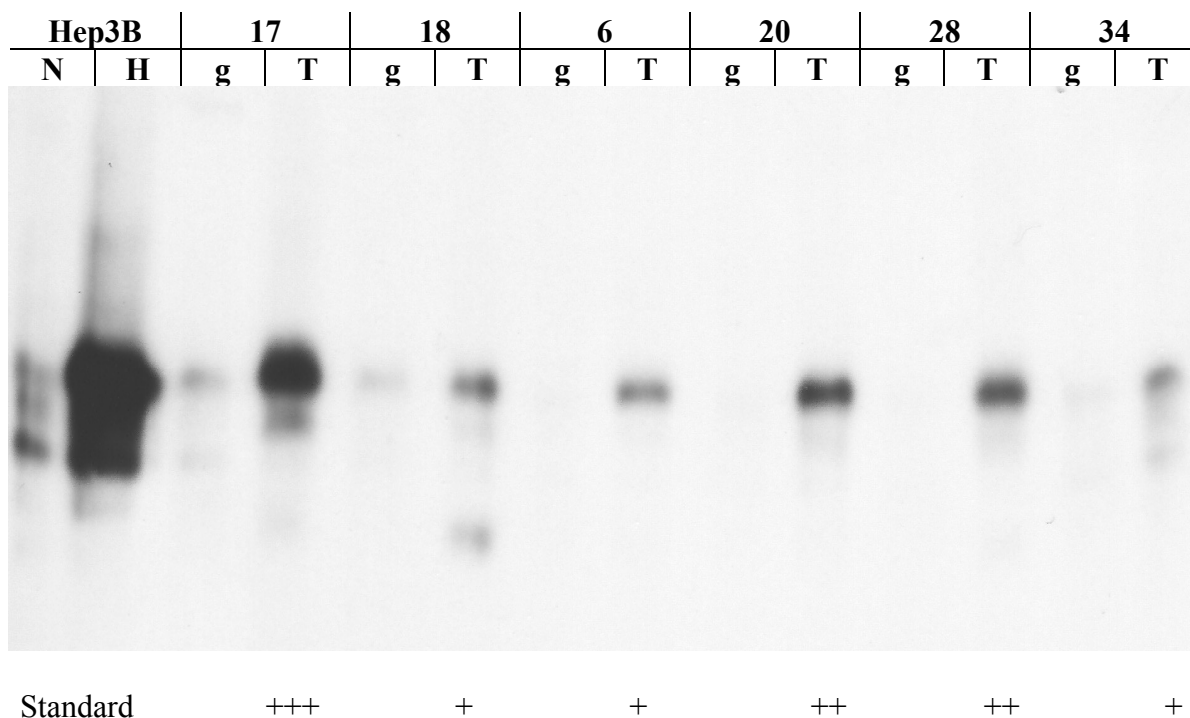
Von den klarzelligen Nierenzellkarzinomen zeigten 30/53 (56,7%) eine Signalintensität von mindestens ++ für HIF-1 α , wohingegen nur 3/17 (17,7%) bei den nichtklarzelligen Nierenzellkarzinomen eine entsprechende Signalintensität aufwiesen.

Für die HIF-2 α Expression ergab sich folgendes Bild: 20/53 (37,8%) der klarzelligen Nierenzellkarzinome zeigte eine Signalintensität von ++ im Vergleich zu den nichtklarzelligen Nierenzellkarzinomen 3/17 (17,6%).

In den folgenden Abbildungen (Abb.2a/b) ist die HIF-1 α /HIF-2 α Expression in klarzelligen Nierenzellkarzinomen exemplarisch am Beispiel von sechs Patienten dargestellt.

Abbildung 2a:

Immunoblot: Expression des Proteins HIF-1 α in klarzelligen Nierenzellkarzinomen



Darstellung von sechs Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom.

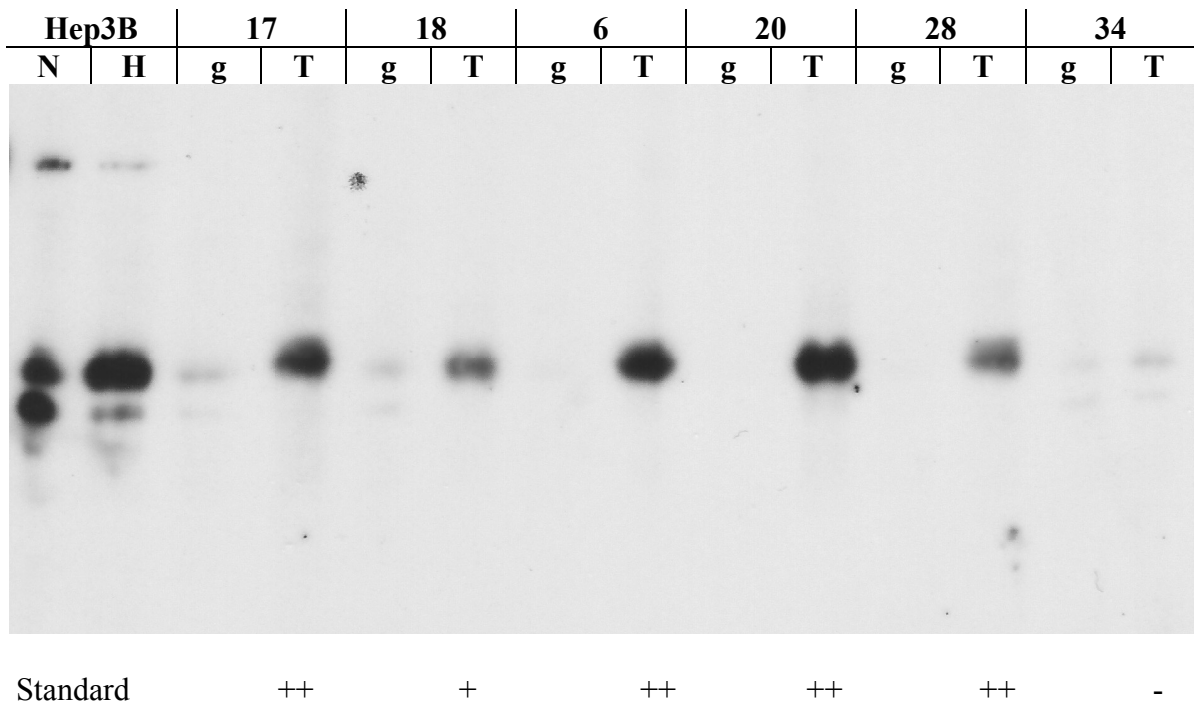
g: gesundes Nierengewebe, T: Tumor; Als Standards für die hypoxische Induktion von

HIF-1 α dienten Zellkulturlysate von Hep3B Zellen unter Normoxie (N) und vier Stunden Hypoxie (H) 1% O₂.

Semiquantitative Quantifizierung (+, ++, +++), im Vergleich zum Standard (+++) der hypoxischen Hep3B Zellen.

Abbildung 2b:

Immunoblot: Expression des Proteins HIF-2 α in klarzelligen Nierenzellkarzinomen



Darstellung von sechs Patienten mit einem klarzelligen Nierenzellkarzinom.

g: gesundes Nierengewebe, T: Tumor; Als Standards für die hypoxische Induktion von

HIF-2 α dienten Zellkulturlysate von Hep3B Zellen unter Normoxie (N) und vier Stunden Hypoxie (H) 1% O₂.

Semiquantitative Quantifizierung (+,++), im Vergleich zum Standard (++) der hypoxischen Hep3B Zellen.

3.3. Expression von Erythropoietin in menschlichen Nierentumoren

In dieser Arbeit wurde neben der HIF-1 α /HIF-2 α Expression auch die EPO Expression mit Hilfe eines RNase Protection Assay untersucht. Es wurde wiederum gesundes und malignes Gewebe ein und desselben Patienten analysiert.

Von den 70 Nierentumoren konnten lediglich 64 auf EPO mRNA untersucht werden. Die ausstehenden sechs Tumoren wurden aus Materialgründen (Mangel an Material; Degradation von RNA) nicht in der Arbeit berücksichtigt.

Im gesunden Gewebe konnte in der Mehrzahl der Fälle 58/64 keine EPO Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Hingegen zeigten 22/64 (34,4%) der Nierenzellkarzinome eine mRNA Expression für das EPO-Gen.

Die Häufigkeit der Erythropoietin Expression variierte je nach histologischem Typ. Von den 52 klarzelligen Nierenzellkarzinomen zeigten 21 (40,4%) eine Expression für EPO, währenddessen dies bei den Nichtklarzellern nur in 1 von 11 der Fall war.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die EPO Expression in allen Nierenzellkarzinomen mit einer Differenzierung in Klarzeller und Nichtklarzeller.

Tabelle 5:

EPO-Expression in Nierenzellkarzinomen

	EPO	
	positiv	negativ
Nierentumoren n=64	22 34,4%	42 65,6%
Klarzeller n=52	21 40,4%	31 59,6%
Nichtklarzeller n=12	1	11

Für die Expression des EPO Gens, insbesondere aber für die hypoxische Induktion, ist die Aktivierung von HIF notwendig. Dementsprechend zeigten im Immunoblot 20/21 der EPO exprimierenden klarzelligen Nierentumoren eine gleichzeitige HIF-1 α Überexpression beziehungsweise 19/21 eine gleichzeitige HIF-2 α Überexpression.

Von den EPO-bildenden klarzelligen Nierentumoren zeigten 18/21 eine Überexpression sowohl für HIF-1 α als auch für HIF-2 α (siehe Tabelle 8 im Anhang).

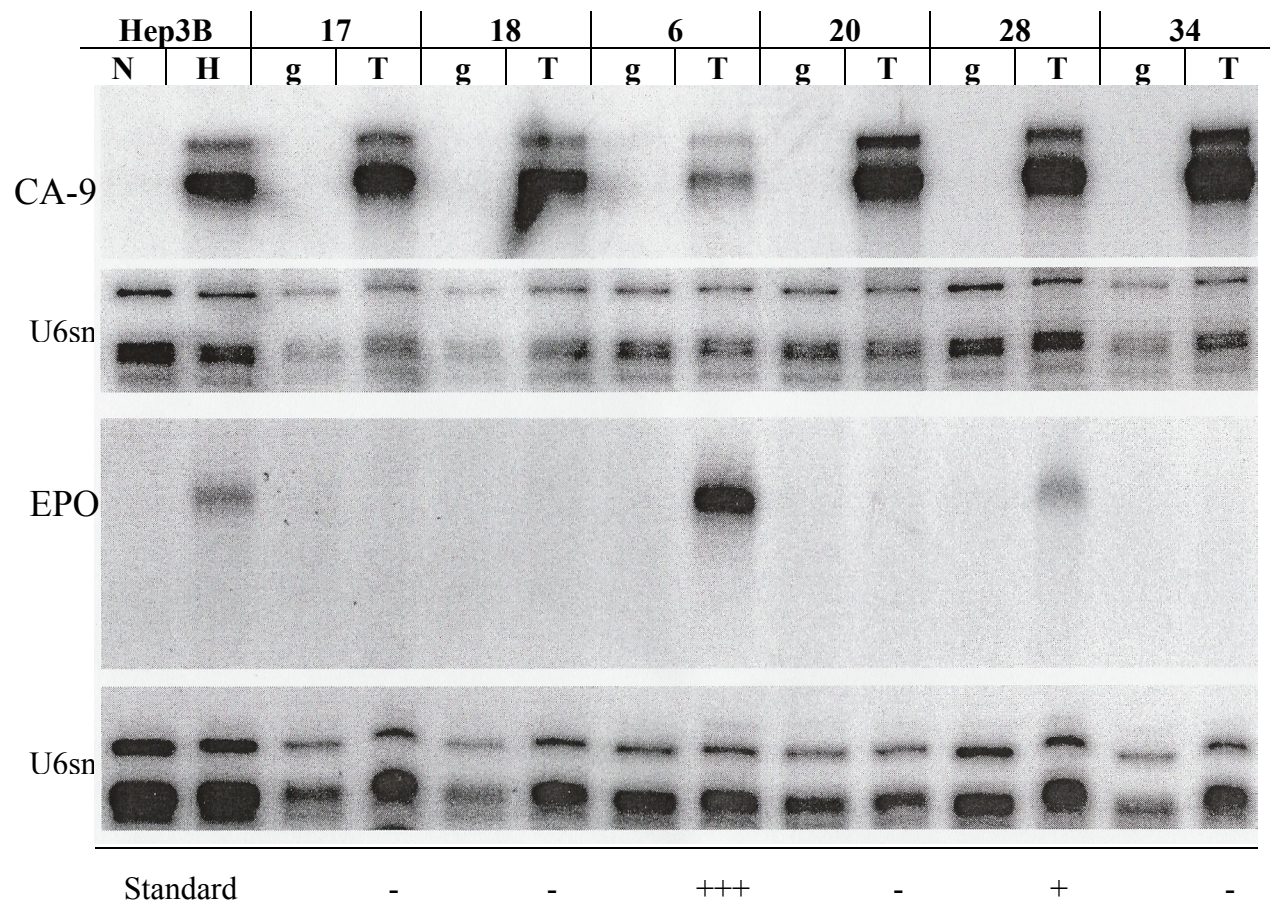
Alle EPO sezernierenden klarzelligen Nierentumoren zeigten eine Expression für eine der beiden HIF Isoformen.

Abbildung 3a demonstriert die Expression des Erythropoietin Gens und von Carboanhydrase-9 (CA-9) im gesunden Nierengewebe und in klarzelligen Nierenzellkarzinomen.

CA-9, welches für die reversible Hydratation von Kohlendioxid zu Kohlensäure verantwortlich ist, wird durch Hypoxie induziert. CA-9 wurde als Zielgen von HIF-1 α identifiziert [81] und zeigt dementsprechend eine deutliche Hochregulation in klarzelligen Nierenzellkarzinomen.

Abbildung 3a:

RNase Protection Assay: Expression von EPO mRNA und CA9 bei klarzelligen NZK



Expression von EPO und CA-9 mRNA; Darstellung derselben sechs klarzelligen Nierenzellkarzinome, für welche die Expression des Proteins HIF-1 α bzw. HIF-2 α in Abbildung 1 bzw. 2 dargestellt sind;

N: Normoxie, H: Hypoxie 16h 1% O₂, g: gesundes Nierengewebe, T: Tumor, CA-9: Carboanhydrase-9

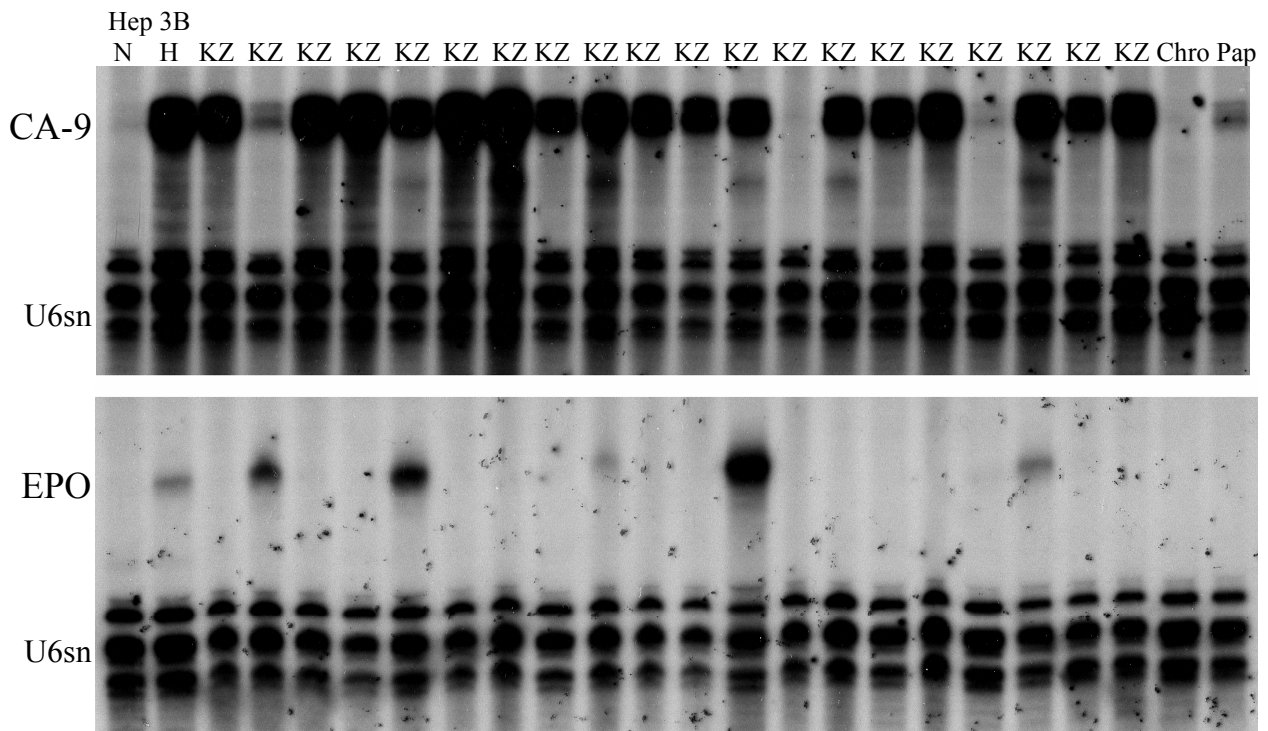
Als Kontrolle jeder einzelnen Probe wurde das Strukturgen U6small nuclear RNA (U6sn) verwendet.

Semiquantitative Quantifizierung (+, ++, +++), im Vergleich zum Standard (+++) der hypoxischen Hep3B Zellen.

In Abbildung 3b ist eine Auswahl von 22 Nierenzellkarzinomen unterschiedlicher Histologie zusammengestellt.

Abbildung 3b:

RNase Protection Assay: Expression von EPO und CA-9 mRNA von 22 NZK



Darstellung von 22 Nierenzellkarzinomen unterschiedlicher Histologie.

T: Tumor. Als Standards dienten für die hypoxische Induktion von EPO Zellkulturlysate von Hep3B Zellen unter Normoxie (N) und 16 Stunden Hypoxie (H) 1% O₂.

KZ: Klarzeller; Chro: Chromophob; Pap: Papillär

Als Kontrolle jeder einzelnen Probe wurde das Strukturgen U6small nuclear RNA (U6sn) verwendet.

Die Mehrzahl der EPO exprimierenden klarzelligen Nierenzellkarzinome (13/52) zeigte eine Signalintensität von +. Nur wenige dieser Tumoren wiesen eine Signalintensität von ++/+++ auf. Die Intensität der EPO Expression korrelierte dabei nicht mit der Intensität der HIF α Expression.

Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die Signalintensitäten der EPO negativen bzw. positiven Nierenzellkarzinome, mit histologischer Differenzierung.

Tabelle 6:

Expression von EPO in klarzelligen und nicht-klarzelligen Nierenzellkarzinomen

Nierentumoren n=64	EPO			
	-	+	++	+++
Klarzeller n=52	31 59,7%	13 24,8%	5 9,6%	3 5,9%
Nichtklarzeller n=12	11	1	-	-

3.3.1. Hämoglobinkonzentration (Hb) der Patienten

Die in der Literatur beschriebenen Angaben für das Auftreten einer paraneoplastischen Polyzythämie bei Patienten mit einem Nierenzellkarzinom, werden mit bis zu 5% angegeben [63]. Dabei kommt die Erhöhung der Hb-Konzentration vermutlich durch eine Überproduktion von EPO in den Tumoren zustande [82; 74].

Aufgrund des Beschriebenen liess sich vermuten, dass ebenfalls in unserem Kollektiv von 70 Nierenzellkarzinomen, Patienten mit erhöhten Hb-Konzentrationen zu diagnostizieren wären. Von den 70 Patienten lagen nur für 56 klinische Daten, bezüglich des Hb-Gehaltes, vor. Unter Berücksichtigung der Referenzwerte für Hämoglobin (Frauen: 12-16 g/dl und Männer: 13,5-17 g/dl) zeigten von den 56 Patienten 27 einen normalen Hb. Bei den restlichen Patienten (28) lagen die Hb-konzentrationen unterhalb des Referenzbereiches. Lediglich ein Patient (Tabelle 8 Anhang, Patient Nummer 70) wies eine Polyzythämie, mit einem Hb von 20,6g/dl auf.

Dieser Tumor gehörte zu der Gruppe der klarzelligen Nierenzellkarzinome und zeigte sowohl im Immunoblot, für HIF-1 α /HIF-2 α , als auch im Protection Assay, für EPO mRNA, deutliche Signale [83].

In Tabelle 7 sind die Hb-Werte der 56 Patienten unter Berücksichtigung von HIF-1 α /HIF-2 α Protein und EPO mRNA dargestellt.

Tabelle 7:

Hb-Wert in Bezug auf Expression von HIF-1 α /HIF-2 α Protein und EPO mRNA

Patient	Geschlecht	Histologie	Hb (g/dl)	HIF-1 α	HIF-2 α	EPO-mRNA
1.	w	KZ	14,6	++	-	-
2.	m	KZ	14,1	++	-	-
3.	w	KZ	10,3	+++	+	+
4.	m	KZ	14,6	++	+	+
5.	m	KZ	10,6	++	++	++
6.	m	KZ	10,5	++	++	+++
7.	m	Pap	11,8	++	+	-
8.	w	KZ	10,0	++	++	-
9.	m	KZ	12,0	++	++	-
10.	m	Onk	9,7	+	+	-
11.	w	KZ	9,4	++	++	-
12.	w	KZ	7,6	++	+	++
13.	m	KZ	12,9	++	+	-
14.	m	KZ	13,5	+++	++	-
15.	w	KZ	10,1	++	+	-
16.	w	KZ	11,1	+++	+	+
17.	m	KZ	12,0	+++	++	+
18.	m	KZ	12,4	++	+	-
19.	w	Onk	11,6	-	+	+
20.	m	KZ	13,5	++	++	+
21.	m	PZ	13,5	-	+	-
22.	m	KZ	15,1	+	-	+
23.	m	KZ	8,9	+	++	-
24.	m	KZ	12,4	+	+	+
25.	w	KZ	11,0	-	++	+
26.	m	Chro	13,9	+	-	-
27.	m	Sar	9,9	++	+	-
28.	w	KZ	12,5	++	++	+
29.	m	Chr	13,5	-	-	degradiert
30.	w	Chr	12,1	-	-	-
31.	m	KZ	9,7	++	+	+
32.	m	KZ	14,7	+	+	-
33.	m	KZ	10,2	+	++	+
34.	m	KZ	10,8	+	-	-
35.	m	KZ	13,0	+	++	+
36.	w	KZ	10,5	+	++	-
37.	m	KZ	14,8	+	++	-
38.	m	KZ	15,1	++	++	-
39.	m	Pap-Chr	13,3	+	-	degradiert
40.	m	KZ	15,8	++	+	++
41.	m	KZ	14,3	+	+	-
42.	w	KZ	14,4	+++	+	+
43.	w	KZ	11,8	+	+	-
44.	m	KZ	12,6	+	+	degradiert
45.	m	KZ	14,1	+	++	-
46.	w	KZ	11,1	+++	+	-
47.	m	Sp-Pl	14,0	-	-	-
48.	m	Sp-Pl	10,7	+	+	-
49.	m	KZ	14,1	++	-	++
50.	m	KZ	16,6	++	+	+++
51.	m	Sp-Pl	8,9	-	++	degradiert
52.	w	KZ	14,4	++	-	-
53.	m	Chr	15,2	+	+	degradiert
54.	m	Chr	15,9	+	++	degradiert
55.	m	KZ	15,6	+	+	++
70.	m	KZ	20,6	++	+	+++

M=Männlich; W=Weiblich; Hb=Hämoglobin; KZ=klarzellig; Pap.=papillär; Onk.=Onkozytom; PZ=Polyzysten;

Chro=Chromophob; Sar=Sarkomatoid;

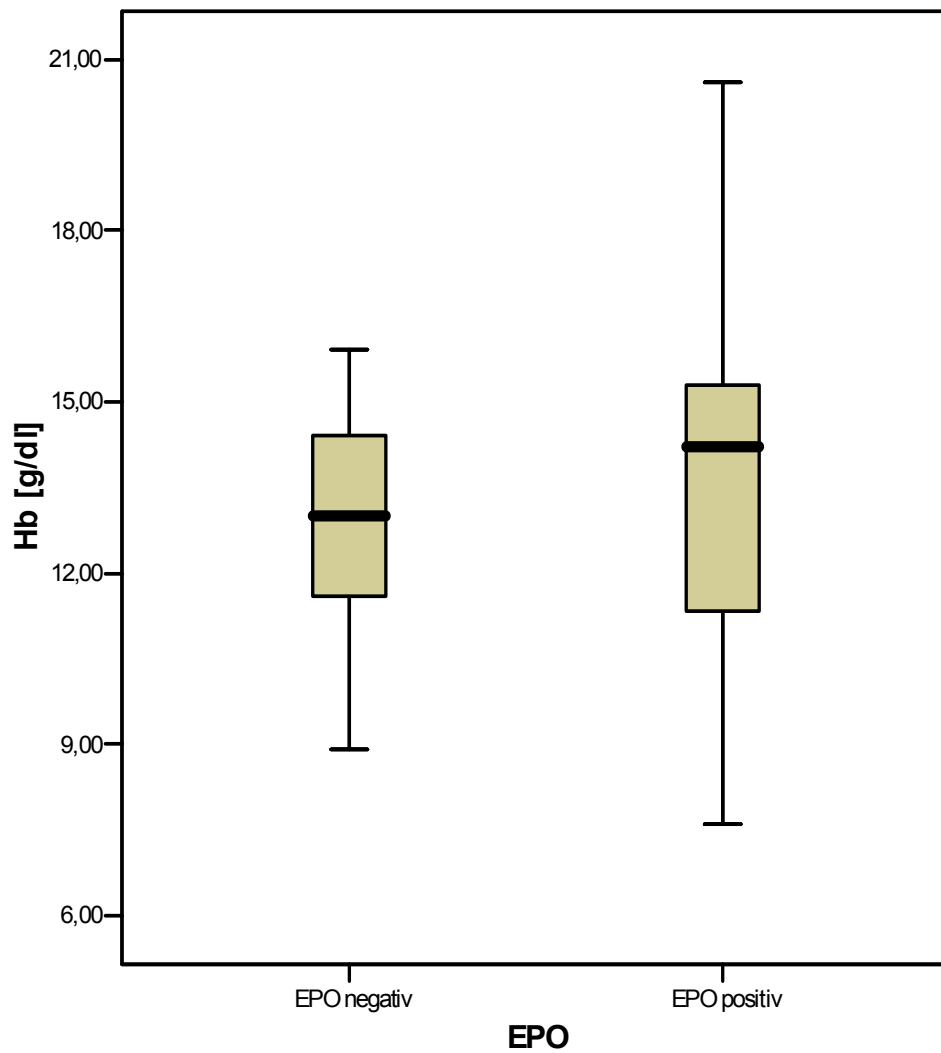
Chr=Chromophil; Pap-Chr=Papillär-Chromophil; Sp-Pl=Spindelzellig-Pleomorph

Bei den EPO exprimierenden Tumoren lag die mittlere Hb-Konzentration bei 13,5 g/dl, dagegen 12,3 g/dl bei den EPO negativen Tumoren. Aus der Tabelle kann man erkennen, dass Patienten mit EPO bildenden Tumoren Hb-Konzentrationen von größer 10 g/dl aufzeigten, wohingegen niedrige Hb-Konzentrationen nur bei EPO negativen Tumoren zu verzeichnen waren.

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 4) stellt den Vergleich zwischen der EPO Expression und der Hb-Konzentration der einzelnen Patienten dar.

Mit Hilfe eines Boxplot wurde die Verteilung der Hb-Werte in beiden Gruppen wiedergegeben (Abbildung 4).

Abbildung 4: Vergleich der EPO-Expression mit der Hb-Konzentration

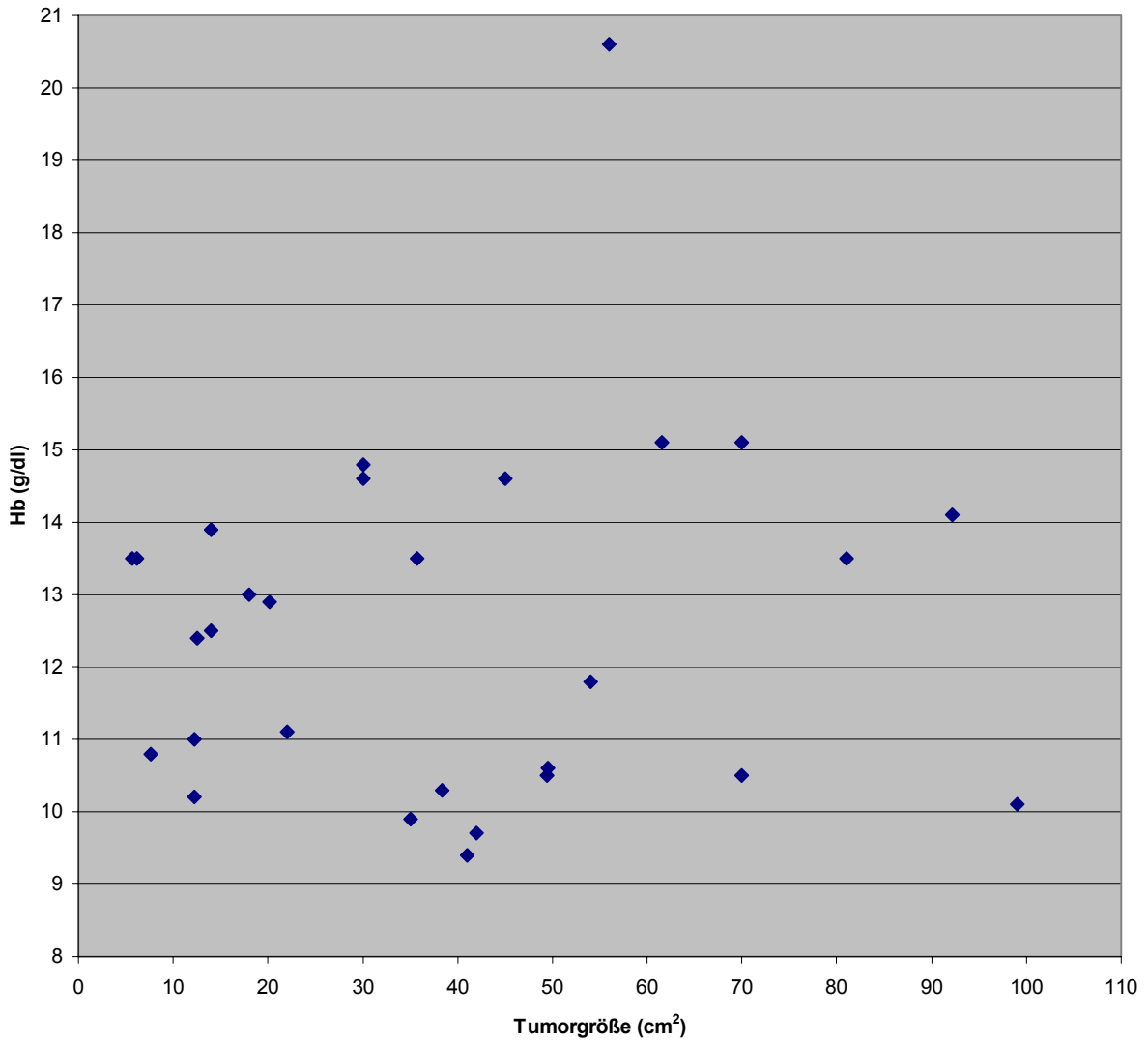


Durch den Querbalken im Bereich beider Rechtecke wird der Median-Wert angezeigt. Die Patienten mit EPO positiven Tumoren zeigten eine Tendenz zu höheren Hb-Konzentrationen, eine statistische Signifikanz wurde aufgrund der geringen Fallzahl jedoch nur knapp verfehlt ($p=0,06$).

Desweiteren lässt sich kein Zusammenhang zwischen der Tumorgröße und der Höhe der EPO-Expression erkennen. Die Annahme, dass grosse Tumoren auch mit einer erhöhten EPO-Expression einhergehen, konnte nicht bestätigt werden.

Abbildung 5 gibt diesen Sachverhalt wieder.

Abbildung 5: Korrelation Tumorgröße versus Hb-Wert



Abszisse: Tumorgröße in cm²

Ordinate: präoperativer Hämoglobinwert in g/dl

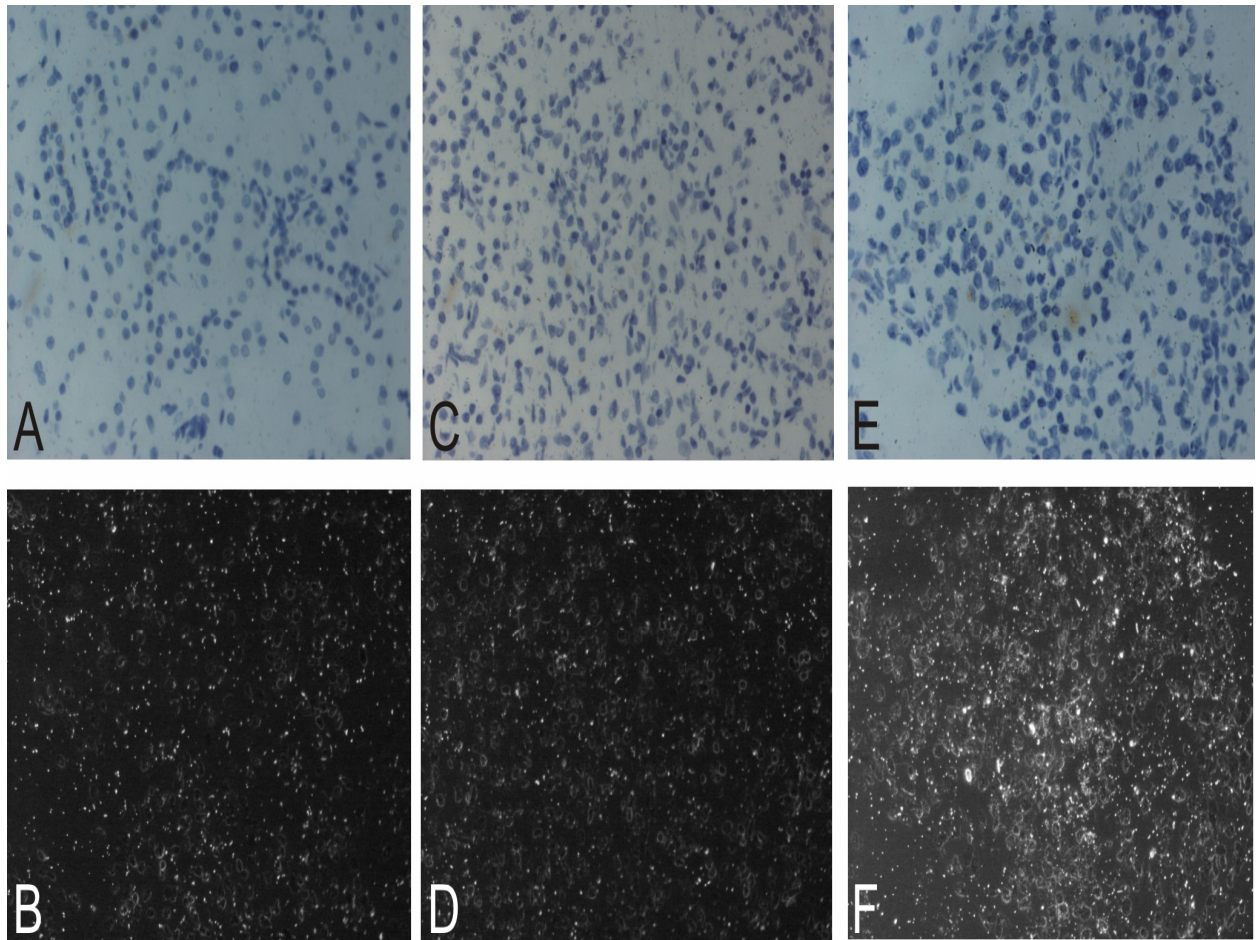
3.4. In situ Hybridisierung für EPO

(in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Ratcliffe in Oxford, siehe Material und Methoden)

In der Vergangenheit konnte in einigen Arbeiten gezeigt werden, dass die Tumorzellen selbst verantwortlich für die EPO-Genexpression sind und nicht das umgebende Stromagewebe. Wir untersuchten exemplarisch Material aller uns vorliegender Gewebe (gesundes Nierengewebe, EPO negative und EPO positive klarzellige Nierenzellkarzinome) mittels „In situ Hybridisierung“, um den Ort der EPO-Genexpression lokalisieren zu können.

Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, zeigten sich im Bereich des gesundes Nierengewebes (A/B) und des EPO negativen klarzelligen NZK (C/D) nur sehr geringe Signalintensitäten, welche als unspezifisch interpretiert wurden. Im Gegensatz dazu war ein klar positives Signal in EPO positiven klarzelligen NZK (E/F) zu verzeichnen, welche sich jeweils in den Abgrenzungen der Tumorzellen projizierten.

Abbildung 6: In situ Hybridisierung von gesundem Nierengewebe, klarzelliger EPO positiver und EPO negativer NZK



A (Lichtmikroskopie): gesundes Nierengewebe

B (Dunkelfeldmikroskopie): gesundes Nierengewebe

C (Lichtmikroskopie): klarzelliges Nierenzellkarzinom, EPO negativ

D (Dunkelfeldmikroskopie): klarzelliges Nierenzellkarzinom, EPO negativ

E (Lichtmikroskopie): klarzelliges Nierenzellkarzinom, EPO positiv

F (Dunkelfeldmikroskopie): klarzelliges Nierenzellkarzinom, EPO positiv