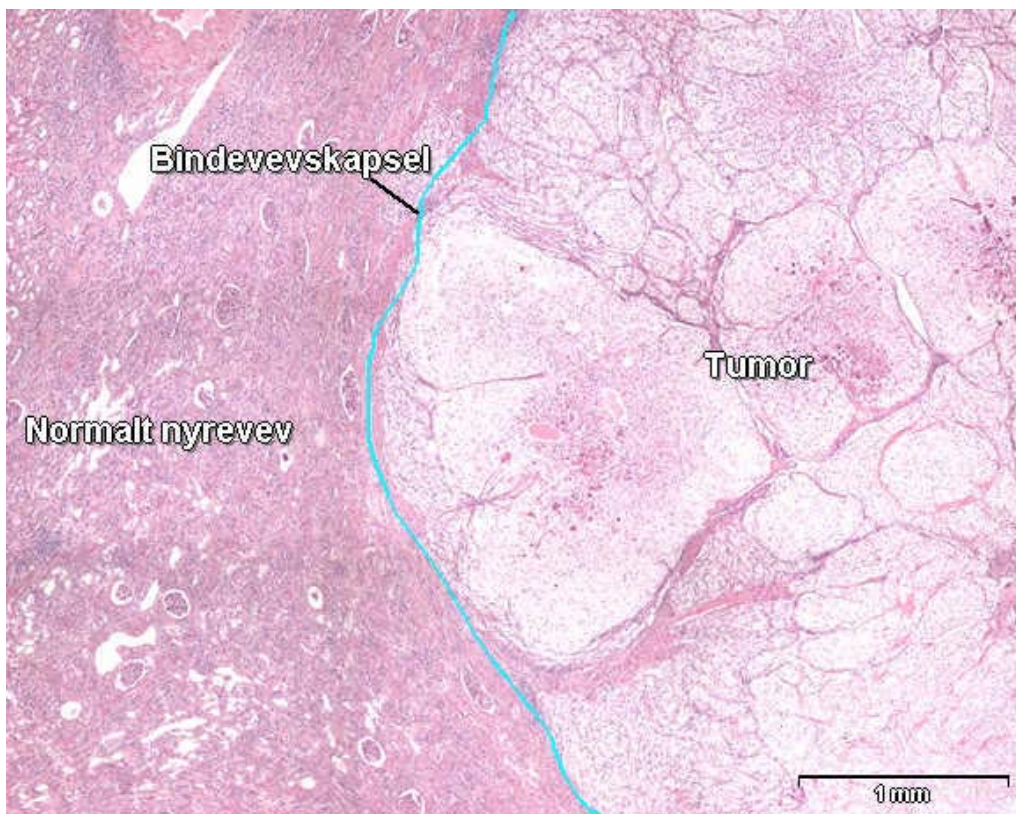

Von Hippel Lindau syndrom og nyrekreft - mulige molekylærbiologiske forklaringsmodeller



Prosjektoppgave Profesjonsstudiet i medisin 2009

Stud.med. Solveig Margrethe Mykleset, Kull H-04, UiO

Veileder: Professor Trond Buanes, Gastrokirurgisk avdeling, Oslo

Universitetssykehus, Ullevål

ABSTRACT

Von Hippel Lindaus(VHL) disease is an autosomal dominant syndrome with 1 of 36 000 individuals affected. It's caused by different types of mutations in the von Hippel Lindau gene located on the short arm on chromosome 3. The syndrome involves malignant and/or benign neoplasia in retina, cerebellum, brainstem, spinal cord , pancreas, epididymis, the broad ligament of the uterus and – most often renal cell carcinoma. The risk of developing some of the tumours shows a genotype-phenotype correlation.

Renal cell carcinoma are responsible for 50% of all deaths, caused by the VHL syndrome. Unfortunately kidney cancer is chemoresistant, and therefore the best treatment is early surgery , which is the only possibility for permanent cure. To detect tumorurs as early as possible screening and close follow up are recommended in individuals at risk. Several studies are performed to unravel the molecular defects involved, and hopefully this will be helpful in the development of new effective drugs against kidney cancer.

In the present thesis an overview of different cellular pathways, disturbed in VHL patients, are described. Possible etiological intracellular mechanisms, involved in carcinogenesis in VHL syndrome, is focused, assessing the biological significance of each pathway, and the possible interactions between them. Finally, the search for targeted therapy against tumour cells, based on basic biological understanding, is investigated, and the need of future investigational break through is underlined.

INNHALDSFORTEGNELSE

Abstract..... s. 2

Introduksjon..... s. 4

Metode..... s. 6

Resultater

Nøkkelfakta om von Hippel Lindaus syndrom..... s. 7

Hypoksi; en mulig forklaringsmodell på utvikling av nyrekreft..... s. 14

E-cadherin..... s. 18

Ekstracellulær matriks..... s. 20

Cellesyklus og apoptose..... s. 23

Primærcilier..... s. 27

Andre signaleringsmekanismer..... s. 28

Diskusjon og konklusjon..... s. 31

Kilder..... s. 37

INTRODUKSJON

HISTORIKK

Von Hippel Lindaus (VHL) syndrom er et arvelig syndrom med autosomal dominant arvegang karakterisert ved utvikling av både benigne og maligne tumores i en rekke organer, som retina, cerebellum, medulla spinalis, pancreas, nyre, epidydimis, lig. teres uteri og det indre øret. Årsaken til svulstutviklingen er et mutert tumor suppressor gen (VHL-genet), lokalisert på kromosom 3p25. Genet ble for første gang isolert i 1993.(1,2)

VHL syndromet rammer 1 av 36 000, og i USA har ca 6000-7000 tilstanden.(2,3) Den finns hos alle etniske grupper, og er jevnt fordelt mellom menn og kvinner. VHL sykdom kan grupperes sammene med fakomatosene*; dvs Sturge-Webber-Krabbe syndrom, tuberøs sklerose og neurofibromatose, pga felles arvemønster og neoplastisk hang.(3) Det blir i tillegg gruppert sammen med andre hereditære nyrecancer-syndromer, slik som Birt-Hogg-Dube, HLRCC (Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma), HPRC (Hereditary Papillary Renal Cell Carcinoma), Tuberøs sclerose, HPT-JT(Hyperparathyroidism-jaw tumor) og CC3T(Constitutional Chromosome 3 Translocation).(4)

Syndromet har fått sitt navn etter de to europeiske legene Eugen von Hippel og Arvid Lindau. Det antakelig første beskrevne tilfellet av von Hippel Lindaus syndrom var av en 35 år gammel kvinne som døde i 1864 av øye- og hjernetumores. Det var flere leger som på slutten av 1800-tallet beskrev lesjoner fra pasienter med det som senere skulle bli kalt von Hippel Lindau syndrom; von Hippel var én av dem. Eugen Hippel (1867-1939) var tysk oftalmolog, og ble en verdensautoritet når det gjaldt medfødte malformasjoner i øyet. Det var først i 1926 at Arvid Lindau foreslo at de retinale, cerebrale og vicerale komponentene faktisk var manifestasjoner av én og samme sykdom. På grunnlag av funn han gjorde ved undersøkelsene av tumorene i cerebellum og ryggmargen, foreslo han at utviklingen av disse lesjonene hadde sin årsak i feilutvikling i 3. måned av fosterlivet. I en senere avhandling beskrev Lindau også en histologisk likhet mellom retinale og CNS lesjoner. Han bemerket seg i tillegg at 20% av tilfellene var familiære. I 1929 foreslo Müller at det lå en autosomal dominant arvegang til grunn. Arvid Lindau (1892-1958) var svensk patolog og mikrobiolog ved Karolinska Institut i Stockholm og ved Universitetet i Lund. Lindau og von Hippel møtte hverandre én gang, i 1925. Termen von Hippel Lindau syndrom ble først tatt i bruk i 1936, men ble ikke vanlig i omtalen av tilstanden før 1970-årene. (5)

BIOLOGI

Dette syndromet illustrerer veldig tydelig hva som kan bli konsekvensene av et ufunksjonelt eller ikke optimalt fungerende tumor suppressor gen. Vi ser at mutasjonen har stor klinisk betydning ved at cancerrisikoen er reell, samt ved at tumorer i CNS kan få alvorlige konsekvenser. Én av de store utfordringene er å kartlegge fullt ut hva som er genproduktets normale funksjon og hva som skjer når genet muteres. Hva i all verden er det som gjør at disse pasientene utvikler svulster i en rekke organer? Hvorfor er det akkurat disse organene som blir affisert? Hvilke signalveier er involvert i denne tumorgenese? Men den største utfordringen er nok: Hva kan vi bruke disse kunnskapene til? Det er alltid interessant og nødvendig å forsøke å oppklare etiologien og patogenesen bak en tilstand, og noen ganger kan det få oss til å forstå hva man kan gjøre for ikke å utvikle sykdom. Men ved von Hippel Lindau syndrom, hvor det ikke er aktuelt med profylaktiske tiltak, er konsekvensene forskningen kan få for behandling av størst interesse. Det har blitt foretatt en rekke studier på hva en mutasjon i VHL-genet resulterer i, noen områder er bedre kartlagt enn andre.

Nyrecanceren er den viktigste årsaken til morbiditet og mortalitet (6, 7); omtrent 50% av dødsfallene. (3, 8) Medikamenters rolle i nyrekreftbehandlingen har så langt vært preget av lav remisjonsrate, liten bedring i overlevelse og betydelig grad av toksisitet. (9,10) Nyrekreft er kjemoresistent. (11) Det er nettopp dette som gjør feltet så interessant. Kan basalforskningen gi oss resultater som kan føre til et bedre medikamentelt behandlingstilbud for pasientene? Dette å overføre kunnskap fra basalfag til klinikk kalles translasjonsforskning. Generelt får svært få molekylære resultater relevans i klinisk arbeid. Det betyr altså at det utføres en hel rekke studier som man ikke klarer å gjøre seg nytte av i klinikken. (12)

Utfordringen er også ved von Hippel Lindau syndrom og nyrekreft å finne anvendelse av de molekylærbiologiske forklaringsmodellene i behandlingsøyemed.

Primærmålet med denne oppgaven er å gi et overblikk over mulige molekylærbiologiske forklaringsmodeller ved klarcellet nyrecarcinom ved von Hippel Lindaus syndrom. Jeg vil deretter diskutere hvordan disse kunnskapene kan få klinisk relevans. Aller først et metodeavsnitt og en oversikt over hva syndromet innebærer.

*fakomatose: arvelige syndromer karakterisert ved benigne tumorer i øye, hud og hjerne.

METODE

Søk i PubMed juni 2009 med Mesh-ordene "von Hippel Lindau disease AND Renal Cell Carcinoma". Som limits hadde jeg artikler publisert de siste 10 år, samt kun engelskspråklige, lenker til fulltekst. Dette søket gav 154 treff i enkeltartikler og 40 oversiktsartikler. Jeg plukket ut de artiklene jeg anså som mest relevante for min problemstilling; for eksempel var jeg ikke interessert i kasuistikker, heller ikke i stor grad artikler om behandling og radiologi.

Jeg foretok søk i the Lancet, på utkikk etter gode oversiktsartikler. Her brukte jeg kun "von Hippel Lindau disease" som søkeord, og endte opp med 2 relevante artikler.

I tillegg gjorde jeg et søk i Cochrane med søkeordene "von Hippel Lindau disease", og fant 3 artikler om behandling av nyrecancer. I.o.m. Cochranes pålitelighet vurderte jeg det som lite hensiktsmessig å sette seg inn i enkeltartikler jeg fant i PubMed angående nåværende virksomme behandlingmetoder.

Behandling av nyrecancer var da heller ikke min hovedproblemstilling.

Jeg har også Robbins basic pathology og et kompendium fra Universitetet i Oslo som referanser. Dette for å innhente litt basiskunnskap om apoptose og E-cadherin. En artikkel fra Den Norske Tannlegeforening om translasjonsforskning ble funnet gjennom et søk i www.google.com på "translasjonsforskning".

NØKKELFAKTA OM VON HIPPEL LINDAUS SYNDROM

Tabellen under gir en oversikt over hvilke organer som kan bli angrepet ved VHL syndromet, samt gjennomsnittsalderen for debut og prosentandel av pasientene som utvikler de ulike lesjonene.

| Organaffeksjon | Gjennomsnittsalder for debut | Prosentandel av pasientene |
|---|------------------------------|----------------------------|
| CNS: | | |
| Retinalt hemangioblastom | 25 (1- 67) | 25-60% |
| Endolymfatisk sekketumor | 22 (12- 50) | 10% |
| Craniospinale hemangioblastom: | | |
| Cerebellum | 33 (9- 78) | 44- 72% |
| Hjernestamme | 32 (12- 46) | 10-25% |
| Medulla spinalis | 33 (12- 66) | 13-50% |
| Lumbosacral nerverot | ukjent | < 1% |
| Supratentorialt | ukjent | < 1% |
| Viscerale lesjoner: | | |
| Klarcellet nyrecarcinom eller nyrecyste | 39 (16- 67) | 25- 60% |
| Feokromocytom | 30(5- 58) | 10- 20% |
| Pancreas tumor eller cyste | 36(5 - 70) | 35- 70% |
| Cystadenom i epidydimis | ukjent | 25- 60% |
| Cystadenom i lig. teres uteri | ukjent (16- 46) | Ukjent |

(2)

Som vi ser av tabellen er det en hel rekke organer som kan bli affisert. Det er derfor viktig med en multidisiplinær tilnærming til denne pasientgruppen. Før screeningens tidsalder var gjennomsnittlig levealder for VHL pasienter lavere enn 50 år. (2)

GENETIKK OG GENETISK TESTING

I 39-80% av sykdomstilfellene finner man en germline mutasjon i VHL genet, i alle kroppens celler. (13)

Mer enn 300 ulike germline mutasjoner har blitt identifisert ved familiær VHL.(3)

Man er avhengig av mutasjon på begge alleler for å utvikle sykdom.(1,2).

Omkring 20 % av VHL syndromtilfellene skyldes nye mutasjoner (13). VHL pasienter har enten store eller partielle germline mutasjoner, missense mutasjoner, nonsense eller rammeskiftemutasjoner. VHL mutasjoner ses utover i hele genet, men sjeldent i de første 50 kodoner. (14)

Sykdommen har penetrans på over 90% ved 65 års alder(1-3,6), men de kliniske manifestasjonene dukker som regel opp i 18-30 årsalderen. (5).

Pasienter med Chuvash polycytemi, som er et arvet polycytemi syndrom grunnet homozygositet for et hypomorft VHL allel, er ikke utsatt for å utvikle tumorer, til tross for en abnormal HIF-regulering. De har derimot økt forekomst av varicer og tromboser (14, 15, 16)

Når en pasient har fått diagnosen von Hippel Lindau syndrom, kan det være fordelaktig å finne mutasjonens lokalisasjon. Slik kan familiemedlemmer raskt teste seg for sykdommen. Genetisk testing for mutasjoner i VHL-genet krever komplett DNA-sekvensering av de kodende regionene, kvalitativ og kvantitativ southern blot analyse, samt fluoreserende in situ hybridisering (FISH). (17) Man bruker hvite blodceller for å gjøre disse analysene. Sensitiviteten er opp mot 100%. Utfordringen er større ved nyeopstående kasus av VHL syndrom, da disse kan ha en mosaikk, og følgelig kan ende opp med negativ genetisk test (2)

SPORADISKE TUMORER OG VHL-MUTASJONER

Biallelisk VHL inaktivering er vanlig også ved sporadisk ccRCC(clear cell Renal Cell Carcinoma, ccRCC).

Det er estimert at ca 50-70% har somatisk mutert VHL. (8, 14, 16, 18) Mutasjonene leder vanligvis til et forkortet, inaktivt protein. I 10%-20% av tilfellene av klarcellede tumorer er promotor-regionen til VHL genet hypermetylert. Tap av VHL gen heterozygositet ses i >90% av ccRCCs.(14, 19)

Ved sporadisk hemangioblastom finner man at VHL er mutert i omlag 30% av tilfellene, mens hypermetylering aldri har blitt påvist.

Somatisk mutasjon av VHL ved sporadiske feokromocytomer er sjeldent. (14, 16) Sporadiske tumorer i bryst-, colon-, lunge- og prostata, har sjeldent somatiske VHL mutasjoner. (14)

VHL-inaktivering i nyrer hos mus fører til nyrecyster, inaktivering av genet i lever gir heptaomegali, steatose og polycytemi, mens i hjertet medfører inaktivering cardiomegali, hjertesvikt og tumordannelse. (20)

KLASSIFIKASJON

Det er sterk genotype-fenotype korrelasjon ved VHL syndrom. Pasienter med type 1 har lav risiko for å utvikle feokromocytom, type 2 har høy risiko for å utvikle feokromocytom. Type 2 familier har så og si alltid missense VHL mutasjoner, mens type 1 familiene har ulike typer mutasjoner, inkludert nonsense og delesjon VHL mutasjoner. Type 2 har igjen blitt delt inn i type 2A, type 2B og type 2C.(1-4).

| Klassifikasjon | VHL-mutasjon | Molekylær defekt | Kliniske manifestasjoner |
|----------------|------------------------------|--|--|
| Type 1 | Total eller partielt VHL-tap | Oppregulering av HIF Feilaktig folding av proteiner | Hemangioblastom Nyrecellecarcinom Lav risiko for feokromocytom |
| Type 2A | VHL missense mutasjon | Oppregulering av HIF Svikt i stabilisering av mikro-tubuli | Hemangioblastom Feokromocytom Lav risiko for nyrecellecarcinom |
| Type 2B | VHL missense mutasjon | Oppregulering av HIF | Hemangioblastom Feokromocytom Høy risiko for nyrecellecarcinom |
| Type 2C | VHL missense mutasjon | Nedsatt binding til fibronektin Defekt samling av fibronektin-matriks | Feokromocytom |

HIF, Hypoxia Inducible Factor; pVHL, VHL tumor suppressor protein (14)

KLINISKE KRITERIER

For pasienter med kjent familiehistorie trenger man bare ett enkelt retinalt eller cerebellært hemangioblastom, nyrecellecarcinom eller feokromocytom for å oppfylle diagnosen. Uten kjent hereditet må man ha to eller flere retinale eller cerebellære hemangioblastomer, eller ett enkelt hemangioblastom og i tillegg til en visceral lesjon (med unntak av nyrecyster og cyster i epididymis, som begge er relativt vanlig forekommende i befolkningen). (2, 3, 17)

SYMPTOMER

Nyrecellecarcinomer forblir ofte asymptomatiske i lengre tid. Men presenterer seg så med hematuri, flankesmerter eller palpabel oppfylling. Nyrecyster ved VHL er oftest asymptomatiske, og trenger som regel ingen behandling. Komplekse cyster må derimot følges opp. (2, 21)

Symptomer fra hemangioblastomer i lillehjerne kan gi gangataksi (64%), dysmetri(64%), hodepine(12%), diplopi(8%), svimmelhet(8%) og kvalme(8%). Hjernestammeaffeksjon kan gi hyperestesi (55%), gangataksi(22%), dysfagi(22%), hyperrefleksi(22%), hodepine(11%) og dysmetri(11%). Ved affeksjon av ryggmarg kan det fremkomme hyperestesi(83%), svakhet(65%), gangataksi(65%), hyperrefleksi(52%), smerte(17%) og inkontinens(14%).

Feokromocytom kan gi plager som palpitasjoner, takykardi, hodepine, intermitterende eller episodisk svetting og kvalme. De fleste pancreascyster er asymptomatiske.(2)

Papillære cystadenomer i epididymis og papillære cystadenomer i lig. teres uteri er vanligvis asymptomatiske. (2,3) Retinale hemangioblastomer er symptomløse i initialstadiet, men kan etterhvert føre til partielt eller totalt synstap. Symptomer fra endolymfatiske tumores er hørselstap, tinnitus, svimmelhet og facialispåse. (2)

DIFFERENSIALDIAGNOSER

VHL syndromet er én av mange arvelige cancersyndromer som er assosiert med en økt risiko for nyrecelle carcinom. I arbeidet med å skille de fra hverandre bruker man klinikk og histologi.

Differensialdiagnose til cystiske nyrer er polycystisk nyresykdom. Radiologisk kan cystene se like ut, men pasientene har vanligvis en litt annen sykdomsmanifestasjon; med høyt blodtrykk, kronisk nyresvikt og mange cyster gjennom hele nyren. (3, 14)

Familiært feokromocytom er heller ikke bare karakteristisk for VHL syndromet. Dette ser man også ved nevrofibromatose type 1, multippel endokrin neoplasia type 2 (MEN2), samt ved mutasjoner i succinat dehydrogenase subenheter (SDHB, C og D). (14)

OPPFØLGING AV VHL-PASIENTER

Det finnes ikke standardiserte screeningprotokoller for von Hippel Lindaus syndrom, og guidelines varierer mellom institusjoner. Under følger en tabell med protokollen som the National Institute of Health, i USA, bruker.

| TEST | START OG FREKVENNS |
|-----------------------------|--|
| Urinalyse for katekolaminer | Fra 2-årsalder, hvert 1.- 2.år |
| Oftalmoskopi | Fra spedbarnsalder, årlig |
| MR hjerne og rygg | Fra 11-årsalder, hvert 2. år Etter 60-årsalder, hvert 3.- 5. år |
| Abdominal CT eller ultralyd | Fra 11-årsalder, ultralyd årlig Fra 20-årsalder, CT hvert 1.- 2. år |

(22)

VHL GEN- OG PROTEINBESKRIVELSE

VHL genet består av 3 eksoner, på tilsammen 639 nukleotider. Det koder et 25kd protein (pVHL30) som består av 213 aminosyrer. Alternativ spleising gir et 160 aminosyre langt gentranskript, som ikke inneholder ekson 2 (pVHL19). Det blir altså produsert 2 ulike VHL-proteiner (pVHL30 og pVHL19), men proteinene har så og si overlappende funksjoner, og blir derfor som oftest bare omtalt som pVHL. VHL promotoren har bindingssteder for flere transkripsjonsfaktorer, deriblant Sp1, PAX og nuclear respiratory factor 1. (3, 6, 23, 24).

pVHL trafikkerer mellom cytosol og kjerne, men pVHL30 finnes hovedsaklig i cytosol og pVHL19 primært i kjernen.(14, 16, 25) Man finner også noe pVHL i mitokondriene og ER. Under lave pH-forhold er en stor andel pVHL i nucleoli. (16)

VHL genet er et høyt konservert gen, som man finner hos organsimer fra *C. Elegans* til mennesket. (17, 26) Musemodeller har vist at embryoer som har VHL -/- dør tidlig i embryogenesen, mens embryoer som har VHL -/+ utvikler seg normalt, men de vil med tiden utvikle multiple svulster i leveren med høye nivåer av HIF(Hypoxia Inducible Factor)(14, 27) VHL-proteinet har mange oppgaver, hvor den mest kjente er degraderingen av HIF.

HIF er en transkripsjonsfaktor som styrer transkripsjonen av 100-200 gener; mange av disse er viktige for at celler skal overleve og tilpasse seg lave O₂-forhold. (1).

VHL-proteinet har et α -domene og et β -domene. (17) α -domenet binder proteinene Elongin B og C, Cul2 og Rbx1. Komplekset (det såkalte VBC-komplekset, pVHL/E3 ubiquitin ligase komplekset, eller VBC-CUL2 komplekset) bestående av VHL, Elongin B og C, Cul2 og Rbx1 sørger for ubiquitinerings og degradering av ulike proteiner, slik som HIF1- α , HIF2- α , HIF3- α , atypisk protein kinase λ , VDUs (VHL-interacting deubiquitinating enzymes, VDU1 og VDU 2) og to subenheter av RNA Polymerase II (Rpb1 og Rpb7) (14, 17, 27, 28). Disse mål-proteinene blir bundet til β -domenet til pVHL. Selve degraderingen blir utført av 26S proteasomet. (27). pVHL binder seg i tillegg til Jade-1 og til et KRAB-A domene-inneholdende protein (VHLaK). (14, 24, 25, 27)

Binding til HIF- α krever at HIF- α blir hydroksylert på ett eller to prolyl seter, noe som blir utført av medlemmer av den såkalte Phd familien (også kalt EglN) av prolyl hydroksylaser. (1)

Prolyl-hydroksyleringen av HIF skjer ikke ved hypoksiske forhold. HIF- α vil da istedet danne kompleks med HIF-1 β /ARNT og fungere som transkripsjonsfaktor. (29)

Fritt pVHL, som ikke er bundet til elonginer er relativt ustabil. E2-EPF UCP interagerer med fritt pVHL og merker det for polyubiquitinerings og proteasomal degradering. Ofte er E2-EPF UCP-nivået økt ved ulike typer kreft. Overekspressjon av E2-EPF i celler som inneholder pVHL fremmer akkumulering av HIF og letter tumorvekst, invasjon og metastasering. (15)

PATOHISTOLOGI VED ccRCC

ccRCC ved VHL syndrom er gule eller oransje av farge, og er innkapslede. De kan være solide eller ha en blanding av solid og cystisk utseende. Histologisk sett er de alltid av klarcellet type (2)

Det er usikkert om tumorcellene utgår fra proksimale eller distale tubuli. (30)

PROGNOSE VED ccRCC

Prognosen for nyrecancer estimeres på grunnlag av TMN stage, tumor gradering, tilstedeværelse av nekrose og/eller vaskulær invasjon i primærtumor. (19)

5-års overlevelse for ccRCC er 70% hvis tumoren er lokalisert, og ved en stage I RCC vil over 90% overleve 5 år. 5-20% med metastatisk sykdom vil overleve 5 år, med en median overlevelsestid på 13 mnd. (6, 18, 31, 32) Beklageligvis har 20-30% allerede metastaser på diagnosetidspunktet. (18) RCCs metastaser oftest til lever, lunge og ben. (3)

Det er mulig at type VHL mutasjon kan forutsi prognose, men få studier finnes så langt. To studier har

rapportert dårligere overlevelse hos pasienter med somatisk mutasjon hvor pVHL har mistet sin funksjon. (19, 33)

Muligens kan man få ulik grad av mikrovaskulær invasjon avhengig av hvor mutasjonen sitter. Det er også uvisst om en kombinasjon av mutasjon og metylering av VHL-genet er av betydning.

Det kan være en assosiasjon mellom type mutasjon i VHL og tumorstørrelse. (19)

Det mest kjente konsekvensen av en VHL-mutasjon er forstyrrelse i reguleringen av HIF, og det er nettopp dette vi skal se på i neste avsnitt.

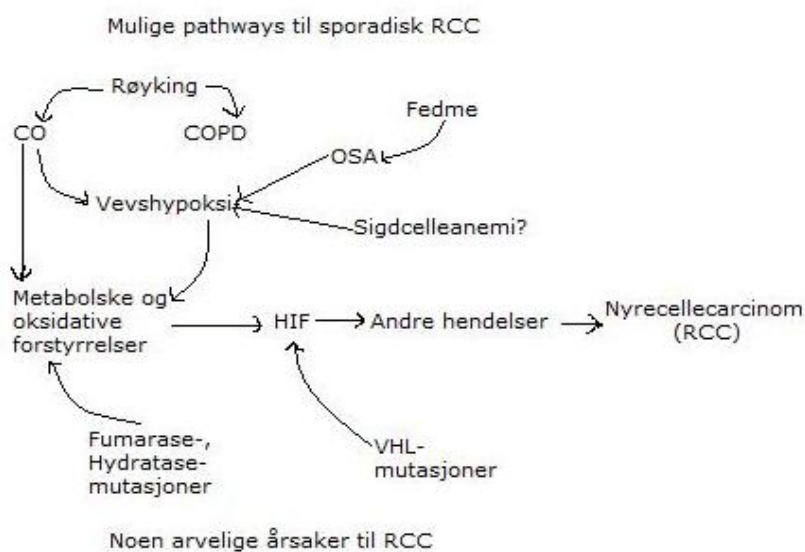
HYPOKSI; EN MULIG FORKLARINGSMODELL PÅ UTVIKLING AV NYREKREFT

Nyrekreft ble anslått å skulle være årsak til omtrent 2,3 % av alle cancerrelaterte dødsfall i Europa i 2006.(19, 32) Den mest vanlige formen for nyrekreft er den klarcellede typen, som står for >75% av tilfellene.(19)

To etablerte viktige risikofaktorer for nyrekreft er fedme og røyking. Risikoen for nyrekreft hos røykere er doseavhengig. KOLS, som ofte er forårsaket av røyking, er én årsak til kronisk hypoksi. CO fra tobakken inhiberer i tillegg mitokondriell elektrontransport ved å påvirke cytochrome c oxidase, samt induserer det HIF ekspresjon i nyrene.

Årsaken bak fedme som riskiofaktor er ikke helt klartlagt, men det spekuleres i om det kan ha sin årsak i hormonelle forandringer. Overvekt/fedme er også en riskiofaktor for obstruktiv søvnapné, som medfører hypoksi under søvn.

En dysregulering av HIF og oksygen-registrering hos nyrecellecarcinomer ses ved von Hippel Lindaus syndrom. Mutasjoner i gener som er involvert i sitronsyresyklus predisponerer også for tumores. (34)



(COPD= KOLS. CO= Karbonmonoksid. HIF= Hypoxia Inducible Factor. RCC= Renal Cell Carcinoma. OSA= Obstructive sleep apnea). (Figuren er en gjengivelse fra ref 34).

Andre risikofaktorer for nyrekreft er kjønn(menn), økende alder, cadmium, benzen, trikloroetylen, asbest og kronisk dialyse. (21)

HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR (HIF)

HIF GENERELT

HIF er en sekvens-spesifikk transkripsjonsfaktor som styrer transkripsjonen av 100-200 gener. Disse genproduktene fremmer evnen til adaptasjon og overlevelse under lave O₂-forhold. (1) pVHLs interaksjon med HIF- α er avhengig av at en eller begge av HIF α s prolyl-områder (NTAD og CTAD) hydroxyleres. Denne hydroxyleringen foretas av medlemmer i Phd-(også kalt EglN)familien av prolyl hydroxylaser. (1, 4, 6, 14, 23, 25)

Phd-familiemedlemmene er 2-oxoglutarat- og jern-avhengige dioxygenaser, og er sensitive for oksygenforandringer. Disse enzymene blir i tillegg inhibert av reaktive oksygen arter og spesielle metabolitter som konkurrerer med 2-oxoglutarate, inkludert succinat, en av bi-produktene ved hydroxyleringsreaksjonen. Alle de tre typene dioxygenaser i Phd-familien kan hydroxylere prolin på HIF- α , men det ser ut til at er PHD2 (EGLN1) er den viktigste. (1, 6, 14, 16, 23, 25).

Hydroksylering av et asparaginyll domene innenfor CTAD utført av Factor inhibiting HIF (FIH1, også kjent som HIF1AN) hindrer rekrutteringen av ko-aktivatorene p300 og CREB-bindende protein (CBP). FIH1 er en annen 2-oxoglutarat- og jernavhengig dioxygenase. Disse to ovennevnte ko-aktivatorene er absolutt nødvendige for at Phd skal få hydroxylert prolyl-domenet. FIH1 har en lavere O₂Km enn Phd familiemedlemmene. FIH1 er derfor aktiv i celler med intermediære nivåer av hypoksi. (1, 6, 14, 15, 28) HIF-1 α er mer sensitiv enn HIF-2 α for den inhibitoriske effekten av FIH1. (20)

Prolyl-hydroksyleringen av HIF skjer ikke ved hypoksiske forhold, noe som igjen medfører at pVHL/E3 ubiquitin-ligase-komplekset ikke klarer å gjenkjenne HIF, og HIF således ikke blir degradert. HIF-1 α vil da istedet samles med den stabile HIF-1 β /ARNT subenheten til en aktiv transkripsjonsfaktor og drive ekspresjonen av hypoksiresponsive gener involvert i angiogenese, glukoseopptak og metabolisme, cellevekst og regulering av cellesyklus (15, 23, 25, 35)

HIF består av to ulike ikke-identiske subenheter (en α subenhet og en β subenhet). Det er tre HIF- α -gener i det humane genom, samt tre HIF- β -gener. HIF β er et stabilt protein, mens HIF α proteinene er svært ustabile hvis oksygen er tilstede. (14) Genetisk ablasjon hos mus av enten HIF-1 α eller HIF-2 α er letalt for embryogenesen. (36) Ekspresjonen av HIF-1 α og HIF-2 α er ofte økt i ulike kreftcelletyper. (37) HIF-2 α har lavere transaktiveringsenergi enn HIF-1 α under hypoksiske betingelser, og til forskjell fra HIF-1 α er HIF-2 α s binding til DNA regulert gjennom en redox mekanisme. (36)

Flere HIF-3 α splice varianter har blitt identifisert. Ingen av disse ser ut til å ha områder homologe med CTAD, men noen ser ut til å ha områder som er homologe med NTAD. Men transkripsjonell aktivering utført av HIF-3 α har ikke blitt godt dokumentert, og noen HIF-3 α splice varianter inhiberer klart HIF-avhengig transkripsjonell aktivering. (1, 38)

Induksjon av HIF-1 α protein ved hypoksi skjer primært ved proteinstabilisering og ikke induksjon av HIF-1 α mRNA. Men hypoksi over en viss varighet fører til nedsatt mengde HIF-1 α mRNA. Induksjon av aHIF (HIF-1 α antisense transcript) kan være ansvarlig for dette. Det er altså snakk om en mulig auto-feedback mekanisme. HIF-2 α er regulert på en liknende måte. VHL regulerer HIF-2 α på transkripsjonsnivå.(39)

HIF-1 α har blitt vist å ha negativ effekt på tumorvekst, mens HIF-2 α innehar en positiv effekt. Pga interaksjon mellom HIF- α isoformer, har det ikke blitt avgjort om HIF-1 α s suppresjon av tumorvekst skyldes direkte effekt, indirekte effekter pga nedregulering av HIF-2 α , eller en kombinasjon.(40)

De noe overlappende og antagonistiske effektene av HIF-1 α og HIF-2 α er dårlig forstått, men det er klart at ved RCC er HIF-2 α en kritisk viktig faktor, da suppresjon av HIF-2 α hindrer tumor dannelse hos nyreceller. Man tror at ekspresjon av HIF-2 α bidrar til overlevelsessignaler hos nyrekreftcellene som beskytter de mot apoptose og fremmer angiogense.(37)

Det har blitt rapportert flere grunner til at HIF-2 α er mer onkogen sammenliknet med HIF-1 α . Bl.a. er HIF-2 α mindre sensitiv enn HIF-1 α for inhibisjon fra FIH1, som skal være aktiv i oksygenererte VHL-defekte celler. I tillegg blir HIF-1 α lettere degradert enn HIF-2 α hos VHL-negative celler. (1, 40)

HIF-1 α og HIF-2 α har ikke samme målgener. F.eks. er spesifikke metabolske gener først og fremst aktivert av HIF-1 α , mens EPO og OCT4(Octamer 4) oftest aktiveres av HIF-2 α . Man har også vist at HIF-1 α virker som en antagonist på MYCs funksjon, mens HIF-2 α samarbeider med MYC. (1, 40) Studier av hypoksisk nyrevev fra rotte har vist at HIF-1 α er den isoformen som normalt blir aktivert ved hypoksi i nyretubuli, mens HIF-2 α normalt er begrenset til non-tubulære cellepopulasjoner. (41)

Forskjellige VHL tumorer skiller seg fra hverandre i deres ekspresjon av HIF- α isoformer, hvor noen bare uttrykker 1 type isoform og andre begge typer. (23, 31) Det finnes mutasjoner i VHL som ikke forårsaker dysregulering av HIF-degraderingen. Disse pasientene får heller ikke RCC. (35)

Hos nyrer fra pasienter med VHL syndrom har det blitt funnet at HIF aktivering er en tidlig hendelse som skjer i tilsynelatende normale enkle celler i nyretubuli. Til sammenlikning viser dysplastiske lesjoner, cystiske lesjoner og tumorer tegn på at det i tillegg har foregått flere, andre, mekanismer som hadde økt HIF aktiveringen ytterligere. (41)

Foci med tap av pVHL funksjon har blitt rapportert å befinne seg hovedsaklig i et begrenset område av nyretubuli, nemlig den distale tubuli. (23)

HIF 1

HIF-1 α har blitt rapportert både å skulle fremme og hemme tumorutvikling.(37)

Mange HIF-1 α målgener er mistenkt å ha en rolle ved kreft. F.eks gener som koder for proteiner ansvarlig for å regulere glukoseopptak og metabolisme (GLUT1, 6-fosfofruktokinase og pyruvat dehydrogenase

kinase), angiogenese (VEGF, PDGF, CTGF), ekstracellulær matrix formasjon og turnover (slik som metalloproteinaser og lysyl oxidase), kjemotakse (SDF1 og dets reseptor CXCR4) og celleproliferasjon eller overlevelse (f.eks. EGFR). (1, 28, 38, 39, 40)

HIF-1 α proteinet viser progressivt høyere immunoreaktivitet i morfologisk normale foci, dysplastiske foci, cystiske lesjoner og ccRCC. (41)

HIF-1 α har vært demonstrert å antagonisere Myc og inducere celle syklus arrest ved å sette Myc i en transkripsjonell inaktiv form. HIF-1 α regulerer BNip3 og CAIX positivt, men har ingen effekt på cyclinD1, TGF- α og VEGF.(1, 23, 40, 42) (Bnip3 er et medlem av Bcl-2 familien av apoptose-regulerende proteiner. Proteinene blir kraftig indusert ved hypoksi).(40)

HIF-1 α har større evne enn HIF-2 α til å bli proteasomalt degradert ved fravær av pVHL, dette pga en alternativ ubiquitinerings-ligase eller direkte interaksjon med proteasomet.(20)

HIF 2

HIF-2 α har blitt implisert bare å skulle fremme tumorutvikling/progresjon. Stabil ekspresjon av HIF-2 α er et kritisk aspekt av tumorgenese ved nyrecancer.

Det har blitt rapportert at å supprimere HIF-2 α er tilstrekkelig for å hindre tumorgenese. (15, 16, 20, 23, 35, 37, 43) HIF-2 α -terskelen er høyere for å utvikle RCC enn hemangioblastom. (1)

HIF-2 α proteinet blir ikke detektert i de tidligste abnormale foci i VHL-nyrer, men fargningen øker i intensitet i takt med lesjonenes grad av avanserthet. (41)

Det har blitt rapportert at gener som CyclinD1 bare er transkripsjonelle targets til HIF-2 α hos VHL-negative celler. TGF- α kan også havne i denne kategorien. Andre gener som GLUT-1 og VEGF har også sett ut til å være spesifikke HIF-2 α targets i VHL-defekte RCC-celler, mens de i VHL-kompetente RCC-celler og non-RCC celler har vært vist å være responsive for begge HIF- α isoformer. Forklaringen på denne forskjellen er uviss, men den enkleste er at en spesifikk transkripsjonell forbindelse mellom HIF-1 α og disse genene mangler i VHL-defekte RCC-celler. (27, 38, 40)

HIF-2 α regulerer Bnip3 negativt, og cyclinD, TGF- α og VEGF positivt. (16, 23, 40)

Det har også blitt vist at overekspresjon av HIF-2 α (men ikke HIF-1 α) kan overstyre pVHLs evne til å supprimere vekst ved nyrekraft. (15) Høyt nivå av HIF-2 α er ofte assosiert med dårlig prognose. (20)

Deregulering av VHL har også vært forbundet med nedregulering av E-cadherin og induksjon av en epitelial til mesekymal transformasjon (EMT), som er et kjennetegn ved RCC.(1) Dette skal vi se nærmere på i neste avsnitt.

E-CADHERIN

E-cadherin er et homofilt adhesjonsmolekyl og en hovedbestanddel for celle-celle adheranse hos epitelceller. Den cytoplasmatiske halen til E-cadherin assosieres med β -catenin, som er forbundet til α -catenin, som igjen er bundet til aktin. Dette skaper et dynamisk forbindelsesledd. (28, 43, 44) I tillegg er det verdt å nevne at pVHL inducerer ekspresjon av ZO-1 (Zona Occludens 1), et protein uttrykt på den cytoplasmatiske siden av en tight junction. (13) I nyren finner vi E-cadherin normalt kun i den distale del av nyretubuli, inkludert det kortikale tykke oppadstigende ben, pars convoluta av distale tubuli, samt samlerøret. (23)

Storparten av ccRCC-celler med mutert VHL-gen viser en markant redusert E-cadherin ekspresjon. Ved reintroduksjon av friskt VHL-gen blir ekspresjonen normal igjen. (23, 28)

E-cadherin-funksjon er tapt i nesten alle typer epiteliale cancere, enten ved mutasjonell inaktivering av E-cadherin eller epigenetiske forandringer, eller ved aktivering av β -catenin-gener. (27, 28, 44) Eksempler på slike epigenetiske forandringer er metylering og oppregulering av E-cadherin transkripsjonsfaktor-suppressorer. Tap av E-cadherin er et kjennetegn ved epitelial-mesenkymal transisjon (EMT). EMT er nødvendig for cellers migrasjon og invasjon under normal embryogenese. (1, 15, 23, 28, 43)

Tap av E-cadherin kan i tillegg påvirke Wnt signalerings-pathway. F.eks kan fosforylering av β -catenin via tyrosin reseptor kinaser (c-Met, fyn, fer) eller c-src dissosiere β -catenin fra den cytoplasmatiske halen til E-cadherin, slik at β -catenin blir translokert til kjernen hvor den binder seg til TCF4 som igjen driver transkripsjon av gener ansvarlig for proliferasjon og differensiering (bl.a MMPs og CyclinD1). c-Met er vedvarende fosforylert ved tap av VHL .Tap av VHL hos ccRCC trigger i tillegg HGF-drevet β -catenin signaliering.(HGF, Hepatocyte Growth Factor) (28, 43)

Hypoksi reduserer E-cadherin-nivået signifikant. Når ulike typer kjemiske stoffer som aktiverer HIF tilsettes, ser man også en reduksjon i nivå av E-cadherin. (23)

Den VHL-medierte reguleringen av E-cadherin er altså avhengig av HIF (27, 28) pVHL kan også trolig regulere E-cadherin uavhengig av HIF.(15)

HIF-1 α inhibisjon alene hos pVHL-negative celler fører ikke til E-cadherin ekspresjon, inhibering av HIF-2 α resulterer i en detekterbar, men variabel økning i E-cadherin ekspresjon. Kombinasjonen HIF-1 α og HIF-2 α inhibisjon medfører en robust økning av E-cadherin ekspresjon. Men gjenopprettelse av E-cadherin ekspresjon er ikke nok for at pVHL skal suppressere tumorvekst hos ccRCC-celler (23)

Det har blitt vist at ccRCC celler som mangler VHL har økt nivå av E-cadherin-spesifikke repressorer, som Smad-interacting protein (SIP1, også kjent som ZEB-2 og ZFHX1B), Snail, TCF-3 og δ EF1(ZFHX1A). Disse

repressorene virker på E2-boksene lokalisert innen promotor-regionen til E-cadherin. RNA polymerase IIs binding til promotoren til E-cadherin er nedsatt under hypoksiske forhold eller under normoksi hos ccRCC celler. Dette stemmer overens med at repressorenes funksjon er å blokkere transkripsjon ved å hemme RNA polymerase IIs engasjement til promotor. (13, 23, 27, 28, 45)

For å enklere kunne migrere gjennom ekstracellulær matriks trenger cellen at dette er disorganisert og løst modellert.

EKSTRACELLULÆR MATRIKS

pVHL OG ECM-DEGRADERING

For at en tumor skal kunne metastasere må den ødelegge celle-celle og celle-ekstracellulær matrix kontakter, migrere gjennom stromalt vev, invadere basalmembranen og komme seg over i blodsirkulasjonen. Disse stegene er primært en oppgave for den sink-avhengige endopeptidase metalloproteinase-familien(MMPs). De fleste MMPs blir sekretert fra celler som zymogener og må bli aktivert ekstracellulært av serin proteaser eller andre MMPs. MT1-MMP(membran type-1 matrix metalloproteinase) er kjent for å stå for proteolyse av type I kollagen, kontrollere celle-ECM kontakter, kløyve adhesjonsmolekyler og aktivere latent MMP-2 og MMP-13. Normalt epitel uttrykker ikke MT1-MMP. (31) Gelatinasene MMP-2 og MMP-9 degraderer kollagen type IV, som vi finner i basalmembranen. Økte nivåer av MMPs har vært forbundet med invasive egenskaper hos de fleste humane kreftformer. MMP-2 aktivitet har faktisk, sammen med histologisk gradering, staging og T-klassifikasjon, blitt identifisert som en signifikant prediktor for klinisk outcome ved RCC. Dette til tross for at MMP-2 ikke alene selv er i stand til å kløyve kollagen type I. Men MMP-2 aktivitet er muligens en nødvendig bidragende faktor for at RCC-celler skal kunne invadere kollagen type I.(35)

Stromale omgivelser består hovedsaklig av type I kollagen, mens basalmembranen består av type IV kollagen. (35) I fravær av VHL, overuttrykker RCC-celler MT1-MMP både på gen- og protein-nivå; i tillegg ses også en oppregulering av MMP-2 og -9. (35, 14, 27, 46) MT1-MMP ekspresjon har vært vist å være forbundet med avanserte stadier av RCC. Spesifikk inhibering av MT1-MMP hos tumorceller som overuttrykker MT1-MMP har vist å kunne supprimere tumor cellens migrasjon, invasjon, proliferasjon og metastasering. (35) MMP inhibitor, selektiv for MT1-MMP, MMP-2 OG MMP-9, hindrer tumor invasjon in vitro og har anti-tumor og antiangiogenetiske virkninger in vivo.(31, 35) Mens RCC-celle invasjon av Matrigel (som hovedsaklig består av kollagen IV og laminin) muligens er HIF-uavhengig, medierer HIF-2 α invasjon av type I kollagen hos RCC gjennom regulering av MT1-MMP. (35)

Et samarbeid mellom HIF-2 og transkripsjonsfaktoren Sp1 induserer MT1-MMP ekspresjon. Det er et HIF-2 bindingssete på -125 MT1-MMP promotorregionen. Men ved mutasjon av både HIF-2 og Sp1 blir man ikke helt kvitt MT1-MMP ekspresjonen. En mulig forklaring på dette er signalering gjennom kjemokin-reseptoren CXCR4. CXCR4 er et hypoksi-induserbart gen, og dets oppregulering pga tap av VHL fører til økt invasivitetsevne hos RCC celler som reaksjon på dets ligand, stromal-derivert faktor 1 (SDF-1).

MMP-mediert proteolyse er regulert av TIMPs(Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases). Celler som mangler VHL sekretierer lavere nivåer av TIMPs enn celler med villtype VHL. (14, 46) Hos RCC-celler som har defekt VHL vil tilsettelse av antistoffer mot TIMPs øke cellens evne til invasjon av kollagen IV og

Matrigel. (35, 46) Behandling av VHL-negative RCC celler med biologisk aktiv rekombinant TIMPs utsletter tendensen til grenet morfogenese.(46) Tap av VHL kan være nødvendig og tilstrekkelig for å forandre ekspresjonen av TIMP-2, mens tap av VHL er nødvendig, men ikke tilstrekkelig for å endre ekspresjonen av TIMP-1, MMP-2 og MMP-9. (46)

Det er ingen målbar forskjell blant VHL-negative og VHL-positive ccRCC-celler med hensyn på ekspresjon av cathepsin B og L, som er lysosomale cystein proteaser. (46)

pVHLs OPPRETTTHOLDELSE AV ECM OG ENDRET ANGIOGENESE VED MUTASJON

pVHL er en viktig aktør i opprettholdelsen av ekstracellulær matriks(ECM)' integritet. (38) Studier på *C. Elegans* tyder sterkt på at dette er HIF-uavhengig. (16, 27) pVHL fører til samling av fibronektin og kollagen type IV nettverk; dette fører til nedsatt evne til invasivitet *in vitro*, samt nedsatt angiogenese og tumorgenese *in vivo*. (38) Interaksjonsevnen med fibronektin er mistet ved alle typer naturlig forekommende VHL mutanter.(38, 43)(Fibronektin interagerer bl.a med integriner og danner slik bro mellom celler og strukturelle proteiner i ECM).(14) pVHL har blitt rapportert å skulle binde seg direkte til både fibronektin og til hydroksylert kollagen IV ($\alpha 2$ -kjeden). (1, 27, 43) pVHL kan binde seg til fibrillære kollagenkjeder, men ikke ferdig foldet trippel helix kollagen, noe som kan tyde på at pVHL er viktig for riktig prosesseringen av kollagen. (43) Det er mulig at pVHL binder seg til aminoterminalen til kollagen IV som protruerer inn i cytosol fra endoplasmatisk retikulum. (1, 27) pVHL binder seg trolig indirekte til fibronektin. (27). I tillegg ser det ut til at pVHLs binding til fibronektin er avhengig av at pVHL blir modifisert av et ubiquitin-liknende molekyll kalt NEDD8. Dette fører til at pVHL ikke binder seg til Cullin 2. (Binding til Cullin 2 mothindrer at pVHL binder seg til fibronektin). (43)

VHL-defekte celler mister evnen til å samle fibronektin matrix, mens reintroduksjon av funksjonelt VHL i disse cellene gjenoppretter evnen. (14, 29, 45) ECM samling er et viktig regulatorisk element i dannelsen av nye blodårer. Degradering av ECM tillater endotel-celle-migrasjon, medfører løslatelse av ECM-bundne angiogenetiske faktorer, og resulterer i karinfiltrasjon.(38, 43) Celler med kun overekspresjon av HIF-2 α viser ikke slik viktig angiogenese. (38) VEGF ekspresjon og sekresjon hos VHL tumorer er ikke tilstrekkelig for å fremme og opprettholde angiogenese med mindre det forekommer i kombinasjon med en feilaktig remodelert ECM som er passende for endotelcelle-migrasjon og karinfiltrasjon.(38, 43)

VHL affiserer også integrinfunksjon, som igjen påvirker samlingen av ECM. ECM kan også avgi proliferasjons- og overlevelsessignaler som er bundet til integriner. (1, 16) Nyrecyster og tumorer hos pasienter med VHL syndromet har eleverte nivåer av $\alpha 3$ - og $\alpha 5$ -integrinene, sammenliknet med nivåene hos normale proximale tubuliceller.(47) MMP-2 binder seg til $\alpha v\beta 3$ integrin på endotelceller, og kan slik blotlegge kryptiske områder på kollagen IV. Når man hindrer MMP-2s binding til $\alpha v\beta 3$ integrin blir tumor vekst og neovaskulariseringen inhibert. (38)

Ved fravær av eksogen matrix er vekst av celler ved høy celletetthet nok til å få frem VHL-avhengige forandringer i cellevekst og morfologi. VHL-positive celler blir runde og samler seg i clustre, mens VHL-negative celler blir forgrenede og vokser spredt. Lanvarig vekst på Matrigel og polymerisert kollagen I stimulerer VHL(+) celler til å vokse som et sammenhengende epitel-monolayer, mens VHL(-) celler viser disorganisert og forgrenet og vekst over monolayeret og inn i ECM substrater. (47)

Som vi ser viser ccRCC-celler med mutert VHL evne til invasjon og metastasering, samt et disorgansiert vekstmønster. Noe som også, som hovedregel er ute av kontroll ved cancer, er cellesyklus. Dette omtales inngående i neste avsnitt.

CELLESYKLUS OG APOPTOSE

KONTROLL AV CELLESYKLUS

CyclinD1 hører til G1 cyclinfamilien og spiller en nøkkelrolle i reguleringen av cellyklus under G1/S overgangsfasen, sammen med dets katalytiske medarbeidere CDK4/CDK6. CyclinD1-CDK4/CDK6 komplekset fremmer G1 progresjon ved bl.a å fosforylere retinoblastom(Rb)-proteinet. (16, 33, 48) Dette inaktiverer Rb proteinets evne til å binde seg til proteiner av E2F familien og til å supprimere transkripsjonell aktivitet. Humane cancere har ofte translokasjon eller amplifikasjon av cyclinD1-genet. Trolig blir cyclinD1 induisert via Ras-ERK pathway. (33) Det finnes også dokumentasjon på at transkripsjonen av cyclinD1 er β -catenin-mediert. (28)

Celler uten funksjonelt pVHL nedregulerer den cyclin-avhengige kinase inhibitoren p27, oppregulerer cyclin D1, og mislykkes i å tre ut av cellyklus ved serum deprivasjon.

(6, 14, 20, 48) Evnen til å bryte ut av cellyklus kan bli gjenvunnet ved å reintrodusere villtype VHL.

Muligens reguleres cyclinD1 av HIF. Flere forhold taler for dette:

- 1) Hypoksiske kulturforhold kan inducere deregulert cyclinD1 ekspresjon selv hos VHL-positive celler.
- 2) Ekspresjon av en HIF-mutant, som ikke kan binde pVHL, kan inducere cyclinD1 ekspresjon hos VHL-positive celler.
- 3) Endogent HIF protein-nivå er høyt hos VHL-defekte celler, men ikke hos VHL-intakte celler. (33)

Det er tre HIF-bindende konsensussekvenser (HRE) i cyclinD1 promotor-regionen, som kan binde HIF-2 α , ihvertfall in vitro. Om oppreguleringen av cyclinD1 alene etter tap av VHL er tilstrekkelig for carcinogenese er fremdeles usikkert. (16, 33)

Tap av VHL medfører deregulert cyclinD1 mRNA ekspresjon kun ved høy celletetthet, mens protein-nivå og aktivitet av cyclinD1 forblir høy uavhengig av celletetthet hos VHL-defekte celler.(33)

Aktinregulatoren HSPC300(også kjent som BRICK1), som befinner seg på VHLs teleomer og som kan være mutert ved VHLs syndrom, spiller en nøkkelrolle i reguleringen av aktin-cytoskjelettet og er nødvendig for polarisert celledeling. Ablasjon resulterer i partiell arrest eller forsinket cytokinese, noe som indikerer at celledelingen er svekket hos tumorceller som mangler denne. (49)

APOPTOSE

Apoptose er kritisk for normal utvikling av nyreceller. Apoptose er en prosess ved mange tilstander som affiserer nyrene; bla. polycystisk nyresykdom, hypoksisisk-iskemisk skade, nefrotoksisitet og proteinurisk skade. Da apoptose er energikrevende er cellens nivå av ATP avgjørende for om cellen kan gå i apoptose

eller ikke. Det har blitt foreslått at lokale områder med hypoksi og apoptose hos VHL-negative tumorer stimulerer vaskularisasjon og angiogenese. (50)

Caspase-familien utgjør den ultimate effektor av apoptose. Caspasene er enzymer som produseres som inaktive pro-enzymmer, men som ved spalting av andre caspaser, aktiveres. Derved oppstår caspase-kaskader. Endeproduktet i caspase-kaskaden er spalting av proteiner som bidrar til at cellen dør.

Apoptose kan induseres med eller uten involvering av mitokondriene. (51) Aktivering av pro-caspase 8 er et resultat av signalering via integral membran dødsreseptorer, slik som Fas og TNFR1. Aktivering av pro-caspase 9 er primært avhengig av mitokondriell signaleringsveier, som involverer medlemmer av Bcl-2 familien.

De best karakteriserte hendelsene etter aktivering av pro-apoptotiske Bcl-2 familiemedlemmer, slik som Bax, inkluderer induksjon av mitokondriell permeabilitet, og aktivering av pro-caspase 9. Caspase 8 og 9 setter i gang en kaskade som resulterer i en aktivering av caspase 3, som kløyver flere ulike substrater, noe som igjen resulterer i DNA-fragmentering og andre forandringer karakteristisk for apoptose. Til kontrast beskytter de anti-apoptotiske Bcl-2 familiemedlemmene, f.eks Bcl-2 og Bcl-xL, mot disse virkningene ved å opprettholde mitokondriell struktur, funksjon og permeabilitet, samt hindre utslipp av cytochrom c ut i cytosol. (50)

VHL-negative humane RCC-celler undergår dose-avhengig apoptose under hypoksi, etter UV-bestråling, samt etter glukosedepivasjon. VHL-negative celler viser en signifikant aktivering av caspase 9 og frigivning av mitokondriell cytochrom c ut i cytosol etter kjemisk hypoksi, dette til motsetning til VHL-positive celler. Caspase 8 er bare minimalt aktivert i både VHL-positive og VHL-negative celler. I tillegg viser VHL-positive celler en markert oppregulering av Bcl-2 protein ekspresjon sammenliknet med VHL-negative celler (5 x økning). VHL-negative celler viser også en øket akkumulasjon av feilfoldede og feilprosseserte proteiner, noe som muligens kan interferere med generell opprettholdelse av cellulær funksjon og integritet.

Reintroduksjon av VHL er ikke bare assosiert med oppregulering av Bcl-2 og Bcl-xL, men også akkumulasjon av cyclin-avhengig kinase inhibitor p27 og p21 og proteksjon fra apoptose. (16, 50) HIF-1 α oppregulerer i tillegg det proapoptotiske proteinet Bnip3, som er medlem av Bcl-2-familien. (16, 40)

Kollektivt betyr disse dataene at VHL er nødvendig for eliminering av abnormale proteiner og for cellyklus exit etter cellulært stress og at svikt i disse mekanismene kan føre til en øket sensitivitet for apoptotiske stimuli. (50, 16) På den annen side kan dette drive seleksjon av celler som blir resistente for apoptose, som igjen kan bidra til cancerutvikling. (50)

NFκB OG p53

Nyrecancere har økt NFκB aktivitet, noe som kan fremme cellers overlevelse. Tap av pVHL aktiverer NFκB. Det har blitt foreslått både HIF-avhengige og HIF-uavhengige mekanismer for dette. (1, 15, 20) pVHL fremmer fosforlyeringen av NFκB-agonisten Card9; denne fosforlyeringen utføres av casein kinase 2 og fører til nedsatt NFκB-aktivitet. Noen pVHL missense mutanter som er forbundet med nyrekreft beholder dog evnen til å regulere Card9. (1, 20)

p53 interagerer også med pVHL. Dette muliggjør stabilisering av p53, ved å supprimere Mdm2 (murine double minute 2)-mediert ubiquitineringsmekanisme. (1, 15, 27) pVHL binder seg i tillegg direkte til p53 og dets protein kinase ATM (ataxia telangiectasia mutated), noe som fremmer dannelsen av et kompleks som stabiliserer p53. Tap av pVHL hindrer denne stabiliseringen. (13, 15)

Det har på den annen side også blitt publisert resultater på at pVHL kun har en neglisjerbar effekt på ekspresjon av p53. (27, 52). Det trengs mer forskning på dette feltet for å avklare hva som foregår mellom p53 og pVHL. (15, 52)

Disse to observasjonene kan være noe av forklaringen på den sterke resistansen hos nyrecancere mot kjemoterapeutika. (1)

Jade-1

pVHL stabiliserer proteinet Jade-1. Ved mutasjoner i VHL forstyrres interaksjonen mellom de to proteinene, og det kan være assosiert med en økning i nyrekreftrisiko. Jade-1 er sannsynligvis et nyre tumor suppressor protein, siden det hos mus har vist å hemme nyrecellekreftevekst og tumordannelse. Forholdet mellom Jade-1 og pVHL er ikke klarlagt fullstendig. (27, 45)

TGF-α, EGFR, Akt-1 og MEK-1

EGFR er et medlem av erbB familien av transmembran reseptor tyrosin kinase, som er involvert i celledivisjon, motilitet og overlevelse. EGFR kan bli aktivert av flere ligander, inkludert TGF-α. Multiple studier har vist en overekspresjon av både TGF-α og EGFR reseptor hos RCC celler, sammenliknet med normalt nyrevev. (1, 14, 27, 53)

Hos sporadiske RCCs ser man at VHL-defekte celler har et økt nivå av HIF, som igjen fører til TGF-α-ekspresjon og EGFR autokrin signalering. Tumor hypoksi, uavhengig av tap av VHL-gen-funksjon, øker EGFR ekspresjon gjennom early response factor 1 (Egr-1). (53) HIF-2α-indusert celledivisjon er primært forårsaket av denne pathway. (13)

Akt-1 er en serin/threonin kinase som aktiverer phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), som medierer diverse celle overlevelsessignaler via mTOR, en initator av apoptose via caspase-9, NF- κ B, og "forkhead". (13, 53) Økt Akt-1 har blitt korrelert med høy RCC tumor grade og metastaser.

MEK-1 er et medlem av den ekstracellulære signalregulerte kinase (ERK) serin/threonin kinase familien som medierer diverse cellulære prosesser inkludert proliferasjon, overlevelse, differensiering, og motilitet hos såvel normale celler som cancerceller. (53)

Ved å senke VHL-defekte RCC cellers ekspresjon av enten EGFR, Akt-1 eller MEK-1, kan man se at cellene er avhengig av alle tre faktorer for vekstfaktor-indusert invasjon av ECM og for aggressiv tumor vekst. Alle de tre proteinene bidrar signifikant til celleproliferasjon. Hver av disse signaleringskomponentene er en kritisk onkogenisk effektor ved RCC, nesten eller helt på lik linje med VHL og HIF-2 α .

EGFR knockdown kan muligens forsinke, men ikke supprimere tumorvekst totalt. Proliferasjon og invasjon blir dog inhibert. Man har funnet partiell regresjon av RCC-celler hos RCC tumor xenograft etter systemisk behandling av dyr med PI3K familie-inhibitoren LY294002. Det kan se ut til at både Akt-1 og MEK-1 er av viktigere betydning enn EGFR. (53)

85% av humane RCCs viser overekspresjon eller uadekvat aktivering av EGFR. (13)

Neste avsnitt tar for seg primærcilier, som er nødvendig for bl.a normal cytoarkitektur og celleproliferasjon. (1)

PRIMÆRCILIER

Primær ciliet er en hårlignende spesialisert struktur på celleoverflaten som har en viktig rolle i transduksjon av både kjemiske og mekaniske signaler. (1, 42) Det overfører bl.a kalsium-medierte intracellulære signaler etter mekanisk bøyning. Disse kalsiumsignalene er trodd å skulle regulere cytoarkitektur og cellulær proliferasjon av nyretubuliceller, i respons til urinflow. (15, 20, 27, 42) Opprettholdelse av primærciliets struktur er mediert av en bidirektoral cargoprosess kalt intraflagellær transport. Denne prosessen er meget energikrevende. Av denne grunn kan man tenke seg at aktivering av HIF-1 α ved hypoksi (og hos pVHL-negative celler) kunne forårsake nedregulering av flagellær transport som ledd i en energisparende strategi. (42)

Ved hjelp av immunohistokjemi (farging for acetyleret α -tubulin) finner man hos normale nyretubuliceller primærcilier inn mot lumen. Derimot får man intet utslag ved farging hos nyretubuliceller fra nyrecyster hos VHL pasienter. Suppresjon av HIF-1 α reetablerer cilieformasjon hos pVHL-negative celler.(42) VHL regulerer primærciliet trolig ved å binde seg til kinesin 2. Også HIF-uavhengige mekanismer spiller en rolle.(1, 15) Type 1 og type 2A mutanter har ikke evne til å opprettholde primærciliet, mens type 2B mutanter kan dette.(1, 20)

Det har blitt økende bevissthet rundt at primærciliet, som tidligere ble oppfattet som en cellulær kuriositet, har en aktiv rolle i å organisere cancer-relevante signaleringsmolekyler og i å opprettholde cellens polaritet. Tap av primærciliet kan være ansvarlig for den økte aktiveringen av β -catenin. (1, 15)

Tap av cilie-funksjon i nyren fører til eksessiv proliferasjon av tubulære epitelceller, dannelse av væskefylte cyster og nyresvikt. (27)

pVHL binder seg til Par3-Par6-atypisk PKC polaritetskompleks, som har en viktig rolle i orienteringen av mikrotubulivekst.(13, 20, 27, 42) Det har også blitt vist at fosforylering av pVHL utført av GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) inhiberer den positive reguleringen av ciliogenese utført av pVHL. I tillegg skjer tap av cilier etter VHL inaktivering bare når GSK3 β er inaktivert av fosforylering, noe som tyder på at GSK3 β har kapasitet til å fremme ciliogenese uavhengig av pVHL. I følge denne modellen vil dannelsen av nyrecyster være avhengig av GSK3 β inaktivering, fulgt av pVHL tap. (1, 20, 27, 43)

Når GSK3 er inaktiv faller ansvaret for å stabilisere mikrotubuli og opprettholde primærciliet på pVHL.(1, 20)

Til slutt i resultatdelen av denne oppgaven skal vi se på noen litt mindre utforskede, mulige molekylære forklaringsmodeller når det gjelder von Hippel Lindaus syndrom og utviklingen av nyrekreft.

ANDRE SIGNALERINGSMEKANISMER

Epo OG EpoR

En umiddelbar reaksjon på hypoksi er forandring i ionekanalers konduktans. Senere vil det foregå en adaptasjon, som innebærer en endring i genekspresjon og proteinsyntese. EPO-produksjonen kan bli oppregulert mer enn 100 ganger i nyre og lever iløpet av kun få timer med hypoksi.(7) Inaktivering av VHL hos mus fører til økte EPO-nivåer og polycytemi. (2, 43)

Immunokjemiske analyser av klarcellet epitel i VHL-assosierte RCC viser koekspresjon av Epo og EpoR i cytoplasma hos alle de maligne tumorene, samt hos storparten av de benigne nyrecystene.(30)

Ekspresjon av Epo i RCC og nyrecyster kan være et resultat av VHL gen-defekt gjennom HIF-1-pathway.(30, 43)

Epo/EpoR koekspresjon er foreslått å sette i gang en autokrin stimulering. (30)

HDM2

HDM2 er en E3 ubiquitin ligase som bl.a regulerer stabiliteten til tumor suppressoren p53. HDM2 interagerer i tillegg med en rekke ulike faktorer i å påvirke RNA biosyntese, DNA syntese, cellesyklus-kontroll, transkripsjon og reseptorregulering på celleoverflater.

HDM2 er nødvendig for normoksisk ekspresjon av HIF-1 α og HIF-2 α hos ccRCC-celler. HDM2 regulerer også de angiogentiske faktorene VEGF, PAI-1 og ET-1, uavhengig av HIF- α og p53. (52) VEGF er in vitro et mitogen spesifikt for endotelceller og induserer angiogenese, både ved dannelse av arterier, vener og lymfeårer.(VEGF refererer vanligvis til VEGF-A) Det regulerer også blodårepermeabilitet, endotelcelle-aktivering, -overlevelse, -proliferasjon, -invasjon og -migrasjon. Mange ulike tumor-typer sekreterer nettopp VEGF, og ved VHL-inaktivering ser man overekspresjon av VEGF i ca 80% av ccRCC-tilfellene. (48)

pVHL regulerer VEGF negativt, ved at VEGF er et HIF target gen. Nyretubuliceller er spesielt sensitive for den mitogene effekten av dette proteinet. (14) Men i den tidlige tumorgenese er muligens ikke neovaskularisasjon av kritisk betydning. (15)

PARATHYROID HORMON-RELATERT PROTEIN (PTHrP)

Parathyroid hormonet (PTHrP) er et polyprotein som er normalt uttrykt i hele kroppen, og har effekter slik som regulering av cellers vekst, differensiering og død. Mus med enten PTHrP eller PTH1 reseptor(PTH1R) knockout dør perinatalt. (18)

PTHrP er uttrykt i 95% av ccRCC hos mennesket, og ekspresjonen er signifikant økt sammenliknet med normale celler. Flere studier tyder på at PTHrP er involvert i ccRCC vekst og invasjon. PTHrP/PTH1R virker som en essensiell vekst- og overlevelsesfaktor for ccRCC, både in vitro og in vivo. (18)

Trolig er PTHrP et pVHL-target ved at pVHL regulerer PTHrP-ekspresjon på post-transkripsjonelt nivå. pVHL supprimerer endogent PTHrP mRNA- og proteinnivåer. Om pVHL regulerer PTHrP direkte er uklart.(18)

HETERONUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN A2 (hnRNP A2)

hnRNP A2 binder seg til et instabilitets-element på GLUT-1 3'-UTR, som spiller en rolle i den post-transkripsjonelle reguleringen av GLUT-1-ekspresjon (GLUT-1, Glukosetransporter 1). (15, 16, 24) Det kan tyde på at overekspresjon av hnRNP A2 kan være skyld i endringen i GLUT-1 mRNA turnover som er assosiert med fravær av pVHL.(24) En økning i GLUT-1 fremmer anaerob metabolisme.(43)

hnRNP A2 danner også kompleks med hnRNP L og medvirker til stabilisering av VEGF mRNA. Hvis hnRNP A2-nivået stiger over en terskelverdi kan det muligens resultere i renal carcinogenese. (24)

HGF/SF og HNF-1 α

HGF/SF er en multipotent modulator av diverse biologiske aktiviteter hos såvel normale celler som kreftceller. Gjennom Met tyrosin kinase reseptor virker HGF/SF som et mitogen. HGF/SF stimulerer cellemotilitet og invasjon, virker som en angiogenetisk faktor både in vitro og in vivo, og deltar som et morfogen ved lumenformasjon og tubulogenese i ulike typer epitelceller. Met og HGF/SF har blitt implisert ved mange humane cancere, og det har blitt vist at Met-HGF/SF signalering har induisert invasjon in vitro og metastatiske egenskaper in vivo. (46)

VHL inhiberer HGF/SF-mediert grenet morfogenese og in vitro invasivitet hos RCC celler.(46)
Inaktivering av VHL fremmer fosforylering av c-Met hos ccRCC. (15, 43)

Invasjon, både basal nivå og HGF/SF mediert, er signifikant høyere hos VHL-negative RCC celler. (15, 28, 46) HGF/SF øker i tillegg onkogen β -catenin signalering. (15, 43)

Aktivering av Hepatocyte growth factor receptor (HGFR) aktivering har vært forbundet med en epitelial til mesenkymal transisjon (EMT). (1) Det er usikkert om HGFR er HIF-avhengig. (1, 15)

VHL ekspresjon og høy celletetthet medierer også oppreguleringen av HNF-1 α , en transkripsjonsaktivator som er nødvendig for ekspresjonen av gener viktige for modningen og opprettholdelsen av proksimale tubuli. HNF-1 α funksjon er tapt hos de fleste RCCs.(47)

DISKUSJON OG KONKLUSJON

Innledningsvis stilte jeg meg selv noen spørsmål angående dette fascinerende syndromet. Min største interesse var å finne ut hva som gjør at disse pasientene er predisponert for svulstutvikling i nyrene. Med denne oppgaven mener jeg å ha belyst sentrale mulige molekylærbiologiske forklaringsmodeller på nettopp dette.

Et av spørsmålene jeg ble sittende igjen med er hva som er forskjellen på pVHL19 og pVHL30 når det gjelder funksjon. Er det mulig at bare ett av proteinene blir dysfunksjonelt; hva skjer evt da? Og er en celle avhengig av at begge proteinene fungerer optimalt? I dag vet man at disse to proteinene har noe overlappende funksjon, men at de befinner seg primært i ulike compartments i cellen. Dette kunne da tyde på at det var noe som skilte dem i funksjon. (14)

Den best karakteriserte signaleringsvei er rollen pVHL har i reguleringen av Hypoxia Inducible Factor(HIF). Det kan se ut til at det også er den forklaringsmodellen som er av størst betydning. Til tross for dette er ikke alt om HIF og pVHL klarlagt. Underveis dukket det opp flere spørsmål hos meg som jeg ikke har kunnet finne svar på i de ulike artiklene. For det første ble jeg presentert for at HIF styrer transkripsjonen av 100-200 gener; i løpet av min lesning har jeg kun fått en håndfull ulike målgener beskrevet. Er det da fordi man ikke kjenner alle genene, eller fordi de fleste ikke er av betydning for tumorgenese? Det råder også usikkerhet angående HIF-1 α s rolle i tumorgenese; om det er av inhibitorisk eller stimulerende art. Stabil ekspresjon av HIF-2 α er til kontrast bevist å skulle være et kritisk aspekt av tumorgenesen ved nyrecancer. Supprimering av HIF-2 α er tilstrekkelig for å hindre tumorgenese. (1, 15, 16, 20, 23, 35, 37, 43) Men renal carcinogenese kan ikke forklares med økt HIF signalering alene. (45) Ikke nok med det, i tillegg er de noe overlappende og antagonistiske effektene av HIF-1 α og HIF-2 α dårlig forstått. Man vet heller ikke fullt ut hva slags funksjon de ulike HIF-3 α variantene har, annet enn at transkripsjonell aktivering utført av HIF-3 α ikke har blitt godt dokumentert, og at noen klart inhiberer HIF-avhengig transkripsjonell aktivering. (1) Hva betyr dette for vår viten? Og hva betyr dette for klinisk anvendelse av basalkunnskapen?

De genene som blir beskrevet som HIF-målgener er alle interessante i den betydning at en oppregulering av disse fremmer cellers mulighet til å vokse og spre seg via ulike signaleringsveier.(1, 2) HIF regulerer bl.a gener som koder for proteiner som er ansvarlig for å regulere glukoseopptak og metabolisme, eksempelvis GLUT-1, 6-phosphofruktokinase 1 og pyruvat dehydrogenase kinase. I artiklene er nesten utelukkende GLUT-1 beskrevet. En oppregulering av GLUT-1 fremmer anaerob metabolisme, noe som gjør cellene mer motstandsdyktige og i lavere grad oksygen-avhengige. (1, 43) Dette er utvilsomt meget fordelaktig ved tumorgenese. Ved tap av pVHL-funksjon oppreguleres i tillegg hnRNP A2, som spiller en rolle i den post-translasjonelle reguleringen av GLUT-1. (24) Vi ser altså at det parallelt eksisterer ulike mekanismer bak GLUT-1-oppreguleringen ved tap av pVHLs normalfunksjon. Interessant er det å merke seg at man i tumorvev fra hjerne har vist at hnRNP A2 binding til GLUT-1 mRNA er korrelert med økt

mRNA turnover, i motsetning til det man finner hos RCC-celler. Dette kan reflektere vevsspesifikke forskjeller. (24) Det skulle heller ikke overraske om andre signaleringveier også er involvert i denne oppreguleringen av proteiner viktige for metabolisme.

Andre viktige proteiner for tumorgense som vi ser oppregulert ved VHL syndrom er VEGF. Øket angiogenese er nødvendig for vekst og metastasering hos solide tumorer som er over noen få kubikkmillimeter i størrelse. (38) Også her spiller hnRNP A2 en rolle, i samarbeid med hnRNP L, ved at komplekset stabiliserer VEGF mRNA. (24) VEGF er i tillegg et mål for HIF; og det er denne mekanismen som oftest nevnes i forbindelse med VHL syndrom. (14) HDM2 regulerer VEGF, samt de angiogenetiske faktorene PAI-1 og ET-1, dette uavhengig av HIF- α . HDM2 er i tillegg nødvendig for normoksisk ekspresjon av HIF-1 α og HIF-2 α hos ccRCC-celler. (52) Overekspresjonen av VEGF og PDGF er trolig ansvarlig for den observerte hypervaskulariteten hos VHL-assosierte tumores. (14) HGF/SF er medansvarlig for den økte angiogenesis. (46) VEGF trigger en angiogenetisk respons som fører til proliferasjon, migrering og overlevelse hos endotelceller. (38) Hos mus har man vist at en induert overekspresjon av VEGF er tilstrekkelig for utvikling av hemangioblastom-liknende lesjoner i CNS. (14) Andre forskere sier at VEGF ekspresjon og sekresjon ikke er tilstrekkelig for å fremme og opprettholde angiogenese med mindre det forekommer i kombinasjon med en feilaktig remodelert ECM. (38, 43)

Ulike forklaringsmodeller bringes frem ved forsøk på å forklare nettopp denne forstyrrede ECM-strukturen man ser ved bilallelisk mutert VHL. Et dysfunksjonelt pVHL fører til økte nivåer av enzymer som bryter ned proteiner i ECM. Eksempler er MT1MMP, MMP 2 og MMP9 (31, 35) I tillegg viser cellene lavere nivåer av TIMPs, inhibitorene til MMPs. (14, 46)

Mens RCC-celle invasjon av kollagen IV og laminin muligens er HIF-uavhengig, medierer HIF-2 α invasjon av type I kollagen gjennom regulering av MT1-MMP. (35) En oversiktsartikkel gir motsatte beskrivelser av de ovennevnte fakta. (6) Jeg velger å tro at dette ikke er korrekt, da ingen andre kilder støtter dette, samt at det er særdeles kort beskrevet i artikkelen.

pVHL har en viktig rolle i opprettholdelsen av ECM ved at det binder seg til fibronektin og kollagen IV; dette fører til nedsatt evne til invasivitet in vitro, samt nedsatt angiogenese og tumorgenese in vivo. (1, 27, 38, 43) pVHL er i tillegg viktig for opprettholdelse av integrinfunksjon. (1, 16) Ved ødeleggelse av ECM-struktur vil vekstfaktorer som er bundet til ECM-proteiner løslates og slik fremme vekst og invasjon. (38, 43) Måten pVHL samler ECM på er dårlig forstått. Bl.a diskuteres det hvordan pVHL binder seg til fibronektin og kollagen IV, og hvordan dette fører til et velorganisert ECM. (38) I tillegg kan man ved å senke VHL-defekte RCC cellers ekspresjon av enten EGFR, Akt-1 eller MEK-1 se at cellene er avhengig av alle tre faktorer for vekstfaktor-indusert invasjon av ECM og for aggressiv tumor vekst. Hver av disse signaleringskomponentene er en kritisk onkogenisk effektor ved RCC, nesten eller helt på lik linje med VHL og HIF-2 α . (53)

Ved fravær av eksogen matrix blir VHL-positive celler runde og samler seg i clustre, mens VHL-negative celler blir forgrenede og vokser spredt. (47)

Tap av pVHL-funksjon medfører tap av adhesjonsmolekylet E-cadherin, som i sin tur fremmer cellenes mulighet for å løsrive seg fra naboceller. Tap av E-cadherin er i tillegg et kjennetegn ved epitelial-mesenkymal transisjon (EMT). (1, 15, 23, 28, 43) Det har også en funksjon i beta-catenin signalering og Wnt signalerings-pathway, og oppregulerer via disse gener ansvarlig for proliferasjon og differensiering (bl.a MMPs og CyclinD1) (28, 43) Den VHL-medierte reguleringen av E-cadherin er trolig både HIF-avhengig og HIF-uavhengig. (15) Det beskrives at ccRCC-celler med defekt VHL har økt ekspresjon av repressorer som binder seg til E-cadherin promotoren, men hvordan HIF medvirker til denne økningen får jeg ikke tak i. (23, 28) Det kan se ut som det ikke er avklart.

Når det gjelder kontroll av cellesyklus vil man ved VHL syndrom få en nedregulering av p27, og oppregulering av cyclin D1. Cellene vil av denne grunn mislykkes i å tre ut av cellesyklus, bl.a ved serum deprivasjon. (6, 14, 20, 48) Det råder noe usikkerhet om HIF regulerer CyclinD1 eller ikke. (33) Om oppreguleringen av cyclinD1 alene etter tap av VHL er tilstrekkelig for carsinogense er også usikkert. (16, 33) pVHL er også viktig i forbindelse med apoptose, både hos normale og abnormale celler. Når ccRCC-celler med mutert VHL utsettes for cellulært stress fremviser de i høyere grad økning av caspase 9 og utslipp av cytochrome c enn normale celler. Ved reintroduksjon av VHL senkes disse nivåene, nivåene av antiapoptotiske Bcl-2 og Bcl-xL økes, og stabilisering av p21 og p27 finner sted. Slik beskyttes de mot den økte sensitiviteten for apoptose de i utgangspunktet hadde ervervet. Det kan på den annen side tenkes at VHL-mutasjon kan føre til seleksjon av celler som kan unnsnippe apoptose, som igjen kan bidra til cancerutvikling. Hvordan reintroduksjonen av VHL fører til oppregulering av Bcl-2 og Bcl-xL er ikke fullstendig klarlagt. Det er mulig at VHL regulerer transkripsjonen eller degraderingen av Bcl-2(50) Andre faktorer involvert i overlevelse og mislykket DNA-reparasjon er p53, NFκB og Jade-1. Mer forskning må til for å klarlegge disses interaksjoner med pVHL og relevans ved VHL syndrom. (1, 15, 27, 45, 52)

Et annet aspekt som er nokså velstudert, er tap av primærcilier hos celler med defekt pVHL. Primærciliene regulerer cytoarkitektur og cellulær proliferasjon av nyretubuliceller i respons til urinflow. (15, 20, 27, 42) De har også en aktiv rolle i å organisere cancer-relevante signaleringsmolekyler og i å opprettholde cellens polaritet. Tap av primærciliet kan være ansvarlig for den økte aktiveringen av β -catenin man ser ved VHL syndrom. (1, 15) Tap av cilie-funksjon i nyren fører til eksessiv proliferasjon av tubulære epitelceller, dannelse av væskefylte cyster og nyresvikt. (27) Hvordan VHL regulerer primærciliet er uklart. Det er uklart om det er HIF-avhengig eller ikke; trolig er det i hvert fall delvis HIF-uavhengig (1, 42) Det er vist at suppresjon av HIF-1 α hos VHL-muterte ccRCC-celler gjenoppretter ciliene. (42)

Andre faktorer beskrevet er PTHrP, som har betydning for vekst og invasjon hos ccRCC-celler, og HNF-1 α , som er en transkripsjonsaktivator nødvendig for ekspresjonen av gener viktige for modningen og opprettholdelsen av proksimale tubuli. PTHrP er uttrykt i 95% av ccRCC hos mennesket, mens HNF-1 α

funksjon er tapt hos de fleste RCCs.(18, 47)

Interessant er også genotype-fenotype korrelasjonen man ser ved VHL syndrom. Dette er grunnlaget for at syndromet inndeles i ulike subtyper. Avhengig av hvor mutasjonen sitter og hva slags mutasjon det er, har man ulik risiko for å utvikle de forskjellige typene tumores. De ulike mutasjonene medfører molekylære defekter karakteristisk for hver av subtypene. (54) En inngående beskrivelse av dette temaet faller utenfor denne oppgaven.

Hvorfor tumorene hos VHL-pasienter opptrer kun i spesifikke organer fant jeg ikke noe svar på, og slik jeg har oppfattet det finnes det heller ingen fasit på det. VHL-genet er et tumor suppressor gen, og man skulle tro det hadde lik funksjon i alle celler. Kan det være at det er av større viktighet blant enkelte typer celler?

Angående opphavet til ccRCC-cellene, proksimale eller distale tubuli, eksisterer det ulike meninger. Det samme gjelder spørsmålet om ccRCC kan utvikle seg fra nyrecyste, og om cystene kan utvikle malignitet. (3, 8, 23)

Andre ubesvarte spørsmål som dukket opp hos meg underveis var bl.a hvorfor det ikke finnes internasjonale guidelines for screening, samt om alle pasienter med hemangioblastom eller ccRCC blir screenet for VHL syndrom.

VHL/pVHL har altså mange funksjoner, og som ansvarlig for tumorgenese ser vi at det eksisterer mange ulike molekylærbiologiske forklaringsmodeller. Det gjenstår en del uklarheter, og det er sikkert også en del mekanismer som ennå ikke er studert. En av de største utfordringene er hvordan man skal benytte seg av denne kunnskapen i klinikken. Kan det være at man kan bruke denne viten som angrepspunkt for nye medikamenter? Behandlingen av nyrekreft er som tidligere beskrevet først og fremst kirurgi, da nyrekreft er kjemoresistent. (9, 10, 11)

Av de mange typene immunoterapi som har blitt testet har bare interferon- α vist å bedre sjansen for å overleve ett år. Interferon- α blir gitt som en injeksjon under huden, vanligvis 3 ganger i uken. 4 studier på 644 pasienter har vist at denne behandlingen, sammenliknet med kontrollterapi, har redusert risikoen for død iløpet av ett år med 46% og død i løpet av 2 år med 36%. (11) Sannsynligheten for at tumor skal krympe med denne behandlingen er dog lav; partiell remisjon ses hos 12,5% av pasientene. Interferon- α -behandlig er trygt, men forårsaker et væmmelig influensa-liknende syndrom av variabel alvorlighetsgrad. Man har prøvd å legge til andre medikamenter for å øke responsraten, uten særlig suksess; med muligens unntak av cis-retinoinsyre, men dette gav til gjengjeld lavere livskvalitet hos pasientene. Ved nyrekreft med synlig spredning er den så langt beste behandling å fjerne den affiserte nyren, for deretter å gi interferon- α . Dette øker den gjennomsnittlige overlevelsen med 6 mnd. (11)

mTOR kinase spiller en kritisk rolle ved transkripsjonen og translasjonen av HIF-1 α . VHL-negative celler viser økt sensitivitet for mTOR inhibitorer i prekliniske modeller, og 2 rapamycin-liknende mTOR inhibitorer, temsirolimus og everolimus, har demonstrert aktivitet ved kliniske studier på nyrecancer. (1, 16, 20) Sammenliknet med INF- α har temsirolimus gitt venøst 1 gang pr uke vist å bedre gjennomsnittlig overlevelse fra 7,3 til 10,9 mnd. Denne studien ble gjort på pasienter med kliniske trekk som predikerte dårlig prognose. (9)

Erfaring har vist at VEGF-inhibitorer kan indusere symptomatisk bedring ved retinale og CNS hemangioblastomer, og muligens stabilisering av sykdom. Nøytraliserende antistoffer mot VEGF, samt flere småmolekylære inhibitorer mot VEGFs reseptor KDR, har også vist signifikant aktivitet mot ccRCC når det gjelder objektiv tumorskrumpning og sykdomsstabilisering. (1, 16, 20) Denne effekten ser ut til ikke å være begrenset til pVHL-defekte ccRCC-celler.(20) To av disse medikamentene, sunitinib og sorafenib, har blitt godkjent av "Food and Drug Administration" i USA for denne indikasjonen. (1, 16, 20) En studie gjort på en uselektert pasientgruppe prognostisk sett, viste at sunitinib daglig pr os resulterte i store remisjoner og utsatte forverrelsen av canceren. Det har vist høyere livskvalitet sammenliknet med standard INF- α behandling. Det er for tidlig å si om det har noen innvirkning på overlevelse. En annen studie viste liknende resultater for kombinasjonen bevacizumab/INF- α . Det beste outcome for pasienter som hadde mottatt medikamentell terapi tidligere ble sett med sorafenib pr os. Det utsatte sykdomsforverrelsen og gav bedre symptomkontroll enn placebo. (9)

Det finns ingen studier hvor de sammenlikner høy-dose Interleukin-2 (IL-2) med ikke-immunoterapi-kontroll. Høydose IL-2 er ekvivalent med lavdose IL-2 kombinert med INF- α , men denne kombinasjonen har en høyere grad av toksisitet sammenliknet med INF- α alene. Studiene som har sett på immunoterapi ved nyrekreft er dessverre ofte gjort på små pasientpopulasjoner, noe som gjør det vanskelig å trekke konklusjoner. (11)

Både histon deacetylase (HDAC) inhibitorer og heat shock protein 90 (HSP 90) inhibitorer har blitt rapportert å nedregulere HIF-1 α i fravær av pVHL. HDAC inhibitorer og HSP90 inhibitorer fremmer pVHL-avhengig degradering av HIF-1 α . HSP90 inhibitorer affiserer også proteiner involvert i nyrecarcinogenese, inkludert cyclinD1, c-Met og EGFR. Resultater med første generasjons HSP90 inhibitorer i klinikken har dessverre vært skuffende. Inhibitorer av EGFR har også vist skuffende resultater i klinisk arbeid. (20)

Forhåpentligvis vil de nye medikamentene komme til å gi bedre outcome for denne medikamentell-resistente tilstanden. Men mye mer klinisk forskning på området kreves. (9) Så lenge mange av signaleringsmekanismene ikke er fullstendig klarlagt er det logisk å tenke seg at det også vil være noe problematisk å forsøke å lage medikamenter som angriper spesifikt.

Så til slutt litt kritikk av mine utvalgte kilder. Én svakhet ved mitt søk i PubMed var at det kanskje ikke var godt nok avgrenset, i.o.m. mine mange treff. Det at jeg da manuelt måtte sitte og vurdere hver enkelt ut i fra deres abstrakt kan ha medført til en viss grad av subjektivitet. På denne måten kan jeg også ha gått glipp av relevante studier.

De fleste av mine enkeltartikler har velbeskrevne metode-avsnitt, bortsett fra et editorial comment og en artikkel fra Medical Hypothesis. Få oversiktsartikler inneholder metodeavsnitt, hvilket nok betyr at forfatterne har valgt den siterte litteratur ut fra eget skjønn. Det kan tenkes at dette medfører en skjev fremstilling av fakta - man kan ikke vite om alle relevante artikler er funnet.

KILDER

- 1 Kaelin William G. Jr, The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O2 sensing and cancer, Nature reviews Cancer 2008; 8: 865-873
- 2 Lonser Russell R, Glenn Gladys M, Walther McClellan et. al., von Hippel-Lindau disease, The Lancet 2003; 361: 2059-2067
- 3 Shehata Bahig M, Stockwell Christina A., Castellano-Sanchez Amilcar A. et .al., von Hippel-Lindau (VHL) Disease, Adv Anat Pathol 2008; 15: 165-171
- 4 Hansel Donna E, Rini Brian I, Molecular genetics of hereditary renal cancer: new genes and diagnostic and therapeutic opportunities, Expert Rev. Anticancer Ther. 2008; 8(6): 895-905
- 5 Richard Stéphane, Graff Joyce, Lindau Jan et. al., Von Hippel Lindau disease, The Lancet 2004; 363: 1231-1234
- 6 Sufan Roxana I, Jewett Michael A.S., Ohh Michael, The role of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and hypoxia in renal clear cell carcinoma, Am J Physiol Renal Physiol 2004; 287: F1-F6
- 7 Wiesener Michael S, Eckardt Kai-Uwe, Erythropoietin, tumours and the von Hippel-Lindau gene: towards identification of mechanisms and dysfunction of oxygen sensing, Nephrol Dial Transplant 2002; 17: 356-359
- 8 Paraf F, Chauveau D, Chrétien Y et. al., Renal lesions in von Hippel-Lindau disease: immunohistochemical expression of nephron differentiation molecules, adhesion molecules and apoptosis proteins, Histopathology 2000; 36: 457-465
- 9 Coppin Chris, Le Lyly, Porzolt Franz, et. al., Targeted therapy for advanced renal cell carcinoma, The Cochrane Collaboration 2008
- 10 Rini Brian I, Campell Steven C, Escudier Bernard, Renal Cell Carcinoma, The Lancet 2009; 373: 1119-1132
- 11 Coppin Chris, Porzolt Franz, Autenrieth Michael, et. al., Immunotherapy for advanced renal cell cancer, The Cochrane Collaboration 2004

- 12 Øilo, Marit, Translajonsforskning - overføring av kunnskap fra ett felt til et annet, *Nor Tannlegeforen Tid* 2005; 115: 586-8
- 13 Siroky Brian J, Czyzyk-Krzeska Maria F, Bissler John J, Renal involvement in tuberous sclerosis complex and von Hippel-Lindau disease: shared disease mechanisms?, *Nature Clinical Practice nephrology* 2009; 5: 143-156
- 14 Kim William Y., Kaelin William G, Role of VHL Gene Mutation in Human Cancer, *Journal of Clinical Oncology* 2004; 22: 4991-5004
- 15 Kaelin William G Jr, The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: An update, *Methods in Enzymology* 2007; 435: 371-379
- 16 Kaelin William G Jr, von Hippel Lindau Disease, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2007; 2: 145-158
- 17 Shuin Taro, Yamasaki Ichiro, Tamura Kenji et. al., Von Hippel-Lindau Disease: Molecular Pathological Basis, Clinical Criteria, Genetic Testing, Clinical Features of Tumours and Treatment, *Jpn J Clin Oncol* 2006; 36(6): 337-343
- 18 Massfelder Thierry, Lang Herve, Schordan Eric, et. al., Parathyroid Hormone-Related Protein Is an Essential Growth Factor for Human Clear Cell Renal Carcinoma and a Target for the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene, *Cancer Research* 2004; 64: 180-188
- 19 Smits Kim M, Schouten Leo J, van Dijk Boukje A.C., et. al., Genetic and Epigenetic Alterations in the von Hippel-Lindau Gene: the Influence on Renal Cancer Prognosis, *Clin Cancer Res* 2008; 14(3): 782-787
- 20 Kaelin William G. Jr, Treatment of Kidney Cancer, *Cancer* 2009; 115: 2262-2272
- 21 Shelley Mike, Gillatt David, Nabi Ghulam, et. al., Surgical management of localised renal cell carcinoma, *The Cochrane Collaboration* 2007
- 22 Meister M, Choyke P, Anderson C et. al., Radiological evaluation, management, and surveillance of renal masses in Von Hippel-Lindau disease, *Clinical Radiology* 2009; 64: 589-600
- 23 Esteban Miguel A, Tran Maxine G.B., Harten Sarah K, et. al., Regulation of E-cadherin Expression by VHL and Hypoxia-Inducible Factor, *Cancer Res* 2006; 66: 3567-3575

- 24 Pioli Patrica A, Rigby William F.C., The von Hippel-Lindau Protein Interacts with Heteronuclear Ribonucleoprotein A2 and Regulates Its Expression, *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 40346-40352
- 25 Kaelin William G. Jr, The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene and Kidney Cancer, *Clinical Cancer Research* 2004; 10: 6290-6295
- 26 Sudarshan Sunil, Linehan W. Marston, Genetic Basis of Cancer of the Kidney, *Semin. Oncol* 2006; 33: 544-551
- 27 Nyhan Michelle J., O'Sullivan Gerald C., McKenna Sharon L., *Biochemical Society Transactions* 2008; 36: 472-478
- 28 Russell Ryan C, Ohh Michael, The Role of VHL in the Regulation of E-Cadherin, *Cell Cycle* 2007; 6:56-59
- 29 Knauth K, Bex C, Jemth P, et. al., Renal cell carcinoma risk in type 2 von Hippel-Lindau disease correlates with defects in pVHL stability and HIF-1 α interactions, *Oncogene* 2006; 25: 370-377
- 30 Lee Youn-Soo, Vortmeyer Alexander O., Lubensky Irina A., et. al., Coexpression of Erythropoietin and Erythropoietin Receptor in Von Hippel-Lindau Disease-Associated Renal Cysts and Renal Cell Carcinoma, *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 1059-1064
- 31 Petrella Brenda L, Lohi Jouko, Brinckerhoff Constance E, Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2 α in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma, *Oncogene* 2005; 24: 1043-1052
- 32 Reuter Christoph W. M., Morgan Michael A., Grünwald Viktor, et. al., Targeting vascular endothelial growth factor(VEGF)-receptor-signaling in renal cell carcinoma, *World J Urol* 2007; 25: 59-72
- 33 Baba Masaya, Hirai Syuiohi, Yamada-Okabe Hisafumi, Loss of von Hippel-Lindau protein causes cell density dependent deregulation of CyclinD1 expression through Hypoxia-inducible factor, *Oncogene* 2003; 22: 2728-2738
- 34 Sharifi Nima, Farrar William L, Perturbations in hypoxia detection: A shared link between hereditary and sporadic tumor formation?, *Medical Hypotheses* 2006; 66; 732-735

- 35 Petrella Brenda L, Brinckerhoff Constance E, Tumor cell invasion of von Hippel Lindau renal cell carcinoma cells is mediated by membrane type-I matrix metalloproteinase, *Molecular Cancer* 2006; 5: 66
- 36 Choi Ji-Woong, Park Sang Chul, Kang Gyeong Hoon, et. al., Nur77 Activated by Hypoxia-Inducible Factor-1 α Overproduces Proopiomelanocortin in von Hippel-Lindau-Mutated Renal Cell Carcinoma, *Cancer Research* 2004; 64: 35-39
- 37 Toschi A, Edelstein J, Rockwell P, et. al., HIF α expression in VHL-deficient renal cancer cells is dependent on phospholipase D, *Oncogene* 2008; 27: 2746-2753
- 38 Kurba Ghada, Hudon Valérie, Duplan Eric, et. al., Characterization of a von Hippel Lindau Pathway Involved in Extracellular Matrix Remodeling, Cell Invasion, and Angiogenesis, *Cancer Res* 2006; 66: 1313-1319
- 39 Krieg Marion, Haas Richard, Brauch Hiltrud, et.al., Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function, *Oncogene* 2000; 19: 5435-5443
- 40 Raval Raju R, Lau Kah Weng, Tran Maxine G, et. al., Contrasting Properties of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-Associated Renal Cell Carcinoma, *Molecular and cellular Biology* July 2005: 5675-5686
- 41 Mandriota Stefano J, Turner Kevin J, Davies Davis R, et.al, HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: Evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron, *Cancer cell* 2002; 2: 459-468
- 42 Esteban Miguel A, Harten Sarah K, Tran Maxine G, et. al., Formation of Primary Cilia in the Renal Epithelium Is Regulated by the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein, *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 1801-1806
- 43 Roberts Andrew M, Ohh Michael, Beyond the hypoxia-inducible factor-centric tumour suppressor model of von Hippel-Lindau, *Current Opinion in Oncology* 2008; 20: 83-89
- 44 Kumar, Abbas, Fausto et. al., *Robbins basic pathology* 8th edition, 2007, Saunders Elsevier
- 45 Kapitsinou PP, Haase VH, The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice, *Cell Death and Differentiation* 2008; 15: 650-659

- 46 Koochekpour Shahriar, Jeffers Michael, Wang Paul H, et. al., Molecular and cellular Biology 1999; 19: 5902-5912
- 47 Davidowitz Aliot J, Schoenfeld Alan R, Burk Robert D, VHL Induces Renal Cell Differentiation and Growth Arrest through Integration of Cell-Cell and Cell-Extracellular Matrix Signaling, Molecular and Cellular Biology 2001; 21: 865-874
- 48 Haase VH, The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease, Kidney International 2006; 69: 1302-1307
- 49 Cascón Alberto, Escobar Beatriz, Montero-Conde Cristina, et.al., Loss of the Actin Regulator HSPC300 Results in Clear Cell Renal Cell Carcinoma Protection in Von Hippel-Lindau Patients, Human Mutation 2007; 28(6): 613-621
- 50 Devarajan Prasad, De Leon Maryely, Talasazan Farahnaz, et. al., The von Hippel-Lindau Gene Product Inhibits Renal Cell Apoptosis via Bcl-2-dependent Pathways, The Journal of Biological Chemistry 2001, 276: 40599-40605
- 51 Gordeladze, Jan O., Kurshefte cellebiologi, medisin 2.semester, Universitetet i Oslo, Det medisinske fakultetet, 2002
- 52 Carroll Veronica A, Ashcroft Margaret, Regulation of Angiogenic Factors by HDM2 in Renal Cell Carcinoma, Cancer Res 2008; 68(2): 545-552
- 53 Lee Justin S, Lattouf Jean-Baptiste, Xanthopoulos Julie, et. al., Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene Loss in Renal Cell Carcinoma Promotes Oncogenic Epidermal Growth Factor Receptor Signaling via Akt-1 and MEK-1
- 54 Ong Kai Ren, Woodward Emma R, Killick Pip, et. al., Genotype-Phenotype Correlations in von Hippel-Lindau Disease, Human Mutation 2007; 28(2): 143-149