

## Odkrivanje dednega sindroma von Hippel-Lindau: določanje mutacij v genu VHL

Maša Milatović, Uršula Prosenč Zmrzljak in Srdjan Novaković

### Izvleček

Na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana smo uvedli testiranje mutacij v tumorskem supresorskem genu *von Hippel-Lindau* (*VHL*). Mutacije v tem genu povečajo verjetnost za nastanek rakastih bolezni, povezanih s sindromom »von Hippel-Lindau« (*VHL*), kakor tudi z nastankom sporadičnega raka ledvic. Testiranje dednih mutacij pri bolnikih s sumom na sindrom *VHL* omogoča zgodnjo pravilno diagnozo bolezni. Prisotnost mutacije v genu *VHL* je dovolj za potrditev diagnoze sindroma *VHL* tudi ob odsotnosti značilnih tumorjev. Za testiranje prisotnosti mutacij v genu *VHL* uporabljamo metodo neposrednega sekvenciranja in metodo MLPA (ang. *multiplex ligation-dependent probe amplification*). S sekvenciranjem odkrivamo točkovne mutacije in manjše delecije ter insercije. Z metodo MLPA pa prisotnost večjih delecij in insercij v genu oziroma delecijo celotnega gena. Pravočasno odkrivanje mutacij v genih, povezanih z nastankom raka, je za nosilce mutacij pomembno, saj je dokazana mutacija razlog za prilagojeno klinično spremljanje in/ali preventivne ukrepe pri nosilcih mutacije. Posledično so zaradi tega povečane možnosti za preprečevanje ali zgodnejše odkrivanje raka.

### Uvod

Mutacije v genu *VHL* povzročajo nastanek sindroma von Hippel-Lindau (*VHL*, MIM št. 193300). Gre za redke dedne neoplastične sindrome s številnimi benignimi in malignimi tumorji, predvsem hemangioblastomi mrežnice in osrednjega živčevja (*CNS*), rakom ledvičnih celic (*RCC*) in feokromocitomi. Sindrom *VHL* naj bi bil vzrok za nastanek približno tretjine hemangioblastomov *CNS*, več kot 50 odstotkov angiomov mrežnice, enega odstotka *RCC* ter polovico družinsko povezanih in 11 odstotkov sporadičnih feokromocitomov. V sklopu tega sindroma se pojavljajo tudi ciste ledvic in trebušne slinavke ter cistadenomi obodke ali širokega ligamenta maternice. Sindrom *VHL* se deduje avtosomalno dominantno in ima značilno fenotipsko variabilnost in starostno odvisno penetranco. Po veljavnih kliničnih diagnostičnih kriterijih je za potrditev sindroma von Hippel-Lindau, ob potrjeni družinski anamnezi, pri ogroženem sorodniku potrebno najti en tumor, značilen za *VHL* (npr. hemangioblastom retine ali *CNS*). Ker se tumorji, značilni za sindrom *VHL*, lahko pojavljajo tudi sporadično, je za natančnejšo opredelitev sindroma *VHL* pri posamezniku, ki ne izhaja iz dokazano ogrožene družine, potrebno najti dva tumorja (npr. dva hemangioblastoma ali hemangioblastom in visceralni tumor) [1]. Ključno pri poznavanju sindroma *VHL* je bilo odkritje, da bolezen povzroča mutacija v tumorskem supresorskem genu *VHL* [2]. Mutacije v genu *VHL* najdemo pri vseh bolnikih s sindromom *VHL*. Prisotnost zarodne mutacije v genu *VHL* tako zadostuje za diagnozo sindroma *VHL* tudi pri posameznikih,

ki še nimajo kliničnih znakov bolezni [2]. Ker je povprečna starost pojavljanja tumorjev pri bolnikih s sindromom *VHL* veliko nižja kot pri bolnikih s sporadičnimi tumorji (~29 let pri hemangioblastomih *CNS* in 44,8 leta pri *RCC*), je podatek o prisotnosti mutacije pri testirani osebi izredno pomemben za klinično spremljanje nosilca mutacije. Z rednim spremljanjem odpiramo možnost za zgodnje odkrivanje bolezni in ustrezno zdravljenje. To v praksi pomeni boljše in kakovostnejše preživetje bolnikov ter manj stroškov za zdravljenje. Po podatkih za vzhodno Anglijo je bila pred uvedbo določanja mutacij v genu *VHL* incidenca sindroma *VHL* ocenjena na 1/36.000 živih rojstev, prevalenca pa na 1/53.000 ter 1/39.000 v jugozahodni Nemčiji [3]. Za slovensko populacijo podatkov o tem ni na voljo.

### Molekularna genetika

Kot vzrok za razvoj sindroma *VHL* je Latif s sod. leta 1993 identificiral gen *VHL*. To je vodilo do pojasnitve celičnih mehanizmov nastanka tega sindroma. Gen *VHL* se nahaja na kromosomski regiji 3p25, dolg je približno 11 kb in se močno izraža tako v zarodkih kot tudi v tkivih odraslih [2]. Kodirajoče zaporedje gena *VHL* sestavljajo trije eksoni, ki nosijo zapis za dva različna proteina *VHL*: 213 aminokislinski dolg protein (pVHL<sub>30</sub>) [4] in krajši protein (pVHL<sub>19</sub>), ki mu manjka prvih 53 aminokislinskih [5]. Obe izoobliki delujeta kot zaviralki tumorske rasti. Pri tem se naj bi pVHL<sub>30</sub> nahajal pretežno v citoplazmi, medtem ko se naj bi pVHL<sub>19</sub> nahajal pretežno v jedru [6]. Posamezniki s sindromom *VHL* so heterozigoti za gen *VHL*. Razvoj tumorja ali ciste je tako povezan s somatsko inaktivacijo ali izgubo še delujočega gena *VHL* [7]. Poleg tega pa najdemo bialnelno inaktivacijo gena *VHL* tudi pri večini primerov sporadičnega *RCC*, kar ustreza klasičnemu Kundsonovemu modelu nastanka in razvoja raka [8]. Dvajset do 37 odstotkov bolnikov s sindromom *VHL* ima velike ali delne delecije v genu *VHL* (0,5 - 250 kb), pri čemer približno 30 odstotkov delecij zajame celoten gen *VHL*. Trideset do 38 odstotkov je drugačno smiselnih mutacij in 23 do 27 odstotkov je nesmiselnih mutacij ali mutacij s premikombralnega okvirja [7]. Za sindrom *VHL* je značilna zapletena povezava genotipa s fenotipom, pri čemer tip mutacije vpliva na izražanje kliničnih znakov bolezni. Klinično se obolele družine deli glede na prisotnost (tip 2) ali odsotnost (tip 1) feokromocitomov. Podtipi (A, B in C) pa so označeni glede na tveganje ob pojavljanju drugih vrst tumorjev (Preglednica 1) [9]. Zanimivo je, da je izguba gena HSPC300 (ang. *haematopoietic stem/progenitor cell protein 300*) v kombinaciji z izgubo gena *VHL* povezana z zmanjšanim tveganjem za *RCC*, kot če je okvarjen le gen *VHL* [10].

**Preglednica 1:** Povezava genotipa s fenotipom pri sindromu VHL (povzeto po [9]).

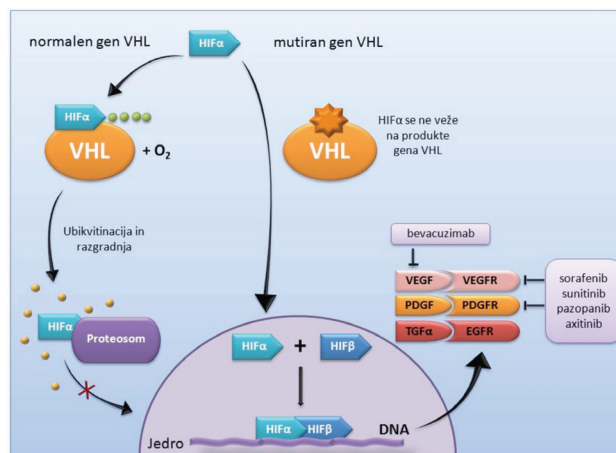
Tip fenotipa	Vrsta mutacije v genu VHL	Molekularne nepravilnosti	Klinični znaki VHL sindroma
Tip 1A	Delecije celotnih eksonov in mutacije, ki skrajšajo protein.	Povečanje delovanja HIF.	Hemangiomi mrežnice in CNS, RCC. Nižje tveganje za nastanek feokromocitomov
Tip 1B	Delecije dela ali celega gena VHL in sosednjega gena HSPC300.		Hemangiomi mrežnice in CNS, manjše tveganje za nastanek RCC.
Tip 2A	Drugačno smiselne mutacije.	Povečanje delovanja HIF in nezmožnost stabilizacije mikrotubulov.	Hemangiomi in feokromocitomi. Nižje tveganje za nastanek RCC.
Tip 2B		Povečanje delovanja HIF.	Hemangiomi, feokromocitomi. Večje tveganje za nastanek RCC.
Tip 2C	Določene drugačno smiselne mutacije.	pVHL obdrži zmožnost zaviranja HIF, zmanjšana sposobnost vezave na fibronektin, nepravilna izgradnja fibronektinske mreže.	Le feokromocitomi.

### Molekularni mehanizmi in vloga tumorskega supresorskega gena VHL

Produkta gena *VHL*, izoforma pVHL<sub>30</sub> in pVHL<sub>197</sub>, imata številne funkcije in se vključujeta v različne celične procese. V tem prispevku bomo opisali le njun pomen pri razvoju sindroma VHL. Izoforma proteina pVHL uravnava razgradnjo  $\alpha$ -podenot transkripcijskih faktorjev HIF-1 in HIF-2 (hipoksija inducibilni faktor 1 in 2), ki sprožita odgovor celice na pomanjkanje kisika [11]. Sestavljata del ubikvitin-ligaznega kompleksa, ki se preko dveh hidroksiliranih prolinov poveže z  $\alpha$ -podenotama HIF-1 in HIF-2 in ju tako označi za ubikvitinacijo oz. razgradnjo v proteasomu [12]. Hidroksilacijo prolinov  $\alpha$ -podenot, HIF-1 in HIF-2, ki je nujna za vezavo na izoforme proteina pVHL, omogoča encim prolin hidroksilaza, ki za svoje delovanje potrebuje tako kisik kot kofaktor. Pri normalnem delovanju produktov gena *VHL* in ob prisotnosti kisika se podenote HIF- $\alpha$  hitro razgradijo. Ob pomanjkanju kisika, ali zmanjšani aktivnosti produktov gena *VHL*, pa se HIF-1 in HIF-2 nakopičita in sprožita prepisovanje številnih tarčnih genov, vpletenih v odgovor celice na hipoksijo. Med tarčne gene HIF-1 in HIF-2 spadajo VEGF, PDGF $\beta$ , TGF $\alpha$ , ciklin D1 in drugi geni, ki so povezani s procesi angiogeneze, proliferacije, apoptoze in metabolizma [13]. Okvara pVHL v celici sproži celični odgovor, značilen za hipoksijo, kar se odraža v stimulaciji tvorbe tumorskega ožilja (angiogeneza) in s hitrejšo rastjo tumorske mase (Slika 1).

**Slika 1:** Prikaz delovanja produktov normalnega in mutiranega gena VHL.

Ko protein pVHL deluje normalno in je v celici prisoten kisik, se  $\alpha$ -podenote transkripcijskih faktorjev HIF povežejo s pVHL v ubikvitinazni kompleks. Podenote HIF- $\alpha$  se ubikvitinirajo in razgradijo v proteasomu. Ko je protein pVHL okvarjen (mutiran) se v celicah kopičijo  $\alpha$ -podenote transkripcijskih faktorjev HIF in sprožijo prepisovanje tarčnih genov, kot so VEGF, PDGF, TGF $\alpha$  idr. Tirozin kinazni inhibitorji, kot sta sorafenib in sunitinib, inhibirajo receptorje za VEGF in PDGF ter tako zmanjšajo posledice mutacij v genu VHL [13, 14].



### Metode za zaznavanje mutacij v genu VHL

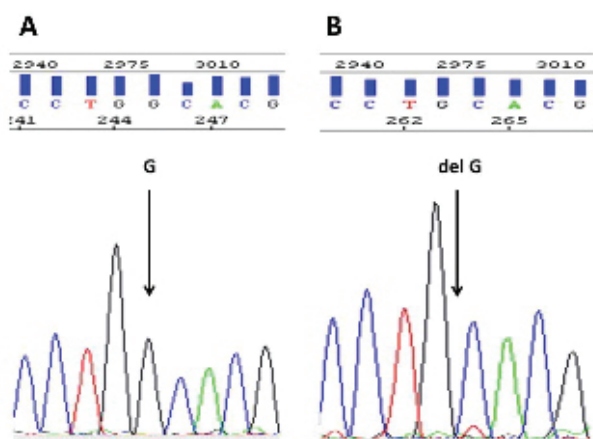
Na Oddelku za molekularno diagnostiko Onkološkega inštituta Ljubljana določamo mutacije v genu VHL pri bolnikih, za katere obstaja sum, da so nosilci dedne mutacije. Pri teh bolnikih določimo morebitno prisotnost mutacij v genu VHL v vzorcu DNA iz periferne krvi. Poleg tega lahko določimo prisotnost somatskih mutacij tudi v vzorcu tumorske DNA, izolirane iz tumorskega tkiva, fiksanega v formalinu in vklopljenega v parafin.

Velike delecije v genu VHL določamo z metodo MLPA (metoda hkratnega pomnoževanja od ligacije odvisnih sond), s kompletom SALSA® MLPA® P016-C2 (MRC-Holland) [15]. Z metodo MLPA lahko v genu zaznamo insercije in delne ter popolne delecije. V prvem koraku hibridiziramo MLPA-sonde na tarčno sekvenco in sprožimo postopek zlepljanja dveh sosednjih sond z ligazo. Do ligacije pride le med sondami, ki so si dovolj blizu. Med sondami, ki so predaleč (insercija) ali pa ene od sond ni v bližini (delecija), do zlepljanja ne more priti. Sonde, ki jih uporabljamo, imajo na navzen orientiranih končnih delih enotna zaporedja, kamor naležejo univerzalni PCR-začetni oligonukleotidi. To nam omogoča, da z enim parom oligonukleotidnih začetnikov v PCRreakciji pomnožimo le uspešno hibridizirane in zlepljene sonde. Ta pomnožena zaporedja so dolga od 130 do 480 nukleotidov. Produkta PCR-reakcije ločimo na kapilarni elektroforezi in jih analiziramo. Heterozigotne delecije enega ali več eksonov gena VHL so vidne kot 35- do 50-odstotno zmanjšanje relativne količine PCR-produktov, pomnoženih s specifičnimi sondami.

Točkovne mutacije v genu VHL določamo z metodo neposrednega sekvenciranja vseh treh eksonov gena VHL. Dele gena VHL pomnožimo z metodo PCR, pri čemer uporabljamo specifične oligonuklotide začetnike za eksona 1, 2 in 3 gena

VHL. PCR-produkte sekvenciramo s sekvencatorjem ABI3500 in odčitamo morebitne točkovne spremembe v primerjavi z referenčnim zaporedjem gena VHL (Slika 2). DNA iz vzorcev, vključenih v parafin, je bolj razgrajen, zato pri teh vzorcih uporabljamo več kompletov oligonukleotidnih začetnikov, s katerimi sekvenciramo krajše odseke DNA. S prekrivanjem robnih delov zaporedij zaznamo morebitne mutacije v celotnem genu.

**Slika 2:** Elektroferogram dela zaporedja gena VHL pri **A** - nemutiranem vzorcu in **B** - mutiranem vzorcu, s homozigotno delecijo nukleotida G.



### Zaključek

Z metodo MLPA in sekvenciranjem celotnega gena *VHL* lahko temeljito preverimo prisotnost mutacij v kodirajočem delu nukleotidnega zaporedja gena. Mutacije gena *VHL* lahko določamo iz DNA, izolirane iz svežih in zmrznjenih vzorcev (krvi, tkiva ...) ali iz tumorskega tkiva, vključenega v parafin. Z omenjenima metodama lahko potrdimo prisotnost germinalnih in/ali somatskih mutacij. Germinalne mutacije lahko določamo tudi pri osebah, ki nimajo razvitih kliničnih znakov sindroma VHL. Za dokazovanje somatskih mutacij v tumorskem tkivu, vključenega v parafin, je treba zagotoviti dele tkiva z največjim deležem tumorskih celic. Z določanjem germinalnih mutacij v genu *VHL* omogočamo evidentiranje nosilcev mutacij in ustrezno (zgodnje) klinično spremljanje. Rezultat tega je večja verjetnost, da tumorje odkrijemo v zgodnjih fazah razvoja in s tem omogočimo uspešnejše zdravljenje ter daljše in kakovostnejše preživetje. V zadnjem času je določanje mutacij v genu *VHL* smiselno tudi pri bolnikih s somatskimi mutacijami, kajti njihova prisotnost je napovedni dejavnik za zdravljenje s tirozin kinaznimi inhibitorji.

### Viri

1. Melmon, K.L. and S.W. Rosen, Lindau's Disease. Review of the Literature and Study of a Large Kindred. *Am J Med*, 1964. 36: p. 595-617.
2. Latif, F., et al., Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*, 1993. 260(5112): p. 1317-20.
3. Maher, E.R., H.P. Neumann, and S. Richard, von Hippel-Lindau disease: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet*, 2011. 19(6): p. 617-23.
4. Iliopoulos, O., et al., Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med*, 1995. 1(8): p. 822-826.
5. Schoenfeld, A., E.J. Davidowitz, and R.D. Burk, A second major native von Hippel-Lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(15): p. 8817-22.
6. Duan, D.R., et al., Characterization of the VHL tumor suppressor gene product: localization, complex formation, and the effect of natural inactivating mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(14): p. 6459-63.
7. Stolle, C., et al., Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum Mutat*, 1998. 12(6): p. 417-23.
8. Kundson AG, S.L., Anderson DE, Heredity and cancer in man. *Prog Med Genet*, 1973. 9: p. 113-158.
9. Kim, W.Y. and W.G. Kaelin, Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol*, 2004. 22(24): p. 4991-5004.
10. Cascón, A., 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): p. 613-621.
11. Maxwell, P.H., et al., The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 1999. 399(6733): p. 271-5.
12. Iwai, K., et al., Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(22): p. 12436-41.
13. Kaelin, W.G., Jr., Treatment of kidney cancer: insights provided by the VHL tumor-suppressor protein. *Cancer*, 2009. 115(10 Suppl): p. 2262-72.
14. Rini, B.I., Metastatic renal cell carcinoma: many treatment options, one patient. *J Clin Oncol*, 2009. 27(19): p. 3225-34.
15. Schouten, J.P., et al., Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*, 2002. 30(12): p. e57.