

## -Zusammenfassung-

Luise Eckardt  
Dr. med.

### **The developmental role of the prolyl hydroxylase 2 in the pathogenesis of pseudohypoxic pheochromocytomas**

Fach/Einrichtung: Physiologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Hugo H. Marti

Paragangliome (PGL) und Phäochromozytome (PCC) sind Tumore des autonomen Nervensystems, deren Pathogenese bis heute nicht vollständig geklärt ist. Während Phäochromozytome im Nebennierenmark auftreten, entwickeln sich Paragangliome in autonomen Ganglien außerhalb der Nebenniere. So treten sie zum Beispiel häufig im Glomus caroticum, einem in der Karotisbifurkation lokalisierten peripheren Chemorezeptor, auf. Die Tumore des autonomen Nervensystems haben eine starke erbliche Komponente, wobei ungefähr 40% mit einer Keimbahnmutation assoziiert werden (zusammenfassend erläutert in Buffet, *et al.* 2020). Genetische Analysen haben ~20 Genmutationen identifiziert, die für die Entwicklung von PGL/PCC prädisponieren und von denen ein großer Teil den Hypoxie Signalweg betrifft (Crona, *et al.* 2017; Lussey-Lepoutre, *et al.* 2018). Beispiele hierfür sind Genmutationen in der Isoform des Hypoxie Induzierbaren Faktors (HIF) *HIF-2 $\alpha$* , einem Transkriptionsfaktor mit zentraler Funktion in der Regulation der zellulären Antwort auf Hypoxie, Mutationen im von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgen (*VHL*), dessen Proteinprodukt den Abbau von HIF in einem Zustand adäquater Sauerstoffversorgung ermöglicht und Mutationen in der HIF Prolyl-Hydroxylase 2 (*PHD2*). *PHD2* ist die dominante Isoform des HIF regulierenden Enzyms PHD, welche als zentraler „Sauerstoffsensoren“ in Zellen des menschlichen Körpers gilt (Epstein, *et al.* 2001). All diese Mutationen führen zu einer konstitutiven Aktivierung von HIF- $\alpha$ , das daraufhin mit HIF- $\beta$  heterodimerisiert und als heterodimerer Transkriptionsfaktor die zelluläre Antwort auf Sauerstoffmangel initiiert (Bishop and Ratcliffe 2014). Der sich ergebende Phänotyp dieser Mutationen wird als

'pseudohypoxisch' bezeichnet, da diese Genmutationen den Zustand von Hypoxie ohne eigentlichen Sauerstoffmangel nachahmen.

Konditionelle Inaktivierung des *Vhl* Gens in Tierversuchen konnte bisher den menschlichen Phänotyp pseudohypoxischer Tumore des autonomen Nervensystems nicht widerspiegeln (Macias, *et al.* 2014). Allerdings zeigte sich, dass HIF Aktivierung durch konditionelle Deletion des *Phd2* Gens zu einer HIF-2 abhängigen Entwicklung von Glomus caroticum Tumoren führt (Fielding, *et al.* 2018). In Anbetracht der Gemeinsamkeiten des Gewebes des autonomen Nervensystems ist das Ziel dieses Projekts, den Einfluss einer Aktivierung des Hypoxie Signalwegs auf die Entwicklung von Nebennierenmarkstumoren zu untersuchen. Mit Hilfe konditioneller Deletion des *Phd2* Gens wurde das Nebennierenmark bezüglich Genexpression, Funktion und Morphologie analysiert und die Abhängigkeit von einer spezifischen HIF-Isoform untersucht.

Die Analyse von Genen, die bekannterweise in pseudohypoxischen Tumoren des autonomen Nervensystems dysreguliert sind, ergab ein PCC-ähnliches Genexpressionsprofil im Nebennierenmark von *Phd2<sup>fl/fl</sup>;THCre* Mäusen. Unter anderen zeigte sich eine bemerkenswerte Herunterregulierung von *Pnmt*, einem Gen, welches das Noradrenalin-zu-Adrenalin methylierende Enzym Phenylethanolamin *N*-Methyltransferase (PNMT) codiert. Damit übereinstimmend fand sich im Blutplasma dieser Mäuse ein verändertes Katecholaminverhältnis, welches erhöhte Werte für Noradrenalin und gleichzeitig erniedrigte Werte für Adrenalin zeigte. Interessanterweise wird ein solches verändertes Katecholaminverhältnis auch häufig in Patienten mit pseudohypoxischen Nebennierenmarkstumoren beobachtet. Weitere Analysen bezüglich der räumlichen Verteilung der Genexpression in Wildtyp-Mäusen zeigten eine binäre Verteilung von zwei sich kontrastierenden Zelltypen mit individuellen Genexpressionsprofilen: Die überwiegende Zellpopulation bestand aus differenzierten *Pnmt<sup>+</sup>/Hif-2 $\alpha$ <sup>-</sup>/Rgs5<sup>-</sup>* Zellen, während vereinzelte Zellballen aus weniger differenzierten *Pnmt<sup>+</sup>/Hif-2 $\alpha$ <sup>+</sup>/Rgs5<sup>+</sup>* Zellen gebildet wurden. *Phd2* Inaktivierung führte zu einer Verschiebung des Verhältnisses dieser zwei Populationen hin zu einem dominierenden Anteil undifferenzierter Zellen. Dies erklärte zum einen den beobachteten

generellen Verlust von *Pnmt* und zum anderen den noradrenergen Phänotyp in diesen Mäusen. Diese Änderungen im Genexpressionsprofil von *Phd2<sup>fl/fl</sup>;THCre* Mäusen waren begleitet von morphologischen Auffälligkeiten, die sich in TH<sup>+</sup>, ektopischen Zellen in der Nebennierenrinde und einer TH<sup>+</sup> Ganglion-ähnlichen extra-adrenalen Struktur äußerten. Sowohl die morphologischen als auch die Genexpressionsprofil Veränderungen waren abhängig von *Hif-2α*, aber nicht von *Hif-1α* und konnten nicht durch Inaktivierung von *Phd2* in erwachsenen Mäusen rekapituliert werden.

Zusammenfassend bietet diese Studie experimentelle Hinweise für die entscheidende Rolle des PHD2/HIF-2 Signalweges in der Pathogenese von pseudohypoxischen Nebennierenmarkstumoren und gibt Anlass zur Annahme, dass diese Tumore ihren Ursprung bereits während der Entwicklung des Nebennierenmarks haben. Diese Ergebnisse mögen dazu beitragen, die Physiologie pseudohypoxischer Tumore besser zu verstehen und eine sinnvolle Argumentationsbasis für die Behandlung von Patienten mit neu-entwickelten HIF-2α Antagonisten zu schaffen.

## References

- Bishop, T. and Ratcliffe, P. J. (2014). Signaling hypoxia by hypoxia-inducible factor protein hydroxylases: a historical overview and future perspectives. *Hypoxia (Auckl)* 2, 197-213, doi: 10.2147/hp.S47598.
- Crona, J., Taïeb, D. and Pacak, K. (2017). New Perspectives on Pheochromocytoma and Paraganglioma: Toward a Molecular Classification. *Endocr Rev* 38 (6), 489-515, doi: 10.1210/er.2017-00062.
- Epstein, A. C., Gleadle, J. M., McNeill, L. A., Hewitson, K. S., O'Rourke, J., Mole, D. R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M. I., Dhanda, A., Tian, Y. M., Masson, N., Hamilton, D. L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Schofield, C. J. and Ratcliffe, P. J. (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107 (1), 43-54, doi: 10.1016/s0092-8674(01)00507-4.
- Fielding, J. W., Hodson, E. J., Cheng, X., Ferguson, D. J. P., Eckardt, L., Adam, J., Lip, P., Maton-Howarth, M., Ratnayaka, I., Pugh, C. W., Buckler, K. J., Ratcliffe, P. J. and Bishop, T. (2018). PHD2 inactivation in Type I cells drives HIF-2alpha-dependent multilineage hyperplasia and the formation of paraganglioma-like carotid bodies. *J Physiol* 596 (18), 4393-4412, doi: 10.1113/jp275996.
- Lussey-Lepoutre, C., Buffet, A., Morin, A., Goncalves, J. and Favier, J. (2018). Rodent models of pheochromocytoma, parallels in rodent and human tumorigenesis. *Cell Tissue Res* 372 (2), 379-392, doi: 10.1007/s00441-018-2797-y.
- Macias, D., Fernandez-Aguera, M. C., Bonilla-Henao, V. and Lopez-Barneo, J. (2014). Deletion of the von Hippel-Lindau gene causes sympathoadrenal cell death and impairs chemoreceptor-mediated adaptation to hypoxia. *EMBO Mol Med* 6 (12), 1577-1592, doi: 10.15252/emmm.201404153.