

Genetik der Nierenzelltumoren

Gyula Kovacs

Chirurgische Universitätsklinik,
Heidelberg

Zusammenfassung

Um das Problem der phenotypischen Heterogenität der Nierenzelltumore zu umgehen, legt die neue „Heidelberg-Klassifizierung“ charakteristische, genetische Merkmale der unterschiedlichen Tumoren zugrunde. Konventionelle Nierenzellkarzinome sind durch einen Allelverlust am Chromosom 3p und Mutation des VHL Gens gekennzeichnet. Hinzu kommen Allelduplikationen am Chromosom 5q sowie Allelverluste an den Chromosomen 6q, 8p, 9p und 14q, die auch von prognostischem Wert sind. Auf der anderen Seite zeigen die papillären Nierenzelltumore, eine Trisomie der Chromosomen 3q, 7, 8p, 12q, 16q, 17q und 20q, sowie den Verlust des Y Chromosoms in männlichen Patienten. Chromophobe Nierenzellkarzinome hingegen weisen Monosomien der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21 auf. Die genetische Diagnose gutartiger Tumortypen, wie Nierenonkozytome und metanephrogene Adenome, ist ebenfalls möglich. Die Differenzierung zwischen den oben genannten Tumortypen ist aufgrund ihres unterschiedlichen biologischen Verhaltens von klinischer Bedeutung. Die Verwendung der fluoreszenten Mikrosatelliten-Analyse erlaubt neben der postoperativen und retrospektiven Diagnose auch die Erstellung präoperativer Befunde ausgehend von Biopsiematerial.

Schlüsselwörter

Nierenzelltumore, Genetische Alterationen, Heidelberg-Klassifizierung

Molecular genetics and diagnosis of renal cell tumors

Summary

To overcome the cytological heterogeneity of kidney cancers, the „Heidelberg Classification of Renal Cell Tumours“ is soundly based on the genetic lesions that underlie the formation of distinct tumors. Allelic loss of chromosome 3p and mutation of the VHL gene specify conventional renal cell carcinoma. In addition duplication of chromosome 5q as well as allelic losses at chromosomes 6q, 8p, 9p and 14q characterize this tumor and are also of prognostic value. Papillary renal cell tumors, which arise from embryonal rest cells, are marked by trisomies of chromosomes 3q, 7, 8p, 12q, 16q, 17q and 20q as well as loss of the Y chromosome in males. Chromophobe renal cell carcinoma shows a low chromosome number due to monosomy of chromosomes 1, 2, 6, 10, 13, 17, and 21. Benign tumors, such as renal oncocytoma and metanephric adenoma, can also be diagnosed by genetic means. The distinct types of tumors have different biological behaviour and therefore, an accurate classification is considered clinically important. The quick and reproducible fluorescent microsatellite assay for detecting allelic changes is the most useful technique for postoperative and retrospective diagnosis as well as for preoperative analysis of fine needle aspiration specimens.

Keyword

renal cell tumors, genetic profile, Heidelberg classification

Einleitung

Die Klassifizierung und Diagnose von Tumoren reflektiert zum einen unsere jeweiligen technischen Möglichkeiten in der Tumorforschung sowie zum anderen unsere theoretischen Kenntnisse und Hypothesen über Tumorentstehung. Die Einteilung und Diagnose von Nierenzelltumoren (NZT) basiert daher in den letzten Jahrzehnten fast ausschließlich auf histologisch-zytologischen Merkmalen. Es ist jedoch bekannt, dass NZT durch ein Gemisch unterschiedlicher Zell- und Wachstumsformen gekennzeichnet sind und ihre phenotypischen Merkmale während der Progression dramatisch ändern können. Der Durchbruch wurde durch systematische genetische Analysen erreicht (Kovacs, 1990; Kovacs 1993). Die modernen diagnostischen Prinzipien wurden 1996 während eines Expertentreffens in Heidelberg diskutiert und schließlich als „The Heidelberg Classification of Renal Cell Tumours“ veröffentlicht (Kovacs et al., 1997). Später wurde, ohne Beachtung urheberrechtlicher Bestimmungen und guter wissenschaftlicher Praxis, ein nahezu wortwörtlich übernommenes Plagiat veröffentlicht (Störkel et al., 1997). Die Autoren dieses Plagiates haben jedoch, ebenso wie die meisten Pathologen, den Fehler begangen, die genetischen Daten auf überholte morphologische Systeme zu übertragen. Als Folge davon sind Kombinationen älterer, zytomorphologischer Begriffe und neuerer, genetischer Charakteristika ohne vorhandene Grundlage sowohl in aktuellen

Handbüchern als auch in der WHO-Klassifikation erschienen.

Die wichtigsten Vorteile der Heidelberg Klassifizierung liegen in der Spezifität der genetischen Alterationen, die mit der Entstehung der jeweiligen Tumortypen zusammenhängen. Der grundlegende Gedanke dieser Klassifizierung ist, dass spezifische chromosomale/DNA Alterationen die Funktion von Genen verändern, die die Proliferation, den Zelltod, die Differenzierung oder die intrazelluläre Kommunikation und damit das biologische Verhalten der Tumorzellen kontrollieren. Diese Alterationen bleiben, unabhängig von morphologischen Veränderungen, während der gesamten Tumorprogression in allen Tumorzellen konstant bestehen, und können für die Diagnose verwendet werden.

Genetische Merkmale

Konventionelle

Nierenzellkarzinome

Konventionelle Nierenzellkarzinome (NZK) machen ungefähr 75 % der NZT aus. Eine Deletion der Chromosom 3p Region kommt in 97 % der konventionellen NZK, jedoch nicht in papillären NZT vor. Der Genlokus der von-Hippel-Lindau (*VHL*) Erkrankung wurde auf die Chromosom 3p25 Region kartiert und schließlich das *VHL* Gen kloniert (Latif et al. 1993). Eine Keimbahnmutation des *VHL* Gens ist mit einem hohen Risiko für die Entstehung multipler, bilateraler Nierenzysten und konventioneller NZK, sowie mit der Entwicklung multipler Hämangioblastome und Pheochromozytome verbunden. Jedoch kommt eine somatische Mutation des *VHL* Gens nur in ca. 45-50 % der sporadischen konventionellen NZK vor. Die kleinste überlappende Deletion in sporadischen und hereditären konventionellen NZK umfasst ca. 55 cM genetische Distanz am Chromosom 3p14.2-p25, einschließlich des *VHL* Gens. Konventionelle NZK mit oder ohne Mutation des *VHL* Gens stellen jedoch keine biologisch unterschiedlichen Tumorguppen dar. *VHL*-Patienten entwickeln lediglich zunächst Nierenzysten und erst später konventionelle NZK. Dies deutet darauf hin,

dass das *VHL* Gen eher für Zystenbildung, d.h. für Differenzierungsstörungen der tubulären Zellen des Nephrons, als direkt für die Entstehung der konventionellen NZK verantwortlich ist, und dass am Chromosom 3p noch ein weiteres Tumorsuppressorgen lokalisiert ist.

Durch Deletionskartierung sind mehrere kleine „LOH“-Regionen und durch mikrozellvermittelten Chromosomentransfer wiederum andere Tumorgenregionen auf dem Chromosom 3p in NZK beschrieben worden. Jedoch konnte bisher, mit Ausnahme des *VHL* Gens, kein Gen mit nachgewiesener Tumorsuppressorfunktion aus der Chromosom 3p Region kloniert werden. Dies liegt daran, dass die meisten publizierten „interstitiellen Deletionen“ die Folge von technischen Artefakten sind oder lediglich durch eine unspezifische mitotische Rekombination zustande kamen.

In einigen Familien sind die konstitutionellen Translokationen t(3;8) t(3;6) und t(2;3) mit der Entwicklung von Nierenzellkarzinomen assoziiert. Jedoch sind die Bruchstellen auf einem ca. 15 Mb großen DNA-Abschnitt verstreut, so dass diese nicht ein einzelnes Tumorgen markieren können. Zwar befindet sich die Bruchstelle der 3;8 Translokation zwischen Exon 3 und 4 des „fragile histidine triad“ (*FHIT*) Gens, die Rolle des *FHIT* Gens in der Entstehung von konventionellen NZK kann jedoch mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Konventionelle NZK weisen noch weitere spezifische Alterationen auf. Eine Trisomie der Chromosom 5q22.3 Region kommt in jedem zweiten konventionellen NZK vor. Chromosomenanalysen und Deletionskartierungen haben einen LOH an den Chromosomen 6q23-qter, 8p11.2-pter, 9p13 und 14q24.2-qter in 25%, 33%, 40% bzw. 48% der Fälle festgestellt. Es wurde teilweise eine gute Korrelation zwischen dem Allelverlust dieser Chromosomen und der Progression von pT3aN0M0 Tumoren bzw. dem metastatischen Tumorwachstum festgestellt. Obwohl homozygote Deletionen von *CDKN2/p16* am Chromosom

9p21 in Tumorzelllinien häufig nachgewiesen wurden, kann eine Rolle dieses Gens bei der Tumorentstehung jedoch mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Papilläre Nierenzelltumore

Papilläre NZT machen etwa 10 % der Nierentumore im Operationsgut aus. Sie sind im Gegensatz zu konventionellen NZK nicht durch Allelverlust, sondern durch konsequente Allelduplikationen spezifischer chromosomaler Abschnitte gekennzeichnet. Trisomie oder Tetrasomie des Chromosoms 7 kommt in ca. 85 % der papillären NZT vor. Selektive Duplizierung der Chromosom 7q31.2 Region mit dem *MET* Gen, von Chromosom 7q21.1 mit dem *HGF/SF* Gen und von Chromosom 7p12 mit dem *EGFR* Gen deuten darauf hin, dass mehrere Gene an Chromosom 7, wahrscheinlich durch erhöhte und kontinuierliche Expression, an der Entstehung der papillären NZT beteiligt sind. Eine seltene familiäre Form der papillären NZK ist mit der Keimbahnmutation des *MET* Onkogens assoziiert (Schmidt et al., 1997). In multiplen hereditären Tumoren ist das mutierte *MET* Allel dupliziert und überexprimiert (Fischer et al., 1998). Jedoch findet man eine somatische Mutation der *MET* Tyrosinkinase nur in 5-8 % der sporadischen papillären NZT. Eine Duplizierung der Chromosom 17q 21.32 Region hingegen kommt in 93 % der sporadischen und fast 100 % der hereditären Tumore vor. Da jedoch sowohl in multiplex hereditären als auch in multiplex sporadischen, papillären Tumoren beide Chromosom 17q Allele dupliziert sind, kann man eine Keimbahnmutation eines noch unbekanntes Genes ausschließen.

Weitere selektive Duplizierungen kleinerer Regionen kommen an den Chromosomen 3q, 8p, 12q, 16q und 20q in 30-60 % der Tumore vor. Da papilläre NZT sich in männlichen Patienten 8-mal häufiger als bei Frauen entwickeln, und etwa 85 % dieser Tumore einen Verlust des Y Chromosoms zeigen, kann diese Alteration ebenfalls als tumorspezifisch eingestuft werden. Weiterhin ist eine sehr seltene Form der papillären NZT, die

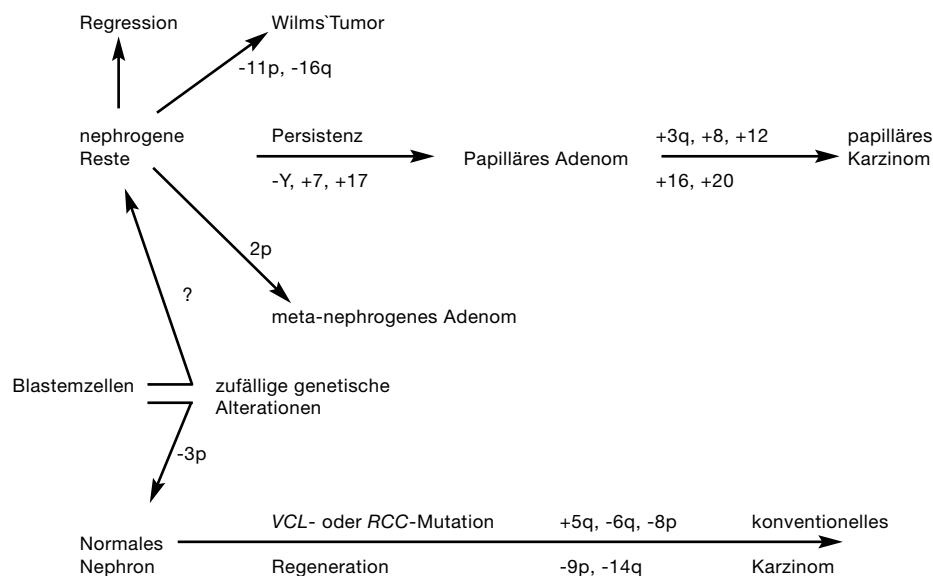


Abb 1 Hypothese zur Entstehung verschiedener Nierenzell-tumore

Der Verlust von Chromosom 3p und die folgende Mutation des *VHL* Gens und/oder anderen Tumorsuppressorgenen schafft die Voraussetzung zur Entstehung der konventionellen Nierenzellkarzinome. Duplikation der Chromosom 5q Region und sekundäre Allelverluste an den Chromosomen 6q, 8p, 9p und 14q führen zur Tumorphysion. Meta-nephrogene Adenome, Wilms' Tumoren und papilläre Nierenzelltumoren gehen von embryonalen Resten aus. Trisomie der Chromosomen 7 und 17 sowie der Verlust des Y Chromosoms führen zur Entstehung der papillären Adenome, aus denen sich infolge weiterer Trisomien der Chromosomen 3q, 8p, 12q 16p und 20 Karzinome entwickeln.

meist in jüngeren Patienten auftritt, durch eine Translokation zwischen der Xp11.2 Region und den Chromosomen 1p34, 1q21, 10q23 oder 17q25 charakterisiert. Die Translokation führt durch Fusion des *TFE3* Transkriptionsfaktors am Xp11.2 Chromosom mit den Genen *PRCC* bzw. *PSF* auf 1p34 bzw. 1q21 zur Expression von chimerischen Proteinen (Sidhar et al., 1996).

Chromophobe Nierenzellkarzinome

Chromophobe NZK, die durch morphologische Alterationen der Mitochondria und zytoplasmatische Vesikel charakterisiert sind, machen ca 5 % der NZK aus. Monosomien der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17 und 21 kommen in 75 bis 100 % der Fälle vor. Der Verlust zahlreicher Chromosomen führt zu einem hypodiploiden Karyotyp mit einer Chromosomenzahl von 33-40. Es sind größere Alterationen der mtDNA sowie somatische Mutationen von mitochondrialen Genen in chromophoben NZK festgestellt worden.

Nierenonkozytome

Die gutartigen Nierenonkozytome machen ca. 5 % der NZT aus. Einige Nierenonkozytome zeigen eine Monosomie des Chromosoms 1 und/oder von Chromosom 14q sowie den Verlust des Y Chromosoms, während eine zweite Gruppe eine balancierte Translokation zwischen Chromosom 11q13 und anderen Chromosomen aufweist. Eine dritte Gruppe zeigt entweder keine sichtbaren oder nur unspezifische genetische Alterationen.

Seltene Tumore

Die Sammelrohrkarzinome (Bellini duct Karzinome) haben eine sehr schlechte Prognose. Die Ergebnisse der wenigen genetischen Analysen sind sehr heterogen und widersprüchlich, was teilweise auf Unsicherheiten bei der histologischen Diagnose zurückgeführt werden kann. Bei den metanephrogenen Adenomen handelt es sich um sehr seltene, gutartige Tumore der Niere, die sich aus embryonalen Resten entwickeln. Sie zeigen weder Duplikationen der Chromosom 17q21.32 Region oder des Chromosoms 12 noch eine Deletion der Chromosom 11p13 Region, wie sie für papilläre NZT bzw. Wilms' Tumore charakteristisch sind. Dagegen kommt die Alteration der Chromosom 2p Region in 56 % der metanephrogenen Adenome vor. Etwa 3 % der Nierenzelltumore zeigen eine ungewöhnliche, genetische und histologische Charakteristik und können somit nicht eindeutig einer bekannten Gruppe der Nierenzelltumore zugeordnet werden.

Entwicklung der Nierenzelltumore

Die konventionellen Nierenzellkarzinome entwickeln sich aus differenzierten tubulären Zellen des Nephrons, die für die Erneuerung eine Proliferationskapazität besitzen (Abb. 1). Dieser Prozess wird durch Gene gesteuert, deren intakte Funktion für eine kontrollierte Regeneration notwendig sind. Die Möglichkeit zur Entwicklung eines konventionellen NZK entsteht durch die Inaktivierung eines „stop“ Gens, was sich in der Praxis als Verlust eines Allels (LOH) und Mutation

des zweiten Allels darstellt (z. B. das *VHL* Gen an Chromosom 3p). Deshalb sind die konventionellen NZK so wie auch die meisten anderen Tumore in Erwachsenen durch Deletion/Mutation bestimmter Tumorsuppressorgene charakterisiert.

Das Vorkommen eines papillären NZK und einer großen Anzahl von „Vorläuferläsionen“ in derselben Niere lassen keinen Zweifel daran, dass diese Tumore von embryonalen Resten ausgehen. Die Duplizierung bestimmter Chromosomen, wie z. B. 2, 7, 8, 12, 17 und 20 sind ebenfalls charakteristisch für embryonale Tumoren, wie Nephroblastom, Hepatoblastom, Medulloblastom und Neuroblastom. Vermutlich ist die Differenzierung embryonaler Zellen durch Gene auf diesen Chromosomen reguliert, welche nach abgeschlossener Organentwicklung herunterreguliert werden sollten. Eine kontinuierliche und erhöhte Expression dieser Gene durch Allelduplizierung oder aktivierende Mutation/Duplikation (wie z. B. im Fall des *MET* Onkogens in hereditären papillären NZK) könnten zur Störung der Differenzierung und somit Erhaltung zahlreicher embryonaler Zellen führen. Diese Zellen würden weiterhin ihre Fähigkeit zum Wachstum behalten und damit die Grundlage für eine spätere Tumorentstehung bilden.

Molekulare Diagnose

Die hohe Spezifität und Konstanz der genetischen Alterationen erlaubt eine korrekte Differentialdiagnose der NZT, insbesondere in Fällen mit ungewöhnlichem histologischen Erschei-

nungsbild. Die genetischen Alterationen können entweder durch Karyotypisierung, RFLP, FISH, CGH und Mikrosatellitenanalyse oder durch DNA-Array erfasst werden (Bugert und Kovacs, 1996, Wilhelm et al., 2002). Zur gezielten Untersuchung bestimmter chromosomaler Abschnitte eignen sich am besten FISH, DNA-Array und Mikrosatelliten-Analyse. Entscheidend bei allen Methoden ist die Bestimmung des richtigen Genomabschnitts und die Auswahl geeigneter Sonden bzw. Marker für die jeweilige chromosomale Region. FISH und DNA-Array beschränken sich lediglich auf die Feststellung der Kopienzahl, wogegen man durch Mikrosatelliten-Analysen die Allele unterscheiden kann. Der Einsatz moderner DNA-Analysesysteme in Verbindung mit der Fluoreszenzmarkierung der PCR-Produkte ermöglicht neben dem schnellen Nachweis von Allelverlusten auch die zuverlässige Erkennung von Duplikation eines Allels oder dem Allelverlust in einer Subpopulation von Tumorzellen.

Falls aus der Anamnese und den klinischen Daten der Verdacht auf das Vorliegen einer hereditären Tumorerkrankung besteht, sollten die Patienten, je nach klinischem Syndrom, auf Mutation des *VHL* bzw. *MET* Gens in der Keimbahn analysiert werden. Patienten mit positivem Befund sollten engmaschig kontrolliert und bei chirurgischen Maßnahmen die Möglichkeit der Entwicklung weiterer Tumore berücksichtigt werden. Den Familien sollte eine genetische Beratung empfohlen werden.

Literatur

Bugert P, Kovacs G (1996) Molecular differential diagnosis of renal cell carcinomas by microsatellite analysis. *Am J Pathol* 149: 2081-2088

Fischer J, Palmedo G, von Knobloch R, Bugert P, Prayer-Galetti T, Pagano F, Kovacs G (1998) Duplication and overexpression of the mutated allele of the *MET* proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene* 17: 733-739

Kovacs G (1990) Application of molecular cytogenetic techniques to the evaluation of renal parenchymal tumours. *J Cancer Res Clin Oncol* 116:318-322

Kovacs G (1993) Molecular cytogenetics of renal cell tumors. *Adv Cancer Res* 62:89-124

Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B, Eble JN, Fleming S, Ljungberg B, Medeiros LJ, Moch H, Reuter VE, Ritz E, Roos G, Schmidt D, Srigley JR, Störkel S, van den Berg E, Zbar B (1997) The Heidelberg Classification of Renal Cell Tumours. *J Pathol* 183:131-133

Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh F-M, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, Schmidt L, Zhou F, Li H, Wei MH, Chen F, Glenn G, Choyke P, Walther MM, Weng Y, Duan DR, Dean M, Glavac D, Richards FM, Crossey PA, Ferguson-Smith MA, Le Paslier D, Chumakov I, Cohen D, Chinault AC, Maher ER, Linehan WM, Zbar B, Lerman MI (1993) Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science* 260:1317-1316

Störkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B, Iczkowski K (1997) Classification of renal cell carcinoma. *Cancer* 80:987-989

Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, Scherer S, Zhuang Z, Lubensky I, Dean M, Allikmets R, Chidambaram A, Bergerheim UR, Feltis JT, Casadevall C, Zamarron A, Bernues M, Richard S, Lips CJM, Walther MM, Tsui L-C, Geil L, Orcutt ML, Stackhouse T, Lipan J, Slife L, Brauch H, Decker J, Niehans G, Hughson MD, Moch H, Störkel S, Lerman MI, Linehan WM, Zbar B (1997) Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the *MET* proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nature Genet* 16:68-73

Sidhar SK, Clark J, Gill S, Hamoudi R, Crew AJ, Gwillin R, Ross M, Linehan WM, Birdsall S, Shipley J, Cooper CS (1996) The t(X;1)(p11.2;q21.2) translocation in papillary renal cell carcinoma fuses a novel gene *PRCC* to the *TFE3* transcription factor gene. *Hum Mol Genet* 5:1333-1338

Wilhelm M, Veltman JA, Olshen AB, Jain AN, Moore DH, Presti JC, Kovacs G, Waldman FM (2002) Array-based comparative genomic hybridisation for the differential diagnosis of renal cell cancer. *Cancer Res* 62:957-960

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Gyula Kovacs
Labor für Molekulare Onkologie
Chirurgische Universitätsklinik
Im Neuenheimer Feld 325
D-69120 Heidelberg
Tel. 06221-566519,
Fax 06221-564634
gyula.kovacs@urz.uni-heidelberg.de