

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.2:616-006

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ТОЧКОВЫХ МУТАЦИЙ В КОДИРУЮЩЕЙ ЧАСТИ
ГЕНА *VHL* ПРИ СВЕТЛОКЛЕТОЧНОМ РАКЕ ПОЧКИ

© 2012 г. Д. С. Михайленко^{1,2,3*}, М. В. Григорьева⁴, И. Г. Русаков⁴, Р. В. Курынин⁵,
А. М. Попов⁶, М. В. Петерс⁷, В. Б. Матвеев⁷, Е. С. Яковлева⁷, Д. А. Носов⁷,
Л. Н. Любченко⁷, С. А. Тюляндин⁷, В. В. Стрельников^{1,2}, Д. В. Залетаев^{1,2,3}

¹Медико-генетический научный центр Российской академии медицинских наук, Москва, 115478

²Научно-исследовательский институт молекулярной медицины Первого Московского государственного
медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, 119991

³Медико-биологический факультет Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова,
Москва, 117997

⁴Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена, Москва, 125284

⁵Клиника урологии им. Р.М. Фронштейна Первого Московского государственного медицинского университета
им. И.М. Сеченова, Москва, 119991

⁶Медицинский радиологический научный центр Министерства здравоохранения и социального развития
Российской Федерации, Калужская обл., Обнинск, 249036

⁷Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук,
Москва, 115478

Поступила в редакцию 29.03.2011 г.

Принята к печати 29.04.2011 г.

Ген *VHL* часто инактивируется при спорадическом светлоклеточном раке почки в результате соматических мутаций, а герминальные мутации этого гена приводят к развитию наследственного светлоклеточного рака почки — синдрома Хиппеля-Линдау. Локализация мутаций в гене *VHL*, идентификация новых мутаций и их влияние на прогрессию светлоклеточного рака почки и на чувствительность к таргетным препаратам актуальны для современной онкогенетики. В настоящей работе с помощью SSCP-анализа и секвенирования в 248 образцах первичного светлоклеточного рака почки идентифицированы и охарактеризованы мутации в гене *VHL*. Соматические мутации найдены в 37.5% образцов, из них 72% мутаций идентифицированы впервые. Новые миссенс-мутации анализировали с использованием программ выравнивания последовательностей и построения трехмерной структуры белка. Сравнивали встречаемость мутаций в группах, сформированных с учетом стадии заболевания, степени дифференцировки опухоли и наличия метастазов. Соматические мутации *VHL* выявлены в 39.1% образцов светлоклеточного рака почки первой стадии, но они не ассоциированы с прогрессией и метастазированием первичной опухоли. Охарактеризовано распределение мутаций в кодирующей части *VHL* и участки мутаций без сдвига рамки считывания относительно критических областей гена. Анализ соматических мутаций *VHL*, выполненный в представленной работе, позволит расширить возможности лабораторной диагностики как при наследственном, так и при спорадическом светлоклеточном раке почки.

Ключевые слова: ген *VHL*, мутация, белковый домен, рак почки.

LOCALIZATION OF POINT MUTATIONS IN THE CODING PART OF THE *VHL* GENE IN CLEAR CELL RENAL CANCER, by D. S. Mikhaylenko^{1,2,3*}, M. V. Grigoryeva⁴, I. G. Rusakov⁴, R. V. Kurynin⁵, A. M. Popov⁶, M. V. Peters⁷, V. B. Matveyev⁷, E. S. Yakovleva, D. A. Nosov⁷, L. N. Lyubchenko⁷, S. A. Tulyandin⁷, V. V. Strelnikov^{1,2}, D. V. Zaletayev^{1,2,3**} (¹Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia, *e-mail: dimserg@mail.ru; ²Institute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia; **e-mail: zaletaev@list.ru; ³Medical-biological Department, Pirogov Russian State Medical University, Moscow, 117997 Russia; ⁴Hertzen Moscow Oncological Research Institute, Moscow, 125248 Russia; ⁵Fronstein Clinic of Urology, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia; ⁶Medical Radiological Research Center, Ministry of Health and Social Development, Obninsk, Kaluga Region, 249036 Russia; ⁷Blokhin Russian Oncological Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia). *VHL* gene is often inactivated in sporadic clear cell renal cancer (CCRC) due to somatic mutations, and it's germline mutations cause hereditary CCRC — von Hippel-Lindau syndrome. Localization of mutations in *VHL*, identification of new mutations and their influence on CCRC progression and sensitivity to targeted therapy are actual problems in modern oncogenetics.

Принятые сокращения: СРП — светлоклеточный рак почки; РП — рак почки; VHL — синдром Хиппеля-Линдау; HIF — индуцируемый гипоксией фактор.

* Эл. почта: dimserg@mail.ru

We have provided search and characterization of mutations in 248 primary CCRC using SSCP-analysis and sequencing. Somatic mutations were detected in 37.5% of samples, 72% of mutations were identified for the first time. New missense-mutations were analyzed by alignment programs and three-dimensional structure modeling. Mutation frequency was compared in different groups of patients in respect to stage, grade, and metastases. It was demonstrated that 39.1% samples with stage I harbor somatic mutations, however, no association with progression or metastases was found. We also have investigated localization of mutations in the *VHL* coding part and positions of missense-mutations and inframe deletions/insertions focusing on *VHL* critical sequences. *VHL* mutation analysis performed in this study improve the possibilities of laboratory diagnostics of familial and sporadic CCRC.

Keywords: gene *VHL*, mutation, protein domain, renal cancer.

Ген *VHL* привлекает внимание молекулярных онкологов по ряду причин: герминальные мутации в этом гене приводят к развитию наследственного онкологического синдрома Хиппеля-Линдау (*VHL*-синдром), а соматические мутации часто встречаются при спорадическом светлоклеточном раке почки (СРП) и, возможно, влияют на эффективность таргетной терапии. Рак почки (РП) входит в число 10 наиболее часто встречающихся опухолей у взрослых, что позволяет считать его одной из основных проблем современной онкоурологии [1]. Доля наследственных форм РП составляет около 2%, среди них наиболее распространен *VHL*-синдром [2, 3]. При *VHL*-синдроме опухоли могут развиваться в различных органах-мишенях, однако наиболее часто встречается СРП. Выделяют два типа *VHL*-синдрома – без феохромоцитомы и с высоким риском СРП (тип 1) и с феохромоцитомой (тип 2). В первом случае находят мутации сдвига рамки считывания, нонсенс-мутации, а также миссенс-мутации, препятствующие фолдингу. Для *VHL*-синдрома типа 2, напротив, характерны точковые мутации, приводящие к замене определенных аминокислотных остатков, расположенных на поверхности белка [4, 5]. Тем не менее, в подавляющем большинстве случаев РП представлен спорадическими опухолями, из них около 75% составляет СРП. По разным оценкам в 30–70% спорадического СРП выявляют соматические мутации в гене *VHL*, потерю гетерозиготности и/или aberrантное метилирование. Ген *VHL* локализован в области 3p25, он содержит три экзона и кодирует белок из 213 аминокислотных остатков. Ген *VHL* характеризуется значительной консервативностью нуклеотидной последовательности, что указывает на важную роль белка *VHL* и выполнение им сходных функций у различных организмов [5]. Белок *VHL* необходим для сборки мультибелкового комплекса, в котором происходит убиквитин-зависимая деградация индуцируемых гипоксией факторов 1 α и 2 α (HIF). В нормальных условиях HIF гидроксилируется в определенных позициях, после чего приобретает способность связываться с β -доменом *VHL*. Белок *VHL* с помощью α -домена взаимодействует с элонгином C, который, в свою очередь, привлекает другие компоненты комплекса. В сформированном ком-

плексе молекулы убиквитина присоединяются к HIF и осуществляется протеолиз. В условиях гипоксии гидроксилирование HIF не происходит. HIF1- α и HIF2- α образуют гетеродимеры с HIF1- β , транслоцируются в ядро и активируют гены, ответственные за функционирование клеток при низком содержании кислорода. В число генов-мишеней HIF входят гены факторов роста VEGF, PDGF и их рецепторов, GLUT1, CA9 и других молекул, стимулирующих клеточную пролиферацию, ангиогенез, и обеспечивающих энергетические потребности опухолевой клетки. Предполагают, что повышенная экспрессия этих генов лежит в основе развития *VHL*-ассоциированных опухолей [3, 5, 6]. Результаты изучения влияния инактивации гена *VHL* на прогноз заболевания неоднозначны: одни и те же нарушения определяли и как потенциальные неблагоприятные маркеры, и как критерии длительной послеоперационной выживаемости [7–9]. Тем не менее, предполагается, что мутации *VHL* могут иметь прогностическое значение для таргетной терапии. При метастатическом СРП все шире используют таргетные препараты, которые избирательно действуют на ключевые сигнальные молекулы и рецепторы, вовлеченные в канцерогенез СРП и гиперэкспрессирующиеся в ответ на инактивацию *VHL* [10]. Однако эти предположения нуждаются в проверке на больших выборках. Изучение новых мутаций и точное картирование участков гена *VHL*, критически важных для развития СРП, актуальны для понимания патогенетических механизмов развития *VHL*-ассоциированных опухолей и поиска клинически значимых корреляций генотип-фенотип при СРП.

Цель настоящей работы – поиск мутаций в гене *VHL* при спорадическом СРП для определения особенностей их локализации в кодирующей части гена и сравнительного анализа выявленных изменений у больных с различными стадиями заболевания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клинический материал. В работе изучены 248 образцов первичного СРП, из которых 126 – архивные образцы (парафиновые блоки) и 122 – замо-

Таблица 1. ПЦР-праймеры к кодирующей части гена *VHL*

Праймер	Нуклеотидная последовательность, 5' → 3'	$T_{отж}$, °C	ПЦР-продукт, п.н.
VHLex1-F	tgg tct gga tcg cgg agg gaa t	60	416
VHLex1-R	cat ctt ctg caa tcg cag tc		
VHLex1-1F	cga aga cta cgg agg tcg ac	61	184*
VHLex1-1R	tct tca ggg ccg tac tct tcg		
VHLex1-2F	agg ccg agg tag gcg cgg a	62	203*
VHLex1-2R	gca gaa gat gac ctg gga ggg c		
VHLex1-3F	cat ctt ctg caa tcg cag tc	60	175*
VHLex1-3R	ggc ttc aga ccg tgc tat cg		
VHLex2-F	acc ggt gtg gct ctt taa caa cc	61	227
VHLex2-R	tca agt ggt cta tcc tgt act tac		
VHLex3-F	tgc cac tga gga ttt ggt ttt tgc	58	250
VHLex3-R	aaa gct gag atg aaa cag tgt aag		

* Праймеры для амплификации экзона 1 гена *VHL* с геномной ДНК, выделенной из парафиновых блоков.

роженные ткани. Клинические данные доступны для 166 образцов, из них 87 относились к стадии I заболевания, 18 – II, 37 – III и 24 – IV. На момент постановки диагноза 17.5% (29/166) больных имели метастазы в регионарные лимфатические узлы и/или отдаленные метастазы. По степени дифференцировки первичной опухоли образцы распределились следующим образом: 37 – G₁, 81 – G₂, 47 – G₃ и 1 – G₄.

Выделение ДНК. Геномную ДНК из замороженных тканей выделяли с помощью протеиназы К с последующей фенол-хлороформной экстракцией [11]. Предварительно с парафиновых блоков получали срезы, которые депарафинизировали ксилолом и этанолом [12].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Мутации в гене *VHL* выявляли с помощью ПЦР экзонов 1–3 и последующего секвенирования. ПЦР проводили с использованием праймеров и условий, разработанных ранее [13, 14]. Первый экзон *VHL* в образцах, полученных из парафиновых блоков, в силу его протяженности и частичной фрагментированности геномной ДНК, анализировали в ходе трех отдельных ПЦР [15]. Реакционная смесь содержала 50 нг геномной ДНК, 5 мкл пятикратного буфера для ПЦР (“Интерлабсервис”, Москва), по 2.5 пмоль каждого праймера, 1.5 ммоль MgCl₂, 2.0 ммоль dNTP, 1 ед. акт. Taq-полимеразы, деионизированной воды до конечного объема 25 мкл. ПЦР проводили в следующих условиях: начальная денатурация – 95°C, 1 мин 30 с; затем 34 цикла – денатурация – 95°C, 50 с; 40 с при температуре отжига (табл. 1), элонгация – 72°C, 40 с; финальная элонгация – 72°C, 3 мин.

Секвенирование. Отсутствие неспецифических продуктов амплификации в реакционной смеси после ПЦР проверяли с помощью электрофореза

в 8%-ом полиакриламидном геле. Затем ПЦР-продукты очищали от невключившихся праймеров и dNTP. Для этого к 7 мкл ПЦР-продуктов добавляли 4 ед. акт. экзонуклеазы I *Escherichia coli* (“Fermentas”, Литва), 1 ед. акт. щелочной фосфатазы (“СибЭнзим”, Россия), по 0.5 мкл буферов (×10) для этих ферментов и деионизированную воду до объема реакционной смеси 10 мкл. Смесь инкубировали в течение 50 мин при 37°C, затем инактивировали ферменты – 15 мин при 85°C. После этого 4 мкл полученной смеси использовали для секвенирования, которое проводили с использованием BigDye® Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit и анализатора ABI3100 в соответствии с протоколами фирмы “Applied Biosystems”. Каждую выявленную мутацию подтверждали в трех независимых опытах.

Статистическая обработка экспериментальных данных. Сравнительный анализ абсолютных частот мутаций в парных группах проводили с помощью точного двустороннего критерия Фишера. Встречаемость соматических мутаций в группах больных СРП с разной стадией и степенью дифференцировки опухоли анализировали с использованием критерия Крускала–Уоллиса. При обработке данных применяли программу GraphPadInStat v.3.05.

Анализ влияния мутаций на структуру белка VHL. Выравнивание аминокислотных последовательностей белка VHL различных биологических видов и определение консервативных участков проводили с помощью интерактивной программы ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Влияние новых точковых мутаций на пространственную структуру белка VHL прогнозировали с использованием программы Swiss-Pdb Viewer 4.0.1. (<http://spdbv.vital-it.ch/>).

Таблица 2. Мутации в гене *VHL*, выявленные в настоящей работе*

№№ 1–24	№№ 25–48	№№ 49–71	№№ 72–93
c.151G → T	c.263G → T	c.390delT	c.464-3C → G
c.155_196del	c.264_273del	c.392_408del	c.472C → G
c.162_166del	c.266T → C	c.395delA	c.474_477del
c.165_169del	c.272_284del	c.395dupA	c.478_481del
c.167_173del	c.273_281del	c.401delA	c.481C → T
c.168_184del	c.275_276insGG	c.401dupA	c.506T → C
c.170_177del	c.277delG	c.406dupT	c.509T → C
c.175_181del	c.293A → T	c.416dupC	c.512_517del
c.175_177delinsTC	c.297delA	c.416_417insCC	c.514_527del
c.188_201del	c.307delC	c.421delA	c.516_521del
c.192_200del	c.311_320del	c.430_431del	c.517_518del
c.195delG	c.319_320insGC	c.432delA	c.522dupT
c.208_209insCG	c.321delC	c.434delA	c.527delG
c.211delC	c.330_331delinsT	c.440delT	c.535_540del
c.234T → G**	c.336_340del	c.440_442del	c.545delG
c.242_248del	c.340+2_340+4del	c.440_443del	c.572delA
c.245_246del	c.346_347del	c.440_441dup	c.585_586del
c.249_257del	c.350G → A	c.441delinsAA	c.590delA
c.253_260del	c.353_368delinsC	c.444_445del**	c.597_604del
c.256delC	c.359_368del	c.450_451insTAT	c.626dupA
c.262T → G**	c.377_381del**	c.464-1_469del	c.633_634del
c.263delG	c.379delG**	c.464-2_465del	c.638_642+1delinsG

* Мутации перечислены в порядке локализации от 5'- к 3'-концу кодирующей области гена.

** Мутация выявлена в двух образцах, полученных от разных больных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика выявленных мутаций

Использовали парные образцы замороженных тканей – опухольная ткань/гистологически неизменная паренхима почки. Мутации, выявленные в опухолях, отсутствовали в нормальной ткани. Парафиновые блоки (59 образцов) аннотированы необходимыми анамнестическими данными, свидетельствующими об отсутствии семейной истории заболевания и других признаков наследственного СРП. Это позволило рассматривать имеющуюся выборку как совокупность образцов спорадического СРП. Мутации *VHL* определены в 37.5% (93/248) образцов СРП (табл. 2). Среди мутаций 66.7% (62/93) составляли делеции, 12.9% (12/93) – инсерции и дупликации, 15.0% (14/93) – однонуклеотидные замены, остальные 5.4% (5/93) приходились на комплексные мутации. Мутации обозначены в соответствии с международными рекомендациями HGVS (<http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/mutnomen/>). В 75.3% (70/93) случаев мутации приводили к сдвигу рамки считывания и формированию новых стоп-кодонов. Пять делеций в экзоне 1,

одна – в экзоне 2, три – в экзоне 3 не изменяли рамку считывания, но нарушали сайты связывания HIF или элонгина C, что критично для выполнения белком VHL своей функции. Делеция c.340+2_340+4del повреждала донорный сайт сплайсинга в первом интроне, а делеции c.464-1_469del, c.464-2_465del и миссенс-мутация c.464-3C→G – акцепторный сайт сплайсинга во втором интроне. Влияние мутаций на структуру транскрипта анализировали с помощью интерактивной программы поиска сайтов сплайсинга (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html). При делециях c.196delG и c.336_340del формировались преждевременные стоп-кодоны. Однонуклеотидные замены в кодирующей части представляли собой миссенс-мутации p.Asn78Lys (два случая), p.Trp88Gly (два случая), p.Trp88Leu, p.Leu89Pro, p.Tyr98Phe, p.Leu158Val, p.Leu169Pro, p.Val170Ala и нонсенс-мутации p.Glu51X, p.Trp117X, p.Arg160X. Первые семь миссенс-мутаций изменяли участки связывания HIF в β-домене VHL, последние три затрагивали участок связывания элонгина C в α-домене. В одном образце опухоли выявлена синонимичная замена c.183C → T, присутствующая и в нормальной тка-

Таблица 3. Сравнительный анализ встречаемости мутаций в разных группах больных

Группа (количество)	Частота встречаемости мутаций <i>VHL</i> , % (число)	Критерий Крускала–Уоллиса, <i>p</i>	Частота встречаемости мутаций в парных группах, % (доля)	Критерий Фишера, <i>p</i>
Стадия заболевания				
I (<i>n</i> = 87)	39.1 (34)	0.109	36.2 (38/105)	0.866
II (<i>n</i> = 18)	22.2 (4)			
III (<i>n</i> = 37)	24.3 (9)		34.4 (21/61)	
IV (<i>n</i> = 24)	50.0 (12)			
Степень дифференцировки первичной опухоли				
G1 (<i>n</i> = 37)	40.5 (15)	0.372	33.9 (40/118)	0.592
G2 (<i>n</i> = 81)	30.9 (25)			
G3 (<i>n</i> = 47)	38.3 (18)		39.6 (19/48)	
G4 (<i>n</i> = 1)	(1)			
Метастазы в регионарные лимфоузлы и/или отдаленные метастазы				
Нет (<i>n</i> = 137)	33.6 (46)		–	0.288
Есть (<i>n</i> = 29)	44.8 (13)			

ни, что позволяет рассматривать ее как однонуклеотидный полиморфизм. Все мутации сопоставили с мутациями, представленными в банке данных Universal Mutation Database (UMD, <http://www.umd.be:2020/>), Human Genome Mutation Database (HGMD, www.hgmd.org), с опубликованными экспериментальными данными об изменениях нуклеотидной последовательности *VHL* (например, [16]), а также с результатами аналитических работ, в которых систематизированы данные о мутациях *VHL* [17]. Описанные ранее мутации найдены в 28.0% (26/93) образцов, впервые охарактеризованные мутации – в 72.0% (67/93) образцов СРП. Однако доля новых мутаций может быть несколько завышена из-за того, что после идентификации мутации до ее внесения в базы данных может пройти до 2 лет.

Полученные результаты в целом согласуются с данными о том, что соматические мутации *VHL* в виде делеций/инсерций часто встречаются при спорадическом СРП, для них характерно преобладание так называемых мутаций потери функции и отсутствие горячих точек мутагенеза [17, 18]. Однако доля образцов с соматическими мутациями в нашей работе ниже, чем в ряде других [16, 19]. Возможно, присутствие в образцах СРП клеток стромы затрудняет выявление соматических мутаций в опухолевых клетках. В настоящее время описаны методы, позволяющие решить проблему малого количества мутантной ДНК в ткани, используемой при анализе *VHL*: использование эндонуклеаз, гидролизующих неспаренные нуклеотиды в ПЦР-продуктах, лазерной микродиссекции для получения изолированных опухолевых клеток [19]. Другой подход к увеличению доли выявленных мутаций *VHL* – обнаружение протяженных делеций с помощью мультиплексной

лигазной реакции и последующей амплификации (MLPA) или ПЦР в реальном времени [20–22]. Кроме того, необходимо учитывать, что около 20–30% спорадических СРП развиваются без ранней инактивации *VHL*. Это позволяет условно разделять СРП на *VHL*-зависимый и *VHL*-независимый, которые различаются не только особенностями повреждения *VHL*, но и профилем экспрессии большого числа генов [23].

Поиск ассоциаций генотип-фенотип

Среди клинически аннотированных случаев доля образцов с мутациями составила 35.5% (59/166). Проведен сравнительный анализ встречаемости соматических мутаций в зависимости от возрастания стадии заболевания и уменьшения степени дифференцировки первичной опухоли, а также частот мутаций в парных группах (табл. 3). Парные клинические группы были сформированы по следующему признакам: начальные (I и II) и поздние (III и IV) стадии заболевания, степень дифференцировки первичной опухоли – группы G_{I-II} и G_{III-IV}, наличие (любое положительное N и/или M) и отсутствие (T_xN₀M₀) метастазов к моменту постановки диагноза. Объединение в парные группы обусловлено малой (<30) численностью некоторых групп, а также особенностями диагностики и лечения больных на ранних и поздних стадиях СРП. Нами не обнаружено ассоциаций мутаций *VHL* с перечисленными выше параметрами. Следует отметить, что мутации найдены у 39.1% (34/87) больных с I-й стадией СРП, что свидетельствует в пользу инактивации этого гена на ранних этапах развития первичной опухоли. Ранее существовали разные точки зрения на соматические мутации *VHL* как на отдельный

прогностический маркер, иногда взаимоисключающие. Так, показана ассоциация инактивирующих событий *VHL* с прорастанием первичной опухолью капсулы почки (стадия pT₃ по TNM-классификации), т.е. с поздними стадиями СРП [7]. С другой стороны, обнаружена ассоциация соматических мутаций и метилирования *VHL* с продолжительностью безрецидивного периода. Мутации и метилирование *VHL* рассматриваются при этом как возможные маркеры благоприятного прогноза [8], как и в более поздней публикации [9]. Согласно [16], инактивация *VHL* коррелирует со степенью дифференцированности первичной опухоли, но не выявлено ассоциаций с TNM-параметрами или выживаемостью больных. Кроме того, есть мнение, что соматические мутации *VHL*, хотя и считаются частым ранним и специфичным событием в канцерогенезе СРП, не могут служить индивидуальным прогностическим критерием [18, 24]. Полученные нами результаты согласуются с современным представлением о том, что соматические мутации *VHL* часто встречаются на ранних стадиях спорадического СРП, но не определяют прогрессию и метастазирование первичной опухоли.

Основным методом лечения при СРП остается хирургическое удаление опухоли, при метастатическом СРП назначают иммунотерапию, которая эффективна лишь у 20–25% больных, опухоли почки рефрактерны к химио- и лучевой терапии. При метастатическом СРП все шире используются таргетные препараты Авастин, Сутент и Нексавар [10, 25]. Главные мишени этих препаратов (VEGF, VEGFR тип 1 и 2, PDGFR) гиперэкспрессируются в ответ на инактивацию гена *VHL*. Следовательно, опухоли, в которых поврежден ген *VHL*, могут обладать высокой чувствительностью к таргетной терапии. Это предположение нашло подтверждение в работе, показавшей более выраженный эффект Авастина у больных с соматическими мутациями *VHL*, которые приводят к сдвигу рамки считывания и высокой концентрации HIF, чем у больных без мутаций или с миссенс-мутациями в этом гене [15]. Однако эти ассоциации не столь выражены, как, например, в случае мутаций *EGFR* (ген рецептора фактора роста эпидермиса) и эффективности Ирессы или Тарцевы при раке легкого, и не могут служить прямым показанием к назначению соответствующих ингибиторов. Возможно, это объясняется тем, что мишенью для таргетных препаратов выступает не сам *VHL*, а конечные звенья связанного с ним патогенетического пути. Причем эти молекулы могут быть представлены разными изоформами и иметь разный характер экспрессии даже в опухолях одного и того же гистологического типа. В связи с этим предлагается использовать для прогноза эффективности таргетной терапии не генетические нарушения, а гиперэкспрессию так называемых “суррогатных” маркеров *VHL*, опреде-

ляемую иммуногистохимически. Так, экспрессия карбоангидразы-9 специфична для СРП, связана с инактивацией HIF в патогенетическом пути *VHL* и рассматривается как маркер чувствительности опухоли к иммунотерапии и к действию антиангиогенных препаратов [26].

Локализация мутаций в критических участках VHL

Построено распределение всех выявленных мутаций в кодирующей части *VHL*, отдельно локализованы мутации без сдвига рамки считывания для сравнения их положения относительно границ доменов и сайтов связывания в зрелом белке (рис. 1). Среди мутаций без сдвига рамки считывания 58.8% (10/17) приводили к изменению аминокислотной последовательности β-домена, связывающего HIF, оставшиеся семь мутаций затрагивали α-домен, взаимодействующий с элонгином С. Все миссенс-мутации, изменяющие α-домен, располагались на небольшом участке с.157-172, который непосредственно формирует участок присоединения элонгина С. Возможно, этот участок более важен для потери HIF-зависимых функций *VHL*, чем остальной α-домен, в котором, тем не менее, также найдены мутации без сдвига рамки считывания. Мутации β-домена были локализованы в первых двух третях кодирующей его кДНК, они нарушали структуру β-сэндвича, но не α-спирали, что также может указывать на неодинаковое влияние замены (потери) разных аминокислот β-домена для связывания HIF. Не выявлено мутаций в частях гена, кодирующих N-концевой кислый домен, линкерный участок и C-концевой мотив.

Среди миссенс-мутаций выявлены замены p.Trp88Gly, p.Tyr98Phe и p.Val170Ala, не представленные в доступных нам базах данных и в научных публикациях. С целью прогнозирования возможного влияния этих замен на функцию белкового продукта с помощью программы ClustalW2 проведено выравнивание кодирующих последовательностей гена *VHL* у организмов, принадлежащих к различным таксонам: *Homo sapiens*, *Canis lupus familiaris*, *Bos taurus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Xenopus tropicalis*, *Danio rerio* и *Drosophila melanogaster*. Мутации p.Trp88Gly и p.Tyr98Phe приводили к замене наиболее консервативных аминокислотных остатков, что свидетельствовало об их неблагоприятном влиянии на функцию *VHL*. Оценка изменений в трехмерной структуре зрелого белка с применением программы Swiss-Pdb Viewer 4.0.1. (исходный PDB-файл в базе данных EMBL: 1lm8.ent) также указывала на несоответствие мутантных полипептидных цепей тем ротамерам (фрагментам из нескольких звеньев цепи, принимающим определенную конформацию), которые должны формироваться в

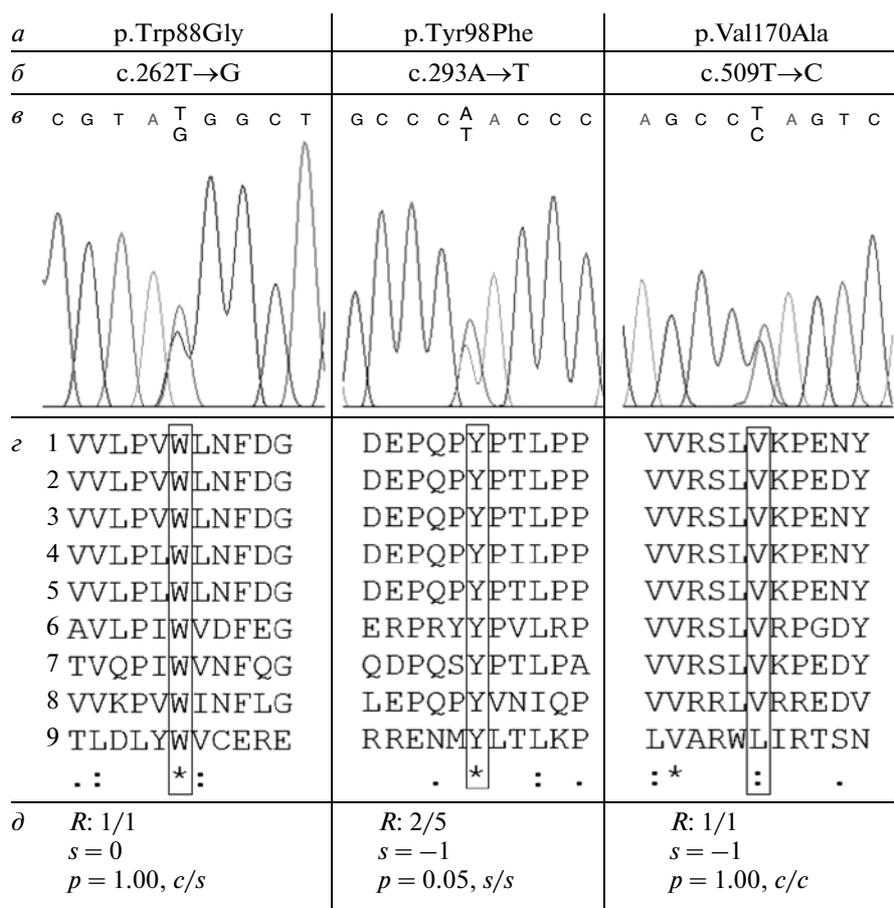


Рис. 2. Новые миссенс-мутации *VHL*. *a* – Изменения в белке *VHL*. *b* – Мутация в кодирующей части гена. *в* – Результаты секвенирования ПЦР-продуктов. *г* – Выравнивание кодирующих участков гомологичных генов у различных организмов (позиции аминокислотных замен отмечены прямоугольниками, степень гомологии отображена в нижней строке, звездочка обозначает наиболее консервативные позиции). Номера последовательностей в NCBI Reference Sequence: 1 – NP_001008552.1 (*C. lupus*), 2 – NP_001103489. (*B. taurus*), 3 – NP_000542.1 (*H. sapiens*), 4 – NP_033533.1 (*M. musculus*), 5 – NP_434688.1 (*R. norvegicus*), 6 – XP_414447.2 (*G. gallus*), 7 – AAI57330.1 (*X. tropicalis*), 8 – NP_001074153. (*D. rerio*) и 9 – NP_524986.1 (*D. melanogaster*). *д* – Результат моделирования влияния миссенс-мутаций на трехмерную структуру белка, в котором: *R* – номер наиболее вероятного ротамера/количество возможных ротамеров; *s* – показатель изменения третичной структуры полипептидной цепи; *p* – вероятность нахождения рассматриваемого участка молекулы в конформации, указанной рядом (*c* – поворот; *s* – β -слой, через косую указаны нормальный и мутантный варианты).

районе аминокислотных остатков 88 и 98 (рис. 2). Анализ замены p.Val170Ala не позволил дать достоверный прогноз влияния этой замены на изменение структуры и функции зрелого *VHL*: этот аминокислотный остаток, в отличие от двух предыдущих, не был полностью консервативным у девяти организмов, формировал только один возможный ротамер без изменения типа укладки полипептидной цепи. Следует отметить, что прогнозировать эффект мутации с помощью компьютерного моделирования можно лишь с определенной долей вероятности. Этот прогноз целесообразно подтверждать в независимых опытах, учитывая опубликованные данные о мутациях в этих кодонах.

Выявленные нами мутации, не нарушающие рамку считывания, могут помочь в уточнении кри-

тических последовательностей *VHL*. Каждая из 17 таких мутаций нарушала структуру α - или β -домена, что соответствует результатам проведенных ранее экспериментальных работ [5, 6, 19]. Вместе с тем, замены отдельных аминокислотных остатков внутри α -домена наблюдали только в участке непосредственного контакта с элонгином С, а мутации в β -доме кластеризовались в его первых двух третях, повреждая только последовательность, кодирующую β -сэндвич. Белок *VHL* обеспечивает деградацию HIF1- α и HIF2- α , однако субстратная специфичность может определяться разными участками его β -домена, приводя к обособлению отдельных критических областей. Недавно получены данные о том, что для развития СРП более важно накопление фактора HIF2- α , чем HIF1- α [27]. В β -доме две мутации из 10 затраги-

вали мотивы взаимодействия с белками, не участвующими в убиквитин-зависимом протеолизе HIF, что может иметь значение в свете данных о многофункциональности VHL: участок β -домена (кодоны 114–122) VHL способен непосредственно связываться с протеинкиназами (PKC) нескольких типов, ингибируя их активность. VHL может подавлять транскрипцию гена фактора роста эндотелия сосудов, действуя через фактор транскрипции Sp1, а также взаимодействовать с фибронектином, способствуя формированию внеклеточного матрикса. Кроме того, нарушение функции VHL стимулирует пролиферацию клеток с участием сигнального пути протеинкиназы mTOR [3, 6]. HIF-независимые функции гена могут влиять на канцерогенез. В частности, с этим связывают два альтернативных патогенетических пути СРП – с развитием первичной опухоли без стадии предраковых изменений (в подавляющем большинстве случаев) и с предварительным формированием кист, рядом с которыми затем возникает очаг неопластического роста. В этот процесс вовлечены в основном кодоны 95–123, которые кодируют участки, отвечающие за взаимодействие с кинезином-2, микротрубочками и формирование ресничек эпителиальных клеток, выступающих в просвет проксимальных почечных канальцев [28, 29]. Именно нарушение организации цитоскелета эпителиальных клеток проксимальных канальцев сейчас рассматривают как основной механизм потери характерной клеточной морфологии почечного эпителия и формирования кист при СРП, тогда как более ранняя версия предполагала вовлечение HIF-зависимых механизмов и активацию гипотетических онкогенов [6]. При оценке влияния не описанных ранее точковых мутаций на функцию VHL в настоящее время часто используют общедоступные серверы и программы для выравнивания последовательностей и моделирования трехмерной структуры белка (Clustal W, 3D-coffee, Swiss PDB Viewer и другие) [30, 31]. В первую очередь, исходят из того факта, что аминокислотные замены, нарушающие расположение доменов VHL относительно друг друга, приводят к развитию СРП, как и потери фрагментов критической области полипептидной цепи. Если же миссенс-мутации не нарушают трехмерную структуру VHL, а связаны с заменами “поверхностных” аминокислотных остатков в некоторых мотивах при сохранении основной функции белка в деградации HIF, то эти изменения не характерны для СРП [32]. В нашей работе в образцах опухолей выявлены три новые соматические миссенс-мутации (p.Trp88Gly, p.Tyr98Phe и p.Val170Ala), две из которых по результатам анализа аминокислотных последовательностей можно отнести к мутациям потери функции, специфичным для СРП. Тем не менее, следует учесть, что сходные изменения в одном и том же положении полипептидной

цепи не всегда одинаково влияют на развитие СРП. Например, герминальная мутация Tyr98His характерна для VHL-синдрома типа 2А с низким риском СРП, а Tyr98Asn – типа 2В с высоким риском СРП [33]. Определенная нами при sporadic СРП соматическая мутация Tyr98Phe более соответствует спектру герминальных мутаций при VHL-синдроме типа 2В. Известны случаи, когда минимальные различия в аминокислотной последовательности VHL были ассоциированы с новообразованиями разного типа. В настоящей работе выявлена соматическая мутация p.Val170Ala, которая, согласно анализу аминокислотных последовательностей, не может считаться изменением, серьезно нарушающим структуру α -домена VHL и характерным для СРП. Тем не менее, у больного с VHL-синдромом типа 2С (наследственная феохромоцитома) описана мутация p.Val170Gly, близкая по свойствам к выявленной нами при sporadic СРП мутации p.Val170Ala [34]. Кроме того, замена валина на гидрофильный остаток (p.Val170Asp) обнаружена и другими авторами при sporadic СРП [17]. Как видно из приведенных данных, сходство аминокислотных замен совсем не означает фенотипическую идентичность проявлений мутаций. На фенотип мутации VHL могут влиять гены-модификаторы. Например, размер герминальных делеций экзонов VHL и прилегающих к ним участков влияют на риск развития СРП при VHL-синдроме типа I. Если в область делеции, наряду с экзоном 1, попадает ген HSPC300, расположенный проксимальнее VHL, то риск СРП достоверно ниже, чем при делеции только гена VHL [35]. До недавнего времени VHL был единственным геном, точковые мутации в котором обнаружены в половине случаев СРП. Новые технологии полногеномного секвенирования значительно упростили поиск генов, мутации в которых часто встречаются в опухолях почки и участвуют в канцерогенезе СРП наряду с VHL. В частности, в результате секвенирования экзона на платформе GAIx “Illumina” в 41% образцов СРП определены точковые мутации гена PBRM1, которые встречаются независимо от мутаций VHL. Как и соматические мутации в гене VHL, мутации PBRM1 не имеют “горячих точек”, они распределены по всем экзонам и приводят к инактивации гена. Ген PBRM1 кодирует белок, участвующий в ремоделировании хроматина. Эти данные позволяют предположить, что канцерогенез СРП ассоциирован не только с функциональными эпигенетическими нарушениями, но в ряде случаев прямо связан с мутациями в генах, кодирующих белки, непосредственно участвующие в формировании структуры хроматина [36]. Проведенное нами изучение новых мутаций VHL при sporadic СРП может использоваться при диагностике синдрома Хиппеля-Линдау типов 1 и 2В,

если выявляемые герминальные мутации отсутствуют в базах данных, но приводят к таким же изменениям кодирующей части гена, как и описанные здесь соматические мутации. Окончательная диагностика VHL-синдрома, учитывающая результаты молекулярно-генетического тестирования, имеет большое значение для мониторинга течения заболевания и его лечения. Во-первых, это дает основание регулярно обследовать органы-мишени и выявлять опухоли на досимптоматической стадии, чтобы затем их своевременно удалять. Во-вторых, тактика хирургического вмешательства различается при спорадическом и наследственном СРП. Спорадические опухоли удаляют сразу после постановки диагноза и определения объема оперативного вмешательства, что зачастую позволяет полностью вылечить больного. Однако при VHL-синдроме опухоли часто развиваются в обеих почках на протяжении всей жизни носителя герминальной мутации. В этих условиях приходится находить баланс между необходимостью удаления первичных опухолей до того, как они дадут отдаленные метастазы, и сохранением функции почек в течение как можно большего времени [4, 37]. Таким образом, данные о типах и локализации мутаций при наследственном и спорадическом РП могут дополнять друг друга в качестве информации об участках *VHL*, связанных с СРП.

В настоящее время генетическая детерминированность развития злокачественных опухолей не вызывает сомнения. Это относится и к СРП, значительная часть случаев которого связана с мутациями в гене *VHL*. Нами проведен поиск и охарактеризованы соматические мутации в этом гене. Мутации выявлены в 93 образцах, причем большинство из них идентифицированы впервые. Показано, что примерно у 40% больных мутации *VHL* встречаются уже на первой стадии заболевания, но не ассоциированы с прогрессией и метастазированием опухоли. Охарактеризовано распределение мутаций различного типа в кодирующей части *VHL* и участки локализации мутаций без сдвига рамки считывания относительно границ критических областей. Мутации *VHL* рассмотрены в контексте недавно открытых генов-кандидатов СРП и соответствия соматических мутаций спорадического СРП герминальным мутациям при VHL-синдроме. Молекулярно-генетические исследования, направленные на поиск маркеров злокачественных новообразований, представляют собой одну из приоритетных задач молекулярной медицины. Анализ соматических мутаций *VHL*, выполненный нами, вместе с изучением иммуногистохимических особенностей злокачественных опухолей почки позволит расширить возможности лабораторной диагностики как при наследственном, так и при спорадическом СРП.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям: грант Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-418.2009.7), и Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” (ГК 02.740.11.0089).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arai E., Kanai Y. 2011. Genetic and epigenetic alterations during renal carcinogenesis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **4**, 58–73.
2. Hansel D.E. 2006. Genetic alterations and histopathologic findings in familial renal cell carcinoma. *Histol. Histopathol.* **21**, 437–444.
3. Cheng L., Zhang S., McLennan G.T., et al. 2009. Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification, differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms. *Hum. Pathol.* **40**, 10–29.
4. Sudarshan S., Linehan W.M. 2006. Genetic basis of cancer of the kidney. *Semin. Oncol.* **33**, 544–551.
5. Richards F.M. 2001. Molecular pathology of von Hippel-Lindau disease and the VHL tumor suppressor gene. *Expert Rev. Mol. Med.* **265**, 4A.
6. Kim W.Y., Kaelin W.G. 2004. Role of *VHL* gene mutation in human cancer. *J. Clin. Oncol.* **22**, 4991–5004.
7. Brauch H., Weirich G., Brieger J., et al. 2000. *VHL* alterations in human clear cell renal cell carcinoma: association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Res.* **60**, 1942–1948.
8. Yao M., Yoshida M., Kishida T., et al. 2002. *VHL* tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 1569–1575.
9. Patard J.J., Rioux-Leclercq N., Masson D., et al. 2009. Absence of *VHL* gene alteration and high VEGF expression are associated with tumor aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma. *British J. Cancer.* **101**, 1417–1424.
10. Алексеев Б.Я., Шегай П.В. 2007. Таргетная терапия распространенного рака почки. *Онкоурология.* **4**, 6–11.
11. Sambrook J., Russell D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual (3rd ed.)*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Lab. Press.
12. Херрингтон С., Макги Дж. 1999. *Молекулярная клиническая диагностика*. М.: Мир.
13. Kuwai T., Kitadai Y., Tanaka S., et al. 2004. Mutation of the von Hippel-Lindau (*VHL*) gene in human colorectal carcinoma: association with cytoplasmic accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha. *Cancer Sci.* **95**, 149–153.
14. Михайленко Д.С., Курьинин Р.В., Попов А.М. и соавт. 2008. Инактивация гена *VHL* при спорадическом светлоклеточном раке почки. *Молекуляр. биология.* **42**, 71–77.
15. Choueiri T.K., Vaziri S.A., Jaeger E., et al. 2008. Von Hippel-Lindau gene status and response to vascular en-

- dothelial growth factor targeted therapy for metastatic clear cell renal cell carcinoma. *J. Urol.* **180**, 860–866.
16. Banks R.E., Tirukonda P., Taylor C., et al. 2006. Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (*VHL*) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Res.* **66**, 2000–2011.
 17. O'Brien M.N., Luijt R.B., Rooijen E., et al. 2010. Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. *Hum. Mutat.* **31**, 521–537.
 18. Gossage L., Eisen T. 2010. Alterations in *VHL* as potential biomarkers in renal-cell carcinoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **7**, 277–288.
 19. Nickerson M.L., Jaeger E., Shi Y., et al. 2008. Improved identification of von Hippel-Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin. Cancer Res.* **14**, 4726–4734.
 20. Cho H.J., Ki C.S., Kim J.W. 2009. Improved detection of germline mutations in Korean *VHL* patients by multiple ligation-dependent probe amplification analysis. *J. Korean Med. Sci.* **24**, 77–83.
 21. Hoebeek J., Luijt R., Poppe B., et al. 2005. Rapid detection of *VHL* exon deletions using real-time quantitative PCR. *Lab. Invest.* **85**, 24–33.
 22. Hattori K., Teranishi J., Stolle C., et al. 2006. Detection of germline deletions using real-time quantitative polymerase chain reaction in Japanese patients with von Hippel-Lindau disease. *Cancer Sci.* **97**, 400–405.
 23. Jiang Y., Zhang W., Kondo K., et al. 2003. Gene expression profiling in a renal cell carcinoma cell line: dissecting *VHL* and hypoxia-dependent pathways. *Mol. Cancer Res.* **1**, 453–462.
 24. Cowey C.L., Rathmell W.K. 2009. *VHL* gene mutations in renal cell carcinoma: role as a biomarker of disease outcome and drug efficacy. *Curr. Oncol. Rep.* **11**, 94–101.
 25. Atkins M.B., Choueiri T.K., Cho D., et al. 2009. Treatment selection for patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer.* **115**, 2327–2333.
 26. Rathmell W.K., Chen S. 2008. *VHL* inactivation in renal cell carcinoma: implications for diagnosis, prognosis and treatment. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **8**, 63–73.
 27. Kaelin W.G. 2009. Treatment of kidney cancer. *Cancer.* **115**, 2262–2272.
 28. Montani M., Heinimann K., Teichman A., et al. 2010. *VHL*-gene deletion in single renal tubular epithelial cells and renal tubular cysts: further evidence for a cyst-dependent progression pathway of clear cell renal carcinoma in von Hippel-Lindau disease. *Am. J. Surg. Pathol.* **34**, 806–815.
 29. Lolkema M.P., Mans D.A., Ulfman L.H., et al. 2008. Allele-specific regulation of primary cilia function by the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Eur. J. Hum. Genet.* **16**, 73–78.
 30. Hasani-Ranjbar S., Amoli M.M., Ebrahim-Habibi A., et al. 2009. Mutation screening of *VHL* gene in a family with malignant bilateral pheochromocytoma: from isolated familial pheochromocytoma to von Hippel-Lindau disease. *Familial Cancer.* **8**, 465–471.
 31. Patocs A., Gergics P., Balogh K., et al. 2008. Ser80Ile mutation and a concurrent Pro25Leu variant of the *VHL* gene in an extended Hungarian von Hippel-Lindau family. *BMC Med. Genet.* **9**, 29.
 32. Ong K.R., Woodward E.R., Killick P., et al. 2007. Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease. *Hum. Mutat.* **28**, 143–149.
 33. Bangiyeva V., Rosenbloom A., Alexander A.E., et al. 2009. Differences in regulation of tight junctions and cell morphology between *VHL* mutations from disease subtypes. *BMC Cancer.* **9**, 229.
 34. Srirangalingam U., Khoo B., Walker L., et al. 2009. Contrasting clinical manifestation of *SDHB* and *VHL* associated chromaffin tumors. *Endocrine-Related Cancer.* **16**, 515–525.
 35. McNeill A., Rattenberry E., Barber R., et al. 2009. Genotype-phenotype correlations in *VHL* exon deletions. *Am. J. Med. Genet.* **149A**, 2147–2151.
 36. Varela I., Tarpey P., Raine K., et al. 2011. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene *PBRM1* in renal carcinoma. *Nature.* **469**, 539–542.
 37. Rasmussen A., Alonso E., Ochoa A., et al. 2010. Uptake of genetic testing and long-term tumor surveillance in von Hippel-Lindau disease. *BMC Med. Genet.* **11**, 4.