

## **4. Diskussion**

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist in den westlichen Industriestaaten das 10. häufigste solide Malignom mit einer derzeitigen Inzidenz von ca. 8 pro 100.000 und steigender Tendenz. Die weltweite Mortalität beträgt >100000 pro Jahr. Durch das Fehlen von klinischen Frühsymptomen, dem fehlenden Ansprechen auf Radio- oder Chemotherapie und dem Vorliegen einer Fernmetastasierung, in 30-40% bereits bei Diagnosestellung, weist das NZK eine sehr schlechte Prognose auf, mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von <10% bei vorbestehender Metastasierung.

Malignomerkrankungen können in seltenen Fällen mit einem Erscheinungsbild einhergehen, welches auf eine veränderte Hormonproduktion des Tumorgewebes zurückgeht und sich in charakteristischen paraneoplastischen Syndromen ausdrückt. Verschiedenste Tumoren, können dabei mit einer vermehrten Erythropoietin-Produktion einhergehen, und zu dem Syndrom der Polyzythämie, einer Erhöhung der roten Blutkörperchen, führen. Insbesondere für Nierenzellkarzinome ist das Syndrom der paraneoplastischen Polyzythämie ein charakteristisches Merkmal, wenn es auch bei weniger als 5% der Patienten beobachtet wird [63].

In den letzten Jahren sind bedeutende Kenntniszugewinne über die molekulare und zelluläre Biologie der NZK erreicht worden. So erkannte man, dass sowohl die Tumoren des familiären von Hippel-Lindau (VHL) Syndroms, als auch die Mehrzahl der sporadisch auftretenden NZK auf die Inaktivierung des VHL-Tumor Suppressor Gens zurückgehen [84]. Eine wesentliche Aufgabe des VHL-Gens ist die sauerstoff-abhängige Degradation des „Hypoxie-induzierbaren-Faktor“, HIF- $\alpha$ . Durch die VHL Inaktivierung kommt es zu einer Stabilisierung und Aktivierung von HIF- $\alpha$  mit nachfolgend vermehrter Expression seiner Zielgene, wie VEGF („vascular endothel growth factor“) und CA-9 (Carboanhydrase-9) in den Tumorzellen. Ein weiteres klassisches Zielgen von HIF ist Erythropoietin. Im Gegensatz zu den anderen genannten, unterliegt es aber einer ausgesprochen restriktiven Gewebe- und zellspezifischen Expression. Die Gründe dafür, sowie die Häufigkeit der Genexpression von EPO in NZK sind nicht bekannt.

Die scheinbare Diskrepanz der Befunde, Hochregulation von HIF mit Aktivierung der Zielgene (von denen eines EPO ist) in der Mehrzahl der NZK und das sehr seltene Auftreten des Syndroms der Polyzythämie, gaben Anlass zu dieser Studie.

## **4.1. EPO Genexpression in NZK**

In den 70 NZK dieser Studie wurde in ca. 40% der Fälle mittels „RNase Protection Assays“ ein positives Signal für EPO mRNA gefunden. Bis auf eine Ausnahme waren diese alle vom klarzelligen Typ. Wie erwartet, zeigte jeder dieser Tumoren eine Überexpression von HIF- $\alpha$  im Immunoblot. Es kann daher vermutet werden, dass die Mehrzahl der EPO exprimierenden Tumoren eine Inaktivierung des VHL Genes aufweisen.

Die relativ häufig gefundene EPO Expression in den NZK steht im Gegensatz zu dem seltenen Auftreten einer Polyzythämie. In unserem Kollektiv wies lediglich ein Patient dieses paraneoplastische Syndrom auf. In vorhergehenden Arbeiten konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Eckardt an dem nephrektomierten Material eine Punktmutation des VHL Genes nachweisen, und zeigen, dass diese Punktmutation die Bindung an HIF- $\alpha$  verliert. Dieses führte zu einer HIF Aktivierung und erheblichen Überproduktion von EPO [83].

Der Vergleich der EPO Expression der positiven NZK zeigte, dass die meisten Tumoren eine gering- bis mittelgradige (+, ++) und nur wenige eine sehr starke (+++) Genexpression aufwiesen. Diese Unterschiede korrelierten nicht mit der Expression von HIF- $\alpha$  oder anderen Zielgenen ab. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass es sich in Bezug auf die EPO Expression um intrinsische Veränderungen der verschiedenen Tumoren handelt, die nicht vom Mikromilieu der einzelnen Tumoren abhängig sind, zumal die meisten NZK eine VHL Inaktivierung aufweisen und somit sauerstoffunabhängig dysreguliert sind. Mehrere Gründe könnten dafür sprechen, dass der entscheidende intrinsische Unterschied, der zu der entkoppelten Sekretion von EPO führt, das Vorliegen einer bestimmten VHL Mutation ist. Erstens, wird die paraneoplastische Polyzythämie mit Abstand am häufigsten bei NZK gefunden. Zweitens, sind die nächsthäufigsten Tumoren die mit einer Polyzythämie assoziiert sind, ebenfalls aus dem Formenkreis des VHL-Syndroms, insbesondere Hämangioblastome und Phäochromozytome [71]. Drittens, konnte kürzlich die molekulare Ursache für eine Vielzahl von familiären und kongenitalen Polyzythämien aufgeklärt werden. Es handelt sich dabei ebenfalls um Mutationen des VHL Gens. Mittlerweile sind zehn verschiedene Mutationen gefunden worden, die alle in einem Zusammenhang mit der Polyzythämie stehen, aber nicht zu einer gesteigerten Tumorzinzidenz führen [72;73;85;86]. Auffällig ist, dass alle diese Fälle Punktmutationen von VHL aufweisen, die zum Austausch nur einer Aminosäure führen.

Berücksichtigt man die publizierte Struktur des VHL Moleküls [87], so lassen sich alle diese Mutationen in dem Bereich der alpha/beta Interphase lokalisieren, einem Bereich der zwischen der HIF- $\alpha$  und der Elongin Bindungsdomäne liegt (Wiesener, unveröffentlichte Daten). Auch die VHL-Mutation des Patienten aus unserem Kollektiv erfüllt diese Kriterien (Mutation: Nukleotid 701 T>C mit Aminosäureaustausch Leu 163 Pro). Diese Daten könnten daher zu der Vermutung Anlass geben, dass nur die wenigsten, folglich nur ganz bestimmte VHL Mutationen die ausgeprägte EPO-Sekretion von Tumorzellen ermöglichen. Dadurch könnte eine neue Funktion des Genes erreicht werden („gain-of-function“ Mutation). Dieses würde einerseits erklären, warum die Polyzythämie am häufigsten bei VHL assoziierten Tumoren zu finden ist. Andererseits erklärt dieser Ansatz aber auch warum dieses Syndrom auch bei diesen Tumoren so selten ist, da nur ganz charakteristische Mutationen die EPO Expression nennenswert beeinflussen.

Nur ein einziger der EPO positiven NZK in unserem Kollektiv war vom nicht-klarzelligen Typ, ein Onkozytom. Dieser Patient wies keine Polyzythämie auf. Insgesamt ist daher eine VHL Mutation als Ursache der EPO Expression eher unwahrscheinlich. Zwar sind VHL Mutationen auch bei anderen Arten von Tumoren beschrieben worden, so z.B. bei pulmonalen und kolorektalen Tumorzellen, [88;89]. Bei diesen Mitteilungen handelt es sich aber um die einzigen Berichte dieser Art. Prinzipiell wurde das Vorkommen einer paraneoplastischen Polyzythämie bei einer grossen Zahl verschiedenster Tumoren in sehr seltenen Einzelfällen mitgeteilt, z.B. der Leber, des Gehirns, des Magens und des Hodens [90;91;92;93].

Interessanterweise sind in den letzten Jahren zahlreiche Arbeiten über die EPO Expression in verschiedenen Tumoren erschienen [94;95]. Diese Fälle zeigten jedoch keinen Zusammenhang zu einer Polyzythämie, vielmehr werden parakrine Effekte des EPOs diskutiert [96]. Die Ursachen und die Auswirkungen dieser EPO Expression sind derzeit noch unklar und Gegenstand intensiver Arbeiten.

## 4.2. Ursachen der EPO Expression

HIF-1 wurde ursprünglich als sauerstoffabhängig bindender Faktor an den 3'Enhancer des EPO Gens identifiziert [28]. Arbeiten der letzten Jahre konnten jedoch zahlreiche Evidenzen dafür erbringen, dass EPO durch HIF-2 $\alpha$  reguliert wird. Immunhistochemische Studien konnten zeigen, dass kortikale peritubuläre Fibroblasten, der Ort der physiologisch relevanten EPO Sekretion, unter Sauerstoffmangel HIF-2 $\alpha$  und nicht HIF-1 $\alpha$  exprimiert [97]. HIF- $\alpha$  spezifische RNAinterference Experimente mit Hep3B und Kelly Zellen konnten HIF-2 $\alpha$  als entscheidenden Transkriptionsfaktor für die EPO-Induktion identifizieren [98].

Schliesslich konnte dieser Befund auch in vivo in "knock-out" Tieren für HIF-2 $\alpha$  bestätigt werden, die eine schwere Störung der Hämatopoiese aufwiesen [99], ein Befund der nicht bei HIF-1 $\alpha$  knock-out Tieren beobachtet wurde [45]. Aus diesem Grund interessierte die Auswertung der HIF Proteindaten vor allem auch hinsichtlich der isotyp-spezifischen Expression von HIF- $\alpha$  in Zusammenhang mit der EPO Expression der Tumoren. Insgesamt konnte in der grossen Mehrzahl der klarzelligen Tumoren eine HIF-Überexpression für beide HIF- $\alpha$  Untereinheiten beobachtet werden (89% für HIF-1 $\alpha$  und 79% für HIF-2 $\alpha$ ). Die meisten der EPO positiven Tumoren zeigten daher eine positive Expression beider HIF- $\alpha$  Unterheiten. Lediglich zwei Tumoren dieser Gruppe zeigten jeweils nur eine HIF-1 $\alpha$  oder HIF-2 $\alpha$  Expression. Somit können aus diesen Daten keine funktionellen Rückschlüsse der isotyp-spezifischen Bedeutung von HIF- $\alpha$  gezogen werden. Zumindestens in den beiden Tumoren, die nur HIF-1 $\alpha$  exprimierten scheint die EPO Expression offensichtlich nicht abhängig von HIF-2 $\alpha$  zu sein.

Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass insbesondere Zell-Linien aus NZK eine verändertes Zielgenspektrum für einige HIF-Zielgene aufweisen können [81].

Die klarzelligen NZK leiten sich ursprünglich von renalen Tubulusepithelzellen ab [100], welche normalerweise nicht in der Lage sind, Erythropoietin zu exprimieren. Solide Tumoren setzen sich jedoch nicht nur aus maligne transformierten Tumorzellen zusammen, sondern auch aus zahlreichen anderen Zellen im Stroma. In dieser könnten natürlich auch solche Fibroblasten sistieren, die in der normalen Niere EPO sezernieren.

Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung wurde daher in der vorliegenden Arbeit versucht, den zellulären Ursprungsort der EPO Sekretion im Tumor zu lokalisieren. Leider zeigte diese Methode nur in der kleinen Gruppe der sehr stark EPO exprimierenden Tumoren eine ausreichende Sensitivität, um spezifische Signale zu detektieren. Wie schon in den beiden Arbeiten von Da Silva et al. und Noguchi et al. beschrieben, konnten hier die Tumorzellen als die EPO sezernierenden identifiziert werden [74;82]. Weitere Studien aus der Vergangenheit belegen, dass prinzipiell die Tumorzellen verantwortlich für die EPO Expression sein können. So konnten EPO sezernierende Zellen von Nierenzellkarzinomen mittels Zellkultur gezüchtet werden [76;101], um dann zu einem späteren Zeitpunkt in Tiermodellen (Mäusen) retransplantiert zu werden. Diese Tiere zeigten nach erfolgter Transplantation eine Polyzythämie, bei vorher normalen Hämoglobinwerten [75;77;102]. Im Gegensatz zu den von uns untersuchten Tumoren wurde jedoch bei allen genannten Studien Material von polyzythämen Patienten untersucht.

Dies kann als weiteres Indiz gewertet werden, dass es intrinsische Unterschiede zwischen den EPO positiven Tumoren gibt, die sich entweder in einer sehr schwach positiven EPO Expression ausdrücken oder aber in einer sehr deutlichen Expression, die sogar in eine Polyzythämie münden kann. Bei den schwach positiven Tumoren ist prinzipiell denkbar, dass das Tumorstroma Ort der EPO Expression ist. In diesem Fall wäre anzunehmen, dass die EPO Expression sauerstoffabhängig reguliert wird und somit fokal zu finden ist. Die *in situ* Hybridisierung konnte bei diesen Tumoren leider keine spezifischen Signale erkennen lassen, so dass wir diesbezüglich keine Evidenzen aufzeigen konnten. Im Gegensatz dazu konnten wir in den stark positiven Tumoren EPO mRNA Signale detektieren, die eindeutig den Tumorzellen zuzuordnen war. In diesen Fällen handelt es sich am ehesten um eine sauerstoffunabhängige Expression des EPO Gens, welches durch VHL Inaktivierung und konsekutiver HIF Stabilisierung überexprimiert wurde. Wie oben bereits diskutiert, ist nahe liegend, dass dieses eine kleine Gruppe von charakteristischen VHL Mutationen darstellt. Ergänzend zeigten weitere Publikationen mit Hilfe von immunhistochemischen Methoden eine EPO Expression in verschiedenen Tumoren. Auch hier waren die Tumorzellen verantwortlich für die EPO Expression [94;95]. Da EPO jedoch überwiegend auf der Ebene der mRNA reguliert wird, und normalerweise nicht intrazellulär gespeichert wird [15], zogen wir den Nachweis der mRNA mittels RNase Protection und *in situ*-Hybridisierung vor.

### 4.3. Auswirkungen der EPO Expression

Im adulten Säugetierorganismus ist die Niere massgeblich für die hämatopoietisch relevante EPO Sekretion verantwortlich. Anhand von sehr sensitiven Nachweismethoden, wie der PCR („Polymerase chain reaction“), konnte in der Vergangenheit in zahlreichen anderen Organen eine EPO Expression nachgewiesen werden. Die Bedeutung der EPO Expression in diesen Geweben ist vermutlich jedoch überwiegend lokal und damit parakrin. Es ist wenig wahrscheinlich, dass diese Gewebe zur systemischen Hämatopoiese über EPO beitragen (Fandrey 2004). Da wir in erster Linie an der Entstehung der Polyzythämie interessiert waren, haben wir uns auf RNase Protection Assays beschränkt. Es ist eher anzunehmen, dass ein EPO Nachweis im RNase Protection Assay mit hämatopoietischen Auswirkungen einhergehen könnte, als in der PCR. Die Gegenüberstellung der EPO Expression im Tumor mit den präoperativen Hämoglobinkonzentrationen (Hb) konnte diesen Zusammenhang bestätigen. Die Gruppe der Patienten, die einen positiven EPO Nachweis im Tumor aufwiesen, zeigte einen höheren Hb-Wert, der allerdings knapp statistische Signifikanz verfehlte. Wenn die EPO Sekretion des Tumors Einfluss auf die systemische Hämatopoiese nehmen kann, so ist denkbar, dass auch die Tumorgrosse eine Rolle spielt. Der Vergleich von Tumolvolumen mit präoperativem Hb-Werten der Patienten, zeigte jedoch keine Assoziation (Abbildung 5-Ergebnisse). Prinzipiell können bei Tumorerkrankungen zahlreiche Begleitumstände vorliegen, die die Erythropoiese wesentlich beeinträchtigen und starken individuellen Schwankungen unterliegen. Zu diesen gehören ein Eisenmangel, eine herabgesetzte Überlebenszeit der Erythrozyten, sowie eine vermehrte Aktivierung inflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1) und dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [103, 104, 105]. Diese Zustände könnten daher im Einzelfall die hämatopoietischen Auswirkungen etwaig erhöhter EPO Serumkonzentrationen entgegenwirken. Serum-EPO Messungen wären diesbezüglich wünschenswert gewesen. Dieses Material stand uns jedoch nicht zur Verfügung.

Über die Auswirkung der Hämatopoiese hinaus kann EPO in Tumoren jedoch auch weitere Funktionen ausüben. In zurückliegenden Studien konnte neben EPO vor allen auch die Expression des EPO Rezeptors in NZK beschrieben werden. Über diesen könnte sezerniertes EPO eine parakrine, bzw. autokrine Rolle spielen. Eine Stimulation dieser Zellen mit EPO zog deutliche mitogene Effekte nach sich, die eine wichtige Rolle für das Tumorwachstum spielen könnten [96].

Diese Zusammenhänge könnten sich in dem Grading der Tumoren ausdrücken, indem Tumoren mit EPO Expression ein höheres Grading aufweisen könnten. Die Gegenüberstellung dieser Parameter zeigte jedoch in unserem Kollektiv keine Beziehung (Daten nicht gezeigt). Die weitaus überwiegende Anzahl der Tumoren wurde von der hiesigen Pathologie als Grad II befundet. Das Vorliegen einer EPO Expression drückte sich daher in unserem Material nicht in histopathologischen Merkmalen maligner Graduierungen aus.

#### **4.4. Perspektiven**

Rekombinantes Erythropoietin gehört zu den weltweit umsatzstärksten Pharmazeutika überhaupt. Durch hohe Produktionskosten und zunehmende Indikationsstellung dieser Präparate auf Gebiete ausserhalb der Nephrologie, wie z.B. Tumoranämie und ischämische Gewebeprotektion, ist eine Limitierung der klinischen Anwendung aus Kostengründen bereits weit verbreitet. Es ist daher von grossem Interesse, die Mechanismen der EPO Regulation, insbesondere der gewebespezifischen Expression besser zu verstehen.

Insbesondere die Möglichkeit der endogenen EPO Stimulation in Geweben, die normalerweise keine relevanten Mengen exprimieren, wäre von grossem klinischen Interesse. Die Klärung der molekularen Ereignisse, die bei der malignen Entartung der renalen Tubuluszellen zu stark exprimierenden NZK-Zellen eine Rolle spielen, könnte einen wesentlichen Beitrag leisten.

Darüber hinaus sollte evaluiert werden, ob die Expression von EPO in NZK über wachstumsfördernde Einflüsse einen prognostischen Wert für die Tumorerkrankung aufweisen könnte und damit zu einem klinisch verwertbaren Parameter genutzt werden kann.