

Identifizierung VHL-assoziiierter Veränderungen im klarzelligen Nierenzellkarzinom

Anwendung von kombinierten Genom- und Expressionsanalysen

Das klarzellige Nierenzellkarzinom (kNZK) ist der häufigste histologische Subtyp der sporadischen Nierenzellkarzinome (NZK; [15]). Die Klassifizierung des NZK basiert bisher vor allem auf morphologischen Kriterien. Molekulargenetische Daten untermauern dies, können aber die komplexen molekularen Unterschiede innerhalb der Subtypen nicht ausreichend erfassen.

Die Prognose der NZK basiert auf den histopathologischen Parametern Grad und Stadium [14]. Diese sind jedoch gerade bei Patienten mit intermediärem Grad/Stadium oft ungenau und erlauben klinisch keine Vorhersage der hämatogenen Metastasierung. Man erhofft sich in der Zukunft durch Anwendung molekularer Methoden eine genauere Vorhersage der Tumorprogression [4].

Die Anwendung molekularbiologischer Methoden belegte in früheren Studien, dass die Inaktivierung des Von-Hippel-Lindau- (*VHL*-) Gens in bis zu 80% der kNZK als initialer Prozess in der Tumorentstehung angesehen werden kann [6]. *VHL* kodiert für 2 Genprodukte, pVHL₃₀ und pVHL₁₉ (allgemein pVHL). Letztere Isoform entsteht durch einen alternativen Translationsstart. pVHL ist ein multifunktionales Protein, das in der Regulation verschiedener für die Tumorprogression förderlicher Prozesse von zentraler Bedeutung ist. Dazu gehören u. a. der proteosomale Abbau des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF), Adhäsion

und Invasion, aber auch Deregulation der Apoptose von Tumorzellen [5].

Wir fassen in diesem Beitrag Forschungsergebnisse zusammen, die auf dem Einsatz von Hochdurchsatztechnologien zur Analyse genetischer, transkriptioneller und translationaler Veränderungen im kNZK beruhen. Wir verstehen die Kombination solcher Daten als Chance für ein besseres Verständnis der vielschichtigen Prozesse der Tumorentstehung, als notwendige Grundlage für die Verbesserung der bestehenden Prognoseparameter sowie als Möglichkeit für eine gezieltere Anwendung bestehender und zukünftiger Therapieformen. Im Folgenden sind die wichtigsten Resultate der aktuellen Studien zusammengefasst.

Genom- und Transkriptomanalysen

In den vergangenen Jahren hat die Analyse chromosomaler Abberationen im kNZK erfolgreich zu der Identifizierung des *VHL*-Tumorsuppressors und der klaren Unterscheidung zwischen kNZK und papillärem NZK (pNZK) geführt [3, 7, 10, 11, 17, 22]. Weiterhin bestätigten CGH-Analysen einen Zusammenhang zwischen genetischen Alterationen und der Prognose von Patienten mit kNZK [16].

Jüngere Microarray-basierte Genexpressionsstudien zielten auf die Identifizierung der komplexen molekularen Mechanismen der Tumorentstehung. Dies

führte zur Entdeckung von Expressionsmustern, anhand derer die Subtypen des NZK auch molekular voneinander differenzierbar wurden [8, 19]. Schließlich resultierten diese Analysen in einer weiteren molekularen Unterteilung des morphologisch homogenen kNZK [18, 19]. Des Weiteren gelang es mittels Genexpressionsstudien, Expressionsmuster zu identifizieren, die Patienten im Hinblick auf die Tumorprogression und Metastasierung unterscheiden, d. h. prognostisch relevante Subgruppen hervorheben [9].

Die molekulare Charakterisierung des kNZK wurde weiterhin durch die Kombination verschiedener Hochdurchsatztechnologien vorangetrieben. So wurde bewiesen, dass sich zytogenetische Alterationen im kNZK in Proteinexpressionsprofilen widerspiegeln und dass diese Expressionsprofile für eine genauere molekulare Unterteilung des kNZK geeignet sind [13]. Kürzlich konnten in einer hochauflösenden SNP-Studie kombiniert mit einer Transkriptionsanalyse weitere genetische Alterationen identifiziert werden [2]. Eine Erkenntnis aus diesen Daten ist, dass neben der Inaktivierung von *VHL* auch die Deregulation von *CDKN2A/CDKN2B* und *Myc* für die Entstehung des kNZK von Bedeutung zu sein scheinen. Interessanterweise zeigten die sporadischen kNZK eine hohe Heterogenität im Vergleich zu kNZK von Patienten mit *VHL*-Syndrom auf. Sporadische kNZK wiesen zusätzlich eine höhere Anzahl an

genetischen Alterationen auf. Die o-Analyse dieser Daten führte zu der Identifizierung zweier Subgruppen im kNZK:

1. Tumoren, deren genetische Profile sich komplett von der Mehrheit der kNZK unterscheiden,
2. Tumoren, deren genetische Profile Tumoren mit einer biallelischen Inaktivierung von *VHL* ähneln.

Diese Daten suggerieren komplexe genetische Veränderungen, die für die Zuteilung von Patienten und letztendlich für eine gezieltere Behandlung von Bedeutung sein könnten. Gleichzeitig wird die zentrale Bedeutung der Inaktivierung von *VHL* für die Entstehung des kNZK untermauert. Konsequenterweise wurde in einer weiteren Genexpressionsstudie nach Genexpressionsmustern gesucht, die spezifisch für unterschiedliche *VHL*-Mutationen sind [12]. Die verschiedenen Mutationen könnten die Funktionalität des p*VHL* spezifisch verändern und somit die Prognose unterschiedlich stark beeinflussen. Die Analyse dieser Studie ergab eine Signatur von 186 Genen, anhand deren Expression kNZK mit funktionslosem p*VHL* von kNZK mit Wildtyp-p*VHL* unterschieden werden konnten. Letztendlich resultierten Analysen zur Identifizierung genetischer Alterationen und deren Einfluss auf die Genexpression in einer feineren Unterteilung des kNZK. Offen bleibt jedoch, welchen Einfluss diese Alterationen auf die Genprodukte und deren Funktionen ausüben.

Proteomanalysen

Auf der Suche nach Veränderungen der Proteinexpression als Folge genetischer Alterationen haben wir uns auf die Analyse von Zelloberflächenproteinen konzentriert (Boysen et al., Manuskript in Vorbereitung). Zelloberflächenproteine sind aufgrund ihrer subzellulären Lokalisation und Zugänglichkeit wichtige Zielstrukturen verschiedener Antitumorthérapien. Zusätzlich könnte eine Abgabe dieser Proteine in das Serum, z. B. infolge proteolytischer Aktivitäten tumorspezifischer Proteasen, als Grundlage für nichtinvasive ELISA-basierte diagnostische Tests oder im Rahmen einer postoperativen Betreuung von Patienten zur

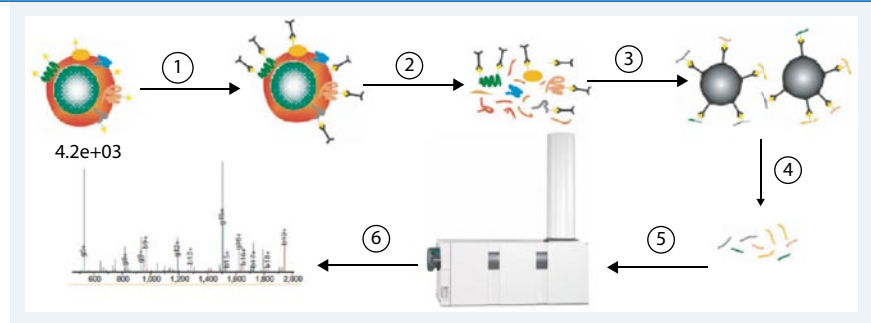


Abb. 1 ▲ Immunophänotypisierung ohne Antikörper. Kurzdarstellung des experimentellen Vorgehens zur Isolierung und Identifizierung von N-glykosylierten Oberflächenproteinen [23]. Die Strategie umfasst 1 das Markieren reaktiver Gruppen an Zellmembranproteinen, 2 Homogenisieren der Tumorzellen und Proteinverdau, 3, 4 Affinitätsaufreinigung der markierten Peptide, 5 Peptidanalyse mittels Tandemmassenspektrometrie und 6 Peptid- oder Proteinidentifizierung. (Mit freundlicher Genehmigung von Wollscheid et al. 2009, Nat Biotechnol 27:378–386)

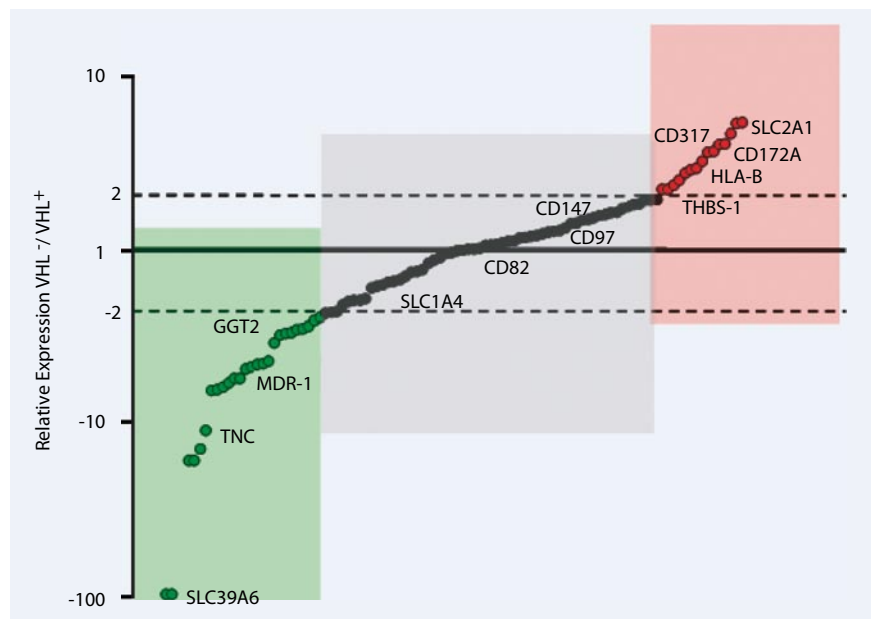


Abb. 2 ▲ Identifizierung und Quantifizierung p*VHL*-assoziierter Oberflächenproteine. Relative Expression von N-glykosylierten Zelloberflächenproteinen in Abhängigkeit von p*VHL*. Die Ergebnisse sind als Quotient der Expressionsstärken eines Proteins in p*VHL*-negativen Nierenkarzinomzellen und in deren p*VHL* reexprimierenden Transfektanten dargestellt. Rot und grün markierte Proteine sind differenziell exprimiert und daher potenziell „p*VHL*-assoziert“. Schwarz markierte Proteine unterliegen keiner Regulation durch p*VHL*

Früherkennung wiederkehrender Tumoren genutzt werden. Zelloberflächenproteine stellen somit ideale Kandidaten auf der Suche nach neuen diagnostischen und therapeutischen Biomarkern dar.

Neben den klinischen Aspekten ist die Analyse tumorspezifischer Membranproteine mit der Möglichkeit eines besseren Verständnisses der Tumorbiologie verbunden, da Membranproteine am Beginn wichtiger Signalkaskaden stehen (z. B. als Rezeptoren für Wachstumsfaktoren), Zell-Zell-Interaktionen vermitteln und

zentraler Bestandteil der metastatischen Disseminierung von Tumorzellen sind.

Ziel dieser Studie ist es, die Konsequenzen eines Verlusts von 3p einhergehend mit einer funktionellen Inaktivierung von *VHL* für die Expression und Funktionsweise von Membranproteinen im kNZK zu charakterisieren. Qualitative und quantitative Messungen dienen dabei als Grundlage für eine feine Analyse dieser gegenüber externen Einflüssen exponierten Mikroumgebung. Solche *VHL*-assozierten Oberflächenproteine könnten sowohl zu der genaueren Be-

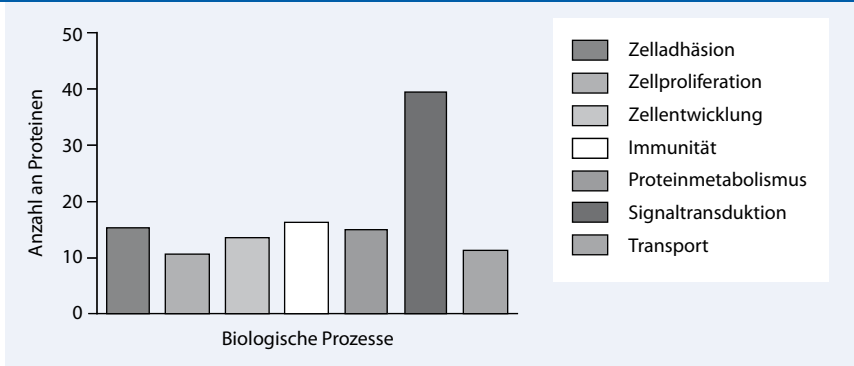


Abb. 3 ▲ Funktionale Klassifizierung pVHL-assoziiierter Oberflächenproteine, *In-silico*-funktionelle-Klassifizierung pVHL-assoziiierter Oberflächenproteine mittels Panther-Datenbank (<http://www.pantherdb.org>). Dargestellt sind die biologischen Prozesse, denen am meisten Proteine zugeordnet werden konnten

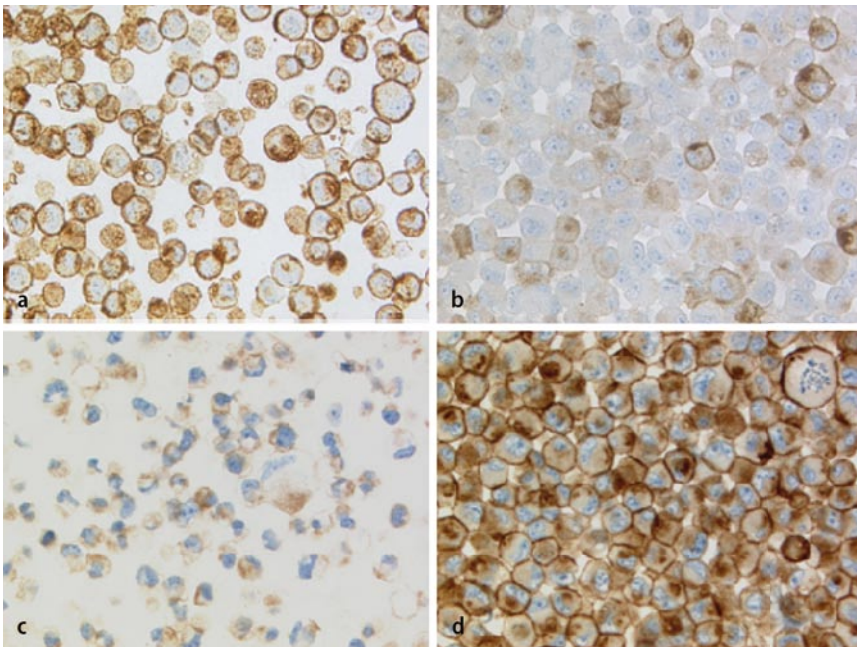


Abb. 4 ▲ Immunohistochemische (IHC) Validierung pVHL-assoziiierter Oberflächenproteine in pVHL-negativen Nierentumorzellen und deren pVHL-reexprimierenden Transfektanten. Zellen wurden in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Schnitte (2 µm) wurden gegen GLUT-1 und EGFR gefärbt. **a** pVHL – GLUT-1, **b** pVHL + GLUT-1, **c** pVHL – EGFR, **d** pVHL + EGFR

stimmung als auch für eine gezieltere Behandlung der bereits erwähnten Gruppe kNZK dienen, deren genetisches Profil dem von Patienten mit biallelischer Inaktivierung von *VHL* ähnelt.

Der gewählten experimentellen Strategie liegt eine vergleichende Massenspektrometrie- (MS-)basierte Analyse von N-glykosylierten Oberflächenproteinen in VHL-negativen Tumorzellen vom kNZK und deren VHL-Isoform (pVHL19, pVHL30) reexprimierenden stabilen Transfektanten zugrunde (■ **Abb. 1**). Kernpunkt dieser neu entwickelten Methode sind die spezifische Markierung,

Aufreinigung und Messung von gering exprimierten Membranproteinen, die in verschiedenen Vorarbeiten erfolgreich angewendet wurden [20, 21, 23]. Dieses Verfahren ermöglicht zudem eine relative Quantifizierung der identifizierten Proteine. Damit ist eine fokussierte IHC-basierte Validierung selektierter Kandidaten auf Tumormaterial basierend auf MS-Daten möglich. Differenziell exprimierte Proteine können in dem von uns verwendeten Zellkultursystem somit als potenziell „VHL-assoziiert“ betrachtet werden. Bisher durchgeführte proteinbasierte Analysen im kNZK fokussierten vor allem auf

zytoplasmatische bzw. gut lösliche Proteine. Eine Analyse des schwer analysierbaren hydrophoben Oberflächensubproteoms wurde bisher noch nicht ausreichend durchgeführt.

Aggelis et al. [1] konnten in einer MS-basierten Studie bereits 19 VHL-assoziierte Membranproteine in UCR2-Nierenkarzinomzellen identifizieren. Dabei wurden neben bekannten VHL-Zielgenen auch unbekannte Kandidaten wie CD166 und CD147 als pVHL-assoziiert detektiert. Dieser Studie liegt jedoch eine initiale 2D-Gel-basierte Separation der isolierten Membranproteine zugrunde, welcher anschließend eine Analyse der im Gel verdauten Proteine mittels MS folgt. Die Neuartigkeit unserer Strategie ist der Verzicht einer vorherigen Separation der isolierten Membranproteine mittels 2D-Gelen. Dadurch können in unserer Analyse auch stark hydrophobe, relativ unlösliche Membranproteine detektiert werden. Des Weiteren können wir in unserem Zellkulturmodell pVHL-isoformspezifische Veränderungen des Oberflächenproteoms analysieren, was uns einen tieferen Einblick in die Wirkungsweise von pVHL im kNZK ermöglicht.

Die Besonderheit unseres experimentellen Ansatzes liegt neben der Identifizierung von Oberflächenproteinen vor allem in deren relativen Quantifizierung. In unseren initialen Experimenten wurden mehr als 100 Oberflächenproteine detektiert, von denen ein Großteil zu der Gruppe der CD-Moleküle gehört. Antikörper gegen diese Proteine stehen für weiterführende multiplexe Immunohistochemie- (IHC-) basierte Analysen zur Verfügung. 46 Proteine waren differenziell exprimiert (■ **Abb. 2**). Diese Proteine wurden als pVHL-assoziiert definiert und sind u. a. in biologische Prozesse wie Signaltransduktion, Immunsystem und Zelladhäsion involviert (■ **Abb. 3**).

Eine Deregulierung dieser Prozesse stellt eine wichtige Grundlage für die Tumorentstehung dar. Bisher wurde jedoch ein Zusammenhang dieser Prozesse mit dem VHL-Funktionsverlust nur für einzelne Kandidaten beschrieben, da eine globale Analyse des Oberflächenproteoms aufgrund fehlender spezifischer Messverfahren nicht möglich war. Nach-

folgende IHC-basierte Validierungen auf in Paraffin eingebetteten Tumorzellen (pVHL-positiv vs. pVHL-negativ) vom kNZK ergaben eine genaue Reproduzierbarkeit der mittels MS als differenziell exprimiert identifizierten Proteine GLUT-1 und EGFR (■ **Abb. 4 a–d**). Einige der differenziell exprimierten Kandidaten werden momentan in Gewebechip-basierten Analysen von mehreren hundert kNZK auf einen möglichen Zusammenhang mit klinischen Parametern untersucht. Schlussendlich wird der Serumproteingehalt ausgewählter Kandidaten mittels ELISA in Serum von Patienten und gesunden Spendern verglichen.

Die Kombination dieser proteomischen Techniken und die direkte Translation von *In-vitro*-Daten auf Patientensmaterial stellen eine neue, gezieltere Herangehensweise an die Identifizierung von spezifischen molekularen Markern im kNZK dar. Letztendlich werden durch die Kombination verschiedener Technologien innerhalb einer Studie die Grenzen überschritten, die die Anwendbarkeit einzelner Messverfahren aufgrund von biologischen oder technischen Einschränkungen bisher limitierten. Unsere zukünftige Forschungsstrategie basiert daher auf einer einzigartigen globalen Analyse von Alterationen auf dem Proteom-, Genom- und Genexpressionsniveau und der computergesteuerten Integration der resultierenden Daten.

Fazit für die Praxis

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die traditionelle Trennung der Analyse genetischer Abberationen, Transkription und Translation wesentliche Einblicke in die molekularen Grundlagen des kNZK ermöglicht. Diese isolierte Sichtweise verhindert jedoch ein tieferes Verständnis für die komplexen Mechanismen der Karzinogenese des kNZK und wird daher für die Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Verfahren ungenügend sein. Vielmehr gilt es, die Heterogenität des kNZK mittels kombinierter systembiologischer Studien aufzuschlüsseln, um die Etappen der Tumorphysion aus verschiedenen Perspektiven zu betrachten und deren biologische Grundlagen zu verstehen. Daraus

Pathologe 2009 · [Suppl 2] 30:188–192 DOI 10.1007/s00292-009-1219-z
© Springer Medizin Verlag 2009

G. Boysen · B. Wollscheid · D. Bausch-Fluck · P. Schraml · H. Moch Identifizierung VHL-assoziiierter Veränderungen im klarzelligen Nierenzellkarzinom. Anwendung von kombinierten Genom- und Expressionsanalysen

Zusammenfassung

Das sporadische Nierenzellkarzinom (NZK) ist ein heterogener solider Tumor, der traditionell basierend auf morphologischen Kriterien in weitere Subtypen unterteilt wird. In den letzten Jahren konnten unter Anwendung molekularer Hochdurchsatzanalysen genetische, transkriptionelle und translationale Alterationen identifiziert werden. Diese Marker eignen sich zum einen für die molekulare Klassifizierung des NZK und haben zum anderen prognostische Wertigkeit. Die isolierte Betrachtung genetischer, transkriptioneller und translationaler Veränderungen verhindert jedoch ein tieferes Verständnis für

die komplexen Vorgänge der Karzinogenese. Wir fassen hier aktuelle Forschungsergebnisse zur molekularen Charakterisierung des NZK zusammen und stellen ein systembiologisches Konzept zur Identifizierung neuer Tumormarker vor. Diese könnten zukünftig Einsatz in der Diagnostik und Therapie des sporadischen NZK finden.

Schlüsselwörter

Nierenzellkarzinom · Von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor · Molekulare Hochdurchsatzverfahren · Zelloberflächenproteom · Tumormarker

Identification of VHL-associated changes in clear cell renal carcinoma. The application of combined genome and expression analyses

Abstract

Sporadic renal cell carcinoma (RCC) represents a heterogeneous tumor, which is traditionally classified into subtypes based on morphological criteria. In recent years high-throughput molecular analyses have been able to identify genomic and proteomic alterations in tumor cells. These markers are the basis for a molecular classification of RCC and bear prognostic value. However, an isolated consideration of genomic and proteomic alterations prevents deeper insights into the complex processes of carcinogene-

sis. Here we summarize recent studies focusing on this aspect of RCC and present a systems biology concept for the identification of novel tumor markers. These could be applied to improve future diagnosis and therapy of RCC.

Keywords

Renal cell carcinoma · Von Hippel-Lindau tumor suppressor · High-throughput molecular techniques · Cell surface proteome · Tumor marker

resultiert die Möglichkeit, neue molekulare Prognoseparameter zu identifizieren und eine „personalisierte“ Therapie, in der Patienten entsprechend individueller molekularer Signaturen behandelt werden können, zu entwickeln.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. H. Moch

Institut für Klinische Pathologie,
UniversitätsSpital Zürich
Schmelzbergstr. 12, 8091 Zürich
Schweiz
holger.moch@usz.ch

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- Aggelis V, Craven RA, Peng J et al (2009) Proteomic identification of differentially expressed plasma membrane proteins in renal cell carcinoma by stable isotope labelling of a Von Hippel-Lindau transfectant cell line model. *Proteomics* 9:2118–2130
- Beroukchim R, Brunet JP, Di Napoli A et al (2009) Patterns of gene expression and copy-number alterations in Von-Hippel Lindau disease-associated and sporadic clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res* 69:4674–4681
- Bugert P, Kovacs G (1996) Molecular differential diagnosis of renal cell carcinomas by microsatellite analysis. *Am J Pathol* 149:2081–2088
- Eichelberg C, Junker K, Ljungberg B, Moch H (2009) Diagnostic and prognostic molecular markers for renal cell carcinoma: a critical appraisal of the current state of research and clinical applicability. *Eur Urol* 55:851–863
- Frew IJ, Krek W (2008) pVHL: a multipurpose adaptor protein. *Sci Signal* 1:pe30
- Gnarra JR, Tory K, Weng Y et al (1994) Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 7:85–90
- Herman JG, Latif F, Weng Y et al (1994) Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9700–9704
- Higgins JP, Shinghal R, Gill H et al (2003) Gene expression patterns in renal cell carcinoma assessed by complementary DNA microarray. *Am J Pathol* 162:925–932
- Jones Otu H, Spentzos D, Kolia S et al (2005) Gene signatures of progression and metastasis in renal cell cancer. *Clin Cancer Res* 11:5730–5739
- Kovacs G, Erlandsson R, Boldog F et al (1988) Consistent chromosome 3p deletion and loss of heterozygosity in renal cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:1571–1575
- Latif F, Tory K, Gnarra J et al (1993) Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260:1317–1320
- Luu VD, Fischer B, von Teichman A et al (2008) Von-Hippel-Lindau gene mutation types. Association of gene expression signatures in clear cell renal cell carcinoma. *Pathologie* 29 (Suppl 2):303–307
- Mertz KD, Demichelis F, Sboner A et al (2008) Association of cytokeratin 7 and 19 expression with genomic stability and favorable prognosis in clear cell renal cell cancer. *Int J Cancer* 123:569–576
- Moch H, Artibani W, Delahunt B et al (2009) Reassessing the current UICC/AJCC TNM staging for renal cell carcinoma. *Eur Urol* 56:636–643
- Moch H, Gasser T, Amin MB et al (2000) Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: a Swiss experience with 588 tumors. *Cancer* 89:604–614
- Moch H, Presti JC Jr, Sauter G et al (1996) Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization are associated with clinical outcome in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 56:27–30
- Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ et al (1988) Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature* 332:268–269
- Takahashi M, Rhodes DR, Furge KA et al (2001) Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9754–9759
- Takahashi M, Yang XJ, Sugimura J et al (2003) Molecular subclassification of kidney tumors and the discovery of new diagnostic markers. *Oncogene* 22:6810–6818
- Teckchandani A, Toida N, Goodchild J et al (2009) Quantitative proteomics identifies a Dab2/integrin module regulating cell migration. *J Cell Biol* 186:99–111
- Tinguely M, Hofmann A, Bausch-Fluck D et al (2008) Immunophenotyping without antibodies. New perspectives for lymphoma characterization. *Pathologie* 29 (Suppl 2):314–316
- Wilhelm M, Krause U, Kovacs G (1995) Diagnosis and prognosis of renal-cell tumors: a molecular approach. *World J Urol* 13:143–148
- Wollscheid B, Bausch-Fluck D, Henderson C et al (2009) Mass-spectrometric identification and relative quantification of N-linked cell surface glycoproteins. *Nat Biotechnol* 27:378–386