

**Mutationsanalyse des *VHL*-Tumorsuppressorgens vor dem  
Hintergrund der erblichen *VHL*-Erkrankung und  
Karzinogenexposition beim sporadischen  
Nierenzellkarzinom**

**Dissertation**

der Fakultät für Biologie  
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

vorgelegt

von

**Bettina Klein**

aus Bietigheim-Bissingen

**2003**

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Oktober 2003

Dekan: Dr. H.-U. Schnitzler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. N. Blin

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H. Brauch

Die vorliegende Arbeit wurde am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie in Stuttgart unter Anleitung von Priv.-Doz. Dr. H. Brauch durchgeführt und aus Mitteln der Robert Bosch Stiftung (Stuttgart), der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) BR 1509/7-1 und der US Environmental Protection Agency (EPA) CR 826535-01, finanziert.

Bedanken möchte ich mich bei:

Frau **Priv.-Doz. Dr. H. Brauch** für die Vergabe des Themas, die zahlreichen Hilfestellungen, Ratschläge und Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit und der Veröffentlichung der Ergebnisse sowie die Möglichkeit auf internationalen Kongressen Erfahrungen sammeln zu dürfen. Besonders danken möchte ich ihr für die ausgesprochen angenehme und motivierende Arbeitsatmosphäre,

Herrn **Prof. Dr. M. Eichelbaum** für die Möglichkeit, diese Arbeit am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie durchführen zu können,

Herrn **Prof. Dr. N. Blin** vom Institut für Humangenetik der Universität Tübingen für sein Interesse an dieser Arbeit und seine Bereitschaft zur wissenschaftlichen Betreuung von Seiten der Fakultät für Biologie der Universität Tübingen,

Herrn **Dr. G. Weirich** vom Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München (Klinikum rechts der Isar) für seine wissenschaftliche Kollaboration in allen Aspekten dieser Arbeit und für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts,

Herrn **Prof. D. Engelhardt** von der Ludwig Maximilians Universität München (Klinikum Großhadern) für die klinischen Daten der untersuchten VHL2C-Familie,

Herrn **Prof. Dr. T. Brüning** vom Berufsgenossenschaftlichen Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin in Bochum und Herrn **Prof. Dr. Dr. H.M. Bolt** sowie Frau **Dr. M. Lammert** vom Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund für die Überlassung der Nierenkarzinomgewebe und der epidemiologischen und arbeitsmedizinischen Daten für die Trichlorethylen-assoziierten Studien,

Herrn **Dr. I. Kuzmin** vom Laboratory of Immunobiology des National Cancer Institute-Frederick Cancer Research and Development Center (NCI-FCRDC) in Frederick, Maryland, USA, für die freundliche Überlassung der in einen Vektor klonierten *VHL*-cDNA und der humanen Nierenzellkarzinom-Zelllinie 786-0,

Frau **S. Brod** für die hervorragende technische Unterstützung im Labor und die angenehme Zusammenarbeit,

**allen Kolleginnen und Kollegen** des Dr. Margarete Fischer-Bosch-Instituts für Klinische Pharmakologie für die freundschaftliche und hilfsbereite Zusammenarbeit, insbesondere bei Herrn **B. Borstel**, Frau **Dr. S. Brenner**, Frau **Dr. M. Buck**, Herrn **Dr. J. Fischer**, Herrn **Dr. P. Fritz**, Frau **Dr. C. Justenhoven**, Frau **Dr. E. Schäffeler** und Herrn **Dr. R. Wolbold**,

**meinem Mann** für seine reichlich vorhandene Geduld und seine Bereitschaft, auf so manche gemeinsamen Abende oder Wochenenden zu verzichten,

**dem Rest meiner Familie** für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

*Für meine Eltern*

## Abkürzungen

A	Adenin
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
AP2	Aktivatorprotein 2
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
bp	Basenpaar
C	Cytosin
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
CCRCC	<i>clear cell renal cell carcinoma</i> , klarzelliges Nierenzellkarzinom
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CI	<i>confidence intervall</i> , Unsicherheitsbereich für die Schätzung eines statistischen Parameters
CpG	Cytidin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotide
CUL2	Protein aus der Familie der Culline
Cys	Cystein
dam <sup>+</sup>	Bezeichnung für einen methylierenden Bakterienstamm
DHPLC	<i>denaturing high performance liquid chromatography</i> , denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
DMEM	Zellkulturmedium ( <i>Dulbecco's modified Eagles medium</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat (N = A, T, G, C)
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
<i>del</i>	Deletion
dest.	destilliert
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>acid</i> )
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
g	Gramm
G	Guanin
G0/G1	Ruhephasen des Zellzyklus (innerhalb der Interphase)
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5-triphosphat
h	Stunde ( <i>hour</i> )
H	Hämalaun
HE	Hämalaun-Eosin (Färbelösung für Gewebeschnitte)
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i> , Hypoxie-induzierbarer Faktor
His	Histidin
HPLC	<i>high performance liquid chromatographie</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
Ile	Isoleucin
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid
<i>ins</i>	Insertion

---

kb	Kilobasenpaare (1 kb = 1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton; Dalton: Einheit der relativen Molekülmasse, entspricht der Masse eines Wasserstoffatoms ( $1.68 \times 10^{-27}$ kg)
lacZ	$\beta$ -Galaktosidase-Gen
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
Lys	Lysin
min	Minute
m	Meter
M	Mol
mg	Milligramm
ml	Mililiter
mM	Millimolar
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ M	Mikromolar
MCS	<i>multiple cloning site</i> , Polylinker in einem Klonierungsvektor
Met	Methionin
MOPS	3-[N-morpholino]-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MSI	Mikrosatelliten-Instabilität
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NAT	N-Acetyl-Transferase
OD	Optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> , humaner Wachstumsfaktor aus Thrombozyten
P-gp	P-Glykoprotein, <i>MDR1</i> -Genprodukt
Phe	Phenylalanin
Pol.	Polymerase
Pro	Prolin
pVHL	von Hippel-Lindau-Protein, Genprodukt des <i>VHL</i>
p-Wert	Ergebnis eines statistischen Signifikanztests
Ran	<i>Ras associated nuclear protein</i>
RCC	<i>renal cell carcinoma</i> , Nierenzellkarzinom
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>acid</i> )
RT	Raumtemperatur
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
S-Phase	Phase im Zellzyklus bei der die Erbinformation der Zelle verdoppelt wird
SCF	Multiproteinkomplex in der Hefe, der sich aus den Komponenten Skp1-Cdc53/CUL1-F-Box zusammensetzt
SDM	<i>site directed mutagenesis</i> , ortsgerichtete Mutagenese
Ser	Serin
Sp1	Transkriptionsfaktor ( <i>specificity protein 1</i> )
SSCP	<i>single strand conformation polymorphism</i> , DNA-Einzelstrang-Polymorphismus
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TE	Tris-EDTA
TEAA	Triethylammoniumacetat
Thr	Threonin
TRI	Trichlorethylen, Trichlorethen, Trichloräthylen, C <sub>2</sub> HCl <sub>3</sub>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Tyr	Tyrosin
UTR	untranslatierte Region eines Gens
U	Unit
UV	ultraviolett
Val	Valin
VCB	ternärer Komplex aus den Proteinen pVHL, Elongin C und Elongin B
VCBC	Komplex aus den Proteinen pVHL, Elongin C, Elongin B sowie CUL2
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VHL	von Hippel-Lindau(-Erkrankung)
<i>VHL</i>	von Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgen
V	Volt oder römisch fünf
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsprozent
wt	Wildtyp
X	„andere Aminosäure“
ZNS	Zentralnervensystem



## Inhaltsverzeichnis

### 1 Einleitung

1.1	Das <i>VHL</i> -Tumorsuppressorgen und seine Rolle bei der Tumorentstehung .....	1
1.1.1	<i>VHL</i> -Tumorsuppressorgen, VHL-Protein, Funktion und Expression .....	1
1.1.2	VHL-Erkrankung, Subtypen und Genotyp-Phänotyp-Korrelationen .....	12
1.2	Sporadische Nierenzellkarzinome .....	18
1.2.1	Gen-Umwelt-Interaktionen .....	19
1.2.2	Berufliche Trichlorethylen-Exposition und <i>VHL</i> -Gendefekte .....	22
1.3	Zielsetzungen .....	25

### 2 Material und Methoden

2.1	Materialien .....	27
2.2	Patienten und Studienkollektive .....	31
2.2.1	Patienten mit VHL-Erkrankung und VHL-Verdachtsfälle .....	31
2.2.1.1	Patienten nicht verwandter VHL-Familien mit bekannten <i>VHL</i> -Mutationen .....	31
2.2.1.2	VHL-Verdachtsfälle mit unbekanntem <i>VHL</i> -Keimbahnstatus .....	32
2.2.1.3	Familie mit erblichem VHL2C-Phänotyp .....	32
2.2.2	Nicht erkrankte Personen (Kontrollgruppe) .....	34
2.2.3	Patienten mit sporadischem Nierenzellkarzinom .....	34
2.2.3.1	Nierenzellkarzinom-Patienten ohne berufliche Trichlorethylen-Exposition .....	34
2.2.3.2	Nierenzellkarzinom-Patienten mit und ohne beruflicher Trichlorethylen-Exposition einer aktuellen molekular-epidemiologischen Fall-Kontroll-Studie .....	35
2.3	DNA-Isolierung und -Aufbereitung .....	37
2.3.1	DNA-Isolierung aus Blut .....	37
2.3.2	DNA-Isolierung aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe .....	38
2.4	Polymerase-Kettenreaktion .....	40
2.5	Denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie .....	46
2.6	Sequenzierung .....	48
2.7	Klonierung .....	51
2.8	Generierung von <i>VHL</i> -Mutationskonstrukten .....	54
2.9	Herstellung kompetenter Zellen .....	58
2.10	Kultur der humanen Nierenzellkarzinom-Zelllinie 786-0 .....	58
2.11	Statistische Analysen .....	59

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1	<i>VHL</i> -Keimbahnmutationsanalysen mittels DHPLC und Sequenzierung .....	60
3.2	Identifizierung einer <i>VHL</i> -Doppelmutation in einer VHL2C-Familie .....	65
3.2.1	<i>VHL</i> -Mutations-Plasmidkonstrukte für zukünftige Expressionsstudien .....	66
3.3	Möglicher Zusammenhang zwischen einer beruflichen Karzinogenexposition und dem Auftreten von <i>VHL</i> -Genschäden .....	67
3.3.1	Qualitätsunterschiede der DNA aus archivierten Geweben .....	68
3.3.2	Somatische <i>VHL</i> -Mutationsanalysen an Nierenkarzinomgeweben von Patienten mit und ohne ehemaliger beruflicher Trichlorethylen-Exposition .....	70
3.3.2.1	Somatische <i>VHL</i> -Mutationen bei nicht Trichlorethylen-exponierten Patienten .....	70
3.3.2.2	Somatische <i>VHL</i> -Mutationen bei Trichlorethylen-exponierten Patienten .....	72
3.3.2.3	Vergleich der somatischen <i>VHL</i> -Mutationsmuster .....	75
3.3.2.4	Vergleich des Tumor-Diagnosealters .....	79
3.3.3	Somatische <i>VHL</i> -Mutationsanalyse bei Nierenzellkarzinom-Patienten im Rahmen einer aktuellen molekular-epidemiologischen Fall-Kontroll-Studie zur Klärung eines Trichlorethylen-assoziierten Nierenkrebsrisikos .....	81
3.3.4	Klonierung von PCR-Produkten mit multiplen <i>VHL</i> -Mutationen .....	85
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1	<i>VHL</i> -Mutationen und ihre Detektierbarkeit in der Keimbahn .....	88
4.2	Genotyp-Phänotyp-Korrelationen .....	92
4.3	Somatische <i>VHL</i> -Mutationen in Nierenzellkarzinomen von Patienten mit und ohne ehemaliger beruflicher Trichlorethylen-Exposition .....	97
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	104
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	107
<b>7</b>	<b>Literatur</b> .....	110
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	129

# 1 Einleitung

## 1.1 Das *VHL*-Tumorsuppressorgen und seine Rolle bei der Tumorentstehung

Das von Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgen (*VHL*) ist durch homologe Mutationen an der Entstehung erblicher und nicht erblicher (sporadischer) Tumoren, insbesondere der Niere (Nierenzellkarzinome, *renal cell carcinoma*, RCC), aber auch der Nebenniere (Phäochromozytome), beteiligt. Der derzeitige Wissensstand umfasst detaillierte Kenntnisse über das *VHL* und sein Mutationsspektrum sowie über das VHL-Protein (pVHL) und seine biologische Funktion. Es gilt heute als gesichert, dass ein Zwei-Schritt-Inaktivierungsmechanismus einen Funktionsverlust initiiert, der die Tumorgenese antreibt, wobei davon ausgegangen wird, dass das pVHL als Schlüsselfaktor an verschiedenen zellulären Regulationssystemen partizipiert. Ein umfangreiches Spektrum molekularbiologisch nachweisbarer *VHL*-Keimbahnmutationen und deren augenscheinliche Folgeeffekte auf das pVHL liefern die Voraussetzung für weitreichende Forschungsarbeiten. Diese beschäftigen sich in erster Linie mit der Aufklärung der komplexen Genotyp-Phänotyp-Zusammenhänge, die dazu beitragen sollen, die grundlegenden Mechanismen der Tumorgenese besser zu verstehen.

### 1.1.1 *VHL*-Tumorsuppressorgen, VHL-Protein, Funktion und Expression

Das *VHL* wurde mit Hilfe genetischer Kopplungsanalysen bei Familien mit der erblichen VHL-Erkrankung, einem Multiorgan-Tumorsyndrom mit autosomal dominantem Erbgang, identifiziert. Voraussetzung dafür war die detaillierte Kenntnis der phänotypischen Ausprägung dieser Erkrankung (1.1.2). Bereits zu Beginn des letzten Jahrhunderts wurde die familiäre Häufung retinaler Angiome (*Angiomatosis retinae*) und deren erblicher Charakter von dem Heidelberger Ophthalmologen Eugen von Hippel beschrieben (von Hippel, 1904) und ihr morphologischer Zusammenhang zu ZNS-Hämangioblastomen von dem schwedischen Pathologen Arvid Lindau erkannt (Lindau, 1926). Später wurde nach und nach offenkundig, dass zu diesem Syndrom auch Tumoren anderer Organe gehören, die in Abbildung 1 aufgeführt sind (Lamiell *et al.*, 1989; Melmon *et al.*, 1964). Die beiden Kliniker von Hippel und Lindau waren namensgebend für die VHL-Erkrankung, die in der Literatur als von Hippel-Lindau'sche Erkrankung, von Hippel-Lindau-Syndrom oder VHL-Syndrom sowie im Verzeichnis des *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) unter dem Eintrag MIM 193300<sup>1</sup> aufgeführt wird. Auch das 1993 identifizierte, krankheitsverursachende Gen wurde nach den beiden Erstbeschreibern des klinischen Syndroms benannt.

<sup>1</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/dispmim?193300>

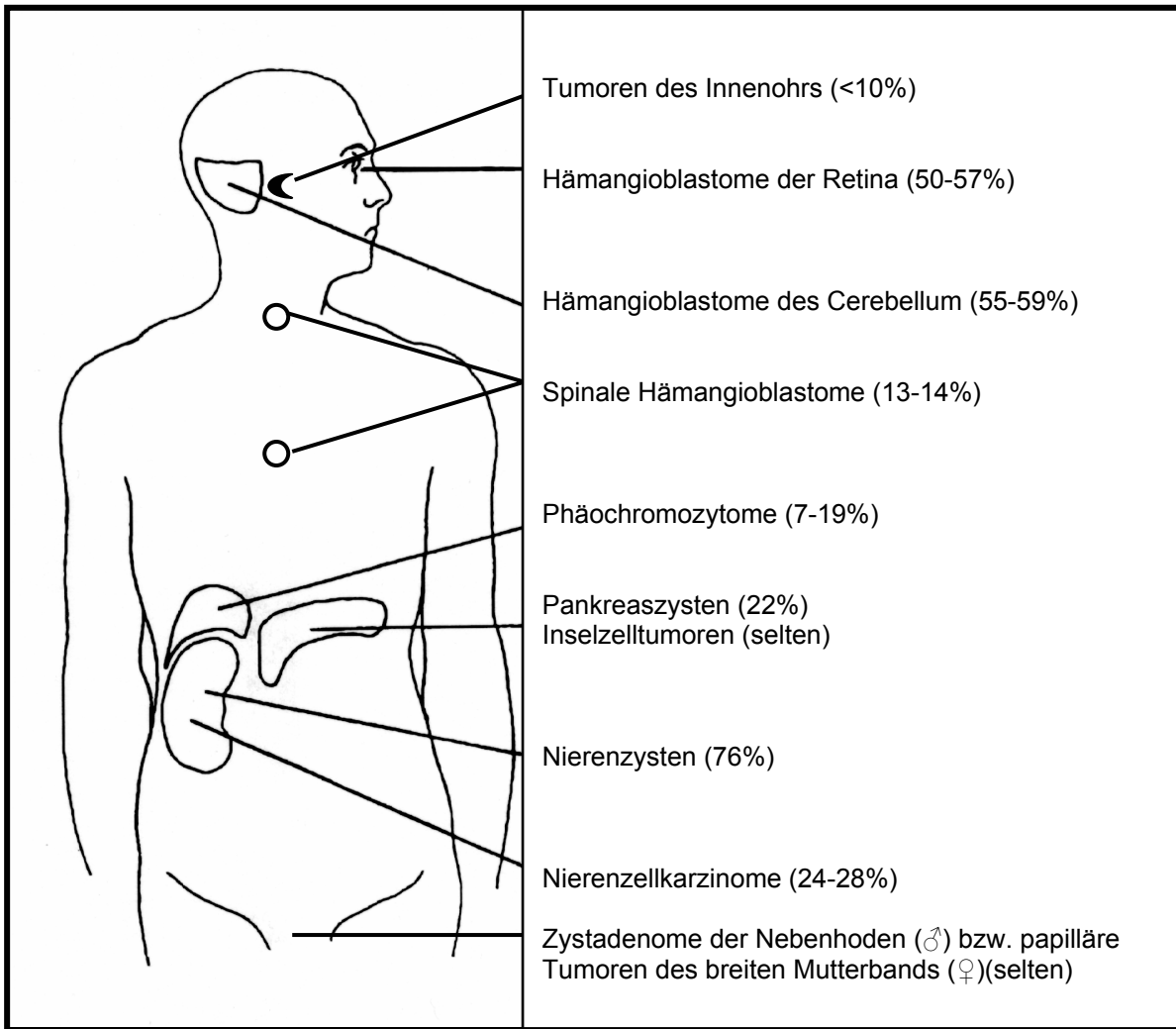


Abbildung 1: VHL-Syndrom. Lokalisation und Häufigkeiten der auftretenden Läsionen

### **VHL-Struktur**

Das *VHL* befindet sich auf Chromosom 3 in der Region p25-26 und erstreckt sich über eine Länge von 12-15 kb (GenBank, *accession no.* AF010238) (Lerman, 2001). Es umfasst drei Exons und einen 5'- bzw. einen 3'-untranslatierten Bereich (5'- bzw. 3'-UTR) (Kuzmin *et al.*, 1995). In der 160 bp-langen Promotorregion (GenBank, *accession no.* AF01238) befinden sich keinerlei TATA- und CCAAT-Boxen. Weitere auffällige Strukturmerkmale des Gens sind je zwei Transkriptions- und Translationsstartstellen sowie ein ungewöhnlich hoher GC-Gehalt von mehr als 70% (Herman *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurden Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1 und AP2 identifiziert (Kuzmin *et al.*, 1995; Zatyka *et al.*, 2002). Der Umfang der cDNA-Sequenz (GenBank *accession no.* L15409) wurde zunächst mit 852 Nukleotiden angegeben (Latif *et al.*, 1993). Nach der Identifizierung des Promotorbereichs (Kuzmin *et al.*, 1995) und des ersten Translationsstartcodons konnte die

cDNA jedoch auf 639 Nukleotide eingegrenzt werden. Sie beginnt heute an der Nukleotidposition 214 der ursprünglichen cDNA-Sequenz (Kuzmin *et al.* 1995). Dennoch beziehen sich alle weiteren Positionsangaben auf die ursprüngliche cDNA-Sequenz. Die 3'-UTR enthält SINE-Elemente (*small interspersed nuclear elements*) (Renbaum *et al.*, 1996), denen wegen ihres Einflusses auf die Biosynthese von Reparaturenzymen eine gewebespezifische, zelluläre Schutzfunktion zugeschrieben wird (Li *et al.*, 2001).

Die *VHL*-mRNA kommt in zwei verschiedenen Spleißvarianten vor. Während die Isoform I (4,7 kb) als das für die Tumorsuppression verantwortliche Transkript gilt, wird der Isoform II wegen des Fehlens der Exon 2-Sequenz eine vermutlich pathologische Funktion zugeschrieben (Iliopoulos *et al.*, 1998; Richards *et al.*, 1996). Sie führt auf Proteinebene zu einer *in-frame*-Deletion von 41 Aminosäuren.

Neben den beiden alternativen Transkriptionsstartstellen und den beiden mRNA-Spleißmöglichkeiten existieren auch zwei alternative Translationsstartstellen (Codon 1 und Codon 54, *MET*, Abb. 2), so dass ausgehend von der mRNA-Isoform I entweder ein Protein aus 213 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa (pVHL<sub>30</sub>) gebildet wird oder ein Protein aus 160 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 19 kDa (pVHL<sub>19</sub>) (Iliopoulos *et al.*, 1998). Sowohl pVHL<sub>30</sub> als auch pVHL<sub>19</sub> können die Tumorgenese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (in der Nacktmaus) supprimieren (Blankenship *et al.*, 1999; Iliopoulos *et al.*, 1998; Schoenfeld *et al.*, 1998). Auch immunhistochemisch sind sie nicht voneinander unterscheidbar. Im folgenden Text umfasst der Begriff pVHL daher stets beide Protein-Isoformen.

Das *VHL* ist evolutionär hoch konserviert. Es ließ sich bei Säugern (Gao *et al.*, 1995; Whaley *et al.*, 1994; Woodward *et al.*, 2000), *Drosophila melanogaster* (Adryan *et al.*, 2000; Aso *et al.*, 2000) und *Caenorhabditis elegans* (Woodward *et al.*, 2000) nachweisen. Wahrscheinlich sind die ersten 54 Aminosäuren trotz einer auffälligen, achtfachen Wiederholung des Aminosäurepentamers Gly-X-Glu-Glu-X (Abb. 2) für die Eigenschaft der Tumorsuppression eher von untergeordneter Bedeutung, da dieses wiederholte Motiv bei Nagern fehlt (Duan *et al.*, 1995a; Gao *et al.*, 1995).

### ***Expression des VHL-Proteins***

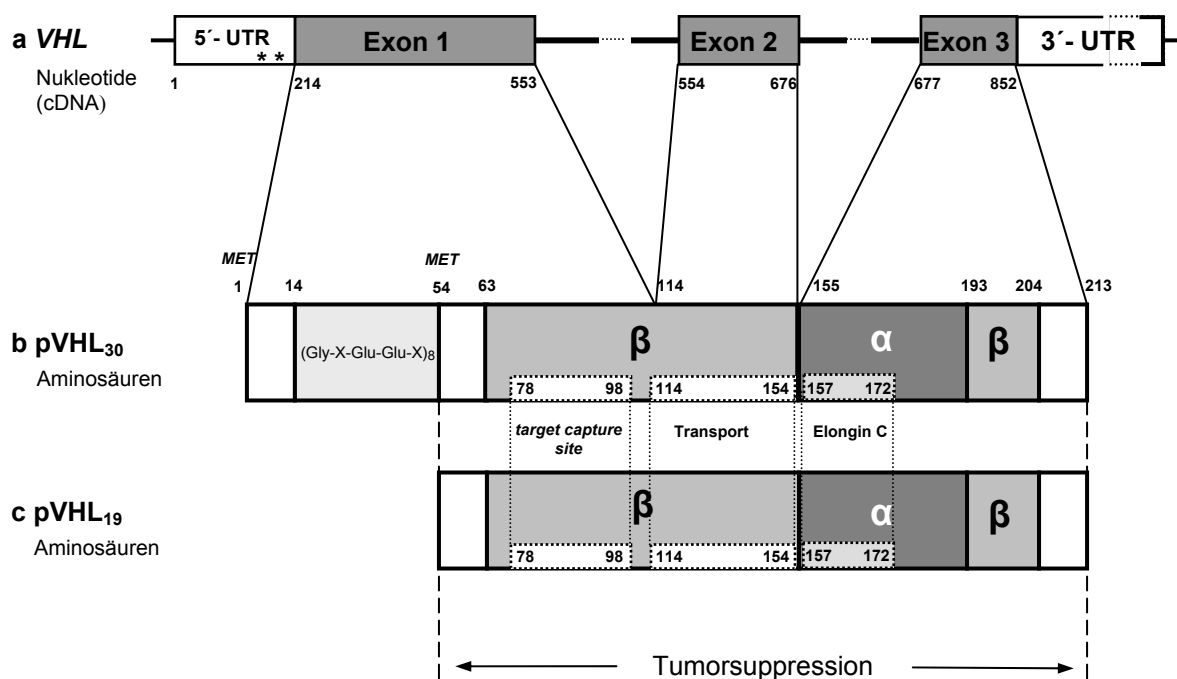
Das pVHL wird ubiquitär in fötalen und adulten Geweben exprimiert (Latif *et al.*, 1993). Es ist verstärkt in Epithelzellen nachweisbar, die den Verdauungs-, Respirations- und Urogenitaltrakt auskleiden, ebenso in sezernierenden Zellen der exokrinen und endokrinen Organe, in parenchymatischen Zellen viszeraler Organe sowie in Herzmuskelzellen,

Neuronen, Lymphozyten und Makrophagen (Corless *et al.*, 1997; Los *et al.*, 1996; Sakashita *et al.*, 1999). Nennenswert ist seine ausgeprägte Expression im Urogenitalsystem, Gehirn, Rückenmark und Bronchialepithel, in den sensorischen Ganglien und den Augen. Sie stellen die überwiegenden Zielgewebe der beim VHL-Syndrom betroffenen Organe dar (Richards *et al.*, 1996). Während der Embryonalentwicklung wird die mRNA des *VHL* verstärkt in bestimmten Zellen der Niere exprimiert. Dazu gehören die Zellen der proximalen Tubuli und der Henle'schen Schleifen (Kessler *et al.*, 1995; Richards *et al.*, 1996). Das pVHL ist sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus nachweisbar (Corless *et al.*, 1997; Duan *et al.*, 1995a; Latif *et al.*, 1993; Los *et al.*, 1996). Der Transport aus dem Nukleus in das Zytoplasma ist vermutlich eine Voraussetzung für die Funktion des Proteins. Dieser Transport ist ATP-abhängig und wird offensichtlich von einem Exon 2-kodierten pVHL-Bereich (Aminosäuren 114-154, Abb. 2) vermittelt. Liegt dieser Bereich deletiert vor, bleibt die Lokalisation des pVHL auf den Nukleus beschränkt (Lee *et al.*, 1999). Auch Ran, eine abundante, multifunktionale GTPase, die den Transport vieler Proteine im und aus dem Nukleus regelt, steht im Verdacht, am Transport des pVHL beteiligt zu sein (Azuma *et al.*, 2000). Außerdem ist dieser Transport wahrscheinlich vom Zellzyklus abhängig, da das pVHL in konfluenten Zellen und in solchen, die sich in der G0/G1-Phase befinden, hauptsächlich im Nukleus nachweisbar ist. In subkonfluenten Zellen sowie in Zellen, die sich in der S-Phase befinden, kommt das pVHL dagegen vor allem im Zytoplasma vor (Ye *et al.*, 1998).

### **Funktionen des VHL-Proteins**

Der Nachweis der tumorsupprimierenden Funktion des pVHL wurde zunächst durch genetische Manipulation *in vitro* und *in vivo* erbracht. Nach Wiedereinführung einer intakten *VHL*-Kopie in humane *VHL*<sup>-/-</sup> RCC-Zellen der Zelllinien A498 und UMRC6 konnte das Wachstum der Tumorzellen *in vitro* deutlich unterdrückt werden (Chen *et al.*, 1995a). Noch eindrucksvoller waren Experimente mit der Nacktmaus, in denen die tumorigenen Eigenschaften humaner *VHL*<sup>-/-</sup>-RCC-Zellen der Zelllinie 786-0 durch eine transiente Transfektion mit einer intakten *VHL*-Kopie supprimiert werden konnten (Iliopoulos *et al.*, 1995). Weitere Hinweise auf die funktionellen Eigenschaften des pVHL ergaben verschiedene Tiermodelle: *VHL*<sup>-/-</sup>-knockout-Mäuse starben *in utero* 10-12 Tage nach der Befruchtung aufgrund einer fehlerhaften Gefäßentwicklung der Plazenta (Gnarra *et al.*, 1997). *VHL*<sup>+/-</sup>-Mäuse entwickelten sich hingegen normal und zeigten selbst im Alter von 15 Monaten keine Tumorentwicklung. Bei *Drosophila melanogaster* konnte durch Reduktion der *VHL*-Expression mittels RNA-Interferenz eine Veränderung in der Entwicklung des

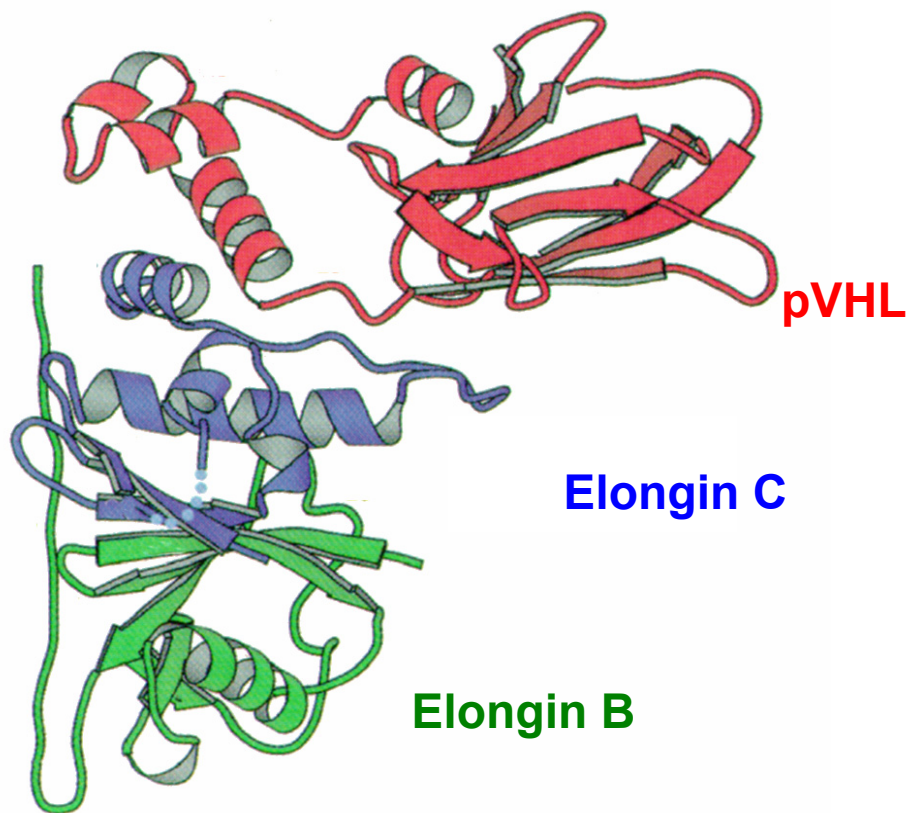
Atmungstraktes gezeigt werden. Die Reduktion der Expression führte zum Abbruch größerer Tracheen und zur Bildung von Ausstülpungen in den kleineren Tracheenästen. Eine *VHL*-Überexpression scheint dagegen die Bildung der Tracheen völlig zu unterdrücken (Adryan *et al.*, 2000). Es wird vermutet, dass das pVHL die Zellmotilität an den Enden der Tracheenverzweigungen herabsetzt. Die Bildung der Blutgefäße bei Säugetieren könnte analog zur Bildung des Trachealsystems von *Drosophila melanogaster* reguliert werden. Beim Menschen vermutet man, dass das pVHL die Morphogenese des fötalen Nierengewebes kontrolliert, indem es die HGF (*hepatocyte growth factor* bzw. *scatter factor*)-induzierte Verästlung des Tubulusgewebes hemmt (Koochekpour *et al.*, 1999).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Tumorsuppressorgens *VHL* (a) und der beiden korrespondierenden Protein-Isoformen *pVHL*<sub>30</sub> (b) und *pVHL*<sub>19</sub> (c), die sich aufgrund alternativer Translationsstartstellen (*MET*) in ihrer Länge unterscheiden. *pVHL*<sub>30</sub> ist um 53 Aminosäuren länger als *pVHL*<sub>19</sub> und umfasst ein achtfach wiederholtes Aminosäurepentamer (Gly-X-Glu-Glu-X) mit unbekannter Funktion. Die kodierende Sequenz des *VHL* beginnt mit dem Nukleotid 214 und umfasst 639 Nukleotide, verteilt auf drei Exons. Die Intronbereiche sind durch unterbrochene Linien zwischen den Exons dargestellt. Im 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR) befinden sich zwei Transkriptionsstartstellen (\*\*). Der 3'-untranslatierte Bereich (3'-UTR) ist durch unterbrochene Linien verkürzt dargestellt. In den beiden *pVHL*-Isoformen befinden sich zwei funktionell wichtige Proteindomänen, die α-Domäne (Aminosäuren 155-192 mit α-helikaler Struktur), in der eine Bindungsregion für Elongin C liegt (Aminosäuren 157-172), und die β-Domäne (Aminosäuren 63-154 mit β-Faltblattstruktur und Aminosäuren 193-204 mit α-helikaler Struktur), die vermutlich eine weitere Bindungsregion für Substratmoleküle wie z. B. HIF-α enthält (*target capture site*, Aminosäuren 78-98). Eine weitere Region der β-Domäne (Aminosäuren 114-154) ist wahrscheinlich für den *pVHL*-Transport aus dem Zellkern verantwortlich.

### **Der VCBC-Komplex und Bindungspartner des pVHL**

Erste Protein-Kopräzipitationsexperimente ermittelten die Proteine Elongin B und Elongin C als Bindungspartner des pVHL (Duan *et al.*, 1995a; Duan *et al.*, 1995b; Kibel *et al.*, 1995). Diese beiden Proteine sind als regulatorische Untereinheiten des heterotrimeren Transkriptions-Elongations-Faktors Elongin (früher als SIII bezeichnet) bekannt (Bradsher *et al.*, 1993a; Bradsher *et al.*, 1993b), der sich aus den drei Elonginen A,B und C zusammensetzt. Im ternären pVHL/Elongin C/Elongin B (VCB)-Komplex (Abb. 3) bindet pVHL an Elongin C und dieses wiederum an Elongin B (Aso *et al.*, 1995; Duan *et al.*, 1995b; Kibel *et al.*, 1995).

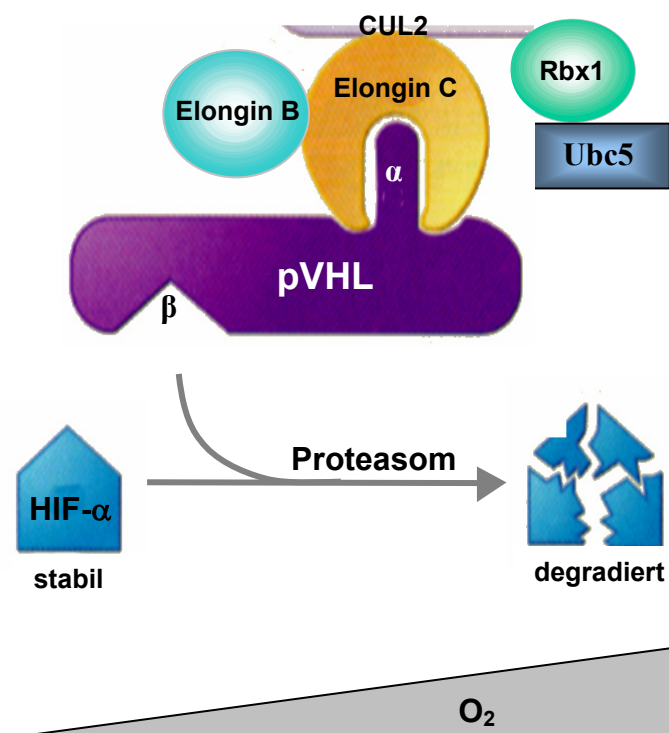


**Abbildung 3:** Sekundärstruktur des ternären pVHL/Elongin C/Elongin B-Komplex. Das VHL-Protein (pVHL) bindet an Elongin C und dieses wiederum an Elongin B.  $\alpha$ -helikale Strukturen sind in Form von Spiralen,  $\beta$ -Faltblattstrukturen in Form von Pfeilen dargestellt (Stebbins *et al.* 1999).

Es wurde vermutet, dass Elongin A durch das pVHL aus dem Komplex mit Elongin C und B verdrängt wird. Dadurch könnte die durch die RNA-Polymerase II vermittelte Elongation der mRNA von noch nicht identifizierten Zielgenen gestört werden, da die RNA-Polymerase II in Abwesenheit von Elongin A an verschiedenen Stellen entlang des zu transkribierenden Gens pausiert (Aso *et al.*, 1995; Duan *et al.*, 1995b). Inzwischen bestätigen sich jedoch auch Hinweise auf eine Destabilisierung Hypoxie-induzierter mRNA-Transkripte durch das pVHL (Gnarra *et al.*, 1996; Iliopoulos *et al.*, 1996; Siemeister *et al.*, 1996).



Genauere Hinweise auf mögliche pVHL-Funktionen ergaben sich aus der Identifizierung weiterer Bindungspartner des VCB-Komplexes (Abb. 4). Eine Schlüsselrolle nimmt dabei CUL2 aus der Genfamilie der Culline ein (Lonergan *et al.*, 1998; Pause *et al.*, 1997). Dessen Hefe-Homolog Cdc53/CUL1 ist Bestandteil des sogenannten SCF-Komplexes, einem Multiproteinkomplex, der sich aus den Komponenten Skp1, Cdc53/CUL1 und dem F-Box-Protein zusammensetzt. Die Aufgabe des SCF-Komplexes ist die Markierung von Substratmolekülen mittels Ubiquitin für den kontrollierten Abbau im Proteasom (Hershko *et al.*, 1998; Kamura *et al.*, 1999; Skowyra *et al.*, 1999).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Funktion des VHL-Proteins (pVHL) im pVHL/Elongin C/Elongin B/CUL2-Komplex. Die  $\beta$ -Domäne des pVHL kann unter normalen Sauerstoffbedingungen in der Zelle Zielmoleküle wie z.B. die Untereinheit HIF- $\alpha$  des Transkriptionsfaktors HIF binden. Die  $\alpha$ -Domäne des pVHL vermittelt durch eine direkte Interaktion mit Elongin C und dieses über weitere Protein-Interaktionen mit Elongin B, CUL2, Rbx1 und Ubc5, die Ubiquitinierung von HIF- $\alpha$ . Das auf diese Weise markierte pVHL-Substrat wird im Proteasom abgebaut. Sowohl Hypoxie als auch pVHL-Defekte verhindern den kontrollierten Abbau von HIF- $\alpha$  und anderen pVHL-Substraten.

Der SCF-Komplex der Hefe zeigt deutliche Homologien zum humanen pVHL/Elongin C/Elongin B/CUL2-Komplex (VCBC-Komplex), bei dem Elongin C die Rolle des Skp1-Proteins übernimmt, CUL2 die des Cdc53/CUL1-Proteins und Elongin B die des Ubiquitins (Pause *et al.*, 1999; Stebbins *et al.*, 1999).

In Übereinstimmung mit den F-Box-Proteinen der Hefe verleiht hierbei das pVHL dem VCBC-Komplex Substratspezifität (Iwai *et al.*, 1999) und trägt auf diese Weise gemeinsam mit weiteren Faktoren wie Rbx1 und Ubc5 (Abb. 4) sowie E2 und NEDD8 zur Ausprägung einer Ubiquitin-Ligase-E3-Aktivität bei (Iwai *et al.*, 1999; Kamura *et al.*, 2000; Liakopoulos *et al.*, 1999; Lisztwan *et al.*, 1999; Tyers *et al.*, 1999).

Weitere Hinweise auf diese nach zwei Seiten hin ausgeprägten Bindungseigenschaften des pVHL ergaben sich aus der Röntgenstrukturanalyse (Stebbins *et al.*, 1999) mit deren Hilfe  $\alpha$ -Helix- und  $\beta$ -Faltblatt-Strukturelemente bestimmt werden konnten sowie deren räumliche Anordnung (Abb. 3) (Berman *et al.*, 2000; Stebbins *et al.*, 1999).

Die vorwiegend aus  $\beta$ -Faltblatt-Strukturelementen aufgebaute und entsprechend benannte  $\beta$ -Domäne umfasst die aminoterminalen Aminosäuren 63-154 sowie die carboxyterminalen Aminosäuren 193-204 und wird von Bereichen der Exons 1, 2 und 3 kodiert (Abb. 2). Die aus mehreren  $\alpha$ -Helices bestehende  $\alpha$ -Domäne des pVHL (Aminosäuren 155-192) wird von Exon 3 kodiert und ist insbesondere im Bereich der Aminosäuren 157-172 für die Elongin C-Bindung verantwortlich (Abb. 2) (Kibel *et al.*, 1995; Kishida *et al.*, 1995; Lonergan *et al.*, 1998; Ohh *et al.*, 1999). Die  $\beta$ -Domäne weist im Bereich der Aminosäuren 78-98 eine bei VHL-Patienten häufig mutierte Region auf, die nicht an der Bindung von Elongin C beteiligt ist (Stebbins *et al.*, 1999). Vermutlich ist sie an der Bindung von Substraten wie HIF- $\alpha$  beteiligt (*target capture site*, Abb. 2). Die meisten bisher identifizierten *VHL*-Keimbahnmutationen wirken sich entweder auf die  $\alpha$ - oder die  $\beta$ -Domäne des pVHL aus, was deren Bedeutung für die Tumorsuppression widerspiegelt (Stebbins *et al.*, 1999).

### ***Substrate des VHL-Proteins***

Bislang konnten nur wenige Proteine identifiziert werden, die mögliche pVHL-Substrate darstellen. Das bekannteste dieser Proteine ist der Transkriptionsfaktor HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*), ein bHLH/PAS (*basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim*)-Protein, das an der Transkription von Genen des Energiestoffwechsels, der Angiogenese sowie der Apoptose beteiligt ist (Carmeliet *et al.*, 1998; Dang *et al.*, 1999). Dabei binden seine beiden Untereinheiten HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  (auch *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*, ARNT) als Heterodimer an HRE (*hypoxia response elements*) in der DNA (Dang *et al.*, 1999; Semenza, 1998; Wenger *et al.*, 1997). Die Aktivität von HIF-1 wird dabei in erster Linie von der Stabilität der HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit bestimmt, die wiederum vom pVHL beeinflusst wird. Herrschen normale Sauerstoffbedingungen in der Zelle, wird HIF-1 $\alpha$  rasch v.a. über den VCBC-Komplex im Proteasom abgebaut (Huang *et al.*, 1998; Kallio *et al.*, 1999; Salceda *et*

*al.*, 1997) und ist daher nicht nachweisbar (Cockman *et al.*, 2000; Kamura *et al.*, 2000; Maxwell *et al.*, 1999; Ohh *et al.*, 2000). Die HIF-1 $\beta$ -Untereinheit wird hingegen konstitutiv exprimiert (Salceda *et al.*, 1997). Unter Hypoxie kommt es allerdings zu einer Anreicherung von HIF-1 $\alpha$  in der Zelle und somit zu einer Zunahme des Heterodimers HIF-1 (Huang *et al.*, 1996; Salceda *et al.*, 1997; Sutter *et al.*, 2000). Diese pVHL-vermittelte HIF-Regulation könnte den Gefäßreichtum pVHL-defekter Tumoren erklären. In diesen Tumoren simuliert das defekte pVHL den Zustand einer Zelle unter Hypoxie. Der genaue Mechanismus der Signalübertragung ist noch nicht vollständig geklärt, bislang wird ein Ferroprotein als Sauerstoff-Sensor vermutet (Acker *et al.*, 2002). Eine wichtige Rolle scheinen 2-Oxoglutarat-abhängige Oxygenasen zu spielen, die bestimmte Aminosäuren in der ODD (*oxygen-dependent degradation domain*) hydroxylieren, einer etwa 200 Aminosäuren umfassenden Sequenz des HIF-1 $\alpha$ -Proteins. Diese Hydroxylierungen stellen eine Voraussetzung für die Interaktion zwischen HIF-1 $\alpha$  und pVHL dar (Acker *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003). Eine Dysregulation von HIF-1 durch Mutationen im *VHL* kann durch die fehlende oder unzureichende Bindung des pVHL an Elongin C oder an HIF-1 $\alpha$  erklärt werden. In beiden Fällen kann HIF-1 $\alpha$  nicht mehr über den VCBC-Komplex abgebaut werden und reichert sich in der Zelle an (Cockman *et al.*, 2000; Kamura *et al.*, 2000; Ohh *et al.*, 2000; Tanimoto *et al.*, 2000), ein Effekt, der durch die Einführung einer intakten *VHL*-Kopie umkehrbar ist (Krieg *et al.*, 2000b; Maxwell *et al.*, 1999).

Ein weiteres pVHL-Substrat ist Fibronectin, ein extrazelluläres Glykoprotein, das an Integrine der Zelloberfläche bindet und eine wichtige Rolle bei der Metastasierung und Migration von Tumorzellen spielt. pVHL scheint die korrekte Ausbildung der Fibronectinmatrix zu beeinflussen, da Fibronectin zwar an intaktes, nicht aber an mutiertes pVHL binden kann (Ohh *et al.*, 1998). Diese Bindung ist eine Voraussetzung für den Fibronectin-Transport an die Zelloberfläche. In RCC-Zellen und Maus-Fibroblasten mit defektem pVHL ist der Aufbau der extrazellulären Fibronectinmatrix massiv gestört und kann auch nur partiell durch die Wiedereinführung von intaktem pVHL wiederhergestellt werden (Ohh *et al.*, 1998). Somit scheint auch die Integrität der Fibronectinmatrix direkt über das Ubiquitin-Ligase-System reguliert zu werden. Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass das bislang nicht näher charakterisierte p220-Protein, das in pVHL-Kopräzipitationsexperimenten identifiziert wurde, Fibronectin entspricht (Iwai *et al.*, 1999).

### **Zelluläre Folgeeffekte der HIF-1-Dysregulation**

Die zellulären Folgeeffekte von Mutationen im *VHL* stehen in direktem Zusammenhang zu den Folgeeffekten einer Dysregulation von HIF-1. Inzwischen sind mehr als 30 Gene mit HRE-Elementen bekannt, die von HIF-1 aktiviert werden können (Maxwell *et al.*, 2001; Wykoff *et al.*, 2000b). Zu diesen gehören beispielsweise die Gene für den Wachstumsfaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Brieger *et al.*, 1999; Damert *et al.*, 1997; Forsythe *et al.*, 1996; Levy *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1995), den Glukosetransporter GLUT1 (Iyer *et al.*, 1998; Semenza, 2000), die Carboanhydrasen CA IX und CA XII (Ivanov *et al.*, 2001; Wykoff *et al.*, 2000a), den Wachstumsfaktor PDGF (*platelet-derived growth factor*) (Iliopoulos *et al.*, 1996) sowie das Hormon Erythropoetin (Krieg *et al.*, 1998).

Eine erhöhte VEGF-Expression wird z.B. für die starke Vaskularisierung bestimmter VHL-assoziiierter Tumoren und sporadischer RCC verantwortlich gemacht. Erhöhte VEGF-Werte konnten darüber hinaus im Serum weiterer Tumorpatienten (Jacobsen *et al.*, 2000) sowie im Stroma verschiedener Tumoren nachgewiesen werden (Chan *et al.*, 1999; Leung *et al.*, 1998; Wizigmann-Voos *et al.*, 1995). Für die VEGF-Überexpression sind daher neben der pVHL-vermittelten HIF-1-Dysregulation vermutlich noch weitere Ursachen verantwortlich, wie z.B. eine posttranskriptionelle und translationelle Stabilisierung der VEGF-mRNA (Acker *et al.*, 2002).

*In vitro* Untersuchungen mit Reportergenkonstrukten zeigten außerdem eine durch *VHL*-Mutationen induzierte mögliche Beteiligung des Transkriptionsfaktors Sp1 an der Aktivierung des *VEGF*-Promotors (Cohen *et al.*, 1999; Mukhopadhyay *et al.*, 1997). Normalerweise verhindert die Interaktion der pVHL- $\beta$ -Domäne mit Sp1 dessen Phosphorylierung durch die Proteinkinase C- $\zeta$  (PKC- $\zeta$ ) (Pal *et al.*, 1998). Ein Defekt im *VHL*, der die Interaktion von pVHL mit Sp1 verhindert, ermöglicht die Phosphorylierung von Sp1 und trägt vermutlich auf diese Weise zu überhöhten VEGF-Werten bei.

Auch die in RCC-Tumorgeweben beobachtete erhöhte Expression der beiden Carboanhydrasen CA IX und CA XII wird Funktionsdefekten des pVHL zugeschrieben. Diese beiden Enzyme katalysieren die reversible Umwandlung von Kohlendioxid und Wasser zu Kohlensäure bzw. zu Hydrogencarbonat und Protonen. Sie sind in der unmittelbaren Umgebung der Tumorzellen an der Senkung des pH-Werts beteiligt (Ivanov *et al.*, 1998; Yamagata *et al.*, 1998) und begünstigen auf diese Weise Tumorwachstum und Metastasierung (Ivanov *et al.*, 2001). Durch die Wiedereinführung einer intakten *VHL*-Kopie in pVHL-defekte Tumorzellen konnte die Expression der beiden Carboanhydrasen inhibiert werden (Ivanov *et al.*, 1998).

Eine mögliche Rolle weiterer Angiogenese- und Metastasierungsfaktoren wie z.B. die des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivators (uPA), einem Kontrollfaktor bei der Plasminsynthese (Los *et al.*, 1999), oder die der *transforming growth factors* TGF- $\beta$ 1 und TGF- $\alpha$  (Ananth *et al.*, 1999; Knebelmann *et al.*, 1998) sowie eine Beteiligung des pVHL am Abbau inkorrekt gefalteter und prozessierter Proteine (Gorospa *et al.*, 1999) wird diskutiert.

Aufgrund dieser Forschungsarbeiten zur Ermittlung der pVHL-Funktionen und der Konsequenzen von *VHL*-Mutationen gelten der Wachstumsfaktor VEGF und die beiden Carboanhydrasen inzwischen als vielversprechende Zielmoleküle bei der Entwicklung spezifischer Antitumor-Therapeutika. So werden derzeit Tyrosinkinasehemmer wie SU5416 zur VEGF-Unterdrückung getestet (Harris, 2000). Auch spezifische und möglicherweise toxinbeladene Antikörper gegen CA IX und CA XII sowie Carboanhydrase-Inhibitoren wie Azetozolamid werden momentan auf ihre Wirkung überprüft (Divgi *et al.*, 1998; Ivanov *et al.*, 2001). Ein humanisierter monoklonaler Antikörper (G250) gegen die Carboanhydrase CA IX wird bereits in Phase I- und Phase II-Studien erprobt (Divgi *et al.*, 1998).

Ein weiterer vielversprechender Ansatz zur Tumorprävention ist die Tumorstimmung. Sie befindet sich allerdings noch am Beginn der experimentellen Phase (Berg *et al.*, 2000). Allen Ansätzen gemeinsam ist die Etablierung einer wirksamen Therapie für das therapieresistente klarzellige RCC (*clear-cell renal cell carcinoma*, CCRCC) (Nathan *et al.*, 2002). Die bisherigen Erfolge treiben die Suche nach weiteren spezifischen pVHL-Substratmolekülen und die Erforschung ihrer *downstream*-Effekte in VHL-assoziierten Tumoren voran. Dabei könnten auch, wie im Folgenden erläutert, gezielte Genotyp-Phänotyp-Korrelationen ausschlaggebend sein.

## 1.1.2 VHL-Erkrankung, Subtypen und Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

### *VHL-Syndrom*

Die Inzidenz des autosomal dominant vererbten VHL-Syndroms liegt zwischen 1:38 900 (Neumann *et al.*, 1991) bzw. 1:53 000 (Maher *et al.*, 1991) Lebendgeburten. Kinder eines erkrankten Elternteils tragen ein 50%iges Erkrankungsrisiko. Ursächlich ist dabei eine *VHL*-Keimbahnmutation, die in ca. 15% der Fälle *de novo* entsteht (Richards *et al.*, 1995). Keimbahnmutationen werden an alle Zellen des Organismus weitergegeben. In seltenen Fällen tritt das Mutationsereignis während der Embryonalentwicklung in einer somatischen Zelle auf, was zur Entstehung von Mosaik-Typen führt (Sgambati *et al.*, 2000). In diesem Fall ist nur ein Teil der Zellen von einer *VHL*-Mutation betroffen, was sich erschwerend auf die Diagnose einer VHL-Erkrankung auswirken kann. Die Mutationsrate wird auf  $2-4 \times 10^{-6}$  pro Gen und Generation geschätzt (Maher *et al.*, 1991). Die Penetranz liegt in einem Lebensalter von 60 Jahren bei über 95% (Glavac *et al.*, 1996; Neumann, 1987). Weltweit gibt es ungefähr 32 000 Träger einer *VHL*-Keimbahnmutation<sup>1</sup>, davon leben ca. 2 000 in Deutschland<sup>2</sup>.

Die häufigsten Tumoren des VHL-Syndroms (Abb. 1) sind Angiome der Retina (50-57%) und ZNS-Hämangioblastome im Cerebellum (55-59%) und im Rückenmark (13-14%). Besonders schwerwiegend sind potentiell maligne RCC (24-28%) und hormonaktive adrenale oder extraadrenale Phäochromozytome (7-19%). Letztere werden auch als Paragangliome bezeichnet. Häufig treten auch Zysten in der Niere (76%) und im Pankreas (22%) auf, seltener Inselzellkarzinome des Pankreas und Leberzysten. In den letzten Jahren konnte auch ein Zusammenhang zwischen dem VHL-Syndrom und dem Auftreten von Endolymphsacktumoren des Innenohrs (10%), Zystadenomen der Nebenhoden bei Männern (10-15%) bzw. gelegentlichen gutartigen papillären Tumoren des breiten Mutterbands bei Frauen (Decker *et al.*, 2001) aufgezeigt werden. Sowohl das Erkrankungsalter als das Krankheitsbild variieren stark, was zu einer ausgeprägten phänotypischen Vielfalt des Syndroms führt. Die ersten Krankheitssymptome sind meist retinale Angiome und ZNS-Hämangioblastome in einem mittleren Erkrankungsalter von  $25 \pm 12$  bzw.  $29 \pm 11$  Jahren. Für Phäochromozytome beträgt das mittlere Erkrankungsalter  $28 \pm 13$  Jahre, für RCC  $39 \pm 11$  Jahre und für Pankreastumoren  $37 \pm 12$  Jahre (Glenn *et al.*, 1990). Insgesamt scheinen die VHL-Läsionen in beliebiger Kombination aufzutreten, innerhalb von VHL-Familien werden jedoch in der Regel ähnliche Phänotypen beobachtet.

---

<sup>1</sup> [www.vhl.org](http://www.vhl.org)

<sup>2</sup> [www.hippel-lindau.de](http://www.hippel-lindau.de)

### **VHL-Subtypen**

Für ein besseres Verständnis der phänotypischen Vielfalt beim VHL-Syndrom werden die verschiedenen Phänotypen zunächst in die zwei Subphänotypen VHL Typ 1 und VHL Typ 2 (Tab. 1) unterteilt (Zbar *et al.*, 1996). Dabei kommt den Phäochromozytomen als Unterscheidungsmerkmal eine wichtige Schlüsselrolle zu. Diese treten in etwa 7-19% der VHL-Familien auf (Chen *et al.*, 1995b; Glenn *et al.*, 1990; Lamiell *et al.*, 1989; Neumann, 1987). Im Erkrankungsspektrum der VHL Typ 1-Familien können alle VHL-Läsionen bis auf Phäochromozytome auftreten. VHL-Familien mit Phäochromozytomen werden hingegen dem VHL Typ 2 zugeordnet, ungeachtet weiterer Tumoren, die noch in dieser Familie auftreten.

Da sich VHL Typ 2-Familien jedoch in der Kombination ihrer Phäochromozytome mit anderen VHL-Läsionen unterscheiden, werden ihre Krankheitsbilder noch weiter in die Subtypen VHL2A, VHL2B und VHL2C unterteilt. Während sich VHL2A- und VHL2B-Familien bezüglich der Häufigkeit von ZNS-Manifestationen nicht vom VHL Typ 1 unterscheiden, variieren sie untereinander in der Häufigkeit von RCC. Im Gegensatz zu VHL2A-Familien, bei denen RCC nur in Ausnahmefällen auftreten, sind VHL2B-Familien durch das Auftreten dieser Tumoren in ca. 32% der Patienten charakterisiert (Brauch *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995b; Glavac *et al.*, 1996; Zbar *et al.*, 1996). Beim VHL2C-Phänotyp handelt es sich um einen „minimalen“ Phänotyp, d.h. es treten außer Phäochromozytomen keine weiteren Tumoren auf (Neumann *et al.*, 1995; Ritter *et al.*, 1996).

**Tabelle 1:** VHL-Phänotypen und damit assoziierte *VHL*-Keimbahndefekte

<b>VHL-Phänotyp</b>	<b>Häm<sup>a</sup></b>	<b>RCC<sup>b</sup></b>	<b>Phäo<sup>c</sup></b>	<b>Vorherrschender Mutationstyp</b>
<b>1</b>	+	+	-	Deletionen <i>nonsense</i> -Mutationen <i>frameshift</i> -Mutationen
<b>2</b>				
<b>VHL2A</b>	+	(-) <sup>d</sup>	+	<i>missense</i> -Mutationen
<b>VHL2B</b>	+	+	+	<i>missense</i> -Mutationen
<b>VHL2C</b>	-	-	+	<i>missense</i> -Mutationen

a Hämangioblastome    c Phäochromozytome  
b Nierenzellkarzinome    d RCC nur in Ausnahmefällen

### **Genotyp-Phänotyp-Korrelationen**

Die VHL-Erkrankung ist nicht nur klinisch sondern auch genetisch sehr heterogen. Über 300 verschiedene Keimbahnmutationen in über 500 VHL-Familien wurden bereits beschrieben (Brauch *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995b; Crossey *et al.*, 1994; Glavac *et al.*, 1996; Latif *et al.*, 1993; Maher *et al.*, 1996; Richards *et al.*, 1995; Whaley *et al.*, 1994; Zbar *et al.*, 1996) und in verschiedene Datenbanken eingegeben, wie z.B. die Datenbank des *National Cancer Institute* (NCI), Bethesda, MD, USA<sup>1</sup>, die Datenbank des *Hopital Necker Enfants Malades*, Paris, Frankreich<sup>2</sup> (Beroud *et al.*, 1998), die *Human Gene Mutation Database*, Cardiff, Großbritannien<sup>3</sup> (Krawczak *et al.*, 2000) sowie die *Human Genome Variation Database*<sup>1</sup> (Ramensky *et al.*, 2002). Von diesen *VHL*-Keimbahnmutationen finden sich 47 in VHL-Familien mit überwiegend deutscher Abstammung (Glavac *et al.*, 1996; Klein *et al.*, 2001).

Aus den bisher bekannten Zusammenhängen ergeben sich Fragestellungen zur Erforschung von Genotyp-Phänotyp-Beziehungen. Da dieser Aspekt auch einen Schwerpunkt der hier vorliegenden Arbeit darstellt, werden im Folgenden insbesondere die bekannten Genotyp-Phänotyp-Beziehungen in den Vordergrund gestellt. Die Vielfalt der genetischen Informationen liefert zusammen mit der Einteilung des VHL-Syndroms in verschiedene Subphänotypen die Grundlage für aussagefähige Genotyp-Phänotyp-Korrelationen. Mit ihrer Hilfe sollen Faktoren in den VHL-Zielorganen identifiziert werden, die durch die Störung der pVHL-Funktion fehlreguliert werden. Diese Faktoren könnten als spezifische Zielmoleküle der Entwicklung neuer Antitumor-Therapeutika dienen. Darüber hinaus sollen aussagefähige Genotyp-Phänotyp-Korrelationen eine bessere Abschätzung des Risikopotentials bestimmter *VHL*-Keimbahnmutationen ermöglichen.

Um den Genotyp einer VHL-Familie näher zu charakterisieren, wurden die *VHL*-Keimbahnmutationen zunächst in zwei Gruppen unterteilt. Zum einen in große Deletionen, bei denen genetisches Material von mehreren tausend Basenpaaren fehlt. Diese Mutationen können mittels Pulsfeld-Elektrophorese, *southern blot* oder Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) nachgewiesen werden (Pack *et al.*, 1999; Richards *et al.*, 1994; Richards *et al.*, 1993; Stolle *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1993). Zum anderen in Mutationen, die in der kodierenden *VHL*-Sequenz oder den *splice-consensus*-Bereichen vorkommen und meist Punktmutationen sind, die aufgrund ihrer vorhersagbaren Konsequenzen für das Protein

---

<sup>1</sup> <http://web.ncifcrf.gov/research/kidney/vhlor.html>

<sup>2</sup> <http://www.umd.necker.fr:2005/>

<sup>3</sup> <http://uwcmml1s.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/120488.html>



weiter in *missense*-, *nonsense*-, *frameshift*- oder *splice-site*-Mutationen unterschieden werden (Chen *et al.*, 1995b; Crossey *et al.*, 1994; Glavac *et al.*, 1996; Kondo, 1995; Latif *et al.*, 1993; Olschwang *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 2000; Zbar *et al.*, 1996). Diese Mutationen werden in der Regel durch die Sequenzierung von PCR-Produkten nachgewiesen.

Große Deletionen verursachen den partiellen oder kompletten Verlust der Gensequenz, was in einem trunkierten oder gänzlich fehlenden pVHL resultiert. *Nonsense*-Mutationen führen durch die Neubildung eines Stopp-Codons zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese, ebenso wie *frameshift*-Mutationen, bei denen Insertionen oder Deletionen einzelner Nukleotide (Mikroinsertionen bzw. -deletionen) ein Verschieben des Leserasters bewirken. Von allen Mutationstypen haben die *missense*-Mutationen den scheinbar kleinsten strukturverändernden Effekt auf das pVHL, da der Nukleotidaustausch „nur“ zu einem Aminosäureaustausch führt. In einer Übersicht internationaler Arbeiten des NCI (Abb. 5) wird die Häufigkeit von großen *VHL*-Deletionen mit 21%, von *missense*-Mutationen mit 58%, von *nonsense*-Mutationen mit 7% und von Mikrodeletionen bzw. -insertionen mit 14% angegeben<sup>2</sup>.

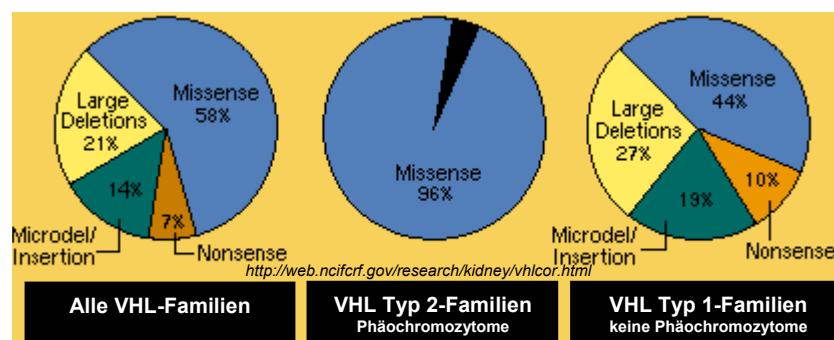


Abbildung 5: *VHL*-Keimbahnmutationen und ihre Häufigkeiten in *VHL* Typ 1- und *VHL* Typ 2-Familien

Unter Berücksichtigung sowohl der Erkrankungs- als auch der Mutationstypen ergab eine erste Genotyp-Phänotyp-Einschätzung der *VHL*-Familien, dass bis auf wenige Ausnahmen in allen *VHL* Typ 2-Familien *missense*-Mutationen auftreten (96%). Dagegen zeichnen sich *VHL* Typ 1-Familien durch ein Spektrum von *missense*-Mutationen (44%), großen Deletionen (27%), Mikrodeletionen und -insertionen (19%) sowie *nonsense*-Mutationen (10%) aus (Abb. 5).

Die zunächst scheinbar einfache Beziehung zwischen *missense*-Mutationen und der Ausprägung von Phäochromozytom-assoziierten *VHL* Typ 2-Phänotypen führte dazu, dass sich Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zunächst auf den *VHL* Typ 2 konzentrierten. Dabei

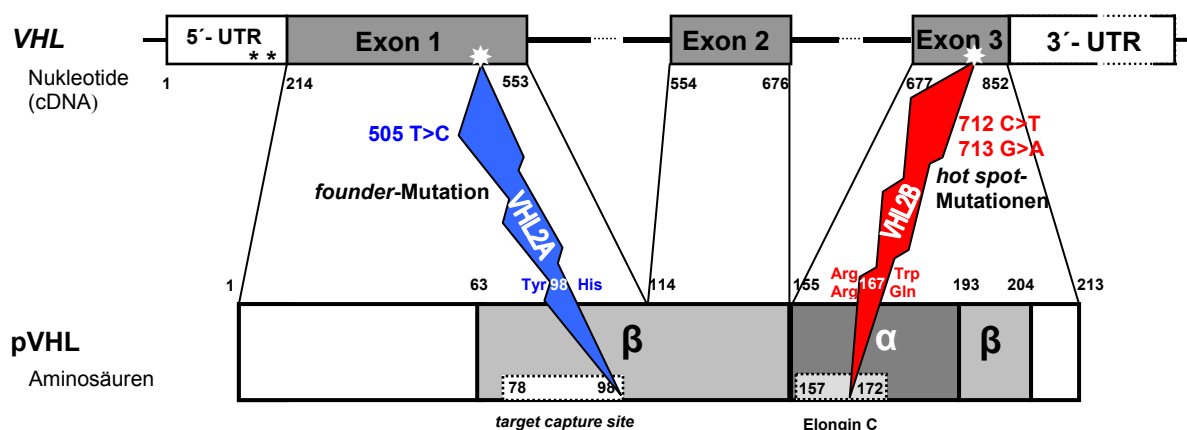
<sup>1</sup> <http://hgvdbase.cgb.ki.se/>

<sup>2</sup> <http://web.ncifcrf.gov/research/kidney/vhlor.html>

konnten Zusammenhänge zwischen kritischen *VHL*-Mutationen und VHL2A- bzw. VHL2B-Phänotypen aufgeklärt werden (Tab. 2).

Eine häufig beobachtete VHL2A-Mutation ist eine T>C-Transition an der Nukleotidposition 505 im Exon 1 des *VHL* (505 T>C), die in der  $\beta$ -Domäne des pVHL einen Austausch der Aminosäure Tyrosin gegen Histidin an der Aminosäureposition 98 (Tyr98His) zur Folge hat (Abb. 6). Diese Mutation wurde in 16 miteinander verwandten Familien aus dem Schwarzwald und aus Pennsylvania (USA) nachgewiesen (Brauch *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995b; Tisherman *et al.*, 1993) und wird einem *founder*-Effekt zugeschrieben, d.h. diese beiden Familien gehen auf einen gemeinsamen Vorfahren zurück. Insgesamt gehören dieser „Großfamilie“ über 70 VHL-Patienten an (Tab. 2), weshalb die Genotyp-Phänotyp-Korrelation mit den häufigen, gutartigen Phäochromozytomen und nur in Einzelfällen auftretenden RCC als gesichert betrachtet werden kann (Brauch *et al.*, 1995). Weitere VHL2A-Genotyp-Phänotyp-Beziehungen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Im Gegensatz zum VHL2A-charakteristischen Tyr98His-Austausch der 505 T>C-*founder*-Mutation in der  $\beta$ -Domäne des pVHL, wirken sich zwei typische VHL2B-Mutationen auf die  $\alpha$ -Domäne des pVHL aus. Es handelt sich dabei um die Mutationen 712 C>T (Arg167Trp) und 713 G>A (Arg167Gln), die dieselbe Aminosäure betreffen (Abb. 6) (Chen *et al.*, 1995b; Klein *et al.*, 2001; Zbar *et al.*, 1996). Auch in diesem Fall ist die Genotyp-Phänotyp-Interpretation zuverlässig, da beide Mutationen ebenfalls in über 70 Patienten aus verschiedenen VHL-Familien nachgewiesen wurden (Tab. 2). Im Gegensatz zur erwähnten VHL2A-*founder*-Mutation treten diese beiden VHL2B-assoziierten Mutationen unabhängig voneinander in einem *hot spot* für Mutationen auf, der sich im Exon 3 des *VHL* befindet. Der entscheidende Unterschied zur VHL2A-*founder*-Mutation ist ihr offensichtlich stärkerer Effekt auf das Nierenepithel (Chen *et al.*, 1996; Zbar *et al.*, 1996). Den unterschiedlichen VHL-Phänotypen VHL2A und VHL2B liegen damit verschiedene *missense*-Mutationen in der Keimbahn zugrunde. Diese betreffen nicht nur unterschiedliche Positionen im *VHL*, sondern wirken sich auch auf die unterschiedlichen Bindungsdomänen des pVHL aus (Chen *et al.*, 1995b). Dies kann Störungen der pVHL-Funktion zur Folge haben, die sich möglicherweise organ- bzw. gewebespezifisch auswirken.



**Abbildung 6:** Lokalisation und phänotypische Effekte verschiedener *VHL*-Keimbahnmutationen. Die mutierten Nucleotide sind in Form weißer Sterne dargestellt und die davon betroffenen Aminosäuren mit Pfeilen angezeigt. Die 505 T>C-*founder*-Mutation (blau) verursacht über einen Tyr98His-Austausch in der *target capture site* der pVHL- $\beta$ -Domäne einen VHL2A-Phänotyp. Die *hot spot*-Mutationen 712 C>T und 713 G>A (rot) haben einen Arg167Trp bzw. einen Arg167Gln-Austausch in der Elongin C-Bindungsregion der pVHL- $\alpha$ -Domäne zur Folge und verursachen einen VHL2B-Phänotyp.

Unklar ist bisher, wie sich der gewebespezifische VHL2C-Phänotyp, bei dem nur Phäochromozytome auftreten, in diese Betrachtungsweise einordnen lässt. Aufgrund einer bekannten C>G-Transversion an der Nucleotidposition 775, die einen Leu188Val-Austausch verursacht, sollte hier ebenso wie beim VHL2B-Phänotyp eine Störung der  $\alpha$ -Domäne des pVHL erfolgen. Dennoch treten im Zusammenhang mit diesem Genotyp weder RCC noch ZNS-Tumoren auf. Die Aufklärung ursächlicher Zusammenhänge für die Ausprägung dieses „minimalen“ VHL2C-Phänotyps ist ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit.

**Tabelle 2:** VHL Typ 2-assoziierte *VHL*-Keimbahnmutationen in großen VHL-Familien

Mutation	pVHL-Domäne, Aminosäureaustausch	Phänotyp	Phäochromozytom-Patienten	Referenzen
<b>505 T&gt;C</b>	$\beta$ : Tyr <b>98</b> His	VHL2A	73	Brauch <i>et al.</i> (1995)
<b>547 T&gt;C</b>	$\beta$ : Tyr <b>112</b> His	VHL2A	19	Chen <i>et al.</i> (1996)
<b>658 G&gt;T</b>	$\beta$ : Ala <b>149</b> Ser	VHL2A	17	Atuk <i>et al.</i> (1998)
<b>709 G&gt;T</b>	$\alpha$ : Val <b>166</b> Phe	VHL2A	7	Gross <i>et al.</i> (1996)
<b>712 C&gt;T</b> <b>713 G&gt;A</b>	$\alpha$ : Arg <b>167</b> Trp $\alpha$ : Arg <b>167</b> Gln	VHL2B	>70 <sup>a</sup>	Chen <i>et al.</i> (1995), Klein <i>et al.</i> (2001) und Stolle <i>et al.</i> (1998)
<b>775 C&gt;G<sup>b</sup></b>	$\alpha$ : Leu <b>188</b> Val	VHL2C	9	Neumann <i>et al.</i> (1995) und Ritter <i>et al.</i> (1996)

a Diese Patienten stammen aus mehreren Familien.

b Diese Mutation wurde als eine singuläre Keimbahnmutation bei zwei miteinander verwandten VHL2C-Familien beschrieben. In der hier vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus eine zweite *VHL*-Keimbahnmutation identifiziert (3.2).

## 1.2 Sporadische Nierenzellkarzinome

Sporadische, d.h. nicht erbliche RCC, machen ca. 3% aller malignen Erkrankungen und 80-90% aller primären Neoplasien der Niere aus (Garnick *et al.*, 1991). Davon entfallen mehr als 70% auf das klarzellige RCC (CCRCC) (Decker *et al.*, 2002). Dieses gilt als ausgesprochen therapieresistent und schnell metastasierend. In industrialisierten Ländern wird ein jährlicher Anstieg der RCC-Inzidenz um 2-3% vermutet (Motzer *et al.*, 1996). In Analogie zu den erblichen RCC wurde gezeigt, dass auch ein Großteil der sporadischen RCC auf homologe *VHL*-Mutationen zurückzuführen ist (Latif *et al.*, 1993; Zbar *et al.*, 1987). Im Hinblick auf die Bedeutung einzelner Mutationen bei der Tumorgenese und ihre Gewebespezifität waren im Rahmen dieser Arbeit insbesondere mögliche Gemeinsamkeiten von Interesse. Daher werden im Folgenden die Grundlagen der *VHL*-assoziierten sporadischen RCC-Tumorgenese näher erläutert.

Eine Reihe von Arbeiten bestätigte das Auftreten somatischer *VHL*-Mutationen in 33% bis 57% der sporadischen RCC (Foster *et al.*, 1994; Gnarrar *et al.*, 1994; Kenck *et al.*, 1996; Shuin *et al.*, 1994; Whaley *et al.*, 1994). Der prozentuale Unterschied ist wahrscheinlich auf eine uneinheitliche histopathologische RCC-Klassifikation zurückzuführen. Erst eine große deutsche Studie (Störkel *et al.*, 1997) an über 200 einheitlich klassifizierten klarzelligen (CCRCC), papillären (chromophilen) und chromophoben RCC sowie gutartigen renalen Onkozytomen bestätigte, dass 45% der CCRCC einen kombinierten Defekt aus *VHL*-Mutation bzw. *VHL*-Hypermethylierung und einem Verlust des kurzen Arms des Chromosoms 3 (3p-Verlust) aufweisen (Brauch *et al.*, 2000). Es gilt daher heute als gesichert, dass etwa die Hälfte aller CCRCC auf den Verlust der tumorsupprimierenden pVHL-Funktion zurückzuführen sind.

Im Gegensatz zu den Keimbahnmutationen bei VHL-Patienten finden sich in sporadischen Tumoren überwiegend *frameshift*-Mutationen, die ein trunkiertes pVHL zur Folge haben. Zudem sind die Mutationen überwiegend im Exon 2 lokalisiert, das eine häufig mutierte thymidinreiche Region (ATT TTT, Codons 147 und 148) enthält (Brauch *et al.*, 2000). Neben dem *VHL* wird die Beteiligung von zwei weiteren potentiellen Tumorsuppressorgenen an der Entstehung von CCRCC diskutiert, die ebenfalls auf dem Chromosom 3 liegen: *RASSF1A* (*RAS association family 1 gene*) (Dreijerink *et al.*, 2001) und *FHIT* (*fragile histidine triad*) (Ramp *et al.*, 2002; Velickovic *et al.*, 2001).

### 1.2.1 Gen-Umwelt-Interaktionen

Im Rahmen der Pathogenese sporadischer RCC interessieren insbesondere die Ursachen der ihnen zugrunde liegenden häufigen *VHL*-Schäden. Die Vermutung liegt nahe, dass Umwelteinflüsse eine Rolle spielen, da heute allgemein angenommen wird, dass die hohe Krebsinzidenz in westlichen Ländern auf schädliche Interaktionen zwischen Gen und Umwelt zurückzuführen ist (Perera, 1996). Insbesondere die Niere ist als Ausscheidungsorgan einer Reihe von wasserlöslichen Metaboliten und Karzinogenen ausgesetzt. Es ist daher denkbar, dass es dabei direkt oder indirekt zu tumorinitiierenden Mutationen im Nierenepithel kommen kann. Als mutationsfördernd werden variable konstitutive Faktoren diskutiert, die Einfluss auf die Zellphysiologie haben könnten. Ähnlich der interindividuellen Unterschiede bei der Metabolisierung von Medikamenten, die als Ursache für das Ansprechen, Nicht-Ansprechen oder eine toxische Reaktion im Rahmen einer medikamentösen Therapie gelten, könnten solche interindividuellen Unterschiede auch für die Konsequenzen eines karzinogenen Stimulus verantwortlich sein (Evans *et al.*, 1999; Perera *et al.*, 2000). Als Ursache für solche unterschiedlichen Reaktionen werden genetische Variationen, sogenannte Polymorphismen, verantwortlich gemacht. Im Gegensatz zu Mutationen in Tumorsuppressorgenen, handelt es sich bei Polymorphismen nicht um krankheitsverursachende Mutationen, sondern um „normale“ Keimbahnvariationen. Diese können zwar eine biologische Funktion modulieren und auf diese Weise Suszeptibilitäten für bestimmte Erkrankungen verursachen, ein kritischer Effekt im Sinne eines erhöhten Tumorrisikos ergibt sich jedoch erst im Zusammenspiel mit bestimmten Umweltfaktoren (Perera, 1996).

Bei der Entschlüsselung des menschlichen Genoms (Lander *et al.*, 2001; McPherson *et al.*, 2001) konnten bereits 1,4 Millionen Polymorphismen identifiziert werden, die einzelne Nukleotide betreffen (*single nucleotide polymorphism*, SNP). Es wird geschätzt, dass im menschlichen Genom ca. alle 1000 Basen ein SNP auftritt. Schätzungsweise 60 000 davon liegen in exonischen Sequenzen (Sachidanandam *et al.*, 2001) und können die Expression von Genen oder die Funktion von Genprodukten beeinflussen. Im Rahmen der Karzinogenese könnten Polymorphismen jener Gene relevant sein, deren Produkte an biochemischen Prozessen wie Fremdstoffaufnahme, -transport, -verteilung, -metabolismus und -ausscheidung beteiligt sind.

Ein eindrucksvolles Beispiel für einen genetischen Polymorphismus mit Einfluss auf das RCC-Risiko ist der *MDR1* (*multi drug resistance*)-Polymorphismus der einen C>T-Austausch an der Nukleotidposition 3435 betrifft. Das *MDR1* kodiert für das transmembranale P-Glykoprotein (P-gp), einen ABC-Transporter, der hydrophobe Peptide und Medikamente

durch die Plasmamembran hindurch aus der Zelle transportiert (Delph, 2002; Gottesman *et al.*, 1996; Schinkel, 1997). Die physiologische Funktion des P-gp ist noch nicht vollständig geklärt, es ist jedoch vorstellbar, dass das P-gp eine intrazelluläre Anreicherung toxischer Substanzen verhindert (Schinkel, 1997). Es wird in der apikalen Membran von Organen mit exkretorischer Funktion exprimiert, unter anderem auch in der Niere (Cordon-Cardo *et al.*, 1990; Thiebaut *et al.*, 1987). Obwohl mit keiner vorhersagbaren Proteinveränderung in Verbindung zu bringen, ist eine *MDR1*-T-Homozygotie an der Nukleotidposition 3435 (*MDR1*<sup>3435</sup>-T-Homozygotie) mit einer verringerten P-gp-Expression im Darmepithel und einer damit verbundenen höheren Aufnahme des P-gp-Substrats Digoxin assoziiert (Hoffmeyer *et al.*, 2000). In einer neueren Fall-Kontroll-Studie wurde gezeigt, dass eine *MDR1*<sup>3435</sup>-T-Homozygotie darüber hinaus mit einem erhöhten RCC-Risiko korreliert (Siegsmond *et al.*, 2002). Das Risiko, an einem CCRCC zu erkranken, war dabei jedoch schwach, das Erkrankungsrisiko für papilläre (chromophile) oder chromophobe RCC jedoch mehr als 30-fach erhöht. Obwohl in diesem Fall ein spezifisches Umweltkarzinogen, das sich möglicherweise im Nierenepithel anreichert, unbekannt war, wurde anhand dieser Studie demonstriert, dass die durch einen C>T-Austausch modulierte Transporteigenschaft des *MDR1*-Produkts Einfluss auf das RCC-Risiko nehmen könnte.

Ein weiterer Zusammenhang zwischen dem Auftreten polymorpher Enzyme des Fremdstoffmetabolismus und einem erhöhten RCC-Risiko konnte gezeigt werden (Longuemaux *et al.*, 1999). Dabei wurden eine mögliche Rolle des Cytochrom-P 450 (CYP)-Enzyms CYP1A1, in Kombination mit den Gluthathion-S-Transferasen (GST) GSTT1 und GSTP1 sowie der N-Acetyltransferase (NAT) NAT2 untersucht.

Phase I-Enzyme der CYP-Isoenzymfamilie spielen im Fremdstoffmetabolismus eine wichtige Rolle. Sie initiieren die Umwandlung lipophiler Substanzen in hydrophile Metabolite (Biotransformation), die dann über die Leber oder Niere ausgeschieden werden können, und schützen so den Organismus vor toxischen Fremdstoffwirkungen (Doehmer *et al.*, 1993). CYP1A1 ist z.B. für die Umsetzung polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe und Benz(a)pyrenen verantwortlich (Conney, 1982; Doehmer *et al.*, 1993). Bestimmte *CYP1A1*-Polymorphismen können allerdings eine erhöhte CYP1A1-Aktivität bewirken, deren Folge auch eine massive Bildung von toxischen Metaboliten, Karzinogenen und freien Radikalen sein kann. Werden diese nicht umgehend von Phase II-Enzymen metabolisiert oder durch Antioxidantien entschärft, können sie sich im Gewebe anreichern und das Risiko für bestimmte Krebsarten erhöhen.

Zu den Phase II-Enzymen gehören die Enzyme der *GST*-Supergenfamilie (z.B. *GSTM1*, *GSTT1* und *GSTP1*) und die *NAT* (*NAT1* und *NAT2*). Die *GST* spielen aufgrund zahlreicher Isoformen und einer geringen Substratspezifität bei der Detoxifizierung vieler giftiger Substanzen eine bedeutende Rolle. Sie katalysieren die Umwandlung potentiell genotoxischer Substanzen in Glutathion-Konjugate, die weiter zu Cystein-Konjugaten umgewandelt und über die *NAT* zu den als Merkaptursäuren bezeichneten hydrophilen N-Acetyl-S-Cystein-konjugaten acetyliert werden.

*NAT* sind über N- und O-Acetylierungen v.a. an der Detoxifizierung aromatischer Amine beteiligt (Hein, 2002), die beispielsweise im Zigarettenrauch enthalten sind. Heterozyklische Amine entstehen darüber hinaus beim Zubereiten von Fleisch unter hohen Temperaturen. Auf der Basis genetisch determinierter Enzymaktivitäten werden langsame (*S*, *slow*) von schnellen (*R*, *rapid*) Acetylierern unterschieden.

Durch die in der Leber und in der Niere vorkommenden Cystein- $\beta$ -Lyasen können die Cystein-Konjugate allerdings auch zu reaktiven toxischen Metaboliten umgewandelt werden. Diese Lyasen spalten die Bindung zwischen dem  $\beta$ -C-Atom und dem S-Atom des Cysteins, so dass instabile, reaktive Thiolmetabolite sowie Pyruvat und Ammoniak entstehen können.

Diese Rolle der *GST* und *NAT* als Suszeptibilitätsfaktoren bei der Entstehung von Neoplasien im Urogenitaltrakt wird kontrovers diskutiert (Reszka *et al.*, 2002). Individuen mit einer homozygoten *GSTM*-oder *GSTT*-Deletion zeigten beispielsweise geringere oder fehlende Enzymaktivitäten, verbunden mit einer wahrscheinlich verminderten Effizienz der Eliminierung elektrophiler Kanzerogene, was zu einem erhöhten Risiko für somatische Mutationen und damit zu einer Tumorentwicklung führen kann (Coughlin *et al.*, 2002). Bei der Untersuchung einer möglichen Rolle dieser Faktoren bei der Entwicklung *VHL*-assoziierter sporadischer RCC wurde beobachtet, dass bei einer Gruppe von CCRCC-Patienten mit positivem *GSTT1*- und wahrscheinlich defektem (*S/R*) *NAT1*-Genotyp vermehrt Transversionen im *VHL* auftraten (Gallou *et al.*, 2001). Möglicherweise kann demnach der Typ einer erworbenen *VHL*-Mutation mit polymorphen Enzymen des Fremdstoffmetabolismus assoziiert sein. Obwohl diese Untersuchungen keinen Aufschluss über ein möglicherweise beteiligtes Umweltkarzinogen liefern konnten, unterstützen sie doch die Hypothese eines Zusammenhangs von Gen-Umwelt-Interaktionen, *VHL*-Schäden und der Entwicklung von RCC.

### 1.2.2 Berufliche Trichlorethylen-Exposition und *VHL*-Gendefekte

Bis heute sind nur wenige direkte Karzinogen-Karzinom-Beziehungen bekannt. Eines der eindruckvollsten Beispiele ist die Entwicklung von hepatozellulären Karzinomen auf der Basis einer spezifischen *p53*-Mutation im Zusammenhang mit einer Aflatoxin-Exposition (Bressac *et al.*, 1991; Hsu *et al.*, 1991). Daneben existieren Hinweise auf eine Beteiligung eines spezifischen Karzinogens an der Entstehung von *VHL*-Mutationen und einer damit verbundenen RCC-Tumorgenese. Bei diesem Karzinogen handelt es sich um das technische Lösemittel Trichlorethylen ( $C_2HCl_3$ , Trichlorethen, Trichloräthylen, TRI, Abb. 7), das insbesondere zwischen 1950 und 1985 in erster Linie zur Entfettung von Werkstücken in der Metall- und Elektroindustrie verwendet wurde (Bruckner *et al.*, 1989). Anfang der 1980er Jahre wurden weltweit ca. 500 000 Tonnen TRI produziert<sup>1</sup>. Die Produktion ist seither jedoch stark rückläufig, weil verbesserte Luftreinhaltevorschriften implementiert, die Rückgewinnung verbessert und auf alternative Lösemittel (z.B. Perchlorethylen) umgestellt wurde, vor allem aber weil TRI im Hinblick auf eine zunehmende Zerstörung der Ozonschicht durch Tenside ersetzt wurde. In Westeuropa wurden 1993 noch 94 000 Tonnen TRI produziert, im Jahr 2000 sank die Produktion bereits auf 74 000 Tonnen<sup>2</sup>. Speziell in Deutschland ging der TRI-Verbrauch zwischen 1976 und 1993 von 60 000 Tonnen auf unter 10 000 Tonnen zurück (Jacob *et al.*, 1997). In industriell aufstrebenden Entwicklungsländern wird TRI jedoch wegen seiner geringen Produktionskosten noch immer häufig verwendet.

Das Lösemittel gelangt entweder über direkten Kontakt (Haut) oder über Verdunstung und anschließendes Einatmen in den menschlichen Organismus. Obwohl beim Menschen akute Effekte wie Kopfschmerz, Schwindel, Übelkeit und Erbrechen bekannt sind, werden Langzeiteffekte wie z.B. eine mögliche karzinogene Wirkung durch Arbeitsplatz- aber auch Boden- und Wasserkontaminationen international kontrovers diskutiert. Langzeitstudien an Tieren belegten eine karzinogene Wirkung von TRI, vor allem auf das Leber- und Nierengewebe (Wartenberg *et al.*, 2000). Epidemiologische Studien in den USA und Skandinavien konnten jedoch an über 16 000 Studienteilnehmern kein erhöhtes Krebsrisiko für den Urogenitaltrakt (Morgan *et al.*, 1998; Weiss, 1996) nachweisen. Andere Studien berichteten über ein erhöhtes Risiko für Leber- und Gallengangkrebs sowie Non-Hodgkin Lymphome (Lynge *et al.*, 1997).

Ein erhöhtes RCC-Risiko wurde hingegen von einer deutschen Studie bei Arbeitern mit einer beruflichen Langzeit- und Hochdosis-Exposition gegenüber TRI beobachtet (Henschler *et al.*,

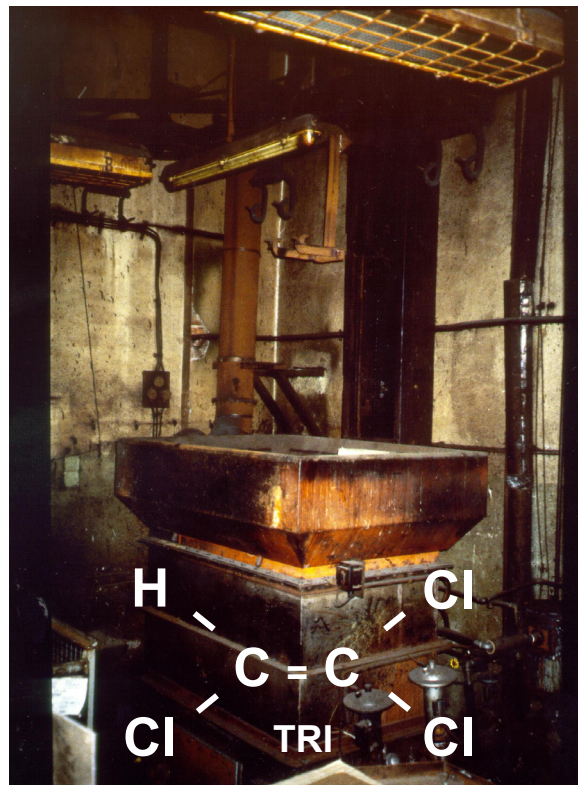
---

<sup>1</sup> <http://www.hvbg.de/d/bia/pub/rep/rep02/biar0498/kap13.pdf>

<sup>2</sup> <http://www.eurochlor.org/chlorsolvents/publications/digest20de.pdf>



1995; Vamvakas *et al.*, 1998). Während diese Arbeit insbesondere wegen vermuteter Mängel im Studiendesign international mit Kritik belegt wurde (Cherrie *et al.*, 2001; Green *et al.*, 1999; Mandel, 2001; Vamvakas *et al.*, 2001a; Vamvakas *et al.*, 2001b; Wartenberg *et al.*, 2000), bestätigten sowohl eine neuere arbeitsmedizinische Kohortenstudie in Dänemark (Hansen *et al.*, 2001) als auch eine Fall-Kontroll-Studie in Deutschland (Pesch *et al.*, 2000a) ein erhöhtes TRI-assoziiertes RCC-Risiko. Darüber hinaus wird ein möglicher Zusammenhang durch internationale Literaturdaten über RCC-Risikofaktoren gestützt, die ein Risiko für jene Berufe aufzeigen, in denen u.a. mit TRI umgegangen wird, wie z.B. in der Eisen-, Stahl-, Textil- und Glasindustrie sowie in der chemischen Reinigung (Dhote *et al.*, 2000).



**Abbildung 7:** Ein ehemaliger, typischer Trichlorethylen (TRI)-Arbeitsplatz. In einem beheizbaren, mit TRI-gefüllten Tauchbecken wurden manuell und ohne erkennbare Schutzvorkehrungen (Abzug oder Belüftung) bis Mitte der 1980er Jahre Metallteile entfettet. Dabei wurde TRI bis knapp unter den Siedepunkt (87°C) erhitzt, so dass davon auszugehen ist, dass die Atemluft häufig mit TRI gesättigt war.

Somatische *VHL*-Mutationsanalysen in Tumorgeweben TRI-exponierter RCC-Patienten ergaben ein Spektrum an *VHL*-Mutationen, das sich deutlich von dem anderer RCC-Patienten unterschied (Brauch *et al.*, 1999). Neben den insgesamt häufigeren *missense*-Mutationen konnte eine Prävalenz für C>T- und G>A-Transitionen und das Auftreten einer 454 C>T-*hot spot*-Mutation (Pro81Ser) im Exon 1 des *VHL* beobachtet werden. Dieses charakteristische

*VHL*-Mutationsmuster unterstützt die Hypothese eines Zusammenhangs zwischen einer TRI-Exposition, einer spezifischen *VHL*-Schädigung und der RCC-Tumorgenese (Brauch *et al.*, 1999). Gestützt wird diese Hypothese durch weitere mechanistische Erkenntnisse wie die Aufklärung des TRI-Metabolismus und das Wissen über die Entstehung karzinogener Metabolite in der Niere von Ratten (Dekant *et al.*, 1990; Dekant *et al.*, 1986) bzw. der Niere des Menschen (Bernauer *et al.*, 1996; Brüning *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass TRI-exponierte Personen mit einem RCC häufiger GSTM1- und GSTT1-positiv waren (Brüning *et al.*, 1997). Diese beiden Enzyme katalysieren die Umwandlung von TRI in Dichlorovinyl-S-Cystein (DCVC). Im proximalen Tubulus der Niere erfolgt durch die dort vorkommenden Cystein- $\beta$ -Lyasen eine weitere Umsetzung des DCVC zu elektrophilen Thioketenen mit genotoxischem Potential. Auch Tubulusschäden konnten im Zusammenhang mit einer TRI-Exposition nachgewiesen werden, die möglicherweise einer Tumorgenese vorausgehen (Brüning *et al.*, 1999).

Die IARC (*International Agency for Research on Cancer*) bezeichnete die Gefahrenstufe für TRI im Jahr 1995 mit „genügend Evidenz für Karzinogenität im Tierexperiment“ (IARC, 1995). Die Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für Gesundheitsgefährdung am Arbeitsplatz, die MAK-Kommission (MAK, Maximale Arbeitsplatz-Konzentration), stufte TRI als keimzellmutagen der Kategorie III B, als krebserzeugend der Kategorie I sowie als krebserzeugenden Arbeitsstoff ein (DFG, 2002).

Aufgrund der kontroversen Diskussionen im Hinblick auf die Interpretation der genannten Studien, liegen jedoch weder innerhalb der Europäischen Union noch international durch die EPA (*Environmental Protection Agency*) einheitliche Empfehlungen zum Umgang mit TRI vor. Zur Klärung dieser wichtigen Frage sind weiterführende wissenschaftliche Untersuchungen erforderlich, die einen molekularen Zusammenhang zwischen einer TRI-Exposition und einer RCC-Erkrankungen am Beispiel einer aussagefähigen *VHL*-Signatur belegen können. Die hier vorliegende Arbeit sollte dazu einen Beitrag leisten.

### 1.3 Zielsetzungen

Ziel dieser Arbeit war die weitere Aufklärung der Rolle des *VHL* bei der Entstehung erblicher und sporadischer Tumoren. Dafür wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt. Der erste Ansatz basierte auf einer umfangreichen aber immer noch unzulänglichen Datenlage hinsichtlich der Interpretation von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen beim erblichen VHL-Syndrom. Am Beispiel eines seltenen VHL-Phänotyps (VHL2C) sollten charakteristische *VHL*-Keimbahnmutationen identifiziert und ihre gewebespezifischen, tumorigenen Bedeutungen in einem gesamtbiologischen Zusammenhang diskutiert werden. Der zweite Ansatz fokussierte auf das sporadische RCC und sollte einen Beitrag zur Klärung einer möglichen Beteiligung von Umweltfaktoren bei der Entstehung tumorigener somatischer *VHL*-Mutationen liefern. Er hatte zum Ziel, die molekularen Charakteristika einer spezifischen deutschen RCC-Kohorte für die internationale Diskussion im Hinblick auf ein mögliches TRI-assoziiertes RCC-Risikos zu erschließen und damit einen Beitrag zur Prävention des sporadischen RCC zu liefern, dessen Inzidenz in den Industrieländern beständig zunimmt. Beiden Aspekten liegen die genaue Analyse des *VHL* und eine mögliche gewebespezifische Auswirkung von Mutationen zugrunde. Beide Ansätze unterscheiden sich dennoch sowohl im Bezug auf ihr Studiendesign als auch in den angewandten Analysemethoden und den aus ihnen ableitbaren Aussagen.

#### ***Genotyp-Phänotyp-Korrelationen bei der VHL-Erkrankung***

Die Aufklärung von Genotyp-Phänotyp-Beziehungen ist neben ihrer Bedeutung für die Grundlagenforschung vor allem aufgrund ihrer klinisch-therapeutischen Relevanz von vorrangigem Interesse. Sie stellt eine Voraussetzung für die Erforschung veränderter zellulärer Funktionen und für die Identifikation von Zielmolekülen dar, die der Entwicklung spezifisch wirksamer Antitumor-Therapeutika dienen können. Nach der Aufklärung der räumlichen Struktur des pVHL bzw. des VCB-Komplexes ist nun die Zuordnung einzelner Aminosäuren zu bestimmten pVHL-Bindungsdomänen möglich.

Für die Untersuchung dieser Genotyp-Phänotyp-Zusammenhänge sollte die DHPLC (*denaturing high performance liquid chromatography*) zur *VHL*-Mutationsdetektion in Blut-DNA etabliert werden. Hierfür stand eine Kollektion von Blut-DNA-Proben mit insgesamt 43 verschiedenen *VHL*-Keimbahnmutationen zur Verfügung. Des Weiteren sollten 36 DNA-Proben von VHL-Verdachtspatienten mit noch unbekanntem *VHL*-Keimbahnstatus untersucht werden, die mit den bisher angewandten Methoden (z.B. SSCP) im Rahmen klinischer Diagnosestellungen bislang nicht als *VHL*-Mutationsträger identifiziert werden konnten.

Ein weiterer wichtiger Punkt war die Klärung der molekularen Basis des VHL2C-Phänotyps, da diesem Krankheitsphänotyp wegen der Beteiligung von nur einer Gewebespezies (chromaffines Gewebe) im Rahmen der VHL-Tumorgenese eine prominente Bedeutung eingeräumt wird. Die Beschreibung dieses Phänotyps beruht in erster Linie auf einer großen deutschen VHL2C-Familie. In vorausgegangenen Studien konnte bei ihr bereits eine familien-spezifische 775 C>G-Mutation (Leu188Val) identifiziert werden. Da *VHL*-Mutationen meist Tumoren in verschiedenen Geweben verursachen, sollte geklärt werden, ob diese Mutation singulär oder in Kombination mit noch weiteren, bislang nicht detektierbaren *VHL*-Mutationen bei dieser VHL2C-Familie auftritt.

### ***TRI-assoziiertes Nierenzellkarzinom***

Anhand einer molekular-epidemiologischen Patientenkohorten-Vergleichsstudie sollten neue Erkenntnisse über die Wahrscheinlichkeit eines Zusammenhangs zwischen einer TRI-Exposition und der Entstehung von *VHL*-Mutationen im Rahmen der RCC-Tumorgenese gewonnen werden. Hierfür sollten formalinfixierte und in Paraffin eingebettete RCC-Tumorgewebe auf somatische *VHL*-Mutationen untersucht werden. Die Gewebe stammen von einem RCC-Patientenkollektiv aus einer westdeutschen Industrieregion (Arnsberg, Sauerland) mit überdurchschnittlich hoher TRI-Industriedichte. Die Patienten waren in den Jahren zwischen 1987 und 1992 nephrektomiert worden. Im Gegensatz zu den bereits früher untersuchten RCC-Patienten mit ehemaliger TRI-Langzeit- und Hochdosisexposition, waren diese Patienten nie beruflich TRI-exponiert gewesen. Es sollte nun geklärt werden, ob sich auch in diesem nicht exponierten Kontrollkollektiv die früher ermittelten Merkmale einer hohen TRI-Belastung, wie eine *hot spot*-454 C>T-Mutation (Pro81Ser), das Vorkommen multipler *VHL*-Mutationen, eine Häufung von C>T-Transitionen sowie ein Auftreten von *VHL*-Mutationen im tumorbenachbarten, morphologisch normalen Gewebe (Normalgewebe) nachweisen ließen. Darüber hinaus sollten erste *VHL*-Mutationsanalysen im Rahmen einer neuen Studie an archivierten RCC-Tumorgeweben durchgeführt werden, die zwischen 1992 und dem Jahr 2000 gesammelt und archiviert worden waren und von RCC-Patienten mit und ohne TRI-Exposition aus derselben, TRI-belasteten Region, stammten. Die molekulargenetischen Analysen sollten blind, d.h. ohne Kenntnis der individuellen beruflichen TRI-Exposition durchgeführt werden. Das Ziel dieser Untersuchung war, anhand der Zusammenführung epidemiologischer, arbeitsmedizinischer und molekularbiologischer Parameter, einen Beitrag zum besseren Verständnis der Kanzerogenese des TRI-assoziierten sporadischen RCC zu leisten und damit dessen wirksame Prävention voranzutreiben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### *Chemikalien, Reagenzien und Enzyme*

1 Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen	Karlsruhe
Acetonitril	Roth	Karlsruhe
Ampicillin	Roth	Karlsruhe
AmpliTaq <sup>®</sup>	Applied Biosystems	Weiterstadt
AmpliTaq Gold <sup>®</sup>	Applied Biosystems	Weiterstadt
CaCl <sub>2</sub>	Merck	Darmstadt
DNA Ladder V	Roche	Mannheim
dNTP	Eurobio	Raunheim
DMEM (25mM HEPES, ohne Natriumpyruvat, mit 4500 mg Glucose und Pyridoxin)	Invitrogen	Karlsruhe
EDTA	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Essigsäure	Roth	Karlsruhe
Eosin-Y	Lobonord	Mönchengladbach
Ethanol, pro analysi	Merck	Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth	Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FBS, hitzeinaktiviert)	Invitrogen	Karlsruhe
L-Glutamin (200 µM)	Invitrogen	Karlsruhe
Glycerin	Roth	Karlsruhe
Guanidinium-Hydrochlorid	AppliChem	Darmstadt
Gurr <sup>®</sup> (DePex mounting medium)	LGC Promochem	Wesel
H <sub>2</sub> O dest. (steril und pyrogenfrei) für PCR	Delta-Pharma	Pfullingen
H <sub>2</sub> O dest. (HPLC-Qualität) für Sequenzierungen	Merck	Darmstadt
Hämalaun (Papanicolaoun 1a)	Merck	Darmstadt
HotStarTaq <sup>™</sup> Polymerase	Qiagen	Hilden
Kaliumacetat	Roth	Karlsruhe
Luria Agar Powder, Miller's LB	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Luria Broth Base, Miller's LB	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
MgCl <sub>2</sub>	Merck	Darmstadt
MnCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Microclear	Vogel GmbH	Giessen
MOPS-Puffer	Roth	Karlsruhe
Natriumacetat	Roth	Karlsruhe
NuSieve <sup>®</sup> GTG <sup>®</sup> Agarose	Biozym	Hessisch Oldendorf
PBS	Invitrogen	Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	Invitrogen	Karlsruhe
<i>PfuTurbo</i> <sup>®</sup> Hotstart DNA Polymerase	Stratagene	Heidelberg
Proteinase K	Roche	Mannheim
RbCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Saccharose	Roth	Karlsruhe
Seakem <sup>®</sup> ME Agarose	Biozym	Hessisch Oldendorf
Tetrazyklin (Hydrochlorid)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Triton-X-100	Roth	Karlsruhe

Trypsin-EDTA	Invitrogen	Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich	Taufkirchen

**Primer, Plasmide, Zellen**

Mutageneseprimer	TIB Molbio	Berlin
pBlueskript <sup>®</sup> II SK-Vektor	Stratagene	Heidelberg
pCR <sup>®</sup> 2.1-Vektor	Invitrogen	Karlsruhe
PCR- und Sequenzierprimer	MWG -Biotech AG	Ebersberg
TOP10F' <i>E.coli</i> -Zellen	Invitrogen	Karlsruhe

**Kits**

Advantage <sup>™</sup> -GC cDNA Kit	Clontech	Heidelberg
AmpliTaq <sup>®</sup> FS BigDye Terminator Premix	Applied Biosystems	Weierstadt
E.Z.N.A. <sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit II	Peqlab	Erlangen
FailSafe <sup>™</sup> PCR PreMix Selection Kit	Biozym	Hessisch Oldendorf
QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraction Kit	Qiagen	Hilden
QIAamp <sup>®</sup> DNA Mini Kit	Qiagen	Hilden
QIAquick <sup>™</sup> PCR Purification Kit	Qiagen	Hilden
QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep Kit	Qiagen	Hilden
QuikChange <sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene	Heidelberg
Taq PCR Core Kit	Qiagen	Hilden
TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen	Karlsruhe

**Geräte und sonstige Hilfsmittel**

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Weierstadt
Adhäsiv-Objektträger	Starfrost/Engelbrecht	Edermünde
Analysenwaage	Mettler-Toledo	Gießen
Autoklav HA-3000 MII CF	Wolf/Multimedia	Kirchheim u. Teck
Bakterien-Inkubationschüttler	Infors	Bottmingen
Beckman-Zentrifuge CS-6R	Beckman Coulter	Krefeld
Biofuge 22R	Kendro	Hanau
BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg
DNA Sep <sup>®</sup> Column	Transgenomic	Cambridge, UK
Elektrophorese-Kammer	Bio-Rad	München
Eppendorf-Tischzentrifuge 5417 C	Eppendorf	Hamburg
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 ml/1ml/2ml)	Eppendorf	Hamburg
Falcon <sup>®</sup> -Röhrchen	BD/Neolab	Heidelberg
Filter-Tips	Biozym	Hessisch Oldendorf
Heat Sealer	Eppendorf	Hamburg
Heat Sealing Foil	Eppendorf	Hamburg
Heizblock	Techne	Duxford/Cambridge, UK
Inkubator Forma Scientific (Zellkultur)	Labotech	Bovenden
Mikrotom RM 2055	Leica	Nussloch
Mikrotomklingen Typ S35	pfm	Köln

PCR 96- <i>well</i> -Platten	Biozym	Hessisch Oldendorf
Peltier Thermal Cycler 225	Biozym	Hessisch Oldendorf
pH-Meter	Schott	Hofheim am Taunus
Pipetten	Eppendorf	Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5-2 ml)	Eppendorf	Hamburg
<i>reversed phase column</i> (4,6 x 75mm)	Agilent	Böblingen
Schüttelwasserbad	Daglef Patz	Wankendorf
Skalpellsklingen	Nopa Instruments	Tuttlingen
Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad	München
Trockenschrank	Kendro	Hanau
UV-Transilluminator	LTF Labortechnik	Wasserburg
Varian-Helix™-System (DHPLC)	Varian	Walnut Creek, CA, USA
Vortexgerät „Reax top“	Multimed	Kichheim u. Teck
Wave® Nucleic Acid Fragment Analysis-System (DHPLC)	Transgenomic	Cambridge, UK
Zentrifuge (Zellkultur) Hettich Rotanta/S	Hettich	Tuttlingen
Zellkulturflaschen	Corning	Wiesbaden

**Software**

GraphPad InStat	GraphPad	San Diego, CA, USA
Sequence Navigator	Applied Biosystems	Weierstadt
Star 5.5	Varian	Walnut Creek, CA, USA
Wave Maker 4.1	Transgenomic	Omaha NE, USA

**Puffer, Lösungen und Medien**

C1-Puffer	Saccharose	320 mM
	MgCl <sub>2</sub>	5 mM
	Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
	Triton-X-100	1% (v/v)
Kulturmedium für RCC-Zellen	DMEM	88% (v/v)
	FCS	10% (v/v)
	L-Glutamin	1% (v/v)
	Pen/Strep	1% (v/v)
Einfriermedium für RCC-Zellen	DMEM	65% (v/v)
	FBS	25% (v/v)
	DMSO	10% (v/v)
G2-Puffer	Guanidinium-HCl	800 mM
	EDTA	30 mM
	Tris-HCl (pH 8,0)	30 mM
	Tween 20	5% (v/v)
	Triton-X-100	0,5% (v/v)

TE-Puffer	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA	1 mM
TfBI	RbCl <sub>2</sub>	100 mM
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM
	Kaliumacetat (5M)	30 mM
	CaCl <sub>2</sub> (1M)	10 mM
	Glycerin (99,5%)	1 % (v/v)
	(pH 5,8; Einstellung mit Essigsäure)	
TfBII	MOPS pH 7,0	10 mM
	RbCl <sub>2</sub> (1M)	10 mM
	CaCl <sub>2</sub> (1M)	75 mM
	Glycerin (50%)	15% (v/v)

### **Ethidiumbromid-Stammlösung**

7 mg Ethidiumbromid wurden in 10 ml H<sub>2</sub>O dest. gelöst und in einem lichtundurchlässigen Glasgefäß bei 4°-6° C aufbewahrt.

### **Ampicillin (Amp)-Stammlösung (50 mg/ml)**

500 mg Amp wurden in 10 ml H<sub>2</sub>O dest. gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt.

### **X-Gal-Stammlösung (40 mg/ml)**

100 mg X-Gal wurden in 2,5 ml Dimethylformamid gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt.

### **LB-Amp-Flüssigmedium**

40 g Luria Broth Base wurden in 1 l H<sub>2</sub>O dest. gelöst, autoklaviert und die abgekühlte Lösung mit 1 ml Amp-Stammlösung versetzt.

### **LB-Amp-Platten**

40 g Luria Agar Powder wurden in 1 l H<sub>2</sub>O dest. gelöst, autoklaviert und die Lösung nach Abkühlung auf ca. 50°C vor dem Gießen der Platten mit 1 ml Amp-Stammlösung versetzt. Platten, die älter als vier Wochen waren, wurden vor Gebrauch mit 50 µl Amp-Stammlösung versetzt.



## 2.2 Patienten und Studienkollektive

Von allen Personen, denen Blutproben zum Zweck molekulargenetischer Untersuchungen entnommen worden waren, lag das Einverständnis entsprechend der Richtlinien der Deklaration von Helsinki vor. Den Untersuchungen an archivierten Patientengeweben wurde gemäß einem Ethikvotum<sup>1</sup> stattgegeben.

### 2.2.1 Patienten mit VHL-Erkrankung und VHL-Verdachtsfälle

Alle molekulargenetischen Analysen zur Klärung des Vorliegens von *VHL*-Mutationen in der Keimbahn von VHL-Patienten, VHL-Verdachtsfällen oder gesunden Individuen (Kontrollen) wurden an Blut-DNA-Proben durchgeführt.

#### 2.2.1.1 Patienten nicht verwandter VHL-Familien mit bekannten *VHL*-Mutationen

Es wurden 43 nicht miteinander verwandte VHL-Patienten mit bereits bekannten *VHL*-Mutationen molekulargenetisch nachuntersucht, deren familienspezifische Keimbahnmutationen zum Teil bereits publiziert (Glavac *et al.*, 1996; Zbar *et al.*, 1996) oder im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und publiziert wurden (Klein *et al.*, 2001). Bei diesen *VHL*-Mutationen handelte es sich um ein breites Spektrum an DNA-Veränderungen sowohl hinsichtlich ihrer Lokalisation im Gen, der Anzahl der betroffener Basen als auch der damit verknüpften biologischen Konsequenzen (Tab. 3).

**Tabelle 3:** Nachuntersuchte *VHL*-Mutationstypen bei Patienten mit gesicherter VHL-Erkrankung

<b>Mutationstyp</b>	<b>Anzahl</b>
<i>missense</i> -Mutationen	21
<i>nonsense</i> -Mutationen	10
<i>splice-site</i> -Mutationen	5
<i>frameshift</i> -Mutationen	4
<i>in-frame</i> -Insertion	1
<i>in-frame</i> -Deletion	1
3'UTR-Mutation	1
<b>Summe aller Mutationen</b>	<b>43</b>

Die 43 bekannten *VHL*-Mutationen waren ursprünglich im Rahmen eines zeitintensiven SSCP-Mutationsscreenings in Kombination mit der Sequenzierung auffälliger PCR-Produkte identifiziert worden. Nun sollte geklärt werden, ob moderne DHPLC-Verfahren Vorteile hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und Sensitivität beim *VHL*-Mutationsnachweis bieten.

<sup>1</sup> [http://www.wma.net/e/policy/17-c\\_e.html](http://www.wma.net/e/policy/17-c_e.html)

Diese Fragestellung war nicht nur aus diagnostischen Gründen von großem Interesse, sie sollte darüber hinaus zur verbesserten Klärung von Genotyp-Phänotyp-Korrelation beitragen und dadurch Interpretationen funktioneller Störungen im Rahmen der Aufklärung der VHL-Tumorgenese erleichtern.

#### **2.2.1.2 VHL-Verdachtsfälle mit unbekanntem VHL-Keimbahnstatus**

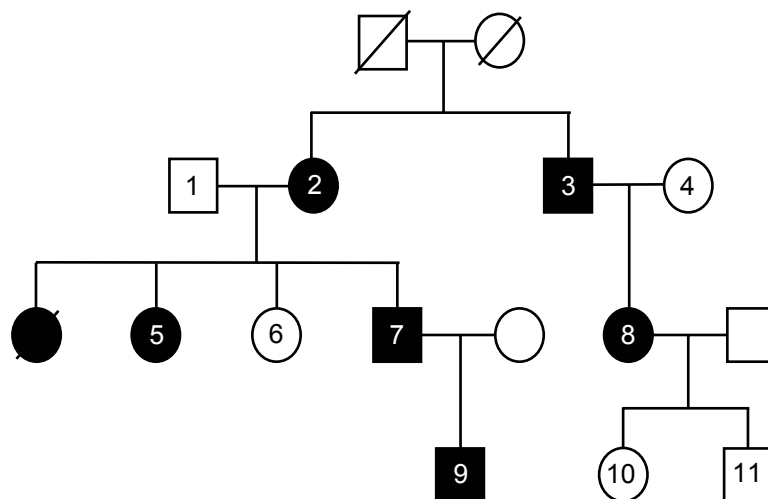
Außer den Blut-DNA-Proben mit den insgesamt 43 bekannten *VHL*-Keimbahnmutationen wurden DNA-Proben von 36 Patienten mit noch unbekanntem *VHL*-Keimbahnstatus untersucht. Dabei handelte es sich um Patienten, die anhand ihrer klinischen Diagnosen Verdachtsfälle für das Vorliegen einer erblichen VHL-Erkrankung darstellten und somit in Betracht kamen, Träger einer *VHL*-Keimbahnmutation zu sein. Von diesen Patienten hatten fünf eine klinisch gesicherte VHL-Erkrankung, bei 20 Patienten bestand ein Verdacht auf eine VHL-Erkrankung (von den zuweisenden Kliniken nicht näher beschrieben), sechs hatten ein RCC und fünf ein Phäochromozytom. Von den sechs RCC-Patienten hatten fünf eine positive Familiengeschichte für RCC, d.h. in diesen Familien waren mehrere Personen an einem RCC erkrankt, der sechste hatte zusätzlich Nierenzysten. Von den fünf Phäochromozytom-Patienten wies einer eine positive Phäochromozytom-Familiengeschichte auf, bei den anderen vier Patienten wurde die Diagnose jeweils im Alter von unter 50 Jahren gestellt, was ein Hinweis auf eine erbliche Belastung sein kann.

Insgesamt war das Risiko einer *VHL*-Mutationsträgerschaft in diesem Kollektiv unterschiedlich zu bewerten: Patienten mit klinisch gesicherter VHL-Diagnose trugen ein hohes Risiko, Patienten mit singulären Tumoren, einer positiven Familiengeschichte für RCC oder Phäochromozytome sowie Patienten mit einem niedrigen Erkrankungsalter trugen ein niedriges Risiko. In molekulargenetischen Voruntersuchungen mittels SSCP waren bei den klinisch diagnostizierten VHL-Patienten allerdings keine Anhaltspunkte für das Vorliegen einer *VHL*-Mutation gefunden worden.

#### **2.2.1.3 Familie mit erblichem VHL2C-Phänotyp**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einer der Blut-DNA-Proben mit bekanntem *VHL*-Keimbahnstatus neben der bereits bekannten 775 C>G-Mutation im Exon 3 des *VHL* (Leu188Val) eine weitere Mutation identifiziert. Zur Klärung eines Zusammenhangs zwischen dem Auftreten dieser Doppelmutation und der Entwicklung eines VHL2C-Phänotyps wurde die gesamte Familie des VHL-Patienten, von dem diese Probe stammte, auf das Vorliegen und die Kosegregation beider Mutationen nachuntersucht. Insgesamt handelte

es sich bei den Familienmitgliedern um 16 Personen, die zwei vormalig unabhängig voneinander untersuchten VHL2C-Familien angehören (VHL 37 und VHL 38). Diese hatten bereits zuvor aufgrund ihres seltenen VHL2C-Phänotyps Beachtung in der Literatur gefunden (Glavac *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 1995; Ritter *et al.*, 1996). Im Rahmen erster molekulargenetischer Untersuchungen war die gemeinsame 775 C>G-*VHL*-Mutation (Leu188Val) identifiziert und die Verwandtschaft beider Familien bestätigt worden (Glavac *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 1995; Ritter *et al.*, 1996). Zum Zeitpunkt der Erstbeschreibung hatten sieben Patienten Phäochromozytome entwickelt: zwei Patienten hatten singulären Tumoren, vier Patienten multiple, bilaterale oder unilaterale Tumoren und ein Patient ein extraadrenales Phäochromozytom (Ritter *et al.*, 1996). Eine Patientin war bereits verstorben. Inzwischen sind in beiden VHL2C-Familien zusammen neun Patienten an Phäochromozytomen erkrankt. Zu den 16 dokumentierten Familienmitgliedern gehören auch zwei zwischenzeitlich geborene Kinder. In Abbildung 8 ist der Stammbaum der größeren der beiden Familien abgebildet, aus der elf Familienmitglieder im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachanalysiert wurden: drei gesunde Personen (Abb. 8: 1, 4 und 6) und sechs VHL-Patienten (Abb. 8: 2, 3, 5, 7, 8 und 9) sowie die beiden neu hinzugekommenen Kinder (Abb. 8: 10 und 11). Aufgrund des autosomal dominanten Erbgangs der VHL-Erkrankung tragen die beiden letztgenannten Kinder ein 50%iges Risiko an einem Phäochromozytom zu erkranken, sie waren jedoch zum Zeitpunkt der molekulargenetischen Untersuchung im Alter von zwölf und fünf Jahren (noch) symptomfrei.



**Abbildung 8:** Stammbaum einer deutschen VHL2C-Familie (VHL 37). Frauen sind durch Kreise und Männer durch Quadrate dargestellt. Verstorbene Familienglieder sind mit einer diagonalen Linie markiert. Die Symbole gesunder Familienmitglieder sind weiß, die von erkrankten Familienmitgliedern sind schwarz. Die in die *VHL*-Mutationsanalyse einbezogenen Familienmitglieder sind durch eine fortlaufende Nummerierung gekennzeichnet.

### **2.2.2 Nicht erkrankte Personen (Kontrollgruppe)**

Um auszuschließen, dass es sich bei der neu identifizierten, kosegregierenden *VHL*-Alteration in der Keimbahn der deutschen VHL2C-Familie um einen genetischen Polymorphismus handelt, wurden zusätzlich Blut-DNA-Proben von 65 nicht verwandten, deutschen Individuen einer *VHL*-Mutationsanalyse im Exon 1 unterzogen.

### **2.2.3 Patienten mit sporadischem Nierenzellkarzinom**

#### **2.2.3.1 Nierenzellkarzinom-Patienten ohne berufliche Trichlorethylen-Exposition**

Für die somatische *VHL*-Mutationsanalyse wurde DNA aus archivierten, d.h. formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten RCC-Geweben von 21 nicht TRI-exponierten Patienten verwendet. Diese waren zwischen Dezember 1987 und Mai 1992 im St. Karolinenhospital Arnsberg (Nordrhein-Westfalen) nephrektomiert worden. Dieses Krankenhaus liegt im Einzugsgebiet einer Region mit einer ehemals hohen TRI-Industriedichte. Die Patienten waren bereits im Rahmen einer epidemiologischen Studie zur Klärung der Relevanz von TRI für das RCC-Risiko arbeitsmedizinisch untersucht worden (Vamvakas *et al.*, 1998). Dabei konnte eine Langzeit- und Hochdosis-Exposition gegenüber TRI ausgeschlossen werden. Sie stellen das Vergleichskollektiv für eine 1999 publizierte molekulargenetische Studie dar, in der charakteristische somatische *VHL*-Mutationen in den Tumorgeweben einer RCC-Kohorte mit TRI-Langzeit- und -Hochdosis-Exposition nachgewiesen wurden (Brauch *et al.*, 1999). Diese Studie zeigte auf molekularer Ebene einen Zusammenhang zwischen einer Langzeit- und Hochdosis-TRI-Exposition und einem offensichtlich RCC-verursachenden *VHL*-Schaden. Seither werden diese Ergebnisse kontrovers diskutiert (Cherrie *et al.*, 2001; Green *et al.*, 1999; Mandel, 2001; Vamvakas *et al.*, 2000; Vamvakas *et al.*, 2001a; Vamvakas *et al.*, 2001b; Wartenberg *et al.*, 2000).

Das zur epidemiologischen Fall-Kontroll-Studie gehörige Kontrollkollektiv konnte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erstmalig einer molekulargenetischen Untersuchung zugänglich gemacht werden. Gründe für die zeitlich verzögerte Rekrutierung der Kontrollgewebe im Vergleich zur 1999 durchgeführten Studie von Brauch *et al.* liegen in der zunächst geringen wissenschaftlichen Beachtung dieser RCC-Fälle, die aufgrund einer fehlenden beruflichen Belastung arbeitsmedizinisch nicht erfasst worden waren. Es handelte sich dabei um die formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten RCC-Gewebe der von Vamvakas *et al.* (1998) beschriebenen Serie von 39 nicht TRI-exponierten Patienten. Von 13 Patienten dieses Kollektivs war kein Tumorgewebe vorhanden, zum einen weil keine

Nephrektomien durchgeführt worden waren, zum anderen, weil Gewebeproben für histologische Diagnosestellungen an pathologischen Instituten nicht länger als zehn Jahre aufbewahrt werden. Insgesamt standen somit Gewebeproben von 26 nicht TRI-exponierten RCC-Patienten für die Analyse somatischer *VHL*-Mutationen zur Verfügung.

Davon wurden vier Fälle ausgeschlossen: bei einem Patienten stimmte die Gewebe-Identifikationsnummer nicht mit den Patientenangaben auf dem Datenblatt überein. Dieser Patient wurde nicht in die Gesamtanalyse eingeschlossen. Das Gewebe eines weiteren Patienten war nicht zur Mikrodisektion geeignet. Bei einem dritten Patienten lag kein Tumorgewebe vor und von einem vierten Patienten waren zu wenige Hämalaun-Eosin (HE)-Schnitte vorhanden, um eine ausreichende DNA-Menge isolieren zu können. Die DNA eines weiteren Patienten konnte in der PCR nicht amplifiziert werden. Insgesamt wurden somit von 26 nicht TRI-exponierten Patienten 21 in die *VHL*-Mutationsanalyse einbezogen. Die dabei gewonnenen *VHL*-Mutationsdaten wurden anschließend mit denen von 17 TRI-exponierten RCC-Patienten aus der Studie von Vamvakas *et al.* (1998) verglichen. Die *VHL*-Mutationsdaten von 16 dieser Patienten waren bereits im Rahmen der Studie von Brauch *et al.* (1999) publiziert worden. Die *VHL*-Mutation im RCC-Gewebe einer weiteren Patientin, deren Tumor als ein renales Onkozytom diagnostiziert worden war (G. Weirich, Institut für Anatomie und Allgemeine Pathologie der Technischen Universität München, persönliche Mitteilung), wurde im Rahmen dieser Arbeit identifiziert.

### **2.2.3.2 Nierenzellkarzinom-Patienten mit und ohne beruflicher Trichlorethylen-Exposition einer aktuellen molekular-epidemiologischen Fall-Kontroll-Studie**

Belastbare Ergebnisse zur Klärung eines Zusammenhangs zwischen einer Langzeit- und Hochdosis-TRI-Exposition mit nachfolgender RCC-assoziiertes *VHL*-Schädigung erfordern die Durchführung einer größeren Fall-Kontroll-Studie. Zu diesem Zweck wurden im Zeitraum von Juni 1992 bis April 2000 alle RCC-Patienten mit durchgeführter Nephrektomie im St. Karolinenhospital Arnsberg erfasst und deren formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Tumorgewebe gesammelt. Es wurde davon ausgegangen, dass unter den RCC-Patienten aus diesem industriellen Einzugsgebiet sowohl Patienten mit als auch ohne berufliche Hochdosis- und Langzeit-TRI-Exposition waren. Die arbeitsmedizinischen und epidemiologischen Charakteristika dieser Patienten wurden zwischenzeitlich anhand von Interviewdaten erhoben (Brüning *et al.*, 2003). Dabei wurden auf der Basis der ausgeführten Berufe (*job title*) und Aufgaben (*job tasks*) eine mögliche TRI-Exposition und weitere, in Frage kommende Risikofaktoren erhoben. Die Bewertung einer TRI-Exposition wurde anhand der Häufigkeit

TRI-spezifischer Nebenwirkungen, insbesondere unter Berücksichtigung von Spitzenexpositionen vorgenommen. Die molekularen Untersuchungen dieses gemischten RCC-Patientenkollektivs sollten blind, d.h. ohne Kenntnis der individueller TRI-Exposition durchgeführt werden, um anhand der Mutationscharakteristika weitere unabhängige Belege für einen Zusammenhang zwischen einer TRI-Exposition und spezifischen *VHL*-Genschäden zu etablieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gewebeblöcke (46 Tumorgewebe und 23 Normalgewebe) von 44 der insgesamt 134 RCC-Patienten auf das Vorliegen somatischer *VHL*-Mutationen untersucht, wobei das Augenmerk auf die Anzahl der Mutationen im Tumor und die Häufigkeiten der einzelnen Mutationstypen gerichtet war.

## 2.3 DNA-Isolierung und -Aufbereitung

Genomische DNA wurde sowohl aus Blutproben als auch archivierten, formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben isoliert. Die Methoden sind im Folgenden aufgeführt.

### 2.3.1 DNA-Isolierung aus Blut

Die genomische DNA der VHL-Patienten und Verdachtsfälle wurde entweder mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-fällung (Sambrook *et al.*, 1989) oder mittels Proteinaussalzung und anschließender Ethanol-fällung aus Blut isoliert.

#### DNA Isolierung aus EDTA-Blut (5 ml) mittels Proteinaussalzung

Lyse der Erythrozyten mit 20 ml 1x C1-Puffer in einem 50 ml-Falcon-Röhrchen	Inkubation auf Eis, 10 min Zentrifugation (3000 x g, 4°C, 15 min) Verwerfen des Überstands
Waschen der mononukleären Zellen mit 8 ml 1x C1-Puffer	Zentrifugation (3000 x g, 4°C, 5 min) Wiederholung des Waschschrittes bis zur vollständigen Entfernung des Hämoglobins im Überstand
Lyse der mononukleären Zellen mit 400 µl kaltem G2-Puffer und Überführung in ein 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß	
Freisetzung der DNA durch Zugabe von 100 µl Proteinase K (20 mg/ml)	Inkubation über Nacht bei 48°C in einem Schüttel-Wasserbad
Aussalzen der Proteine mit 130 µl gesättigter NaCl-Lösung	Mischen durch mehrmaliges Invertieren Zentrifugation (4000 x g, RT, 15 min) Überführung des DNA-haltigen Überstands in ein neues 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß
Fällung der DNA mit 1 ml (ca. 2,5-faches Volumen) absolutem Ethanol (pro analysi)	Zentrifugation (20 000 x g, RT, 10 min) Verwerfen des Überstands
Waschen des DNA-Pellets durch Zugabe von 500 µl Ethanol (70%)	Zentrifugation (20 000 x g, RT, 5 min) Verwerfen des Überstands
Resuspension der DNA in 500 µl TE-Puffer (Stammlösung)	

Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) und 280 nm ( $OD_{280}$ ) bestimmt. Hierfür wurde eine Verdünnung (1:50) der Stammlösung hergestellt.

Eine gemessene OD von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 ng/µl doppelsträngiger DNA und errechnet sich wie folgt:

$$\text{DNA-Konzentration} = \text{OD}_{260} \times 50 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 50 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

Der Quotient  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  stellt ein Maß für die Reinheit der DNA dar. Werte zwischen 1,7 und 1,8 entsprechen einer reinen DNA-Lösung. Werte darüber zeigen RNA- oder Ethanolverunreinigungen an, Werte darunter Proteinverunreinigungen. Nach den Messungen wurde die DNA-Konzentration mit TE-Puffer auf 100 ng/µl eingestellt und diese Verdünnung als PCR-Gebrauchslösung bei 4°C aufbewahrt.

### 2.3.2 DNA-Isolierung aus formalinfixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe

#### *Präparation und Färbung der Gewebeschnitte*

Von jedem Paraffinblock wurde zunächst ein 3 µm dicker Schnitt für eine HE-Färbung angefertigt. Nach der histopathologischen Überprüfung der Diagnose und der Unterscheidung von Tumor (CCRCC)- und Normalgewebe durch einen Pathologen (G. Weirich) wurden weitere neun Schnitte von 8 µm Schichtdicke angefertigt und zur Darstellung der Zellkerne mit Hämalaun (H) gefärbt. Zur Vermeidung von Kontaminationen zwischen den Geweben der einzelnen Patienten wurden die benutzten Geräte und Werkzeuge (Mikrotom, Pinzetten, Pinsel, Wasserbad) vor dem Schneiden eines neuen Paraffinblock jeweils gründlich mit Seifenlauge und *Microclear* gereinigt und das Schneidemesser sowie die Färbelösungen erneuert. Nach der Fixierung der Schnitte (über Nacht bei 56°C im Trockenschrank) wurden die Färbungen nach folgenden Protokollen durchgeführt:

#### **Hämalaun-Färbung**

- 15 min in *Microclear* (Deparaffinierung)
- 3 min in Ethanol (100%)
- 3 min in Ethanol (96%)
- 3 min in Ethanol (70%)
- 5 min in Hämalaun, gut wässern
- 1 min in Ethanol (70%)
- 1 min in Ethanol (96%)
- 1 min in Ethanol (100%)
- Trocknen bei Raumtemperatur

#### **Hämalaun-Eosin-Färbung**

- 15 min in *Microclear* (Deparaffinierung)
- 3 min in Ethanol (100%)
- 3 min in Ethanol (96%)
- 3 min in Ethanol (70%)
- 5 min in Hämalaun, gut wässern
- 1 min in Eosin, kurz wässern
- 20 s in Ethanol (70%)
- 20 s in Ethanol (96%)
- 1 min in Ethanol (100%)
- 3 min in *Microclear*
- Trocknen bei RT, Eindecken in Gurr®



### **Isolierung der DNA aus Gewebeschnitten**

Für die DNA-Isolierung wurden die Tumoreale auf den H-gefärbten Schnitten auf der Unterseite der Objektträger mit einem wasserfesten Stift umrahmt. Die so markierten Gewebearale wurden anschließend mit einem sterilen Skalpell mikrodisektiert und der getrennten DNA-Isolierung von Tumor- und Normalgewebe zugeführt. Die DNA-Isolierung erfolgte in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen unter Durchführung der folgenden Lyse- und Extraktionsschritte. Die angegebenen Reaktionsvolumina wurden auf 15-20 mg Gewebe abgestimmt.

### **DNA-Isolierung aus archiviertem Gewebe mit dem QiaAmp® DNA Mini Kit nach modifiziertem Herstellerprotokoll**

Lyse der Zellen mit 130 µl ATL-Puffer und Proteinase K-Verdau mit 15 µl Proteinase K (20 mg/ml)	Inkubation über Nacht bei 56°C im Schüttelwasserbad Wiederholung des Proteinase K-Verdau für weitere 3 h bei unvollständiger Lyse
Entfernung der Proteine	Zentrifugation (20 000 x g, RT, 1 min) Überführung des Überstands in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß
Inaktivierung der Proteinase K mit 145 µl Puffer AL	Inkubation für 10 min bei 70°C
Fällung der DNA durch Zugabe von 155 µl Ethanol (96%)	Überführung auf eine Säule
Retention der DNA durch Binden an die Säulenmatrix	Zentrifugation (6000 x g, RT, 1 min) Verwerfen des Eluats
1. Waschen der an die Säulenmembran gebundenen DNA durch Auftragen von 500 µl Puffer AW 1 auf die Säule	Zentrifugation (6000 x g, RT, 1 min) Verwerfen des Eluats
2. Waschen der an die Säulenmembran gebundenen DNA durch Auftragen von 500 µl Puffer AW 2 auf die Säule	Zentrifugation (6000 x g, RT, 1 min) Verwerfen des Eluats
Entfernen der Restflüssigkeit	Leerzentrifugation (20 000 x g, RT, 3 min)
Elution der DNA von der Säulenmembran durch Zugabe von 100 µl erwärmtem TE-Puffer	5 min Inkubation nach Pufferzugabe Zentrifugation (6000 x g, RT, 1 min)

Die Konzentration und Reinheit der DNA-Lösung wurde wie in 2.3.1 beschrieben bestimmt. Anschließend wurde die DNA-Konzentration ebenfalls zur Herstellung einer PCR-Gebrauchslösung (100 ng/µl DNA) mit TE-Puffer verdünnt und bei 4°C gelagert. Die Qualität der DNA (Fragmentlängenspektrum) wurde in einem 1%igen Agarosegel (Seakem® ME Agarose) mit Hilfe eines Fragmentlängen-Markers (1 Kb Plus DNA Ladder) ermittelt.

## 2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Sowohl die DHPLC-Analyse als auch die direkte Sequenzierung zur Detektion von *VHL*-Mutationen basieren auf der Analyse von PCR-Produkten. Bei der PCR werden definierte DNA-Sequenzen mit Hilfe einer oder mehrerer, hitzestabiler DNA-Polymerasen und zweier spezifischer Oligonukleotide (Primer) exponentiell vervielfältigt (amplifiziert) (Mullis *et al.*, 1986; Mullis *et al.*, 1987; Saiki *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1985). Zunächst wird dabei die doppelsträngige DNA-Matrize (*template*-DNA) bei 94-96°C aufgeschmolzen (Denaturierung). Im nächsten Schritt werden die DNA-Einzelstränge schnell auf eine Temperatur abgekühlt (55-65°C), bei der sich die beiden Primer komplementär an die zu amplifizierende DNA-Sequenz anlagern (Annealing). Anschließend werden die Primer bei 72°C unter Einbau freier dNTPs von der DNA-Polymerase komplementär zum vorliegenden Matrizenstrang in 5'-3'-Richtung verlängert (Extension). Der alte und der neu synthetisierte Strang bilden gemeinsam einen neuen Doppelstrang, der in einem erneuten Zyklus die Matrize für die nächste Verdopplung liefert. Ein DNA-Abschnitt kann auf diese Weise in 30 Zyklen milliardenfach vervielfältigt werden.

Die drei *VHL*-Exons sowie benachbarte *splice consensus*-Regionen, wurden unter Verwendung folgender spezifischer PCR-Primer amplifiziert (Abb. 9).

### *PCR-Primer*

#### **Exon 1**

VHL28<sup>a</sup>            5'-CCG AGG AGG AGA TGG AGG CC-3'  
 VHL22<sup>a</sup>            5'-GAC CGT GCT ATC GTC CCT GC-3'  
 VHL13F<sup>b</sup>           5'-CCG AGG AGG AGA TGG AG-3'  
 VHL13R<sup>b</sup>           5'-TAT CGT CCC TGC TGG GTC-3'

#### **Exon 2**

I5<sup>a</sup>                 5'-CGG TGT GGC TCT TTA ACA ACC-3'  
 I3<sup>a</sup>                 5'-CAA GTG GTC TAT CCT GTA CTT-3'

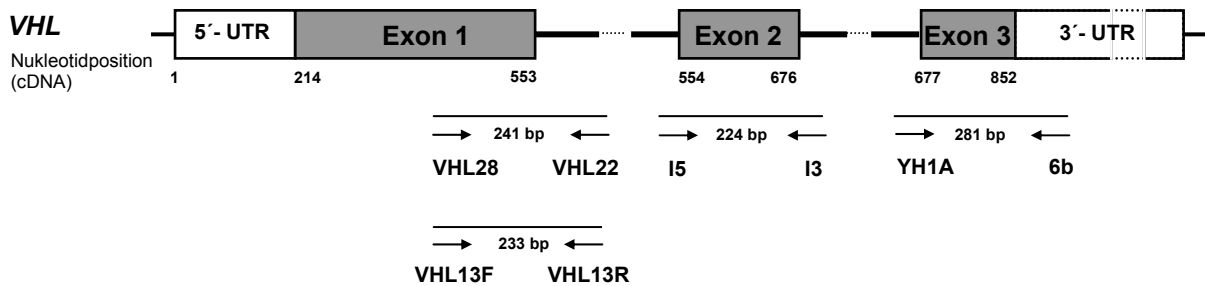
#### **Exon 3**

YH1A<sup>a</sup>             5'-TTC CTT GTA CTG AGA CCC TAG T-3'  
 6b<sup>a</sup>                5'-TAC CAT CAA AAG CTG AGA TGA AAC AGT GTA AGT-3'

<sup>a</sup> Glavac *et al.*, 1996

<sup>b</sup> Weirich *et al.*, 2002

In der Regel wurde die PCR im 96-*well*-Plattenformat in einem Standard-Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt. Bei Ansätzen, die nachfolgend mittels Gelelektrophorese aufgereinigt wurden, wurde das Reaktionsvolumen auf 50 µl erhöht. In jedem PCR-Ansatz wurde eine Wasserkontrolle mitgeführt. War diese positiv, wurde der gesamte PCR-Ansatz wiederholt.



**Abbildung 9:** *VHL*-PCR-Primer für die Amplifikation der Exons 1-3: Annealing-Position und Größe des zu erwartenden Amplikons in Basenpaaren (bp).

### PCR-Reaktionsansätze

Ein Standard-PCR-Reaktionsansatz enthielt folgende Reaktionskomponenten und wurde gemäß dem nebenstehenden Temperaturprofil durchgeführt.

#### PCR-Reaktionsansatz 1

Komponente	Volumen	Temperaturprofil		
		Schritt	Temperatur	Dauer
H <sub>2</sub> O dest.	15 µl	Denaturierung	94°C	5 min
PE-PCR-Puffer <sup>a</sup>	2,5 µl	<b>Denaturierung</b>	<b>94°C</b>	<b>1 min</b>
Primer A (20 µM)	1 µl	<b>Annealing</b>	<b>55°C, 62°C <sup>b</sup></b>	<b>30 s</b>
Primer B (20 µM)	1 µl	<b>Extension</b>	<b>72°C</b>	<b>1 min</b>
dNTP Mix (je 1,25 mM)	4 µl	Extension	72°C	4 min
AmpliTaq <sup>®</sup> (5 U/µl)	0,5 µl			
DNA (100 ng/µl)	1 µl			
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µl</b>			

**34 Zyklen**

<sup>a</sup>Perkin Elmer (mit 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3)

<sup>b</sup>62°C für Exon 1, 55°C für Exon 2 und Exon 3

Die in diesem Ansatz verwendete AmpliTaq<sup>®</sup>-DNA-Polymerase ist eine rekombinante DNA-Polymerase, die durch die Expression einer modifizierten Form des *Thermus aquaticus*-Taq-Polymerase-Gens in *E. coli* gewonnen wird. Ihr Aktivitätsoptimum liegt bei 55-75°C, einer Temperatur, bei der stringente Bedingungen für das Annealing der PCR-Primer herrschen.

Die Halbwertszeit dieses Enzyms beträgt bei 95°C ungefähr 40 min. Die AmpliTaq®-DNA-Polymerase besitzt keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität und keine *proofreading*-Aktivität.

Für DNA-Proben, die unter diesen Bedingungen nicht ausreichend amplifiziert werden konnten, wurde die PCR unter modifizierten Bedingungen durchgeführt. Zur Ermittlung der jeweils optimalen PCR-Bedingungen wurden verschiedene Annealing-Temperaturen, PCR-Pufferzusammensetzungen und Polymerasen getestet.

Im Rahmen dieser Optimierung konnte die Spezifität der PCR durch die Verwendung der AmpliTaq Gold®-Polymerase teilweise deutlich erhöht werden. Bei dieser DNA-Polymerase handelt sich um eine chemisch modifizierte Form der AmpliTaq®-DNA-Polymerase, die erst bei einer bestimmten Temperatur aktiviert wird, nach Abspaltung eines chemischen Inhibitors. Dadurch wird die Extension nicht korrekt angelagerter Primer bei suboptimalen Annealing-Temperaturen verhindert, so dass unspezifische PCR-Produkte vermieden und eine höhere Ausbeute an spezifischem PCR-Produkt erzielt werden kann.

Für die Amplifikation des GC-reichen *VHL*-Exon 1 hatte sich der folgende PCR-Reaktionsansatz bewährt.

### PCR-Reaktionsansatz 2

Komponente	Volumen	Temperaturprofil		
		Schritt	Temperatur	Dauer
H <sub>2</sub> O dest.	9 µl	Denaturierung	94°C	1 min
5x GC cDNA PCR Puffer <sup>a</sup>	5 µl	<b>Denaturierung</b>	<b>94°C</b>	<b>30 s</b>
GC Melt (5M) <sup>a</sup>	5 µl	<b>Annealing</b>	<b>56°C, 65°C<sup>a</sup></b>	<b>3 min</b>
Primer A (20 µM)	0,25 µl	<b>und Extension</b>		
Primer B (20 µM)	0,25 µl	Extension	56°C, 65°C <sup>a</sup>	3 min
dNTP Mix (je 1,25 mM)	4 µl			
Advantage-GC cDNA Pol. Mix <sup>a</sup>	0,5 µl			
DNA (100 ng/µl)	1 µl			
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µl</b>			

34 Zyklen

<sup>a</sup> Advantage™-GC cDNA PCR Kit

<sup>b</sup> 65°C für Exon 1, 56°C für Exon 2 und Exon 3

Der in diesem Reaktionsansatz zum Einsatz kommende Advantage™-GC cDNA Polymerase-Mix enthält eine KlenTaq-1 DNA-Polymerase, wobei es sich um ein Gemisch einer N-terminal deletierten *Taq*-Polymerase ohne 3'-5'-Exonukleaseaktivität und einer zweiten DNA-Polymerase mit 3'-5'-*proofreading*-Aktivität handelt. Zusätzlich sorgen hitzelabile Antikörper ähnlich wie bei der AmpliTaq Gold®-Polymerase für einen automatischen "hot

start“ der PCR-Reaktion. Der im Reaktionsansatz enthaltene DMSO-haltige Reaktionspuffer sowie der Zusatz von GC Melt unterstützen die Denaturierung doppelsträngiger DNA und schwächen die Basenpaarung in GC-reichen Sequenzen.

Die PCR-Reaktionsansätzen 1 und 2 lieferten bei der Amplifizierung von DNA aus archiviertem Gewebe nicht immer ausreichende Mengen an spezifischen PCR-Produkten. In diesen Fällen wurden alternativ zwei weitere PCR-Protokolle angewendet.

### **PCR-Reaktionsansatz 3**

Komponente	Volumen	Temperaturprofil		
		Schritt	Temperatur	Dauer
H <sub>2</sub> O dest.	13,87 µl	Denaturierung	95°C	15 min
10x Qiagen PCR Puffer <sup>a</sup>	2,5 µl	<b>Denaturierung</b>	94°C	30 s
5x Q-Solution <sup>a</sup>	5 µl	<b>Annealing</b>	55°C, 62°C <sup>b</sup>	30 s
Primer A (20 µM)	1 µl	<b>Extension</b>	72°C	1 min
Primer B (20 µM)	1 µl	Extension	72°C	4 min
dNTP Mix (je 10 mM) <sup>a</sup>	0,5 µl			
HotStarTaq™-Polymerase	0,13 µl			
DNA (100 ng/µl)	1 µl			
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µl</b>			

34 Zyklen

<sup>a</sup> Taq PCR Core Kit

<sup>b</sup> 62°C für Exon 1, 55°C für Exon 2 und Exon 3

Die in diesem PCR-Reaktionsansatz verwendete HotStarTaq™-Polymerase liegt ebenfalls als Komplex mit hitzeinstabilen Antikörpern vor. Diese Inaktivierung des Enzyms wird durch eine 15-minütige Inkubation bei 95°C zu Beginn der PCR aufgehoben. Auch diese Polymerase ist eine modifizierte DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, die in *E. coli* exprimiert wird. Ihre Halbwertszeit beträgt 10 min bei 97°C oder 60 min bei 94°C. Sie besitzt keine 3′-5′-Exonukleaseaktivität und verfügt über keine *proofreading*-Aktivität. Der in diesem Reaktionsansatz enthaltene Zusatz von Q-Solution verändert das Schmelzverhalten der DNA und kann so die PCR-Spezifität insbesondere bei der Amplifikation GC-reicher DNA-Sequenzen erhöhen.

Für DNA-Proben aus archivierten Geweben, die mit keinem der vorherigen PCR-Protokolle amplifiziert werden konnten, wurde eine weitere PCR-Modifikation unter Anwendung des Failsafe™ PCR PreMix Selection Kit vorgenommen.

Für den Failsafe™ PCR PreMix Selection Kit wurde das folgendes Protokoll verwendet.

### PCR-Reaktionsansatz 4

Komponente	Volumen
H <sub>2</sub> O dest.	9,25 µl
FailSafe™ PCR Puffer J,I <sup>a</sup>	12,5 µl
Primer A (20 µM)	1 µl
Primer B (20 µM)	1 µl
FailSafe™ PCR Enzyme Mix	0,25 µl
DNA (100 ng/µl)	1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µl</b>

### Temperaturprofil

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	96°C	8 min
<b>Denaturierung</b>	94°C	30 s
<b>Annealing</b>	53°C, 55°C, 62°C <sup>b</sup>	30 s
<b>Extension</b>	72°C	1 min
Extension	72°C	4 min

34 Zyklen

<sup>a</sup> Puffer J für Exon 1, Puffer I für Exon 2 und Exon 3

<sup>b</sup> 62°C für Exon 1, 55°C für Exon 2 und 55°C für Exon 3

Der in diesem Ansatz verwendete Polymerase-Mix gewährleistet eine höhere Lesegenauigkeit als die meisten anderen *Taq*-DNA-Polymerasen. Er enthält ein Gemisch aus verschiedenen, jedoch nicht näher beschriebenen DNA-Polymerasen, einschließlich einer 3'-5'-*proofreading*-Aktivität. Das Puffergemisch enthält neben den vier für die Reaktion notwendigen dNTP, MgCl<sub>2</sub> sowie den *enhancer* Betain (Trimethylglycin), der die Ausbeute und Spezifität von PCR-Produkten bei der Amplifikation GC-reicher DNA-Sequenzen erhöht. Da in diesem Ansatz keine chemischen Polymerase-Inhibitoren oder Antikörper enthalten sind, wurde ein *hot start* der PCR durchgeführt, indem die PCR-Ansätze zunächst auf Eis pipettiert und die Reaktionsgefäße anschließend in den auf über 80°C vorgewärmten Thermozyklerblock überführt wurden.

Für die Amplifikation einiger DNA-Proben aus archiviertem Gewebe wurde das folgende Protokoll mit einer *PfuTurbo*<sup>®</sup> Hotstart DNA Polymerase verwendet.

### PCR-Reaktionsansatz 5

Komponente	Volumen
H <sub>2</sub> O dest.	12 µl
10x <i>Pfu</i> DNA Polymerase-Puffer	2,5 µl
Primer A (20 µM)	2,5 µl
Primer B (20 µM)	2,5 µl
dNTP Mix (je 1,25 mM)	4 µl
<i>PfuTurbo</i> <sup>®</sup> Hotstart DNA Pol.	0,5 µl
DNA (100 ng/µl)	1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µl</b>

### Temperaturprofil

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	98°C	2 min
<b>Denaturierung</b>	95°C	30 s
<b>Annealing</b>	53°C, 55°C, 62°C <sup>c</sup>	30 s
<b>Extension</b>	72°C	7 min
Extension	72°C	10 min

34 Zyklen

<sup>c</sup> 62°C für Exon 1, 55°C für Exon 2 und 53°C für Exon 3

Die *PfuTurbo*<sup>®</sup> Hotstart DNA Polymerase besitzt eine hohe *proofreading*-Aktivität und ermöglicht in Kombination mit hitzelabilen Antikörpern einen automatischen *hot start* der PCR.

Alle PCR-Produkte wurden nach Ablauf der PCR bei 6-8°C gelagert und zur Überprüfung ihrer Spezifität und Menge auf ein 2%iges Agarosegel (Seakem<sup>®</sup> ME Agarose) aufgetragen. Bei unzureichender Amplifikation, erkennbar an der unter UV-Licht nur schwach mit Ethidiumbromid anfärbbaren DNA-Bande, wurde die PCR mit der zwei- bis sechsfachen Menge an eingesetzter DNA wiederholt. Auf diese Weise konnte die PCR-Produktmenge teilweise erheblich gesteigert werden. In Ausnahmefällen (geringe DNA-Konzentration) wurde die Zyklenzahl auf 45 erhöht oder 4 µl des PCR-Produkts reamplifiziert.

#### ***Aufreinigung der PCR-Produkte***

Für eine anschließende Sequenzierung wurden **spezifische** PCR-Produkte mit dem QIAquick<sup>™</sup> PCR Purification Kit aufgereinigt. Bei dieser Methode werden Amplifikate bei hoher Salzkonzentration an die Silika-Membran einer Spin-Säule gebunden, während Verunreinigungen (Salze, PCR-Primer, PCR-Pufferzusätze) die Säulenmatrix passieren und auf diese Weise entfernt werden. Anschließend wurde die aufgereinigte DNA mit TE-Puffer von der Säule eluiert. Die Aufreinigung wurde nach Angabe des Herstellers durchgeführt.

Amplifikate, die auf dem Kontrollgel eine zusätzliche schwache **unspezifische** Bande zeigten sowie PCR-Produkte für die DHPLC-Mutationsanalyse, die nicht im Reaktionsansatz 1 hergestellt worden waren, d.h. Additive enthielten, die die DHPLC möglicherweise beeinträchtigen, wurden über ein 1,9%iges Agarosegel (1,5% NuSieve<sup>®</sup> GTG<sup>®</sup> Agarose und 0,4% Seakem<sup>®</sup> ME Agarose) elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aus dem Agarosegel aufgereinigt. Hierfür wurden die mit Ethidiumbromid gefärbten spezifischen PCR-Banden unter UV-Licht mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick<sup>™</sup> Gel Extraction Kit aus den Gelstückchen extrahiert und in TE-Puffer gelöst. Dadurch wurden unspezifische PCR-Produkte und störende Pufferzusätze (z.B. DMSO) entfernt.

## 2.5 Denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Für die Detektion von *VHL*-Keimbahnmutationen wurde das Varian-Helix™-System (Varian-System) sowie das Wave® Nucleic Acid Fragment Analysis System (Wave-System) verwendet. Die DHPLC-Analyse wurde nach der Methode von Oefner und Underhill (Oefner *et al.*, 1998) durchgeführt, die auf der unterschiedlichen Migrationsgeschwindigkeit von DNA-Homo- und Heteroduplices durch die Matrix einer Trennsäule basiert. Diese werden von einer mobilen Phase (Laufpuffer) auf die DHPLC-Trennsäule überführt, die aus einer hydrophoben Polymermatrix besteht. Indem sich hydrophobe Ammonium-Kationen des TEAA im Laufpuffer an die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA anlagern und die Alkylgruppen des TEAA an die Oberfläche der Polymermatrix binden, werden die DNA-Moleküle an die Säule gebunden. Die Freigabe der DNA-Fragmente erfolgt über Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie, bei der die DNA-Fragmente mittels einer kontinuierlich steigenden Acetonitril-Konzentration von der Polymermatrix eluiert werden. Längere Fragmente haften dabei stärker und damit länger an der Säule als kürzere Fragmente. Bei einer nicht denaturierenden Temperatur verläuft die Trennung daher streng nach Fragmentlänge und ist somit unabhängig von der Basenzusammensetzung. Bei der Mutationsanalyse hingegen werden PCR-Fragmente identischer Länge voneinander getrennt, die sich aufgrund einer Mutation in ihrer Basenzusammensetzung unterscheiden. Beginnend mit einer kontrollierten De- und Renaturierung von PCR-Produkten mit einer heterozygoten Mutation werden bis zu vier mögliche DNA-Duplices generiert (Wildtyp/Wildtyp, Wildtyp/Mutante<sup>(sense)</sup>, Mutante<sup>(antisense)</sup>/Wildtyp, Mutante/Mutante), die sich während der DHPLC-Analyse im Bereich ihrer spezifischen Schmelztemperatur aufgrund minimaler struktureller Unterschiede in ihren Migrationsgeschwindigkeiten unterscheiden. Dadurch entsteht ein Elutionsprofil mit bis zu vier Elutionspeaks. Je größer die Migrationsunterschiede zwischen den vier möglichen DNA-Duplices sind umso größer ist der Abstand zwischen den einzelnen Elutionspeaks. Liegen die Migrationsgeschwindigkeiten jedoch aufgrund struktureller Besonderheiten der Hetero- bzw. Homoduplices nahe beieinander, so können die einzelnen Peakflächen miteinander verschmelzen, so dass weniger als vier Peaks im Elutionsprofil auftreten. Eine Mutation kann im Minimalfall nur einen einzelnen Peak mit einer „Schulter“ zeigen. In Einzelfällen ist sie überhaupt nicht von der Wildtypsequenz zu unterscheiden. Wird die Temperatur über die Schmelztemperatur der DNA-Duplices angehoben, denaturieren diese vollständig und ihre Einzelstränge werden mit nur einem Elutionspeak angezeigt. Ein Einzelpeakprofil entsteht auch dann, wenn nur Homoduplices vorliegen, z.B. beim Vorliegen einer homozygoten Wildtyp-Sequenz oder beim Vorliegen



einer homozygoten Mutation. Letztere kann daher nur durch Zumischen von Wildtyp-Amplifikat in Kombination mit der Wiederholung der Analyse detektiert werden.

Für die DHPLC-Analyse wurden die PCR-Produkte zunächst 5 min bei 95°C denaturiert und zur Bildung der DNA-Duplicates schrittweise (1°C/min) auf 65°C abgekühlt. Die spezifischen Schmelztemperaturen wurden für Analysen mit dem Varian-System mit der im Internet zugänglichen Software der Stanford Universität<sup>1</sup> ermittelt und für Analysen mit dem Wave<sup>®</sup>-System mit der WAVEMaker Software. Dabei ergaben sich für die einzelnen *VHL*-PCR-Produkte die folgenden spezifischen Schmelztemperaturen:

	<b>Melt-Programm (Stanford)</b>	<b>WAVEMaker Software</b>
<b>Exon 1 (VHL28/22)</b>	63-65°C	68-70°C
<b>Exon 1 (VHL13F/VHL13R)</b>	61-65°C	68-69°C
<b>Exon 2 (I5/I3)</b>	55-59°C	59-60°C
<b>Exon 3 (YH1A/6b)</b>	55-60°C	60-62°C

Zur Ermittlung der optimalen Analysetemperatur wurde die Amplifikate im berechneten Temperaturintervall analysiert, wobei mit der niedrigsten Temperatur begonnen wurde und die Analyse in aufsteigenden 1°C-Schritten wiederholt wurde.

#### ***Varian-Helix<sup>TM</sup>-System***

Es wurden 5 µl PCR-Produkt auf die Trennsäule injiziert und mit einem linearen Acetonitril-Gradienten aus Puffer A (0,1 M TEAA, 0,1 mM EDTA) und Puffer B (0,1 M TEAA, 25% Acetonitril, 0,1 mM EDTA) eluiert. Der Anteil an Puffer B wurde innerhalb von sieben Minuten von 40% auf 95% erhöht. Die Dauer der gesamten Analyse betrug 8,5 min. In den letzten 1,5 min wurde der Anteil an Puffer B auf 40% gesenkt. Die Durchflussrate des Elutionspuffers durch die Säule betrug konstant 1 ml/min. Bei der Peak-Elution betrug der Anteil des Puffers B 70-75%.

#### ***Wave<sup>®</sup> Nucleic Acid Fragment Analysis System Transgenomic HSM***

Es wurden ebenfalls 5 µl PCR-Produkt auf die DNA Sep<sup>®</sup> Column injiziert. Die eingesetzten Puffer entsprachen in ihrer Zusammensetzung denen des Varian-Systems. Die Gesamtanalysenzeit betrug 7,7 min. Der Anteil an Puffer B wurde von 48% auf 100% erhöht. Zum Zeitpunkt der Peak-Elution betrug er 60-65%. Die Durchflussrate des Elutionspuffers durch die Säule lag konstant bei 0,9 ml/min.

<sup>1</sup> <http://insertion.stanford.edu/melt/html>

Um das Elutionsprofil einer heterozygot vorliegenden Mutation von dem Elutionsprofil einer Wildtypsequenz unterscheiden zu können, wurden zunächst die einzelnen Wildtyp-Elutionsprofile der zu untersuchenden *VHL*-PCR-Produkte (Exons 1-3) etabliert. Hierfür wurden die Amplifikate der Blut-DNA-Proben von je fünf Patienten verwendet, deren Wildtyp-Sequenzen durch Sequenzierungen bekannt waren. Diese PCR-Produkte wurden mittels DHPLC analysiert um Kontroll-Elutionsprofile zu erhalten.

Die Auswertung, d.h. der Vergleich der Wildtypprofile mit den Profilen der zu testenden Patientenproben wurde mit Hilfe der Software des jeweiligen Geräteherstellers vorgenommen (Star 5.5 bzw. Wave Maker 4.1). Um die konstante Trennleistung der DHPLC-Säule zu überprüfen, wurde zu Beginn und am Ende jeder Probenserie eine bekannte Probe mit komplexem Elutionsprofil analysiert. Bei der Etablierung der Elutionsprofilen bereits bekannter *VHL*-Mutationen in Blut-DNA-Proben von *VHL*-Patienten wurde die DHPLC-Analyse blind durchgeführt, d.h. ohne dass vorab eine Zuordnung von Probe und Mutation möglich war.

## 2.6 Sequenzierung

### *Sequenzierung von PCR-Produkten*

Die Sequenzierung der PCR-Produkten wurde nach der Kettenabbruch- oder Didesoxy-Methode-Methode (Sanger *et al.*, 1977) unter Verwendung des AmpliTaq<sup>®</sup> FS BigDye Terminator Premix durchgeführt und die Sequenzier-PCR-Produkte mittels Kapillarelektrophorese auf einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer analysiert. Für die Sequenzierung der PCR-Produkte in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung wurden dieselben Primer wie für die PCR verwendet. Die Kettenabbruchreaktionen erfolgten mittels fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTP) im Reaktionsgemisch. Während der automatisierten elektrophoretischen Auftrennung der unterschiedlich langen und fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden von der Software des Geräts vierfarbige Elutionsprofile aufgezeichnet, die der komplementären Basenabfolge des zu analysierenden DNA-Einzelstrangs entsprachen.

Die Sequenzierreaktionen wurden in einem Volumen von 20 µl in 0,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen nach folgendem Protokoll durchgeführt.

<b>Sequenzierreaktion für PCR-Produkte</b>		<b>Temperaturprofil</b>		
<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
H <sub>2</sub> O (HPLC-Qualität)	13,5 µl	<b>Denaturierung</b>	96°C	10 s
AmpliTa <sup>®</sup> q FS BigDye Terminator Premix	4 µl	<b>Annealing</b>	58°C	90 s
Sequenzierprimer (20 µM)	0,5 µl	<b>und Extension</b>		
PCR-Produkt	2 µl			
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>			

19 Zyklen

Um Störungen bei der Fluoreszenzdetektion zu vermeiden, wurden farblose Eppendorf-Reaktionsgefäße und HPLC-gereinigtes Wasser verwendet. Der AmpliTa<sup>®</sup>q FS BigDye Terminator Premix enthielt alle für die Reaktion notwendigen Komponenten (dNTP, fluoreszenzmarkierte ddNTP, DNA-Polymerase).

Im Anschluss an die Sequenzierreaktion wurden die nicht inkorporierten, fluoreszenzmarkierten ddNTP durch eine Ethanol-fällung entfernt. Dazu wurde das Reaktionsgemisch zunächst mit 120 µl H<sub>2</sub>O (HPLC-Qualität) und 15 µl Natriumacetat (3M, pH 4,6) versetzt und die DNA durch Zugabe von 375 µl Ethanol (absolut) gefällt. Nach einer Zentrifugation (20 000 x g, RT, 15 min) wurde das DNA-Pellet mit 250 µl Ethanol (70%) gewaschen und erneut zentrifugiert (20 000 x g, RT, 5 min). Anschließend wurde das Pellet 20 min luftgetrocknet, in 20 µl H<sub>2</sub>O (HPLC-Qualität) resuspendiert und der Kapillarelektrophorese zugeführt. Die Sequenzierreaktionen der PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Software „Sequence Navigator<sup>TM</sup>“ ausgewertet.

Beim Vorliegen einer (heterozygoten) *VHL*-Keimbahnmutation in einer DNA-Probe handelt es sich immer um ein Gemisch der beiden *VHL*-Allele, da homozygote *VHL*-Mutationen letal sind und daher nicht in der Keimbahn von *VHL*-Patienten auftreten. Idealerweise ist daher das Mengenverhältnis der beiden amplifizierten Allele bei der Sequenzieranalyse 1:1.

Beim Nachweis somatischer *VHL*-Mutationen kann die aus dem Tumorgewebe isolierte DNA zusätzlich unterschiedliche Mengen an Wildtyp-DNA enthalten, die von den in den Tumor infiltrierten Lymphozyten und von Stromazellen herrührt. In diesem Fall verschiebt sich der Anteil des mutierten Allels zugunsten des Wildtyp-Allels und der Nachweis einer Mutation kann erschwert sein.

Ein Nukleotidaustausch zeigt sich im Sequenzierchromatogramm in Form zweier sich überlagernder Peaks mit den für beide Nukleotide charakteristischen Fluoreszenzfarben. Liegen die beiden Allele im Verhältnis 1:1 vor (Keimbahn), sind die beiden Peaks etwa gleich hoch. Ist das Verhältnis der beiden Allele jedoch in Richtung des Wildtyps verschoben (somatische Mutation), kann der Mutationspeak deutlich unterhalb des Wildtypepeaks liegen und mit einem Stör- oder Hintergrundsignal verwechselt werden.

Zur Bestätigung eines Sequenzierergebnisses wurden die PCR-Produkte daher sowohl in Vorwärts- als auch in Rückwärtsrichtung sequenziert. Eine Mutation wurde nur bewertet, wenn die Höhe des Mutationspeaks in einer Sequenzierichtung mindestens einem Drittel der Höhe des Wildtypepeaks entsprach und die Mutation in beiden Richtungen, d.h. auf beiden DNA-Strängen, nachweisbar war. In nicht eindeutigen Fällen wurde erneut amplifiziert und sequenziert.

War die in der Sequenzierreaktion eingesetzte amplifizierte DNA auf dem Kontrollgel nur als schwache Bande zu erkennen und zeigte der Laserdetektor bei der Analyse der Sequenzierprodukte kein Signal an, wurde die Sequenzierreaktion mit einer größeren Menge an PCR-Produkt (4 µl) wiederholt und die Zyklenzahl auf 25 erhöht.

### **Plasmid-Sequenzierungen**

Ein Mutation, die in einem klonierten *VHL*-PCR-Produkt liegt, wird durch eine komplette Änderung der Peakfarbe im Sequenzierchromatogramm angezeigt, da bei einer Klonierung immer nur eines der beiden Allele in den Vektor inseriert wird (vorausgesetzt das mutierte Allel und nicht das Wildtyp-Allel wurde inseriert). Aus diesem Grund genügte hier in der Regel die Sequenzierung in nur eine Richtung.

In bakterielle Plasmide klonierte *VHL*-Gensequenzen wurden nach folgendem Protokoll sequenziert.

#### **Sequenzierreaktion für Plasmide**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Temperaturprofil</b>		
		<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
H <sub>2</sub> O (HPLC-Qualität)	7,8 µl	<b>Denaturierung</b>	96°C	10 s
AmpliTaq <sup>®</sup> FS BigDye Terminator Premix	8 µl	<b>Annealing</b>	50°C	5 s
Sequenzierprimer (20 µM)	0,2 µl	<b>Extension</b>	60°C	4min
Plasmid-DNA (50-100 ng/µl)	4 µl	<b>keine abschließende Extension</b>		
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>			

24 Zyklen

Für die Sequenzierung der *VHL*-Exon 1-PCR-Produkte, die in den **pCR<sup>®</sup> 2.1-Vektor** kloniert worden waren (2.7), wurden folgende Sequenzierprimer verwendet:

M13 rv      5' -CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'  
 M13 fw      5' -GTA AAA CGA CGG CCA G-3'

Für die komplette Sequenzierung der in den **pBluescript<sup>®</sup> II SK(+)-Vektor** klonierten *VHL*-cDNA (2.8) wurden folgende Sequenzierprimer verwendet:

T7            5' -TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'  
 8tt3b        5' -GTC GAA GAG TAC GGC CCT G-3'  
 8tt3c        5' -ACA CGA TGG GCT TCT GGT-3'  
 8tt3d        5' -GAT ACA GGA CTG GTT CCT-3'  
 8tt3e        5' -GAC TTG TCT GCC TCC TGC TTT GGG-3'  
 8tt3f        5' -CTA GGA TTG ACA TTC TAC AGT TGT GA-3'  
 M13 rv      5' -CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'

## 2.7 Klonierung

Einige Amplifikate von DNA-Proben aus archiviertem RCC-Gewebe enthielten mehrere somatische *VHL*-Mutationen. Da bei der Sequenzierung nicht unterschieden werden kann, ob multiple Mutationen auf dem gleichen Allel oder auf unterschiedlichen Allelen liegen, wurden diese Amplifikate kloniert. Dazu wurde eine PCR in einem Volumen von 25 µl gemäß dem Protokoll des PCR-Reaktionsansatzes 4 (2.4) mit 4 µl DNA durchgeführt. Der letzte PCR-Elongationsschritt wurde auf 10 min erhöht, um dem in diesem Ansatz verwendeten FailSafe<sup>™</sup> PCR Enzym-Mix (mit *proofreading*-Aktivität) das Anhängen von Desoxyadenosin (A)-Resten an die 3'-Enden der PCR-Produkte zu ermöglichen. Diese sind notwendig für die im Anschluss an die PCR durchgeführte Ligationsreaktion. Davor wurden die PCR-Produkte zügig mit dem QIAquick<sup>™</sup> PCR Purification Kit aufgereinigt.

### **Ligation**

Für die Ligation wurden 4 µl des aufgereinigten PCR-Produkts mit 1 µl (10x) Ligationspuffer und 100 ng des pCR<sup>®</sup> 2.1-Klonierungsvektors (25 ng/µl) (beide TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit) versetzt und 5 min bei RT unter vorsichtigem Mischen inkubiert. Der linearisierte pCR<sup>®</sup> 2.1-Vektor enthält überhängende 3'-Desoxythimidin (T)-Reste und ist an das Enzym Topoisomerase I gekoppelt. Dieses Enzym ermöglicht die Ligation durch Zusammenführen

der komplementären freien A-(Insert)- und T-(Vektor) Überhänge. Im Anschluss daran wurde der Reaktionsansatz für einige Minuten auf Eis inkubiert.

### **Chemische Transformation**

Für die chemische Transformation wurden 50 µl einer Bakteriensuspension kompetenter TOP 10F`-Zellen (2.9) auf Eis aufgetaut und mit 2 µl des Ligationsansatzes versetzt. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig mit der Pipettenspitze gemischt und erst 30 min auf Eis und dann 30 s bei 42°C inkubiert. Durch den Hitzeschritt wird die Zellwand der kompetenten Bakterien permeabel, so dass die Plasmide in das Zellinnere gelangen können. Im Anschluss daran wurde erneut 2 min auf Eis inkubiert, um die Öffnungen in der Zellwand wieder zu schließen. Um die transformierten Bakterien zur Teilung und zur Expression des Ampicillin-Resistenzgens anzuregen, wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben und die Zellen 1 h bei 37°C in einem Bakterieneschüttler inkubiert. Danach wurden je Transformationsansatz einmal 50 µl und einmal 100 µl der Bakteriensuspension auf je eine LB-Amp-Agarplatte mit IPTG und X-Gal ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **Blau-Weiß-Selektion**

TOP 10F`-Zellen können das lacZ $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase nicht mehr exprimieren, die für ihre Funktion sowohl das lacZ $\alpha$ - als auch das lacZ $\Omega$ -Fragment benötigt. Der pCR<sup>®</sup> 2.1-Klonierungsvektor enthält neben einem Amp-Resistenzgen für die Selektion der transformierten Bakterien auch die intakte genetische Information für das lacZ $\alpha$ -Fragment. Nach einer erfolgreichen Transformation von TOP 10F`-Zellen mit diesem Vektor kann durch Komplementation des lacZ $\alpha$ -Fragments mit dem von den TOP 10F`-Zellen exprimierten lacZ $\Omega$ -Fragment eine biologisch aktive  $\beta$ -Galaktosidase gebildet werden. Voraussetzung dafür ist die Gegenwart von IPTG, dem Induktor des lac-Operons. Die  $\beta$ -Galaktosidase setzt das im Medium enthaltene Substrat X-Gal zu einem blauen Indigofarbstoff um, so dass sich die erfolgreich transformierten TOP 10F`-Kolonien blau färben. Nach erfolgreicher Klonierung des *VHL*-Inserts in den Vektor befindet sich das Insert allerdings genau im kodierenden Bereich des lacZ $\alpha$ -Fragments, so dass die entsprechend transformierten TOP 10F`-Zellen auch weiterhin keine aktive  $\beta$ -Galaktosidase bilden und X-Gal nicht zu dem blauen Indigofarbstoff umsetzen können. Da diese Zellen allerdings das Amp-Resistenzgen des pCR<sup>®</sup> 2.1-Vektors enthalten, bilden sie auf LB-Amp-Agarplatten weiße Kolonien und können auf diese Weise einfach erkannt werden.

Pro Transformationsansatz wurden zehn bis 15 dieser weißen Kolonien mit einem sterilen Holzstäbchen von den LB-Amp-Agarplatten abgenommen und in jeweils 5 ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37°C in einem Bakterienschüttler (220 rpm) inkubiert. Am folgenden Tag wurden 500 µl der Bakteriensuspension für eventuell nötige Nachuntersuchungen entnommen und einige Tage bei 4-6°C aufbewahrt. Mit dem Rest der Bakteriensuspension (4,5 ml) wurde eine Plasmid-DNA-Isolierung unter Verwendung des QIAprep® Spin Miniprep Kit nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und nach der Sequenzierung des humanen *VHL*-Inserts (2.6) bei 4°C aufbewahrt.

## 2.8 Generierung von *VHL*-Mutationskonstrukten

In der Absicht, zukünftige funktionelle Analysen einzuleiten, die den Effekt möglicher relevanter *VHL*-Mutationen, einzeln und in Kombination, untersuchen sollen wurden die folgenden *VHL*-Mutationen einzeln und in Kombinationen mittels einer ortsgerichteten Mutagenese (*site-directed mutagenesis*, SDM) in die cDNA des *VHL*-Gens eingeführt:

- 454 C>T
- 775 T>G
- 570 C>G<sup>1</sup>
- 699 C>G<sup>1</sup>

### **Plasmid**

Die in einen pBluescript<sup>®</sup> II SK(+)-Vektor klonierte *VHL*-cDNA (Abb. 10) wurde freundlicherweise von Dr. Igor Kuzmin vom *Laboratory of Immunobiology* des *National Cancer Institute-Frederick Cancer Research and Development Center (NCI-FCRDC)*, *Frederick, Maryland, USA*, zur Verfügung gestellt. Da bei der SDM die eingesetzte, parentale DNA methyliert sein muss, wurde das Plasmid zunächst in TOP 10F'-Zellen, die über die Funktion der DNA-Methylierung (*dam*<sup>+</sup>) verfügen, eingeführt und vermehrt.

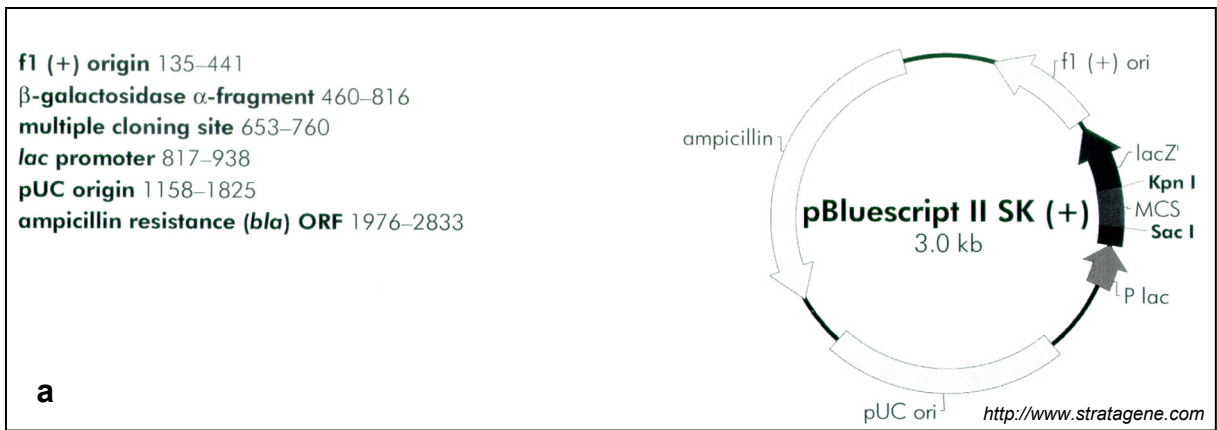
### **Transformation**

Für die Transformation der TOP 10F'-Zellen wurden 50 µl einer kompetenter TOP 10F'-Zellsuspension auf Eis aufgetaut und mit 1 µg des pBluescript<sup>®</sup> II SK(+)-Plasmids mit der humanen *VHL*-cDNA versetzt. Anschließend wurden die Zellen wie in 2.7 beschrieben transformiert und auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Pro Platte wurden 5 Kolonien mit einem sterilen Holzstäbchen in jeweils 5 ml LB-Amp-Medium überführt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Danach wurde die Plasmid-DNA mit dem QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit nach Angabe des Herstellers isoliert (2.7).

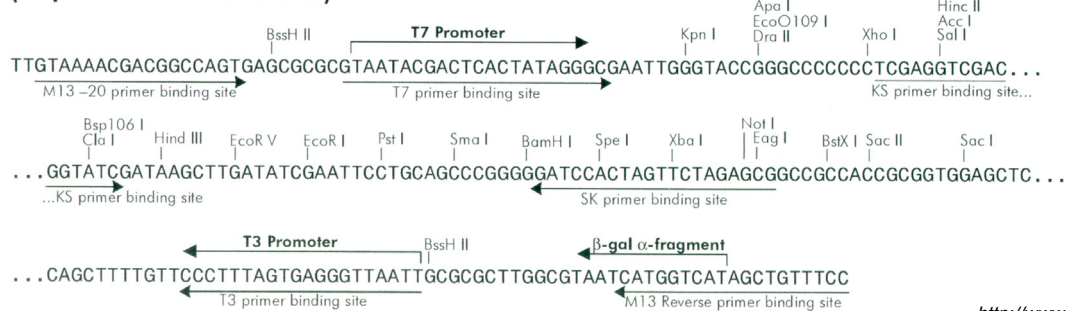
---

<sup>1</sup> siehe Tabelle 6, DNA-Nr.1695





**pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region**  
(sequence shown 598–826)



```

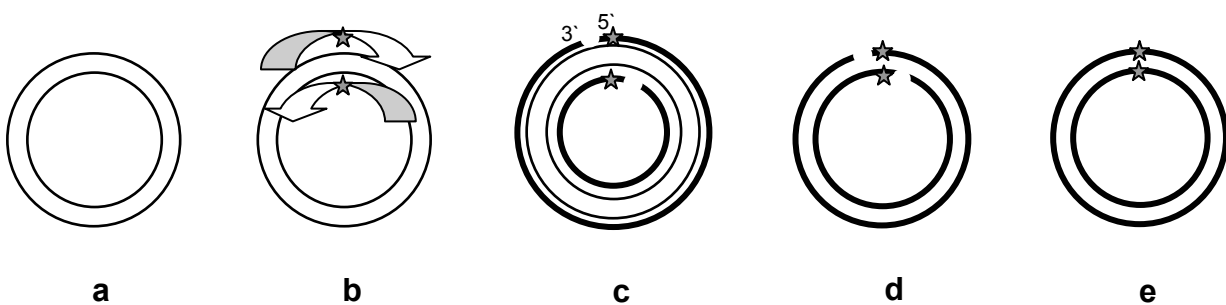
gcgcgtaatacagactcactatagggcgaaattgggtaccgggccccccctcgaggtcgacgggtatcgataagctt
gatatcgaattcCGGATCCCGCGGCGTCCGGCCCGGGTGGTCTGGATCGCGGAGGGAATGCCCGGAGGGCGGA
GAACTGGGACGAGGCCGAGGTAGGCGCGGAGGAGGCAGGCGTCAAGAGTACGGCCCTGAAGAAGACGGCGGGG
AGGAGTCCGGGCGCCGAGGAGTCCGGCCCGAAGAGTCCGGCCCGGAGGAAC TGGGCGCCGAGGAGGAGATCGAG
GCCGGGCGGCGCGGCCCCGTGCTGCGCTCGGTGAACTCGCGCGAGCCCTCCCAGGTCATCTTCTGCAATCGCAG
TCCGCGCGTCTGTGCTGCCCGTATGGCTCAACTTCGACGGCGAGCCGAGCCCTACCCAACGCTGCCGCCCTGGCA
CGGGCCCGCCGATCCACAGCTACCGAGGTCACCTTTGGTCTTTCAGAGATGCAGGGACACACAGTGGGCTTCTG
GTTAACCAAACCTGAATTATTTGTGCCATCTCTCAATGTTGACGGACAGCCTATTTTTGCCAAATATCACACTGCC
AGTGTATACTCTGAAAGAGCGATGCTCCAGGTTGTCCGGAGCCTAGTCAAGCCTGAGAATTACAGGAGACTGG
ACATCGTCAGGTCGCTCTACGAAGATCTGGAAGACCACCCAAATGTGCAGAAAGACCTGGAGCGGCTGACACAG
GAGCGCATTGCACATCAACGGATGGGAGATTGAAGATTTCTGTTGAAACTTACACTGTTTTCATCTCAGCTTTTG
ATGGTACTGATGAGTCTTGATCTAGATACAGGACTGGTTCCTTCCCTTAGTTTTCAAAGTGTCTCATTCTCAGAGT
AAAATAGGCACCATTTGCTTAAAAGAAAGTTAACTGACTTCACTAGGCATTGTGATGTTTTAGGGGCAAACATCAC
AAAATGTAATTTAATGCCTGCCATTAGAGAAGTATTTATCAGGAGAAGGTGGTGGCATTTTTTGTCTTCCTAGTA
AGTCAGGACAGCTTGTATGTAAGGAGGTTTATATAAGTAATTCAGTGGGAATTGCAGCATATCGTTTTAATTTTA
AGAAGGCATTGGCATCTGCTTTTAATGGATGTATAATACATCCATTCTACATCCGTAGCGGTTGGTGACTTGTG
TGCTTCTGCTTTGGGAAGACTGAGGCATCCGTGAGGCAGGGACAAGTCTTTCTCCTCTTTGAGACCCAGTGC
CTGCACATCATGAGCCTTCAGTCAGGGTTTGTGAGAGGAACAAACCAGGGGACACTTTGTTAGAAAGTGCTTAG
AGGTTCTGCCTCTATTTTTGTGTTGGGGGTGGGAGAGGGGACCTTAAAAATGTGTACAGTGAACAAATGTCTTAAA
GGGAATCATTTTTGTAGGAAGCATTTTTTATAATTTTCTAAGTCGTGCACCTTTCTCGGTCCACTCTTGTGTAAG
TGCTGTTTTTACTGTTTCTAAACTAGGATTGACATTTCTACAGTTGTGATAATAGCATTTTTGTAACTTGCCA
TCCGCACAGAAAATACGAGAAAATCTGCATGTTTGTATTATAGTATTAATGGACAAATAAGTTTTTGTCTAAATGT
GAGTATTTCTGTTCTTTTTGTAAATATGTGACATTCCTGATTGATTTGGGTTTTTTTTGTTGTTGTTGTTTTGT
TTTTTTTTGTTTTTTTTGGGATGGAGGgaattcctcgacccccgggggatccactagttctagagcg
    
```

**c**

**Abbildung 10:** Bluescript II SK (+) Vektor (a), Bluescript II SK (+/-) multiple cloning site (MCS) (b) und in den Bluescript II SK (+) Vektor inserierte humane *VHL*-cDNA-Sequenz (c). Die *VHL*-cDNA (Großbuchstaben) wurde durch einen *Eco*RI-Verdau (Erkennungssequenz **gaattc**) auf die Insertion in die MCS des Vektors vorbereitet (Vektorsequenz klein geschrieben). Die beiden alternativen Translationsstartstellen (ATG) für das pVHL sind durch eine Umrahmung, Nukleotide die mittels einer ortsgerichteten Mutagenese (2.8) mutiert wurden (Nukleotidpositionen 454, 570, 699 und 775) sind durch einen schwarzen Hintergrund hervorgehoben.

### Ortsgerichtete Mutagenese

Für eine SDM werden Mutagenese-Primer benötigt, die sich an gleicher Stelle des Vektors gegenüber liegen (Abb. 11). Diese tragen die einzufügende Mutation ungefähr in der Mitte ihrer Sequenz. Wie in einer PCR werden die Mutagenese-Primer durch die *PfuTurbo*<sup>®</sup> DNA-Polymerase des QuikChange<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit verlängert, wobei die Mutagenese-Primer einschließlich der Mutation in den neu synthetisierten, nicht methylierten Tochterstrang inkorporiert werden. Der parentale, methylierte Strang bildet gemeinsam mit dem neu synthetisierten Strang ein doppelsträngiges Plasmid, das am 5'-Ende des Mutagenese-Primers einen Einzelstrangbruch trägt. Der Unterschied zu einer normalen PCR besteht darin, dass nur der parentale Strang amplifiziert wird. Lagert sich ein Mutagenese-Primer an einen Tochterstrang an, so kann er wegen des Einzelstrangbruchs am 5'-Ende des komplementären, inkorporierten Mutagenese-Primers nicht in 5'-3'-Richtung verlängert werden. Die parentale DNA wird nach der SDM durch die Restriktions-Endonuklease *DpnI*, welche die methylierte Erkennungsequenz 5-GmATC-3' schneidet, verdaut, so dass nur die neu synthetisierten DNA-Stränge mit der eingefügten Mutation im Reaktionsansatz verbleiben. Diese lagern sich zu einem doppelsträngigen Plasmid zusammen, dessen Strangenden nach einer erneuten Transformation in den TOP 10F'-Zellen geschlossen werden.



**Abbildung 11:** Prinzip der ortsgerechten Mutagenese. Ein doppelsträngiges, methyliertes Plasmid (a), welches das Insert enthält, in das eine Punktmutation (*Stern*) eingefügt werden soll, wird mit Hilfe von zwei sich gegenüber liegenden synthetischen Oligonukleotidprimern (*Pfeile* in b), die die Mutation enthalten, in einer PCR-ähnlichen Reaktion amplifiziert. Die neu synthetisierten, nicht methylierten DNA-Stränge (c, fett) werden an ihren Enden nicht geschlossen („*staggered nicks*“). Nach Verdau der parentalen, methylierten DNA durch das Enzym *DpnI* (nicht gezeigt) bleiben die beiden komplementären, neu synthetisierten Stränge mit der eingefügten Mutation übrig (d). Nach der Transformation von TOP 10F'-Zellen mit diesem Plasmid werden die Strangbrüche geschlossen (e).

Die SDM-Reaktionen wurden nach folgendem Protokoll und mit den darunter aufgeführten Mutagenese-Primern durchgeführt.

### SDM-Reaktionsansatz

Komponente	Volumen
H <sub>2</sub> O dest.	39,5 µl
10 x Reaktionspuffer	5 µl
Mutagenese-Primer A (100 ng/µl)	1,25 µl
Mutagenese-Primer B (100 ng/µl)	1,25 µl
dNTP Mix (je 5 mM)	1 µl
<i>PfuTurbo</i> <sup>®</sup> DNA-Polymerase(2,5 U/µl)	1 µl
Plasmid-DNA (50 ng/µl)	1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50 µl</b>

### Temperaturprofil

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturierung	95°C	30 s
<b>Denaturierung</b>	95°C	30 s
<b>Annealing</b>	55°C	1 min
<b>Extension</b>	68°C	10 min
<b>keine abschließende Extension</b>		

11 Zyklen

### Mutagenese-Primer

#### 454 C>T

454 fw: 5`-CTT CTG CAA TCG CAG TTC GCG CGT CGT GCT GCC CGT ATG G-3`

454 rv: 5`-CCA TAC GGG CAG CAC GAC GCG CGA ACT GCG ATT GCA GAA G-3`

#### 570 C>G

570 fw: 5`-CCG AGG TCA CCT TTG GCT CTT GAG AGA TGC AGG GAC ACA CG-3`

570 rv: 5`-CGT GTG TCC CTG CAT CTC TCA AGA GCC AAA GGT GAC CTC GG-3`

#### 699 C>G

699 fw: 5`-CCA GTG TAT ACT CTG AAA GAG CGA TGG CTC CAG GTT GTC CGG AGC C-3`

699 rv: 5`-GGC TCC GGA CAA CCT GGA GCC ATC GCT CTT TCA GAG TAT ACA CTG G-3`

#### 775 C>G

775 fw: 5`-GGA CAT CGT CAG GTC GCT CTA CGA AGA TGT GGA AGA CCA CCC-3`

775 rv: 5`-GGG TGG TCT TCC ACA TCT TCG TAG AGC GAC CTG ACG ATG TCC-3`

### *DpnI*-Verdau

Jeder SDM-Ansatz wurde für den Verdau der parentalen DNA mit 1 µl *DpnI* (10 U/µl) versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Plasmide (1 µl des *DpnI*-Verdau) erneut wie unter 2.7 beschrieben in TOP 10F'-Zellen transformiert. Nach dem Ausplattieren der Bakterien und dem Wachsen der Kolonien über Nacht bei 37°C wurden fünf Kolonien gepickt und jeweils in 15 ml LB-Amp-Medium überführt. Anschließend wurde erneut über Nacht bei 37°C inkubiert und die Plasmid-DNA mit dem E.Z.N.A.<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit II nach Angabe des Herstellers isoliert, in 50 µl TE-Puffer gelöst und bei 4°C aufbewahrt. Die DNA wurde entweder für weitere SDM-Reaktionen verwendet oder direkt sequenziert.

## 2.9 Herstellung kompetenter Zellen

Auf Eis aufgetaute TOP 10F`-Zellen wurden auf mit Tetrazyklin vorbehandelte LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 7 ml LB-Medium mit den Zellen angeimpft und diese Vorkultur 90 min bei 37°C in einem Bakterienschüttler inkubiert. Für die Hauptkultur wurden bei einer OD von 0,3 5 ml der Vorkultur in 100 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD von 0,5 weiter inkubiert (nach ca. 2 h). Anschließend wurde die Bakteriensuspension 10 min auf Eis gegeben und anschließend zentrifug 10 min bei 4°C und 6000 x g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das Bakterienpellet vorsichtig in 30 ml eiskaltem TfBI-Puffer resuspendiert, 2 h auf Eis inkubiert und erneut 5 min bei 4°C und 3000 x g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das Pellet in 4 ml eiskaltem TfBII-Puffer resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert, in 50 µl-Volumina aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

## 2.10 Kultur der humanen Nierenzellkarzinom-Zelllinie 786-0

Zur Vorbereitung zukünftiger Transfektionen mit den in Kapitel 2.8 hergestellten von *VHL*-Mutationskonstrukten wurden 786-0 Zellen in Kultur genommen. Dabei handelt es sich um humane RCC-Zellen mit einem homologen *VHL*-Defekt, bestehend aus einer 1 bp-Deletion des einen *VHL*-Allels und dem Verlust des homologen 3p-Chromosomenabschnitts, so dass kein intaktes p*VHL* gebildet werden kann. Die Zelllinie 786-0 wurde ebenfalls von Dr. Igor Kuzmin vom *Laboratory of Immunobiology* des *National Cancer Institute-Frederick Cancer Research and Development Center (NCI-FCRDC)*, Frederick, Maryland, USA, zur Verfügung gestellt. Alle Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einem ersten Schritt in einer mit 5 ml Wachstumsmedium gefüllte T25-Zellkulturflasche bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### *Auftauen der Zellen nach der Kryokonservierung*

Die in einem Volumen von 1,5 ml eingefrorenen Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C vorsichtig aufgetaut und sofort in ein Zentrifugenröhrchen mit Wachstumsmedium überführt. Nach 5 min Zentrifugation bei 200 x g wurde das Mediums abgenommen und verworfen, die Zellen in 5 ml frischem Medium resuspendiert, die Zellsuspension in eine T25-Zellkulturflasche überführt und in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Unter diesen Bedingungen wuchsen die Zellen adherent am Boden der Zellkulturflaschen an. Das

Kulturmedium wurde nach 24 Stunden gewechselt, um restliches wachstumshemmendes DMSO aus dem vorherigen Gefriermedium zu entfernen.

### ***Subkultivierung***

Bei der Subkultivierung wurden die Zellen mit frischem Zellkulturmedium versetzt und in neue Zellkulturflaschen überführt, um sie ausreichend mit Nährstoffen zu versorgen und sie in einem teilungsfähigen Zustand zu halten. Hierfür wurde das verbrauchte Kulturmedium im Überstand der T25-Zellkulturflasche entfernt und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet, um die Zellen vom Plastikboden der Zellkulturflasche abzulösen.

Trypsin ist eine Pankreas-Peptidase, die Proteine an Argininen und Lysin spaltet. EDTA bindet zweiwertige Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , die für die Adhärenz benötigt werden. Die vollständige Ablösung der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 5 ml vorgewärmtem ( $37^{\circ}\text{C}$ ) Zellkulturmedium inaktiviert, die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei  $200 \times g$  zentrifugiert. Danach wurde das überschüssige Kulturmedium entfernt, das Pellet in 2 ml frischem Medium resuspendiert, das Volumen auf 15 ml aufgefüllt und die Zellsuspension in eine T75-Zellkulturflasche überführt (1:3 Expansion). Die Zellen erreichten in der Regel nach 3 bis 4 Tagen konfluentes Wachstum. Eine weitere Expansion in T150-Zellkulturflaschen erfolgte unter Anpassung des Protokolls an dieses Volumen.

### ***Kryokonservierung***

Die konfluenten Zellen einer T150-Zellkulturflasche wurden trypsiniert, abzentrifugiert und das Pellet zunächst in 1 ml Einfriermedium (3.1) resuspendiert, auf 3 ml ergänzt und auf zwei Kryoröhrchen verteilt. Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst für 2 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

## **2.11 Statistische Analysen**

Signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen RCC-Patientengruppen wurden mit dem Fisher's Exact Test und signifikante Altersunterschiede bei der RCC-Diagnose mit dem nicht verbundenen Zweistichprobentest vorgenommen, wobei die Computersoftware GraphPad InStat angewandt wurde. Das Signifikanzniveau wurde bei 5% festgesetzt, d.h. ein Ergebnis war signifikant wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 *VHL*-Keimbahnmutationsanalysen mittels DHPLC und Sequenzierung

Zunächst wurde die Detektierbarkeit von bereits bekannten *VHL*-Keimbahnmutationen mittels zweier unterschiedlicher DHPLC-Systeme, dem Varian- und dem Wave-System, getestet. Dabei handelte es sich um 43 *VHL*-Mutationen, die zum einen in früheren Untersuchungen (Glavac *et al.*, 1996) und zum anderen im Rahmen dieser Arbeit (Klein *et al.*, 2001) mittels SSCP und direkter Sequenzierung in Blut-DNA-Proben von *VHL*-Patienten identifiziert worden waren. Ziel dieser Nachuntersuchung war es, zu eruieren, ob künftige *VHL*-Mutationsanalysen durch die Anwendung semi-automatischer DHPLC-Systeme erleichtert und beschleunigt werden können. In Tabelle 4 sind die nachuntersuchten *VHL*-Keimbahnmutationen und die jeweils optimalen Analysetemperaturen der beiden DHPLC-Systeme aufgeführt. Im Hinblick auf die Zahl der detektierbaren Mutationen war das Wave-System dem Varian-System deutlich überlegen. Die Kennzeichnung der *VHL*-Keimbahnmutationen im Text, in der Tabelle und in den Abbildungen erfolgte anhand der Angabe der *VHL*-familienspezifischen Referenznummer (*VHL* 1-110), der Nukleotidposition im Gen und der Nukleotidvariation.

Mit dem Wave-System waren im Exon 1 des *VHL* 13/14 Keimbahnmutationen (93%), im Exon 2 10/11 Keimbahnmutationen (91%) und im Exon 3 13/13 Keimbahnmutationen (100%) detektierbar. Die beiden Mutationen *VHL* 23,38: 454 C>T und *VHL* 78: 620 T>G konnten unter den angewandten Analysebedingungen nicht nachgewiesen werden. Insgesamt konnten mit dem Wave-System 39/41 *VHL*-Keimbahnmutationen (95%) detektiert werden.

Mit dem Varian-System waren im Exon 1 10/15 Keimbahnmutationen (67%), im Exon 2 11/12 Keimbahnmutationen (92%) und im Exon 3 16/16 Keimbahnmutationen (100%) detektierbar. Die insgesamt sechs unter diesen Bedingungen nicht nachweisbaren Mutationen waren *VHL* 50: 421 G>T, *VHL* 23,38: 454 C>T, *VHL* 66: 467 T>C, *VHL* 3: 479 T>C, *VHL* 62: 490 G>A und *VHL* 78: 620 T>G. Die meisten dieser nicht detektierbaren Mutationen lagen im Exon 1 des *VHL*. Obwohl mit dem Varian-System dennoch die meisten Exon 1-Mutationen detektierbar waren, ist aus Abbildung 12 ersichtlich, dass die entsprechenden Mutationsprofile deutlich unspezifischer waren als die der Mutationen, die in den Exons 2 und 3 lagen.

Deletionen und Insertionen von zwei und mehr Nukleotiden konnten in allen drei *VHL*-Exons anhand spezifischer DHPLC-Profile mit gut aufgetrennten Elutionspeaks eindeutig vom

jeweiligen Wildtyp unterschieden werden (Abb. 12a,d,g), ebenso Punktmutationen, die in den Exons 2 und 3 auftraten (Abb. 12e,f,h,i). Mutationsprofile von Punktmutationen im Exon 1 zeigten in der Regel nur einen Elutionspeak, der im Vergleich zum Wildtyp-Elutionspeak eine Verbreiterung oder eine leichte Schulter aufwies (Abb. 12b,c). Einige Elutionsprofile von Mutationen, die zwar dasselbe Nukleotid betrafen aber einen anderen Basenaustausch zeigten, unterschieden sich deutlich. Beispiele hierfür sind die Mutationen VHL 62: 490 G>A und VHL 106: 490 G>C (Abb. 12b) sowie VHL 49: 694 C>T und VHL 13: 694 C>G (Abb. 12h). Diese Unterschiede konnten allerdings auch schwächer ausgeprägt sein, wie die Elutionsprofile der beiden Mutationen VHL 104: 452 G>T und VHL 82: 452 G>A belegen (Abb. 12c). Im Gegensatz dazu zeigten die benachbart liegenden Mutationen VHL 81: 712 C>T und VHL 76: 713 G>A übereinstimmende Elutionsprofile (Abb. 12i). Nicht eindeutig vom Wildtyp zu unterscheiden waren die Mutationen VHL 38: 454 C>T (Abb. 12c) und VHL 78: 620 T>G (Abb. 12f). In einigen Fällen konnte die Auflösung des Elutionsprofils durch eine Variation der Analysentemperatur erhöht werden, wie z.B. bei der Mutation VHL 13: 694 C>G (Abb. 12h,i).

Beispiele für Elutionsprofile, die mit dem **Wave-System** erzielt wurden, sind in Abbildung 13 dargestellt. Darunter befinden sich die Elutionsprofile von fünf Mutationen, die nicht mit dem Varian-System detektiert werden konnten: VHL 50: 421 G>T, VHL 66: 467 T>C, VHL 3: 479 T>C und VHL 62: 490 G>A (Abb. 13a,b). Die Mutation VHL 23: 454 C>T konnte weder mit dem Varian-System (Abb. 12c) noch mit dem Wave-System (Abb. 13a) eindeutig vom Wildtyp unterschieden werden. Dagegen waren die Mutationen VHL 82: 452 G>A und VHL 104: 452 G>T mit dem Wave-System (Abb.13c) deutlicher voneinander zu unterscheiden als mit dem Varian-System (Abb. 12c).

Darüber hinaus wurden die Blut-DNA-Proben von 36 weiteren Patienten einer DHPLC-Mutationsanalyse unterzogen. Unter diesen waren Patienten mit klinisch diagnostiziertem VHL-Syndrom (n = 5), Verdacht auf VHL (n = 20), familiär auftretenden RCC (n = 5), multiplen RCC (n = 1), familiär auftretenden Phäochromozytomen (n = 1) sowie mit Phäochromozytomen, die im Alter unter 50 Jahren (n = 4) diagnostiziert worden waren. Bei drei Indexpatienten konnten drei verschiedene *VHL*-Keimbahnmutationen detektiert und mittels Sequenzierung identifiziert werden. Darunter waren zwei Patienten mit klinisch gesicherter VHL-Diagnose (VHL 73: 396 insC und VHL106: 490 G>C, Tab. 4, Abb. 12a,b).

**Tabelle 4:** *VHL*-Keimbahnmutationen und der Vergleich ihrer Detektierbarkeit mit dem Varian- bzw. dem Wave-DHPLC-System. Die Mutationen sind entsprechend ihrer Erstidentifizierung in *VHL*-Familien mit fortlaufenden *VHL*-Nummern angegeben. Exonische Nukleotide sind in Großbuchstaben, intronische in Kleinbuchstaben angegeben, ins = Insertion, del = Deletion, n.a = nicht analysiert. Bei Punktmutationen in exonischen Sequenzen ist das betroffene Nukleotid und im Fall einer del oder ins das 5'-benachbarte Nukleotid angegeben. Auf Proteinebene bezieht sich die Positionsangabe auf das betroffene bzw. das letzte intakte Codon.

Exon PCR- Primer	VHL- Nummer	Mutation Nukleotid	Mutation Aminosäure	Varian- System Temperatur	Wave- System Temperatur	
<b>Exon1</b>				<b>63°C</b>	<b>69°C</b>	
	VHL 73	396 insC	Pro61 <i>truncation</i>	+ (neu) <sup>d</sup>	+	
VHL 28	VHL 83	407 C>A	Ser65Stop	+	n.a.	
VHL 22	VHL 50	421 G>T	Glu70Stop	-	+	
	VHL 9, 92, 53	434 T>G	Val74Gly	+	+	
	VHL 26, 63, 77	440 delTCT	Ile75 <i>truncation</i>	+	+	
	VHL 51	446 A>G	Asn78Ser	+	+	
	VHL 39, 82	452 G>A	Ser80Asn	+	+	
	VHL 104	452 G>T	Ser80Ile	+	+	
	VHL 23, 38	454 C>T	Pro81Ser	-	-	
	VHL 110	463 G>T	Val84Leu	+ (neu) <sup>d</sup>	+	
	VHL 66	467 T>C	Leu85Pro	-	+	
	VHL 3	479 T>C	Leu89Pro	-	+	
	VHL 62 <sup>a</sup>	490 G>A	Gly93Ser	-	+	
	VHL 106	490 G>C	Gly93Arg	+ (neu) <sup>d</sup>	+	
	VHL 85	493 G>T	Glu94Stop	+	+	
	VHL 1 <sup>b</sup>	505 T>C	Tyr98His	+	+	
	VHL 86	537 insCGC	Arg108 insArg	+	+	
	VHL 55	550 C>T	Arg113Stop	+	+	
Detektionsraten Exon 1				Bekannte Mutationen Alle Mutationen	10/15 (67%) 13/18 (72%)	13/14 (93%) 16/17 (94%)
<b>Exon 2</b>				<b>59°C</b>	<b>60°C</b>	
	VHL 59	556 C>T	His115Tyr	+	+	
/5	VHL 60	557 A>G	His115Arg	+	+	
/3	VHL 94	566 T>C	Leu118Pro	+	+	
	VHL 99	570 C>G	Phe119Leu	+	+	
	VHL 105	575 A>G	Asp121Gly	+	n.a.	
	VHL 44	597 delT	Leu127 <i>truncation</i>	+	+	
	VHL 30	607 C>T	Gln132Stop	+	+	
	VHL 78	620 T>G	Phe136Cys	-	-	
	VHL 75	662 del14nt	Ala149 <i>truncation</i>	+	+	
	VHL 45	676+1 g>c	<i>splice defect</i>	+	+	
	VHL 7 <sup>a</sup>	676+2 t>c	<i>splice defect</i>	+	+	
	VHL 97, 102	676+8 c>t	<i>splice defect</i>	+	+	
Detektionsrate Exon 2				11/12 (92%)	10/11 (91%)	
<b>Exon 3</b>				<b>60°C/62°C</b>	<b>60°C/62°C</b>	
	VHL 57	677-2 a>t	<i>splice defect</i>	n.a	n.a.	
YH1A	VHL 31	677-2 a>g	<i>splice defect</i>	+	+	
6b	VHL 48	677-1 g>a	<i>splice defect</i>	+	+	
	VHL 49, 32	694 C>T	Arg161Stop	+	+	
	VHL 13	694 C>G	Arg161Gly	+	+	
	VHL 42	699 C>G	Cys162Trp	+	n.a.	
	VHL 90	699 insG	Arg161 <i>truncation</i>	+	n.a.	
	VHL 65	703 C>T	Glu164Stop	+	n.a.	
	VHL 81, 84, 95, 96, 109	712C>T	Arg167Trp	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>	
	VHL 43, 76, 107	713 G>A	Arg167Gln	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>	
	VHL 103	738 C>G	Tyr175Stop	+	+	
	VHL 29	746 T>A	Leu178Gln	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>	
	VHL 6	761 C>A	Ser183Stop	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>	
	VHL 37, 38	775 C>G	Leu188Val	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>	
	VHL 79	794/795 delTG	Asp194 <i>truncation</i>	+	+	
	VHL 56	796 C>T	Gln195Stop	+ <sup>c</sup>	+ <sup>c</sup>	
	VHL 80	852+10 c>g	3'UTR	+	+	
Detektionsrate Exon 3				16/16 (100%)	13/13 (100%)	

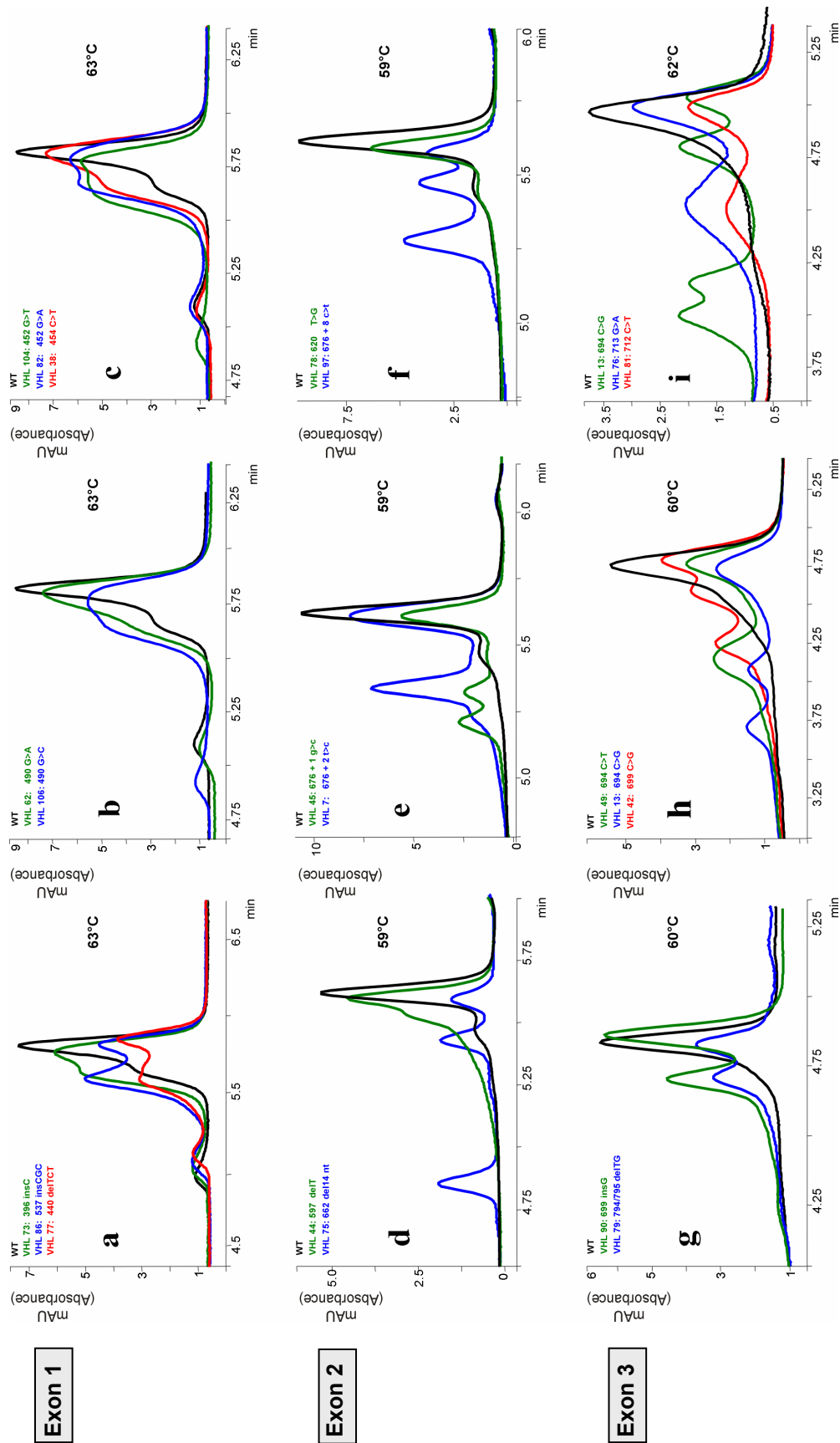
<sup>a</sup> korrigierte Nukleotidposition verglichen mit Glavac *et al.* (1996)

<sup>b</sup> Familien mit dieser *founder*-Mutation sind: VHL 1, 2, 4, 5, 8, 11, 12, 16, 17, 18, 22, 27, 28, 34, 47, 54, 3127 und 3476 (Brauch *et al.* 1995)

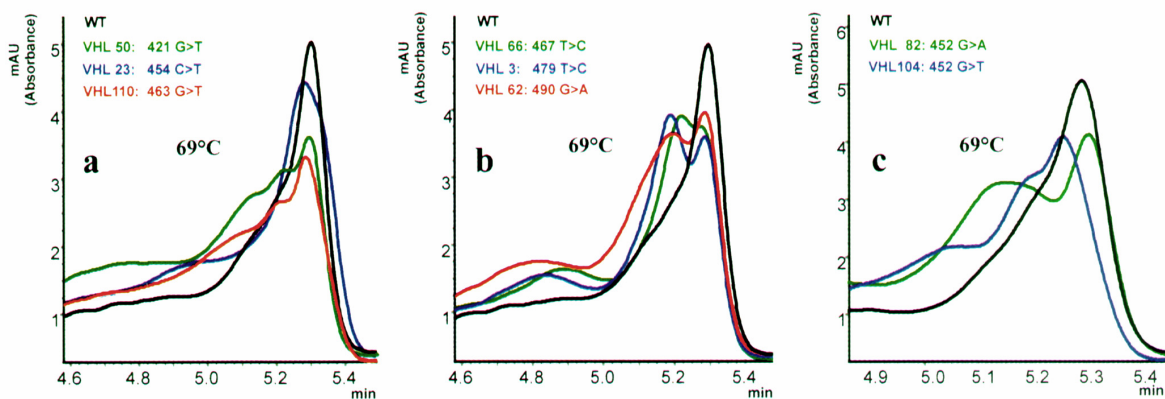
<sup>c</sup> Wildtyp-Elutionsprofil oder Peakschulter bei 60°C und zwei aufgetrennte Elutionspeaks bei 62°C

<sup>d</sup> neu detektiert bei VHL-Verdachtsfällen





**Abbildung 12:** DHPLC-Elutionsprofile (Varian-System) von *VHL*-Keimbahnmutationen in Exon 1 (a-c), Exon 2 (d-f) und Exon 3 (g-i). Die Mutationen wurden anhand der *VHL*-Familiennummer, ihrer Lokalisation im Gen sowie der Nukleotidvariation gekennzeichnet. Elutionsprofile von Insertionen und Deletionen sind in a, d und g dargestellt, Punktmutationen in b, c, e, f, h und i. Mutationen, die dasselbe Nukleotid betreffen, sind VHL 62: 490 G>A (b: grünes Profil) und VHL 106: 490 G>C (b: blaues Profil), VHL 104: 452 G>T (c: grünes Profil) und VHL 82: 452 G>A (c: blaues Profil) sowie VHL 49: 694 C>T (h: grünes Profil) und VHL 13: 694 C>G (h: blaues Profil). Die Mutation VHL 13: 694 C>G zeigte bei 60°C drei (h: blaues Profil) und bei 62°C vier Elutionspeaks (i: grünes Profil). Die Elutionsprofile der Mutationen VHL 76: 713 G>A (i: blaues Profil) und VHL 81: 712 C>T (i: rotes Profil) waren identisch. Die Mutationen VHL 38: 454 C>T (c: rotes Profil) und VHL 78: 620 T>G (f: grünes Profil) waren nicht eindeutig vom jeweiligen Wildtyp (WT) zu unterscheiden.



**Abbildung 13:** DHPLC-Elutionsprofile (Wave-System) von *VHL*-Keimbahnmutationen in Exon 1. Die Mutationen wurden anhand der *VHL*-Familiennummer, ihrer Lokalisation im Gen sowie der Nukleotidvariation gekennzeichnet. In a und b sind die Elutionsprofile von Mutationen aufgeführt, die mit dem Varian-System nicht detektierbar waren. Dazu gehörten die Mutationen VHL 50: 421 G>T (a: grünes Profil), VHL 23: 454 C>T (a: blaues Profil) sowie VHL 66: 467 T>C (b: grünes Profil), VHL 3: 479 T>C (b: blaues Profil) und VHL 62: 490 G>A (b: rotes Profil). Das Elutionsprofil der Mutation VHL 23: 454 C>T (a: blaues Profil) unterschied sich nicht vom Profil des Wildtyps (WT) (a: schwarzes Profil). Im Gegensatz zur Analyse mit dem Varian-System waren die Elutionsprofile der Mutationen VHL 82: 452 G>A (c: grünes Profil) und VHL 104: 452 G>T (c: blaues Profil) mit dem Wave-System deutlich unterscheidbar. Die Mutation VHL 110: 463 G>T (a: rotes Profil) ist ein Beispiel für eine in dieser Arbeit neu identifizierte Mutation, die in einer früher durchgeführten SSCP-Mutationsanalyse nicht nachgewiesen werden konnte.

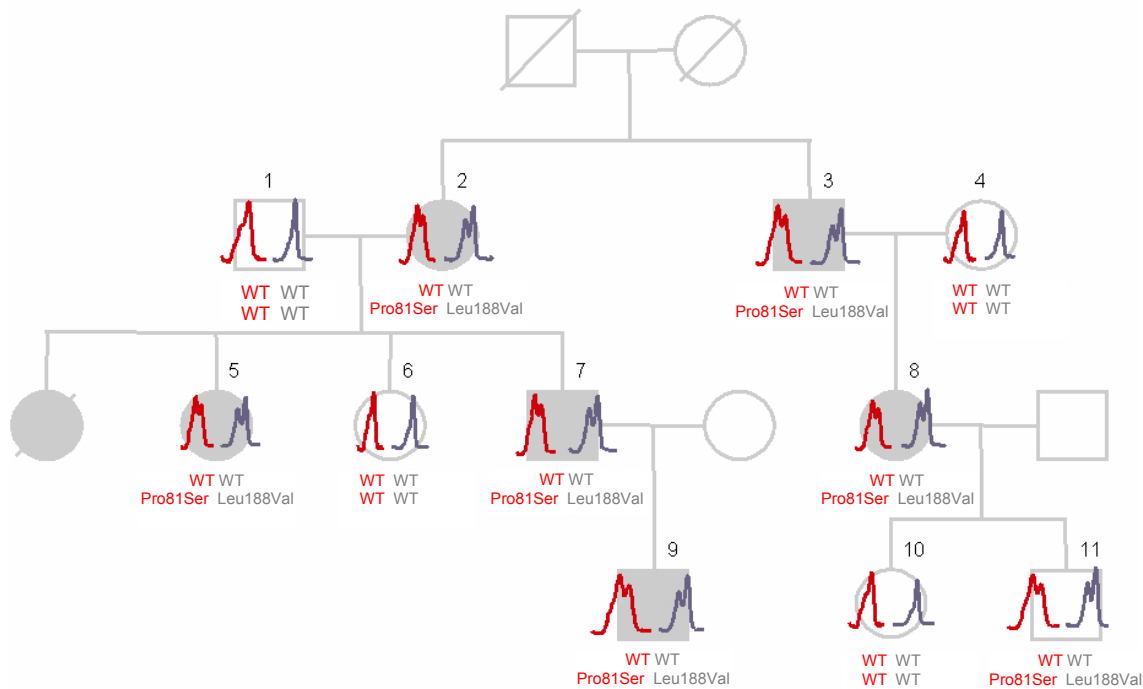
Bei einem Indexpatienten aus einer Familie mit familiär auftretenden Phäochromozytomen wurde ebenfalls eine *VHL*-Keimbahnmutation identifiziert (VHL110: 463 G>T, Tab. 4, Abb. 13a). Diese konnte daraufhin mittels DHPLC auch in zwei seiner Nachkommen detektiert werden (nicht gezeigt). Der Nachweis dieser Keimbahnmutation und ihre Segregation in dieser Familie bestätigten die Diagnose eines *VHL*-Syndroms bei allen Familienmitgliedern, die Träger dieser Mutation waren. Gleichmaßen wurde damit der Verdacht des Vorliegens einer multiplen endokrinen Neoplasie vom Typ II (MENII) widerlegt, zumal bei dem Indexpatienten auch keine MENII-charakteristische *RET*-Mutation nachgewiesen werden konnte (persönliche Mitteilung, M.M. Ritter, Medizinische Klinik, Klinikum Ibbenbüren). Bei den 33 verbleibenden Patienten konnte keine *VHL*-Keimbahnmutation detektiert werden. Diese Negativbefunde wurden durch Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigt.

### 3.2 Identifizierung einer *VHL*-Doppelmutation in einer *VHL2C*-Familie

Im Rahmen von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen wurde die internationale Fachwelt auf eine deutsche Familie (bestehend aus den verwandten Familien *VHL* 37 und *VHL* 38) mit minimalem *VHL*-Phänotyp aufmerksam, die sich durch das Auftreten von Phäochromozytomen als einziger *VHL*-Läsion auszeichnete (*VHL2C*). Die familien-spezifische Keimbahnmutation war bereits als eine im Exon 3 liegende 775 C>G-Transversion (Leu188Val) identifiziert worden (Glavac *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 1995; Ritter *et al.*, 1996), eine Erklärung für die besondere phänotypische Ausprägung dieser Mutation konnte bislang jedoch nicht gefunden werden. Da frühere Mutationsanalysen auf einer Detektion mittels SSCP und der Sequenzierung auffälliger PCR-Produkte beruhten, konnte aufgrund inzwischen modernerer Nachweisverfahren vermutet werden, dass der besondere *VHL2C*-Phänotyp dieser Familie möglicherweise auf einer zusätzlichen *VHL*-Alteration beruht, die in den vorherigen Analysen einer Detektion entgangen war.

In den umfangreichen DHPLC-Analysen dieser Arbeit konnten zwar über 95% der *VHL*-Keimbahnmutationen nachgewiesen werden, es gab jedoch auch falsche Negativbefunde für Mutationen im Exon 1. Im Zuge einer Optimierung der DHPLC-Methodik für dieses Exon konnte mit Hilfe neuer Primer (*VHL13F* und *VHL13R*) bei dieser *VHL2C*-Familie tatsächlich eine zusätzliche *VHL*-Keimbahnmutation detektiert (Weirich *et al.*, 2002) und bei der anschließenden Sequenzierung des PCR-Produkts als eine 454 C>T-Transition (Pro81Ser) identifiziert werden. Die daraufhin erfolgte Nachuntersuchung der Familienmitglieder bestätigte das Vorliegen der zweiten *VHL*-Keimbahnmutation und ihre Kosegregation mit der bereits bekannten 775 C>G-Mutation (Leu188Val). Für die komplette Familienanalyse wurden 16 Familienmitglieder untersucht. Die Doppelmutation 454 C>T (Pro81Ser)/775 C>G (Leu188Val) konnte bei neun Patienten aus drei Generationen nachgewiesen werden (Weirich *et al.*, 2002).

In Abbildung 14 ist der Stammbaum der größeren der beiden Familien (*VHL37*) mit elf untersuchten Familienmitgliedern und den DHPLC-Elutionsprofilen der Exons 1 und 3 dargestellt. Die nicht betroffenen Familienmitglieder (1, 4, 6 und 10, Abb. 14) zeigten Elutionsprofile die dem jeweiligen Wildtyp entsprachen. Bei allen sechs erkrankten Familienmitglieder (2, 3, 5, 7, 8 und 9, Abb. 14) konnte die Doppelmutation nachgewiesen werden. Die Kosegregation beider Mutationen weist darauf hin, dass beide Mutationen auf demselben Allel liegen. Ein zum Zeitpunkt der Analyse nicht erkranktes fünfjähriges Kind (11, Abb. 14) zeigte, wie die erkrankten Familienmitglieder die DHPLC-Elutionsprofile



**Abbildung 14:** Stammbaum einer VHL2C-Familie (VHL37) mit den DHPLC-Elutionsprofilen der beiden heterozygoten *VHL*-Keimbahnmutationen 454 C>T (Pro81Ser) und 775 C>G (Leu188Val) und der beiden Wildtypsequenzen. Frauen sind durch Kreise, Männer durch Quadrate dargestellt. Verstorbene Familienmitglieder sind durch eine Diagonale gekennzeichnet. Symbole für VHL-Patienten (2, 3, 5, 7, 8 und 9) sind grau, Symbole für gesunde Familienmitglieder (1, 4, 6, 10 und 11) sind weiß. Exon 1-Elutionsprofile sind rot, Exon 3-Elutionsprofile sind blau dargestellt. WT = Wildtyp, Pro = Prolin, Ser = Serin, Leu = Leucin, Val = Valin. Alle VHL-Patienten (2, 3, 5, 7, 8 und 9) sowie ein bisher nicht erkranktes Kind (11) sind Träger der *VHL*-Doppelmutation, alle weiteren gesunden Personen (1, 4, 6 und 10) tragen keine *VHL*-Mutation.

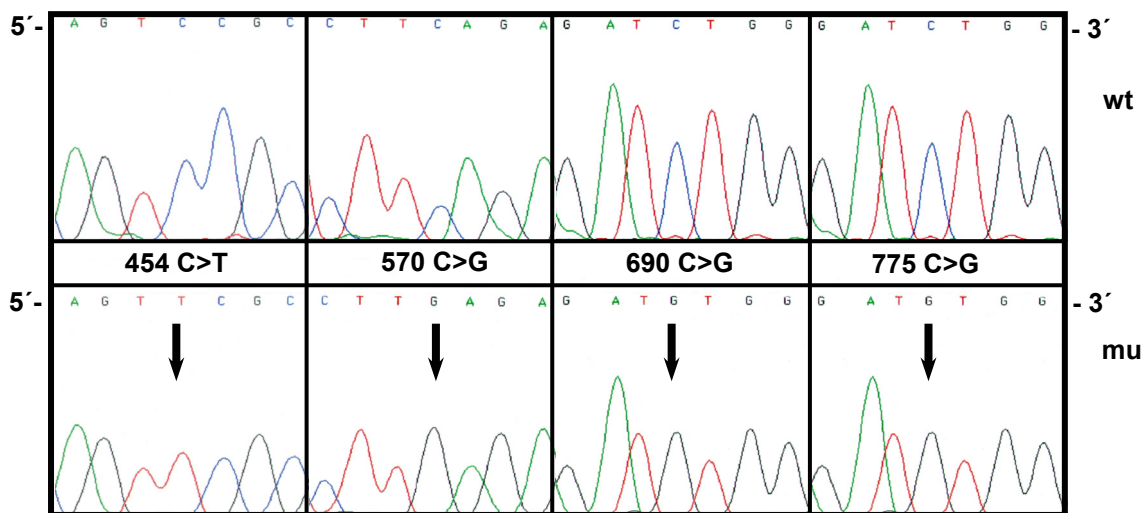
beider Mutationen und wurde somit präsymptomatisch als VHL-Mutationsträger mit hohem VHL2C-Erkrankungsrisiko diagnostiziert. Dass es sich bei der 454 C>T Mutation nicht um einen seltenen Polymorphismus handelt, konnte durch Sequenzierung der Exon 1-PCR-Produkte von 65 nicht verwandten deutschen Kontrollpersonen belegt werden.

### 3.2.1 *VHL*-Mutations-Plasmidkonstrukte für zukünftige Expressionsstudien

Um zukünftige Expressionsstudien zur Untersuchung der funktionellen Relevanz der VHL2C-Doppelmutation sowie weiterer somatischer *VHL*-Mutationen einzuleiten, konnten die Mutationen 454 C>T, 570 C>G, 699 C>G und 775 C>G, einzeln und in folgender Kombination, erfolgreich mittels SDM (2.8) in die *VHL*-cDNA des pBluescript® II SK(+)-Plasmids eingeführt werden (Abb. 15).

- 454 C>T + 775 C>G
- 454 C>T + 570 C>G + 699 C>G + 775 C>G<sup>1</sup>

<sup>1</sup> eine Kombination von vier somatischen *VHL*-Mutationen, die im Tumorgewebe beruflich TRI-belasteter CCRCC-Patienten identifiziert wurde (Tab.6, Patient 1695)



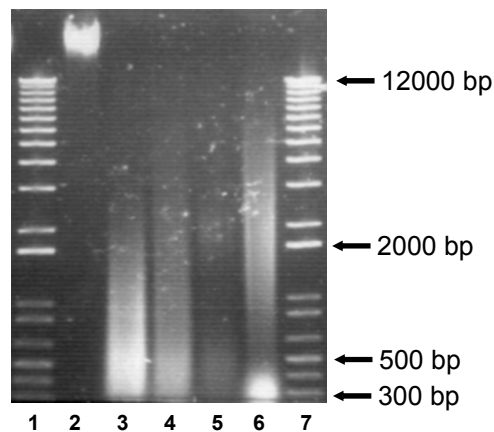
**Abbildung 15:** Sequenzierergebnisse der vier in die *VHL*-cDNA eingefügten Punktmutationen 454 C>T, 570 C>G, 690 C>G und 775 C>G in 5'-3'-Richtung. In der oberen Reihe ist die Wildtypsequenz dargestellt, darunter die mittels SDM mutierte *VHL*-Sequenz, wt = Wildtyp, mu = Mutation.

### 3.3 Möglicher Zusammenhang zwischen einer beruflichen Karzinogenexposition und dem Auftreten von *VHL*-Genschäden

Zur Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen einer beruflichen Karzinogenexposition und dem Auftreten von somatischen *VHL*-Mutationen wurden die *VHL*-Mutationsmuster im Tumorgewebe von RCC-Patienten mit und ohne ehemaliger beruflicher TRI-Exposition ermittelt und miteinander verglichen. Alle Untersuchungen zur Detektion somatischer *VHL*-Mutationen wurden mittels Sequenzierung der amplifizierten DNA-Proben aus archivierten, formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Normal- und Tumorgeweben durchgeführt. Entsprechend der Erfahrungen anderer Autoren (Williams *et al.*, 1999) erwies sich die Mutationsanalyse in DNA aus Paraffingewebe als äußerst diffizil und stellte technisch eine besondere Herausforderung dar. Daher wird im Folgenden auf Besonderheiten der DNA-Qualität archivierter Gewebeproben und ihren Einfluss auf die Amplifizierung und Mutationsanalyse eingegangen.

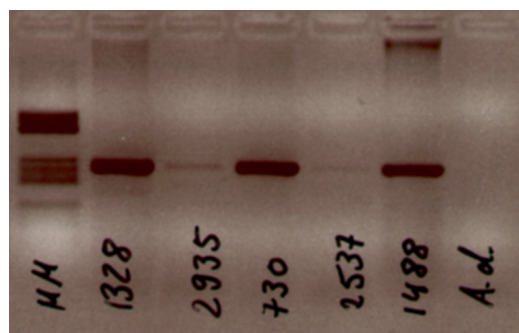
### 3.3.1 Qualitätsunterschiede der DNA aus archivierten Geweben

Die Vorbehandlungen im Rahmen der Archivierung (Formalinfixierung und Einbetten der Gewebe in Paraffin) sowie das Alter der Gewebeproben (älter als zehn Jahre) wirkten sich nachteilig auf die molekularen Analysen aus. Obwohl in der Regel spektrophotometrisch messbare Mengen an genomischer DNA (0,5-20 µg) isoliert werden konnten, erwies sich diese als qualitativ minderwertig, wie der Vergleich von DNA aus peripheren, mononukleären Leukozyten (Frischblut) und aus formalinfixierten archivierten Geweben zeigt (Abb. 16).



**Abbildung 16:** Vergleich der Längenfragmentspektren von genomischer DNA aus Blut und formalinfixierten Geweben im Agarosegel. Bahnen 1 und 7: 1 kb Plus DNA Ladder. Bahn 2: hochmolekulare genomische DNA aus Blut (>12 kb). Bahnen 3-6: fragmentierte, genomische DNA aus formalinfixierten Geweben (<300 bp bis <12 kb).

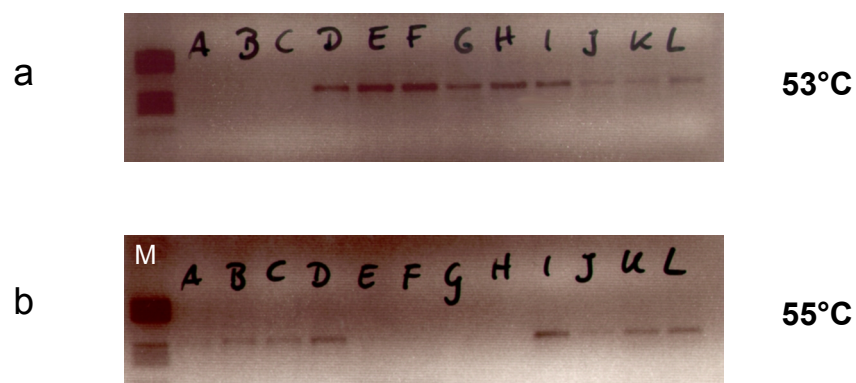
Während die DNA aus Blut hochmolekular vorlag, war die Gewebe-DNA stark fragmentiert. Dies hatte eine verminderte Ausbeute an PCR-Produkt bei ihrer Amplifizierung zur Folge (Abb. 17), weshalb im Rahmen dieser Arbeit aufwendige Vorarbeiten zur Optimierung der PCR-Bedingungen nötig waren.



**Abbildung 17:** Unterschiedliche PCR-Ausbeuten bei der Amplifizierung des *VHL*-Exons 1 mit DNA-Proben aus Blut (1328), tiefgefrorenem Nierenzellkarzinom-Gewebe (730), einer RCC-Zelllinie (1488) und zwei formalinfixierten RCC-Geweben (2935 und 2537). In allen Fällen betrug die Menge der in der PCR eingesetzten DNA ca. 50 ng, A.d = Wasserkontrolle, MM = Molekulargewichtsmarker.

Die PCR-Bedingungen mussten an die individuellen Anforderungen der einzelnen Gewebe-DNA-Proben angepasst und auch für die einzelnen Exons optimiert werden. Abbildung 18 zeigt das Ergebnis einer PCR-Optimierung für die eine Gewebe-DNA-Probe, deren Exon 3-Sequenz unter Standardbedingungen (Glavac *et al.*, 1996) nicht amplifizierbar war. Die Länge der zu amplifizierenden Sequenz betrug 281 bp. Zur Ermittlung eines geeigneten PCR-Puffersystems wurden zwölf verschiedene Puffer des FailSafe™ PCR PreMix Selection Kit (Puffer A-L) bei zwei verschiedenen Annealing-Temperaturen (53°C und 55°C) getestet. Mit den Puffern D, E, F, G, H und I wurden bei 53°C ausreichende Mengen an Exon 3-PCR-Produkt amplifiziert. Mit den Puffern A, B und C waren keine PCR-Produkte und mit den Puffern J, K und L nur geringe Mengen auf dem Kontrollgel nachweisbar (Abb. 18a).

Im Gegensatz dazu bewirkte eine um 2°C erhöhte Annealing-Temperatur (55°C) andere Ergebnisse. So waren mit den FailSafe™ Puffern A, E, F, G und H keine PCR-Produkte nachweisbar. Geringe Mengen wurden mit den Puffern B und C sowie J, K und L generiert und größere Mengen nur mit den Puffern D und I (Abb. 18b). Diese Ergebnisse zeigen, dass die erfolgreiche Amplifizierung von Gewebe-DNA stärker als die Amplifizierung von Blut-DNA von exakten Puffer- und Temperaturbedingungen (Annealing) abhängig ist. Störungen der PCR, die von der DNA-Qualität beeinflusst werden, konnten jedoch nicht immer überwunden werden (Tab. 5 und 7). Darüber hinaus war eine Sequenzierung ohne störende Hintergrundsignale nur bei ausreichender Menge (deutliche Bande im Kontrollgel) und Spezifität des untersuchten PCR-Produkts möglich.



**Abbildung 18:** Ergebnis der *VHL*-Exon 3-Amplifikation einer Gewebe-DNA-Probe bei zwei verschiedenen Annealing-Temperaturen (53°C und 55°C) und der Verwendung von zwölf verschiedenen PCR-Puffern des FailSafe™ PCR PreMix Selection Kit (Puffer A–L). Die restlichen PCR-Bedingungen entsprachen denen des PCR-Reaktionsansatzes 4 (2.4). Die PCR-Produkte und der Molekulargewichtsmarker V (M) wurden auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. **a:** Annealing-Temperatur 53°C: mit den Puffern D, E, F, G, H und I entstanden deutlich nachweisbare PCR-Produkt-Mengen, mit den Puffer J, K und L waren die PCR-Ausbeuten dagegen deutlich geringer. Mit den Puffern A, B und C konnten keine PCR-Produkte generiert werden. **b:** Annealing-Temperatur 55°C: mit den Puffern D und I waren deutliche PCR-Produkt-Mengen zu beobachten. Mit den Puffern B, C, D, J, K und L waren nur geringe und mit den Puffern A, E, F, G und H keine PCR-Produkt-Mengen nachweisbar.

### **3.3.2 Somatische *VHL*-Mutationsanalysen an Nierenkarzinomgeweben von Patienten mit und ohne ehemaliger beruflicher Trichlorethylen-Exposition**

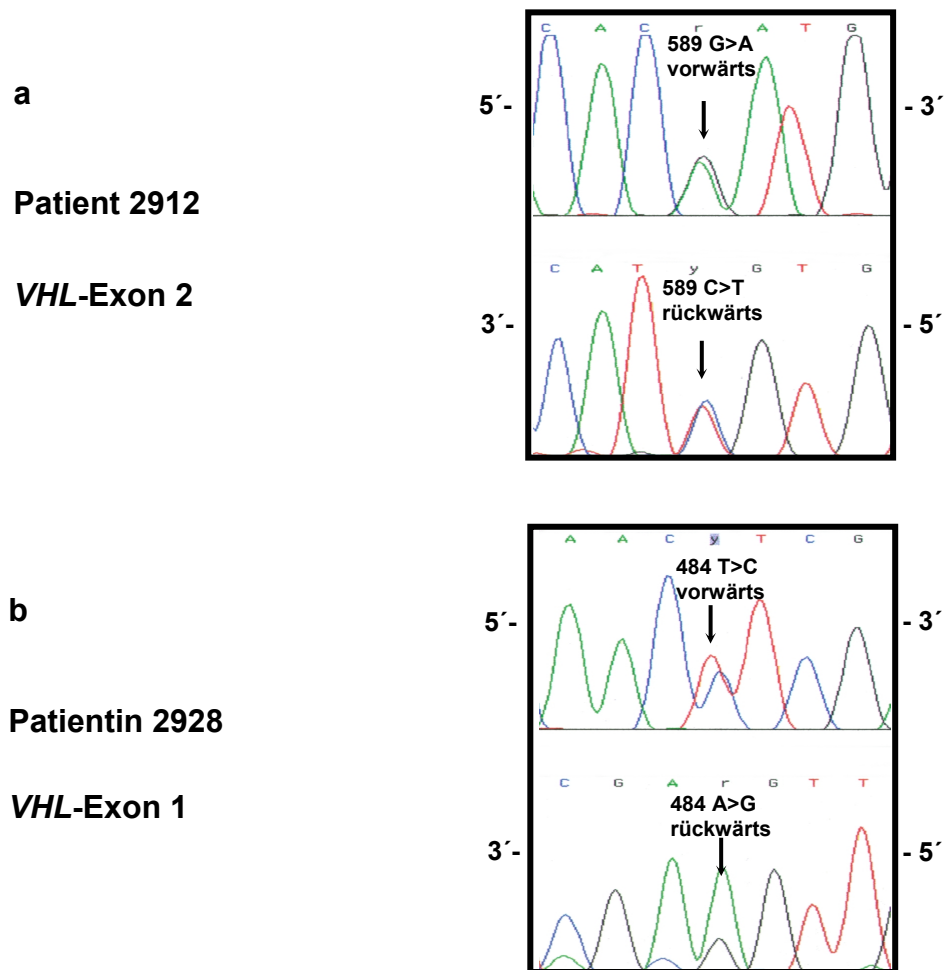
Für die Beurteilung eines möglicherweise unterschiedlichen *VHL*-Mutationsmusters zwischen einer ehemals beruflich TRI-exponierten und einer nicht TRI-exponierten Patientengruppe wurden die Tumorgewebe und korrespondierenden Normalgewebe von 39 CCRCC-Patienten auf das Vorliegen somatischer *VHL*-Mutationen untersucht. Von diesen 39 Patienten waren 18 ehemals TRI-exponiert. Von diesen 18 Patienten konnte wiederum in 17 Fällen DNA isoliert werden. Bei den restlichen 21 Patienten konnte eine TRI-Exposition ausgeschlossen werden. Von allen konnte DNA isoliert werden. Die *VHL*-Mutationsanalyse von 16 TRI-exponierten Patienten war bereits zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt worden (Brauch *et al.*, 1999; Hornauer, M, Doktorarbeit in Vorbereitung). Die Analyse einer weiteren TRI-exponierten Patientin und der 21 nicht TRI-exponierten Patienten wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt. Im Anschluss an diese Analyse wurden die *VHL*-Mutationsmuster beider Patientengruppen miteinander verglichen.

#### **3.3.2.1 Somatische *VHL*-Mutationen bei nicht Trichlorethylen-exponierten Patienten**

Die analysierten 21 Patienten ohne TRI-Exposition gehören zu einer Gruppe von insgesamt 25 Patienten (15 Männer, zehn Frauen) deren mittleres Alter bei Diagnose des CCRCC 66 Jahre betrug, wobei die jüngste Patientin 51 Jahre alt und der ältesten Patient 81 Jahre alt waren. Von diesen 25 Patienten wurden 21 in die *VHL*-Mutationsanalyse einbezogen (Tab. 5), davon waren zehn Raucher und elf Nichtraucher. Insgesamt wurden 27 Tumorgewebe und 16 Normalgewebe analysiert. Im Tumorgewebe von zwei Patienten (2912 und 2928, Tab. 5) konnte jeweils eine somatische *VHL*-Mutation nachgewiesen werden. Bei dem Patienten 2912 handelte es sich um eine G>A-Transition an der Nukleotidposition 589 im *VHL*-Exon 2 (Abb. 19a). Dieser Nukleotidaustausch bewirkt auf Proteinebene einen Austausch der Aminosäure Aspartat gegen Asparagin an der Position 126 (Asp126Asn).

Die *VHL*-Mutation im Tumorgewebe der Patientin 2928 konnte als eine T>C-Transition an der Nukleotidposition 484 im *VHL*-Exon 1 identifiziert werden (Abb. 19b). Sie bewirkt den Austausch der Aminosäure Phenylalanin gegen die Aminosäure Leucin an der Position 91 (Phe91Leu).





**Abbildung 19:** Sequenzierergebnisse zweier somatischer *VHL*-Mutationen im Tumorgewebe von zwei nicht TRI-exponierten Nierenzellkarzinom-Patienten. **a:** Patient 2912: Die Ausschnitte der Exon 2-Sequenzierchromatogramme zeigen die Mutation 589 G>A (Asp126Asn) mit dem Basenaustausch G nach A in Vorwärtsrichtung (G: schwarz, A: grün) und C nach T in Rückwärtsrichtung (C: blau, T: rot). **b:** Patientin 2928: Die Ausschnitte der Exon 1-Sequenzierchromatogramme zeigen die Mutation 484 T>C (Phe91Leu) mit dem Basenaustausch T nach C in Vorwärtsrichtung (T: rot, C: blau) und A nach G in Rückwärtsrichtung (A: grün, G: schwarz).

In den Tumorgeweben der restlichen 19 CCRCC-Patienten (Tab. 5) und in den 16 Normalgeweben (nicht gezeigt) wurde keine *VHL*-Mutation identifiziert. In diesem Zusammenhang muss darauf hingewiesen werden, dass bei 17 der 21 Patienten (81%) entweder keine Exon 3-Amplifikation möglich war oder keine Auswertung der Exon 3-PCR-Sequenzierdaten. Dasselbe traf bei zwei Patienten (10%) auf die Exon 1-Analyse zu. (Tab.5). Insgesamt waren somit nur 58 der 81 zu erwartenden PCR-Produkte (72%) analysierbar. Auch zwölf der 16 (75%) Normalgewebe waren nicht im Exon 3 analysierbar (nicht gezeigt).

### 3.3.2.2 Somatische *VHL*-Mutationen bei Trichlorethylen-exponierten Patienten

Für den Vergleich der *VHL*-Mutationsspektren wurden die bereits vorliegenden Patienten- und Mutationsdaten (Brauch *et al.*, 1999) der 18 TRI-exponierten Patienten (Tab. 6) ausgewertet. Aus dem Tumorgewebe des Patienten 18 (DNA-Nr. 1650, Tab. 6) konnte keine DNA isoliert werden. Mit Ausnahme eines renalen Onkozytoms des Patienten 13 (DNA-Nr. 1699, Tab. 6) waren alle RCC vom klarzelligen Typ (CCRCC). Der Patient 17 entwickelte einen zweiten Tumor in der kontralateralen Niere (DNA-Nr. 2388, Tab. 6). Hinsichtlich Tumortyp, Tumorgröße und Tumorgrad unterschied sich die Gruppe der TRI-exponierten Patienten nicht wesentlich von der Gruppe der nicht TRI-exponierten Patienten (nicht gezeigt). Die exponierte Gruppe bestand aus 14 Männern und drei Frauen. Das mittlere Erkrankungsalter bei Diagnose des CCRCC betrug 58 Jahre, wobei der jüngste Patient 38 Jahre alt und der älteste Patient 78 Jahre alt waren. Davon waren zehn Raucher und sieben Nichtraucher. Die Patienten waren entsprechend ihrer TRI-Exposition in Gruppen mit hoher Exposition (+++, sieben Patienten), mittlerer Exposition (++; zehn Patienten) und niedriger Exposition (+, kein Patient) eingeteilt worden (Tab. 6).

Von den 17 analysierten Patienten hatten 14 (82%) eine oder mehrere *VHL*-Mutationen im Tumorgewebe (Tab. 6). Von diesen 14 Patienten hatten sieben (50%) eine singuläre *VHL*-Mutation und weitere sieben (50%) multiple *VHL*-Mutationen. Die Gesamtzahl der *VHL*-Mutationen belief sich auf 24. Darunter waren 17 (71%) *missense*-Mutationen, sechs (25%) *frameshift*-Mutationen und eine (4%) *splice-site*-Mutation (Tab. 6). Insgesamt waren neun der 24 Mutationen (38%) 454 C>T-Transitionen (Pro81Ser) (Tab. 5). Bei elf Mutationen (46%) handelte es sich um C>T-Transitionen und bei einer Mutation um eine G>A-Transition (4%) (Tab. 6). In vier Fällen wurde im Normalgewebe, d.h. dem Tumor benachbarten, morphologisch nicht auffälligen Nierenparenchym, jeweils eine 454 C>T-Transition nachgewiesen (nicht gezeigt).

**Tabelle 5:** Somatische *VHL*-Mutationen in sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinomen von Patienten ohne berufliche Trichlorethylen (TRI)-Exposition, w = weiblich, m = männlich, n.a = nicht für die molekulare Analyse verfügbar, n.r = nicht reproduzierbares Sequenzierergebnis.

Pat.-Nr.	DNA-Nr.	Geschlecht	Raucher	Alter bei Diagnose	TRI-Exposition Jahre	Stärke	Mutation Nukleotid	Aminosäure
1	2900 2901 <sup>a</sup>	w	nein	71	0	0	- -	- -
2	2902	m	nein	60	0	0	n.r.	
3	2904 2905	w	ja	55	0	0	- -	- -
4	2906	m	ja	67	0	0	-	-
5	2908 <sup>a,b</sup> 2909 <sup>a</sup> 2910 <sup>a</sup>	m	nein	58	0	0	- - n.r.	- - -
6	2912 <sup>a,b</sup>	m	ja	77	0	0	589 G>A	Asp126Asn
7	2914 <sup>a</sup>	m	ja	58	0	0	n.r.	
8	2916 <sup>a</sup> 2918 <sup>a</sup>	w	nein	53	0	0	- n.r.	- -
9	2919 <sup>a</sup>	m	nein	66	0	0	n.r.	
10	2921 <sup>a</sup>	m	ja	71	0	0	n.r.	
11	2923	w	nein	67	0	0	-	-
12	2925 <sup>a</sup> 2926 <sup>a</sup>	m	ja	61	0	0	- -	- -
13	2928 <sup>a</sup>	w	nein	70	0	0	484 T>C	Phe91Leu
14	2929 <sup>a</sup>	m	nein	80	0	0	n.r.	
15	2930 <sup>a</sup>	m	ja	78	0	0	-	-
16	2932 <sup>a</sup>	w	nein	66	0	0	-	-
17	2933 <sup>a</sup>	m	nein	81	0	0	n.r.	
18	2935 <sup>a</sup>	w	nein	71	0	0	n.r.	
19	2937 <sup>a</sup>	m	ja	62	0	0	-	-
20	2939 <sup>a</sup>	m	ja	64	0	0	-	-
21	2941 <sup>a</sup>	w	ja	68	0	0	n.r.	
22 <sup>c</sup>		w		68	0	0	n.a.	
23 <sup>c</sup>		w		57	0	0	n.a.	
24 <sup>c</sup>		m		51	0	0	n.a.	
25 <sup>c</sup>		m		68	0	0	n.a.	

<sup>a</sup> Exon 3 nicht analysierbar

<sup>b</sup> Exon 1 nicht analysierbar

<sup>c</sup> Patienten, deren Alter bei der Tumordiagnose für den Vergleich in 3.3.3.1 berücksichtigt wurde

**Tabelle 6:** Somatische *VHL*-Mutationen in sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinomen von Patienten mit beruflicher Trichlorethylen (TRI)-Exposition, w = weiblich, m = männlich.

Pat.-Nr.	DNA-Nr.	Geschlecht	Raucher	Alter bei Diagnose	TRI-Exposition		Mutation	
					Jahre	Stärke	Nukleotid	Aminosäure
1	1659	m	ja	47	9	++	454 C>T 712 C>T	Pro81Ser Arg167Trp
2	1693	m	ja	58	19	+++	454 C>T 811 C>T 677-1 g>c	Pro81Ser Arg200Trp <i>splice defect</i>
3	1698	m	ja	61	25	++	479 T>A	Leu89His
4	1697	m	ja	55	40	++	544 del10nt	<i>frameshift</i>
5	1655	w	nein	53	3	++	644 delG	<i>frameshift</i>
6	1653	m	nein	73	30	++	454 C>T	Pro81Ser
7	1656 <sup>c</sup>	m	ja	70	20	++	454 C>T	Pro81Ser
8	1652	m	ja	39	20	++	-	-
9	1691	m	ja	58	21	+++	-	-
10	1658 <sup>c</sup>	m	ja	60	24	+++	454 C>T 713 G>A	Pro81Ser Arg167Gln
11	1657	w	nein	56	2	++	454 C>T 639 delTGAC	Pro81Ser <i>frameshift</i>
12	1695 <sup>c</sup>	m	nein	38	11	+++	454 C>T 570 C>G 699 C>G 775 C>G	Pro81Ser Phe119Leu Cys162Trp Leu188Val
13	1699 <sup>a</sup>	w	nein	78	8	++	619 delT	<i>frameshift</i>
14	1696	m	nein	57	2	+++	632 delTC	<i>frameshift</i>
15	1694	m	ja	74	35	+++	454 C>T 570 C>G	Pro81Ser Phe119Leu
16	1692	m	ja	55	5	++	-	-
17	1654 <sup>c</sup> 2388 <sup>b</sup>	m	nein	59 64	19	+++	454 C>T 473 delTAT	Pro81Ser <i>frameshift</i>
18	1650	m	ja	50	15	++	keine DNA -	- -

<sup>a</sup> histopathologische Diagnose: renales Onkozytom<sup>b</sup> Zweitumor in der kolateralen Niere<sup>c</sup> Bei diesen Patienten wurde auch eine 454 C>T-Mutation im Normalgewebe beobachtet.

### 3.3.2.3 Vergleich der somatischen *VHL*-Mutationsmuster

Das somatische *VHL*-Mutationsspektrum der 21 nicht TRI-exponierten CCRCC-Patienten wurde mit dem der 17 TRI-exponierten CCRCC-Patienten (Brauch *et al.*, 1999) verglichen. Daneben wurden beide Spektren dem von 482 RCC-Patienten gegenübergestellt, deren *VHL*-Mutationen in sechs großen internationalen Studien publiziert worden waren (Brauch *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 1994; Gnarra *et al.*, 1994; Kenck *et al.*, 1996; Shuin *et al.*, 1994, Whaley *et al.*, 1994)(Tab. 7). Während die beiden ersten Patientengruppen aus einer TRI-belasteten Industrieregion stammen und ihre mögliche TRI-Exposition im Rahmen arbeitsmedizinischer Untersuchungen gezielt erhoben worden war, handelte es sich bei der Gruppe der 482 RCC-Patienten um reguläre RCC-Patienten ohne Verdacht auf eine besondere Umweltbelastung. In Tabelle 7 sind die einzelnen *VHL*-Mutationstypen sowie deren Anzahl und Häufigkeit in den Tumorgeweben der drei Patientengruppen aufgeführt.

**Häufigkeit somatischer *VHL*-Mutationen:** Während bei den nicht TRI-exponierten Patienten nur zwei *VHL*-Mutationen (10%) identifiziert wurden (Tab. 5), hatten 14 der 17 TRI-exponierten Patienten (82%) *VHL*-Mutationen (Tab. 6). Im Vergleich zu den TRI-exponierten Patienten zeigten auch die 482 RCC-Patienten mit nicht erhobener TRI-Exposition eine geringere *VHL*-Mutationshäufigkeit (Tab. 7). Nur 211 (44%) wiesen eine somatische *VHL*-Mutation im Tumor auf. Der Prozentsatz der Mutationsträger in der Gruppe der TRI-exponierten Patienten war somit fast doppelt so hoch (Abb. 21a) wie in der Gruppe der RCC-Patienten mit unbekannter TRI-Exposition. Dieser Unterschied war statistisch hoch signifikant ( $p = 0,0021$ ).

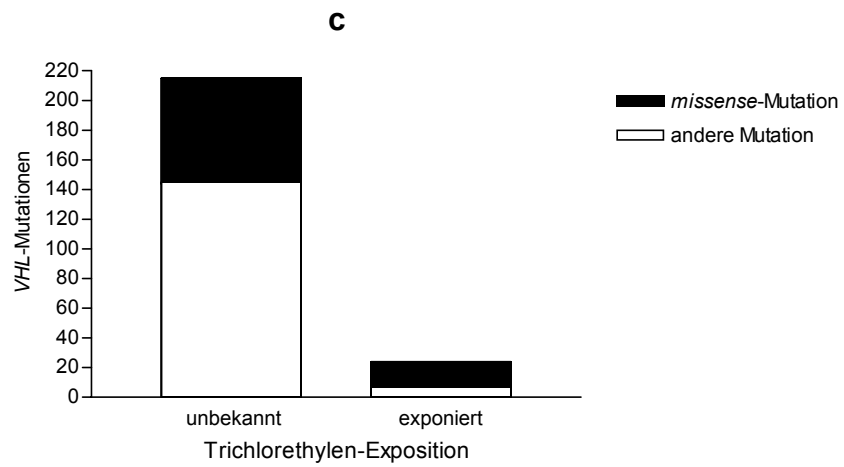
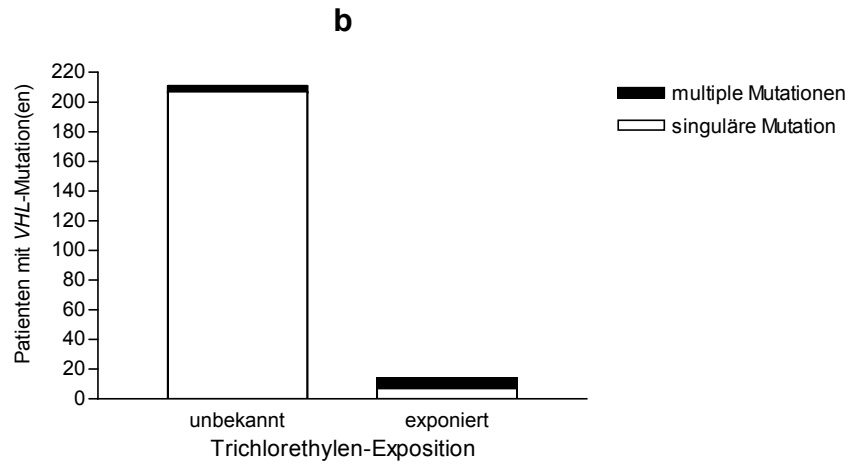
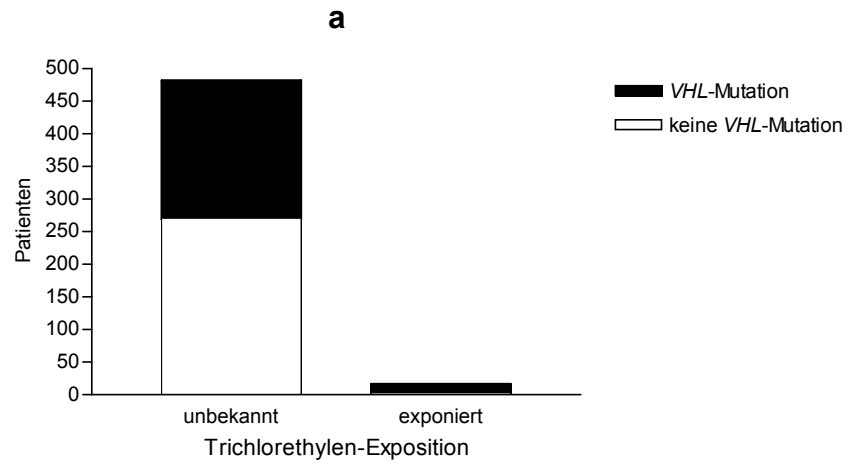
**Häufigkeit multipler *VHL*-Mutationen:** Bei den nicht TRI-exponierten Patienten wurden keine multiplen somatischen *VHL*-Mutationen im Tumorgewebe beobachtet (Tab. 5). Dagegen hatten sieben der 14 TRI-exponierten Patienten mit *VHL*-Mutation (50%) eine *VHL*-Mehrfachmutation (Tab. 6). Dabei handelte es sich in fünf Fällen um eine Doppelmutation und in je einem Fall um eine Dreifach- bzw. Vierfachmutation. Nur vier der 211 RCC-Patienten (2%) mit unbekannter TRI-Exposition hatten dagegen eine zusätzliche *VHL*-Mutation, die in allen vier Fällen stumm war, d.h. keinen Aminosäureaustausch verursachte. Der Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens multipler *VHL*-Mutationen bei den TRI-exponierten Patienten und der Patientengruppe mit unbekannter TRI-Exposition war hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) (Abb. 21b).

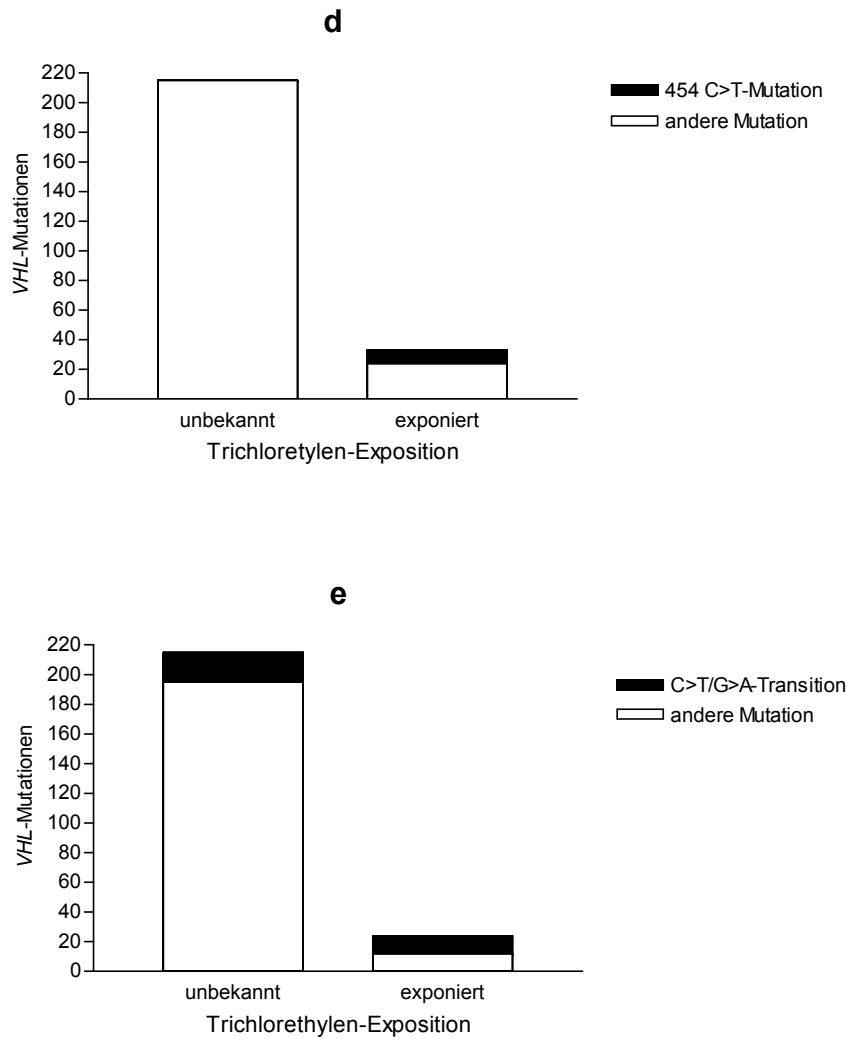
**Tabelle 7:** Vergleich von somatischen *VHL*-Mutationsspektren in den Nierenzellkarzinomen (RCC) von Patienten mit, ohne und unbekannter Trichlorethylen(TRI)-Exposition

	Fälle aus TRI-belasteter Region		Fälle mit unbekannter TRI-Exposition							
	Diese Arbeit		Summe aller rechts aufgeführten Studien	Brauch <i>et al.</i> 2000 <sup>b</sup>	Foster <i>et al.</i> 1994	Gnarra <i>et al.</i> 1994	Kenck <i>et al.</i> 1996	Shuin <i>et al.</i> 1994	Whaley <i>et al.</i> 1994	
	Nicht-TRI-exponiert	TRI-exponiert <sup>a</sup>								
Anzahl Patienten	21 (100%)	17 (100%)	482 (100%)	167	99	98	43	39	36	
Patienten mit <i>VHL</i> -Mutation im Tumor	2 (10%)	14 (82%)	211 (44%)	64	31	56	22	22	16	
Patienten ohne <i>VHL</i> -Mutation im Tumor	19 (90%)	3 (18%)	271 (56%)	103	68	42	21	17	20	
Patienten mit einer <i>VHL</i> -Mutation	2 (100%)	7 (50%)	207 (98%)	61	31	56	21	22	16	
Patienten mit mehreren <i>VHL</i> -Mutationen	0	7 (50%)	4 (2%)	3	0	0	1	0	0	
Gesamtzahl der <i>VHL</i> -Mutationen	2	24	215	67	31	56	23	22	16	
<b>Mutationstyp</b>										
<i>missense</i> -Mutation	2 (100%)	17 (71%)	70 (33%)	18	8	20	14	3	7	
<i>nonsense</i> -Mutation	0	0	13 (6%)	4	1	4	0	1	3	
<i>frameshift</i> -Mutation	0	6 (25%)	111 (52%)	32	21	28	8	17	5	
<i>splice-site</i> -Mutation	0	1 (4%)	11 (5%)	6	1	2	0	1	1	
<i>in-frame</i> -Insertion/Deletion	0	0	5 (2%)	3	0	2	0	0	0	
<i>silent</i> -Mutation	0	0	4 (2%)	3	0	0	1	0	0	
3'-UTR	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
454 C>T	0	9 (38%)	0	0	0	0	0	0	0	
C>T	0	11 (46%)	12 (6%)	3	2	4	1	0	2	
G>A	1 (50%)	1 (4%)	8 (4%)	3	1	4	0	0	0	

<sup>a</sup> Die entsprechenden Mutationsanalysen wurden von Brauch *et al.* (1999) und Hornauer (Doktorarbeit in Vorbereitung) durchgeführt.

<sup>b</sup> In dieser Arbeit wurden die histopathologischen Subtypen genau beschrieben. In die Mutationsanalyse wurden 151 klarzellige RCC, 13 nicht weiter klassifizierte, ein niedrig differenziertes sowie zwei dedifferenzierte RCC miteingeschlossen. Neben den hier aufgelisteten *VHL*-Mutationen hatten zehn weitere Patienten epigenetische *VHL*-Veränderungen (Hypermethylierungen).





**Abbildung 21:** Quantitativer Vergleich somatischer *VHL*-Mutationen in den Tumoren von Nierenzellkarzinom-Patienten mit bekannter (rechts) und unbekannter (links) beruflicher Trichlorethylen-Exposition. a: Häufigkeit somatischer *VHL*-Mutationen. b: Häufigkeit multipler *VHL*-Mutationen. c: Häufigkeit von *VHL*-missense-Mutationen. d: Häufigkeit der 454 C>T-Mutation (Pro81Ser). e: Häufigkeit von C>T- bzw. G>A-Transitionen.



**Häufigkeit von missense-Mutationen:** Die Mutationen der nicht TRI-exponierten Patienten waren in beiden Fällen *missense*-Mutationen (Tab. 5). Von den insgesamt 24 *VHL*-Mutationen der TRI-exponierten Patienten waren 17 (71%) (Tab. 6) und von den 215 Mutationen der 211 RCC-Patienten mit unbekannter TRI-Exposition 70 (33%) *missense*-Mutationen (Tab. 7). Damit trat dieser Mutationstyp bei den TRI-exponierten Patienten mehr als doppelt so häufig auf, wie bei den Patienten mit unbekannter TRI-Exposition (Abb. 21c). Dieser Unterschied war statistisch hoch signifikant ( $p = 0,0005$ ).

**Häufigkeit der 454 C>T-Mutationen:** Eine 454 C>T-Transition (Pro81Ser) wurde weder bei den nicht TRI-exponierten noch bei den Patienten mit unbekannter TRI-Exposition beobachtet. Dagegen entsprachen neun der 24 Mutationen (38%) bei den TRI-exponierten Patienten diesem Mutationstyp (Tab. 6). Bei vier dieser Patienten konnte diese Mutation auch im Normalgewebe nachgewiesen werden (Brauch *et al.*, 1999). Dieser Unterschied im Auftreten der 454 C>T-Mutation zwischen der Gruppe der TRI-exponierten Patienten und der Gruppe der Patienten mit unbekannter TRI-Exposition war statistisch hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) (Abb. 21d).

**Häufigkeit von C>T- bzw. G>A-Transitionen:** In den Tumoren nicht TRI-exponierter Patienten wurde eine G>A-, jedoch keine C>T-Transition beobachtet. Auch bei den Patienten mit unbekannter TRI-Exposition war die Häufigkeit dieser Mutationen insgesamt niedrig. So waren nur 20 der 215 *VHL*-Mutationen (weniger als 10%) C>T- ( $n = 12$ ) bzw. G>A-Transitionen ( $n = 8$ ). Dagegen waren bei den TRI-exponierten Patienten zwölf der insgesamt 24 Mutationen (50%) entweder C>T- ( $n = 11$ ) oder G>A-Transitionen ( $n = 1$ ). Auch dieser Unterschied war statistisch hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) (Abb. 21e).

#### 3.3.2.4 Vergleich des Tumor-Diagnosealters

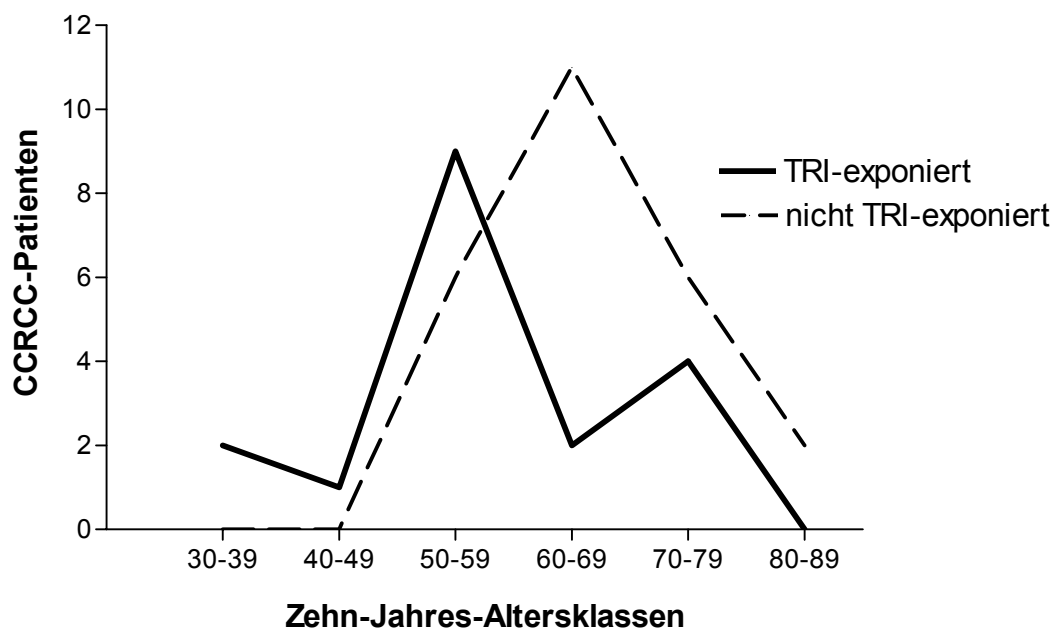
Es wurde der Altersunterschied bei der Diagnose eines CCRCC zwischen der Gruppe der nicht TRI-exponierten Patienten ( $n = 25$ ) (Tab. 5) und der Gruppe der TRI-exponierten Patienten ( $n = 18$ ) (Tab. 6) ermittelt. Die Tumoren der nicht TRI-exponierten Patienten wurden im Alter zwischen 51 und 81 Jahren diagnostiziert (mittleres Erkrankungsalter: 66 Jahre). Die Tumoren der TRI-exponierten Patienten wurden im Alter zwischen 38 und 78 Jahren diagnostiziert (mittleres Erkrankungsalter: 58 Jahre). Die graphische Darstellung der Patientenzahl gegenüber dem CCRCC-Diagnosealter, zusammengefasst in Zehn-Jahres-

Altersklassen, zeigt, dass die Tumoren der TRI-exponierten Patienten meist früher diagnostiziert wurden, als die der nicht TRI-exponierten Patienten (Abb. 20).

Die „Kurve“ der Altersverteilung weist in der Gruppe der TRI-exponierten Patienten darüber hinaus zwei Maxima auf. Entsprechend dem ersten Maximum wurden die meisten Tumoren dieser Patienten im Alter von 50-59 Jahren diagnostiziert (Median 57,5 Jahre). Das zweite Maximum liegt in der Altersklasse von 70-79 Jahren.

Im Gegensatz dazu wurden die meisten Tumoren der nicht TRI-exponierten Patienten im Alter von 60-69 Jahren diagnostiziert (Median 67 Jahre), was dem durchschnittlichen Diagnosealter für RCC entspricht (Moyad, 2001).

Der Vergleich zeigt, dass die Tumoren der TRI-exponierten Patienten im Durchschnitt etwa acht Jahre früher als die der nicht TRI-exponierten Patienten diagnostiziert wurden (CI: 2,08 - 13,87). Dieser Unterschied war statistisch hoch signifikant ( $p = 0,01$ ).



**Abbildung 20:** Altersverteilung bei der Diagnose eines klarzelliges Nierenzellkarzinoms (CCRCC) bei Trichlorethylen (TRI)-exponierten (durchgezogene Linie) und nicht TRI-exponierten (gestrichelte Linie) Patienten. Die Diagnosealter wurden in Zehn-Jahres-Altersklassen zusammengefasst. Bei den TRI-exponierten Patienten erfolgte die CCRCC-Diagnose meist im Alter von 50-59 Jahren (1. Maximum) und weniger häufig im Alter von 70-79 Jahren (2. Maximum). Bei den nicht TRI-exponierten Patienten wurden die Tumoren dagegen meist im Alter von 60-69 Jahren diagnostiziert.

### 3.3.3 Somatische *VHL*-Mutationsanalyse bei Nierenzellkarzinom-Patienten im Rahmen einer aktuellen molekular-epidemiologischen Fall-Kontroll-Studie zur Klärung eines Trichlorethylen-assoziierten Nierenkrebsrisikos

Von 44 CCRCC-Patienten wurden insgesamt 69 archivierte Gewebeproben, die in der Zeit von 1992 bis 2000 gesammelt wurden, mittels einer *VHL*-Sequenzieranalyse untersucht. Von den 207 zu erwartenden PCR-Produkten der drei *VHL*-Exons konnten 173 (84%) analysiert werden. Damit war die Rate der erfolgreich analysierbaren PCR-Produkte um 12% höher als bei dem zuvor beschriebenen nicht TRI-exponierten Patientenkollektiv, dessen Gewebeproben aus den Jahren 1987 bis 1992 stammten (2.2.3.1). In Tabelle 8 sind die Ergebnisse dieser Sequenzierungen aufgeführt, die von der Tabelle 9 noch einmal zusammengefasst werden.

In den 23 **Normalgeweben** konnten bei vier Patienten insgesamt fünf somatische *VHL*-Mutationen identifiziert werden. Dabei handelte es sich um drei *missense*-Mutationen und zwei stumme Alterationen. Der Patient 97 hatte sowohl eine 399 G>A- (Val62Met) als auch eine 454 C>T-Transition (Pro81Ser). Im Normalgewebe des Patienten 122 konnte eine 542 A>G-Transition (His110Arg) identifiziert werden. Zwei weitere Patienten (Patienten 103 und 110) hatten je eine stumme *VHL*-Alteration, eine 387 G>A-Transition (Arg58*silent*) bzw. eine 753 C>T-Transition (Ile180*silent*) (Tab. 8).

In den 46 **Tumorgeweben** wurden 22 *VHL*-Mutationen identifiziert. Davon betroffen waren 17 der 44 untersuchten Patienten (39%). Dabei handelte es sich um acht *missense*-Mutationen (36%), sechs *frameshift*-Mutationen (27%), fünf stumme Alterationen (23%), zwei *nonsense*-Mutationen (9%) und eine *splice-site*-Mutation (5%) (Tab. 8).

**Patienten mit multiplen somatischen *VHL*-Mutationen:** Von den 17 Patienten mit *VHL*-Mutationen hatten drei (18%) multiple Mutationen im Tumorgewebe. Ein Patient (Patient 97) hatte vier somatische Mutationen im Tumor- und zwei im Normalgewebe (Tab. 8). Bei den Mutationen im Tumorgewebe handelte es sich um die zwei *missense*-Mutationen 506 A>G (Tyr98Cys) und 596 T>C (Leu128Pro), die stumme Alteration 552 A>G (Arg113 *silent*) und um die *frameshift*-Mutation 386-388 insC. Diese *frameshift*-Mutation wurde noch bei einem weiteren Patienten (Patient 101) in Kombination mit der *missense*-Mutation 452 G>A (Ser80Asn) beobachtet. Ein dritter Patient (Patient 144) hatte die zwei stummen *VHL*-Alterationen 768 C>T (Tyr185 *silent*) und 774 T>C (Asp187 *silent*).

**Häufigkeit der 454 C>T-Transition (Pro81Ser):** Diese Mutation konnte nur im Normalgewebe eines Patienten (Patient 97) in Kombination mit einer weiteren 399 G>A-*missense*-Mutation (Val62Met) detektiert werden. Im Tumorgewebe dieses Patienten wurden darüber hinaus, wie bereits im vorhergehenden Absatz „Patienten mit multiplen somatischen *VHL*-Mutationen“ beschrieben, die zwei *missense*-Mutationen 506 A>G (Tyr98Cys) und 596 T>C (Leu128Pro) sowie die stumme Alteration 552 A>G (Arg113*silent*) und die *frameshift*-Mutation 386-388 insC identifiziert (Tab. 8).

**Häufigkeit von C>T und G>A-Transitionen:** Von den insgesamt 27 somatischen *VHL*-Alterationen in den untersuchten Normal- und Tumorgeweben waren sechs C>T- und vier G>A-Transitionen (Tab. 8). Insgesamt entfielen somit 37% der identifizierten Mutationen auf diese beiden Mutationstypen.

**Häufigkeit einer 386-388 insC-Mutation:** Diese Mutation wurde bei drei der 17 Patienten (18%) mit einer *VHL*-Mutation im Tumorgewebe identifiziert (Patienten 28, 97 und 101). Sie trat bei dem Patienten 101 in Kombination mit der *missense*-Mutation 452 G>A (Ser80Asn) und in einem weiteren Fall (Patient 97) gemeinsam mit den beiden *missense*-Mutationen 506 A>G (Tyr98Cys) und 596 T>C (Leu128Pro) sowie der stummen Alteration 552 A>G (Arg113*silent*) auf. Der Patient 97 hatte darüber hinaus die beiden *missense*-Mutationen 399 G>A (Val62Met) und 454 C>T (Pro81Ser) im Normalgewebe (Tab.8).

**Tabelle 8:** Somatische *VHL*-Mutationen in Normal- und Tumorgeweben von Nierenzellkarzinom-Patienten der aktuellen Fall-Kontroll-Studie.

Pat.- Nr.	DNA-Nr. Normal	Mutation		DNA-Nr. Tumor	Mutation	
		Nukleotid	Aminosäure		Nukleotid	Aminosäure
2	2806	-	-	2807	-	-
4	2808	-	-	2809	-	-
12	2824	-	-	2825	<b>553 G&gt;T<sup>a</sup></b>	<b>Gly114Cys</b>
13	nicht vorhanden			2549 <sup>c, d</sup>	-	-
14	nicht vorhanden			2543 <sup>b, d</sup>	-	-
16	nicht vorhanden			2540 <sup>c, d</sup>	<b>530 G&gt;A<sup>a, e</sup></b>	<b>Gly106Asp</b>
17	nicht vorhanden			2547 <sup>c, d</sup>	-	-
20	nicht vorhanden			2544 <sup>d</sup>	-	-
21	2830	-	-	2831 <sup>b, c, d</sup>	nicht analysierbar	
28	2466 <sup>f</sup>	-	-	2465	<b>386-388 insC</b>	<b>frameshift</b>
30	nicht vorhanden			2542 <sup>b, d</sup>	-	-
31	nicht vorhanden			2528 <sup>d</sup>	609 A>G	-
32	2562 <sup>c, d</sup>	-	-	2550 2563 <sup>b, c, d</sup>	- nicht analysierbar	-
34	2818	-	-	2819	-	-
35	nicht vorhanden			2541 <sup>b</sup>	-	-
47	2814	-	-	2815	-	-
49	nicht vorhanden			2548 <sup>c, d</sup>	-	-
57	2810 <sup>d</sup>	-	-	2811	<b>621 delT</b>	<b>frameshift</b>
58	nicht vorhanden			2526	-	-
59	2826	-	-	2827	<b>725 insA<sup>a</sup></b>	<b>frameshift</b>
60	2524	699 C>T	-	nicht vorhanden		
61	2802	-	-	2803	<b>514 C&gt;T<sup>a, e</sup></b>	<b>Leu101silent</b>
64	nicht vorhanden			2525	<b>434 T&gt;A</b>	<b>Val74Asp</b>
66	2820	-	-	2821	<b>676+1,2 gt&gt;ta</b>	<b>splice defect</b>
79	nicht vorhanden			2536 <sup>d, g</sup> 2527 2529	451 A>G 496 C>T 530 G>A - -	- -
84	2828	-	-	2829 <sup>d</sup>	<b>553 G&gt;C<sup>a</sup></b>	<b>Gly114Arg</b>

Fortsetzung Tabelle 8

Pat.- Nr.	DNA-Nr. Normal	Mutation		DNA-Nr. Tumor	Mutation	
		Nukleotid	Aminosäure		Nukleotid	Aminosäure
89	2539	-	-	2519	-	-
95	nicht vorhanden			2545	<b>742 A&gt;T</b> <sup>a</sup> 784 C>T 810 G>A	<b>Arg177Stop</b>
97	2804	<b>399 G&gt;A</b> <b>454 C&gt;T</b> 435 C>T	<b>Val62Met</b> <b>Pro81Ser</b>	2805 <sup>d</sup>	<b>386-389 insC</b> <b>506 A&gt;G</b> <b>552 A&gt;G</b> <b>596 T&gt;C</b>	<b>frameshift</b> <b>Tyr98Cys</b> <b>Arg113silent</b> <b>Leu128Pro</b>
101	nicht vorhanden			2534 <sup>d</sup>	<b>452 G&gt;A</b> <sup>a</sup> <b>386-388 insC</b> <sup>a</sup>	<b>Ser80Asn</b> <b>frameshift</b>
103	2800 <sup>c, d</sup>	<b>387 G&gt;A</b> <sup>e</sup>	<b>Arg58 silent</b>	2801 <sup>b</sup>	660delC	
104	2822	-	-	2823	<b>643 G&gt;T</b>	<b>Gly144Stop</b>
109	nicht vorhanden			2537 <sup>c, d, g</sup>	480 C>T <sup>e</sup> 526 A>G <sup>e</sup> 546 C>T <sup>e</sup>	
110	2533	<b>753 C&gt;T</b>	<b>Ile180 silent</b>	2538	<b>753 C&gt;T</b> <sup>a</sup>	<b>Ile180silent</b>
114	2816	-	-	2817	<b>407 C&gt;T</b> <sup>a</sup>	<b>Ser65Leu</b>
115	nicht vorhanden			2506	-	-
116	nicht vorhanden			2546 <sup>d</sup>	-	-
117	2812	-	-	2813	-	-
118	2535	-	-	2522	-	-
119	nicht vorhanden			2502	<b>432 delG</b> <sup>a</sup>	<b>frameshift</b>
122	2924	<b>542 A&gt;G</b> <sup>a</sup>	<b>His110Arg</b>	2923		-
132	nicht vorhanden			2531	-	-
141	nicht vorhanden			2518 <sup>d</sup>	-	-
144	nicht vorhanden			2523	<b>768 C&gt;T</b> <b>774 T&gt;C</b>	<b>Tyr185silent</b> <b>Asp187silent</b>

kursiv: nicht reproduzierbare Mutation (bei erneuter PCR und Sequenzierung des PCR-Produkts)

fett: reproduzierbare Mutation (bei erneuter PCR und Sequenzierung des PCR-Produkts)

<sup>a</sup> PCR und Sequenzierung konnte aufgrund zu geringen DNA-Mengen nicht wiederholt werden.

<sup>b</sup> Exon 1 nicht analysierbar

<sup>c</sup> Exon 2 nicht analysierbar

<sup>d</sup> Exon 3 nicht analysierbar

<sup>e</sup> homozygote Mutation oder LOH (im Sequenzierchromatogramm keine zwei überlagerten Peaks sondern Änderung der Peakfarbe)

<sup>f</sup> Bei diesem Patienten wurde die *VHL*-Mutation nicht nur im Primärtumor sondern auch in 11 Metastasen identifiziert (drei Lymphknoten, Leber, Peritoneum, Nebenniere, Vorhof, Pleura, Perikard, Lunge). Bei allen analysierten Geweben handelte es sich um Frischgewebe.

<sup>g</sup> kloniertes PCR-Produkt

**Tabelle 9:** Häufigkeiten der *VHL*-Mutationstypen in der aktuellen Fall-Kontroll-Studie

<b>Gewebe</b>	<b>Tumorgewebe</b>	<b>Normalgewebe</b>
<b>Mutationstypen</b>		
<i>missense</i> -Mutation	8 (36%)	3 (60%)
<i>silent</i> -Mutation	5 (23%)	2 (40%)
<i>frameshift</i> -Mutation	6 (27%)	0
<i>nonsense</i> -Mutation	2 (9%)	0
<i>splice-site</i> -Mutation	1 (5%)	0
C>T- und G>A-Transition	6 (27%)	4 (80%)
<b>Summe der Mutationen</b>	<b>22</b>	<b>5</b>

### 3.3.4 Klonierung von PCR-Produkten mit multiplen *VHL*-Mutationen

Aufgrund des Nachweises multipler somatischer *VHL*-Mutationen in mehreren PCR-Produkten von DNA-Proben aus archivierten Geweben, stellte sich die Frage nach der Reproduzierbarkeit der, der Lokalisation auf einem oder beiden Allelen sowie der Klonalität der Tumorzellen. Um diesen Fragestellungen nachzugehen, wurden die relevanten Exon 1-PCR-Produkte des Patienten 109 (DNA-Nr. 2537, Tab. 8) mit drei Exon 1-Mutationen und des Patienten 79 (DNA-Nr. 2536, Tab. 8) mit drei Exon 1-Mutationen in einen bakteriellen Vektor kloniert und das *VHL*-Insert nach der Vermehrung der Bakterien und einer anschließenden Isolierung der Plasmid-DNA sequenziert.

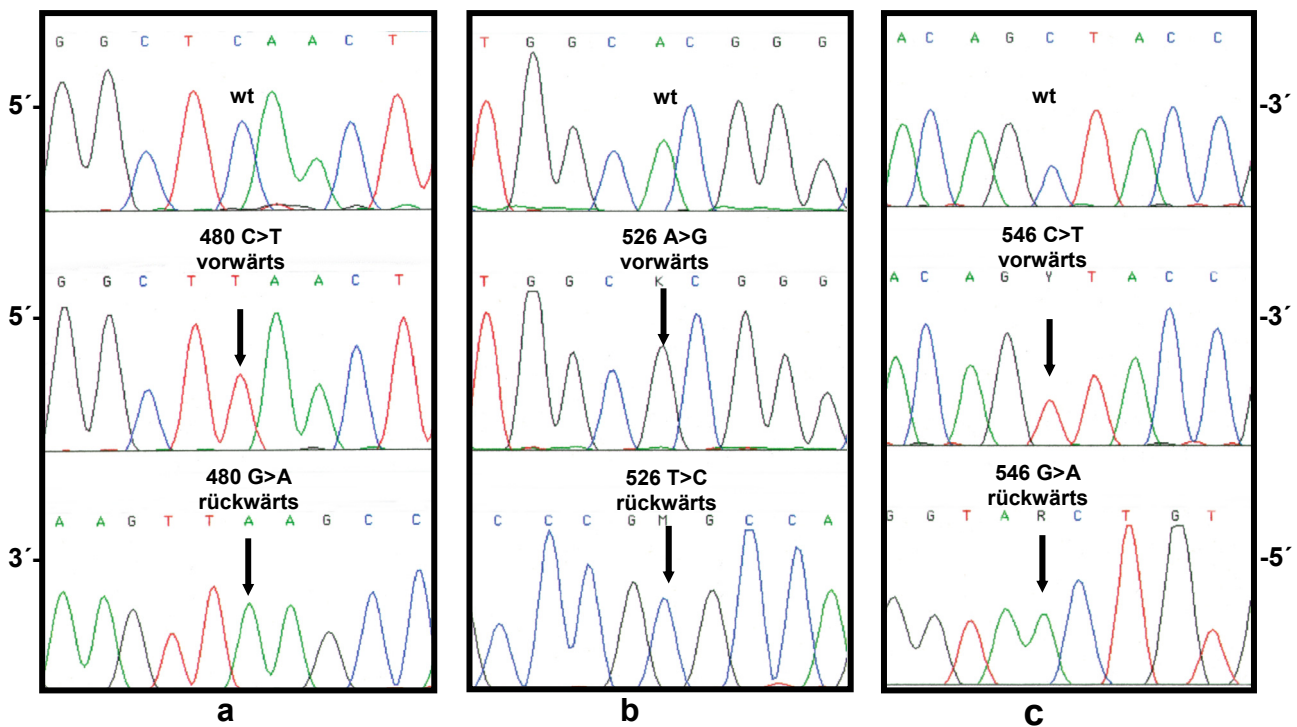
Im Gegensatz zum Nachweis der Exon 1-Mutationen 480 C>T, 526 A>G und 546 C>T im PCR-Produkt des Patienten 109 mittels zuvor erfolgter Sequenzierung (Abb. 22), wurden bei der Sequenzierung der klonierten DNA andere *VHL*-Mutationen identifiziert. So enthielten sieben der zehn Klone die Exon 1-Wildtypsequenz und die restlichen drei Klone jeweils drei verschiedene *VHL*-Mutationen (nicht gezeigt).

Auch im Falle des Patienten 97 wurde keine der drei Exon 1-Mutationen 451 A>G, 496 C>T und 530 G>A im Klonierungsexperimen bestätigt, die bei der Sequenzierung des PCR-Produkts identifiziert worden waren (Abb. 23). Von den 16 analysierten Klonen enthielten zehn die Exon 1-Wildtypsequenz, drei Klone trugen jeweils drei verschiedenen *VHL*-Mutationen und drei weitere Klone je eine singuläre *VHL*-Mutation (nicht gezeigt).

Parallel dazu wurden die mutationstragenden Exon 1-PCR-Produkte von drei Patientenproben mit bekannter *VHL*-Mutation und unterschiedlicher Herkunft kloniert und analysiert. Zu diesen Proben gehörte DNA aus dem Blut eines *VHL*-Patienten, DNA aus Tumor-Frischgewebe eines Patienten mit einem sporadischen RCC und DNA aus einer RCC-

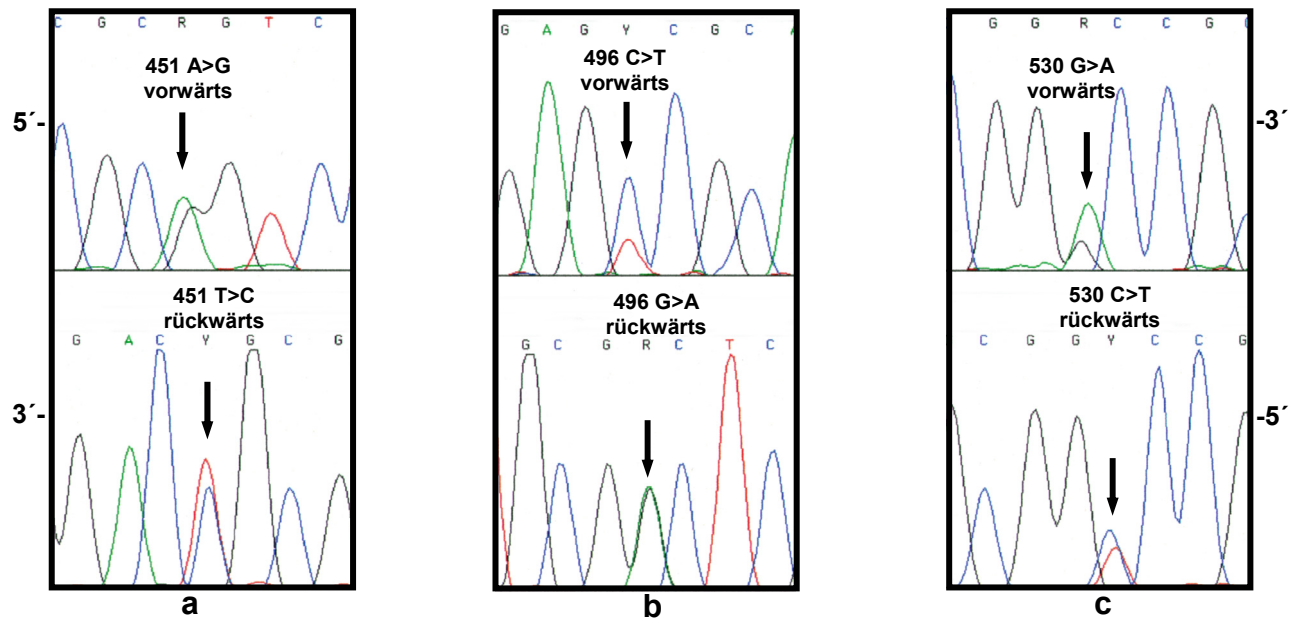
Zelllinie. Die bekannten Mutationen aller drei Gewebe wurden durch die Klonierungsexperimente bestätigt.

Während die Klonierungsexperimente mit DNA aus Frischgewebe somit reproduzierbare Ergebnisse lieferten, wiesen die DNA-Proben aus archivierten Geweben ein breites Spektrum nicht reproduzierbarer *VHL*-Mutationen auf. Dies spiegelt möglicherweise eine DNA-Inhomogenität wider, die sich bereits bei der Sequenzierung der PCR-Produkte angedeutet hatte. Die Fragestellungen nach der Reproduzierbarkeit, der Lokalisation auf einem oder beiden Allelen sowie der Klonalität der Tumorzellen konnte damit nicht beantwortet werden. Dafür bestätigten sich Hinweise auf eine schlechtere Analysierbarkeit von DNA-Proben aus archivierten Geweben. Es wurde deutlich, dass die Bestätigung von Mutationen in diesem Fall eine zweite, unabhängige PCR mit anschließender Sequenzierung erforderte.



**Abbildung 22:** Ausschnitte der Sequenzierchromatogramme zum Nachweis somatischer *VHL*-Mutationen im Exon 1-PCR-Produkt des Patienten 109 (DNA-Nr. 2537). a: Mutation 480 C>T mit Basenaustausch C nach T in Vorwärtsrichtung (C: blau, T: rot) und G nach A in Rückwärtsrichtung (A: grün). b: Mutation 526 A>G mit Basenaustausch A nach G in Vorwärtsrichtung (A: grün, G: schwarz) und T nach C in Rückwärtsrichtung (C: blau). c: Mutation 546 C>T mit Basenaustausch C nach T in Vorwärtsrichtung (C: blau, T: rot) und G nach A in Rückwärtsrichtung (A: grün), wt = Wildtyp.





**Abbildung 23:** Ausschnitte der Sequenzierchromatogramme zum Nachweis somatischer *VHL*-Mutationen im Exon 1-PCR-Produkt des Patienten 97 (DNA-Nr. 2536). a: heterozygote Mutation 451 A>G mit Basenaustausch A nach G in Vorwärtsrichtung (A: grün, G: schwarz) und T nach C in Rückwärtsrichtung (T: rot, C: blau). b: Mutation 496 C>T mit Basenaustausch C nach T in Vorwärtsrichtung (C: blau, T: rot) und G nach A in Rückwärtsrichtung (G: schwarz, A: grün). c: Mutation 530 G>A mit Basenaustausch G nach A in Vorwärtsrichtung (G: schwarz, A: grün) und C nach T in Rückwärtsrichtung (C: blau, T: rot).

## 4 Diskussion

### 4.1 *VHL*-Mutationen und ihre Detektierbarkeit in der Keimbahn

Seit der Identifizierung des Tumorsuppressorgens *VHL* vor zehn Jahren (Latif *et al.*, 1993) wurden über 300 verschiedene, mit dem erblichen VHL-Syndrom assoziierte, *VHL*-Keimbahnmutationen beschrieben (Brauch *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995b; Crossey *et al.*, 1994; Glavac *et al.*, 1996; Latif *et al.*, 1993; Maher *et al.*, 1996; Richards *et al.*, 1995; Whaley *et al.*, 1994; Zbar *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurde auch eine beachtliche Zahl somatischer *VHL*-Mutationen in klarzelligen RCC (CCRCC) (Brauch *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 1994; Gnarra *et al.*, 1994; Kenck *et al.*, 1996; Shuin *et al.*, 1994; Whaley *et al.*, 1994) und in sporadischen Hämangioblastomen (Kanno *et al.*, 1994) identifiziert, so dass heute insgesamt mehr als 700 *VHL*-Mutationen dokumentiert sind<sup>1</sup>. Warum ein Gen, dessen kodierende Sequenz nur 639 Nukleotide umfasst, ein so umfangreiches und heterogenes Mutationsspektrum aufweist, ist noch immer unklar. Die hier vorliegende Arbeit sollte zum besseren Verständnis dieser Sachlage beitragen. Zum einen sollte eine Beziehung zwischen einzelnen *VHL*-Keimbahnmutationen und ihren pathogenetischen Effekten in VHL-Zielgeweben hergestellt werden (Genotyp-Phänotyp-Korrelationen) und zum anderen sollten somatische *VHL*-Mutationsprofile im Zusammenhang zu möglichen ursächlichen Gen-Umwelt-Beziehungen betrachtet werden.

Eine Voraussetzung zur Durchführung dieser Arbeit war die Implementierung methodischer und technologischer Verbesserungen für den umfassenden und sensitiven Nachweis von *VHL*-Mutationen. Daher wurde zu Beginn der Arbeit zunächst die *VHL*-Mutationsdetektion optimiert. Während zu Beginn und Mitte der 1990er Jahre bevorzugt PCR-basierte Restriktionsverdau- (Brauch *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1995b) oder SSCP-Analysen mit der anschließenden Sequenzierung auffälliger PCR-Produkte angewandt wurden, die insgesamt zeitaufwendig, teuer und nur bedingt sensitiv waren (Chen *et al.*, 1996; Glavac *et al.*, 1996), stand nunmehr mit der DHPLC eine neue Technologie für das semi-automatisches Mutationsscreening zur Verfügung. Ihre erfolgreiche Anwendung im Rahmen von Keimbahnmutationsanalysen anderer Krebsgene wie z.B. *BRCA1* und *BRCA2* (Gross *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 1999a; Wagner *et al.*, 1999b; Wagner *et al.*, 1998), *TSC2* (Choy *et al.*, 1999) und des *MET*-Proto-Onkogens (Nickerson *et al.*, 2000) war richtungsweisend für eine Anwendung bei der *VHL*-Mutationsanalyse (Ellis *et al.*, 2000). Dies um so mehr, als die gerade bei deutschen VHL-Patienten häufig anzutreffende *founder-*

---

<sup>1</sup> Universal *VHL*-Mutation Database: <http://www.umd.necker.fr:2005>

Mutation 505 T>C (Tyr98His) (Brauch *et al.*, 1995) sowie die beiden *hot spot*-Mutationen 712 C>T (Arg167Trp) und 713 G>A (Arg167Gln) (Chen *et al.*, 1996; Zbar *et al.*, 1996) bisher spezifische Nachweisreaktionen erforderten (Brauch *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Glavac *et al.*, 1996). Um den Nutzen der DHPLC-Technologie für diesen Forschungsbereich zu prüfen, wurden zunächst 43 DNA-Proben aus Blut mit bekannten, im eigenen Labor ehemals identifizierten *VHL*-Keimbahnmutationen analysiert (Glavac *et al.*, 1996; Klein *et al.*, 2001). Hierfür wurden die mutationstragenden PCR-Produkte mit zwei verschiedenen DHPLC-Systemen analysiert, zum einen mit dem Varian-System (Varian-Helix<sup>TM</sup>-System) und zum anderen mit dem Wave-System (Wave<sup>®</sup> Nucleic Acid Fragment Analysis-System). Anschließend wurde die Sensitivität beider Systeme miteinander verglichen. Dabei war das Wave-System dem Varian-System deutlich überlegen. Bis auf zwei *VHL*-Keimbahnmutationen (5%) konnten alle bekannten Mutationen mit dem Wave-System detektiert werden. Die nicht detektierbaren Mutationen waren eine 454 C>T-Mutation (Pro81Ser) im Exon 1, einer GC-reichen *VHL*-Sequenz (Herman *et al.*, 1994), und ein 620 T>G-Austausch (Phe136Cys) in einer besonders T-reichen Region im Exon 2.

Die Gesamtdetektionsrate des Wave-Systems lag bei 95% und unterschied sich damit deutlich von der Gesamtdetektionsrate des Varian-Systems mit nur 86%. Das Varian-System war zwar hinsichtlich seiner Sensitivität mit der SSCP-Analyse vergleichbar (Cotton, 1993; Orita *et al.*, 1989; Ravnik-Glavac *et al.*, 1994; Sarkar *et al.*, 1992), zeichnete sich jedoch durch einen besonders hohen Anteil falsch negativer Ergebnisse von 33% im GC-reichen Exon 1 aus, was auf die schlechteren Trenneigenschaften der Chromatographiesäule des Varian-Systems zurückgeführt werden konnte.

Trotz der Überlegenheit des Wave-Systems konnten im Gegensatz zu den *BRCA1*-, *BRCA2*- und *MET*-Mutationsanalysen nicht alle Mutationen im *VHL* detektiert werden (Arnold *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 1999; Nickerson *et al.*, 2000). Insgesamt war die Amplifizierung und Analyse der GC-reichen Exons 1 und 3 problematischer. Diese Exons benötigten mehrere Analysetemperaturen bei der DHPLC, was auf die bekanntermassen höhere Thermostabilität GC-reicher DNA-Stränge aufgrund dreifacher Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Nukleotiden zurückzuführen ist. Darüber hinaus kommt es in GC-reichen Sequenzen häufiger zur Ausbildung von Sekundärstrukturen. Dies kann sich während der PCR zum einen in einer erschwerten Denaturierung und zum anderen in einer unspezifischen Anlagerung der PCR-Primer manifestieren. Auch bei der Auftrennung der DNA-Duplicates durch die DHPLC-Säule könnten mögliche Strukturunterschiede zwischen den vier möglichen Strangkombinationen durch den festeren Zusammenhalt der beiden DNA-Stränge maskiert werden und einen

Wildtyp vortäuschen. Die Position der Mutation innerhalb des PCR-Produkts scheint ebenfalls die Struktur der Heteroduplex-Moleküle und somit die DHPLC-Auftrennung maßgeblich zu beeinflussen. Eine minimale Veränderung der PCR-Primer konnte die Detektion einer zuvor nicht nachweisbaren Mutation ermöglichen, wie das Beispiel der 454 C>T-Mutation zeigt (Weirich *et al.*, 2002). Daraus folgt, dass die DHPLC für die Suche nach unbekanntem *VHL*-Mutationen nur sehr eingeschränkt geeignet ist, da deren genaue Lage nicht vorhersagbar ist. In diesem Fall sollte direkt sequenziert werden.

Im Rahmen einer weiteren DHPLC-Untersuchung wurde Blut-DNA von 36 Probanden mit unbekanntem *VHL*-Keimbahnstatus analysiert. Bei diesen Patienten war die Wahrscheinlichkeit, Träger einer *VHL*-Keimbahnmutation zu sein, aus unterschiedlichen Gründen gering. Zum einen waren in dieser Gruppe Patienten mit klinisch gesicherter *VHL*-Symptomatik, bei denen in vorangegangenen SSCP-Analysen kein Hinweis auf das Vorliegen einer *VHL*-Keimbahnmutation gefunden werden konnte, zum anderen waren bei einigen Patienten die klinischen Kriterien für eine *VHL*-Diagnose nur zum Teil erfüllt. Zu diesen Patienten gehörten Personen mit z.B. einer familiären Häufung von Phäochromozytomen, RCC oder retinalen Angiomen. Weitere DNA-Proben stammten von Patienten, für die ein *VHL*-Verdacht nicht näher begründet worden war. Entweder war ihre Blutprobe der Analyse aufgrund einer ärztlichen Anfrage zugeführt worden oder die Patienten gehörten zwar *VHL*-Familien an, waren jedoch selbst frei von Symptomen. Insgesamt erfüllten weniger als 14% die Minimalkriterien für das Vorliegen eines *VHL*-Syndroms (Glenn *et al.*, 1990; Neumann, 1987) und somit für das Vorliegen einer *VHL*-Mutationsträgerschaft. Dennoch konnten in dieser Patientengruppe drei *VHL*-Keimbahnmutationen detektiert werden, von denen zwei zuvor einem Nachweis mittels SSCP entgangen waren. Bei der anschließenden Sequenzierung bestätigten sich diese beiden Mutationen und konnten wie folgt zugeordnet werden: die Insertion 396 insC, die zu einem Abbruch der Translation des pVHL am Codon 61 führt, wurde in einer finnischen *VHL*-Familie identifiziert. Die Punktmutation 463 G>T, die am Codon 84 zu einem Austausch der Aminosäure Valin gegen Leucin führt (Val84Leu), wurde in einer amerikanischen Familie mit bekannter familiärer Häufung von Phäochromozytomen identifiziert. Diese Mutation konnte anschließend auch bei zwei Nachkommen des Probanden nachgewiesen werden. Die dritte Mutation 490 G>C (Gly93Arg) wurde bei einem *VHL*-Verdachtspatienten identifiziert, der erstmalig untersucht wurde. Alle negativen DHPLC-Befunde wurden mittels Sequenzierung überprüft und bestätigten das Vorliegen von *VHL*-Wildtypsequenzen in allen drei *VHL*-Exons.

Einige Autoren beobachteten im Rahmen ihrer DHPLC-Analysen mutationsspezifische Elutionsprofile. Dabei konnte eine unbekannte Mutation in einer DNA-Probe anhand ihres DHPLC-Profiles identifiziert werden, wenn dieses Profil bereits einer durch Sequenzierung bestätigten Mutation zugeordnet worden war (Arnold *et al.*, 1999; Gross *et al.*, 1999; Nickerson *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit war eine solche Zuordnung nicht immer korrekt. Zwar waren die DHPLC-Profile der bereits bekannten *VHL*-Keimbahnmutationen zum Teil so charakteristisch, dass sogar verschiedene Nukleotidaustausche an gleicher Nukleotidposition unterschieden werden konnten, andere Beispiele zeigten jedoch, dass auch verschiedene Mutationen identische Elutionsprofile zeigen können. Aus diesem Grund reicht für eine DNA-Probe mit unbekanntem *VHL*-Mutationsstatus die alleinige DHPLC-Analyse nicht aus, um eine *VHL*-Mutation eindeutig zu identifizieren. In solchen Fällen sollte immer zusätzlich sequenziert werden, was sich insbesondere aus dem sehr breiten und heterogenen Spektrum der möglichen *VHL*-Mutationen ergibt. Bei der Analyse von Familienmitgliedern aus *VHL*-Familien mit bereits bekannter familienspezifischer *VHL*-Keimbahnmutation reichte ein mutationsspezifisches DHPLC-Profil jedoch aus, um das Vorhandensein oder Fehlen der bereits bekannten Mutation bei weiteren Familienmitgliedern zu überprüfen.

Insgesamt betrachtet erwies sich die DHPLC als eine hoch sensitive, schnelle und kostengünstige Methode für die Detektion von *VHL*-Keimbahnmutationen im Rahmen von *VHL*-Familienanalysen. Da sie in Einzelfällen jedoch versagen kann, sollte für diagnostische Erstuntersuchungen die komplette Sequenzierung des Gens routinemäßig durchgeführt werden. Dies trifft insbesondere auf die zunächst nicht detektierbare *VHL*-Keimbahnmutation 454 C>G (Pro81Ser) zu, die im Rahmen der im Folgenden diskutierten Genotyp-Phänotyp-Korrelationen eine besondere Rolle spielt und deren DHPLC-Nachweis bei Patienten aus einer *VHL2C*-Familie erst durch eine Optimierung der PCR-Primer gelang.

## 4.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Im Rahmen der Aufklärung der Struktur (Stebbins *et al.*, 1999) und der physiologischen Funktionen des pVHL (Clifford *et al.*, 1998; Hoffman *et al.*, 2001; Krieg *et al.*, 2000a; Maxwell *et al.*, 1999; Ohh *et al.*, 2000; Ohh *et al.*, 1998) wurden die beiden pVHL-Interaktionsdomänen  $\alpha$  und  $\beta$  sowie Effekte der in diesen Domänen lokalisierten *VHL*-Mutationen untersucht. In der  $\alpha$ -Domäne (Aminosäuren 155-192) befindet sich die Bindungsregion (Aminosäuren 157-172) für das Protein Elongin C und in der  $\beta$ -Domäne (Aminosäuren 63-154 sowie 193-204) eine weitere Bindungsregion (*target capture site*, Aminosäuren 78-98) für Substratmoleküle wie z.B. HIF- $\alpha$ . Im Vordergrund dieser Untersuchungen stand der Einfluss von *missense*-Mutationen auf die Modulation des pVHL-vermittelten Proteinabbaus. Die für diese Betrachtung notwendige Reduktion der Komplexität des VHL-Phänotyps richtete das Augenmerk vor allem auf den VHL Typ 2, bei dessen klinischer Symptomatik Phäochromozytome im Vordergrund stehen. Diese können unterschiedlich stark mit anderen Tumoren wie z.B. retinalen Angiomen und ZNS-Hämangioblastomen (Phänotyp VHL2A) sowie RCC (Phänotyp VHL2B) assoziiert sein. Die zentrale Rolle von Phäochromozytomen rückte eine bereits früher untersuchte VHL-Familie (VHL37/38) ins Zentrum des Interesses. Als phänotypische Besonderheit traten bei neun Patienten lediglich Phäochromozytome auf, aus diesem Grund wurde diese Familie dem VHL Typ 2C zugeordnet (Ritter *et al.*, 1996). Als molekulare Ursache wurde im Exon 3 des *VHL* die Keimbahnmutation 775C>G (Leu188Val) identifiziert. (Glavac *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 1995). Da sich diese Mutation zwar phänotypisch gewebespezifisch manifestiert, im Vergleich zu anderen *missense*-Mutationen jedoch hinsichtlich ihrer Lage im Gen keine Besonderheit darstellt, war die Ausprägung des VHL2C-Phänotyps nicht erklärbar, zumal andere mit diesem Phänotyp assoziierte *missense*-Mutationen in der Exon 1-kodierten  $\beta$ -Domäne liegen (Abb. 24).

Bisherige Mutationsanalysen bei dieser Familie waren mittels SSCP und anschließender Sequenzierung des auffälligen PCR-Produkts durchgeführt worden, so dass keine komplette *VHL*-Sequenzierung erfolgt war. Auf der Basis umfangreicher Genotyp-Phänotyp-Erfahrungen und der inzwischen erfolgten methodischen Verbesserungen beim Mutationsscreening, konnte vermutet werden, dass eine zusätzliche *VHL*-Keimbahnmutation bisherigen Analysen entgangen war. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit eine zweite *VHL*-Mutation mittels optimierter DHPLC-Analyse und Sequenzierung identifiziert werden, die über drei Generationen hinweg bei neun Patienten dieser VHL2C-Familie mit der bereits identifizierten 775C>G (Leu188Val) kosegregierte. Dabei handelte es sich um eine

454 C>T-Transition (Pro81Ser) im Exon 1. Beide Mutationen wurden darüber hinaus präsymptomatisch bei einem fünfjährigen Kind einer Patientin nachgewiesen, weshalb für dieses Kind ein hohes Erkrankungsrisiko für Phäochromozytome aufgezeigt werden konnte. Alle anderen, nicht erkrankten Familienmitglieder waren weder Genträger der 775 C>G-Mutation (Leu188Val) noch der 454 C>T-Mutation (Pro81Ser). Die Familienanalyse bestätigte, dass beide *VHL*-Mutationen auf dem *VHL2C*-Krankheitsallel liegen, da sie gemeinsam vererbt wurden. Dass es sich bei der 454 C>T-Keimbahnmutation (Pro81Ser) um einen seltenen Polymorphismus handeln könnte, wurde im Rahmen dieser und anderer Arbeiten (Brauch *et al.*, 1999; Hes *et al.*, 2000; Weirich *et al.*, 2002) ausgeschlossen.

Im Hinblick auf eine mögliche Störung der pVHL-Kontrollfunktion im Regelwerk des kontrollierten Proteinabbaus können die beiden kosegregierenden *VHL2C*-Mutationen der in der  $\alpha$ -Domäne (Leu188Val) und der *target capture site* in der  $\beta$ -Domäne (Pro81Ser) des pVHL zugeordnet werden. Für die Mutation Leu188Val wurde bereits *in vitro* gezeigt, dass sie die Bindung von pVHL an Elongin C nicht beeinflusst (Hoffman *et al.*, 2001), woraus geschlossen wurde, dass die Elongin C-vermittelte pVHL-Funktion für die Ausprägung des *VHL2C*-Phänotyps wahrscheinlich eher eine untergeordnete Rolle spielt. Der Befund der *VHL*-Doppelmutation bei den untersuchten *VHL2C*-Patienten weist allerdings darauf hin, dass aufgrund der zusätzlichen Pro81Ser-Mutation in der pVHL- $\beta$ -Domäne *in vivo* tatsächlich eine andere Situation vorliegen könnte. Eventuell ist die kosegregierende Pro81Ser-Mutation in Kombination mit der Leu188Val-Mutation in der Lage, die pVHL-Elongin C-Interaktion doch zu beeinflussen oder zu schwächen, zumal beide Mutationen aufgrund der räumlichen Struktur des pVHL benachbart zueinander liegen (Stebbins *et al.*, 1999).

In Proteinstrukturen wird Prolin mit der Ausbildung „starrer Schleifen“ (*rigid kinks*) in Verbindung gebracht, weshalb sich der Austausch von Prolin gegen Serin beträchtlich auf die native pVHL-Struktur auswirken könnte. Prolin ist eine neutrale Aminosäure, deren Ringstruktur einen großen Einfluss auf die dreidimensionale Proteinstruktur hat. Serin hingegen ist eine ungeladene Aminosäure mit einer polaren Hydroxylgruppe. Über diese Hydroxylgruppe könnte die Bildung von Wasserstoffbrücken mit anderen polaren Aminosäuren im Protein begünstigt werden. Ein Zusammenspiel der kosegregierenden Mutationen erscheint aufgrund der Röntgenstrukturdaten des ternären VCB-Komplexes sehr wahrscheinlich. Da an der Interaktion zwischen pVHL und Elongin C stellenweise beide pVHL-Domänen beteiligt sind ( $\alpha$ - $\beta$ -Interphase) (Stebbins *et al.*, 1999), ergibt sich durch die

Kombination der beiden VHL2C-assoziierten Mutationen in dieser sensiblen Region möglicherweise ein synergistischer, funktionsmodulierender Effekt auf das pVHL.

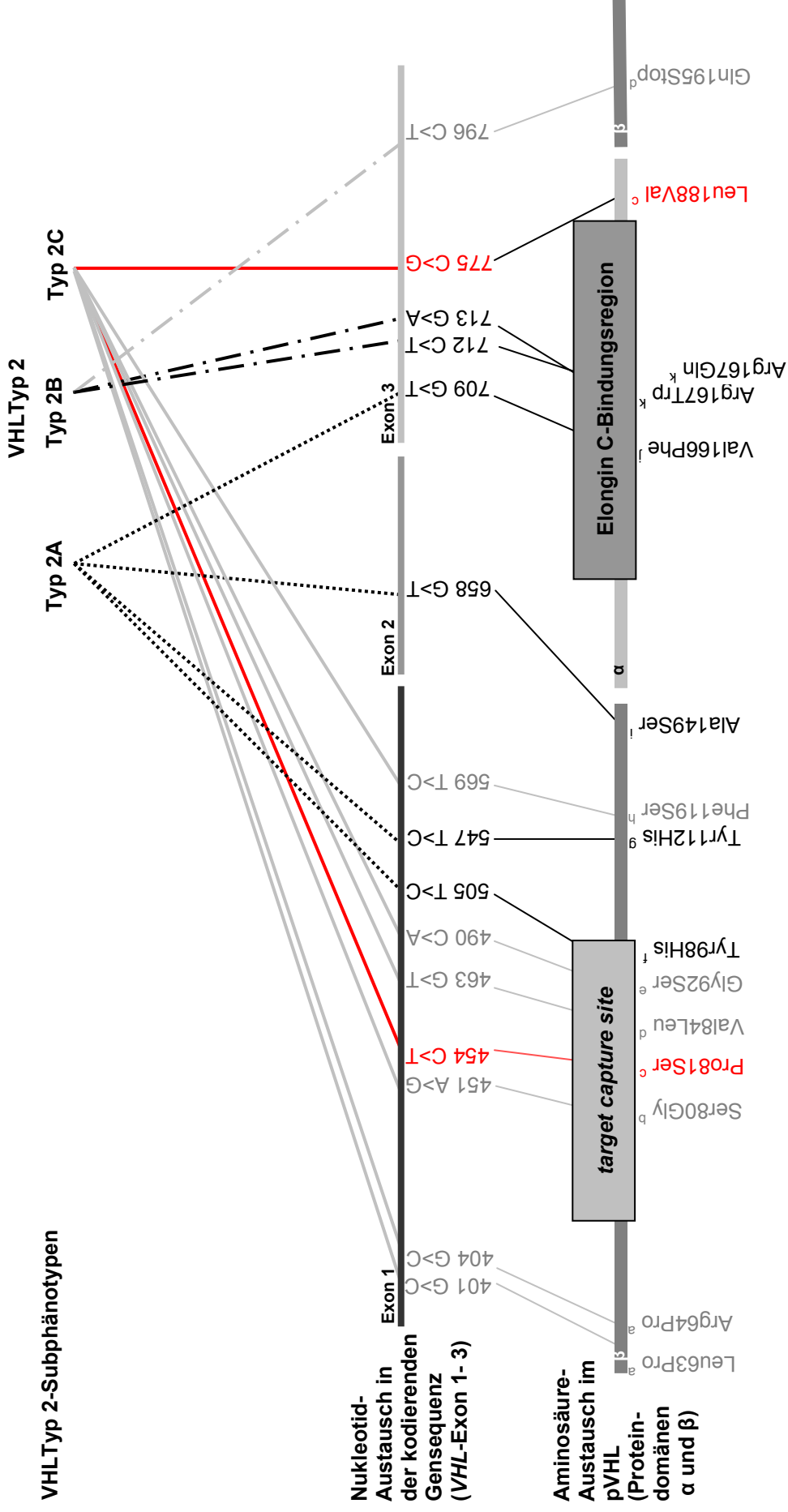
Es ist unklar, weshalb sich diese beiden kosegregierenden Mutationen ausschließlich auf chromaffine Zellen der Nebenniere und extraadrenale Paraganglien auswirken. Neben einer modulierenden Wirkung auf die Elongin C-Bindung über die Beeinflussung der  $\alpha$ - $\beta$ -Interphase könnte sich der Einfluss der Pro81Ser Mutation aber auch auf die *target capture site* (Aminosäuren 78-98) in der  $\beta$ -Domäne des pVHL auswirken. Dies erscheint möglich, da in dieser speziellen Region (und relativ dicht daneben) weitere Mutationen identifiziert wurden, die ebenfalls mit einem VHL2C-Phänotyp assoziiert werden. Dazu gehören die Mutationen Leu63Pro und Arg64Pro (van der Harst *et al.*, 1998), Ser80Gly (Woodward *et al.*, 1997), Val84Leu<sup>1</sup> (Crossey *et al.*, 1994), Gly92Ser (Glavac *et al.*, 1996) und Phe119Ser (Eng *et al.*, 1995) (Abb. 24). In *in vitro* Versuchen konnte jedoch, wie im Fall der Leu188Val-Mutation, kein Einfluss der VHL2C-assoziierten, singulär auftretenden Mutationen Ser80Gly, Val84Leu auf die HIF- $\alpha$ -Regulation festgestellt werden (Clifford *et al.*, 2001; Hoffman *et al.*, 2001), was jedoch der Hypothese einer wechselseitigen Beeinflussung der beiden kosegregierenden Mutationen Pro81Ser und Leu188Val nicht widerspricht.

Ähnliche Überlegungen können am Beispiel des Fibronektins, einem weiteren pVHL-Bindungspartner, angestellt werden. Während ein Leu188Gln-Austausch *in vitro* zum Verlust der Interaktion zwischen Fibronektin und pVHL führte, konnte dies für die VHL2C-assoziierte Leu188Val Mutation nicht beobachtet werden (Clifford *et al.*, 2001). Hoffmann *et al.* (2001) stellten dagegen *in vitro* eine reduzierte Fibronektin-Bindungs Kapazität im Zusammenhang mit den VHL2C-assoziierten, singulären Mutationen Arg64Pro, Val84Leu, Phe119Ser und Leu188Val fest. Für die Leu188Val-Mutation konnte zusätzlich eine defekte Synthese der Fibronektinmatrix gezeigt werden (Hoffman *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Beobachtungen kann Fibronektin zwar direkt an das pVHL binden, ob dieses allerdings eine Rolle bei der Eliminierung falsch gefalteter oder nicht korrekt prozessierter Fibronektin-Moleküle spielt, ist unklar. Ein solcher Zusammenhang scheint möglich, da in Tumoren häufig eine degenerierte Fibronektin-Matrix beobachtet wurde (Labat-Robert, 2002). Auch in diesem Fall muss jedoch zunächst der Effekt beider Mutationen in Kombination geklärt werden.

---

<sup>1</sup> diese Mutation wurde im Rahmen dieser Arbeit auch bei einem MENII-Verdachtspatienten mit familiär auftretenden Phäochromozytomen und zwei seiner Nachkommen identifiziert (3.1)





**Abbildung 24:** VHL Typ 2-Keimbahnmutationen und ihre Positionen in den drei Exons des Tumorsuppressorgens *VHL* (mittlerer Teil) sowie ihre Auswirkung auf die beiden Proteindomänen α und β des VHL-Proteins (pVHL) (unten). Gezeigt wird auch ihre Zuordnung zu den daraus resultierenden klinischen Subtypen VHL2A, VHL2B und VHL2C (oben). Relevante Zuordnungen werden mit schwarzen Linien, weniger relevante Zuordnungen mit grauen Linien angezeigt. VHL2A-Mutationen können in allen drei Exons vorkommen (gepunktete Linien) und sowohl die α- als auch β-Domäne des pVHL betreffen. Der Phänotyp VHL2B ist dagegen hauptsächlich mit den singulären *hot spot*-Mutationen 712 C>T und 713 G>A in Exon 3 assoziiert, die in dieser Arbeit identifizierten *VHL*-Doppelmutation (rot) assoziiert. Die beiden Mutationen liegen einmal in Exon 1 und einmal in Exon 3 und betreffen sowohl die *target capture site* in der β-Domäne des pVHL als auch die α-Domäne des pVHL. In weiteren Fällen ist der VHL2C-Phänotyp mit singulären Exon 1-Mutationen assoziiert (durchgezogene Linien), die die β-Domäne des pVHL und teilweise auch die *target capture site* betreffen. <sup>a</sup> van der Harst *et al.* 1998, <sup>b</sup> Woodward *et al.* 1997, <sup>c</sup> Weirich *et al.* 2002, <sup>d</sup> Crossey *et al.* 1994, <sup>e</sup> Glavac *et al.* 1996, <sup>f</sup> Brauch *et al.* 1995, <sup>g</sup> Chen *et al.* 1995, <sup>h</sup> Eng *et al.* 1995, <sup>i</sup> Atuk *et al.* 1998, <sup>j</sup> Gross *et al.* 1996, <sup>k</sup> Stolle *et al.* 1998, Klein *et al.* 2001 und Chen *et al.* 1995.

Die *in vitro*-Untersuchungen zur möglichen Modulation von pVHL-Funktionen durch *VHL*-Mutationen wurden an *VHL*<sup>-/-</sup>-RCC-Zellen durchgeführt, ein entsprechendes Phäochromozytom-Zellkulturmodell stand bislang nicht zur Verfügung. Möglicherweise sind daher die an RCC-Zellen gewonnenen Erkenntnisse nicht repräsentativ für die Tumorsuppression in chromaffinen Geweben. Zwar konnte die Leu188Val-Keimbahnmutation in chromaffinen Geweben mit der Entstehung von Phäochromozytomen beim Menschen assoziiert werden, jedoch wirkt das mutierte pVHL in transfizierten *VHL*<sup>-/-</sup>-RCC-Zellen weiterhin tumorsupprimierend in der Nacktmaus (Hoffman *et al.*, 2001). Die Entstehung von Phäochromozytomen könnte daher möglicherweise auf einem *gain of function* anstatt eines *loss of function* beruhen, d.h., eine *VHL*-Mutation bewirkt nicht den Verlust einer pVHL-Funktion sondern das Hinzukommen einer neuen Funktion. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass bis auf einzelne Ausnahmen alle Phäochromozytom-assoziierten *VHL*-Keimbahnmutationen *missense*-Mutationen sind (Zbar *et al.*, 1996), die in der Regel keinen kompletten Funktionsverlust des pVHL zur Folge haben.

Der Befund einer Doppelmutation beim VHL2C-Phänotyp unterstreicht die mögliche Bedeutung einzelner *VHL*-Keimbahnmutationen für die Gewebespezifität. Zusätzliche Unterstützung gewinnt diese Vermutung durch andere Arbeiten, in denen die phänotypischen Auswirkungen der singulären Pro81Ser-Mutation beschrieben wurden (Glavac *et al.*, 1996; Hes *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2000). Anders als im Fall der Doppelmutation verursacht die singuläre Pro81Ser-Keimbahnmutation sowohl ZNS-Tumoren als auch RCC und Phäochromozytome, ist jedoch insgesamt eher mit einem niedrig penetranten Krankheitsbild assoziiert (Weirich *et al.*, 2002), was ihren möglichen modulierenden Charakter in der Tumorgenese unterstreicht.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Befund der kosegregierenden *VHL*-Keimbahnmutationen Pro81Ser und Leu188Val neue Perspektiven im Rahmen der Aufklärung gewebespezifischer pVHL-Funktionen eröffnet. In künftigen Untersuchungen sollten daher die funktionellen Effekte der beiden Mutationen, einzeln und in Kombination, untersucht werden. Die hierfür erforderlichen Plasmid-Konstrukte wurden bereits in dieser Arbeit generiert. Eine der damit verbundenen Zielsetzungen ist die Aufklärung spezifischer *downstream*-Effekte dieser Mutationen, sowie die Identifizierung noch unbekannter pVHL-Zielmoleküle in den betroffenen (chromaffinen) Geweben. Die vorliegende Arbeit liefert dazu einen richtungsweisenden Beitrag und wird die Aufklärung spezifischer zellulärer Störungen im Rahmen der RCC-Tumorgenese fördern.

#### 4.3 Somatische *VHL*-Mutationen in Nierenzellkarzinomen von Patienten mit und ohne ehemaliger beruflicher Trichlorethylen-Exposition

Die Pro81Ser-Mutation wurde neben ihrem Vorkommen in der Keimbahn auch als somatische Mutation in Tumoren von RCC-Patienten beobachtet (Brauch *et al.*, 1999; Wiesener *et al.*, 2001) Im Rahmen dieser und anderer Arbeiten konnte ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um eine Keimbahnvariante, d.h. um einen Polymorphismus handelt. Auffallenderweise trat diese Mutation häufig bei RCC-Patienten mit einer ehemaligen beruflichen Hochdosis- und Langzeit-Exposition gegenüber dem Lösemittel Trichlorethylen (TRI) auf.

Seit den 1980er Jahren werden für die Zunahme der Inzidenzrate von sporadischen RCC in den westlichen Industrieländern neben Risikofaktoren wie Rauchen, hoher Body-Mass-Index, hoher Blutdruck und seine medikamentöse Behandlung, die Zugehörigkeit zu bestimmten Bevölkerungsgruppen (afro-amerikanische Bevölkerung in den USA) auch berufliche Faktoren diskutiert (Chow *et al.*, 2000). Letztere beinhalten die Exposition gegenüber Schwermetallen und Lösemitteln (Pesch *et al.*, 2000b). In diesem Teil der Arbeit wurde daher der Frage nachgegangen, ob TRI, das im Rahmen beruflicher Expositionen eine Rolle spielt, einen Einfluss auf die Art und Häufigkeit somatischer *VHL*-Mutationsereignisse und damit auf die RCC-Inzidenz ausübt. Dafür wurden zwei RCC-Patientengruppen miteinander verglichen, die bereits im Rahmen einer epidemiologischen Fall-Kontroll-Studie (Vamvakas *et al.*, 1998) auf ein mögliches TRI-assoziiertes RCC-Risiko voruntersucht worden waren. Beide Patientengruppen stammen aus einer Industrieregion in Nordrhein-Westfalen (Arnsberg, Kreis Sauerland), die historisch eine hohe Dichte an metallverarbeitenden Betrieben aufweist, in denen TRI bis zu Beginn der 1980er Jahre v.a. zu Reinigungszwecken eingesetzt wurde. Hierbei waren die Arbeiter häufig sowohl hohen als auch TRI-Spitzenexpositionen ausgesetzt (Brüning *et al.*, 2000). Nach der ersten Beobachtung eines erhöhten RCC-Risikos bei TRI-exponierten Arbeitern (Henschler *et al.*, 1995) konnte ein möglicher Zusammenhang durch die Ergebnisse einer Fall-Kontroll-Studie untermauert werden (Vamvakas *et al.*, 1998). Diese beiden Studien sind jedoch aufgrund von Mängeln bei der Patienten- und Kontrollrekrutierung mit massiver Kritik belegt worden (Cherrie *et al.*, 2001; Green *et al.*, 1999; Mandel, 2001; Vamvakas *et al.*, 2000; Vamvakas *et al.*, 2001a; Vamvakas *et al.*, 2001b). Dagegen konnten inzwischen auch weitere große epidemiologische Fall-Kontroll-Studien ein TRI-assoziiertes RCC-Risiko bestätigen (Dosemeci *et al.*, 1999; Mandel *et al.*, 1995; Pesch *et al.*, 2000a). Seitdem Mitte der 1990er Jahre der Zusammenhang

zwischen somatischen *VHL*-Mutationen und sporadischen RCC aufgeklärt worden war (Brauch *et al.*, 2000; Gnarr *et al.*, 1994), sollten nun auch vergleichende *VHL*-Mutationsanalysen in RCC-Geweben TRI-exponierter und nicht TRI-exponierter Patienten einen Beitrag zur Aufklärung des Einflusses eines Umweltkarzinogens auf das RCC-Risiko leisten. In ersten molekulargenetischen Untersuchungen konnte so bei Arbeitern mit hoher und lang andauernder TRI-Exposition bereits tatsächlich ein charakteristisches *VHL*-Mutationsspektrum ermittelt werden (Brauch *et al.*, 1999). Die Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen einer TRI-Exposition und der Entstehung eines RCC-assoziierten somatischen *VHL*-Defekts erforderte jedoch weitere *VHL*-Mutationsanalysen in den Tumorgeweben von RCC-Patienten mit und ohne TRI-Exposition. Diese Untersuchungen waren jedoch nur retrospektiv, d.h. an formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben möglich, was eine Anpassung der *VHL*-Analysemethode an die mit diesem Gewebematerial verbundenen analytischen Schwierigkeiten erforderte.

Es ist hinreichend bekannt, dass sich DNA aus archivierten Geweben schlechter mittels PCR amplifizieren lässt als DNA aus Blutproben oder Frischgeweben. Die Gründe hierfür liegen zum einen in der sauren Hydrolyse durch Formalin, das zur Fixierung der Gewebe verwendet wird, was zur Depurinierung und somit zur Fragmentierung der hochmolekularen DNA führt. Darüber hinaus kommt es während des Fixierungsprozesses zur Ausbildung von Quervernetzungen (*crosslinking*) zwischen den Proteinen (Histone) und Nukleinsäuren (DNA) (Chalkley *et al.*, 1975; Wiegand *et al.*, 1996).

Die DNA-Fragmentierung konnte in den letzten Jahren durch Verwendung von phosphatgepuffertem Formalin bzw. alternativen Fixierungsreagenzien deutlich reduziert werden (Wiedorn *et al.*, 2002). Dies wirkt sich seit etwa zehn Jahren positiv auf die molekulargenetischen Analysen von archivierten Gewebeproben aus. Gewebe, die vor dieser Zeit fixiert und eingebettet wurden, sind jedoch auch weiterhin den geschilderten Einschränkungen bei der Mutationsanalyse unterworfen. Diese Nachteile mussten teilweise auch in der hier vorliegenden Arbeit in Kauf genommen werden. Nachdem Brauch *et al.* (1999) bereits bei TRI-exponierten Patienten ein spezifisches *VHL*-Mutationsmuster nachweisen konnten, sollte nun im Rahmen dieser Studie eine RCC-Patientengruppe ohne TRI-Exposition mit der bereits analysierten, TRI-exponierten Patientengruppe aus derselben Studienregion verglichen werden. Dabei wurden die Tumorgewebe der Studienteilnehmer der Fall-Kontroll-Studie von Vamvakas *et al.* (1998) untersucht, deren RCC in den Jahren zwischen 1987 und 1992 diagnostiziert worden waren. Während die Gewebeproben der TRI-

exponierten Patienten bereits früher aus den entsprechenden Pathologien rekrutiert und in der Studie von Brauch *et al.* (1999) analysiert werden konnten, mussten die Gewebe der nicht TRI-exponierten Patienten neu rekrutiert werden, da ihnen zuvor aufgrund einer fehlenden TRI-Belastung keine weitere Beachtung geschenkt worden war.

Wie erwartet war die DNA-Qualität dieser Gewebeblöcke stark reduziert und entsprechend problematisch amplifizier- und analysierbar. Dies traf insbesondere auf die Amplifikation von *VHL*-Sequenzen zu, die länger als 230 bp waren. Die PCR-Ausbeute konnte zum Teil jedoch durch individuelle Optimierung der PCR-Bedingungen an die jeweiligen Ansprüche der DNA-Proben deutlich gesteigert werden. Modifikationen umfassten in der Regel Änderungen der Annealing-Temperatur, der PCR-Pufferzusammensetzung einschließlich der verwendeten Polymerase und des Zusatzes von *enhancer*-Substanzen und eine Erhöhung der Konzentration der eingesetzten DNA. Auf diese Weise konnten insgesamt 72% der zu erwartenden PCR-Produkte analysiert werden.

Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, wurden bei der Auswertung der Sequenzierungen stringente Kriterien für die Bewertung einer Mutation implementiert. Diese basierten zum einen auf einer Mindestpeakhöhe des Mutationspeaks von 30% im Vergleich zum Wildtyppeak im Sequenzierchromatogramm und zum anderen auf der Sequenzierung in beide Richtungen sowie der Wiederholung der PCR und Sequenzierung im Falle eines nicht eindeutigen Ergebnisses.

Obwohl diese Praxis allgemeinen wissenschaftlichen Standardkriterien entspricht, könnte darin der Grund für die auffallend niedrige *VHL*-Mutationshäufigkeit von 10% im nicht TRI-exponierten Patientenkollektiv liegen. Aufgrund einer Nichtübereinstimmung mit den Mutationskriterien wurden die in diesem Kollektiv zunächst identifizierten Mutationen bei 10 der 21 Patienten (48%) als Artefakte gewertet. Geht man von einer zu erwartenden *VHL*-Mutationshäufigkeit von mindestens 44% beim sporadischen RCC aus (Brauch *et al.*, 2000), erscheint die Mutationsrate von 10% im nicht TRI-exponierten Patientenkollektiv zu niedrig. Eine mögliche Erklärung könnte die schlechte Amplifizierbarkeit der GC-reichen *VHL*-Exons 1 und 3 sei, da das Exon 1 bei 10% und das Exon 3 sogar bei 81% der Patienten nicht amplifiziert werden konnten. Berücksichtigt man jedoch eine zu erwartende Mutationshäufigkeit von 27% im Exon 1 und 20% im Exon 3 (Brauch *et al.*, 2000), so kann diese Diskrepanz nicht allein durch die mangelhafte Amplifizierbarkeit erklärt werden. Auch von epidemiologischer Seite bestehen keine Gründe für diese niedrige *VHL*-Mutationshäufigkeit im Tumorgewebe nicht TRI-exponierter RCC-Patienten. Daher kann vermutet werden, dass einige der als Artefakte eingeschätzten *VHL*-Alterationen reale

Mutationen waren. Diese Vermutung wird durch die Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen gestützt, die eine nicht konsistente Amplifizierung von DNA-Proben aus archivierten Geweben einem sogenannten *template*-Disequilibrium zuschrieben (Williams *et al.*, 1999), d.h. einer verhältnismäßig geringen Menge an intakten *template*-DNA-Strängen stehen unterschiedliche Mengen an fragmenierten oder fehlerhaft amplifizierten DNA-Strängen gegenüber. Diese qualitativen und quantitativen *template*-Unterschiede kamen insbesondere bei niedrigen DNA-Konzentrationen zum Tragen und wurden im Gegensatz dazu bei der Amplifikation von Blut- und Frischgewebe-DNA nicht beobachtet.

Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die somatische *VHL*-Mutationsfrequenz von 10% bei nicht TRI-exponierten Patienten einen minimalen Wert darstellt und die tatsächliche Mutationshäufigkeit wahrscheinlich deutlich höher liegt. Damit ist zwar ein Vergleich der Mutationsspektren zwischen TRI-exponierten und nicht TRI-exponierten Patienten nur sehr eingeschränkt möglich, dennoch zeigen die gewonnenen Befunde bei den nicht exponierten Patienten keinerlei Hinweise auf eine TRI-assoziierte 454 C>T-Mutation (Pro81Ser). Demnach stellt diese Mutation zwar bei TRI-exponierten nicht aber bei nicht TRI-exponierten RCC-Patienten einen Schlüsselbefund dar.

Um die Rolle dieser Mutation im Hinblick auf eine vorliegende TRI-Exposition und bei der RCC-Tumorgenese besser zu verstehen, sollen hier zunächst die mit dieser Mutation assoziierten unterschiedlichen phänotypischen Aspekte diskutiert werden. Tritt die 454 C>T-Mutation (Pro81Ser) als solitäre *VHL*-Mutation in der Keimbahn auf, so ist sie häufig mit einer niedrig-penetranten Ausprägung der *VHL*-Erkrankung (mit ZNS-Tumoren, RCC und Phäochromozytome) assoziiert (Glavac *et al.*, 1996; Hes *et al.*, 2000; Weirich *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2000). Wie im ersten Teil der Arbeit beschrieben, kann sie auch in Kombination mit einer weiteren *VHL*-Keimbahnmutation auftreten (*VHL2C*) und dabei einen gewebespezifischen Effekt auf chromaffine Gewebe zeigen (Weirich *et al.*, 2002).

Diese spezielle Situation ähnelt der multipler somatischer *VHL*-Mutationen in den RCC-Geweben TRI-exponierter Patienten. Dort kommt die 454 C>T-Mutation (Pro81Ser) auffallend häufig in Kombination mit noch weiteren *VHL*-Mutationen vor und tritt auch im tumorbenachbarten Normalgewebe auf (Brauch *et al.*, 1999). Bei nicht TRI-exponierten Patienten und bei über 200 weiteren RCC-Patienten mit somatischen *VHL*-Mutationen im Tumor, bei denen keine Umweltbelastung bekannt war (Tab. 7), wurde sie hingegen nicht beobachtet.

Das solitäre Auftreten der 454 C>T-Mutation (Pro81Ser) in der Keimbahn von VHL-Patienten, verbunden mit einer niedrigen Tumor-Penetranz sowie ihr gelegentliches Vorkommen im Normalgewebe sporadischer RCC, ohne morphologische Konsequenzen, spricht für eine niedrige Tumorigenität dieser Mutation. Das gemeinsame Auftreten mit weiteren, zum Teil multiplen *VHL*-Mutationen, unterstreicht diesen Charakter. Betrachtet man ihre Häufigkeit in den RCC TRI-exponierter Patienten, so kann ihr eine Rolle als Marker für eine TRI-Exposition zugeschrieben werden.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang darüber hinaus der Nachweis eines weiteren unabhängigen Unterschieds zwischen TRI-exponierten und nicht TRI-exponierten RCC-Patienten. Der Vergleich des Alters bei der Diagnose zeigte, dass die Tumoren der exponierten Patienten durchschnittlich acht Jahre früher diagnostiziert wurden als die der nicht exponierten Patienten. Eine ähnliche Verschiebung hin zu einem früheren RCC-Erkrankungsalter wurde bereits für Genträger der erblichen chromosomalen 3;8-Translokation beschrieben (Cohen *et al.*, 1979). Da RCC überwiegend bei älteren Personen im Alter von durchschnittlich 60 bis 65 Jahren auftreten (Moyad, 2001), unterstützt die Beobachtung des signifikant niedrigeren Diagnosealters die tumorigene Wirkung von TRI. Auch für Brustkrebs und Non-Hodgkin-Lymphome wurde kürzlich ein früheres Erkrankungsalter im Zusammenhang mit Lösemittel-Expositionen beschrieben (Hansen, 1999; Rego *et al.*, 2002).

Ebenso ergaben sich für einige Patienten des ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektivs der neuen Fall-Kontroll-Studie neben Hinweisen aus der epidemiologischen Auswertung (Brüning *et al.*, 2003) auch anhand der bisher identifizierten *VHL*-Mutationscharakteristika erste Hinweise auf eine mögliche ehemalige berufliche TRI-Exposition. In Übereinstimmung mit den *VHL*-Mutationsdaten von RCC-Patienten ohne bekannte Exposition (Tab. 7) wurden bei 39% der untersuchten Patienten *VHL*-Mutationen im Tumorgewebe identifiziert (Brauch *et al.*, 2000; Foster *et al.*, 1994; Gnarra *et al.*, 1994; Kenck *et al.*, 1996; Shuin *et al.*, 1994; Whaley *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurden wie bei den TRI-exponierten Patienten multiple *VHL*-Mutationen im Tumorgewebe von drei Patienten sowie *VHL*-Mutationen in Normalgeweben von vier Patienten beobachtet. Darunter befand sich interessanterweise eine 454 C>T-Mutation (Pro81Ser) in Kombination mit einer weiteren *VHL*-Mutation im Normalgewebe sowie vier *VHL*-Mutationen im Tumorgewebe.

Während sich die Häufigkeiten der verschiedenen Mutationstypen nicht merklich von denen anderer Kollektive unterschieden, fällt jedoch der hohe Anteil von 37% C>T- oder G>A-

Transitionen auf, die zu 40% in Normalgeweben und zu 60% in Tumorgeweben nachgewiesen wurden.

C>T-Mutationen können auf die spontane Desaminierung von 5-Methylcytosin in CpG-Sequenzen (Duncan *et al.*, 1980) und G>A Mutationen auf die Bildung nicht sperriger DNA-Addukte von O<sup>6</sup>-Alkylguanin zurückgeführt werden (Inga *et al.*, 1997). In den meisten Fällen (70%) waren diese Transitionen stumm, d.h. mit ihnen war kein Aminosäureaustausch verbunden. Obwohl auch bei dem früher untersuchten TRI-exponierten Patientenkollektiv häufig C>T- und G>A-Transitionen beobachtet wurden (Brauch *et al.* 1999 und Tab. 7), fällt hier doch der auffallend hohe Anteil an stummen Alterationen auf.

Es kann vorläufig festgehalten werden, dass in diesem Patientenkollektiv einige typische RCC-Mutationscharakteristika, wie sie zuvor bei TRI-exponierten Patienten beobachtet wurden, identifiziert werden konnten. Ob und wie sich diese jedoch in Übereinstimmung mit den 25 TRI-exponierten Patienten der epidemiologischen Arbeit von Brüning *et al.* (2003) bringen lassen, wird erst die kombinierte Analyse von epidemiologischen und molekulargenetischen Befunden zeigen.

Abschließend soll noch einmal die Problematik des Mutationsnachweises in DNA aus formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben aufgegriffen und diskutiert werden, da sie die Bedeutung dieser Untersuchungen möglicherweise einschränkt. Inzwischen wird vermutet, dass viele Einträge in Mutationsdatenbanken, die auf Untersuchungen an Paraffingeweben zurückzuführen sind, auf Artefakten beruhen (Williams *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1998). Der Anteil falsch bewerteter *p53*-Mutationen wird beispielsweise auf rund 38% geschätzt (Williams *et al.*, 1999). So konnten in Paraffingewebe identifizierte *BRCA1*-Keimbahnmutationen nicht immer im Frischgewebe bestätigt werden (Wong *et al.*, 1998). Selbst LOH- und MSI-Ergebnisse von Paraffingeweben waren nicht immer reproduzierbar (Sieben *et al.*, 2000). Interessanterweise waren die meisten der nicht reproduzierbaren Mutationen C>T- oder G>A-Transitionen. Darüber hinaus war rund ein Drittel davon stumm (Williams *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 1998).

Eine Erklärung für die häufige Beobachtung nicht reproduzierbarer Mutationen in DNA aus archivierten Geweben könnte das sogenannte *DNA-jumping* während der PCR sein. Ist die *template*-DNA stark fragmentiert, so kann die *Taq*-DNA-Polymerase am Ende eines durch Fragmentierung verkürzten *template*-Moleküls gemäß der A-Regel ein Adenosin einbauen



und anschließend zu einem längeren *template*-Molekül „springen“, an dem sie die Extension fortsetzt. Auf diese Weise wird eine künstliche Mutation generiert und amplifiziert.

In Anerkennung dieser kritischen Bewertungen und mit Hinweis auf die in dieser Arbeit stringent angewandten Mutationskriterien soll abschließend darauf hingewiesen werden, dass die meisten der in der aktuellen Fall-Kontroll-Studie gewonnenen Mutationsergebnisse, einschließlich der mit einer TRI-Exposition in Verbindung gebrachten 454 C>T-Mutation (Pro81Ser) in unabhängigen Experimenten reproduziert wurden.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass *VHL*-Mutationsanalysen sowohl klinisch- als auch grundlagenforschungsrelevante Genotyp-Phänotyp-Korrelationen aufzeigen können, die sich schon heute in Form einer verbesserten Diagnose und Vorsorge des VHL-Syndroms auswirken. Insbesondere die Aufklärung der VHL2C-Genotyp-Phänotyp-Beziehung wird die Identifizierung neuer pVHL-Zielmoleküle vorantreiben und die Aufklärung spezifischer zellulärer Folgeeffekte ermöglichen und so Einfluss auf die Entwicklung verbesserter Antitumor-Therapeutika nehmen.

Anders als bei der erblichen VHL-Erkrankung lassen sich derzeit aus den molekularen Befunden beim sporadischen RCC keine diagnostischen und therapeutischen Konsequenzen ableiten. Hier dienen die molekularen Untersuchungen der Aufdeckung von Umweltrisiken als Ursache für eine erhöhte RCC-Inzidenz und schaffen somit die Voraussetzungen für eine zukünftig wirksame Nierenkrebsprävention.

## 5 Zusammenfassung

Das von Hippel-Lindau-Tumorsuppressorgen (*VHL*) ist ursächlich an der Entstehung der erblichen von Hippel-Lindau-Erkrankung (VHL), einem Multi-Tumor-Syndrom beteiligt. Mutationen in diesem Gen können die Funktion des Genprodukts (pVHL) modulieren, dessen Rolle beim kontrollierten Proteinabbau im Proteasom am besten erforscht ist. Für die Etablierung von aussagefähigen Genotyp-Phänotyp-Korrelationen sind zunehmend moderne Verfahren zur kostengünstigen, schnellen und verlässlichen *VHL*-Mutationsdetektion in Blut-DNA gefragt, wie z.B. DHPLC- und Sequenzieranalysen. Aus diesem Grund wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit eine PCR- und DHPLC-basierte Nachweismethode für 43 bekannte *VHL*-Keimbahnmutationen etabliert. Diese Methode wurde anschließend für den Nachweis von Mutationen bei VHL-Verdachtspatienten angewandt. In drei weiteren Familien konnten so *VHL*-Mutationsträger ermittelt werden, die zuvor einer SSCP-Detektion entgangen waren. Eine Erfahrung dieser Arbeit war, dass sich die DHPLC-Methode nur zur Bestätigung von familienspezifischen Keimbahnmutationen im Rahmen von VHL-Familienanalysen eignet. Die erstmalige Identifizierung einer *VHL*-Mutation bei Probanden aus VHL-Familien erfordert jedoch immer die Sequenzierung des gesamten Gens.

Im Rahmen der Aufklärung der komplexen Genotyp-Phänotyp-Zusammenhänge beim VHL-Syndrom konnten zwei kosegregierende *VHL*-Mutationen, 454 C>T (Pro81Ser) und 775 C>G (Leu188Val), dem VHL2C-Phänotyp zugeordnet werden. Zunächst war davon ausgegangen worden, dass dieser minimale VHL-Phänotyp durch die Leu188Val-Mutation in der  $\alpha$ -Domäne des pVHL hervorgerufen wird und so die Interaktion mit Elongin C stört. In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass auch die Störung der pVHL-*target capture site* in der  $\beta$ -Domäne durch die Pro81Ser Mutation mit der Ausprägung dieses Phänotyps assoziiert ist. Diese Genotyp-Phänotyp-Korrelation lieferte somit neue Einblicke in mögliche funktionelle Störungen des kontrollierten Proteinabbaus im Rahmen der VHL-Tumorgenese. Für die weiterführende zellbiologische Erforschung der Folgeeffekte dieser *VHL*-Doppelmutation wurden Plasmidkonstrukte, einzeln und in Kombination, generiert.

Die Pro81Ser-Mutation wurde als somatische Mutation auch im Tumorgewebe von Nierenzellkarzinom (RCC)-Patienten beobachtet. Schon früher war ausgeschlossen worden, dass es sich dabei um eine Keimbahnvariante, d.h. um einen Polymorphismus handelte. Auffallenderweise trat diese Mutation häufig bei Patienten mit ehemaliger beruflicher Hochdosis- und Langzeit-Trichlorethylen (TRI)-Exposition auf, einem häufig verwendeten industriellen Lösemittel. Die weitere Überprüfung eines Zusammenhangs erforderte die *VHL*-

Mutationsanalyse der Tumoren von RCC-Patienten mit und ohne TRI-Exposition. Allerdings waren diese Untersuchungen nur retrospektiv an archivierten, d.h. an formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben möglich. Für diesen Teil der vorliegenden Arbeit war eine Anpassung der *VHL*-Analysemethoden an die mit diesem Gewebematerial verbundenen analytischen Schwierigkeiten nötig. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die PCR-Amplifikation der stark fragmentierten DNA sowie die anschließende Sequenzierung der PCR-Produkte nicht immer durchführbar waren und die Bewertung der Mutationsdaten die Anwendung strikter Kriterien erforderte.

Es wurden zwei RCC-Patientenserien untersucht. Eine Serie von 21 Patienten stellte ein Vergleichskollektiv zu einer früher untersuchten Serie von Patienten mit TRI-Exposition dar, die aus der gleichen Studienregion und aus dem gleichen Diagnosezeitraum stammten. Die 21 Patienten waren jedoch nicht TRI-exponiert. Die molekularen Untersuchungen ergaben keine Anhaltspunkte für die Pro81Ser Mutation, die als charakteristisch für eine TRI-Exposition gilt. Insgesamt waren allerdings nur die Mutationsergebnisse von zwei der zwölf Tumoren mit positivem *VHL*-Erstbefund reproduzierbar. Beim Vergleich der durchschnittlichen RCC-Diagnosealter exponierter und nicht exponierter Patienten zeigte sich ein signifikanter Altersunterschied. Die Tumoren der TRI-exponierten Patienten waren rund acht Jahre früher als die der nicht exponierten Patienten diagnostiziert worden ( $p = 0,01$ ), was auf einen Einfluss von TRI bei der RCC-Tumorgenese hinweist.

Die Vermutung eines Zusammenhangs zwischen einer TRI-Exposition und charakteristischen *VHL*-Mutationen erfordert die weiterführende Überprüfung im größeren Fall-Kontroll-Ansatz. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere RCC-Tumorgewebe untersucht, von 134 Patienten, die ebenfalls aus einer TRI belasteten Industrieregion stammen. Unter ihnen befanden sich Patienten mit und ohne ehemalige berufliche TRI-Exposition, wobei der individuelle Expositionsstatus im Rahmen der molekularen Analyse nicht bekannt war. Von dieser noch laufenden Studie wird erwartet, dass die *VHL*-Mutationsergebnisse aufgrund moderner, DNA-schonender Gewebefixierungsmethoden eine aussagefähigere Beurteilung des Zusammenhangs zwischen einer TRI-Exposition und einem erhöhten RCC-Risiko erlauben werden. Bislang wurden 44 Patienten molekulargenetisch untersucht und schon zum jetzigen Zeitpunkt zeigt sich, dass dieses Patientengut sowohl die für sporadische RCC charakteristischen *VHL*-Mutationen aufweist als auch in Einzelfällen weitere Mutationscharakteristika TRI-exponierter Patienten zeigt. So wurden sowohl multiple *VHL*-Mutationen als auch die Pro81Ser-Mutation reproduzierbar nachgewiesen, was den

Zusammenhang zwischen einer TRI-Exposition, *VHL*-Mutationen und der Entstehung von sporadischen RCC weiter unterstreicht.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *VHL*-Mutationsanalysen sowohl klinisch- als auch grundlagenforschungsrelevante Genotyp-Phänotyp-Korrelationen aufzeigen können, die sich schon heute in Form einer verbesserten Diagnose und Vorsorge des VHL-Syndroms auswirken. Insbesondere die weitere Aufklärung der VHL2C-Genotyp-Phänotyp-Beziehung wird die Identifizierung spezifischer zellulärer Folgeeffekte vorantreiben und so Einfluss auf die Entwicklung verbesserter Antitumor-Therapeutika nehmen.

Anders als beim erblichen VHL-Syndrom lassen sich derzeit aus den molekularen Befunden beim sporadischen RCC keine diagnostischen und therapeutischen Konsequenzen ableiten. Hier dienen die molekularen Untersuchungen der Aufdeckung von Umweltrisiken als Ursache für eine erhöhte RCC-Inzidenz und schaffen so Möglichkeiten für eine zukünftig wirksame Nierenkrebsprävention.

## 6 Summary

Mutations in the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene (*VHL*) cause the hereditary von Hippel-Lindau multi-organ tumor syndrome (VHL) through modification of the gene product's (pVHL) functions i.e. controlled protein degradation. Genotype-phenotype correlations for the understanding of VHL tumorigenesis in various organs require reliable mutation detection in blood DNA. Therefore, this study set out to improve *VHL*-mutation detection by application of a PCR- and DHPLC-based methodology. A collection of 43 known *VHL* germline mutations were subjected to re-analysis and all but two mutations were identified. One of these could be finally detected on the basis of knowledge of its presence and continuous adjustments in methodology including a new primer design. DHPLC analysis was also applied to germline screening of 36 unrelated VHL patients with unknown germline mutation status. Mutation carriers of three families were identified and confirmed by sequencing. These mutations had previously escaped detection by SSCP. Altogether, it may be stated that DHPLC is a useful tool to confirm family specific *VHL* germline mutations in the context of carrier identification in VHL family analyses. However, first-time identification of an unknown *VHL* mutation in probands of VHL families requires sequencing of the entire *VHL* coding gene sequence.

With respect to genotype-phenotype correlations this work significantly contributed to a better understanding of the VHL2C phenotype in detecting a second cosegregating *VHL* germline mutation 454 C>T (Pro81Ser) in the pVHL  $\beta$ -domain. Former studies have linked this minimal phenotype with a 775 C>G (Leu188Val) mutation in the Elongin C binding site of the pVHL  $\alpha$ -domain. This study for the first time provided evidence for an additional effect of the pVHL target capture site during chromaffin tissue specific VHL tumorigenesis. This notion is supported by the presence of both concurrent germline mutations in all nine patients and a (yet) non-affected young child of this family as well as absence in all other family members. In the future, functional analyses for the elucidation of VHL2C tumorigenesis will be required. For this purpose, *VHL* plasmid constructs carrying the single or combined mutations have been generated.

Mutations in the *VHL* gene also play a causative role in sporadic tumorigenesis of RCC and a somatic Pro81Ser mutation was frequently found. The possibility that this genetic variation may be a polymorphism was ruled out in former analyses. Strikingly, this mutation was observed in patients with previous occupational long-term and high dose trichloroethylene (TRI) exposure, a commonly used industrial solvent. It now became important to further

explore this relationship. Thus, the second part of this study compared somatic *VHL* mutation data of 18 occupationally TRI exposed patients with those of 21 non TRI exposed patients. Both RCC patient groups were from the same geographic region and shared the same time interval of diagnosis. Due to the retrospective character of these investigations, tumor analyses could only be performed with formalin-fixed and paraffin-embedded surgical specimen. The mutation detection methodology needed therefore adjustment to the requirements of archived tissues with inherent problems of insufficient PCR amplification and sequencing analysis of the heavily fragmented DNA. To avoid false positive mutation scoring stringent mutation-calling criteria were implemented.

No signs of a TRI-associated Pro81Ser mutation were identified in the tumor tissue of the non-exposed patients. However, only two out of twelve tumors had reproducible somatic *VHL* mutations. The molecular findings of a difference between the two patient groups were matched by the discovery of a significant difference in age at diagnosis. On average TRI-exposed patients were diagnosed eight years earlier than their non-exposed counterparts ( $p = 0,01$ ), suggesting a role of TRI in their tumorigenesis.

Despite difficulties in molecular analyses it is important to follow up recent case-control studies and to further elucidate the role of TRI in renal tumorigenesis. Within the scope of this work, 44 of 134 RCC patients recruited from a heavily TRI-burdened industrial area have been analysed for somatic *VHL* mutations. This group consisted of patients with and without TRI-exposure, however, molecular investigations were carried out blinded, i.e. without knowledge of the individual TRI-exposure status. In the future a reliable estimation of a frequent and specific TRI-associated *VHL* mutation rate and risk to develop RCC may emerge. Already, in some of these patients there is evidence for a mutation pattern similar to TRI-exposed patients. In particular, a Pro81Ser mutation and multiple mutations have been identified supporting the notion of an association between TRI-exposure, somatic *VHL* mutations and the development of RCC.

In conclusion, this work provided evidence for the importance of comprehensive and reliable *VHL* mutation detection both in the germline and in somatic cells. Germline mutations together with clinical information may hold the power to provide informative genotype-phenotype correlations useful both for patients and basic research. The example of the VHL2C phenotype and its underlying concurrent germline mutations showed that further elucidation of its molecular basis will promote the search for new targets for the improvement of antitumor treatment.

Whereas germline *VHL* mutations already today are useful for diagnosis and clinical management of VHL patients, no diagnostic or therapeutic advantages exist for RCC patients carrying somatic VHL mutations. Knowledge of somatic *VHL* mutations may rather lead to a better understanding of a relationship between gene damage and environmental risks and may therefore contribute to the prevention of kidney cancer in the future.

## 7 Literatur

- Acker T., Plate K.H. (2002). A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology. *J Mol Med* 80 (9): 562-75
- Adryan B., Decker H.J., Papas T.S., Hsu T. (2000). Tracheal development and the von Hippel-Lindau tumor suppressor homolog in *Drosophila*. *Oncogene* 19 (24): 2803-11.
- Ananth S., Knebelmann B., Gruning W., Dhanabal M., Walz G., Stillman I.E., Sukhatme V.P. (1999). Transforming growth factor beta1 is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor and a critical growth factor for clear cell renal carcinoma. *Cancer Res* 59 (9): 2210-6
- Arnold N., Gross E., Schwarz-Boeger U., Pfisterer J., Jonat W., Kiechle M. (1999). A highly sensitive, fast, and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers. *Hum Mutat* 14 (4): 333-9
- Aso T., Lane W.S., Conaway J.W., Conaway R.C. (1995). Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II [see comments]. *Science* 269 (5229): 1439-43
- Aso T., Yamazaki K., Aigaki T., Kitajima S. (2000). *Drosophila* von Hippel-Lindau tumor suppressor complex possesses E3 ubiquitin ligase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 276 (1): 355-61
- Atuk N.O., Stolle C., Owen J.A., Jr., Carpenter J.T., Vance M.L. (1998). Pheochromocytoma in von Hippel-Lindau disease: clinical presentation and mutation analysis in a large, multigenerational kindred. *J Clin Endocrinol Metab* 83 (1): 117-20
- Azuma Y., Dasso M. (2000). The role of Ran in nuclear function. *Curr Opin Cell Biol* 12 (3): 302-7
- Berg W.J., Divgi C.R., Nanus D.M., Motzer R.J. (2000). Novel investigative approaches for advanced renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 27 (2): 234-9
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28 (1): 235-42
- Bernauer U., Birner G., Dekant W., Henschler D. (1996). Biotransformation of trichloroethene: dose-dependent excretion of 2,2,2-trichloro-metabolites and mercapturic acids in rats and humans after inhalation. *Arch Toxicol* 70 (6): 338-46
- Beroud C., Joly D., Gallou C., Staroz F., Orfanelli M.T., Junien C. (1998). Software and database for the analysis of mutations in the VHL gene. *Nucleic Acids Res* 26 (1): 256-8
- Blankenship C., Naglich J.G., Whaley J.M., Seizinger B., Kley N. (1999). Alternate choice of initiation codon produces a biologically active product of the von Hippel Lindau gene with tumor suppressor activity. *Oncogene* 18 (8): 1529-35
- Bradsher J.N., Jackson K.W., Conaway R.C., Conaway J.W. (1993a). RNA polymerase II transcription factor SIII. I. Identification, purification, and properties. *J Biol Chem* 268 (34): 25587-93



- Bradsher J.N., Tan S., McLaury H.J., Conaway J.W., Conaway R.C. (1993b). RNA polymerase II transcription factor SIII. II. Functional properties and role in RNA chain elongation. *J Biol Chem* 268 (34): 25594-603
- Brauch H., Kishida T., Glavac D., Chen F., Pausch F., Hofler H., Latif F., Lerman M.I., Zbar B., Neumann H.P. (1995). Von Hippel-Lindau (VHL) disease with pheochromocytoma in the Black Forest region of Germany: evidence for a founder effect. *Hum Genet* 95 (5): 551-6.
- Brauch H., Weirich G., Brieger J., Glavac D., Rodl H., Eichinger M., Feurer M., Weidt E., Puranakanittha C., Neuhaus C., 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 (7): 1942-8.
- Brauch H., Weirich G., Hornauer M.A., Storkel S., Wohl T., Brüning T. (1999). Trichloroethylene exposure and specific somatic mutations in patients with renal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 91 (10): 854-61
- Bressac B., Kew M., Wands J., Ozturk M. (1991). Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 350 (6317): 429-31
- Brieger J., Weidt E.J., Schirmacher P., Storkel S., Huber C., Decker H.J. (1999). Inverse regulation of vascular endothelial growth factor and VHL tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinomas is correlated with vascular growth: an in vivo study on 29 tumors. *J Mol Med* 77 (6): 505-10
- Bruckner J.V., Davis B.D., Blancato J.N. (1989). Metabolism, toxicity, and carcinogenicity of trichloroethylene. *Crit Rev Toxicol* 20 (1): 31-50
- Brüning T., Bolt H.M. (2000). Renal toxicity and carcinogenicity of trichloroethylene: key results, mechanisms, and controversies. *Crit Rev Toxicol* 30 (3): 253-85.
- Brüning T., Lammert M., Kempkes M., Thier R., Golka K., Bolt H.M. (1997). Influence of polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 for risk of renal cell cancer in workers with long-term high occupational exposure to trichloroethene. *Arch Toxicol* 71 (9): 596-9
- Brüning T., Mann H., Melzer H., Sundberg A.G., Bolt H.M. (1999). Pathological excretion patterns of urinary proteins in renal cell cancer patients exposed to trichloroethylene. *Occup Med (Lond)* 49 (5): 299-305
- Brüning T., Pesch B., Wiesenhutter B., Rabstein S., Lammert M., Baumuller A., Bolt H.M. (2003). Renal cell cancer risk and occupational exposure to trichloroethylene: Results of a consecutive case-control study in Arnsberg, Germany. *Am J Ind Med* 43 (3): 274-85
- Brüning T., Vamvakas S., Makropoulos V., Birner G. (1998). Acute intoxication with trichloroethene: clinical symptoms, toxicokinetics, metabolism, and development of biochemical parameters for renal damage. *Toxicol Sci* 41 (2): 157-65.
- Carmeliet P., Dor Y., Herbert J.M., Fukumura D., Brusselmans K., Dewerchin M., Neeman M., Bono F., Abramovitch R., Maxwell P., et al. (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394 (6692): 485-90

- Chalkley R., Hunter C. (1975). Histone-histone propinquity by aldehyde fixation of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (4): 1304-8
- Chan C.C., Vortmeyer A.O., Chew E.Y., Green W.R., Matteson D.M., Shen D.F., Linehan W.M., Lubensky I.A., Zhuang Z. (1999). VHL gene deletion and enhanced VEGF gene expression detected in the stromal cells of retinal angioma. *Arch Ophthalmol* 117 (5): 625-30
- Chan D.A., Sutphin P.D., Denko N.C., Giaccia A.J. (2002). Role of prolyl hydroxylation in oncogenically stabilized hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 277 (42): 40112-7
- Chen F., Kishida T., Duh F.M., Renbaum P., Orcutt M.L., Schmidt L., Zbar B. (1995a). Suppression of growth of renal carcinoma cells by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res* 55 (21): 4804-7
- Chen F., Kishida T., Yao M., Hustad T., Glavac D., Dean M., Gnarr J.R., Orcutt M.L., Duh F.M., Glenn G., et al. (1995b). Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum Mutat* 5 (1): 66-75
- Chen F., Slife L., Kishida T., Mulvihill J., Tisherman S.E., Zbar B. (1996). Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau disease: identification of a mutation associated with VHL type 2A. *J Med Genet* 33 (8): 716-7
- Cherrie J.W., Kromhout H., Semple S. (2001). The importance of reliable exposure estimates in deciding whether trichloroethylene can cause kidney cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 127 (6): 400-4
- Chow W.H., Devesa S.S., Fraumeni J.F., Jr. (2000). Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology, Second Edition*. Vogelzang N.J., Shipley W.U., Scardino P.T., Coffey D.S., Lippincott Williams & Wilkins.
- Choy Y.S., Dabora S.L., Hall F., Ramesh V., Niida Y., Franz D., Kasprzyk-Obara J., Reeve M.P., Kwiatkowski D.J. (1999). Superiority of denaturing high performance liquid chromatography over single-stranded conformation and conformation-sensitive gel electrophoresis for mutation detection in TSC2. *Ann Hum Genet* 63 (Pt 5): 383-91
- Clifford S.C., Cockman M.E., Smallwood A.C., Mole D.R., Woodward E.R., Maxwell P.H., Ratcliffe P.J., Maher E.R. (2001). Contrasting effects on HIF-1alpha regulation by disease-causing pVHL mutations correlate with patterns of tumourigenesis in von Hippel-Lindau disease. *Hum Mol Genet* 10 (10): 1029-38
- Clifford S.C., Prowse A.H., Affara N.A., Buys C.H., Maher E.R. (1998). Inactivation of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumourigenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 22 (3): 200-9
- Cockman M.E., Masson N., Mole D.R., Jaakkola P., Chang G.W., Clifford S.C., Maher E.R., Pugh C.W., Ratcliffe P.J., Maxwell P.H. (2000). Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 275 (33): 25733-41

- Cohen A.J., Li F.P., Berg S., Marchetto D.J., Tsai S., Jacobs S.C., Brown R.S. (1979). Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. *N Engl J Med* 301: 592-96
- Cohen H.T., Zhou M., Welsh A.M., Zarghamee S., Scholz H., Mukhopadhyay D., Kishida T., Zbar B., Knebelmann B., Sukhatme V.P. (1999). An important von Hippel-Lindau tumor suppressor domain mediates Sp1-binding and self-association. *Biochem Biophys Res Commun* 266 (1): 43-50.
- Conney A.H. (1982). Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res* 42 (12): 4875-917
- Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Boccia J., Casals D., Bertino J.R., Melamed M.R. (1990). Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J Histochem Cytochem* 38 (9): 1277-87
- Corless C.L., Kibel A.S., Iliopoulos O., Kaelin W.G., Jr. (1997). Immunostaining of the von Hippel-Lindau gene product in normal and neoplastic human tissues. *Hum Pathol* 28 (4): 459-64
- Cotton R.G. (1993). Current methods of mutation detection. *Mutat Res* 285 (1): 125-44
- Coughlin S.S., Hall I.J. (2002). Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of ovarian cancer: a HuGE review. *Genet Med* 4 (4): 250-7
- Crossey P.A., Richards F.M., Foster K., Green J.S., Prowse A., Latif F., Lerman M.I., Zbar B., Affara N.A., Ferguson-Smith M.A., et al. (1994). Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum Mol Genet* 3 (8): 1303-8
- Damert A., Machein M., Breier G., Fujita M.Q., Hanahan D., Risau W., Plate K.H. (1997). Up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in a rat glioma is conferred by two distinct hypoxia-driven mechanisms. *Cancer Res* 57 (17): 3860-4
- Dang C.V., Semenza G.L. (1999). Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 24 (2): 68-72
- Decker J., Brauch H. (2001). von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene. *Encyclopedic Reference of Cancer*. Schwab M., Springer Verlag Berlin Heidelberg New York: 957-963.
- Decker J., Brauch H. (2002). Nierenzellkarzinome. *Molekulare Medizin, Band 10*. Ganten D., Ruckpaul R., Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Dekant W., Koob M., Henschler D. (1990). Metabolism of trichloroethene--in vivo and in vitro evidence for activation by glutathione conjugation. *Chem Biol Interact* 73 (1): 89-101
- Dekant W., Metzler M., Henschler D. (1986). Identification of S-1,2-dichlorovinyl-N-acetyl-cysteine as a urinary metabolite of trichloroethylene: a possible explanation for its nephrocarcinogenicity in male rats. *Biochem Pharmacol* 35 (15): 2455-8.

- Delph Y. (2002). P-glycoprotein and HIV. *GMHC Treat Issues* 16 (1): 6-10
- DFG (2002). Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und biologische Arbeitsstofftoleranzwerte. Weinheim.
- Dhote R., Pellicer-Coeuret M., Thiounn N., Debre B., Vidal-Trecan G. (2000). Risk factors for adult renal cell carcinoma: a systematic review and implications for prevention. *BJU Int* 86 (1): 20-7
- Divgi C.R., Bander N.H., Scott A.M., O'Donoghue J.A., Sgouros G., Welt S., Finn R.D., Morrissey F., Capitelli P., Williams J.M., et al. (1998). Phase I/II radioimmunotherapy trial with iodine-131-labeled monoclonal antibody G250 in metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 4 (11): 2729-39
- Doehmer J., Goeptar A.R., Vermeulen N.P. (1993). Cytochromes P450 and drug resistance. *Cytotechnology* 12 (1-3): 357-66
- Dosemeci M., Cocco P., Chow W.H. (1999). Gender differences in risk of renal cell carcinoma and occupational exposures to chlorinated aliphatic hydrocarbons. *Am J Ind Med* 36 (1): 54-9
- Dreijerink K., Braga E., Kuzmin I., Geil L., Duh F.M., Angeloni D., Zbar B., Lerman M.I., Stanbridge E.J., Minna J.D., et al. (2001). The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (13): 7504-9
- Duan D.R., Humphrey J.S., Chen D.Y., Weng Y., Sukegawa J., Lee S., Gnarr J.R., Linehan W.M., Klausner R.D. (1995a). 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* 92 (14): 6459-63
- Duan D.R., Pause A., Burgess W.H., Aso T., Chen D.Y., Garrett K.P., Conaway R.C., Conaway J.W., Linehan W.M., Klausner R.D. (1995b). Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein [see comments]. *Science* 269 (5229): 1402-6
- Duncan B.K., Miller J.H. (1980). Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature* 287 (5782): 560-1
- Ellis L.A., Taylor C.F., Taylor G.R. (2000). A comparison of fluorescent SSCP and denaturing HPLC for high throughput mutation scanning. *Hum Mutat* 15 (6): 556-64
- Eng C., Crossey P.A., Mulligan L.M., Healey C.S., Houghton C., Prowse A., Chew S.L., Dahia P.L., O'Riordan J.L., Toledo S.P., et al. (1995). Mutations in the RET proto-oncogene and the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in sporadic and syndromic pheochromocytomas. *J Med Genet* 32 (12): 934-7
- Evans W.E., Relling M.V. (1999). Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 286 (5439): 487-91
- Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V., Agani F., Leung S.W., Koos R.D., Semenza G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16 (9): 4604-13

- Foster K., Prowse A., van den Berg A., Fleming S., Hulsbeek M.M., Crossey P.A., Richards F.M., Cairns P., Affara N.A., Ferguson-Smith M.A., et al. (1994). Somatic mutations of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene in non-familial clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet* 3 (12): 2169-73
- Gallou C., Longuemaux S., Delomenie C., Mejean A., Martin N., Martinet S., Palais G., Bouvier R., Droz D., Krishnamoorthy R., et al. (2001). Association of GSTT1 non-null and NAT1 slow/rapid genotypes with von Hippel-Lindau tumour suppressor gene transversions in sporadic renal cell carcinoma. *Pharmacogenetics* 11 (6): 521-35
- Gao J., Naglich J.G., Laidlaw J., Whaley J.M., Seizinger B.R., Kley N. (1995). Cloning and characterization of a mouse gene with homology to the human von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: implications for the potential organization of the human von Hippel-Lindau disease gene. *Cancer Res* 55 (4): 743-7
- Garnick M.B., Richie J.P. (1991). Renal Neoplasia. *The Kidney*. Brenner B.M., Rector (Jr.) F.C. Philadelphia, Saunders, W.B.: 1809-1827.
- Glavac D., Neumann H.P., Wittke C., Jaenig H., Masek O., Streicher T., Pausch F., Engelhardt D., Plate K.H., Hofler H., et al. (1996). Mutations in the VHL tumor suppressor gene and associated lesions in families with von Hippel-Lindau disease from central Europe. *Hum Genet* 98 (3): 271-80
- Glenn G.M., Coyke P.L., Zbar B., Linehan W.M. (1990). Von Hippel-Lindau Disease. Clinical review and molecular genetics. *Problems in Urology* 4 (2): 312-330
- Gnarra J.R., Tory K., Weng Y., Schmidt L., Wei M.H., Li H., Latif F., Liu S., Chen F., Duh F.M., et al. (1994). Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 7 (1): 85-90
- Gnarra J.R., Ward J.M., Porter F.D., Wagner J.R., Devor D.E., Grinberg A., Emmert-Buck M.R., Westphal H., Klausner R.D., Linehan W.M. (1997). Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (17): 9102-7.
- Gnarra J.R., Zhou S., Merrill M.J., Wagner J.R., Krumm A., Papavassiliou E., Oldfield E.H., Klausner R.D., Linehan W.M. (1996). Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (20): 10589-94.
- Gorospe M., Egan J.M., Zbar B., Lerman M., Geil L., Kuzmin I., Holbrook N.J. (1999). Protective function of von Hippel-Lindau protein against impaired protein processing in renal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 19 (2): 1289-300.
- Gottesman M.M., Pastan I., Ambudkar S.V. (1996). P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev* 6 (5): 610-7
- Green L.C., Lash T.L. (1999). Re: "Renal cell cancer correlated with occupational exposure to trichloroethylene". *J Cancer Res Clin Oncol* 125 (7): 430-2
- Gross D.J., Avishai N., Meiner V., Filon D., Zbar B., Abeliovich D. (1996). Familial pheochromocytoma associated with a novel mutation in the von Hippel-Lindau gene. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (1): 147-9

- Gross E., Arnold N., Goette J., Schwarz-Boeger U., Kiechle M. (1999). A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Hum Genet* 105 (1-2): 72-8
- Gross E., Arnold N., Pfeifer K., Bandick K., Kiechle M. (2000). Identification of specific BRCA1 and BRCA2 variants by DHPLC. *Hum Mutat* 16 (4): 345-53
- Hansen J. (1999). Breast cancer risk among relatively young women employed in solvent-using industries. *Am J Ind Med* 36 (1): 43-7
- Hansen J., Raaschou-Nielsen O., Christensen J.M., Johansen I., McLaughlin J.K., Lipworth L., Blot W.J., Olsen J.H. (2001). Cancer incidence among Danish workers exposed to trichloroethylene. *J Occup Environ Med* 43 (2): 133-9
- Harris A.L. (2000). von Hippel-Lindau syndrome: target for anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor therapy. *Oncologist* 5 (Suppl 1): 32-6
- Hein D.W. (2002). Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis. *Mutat Res* 506-507: 65-77
- Henschler D., Vamvakas S., Lammert M., Dekant W., Kraus B., Thomas B., Ulm K. (1995). Increased incidence of renal cell tumors in a cohort of cardboard workers exposed to trichloroethene. *Arch Toxicol* 69 (5): 291-9
- Herman J.G., Latif F., Weng Y., Lerman M.I., Zbar B., Liu S., Samid D., Duan D.S., Gnarr J.R., Linehan W.M., et al. (1994). Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (21): 9700-4
- Hershko A., Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67: 425-79
- Hes F.J., McKee S., Taphoorn M.J., Rehal P., van Der Luijt R.B., McMahon R., van Der Smagt J.J., Dow D., Zewald R.A., Whittaker J., et al. (2000). Cryptic von Hippel-Lindau disease: germline mutations in patients with haemangioblastoma only. *J Med Genet* 37 (12): 939-43
- Hoffman M.A., Ohh M., Yang H., Klco J.M., Ivan M., Kaelin W.G., Jr. (2001). von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. *Hum Mol Genet* 10 (10): 1019-27
- Hoffmeyer S., Burk O., von Richter O., Arnold H.P., Brockmoller J., Johne A., Cascorbi I., Gerloff T., Roots I., Eichelbaum M., et al. (2000). Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (7): 3473-8
- Hsu I.C., Metcalf R.A., Sun T., Welsh J.A., Wang N.J., Harris C.C. (1991). Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. *Nature* 350 (6317): 427-8
- Huang L.E., Arany Z., Livingston D.M., Bunn H.F. (1996). Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 271 (50): 32253-9

- Huang L.E., Gu J., Schau M., Bunn H.F. (1998). Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (14): 7987-92.
- Huang L.E., Pete E.A., Schau M., Milligan J., Gu J. (2002). Leu-574 of HIF-1alpha is essential for the von Hippel-Lindau (VHL)-mediated degradation pathway. *J Biol Chem* 277 (44): 41750-5
- IARC (1995). Trichloroethylene. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals. Lyon, International Agency for Research on Cancer. 63: 75-158.
- Iliopoulos O., Kibel A., Gray S., Kaelin W.G. (1995). Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat Med* 1 (8): 822-6.
- Iliopoulos O., Levy A.P., Jiang C., Kaelin W.G., Jr., Goldberg M.A. (1996). Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (20): 10595-9
- Iliopoulos O., Ohh M., Kaelin W.G., Jr. (1998). pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (20): 11661-6
- Inga A., Iannone R., Monti P., Molina F., Bolognesi M., Abbondandolo A., Iggo R., Fronza G. (1997). Determining mutational fingerprints at the human p53 locus with a yeast functional assay: a new tool for molecular epidemiology. *Oncogene* 14 (11): 1307-13
- Ivanov S., Liao S.Y., Ivanova A., Danilkovitch-Miagkova A., Tarasova N., Weirich G., Merrill M.J., Proescholdt M.A., Oldfield E.H., Lee J., et al. (2001). Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol* 158 (3): 905-19
- Ivanov S.V., Kuzmin I., Wei M.H., Pack S., Geil L., Johnson B.E., Stanbridge E.J., Lerman M.I. (1998). Down-regulation of transmembrane carbonic anhydrases in renal cell carcinoma cell lines by wild-type von Hippel-Lindau transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (21): 12596-601
- Iwai K., Yamanaka K., Kamura T., Minato N., Conaway R.C., Conaway J.W., Klausner R.D., Pause A. (1999). 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* 96 (22): 12436-41
- Iyer N.V., Kotch L.E., Agani F., Leung S.W., Laughner E., Wenger R.H., Gassmann M., Gearhart J.D., Lawler A.M., Yu A.Y., et al. (1998). Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* 12 (2): 149-62
- Jacob K., Jänike M. (1997). Ökologische Innovationen in der chemischen Industrie: Umweltentlastung ohne Staat? Eine Untersuchung und Kommentierung zu 182 Gefahrstoffen., Forschungsstelle für Umweltpolitik (FFU).
- Jacobsen J., Rasmuson T., Grankvist K., Ljungberg B. (2000). Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. *J Urol* 163 (1): 343-7

- Kallio P.J., Wilson W.J., O'Brien S., Makino Y., Poellinger L. (1999). Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem* 274 (10): 6519-25
- Kamura T., Conrad M.N., Yan Q., Conaway R.C., Conaway J.W. (1999). The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2. *Genes Dev* 13 (22): 2928-33
- Kamura T., Sato S., Iwai K., Czyzyk-Krzeska M., Conaway R.C., Conaway J.W. (2000). Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (19): 10430-5
- Kanno H., Kondo K., Ito S., Yamamoto I., Fujii S., Torigoe S., Sakai N., Hosaka M., Shuin T., Yao M. (1994). Somatic mutations of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic central nervous system hemangioblastomas. *Cancer Res* 54 (18): 4845-7
- Kenck C., Wilhelm M., Bugert P., Staehler G., Kovacs G. (1996). Mutation of the VHL gene is associated exclusively with the development of non-papillary renal cell carcinomas. *J Pathol* 179 (2): 157-61
- Kessler P.M., Vasavada S.P., Rackley R.R., Stackhouse T., Duh F.M., Latif F., Lerman M.I., Zbar B., Williams B.R. (1995). Expression of the Von Hippel-Lindau tumor suppressor gene, VHL, in human fetal kidney and during mouse embryogenesis. *Mol Med* 1 (4): 457-66
- Kibel A., Iliopoulos O., DeCaprio J.A., Kaelin W.G., Jr. (1995). Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C [see comments]. *Science* 269 (5229): 1444-6
- Kishida T., Stackhouse T.M., Chen F., Lerman M.I., Zbar B. (1995). Cellular proteins that bind the von Hippel-Lindau disease gene product: mapping of binding domains and the effect of missense mutations. *Cancer Res* 55 (20): 4544-8
- Klein B., Weirich G., Brauch H. (2001). DHPLC-based germline mutation screening in the analysis of the VHL tumor suppressor gene: usefulness and limitations. *Hum Genet* 108 (5): 376-84.
- Knebelmann B., Ananth S., Cohen H.T., Sukhatme V.P. (1998). Transforming growth factor alpha is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res* 58 (2): 226-31
- Kondo (1995). Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in Japanese VHL. Clinical Research Group for VHL in Japan. *Hum Mol Genet* 4 (12): 2233-7
- Koochekpour S., Jeffers M., Wang P.H., Gong C., Taylor G.A., Roessler L.M., Stearman R., Vasselli J.R., Stetler-Stevenson W.G., Kaelin W.G., Jr., et al. (1999). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene inhibits hepatocyte growth factor/scatter factor-induced invasion and branching morphogenesis in renal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 19 (9): 5902-12
- Krawczak M., Ball E.V., Fenton I., Stenson P.D., Abeyasinghe S., Thomas N., Cooper D.N. (2000). Human gene mutation database-a biomedical information and research resource. *Hum Mutat* 15 (1): 45-51



- Krieg M., Haas R., Brauch H., Acker T., Flamme I., Plate K.H. (2000a). Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene* 19 (48): 5435-43.
- Krieg M., Haas R., Brauch H., Acker T., Flamme I., Plate K.H. (2000b). Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function.[In Process Citation]. *Oncogene* 19 (48): 5435-43
- Krieg M., Marti H.H., Plate K.H. (1998). Coexpression of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in nervous system tumors associated with von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Blood* 92 (9): 3388-93
- Kuzmin I., Duh F.M., Latif F., Geil L., Zbar B., Lerman M.I. (1995). Identification of the promoter of the human von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Oncogene* 10 (11): 2185-94
- Labat-Robert J. (2002). Fibronectin in malignancy. *Semin Cancer Biol* 12 (3): 187-95
- Lamiell J.M., Salazar F.G., Hsia Y.E. (1989). Von Hippel-Lindau disease affecting 43 members of a single kindred. *Medicine (Baltimore)* 68 (1): 1-29
- Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409 (6822): 860-921
- Latif F., Tory K., Gnarr J., Yao M., Duh F.M., Orcutt M.L., Stackhouse T., Kuzmin I., Modi W., Geil L., et al. (1993). Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene [see comments]. *Science* 260 (5112): 1317-20
- Lee C., Kim S.J., Jeong D.G., Lee S.M., Ryu S.E. (2003). Structure of human FIH-1 reveals a unique active site pocket and interaction sites for HIF-1 and von Hippel-Lindau. *J Biol Chem* 278 (9): 7558-63
- Lee S., Neumann M., Stearman R., Stauber R., Pause A., Pavlakis G.N., Klausner R.D. (1999). Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic trafficking is required for the function of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* 19 (2): 1486-97
- Lerman M. (2001). *VHL Protein Function in Health and Disease*. Wiley, John & Sons.
- Leung S.Y., Chan A.S., Wong M.P., Yuen S.T., Fan Y.W., Chung L.P. (1998). Expression of vascular endothelial growth factor in von Hippel-Lindau syndrome-associated papillary cystadenoma of the epididymis. *Hum Pathol* 29 (11): 1322-4
- Levy A.P., Levy N.S., Goldberg M.A. (1996). Hypoxia-inducible protein binding to vascular endothelial growth factor mRNA and its modulation by the von Hippel-Lindau protein. *J Biol Chem* 271 (41): 25492-7
- Li T.H., Schmid C.W. (2001). Differential stress induction of individual Alu loci: implications for transcription and retrotransposition. *Gene* 276 (1-2): 135-41

- Liakopoulos D., Busgen T., Brychzy A., Jentsch S., Pause A. (1999). Conjugation of the ubiquitin-like protein NEDD8 to cullin-2 is linked to von Hippel-Lindau tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (10): 5510-5
- Lindau A. (1926). Studien über Kleinhirnzysten. Bau, Pathogenese und Beziehungen zur Angiomatosis retinae. *Acta Pathol Microbiol Scand* (I)
- Lisztwan J., Imbert G., Wirbelauer C., Gstaiger M., Krek W. (1999). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev* 13 (14): 1822-33
- Liu Y., Cox S.R., Morita T., Kourembanas S. (1995). Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 77 (3): 638-43
- Lonergan K.M., Iliopoulos O., Ohh M., Kamura T., Conaway R.C., Conaway J.W., Kaelin W.G., Jr. (1998). Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol Cell Biol* 18 (2): 732-41
- Longuemaux S., Delomenie C., Gallou C., Mejean A., Vincent-Viry M., Bouvier R., Droz D., Krishnamoorthy R., Galteau M.M., Junien C., et al. (1999). Candidate genetic modifiers of individual susceptibility to renal cell carcinoma: a study of polymorphic human xenobiotic-metabolizing enzymes. *Cancer Res* 59 (12): 2903-8.
- Los M., Jansen G.H., Kaelin W.G., Lips C.J., Blijham G.H., Voest E.E. (1996). Expression pattern of the von Hippel-Lindau protein in human tissues. *Lab Invest* 75 (2): 231-8
- Los M., Zeamari S., Foekens J.A., Gebbink M.F., Voest E.E. (1999). Regulation of the urokinase-type plasminogen activator system by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Cancer Res* 59 (17): 4440-5
- Lynge E., Anttila A., Hemminki K. (1997). Organic solvents and cancer. *Cancer Causes Control* 8 (3): 406-19
- Maher E.R., Iselius L., Yates J.R., Littler M., Benjamin C., Harris R., Sampson J., Williams A., Ferguson-Smith M.A., Morton N. (1991). Von Hippel-Lindau disease: a genetic study. *J Med Genet* 28 (7): 443-7
- Maher E.R., Webster A.R., Richards F.M., Green J.S., Crossey P.A., Payne S.J., Moore A.T. (1996). Phenotypic expression in von Hippel-Lindau disease: correlations with germline VHL gene mutations. *J Med Genet* 33 (4): 328-32
- Mandel J.S. (2001). Renal cell cancer correlated with occupational exposure to trichloroethylene. *J Cancer Res Clin Oncol* 127 (4): 265-8
- Mandel J.S., McLaughlin J.K., Schlehofer B., Mellempgaard A., Helmert U., Lindblad P., McCredie M., Adami H.O. (1995). International renal-cell cancer study. IV. Occupation. *Int J Cancer* 61 (5): 601-5
- Maxwell P.H., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. (2001). Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 11 (3): 293-9

- Maxwell P.H., Wiesener M.S., Chang G.W., Clifford S.C., Vaux E.C., Cockman M.E., Wykoff C.C., Pugh C.W., Maher E.R., Ratcliffe P.J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399 (6733): 271-5.
- McPherson J.D., Marra M., Hillier L., Waterston R.H., Chinwalla A., Wallis J., Sekhon M., Wylie K., Mardis E.R., Wilson R.K., et al. (2001). A physical map of the human genome. *Nature* 409 (6822): 934-41
- Melmon K.L., Rosen S.W. (1964). Lindau's disease: review of the literature and study of a large kindred. *Am J Med* 36: 595-617
- Morgan R.W., Kelsh M.A., Zhao K., Heringer S. (1998). Mortality of aerospace workers exposed to trichloroethylene. *Epidemiology* 9 (4): 424-31
- Motzer R.J., Bander N.H., Nanus D.M. (1996). Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 335 (12): 865-75
- Moyad M.A. (2001). Review of potential risk factors for kidney (renal cell) cancer. *Semin Urol Oncol* 19 (4): 280-93
- Mukhopadhyay D., Knebelmann B., Cohen H.T., Ananth S., Sukhatme V.P. (1997). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. *Mol Cell Biol* 17 (9): 5629-39
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73
- Mullis K.B., Faloona F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-50
- Nathan P.D., Eisen T.G. (2002). The biological treatment of renal-cell carcinoma and melanoma. *Lancet Oncol* 3 (2): 89-96
- Neumann H.P. (1987). Basic criteria for clinical diagnosis and genetic counselling in von Hippel-Lindau syndrome. *Vasa* 16 (3): 220-6
- Neumann H.P., Eng C., Mulligan L.M., Glavac D., Zauner I., Ponder B.A., Crossey P.A., Maher E.R., Brauch H. (1995). Consequences of direct genetic testing for germline mutations in the clinical management of families with multiple endocrine neoplasia, type II. *Jama* 274 (14): 1149-51.
- Neumann H.P., Wiestler O.D. (1991). Clustering of features of von Hippel-Lindau syndrome: evidence for a complex genetic locus [see comments]. *Lancet* 337 (8749): 1052-4
- Nickerson M.L., Weirich G., Zbar B., Schmidt L.S. (2000). Signature-based analysis of MET proto-oncogene mutations using DHPLC. *Hum Mutat* 16 (1): 68-76
- Oefner P.J., Underhill P.A. (1998). DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Current protocols in human genetics*. Dracopoli N.C., Haines J.L., Korf B.R., Moir D.T., Morton C.C., Seidman C.E., Seidman J.G., Smith D.R. New York, John Wiley & Son. Suppl. 19: 7.10-1.12.

- Ohh M., Kaelin W.G., Jr. (1999). The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: new perspectives. *Mol Med Today* 5 (6): 257-63
- Ohh M., Park C.W., Ivan M., Hoffman M.A., Kim T.Y., Huang L.E., Pavletich N., Chau V., Kaelin W.G. (2000). Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2 (7): 423-7
- Ohh M., Yauch R.L., Lonergan K.M., Whaley J.M., Stemmer-Rachamimov A.O., Louis D.N., Gavin B.J., Kley N., Kaelin W.G., Jr., Iliopoulos O. (1998). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell* 1 (7): 959-68
- Olschwang S., Richard S., Boisson C., Giraud S., Laurent-Puig P., Resche F., Thomas G. (1998). Germline mutation profile of the VHL gene in von Hippel-Lindau disease and in sporadic hemangioblastoma. *Hum Mutat* 12 (6): 424-30
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. (1989). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (8): 2766-70
- Pack S.D., Zbar B., Pak E., Ault D.O., Humphrey J.S., Pham T., Hurley K., Weil R.J., Park W.S., Kuzmin I., et al. (1999). Constitutional von Hippel-Lindau (VHL) gene deletions detected in VHL families by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 59 (21): 5560-4.
- Pal S., Claffey K.P., Cohen H.T., Mukhopadhyay D. (1998). Activation of Sp1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor transcription requires specific interaction with protein kinase C zeta. *J Biol Chem* 273 (41): 26277-80
- Pause A., Lee S., Worrell R.A., Chen D.Y., Burgess W.H., Linehan W.M., Klausner R.D. (1997). The von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene product forms a stable complex with human CUL-2, a member of the Cdc53 family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (6): 2156-61.
- Pause A., Peterson B., Schaffar G., Stearman R., Klausner R.D. (1999). Studying interactions of four proteins in the yeast two-hybrid system: structural resemblance of the pVHL/elongin BC/hCUL-2 complex with the ubiquitin ligase complex SKP1/cullin/F-box protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (17): 9533-8
- Perera F.P. (1996). Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. *J Natl Cancer Inst* 88 (8): 496-509
- Perera F.P., Weinstein I.B. (2000). Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 21 (3): 517-24
- Pesch B., Haerting J., Ranft U., Klimpel A., Oelschlagel B., Schill W. (2000a). Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a case-control study in germany [In Process Citation]. *Int J Epidemiol* 29 (6): 1014-24
- Pesch B., Haerting J., Ranft U., Klimpel A., Oelschlagel B., Schill W. (2000b). Occupational risk factors for renal cell carcinoma: agent-specific results from a case-control study in Germany. MURC Study Group. Multicenter urothelial and renal cancer study. *Int J Epidemiol* 29 (6): 1014-24

- Ramensky V., Bork P., Sunyaev S. (2002). Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 30 (17): 3894-900
- Ramp U., Caliskan E., Ebert T., Karagiannidis C., Willers R., Gabbert H.E., Gerharz C.D. (2002). FHIT expression in clear cell renal carcinomas: versatility of protein levels and correlation with survival. *J Pathol* 196 (4): 430-6
- Ravnik-Glavac M., Glavac D., Dean M. (1994). Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Hum Mol Genet* 3 (5): 801-7
- Rego M.A., Sousa C.S., Kato M., de Carvalho A.B., Loomis D., Carvalho F.M. (2002). Non-Hodgkin's lymphomas and organic solvents. *J Occup Environ Med* 44 (9): 874-81
- Renbaum P., Duh F.M., Latif F., Zbar B., Lerman M.I., Kuzmin I. (1996). Isolation and characterization of the full-length 3' untranslated region of the human von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Hum Genet* 98 (6): 666-71
- Reszka E., Wasowicz W. (2002). Genetic polymorphism of N-acetyltransferase and glutathione S-transferase related to neoplasm of genitourinary system. Minireview. *Neoplasma* 49 (4): 209-16
- Richards F.M., Crossey P.A., Phipps M.E., Foster K., Latif F., Evans G., Sampson J., Lerman M.I., Zbar B., Affara N.A., et al. (1994). Detailed mapping of germline deletions of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene. *Hum Mol Genet* 3 (4): 595-8
- Richards F.M., Payne S.J., Zbar B., Affara N.A., Ferguson-Smith M.A., Maher E.R. (1995). Molecular analysis of de novo germline mutations in the von Hippel-Lindau disease gene. *Hum Mol Genet* 4 (11): 2139-43
- Richards F.M., Phipps M.E., Latif F., Yao M., Crossey P.A., Foster K., Linehan W.M., Affara N.A., Lerman M.I., Zbar B., et al. (1993). Mapping the Von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene: identification of germline deletions by pulsed field gel electrophoresis. *Hum Mol Genet* 2 (7): 879-82
- Richards F.M., Schofield P.N., Fleming S., Maher E.R. (1996). Expression of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene during human embryogenesis. *Hum Mol Genet* 5 (5): 639-44
- Ritter M.M., Frilling A., Crossey P.A., Hoppner W., Maher E.R., Mulligan L., Ponder B.A., Engelhardt D. (1996). Isolated familial pheochromocytoma as a variant of von Hippel-Lindau disease. *J Clin Endocrinol Metab* 81 (3): 1035-7
- Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt S.C., Kakol J.M., Stein L.D., Marth G., Sherry S., Mullikin J.C., Mortimore B.J., Willey D.L., et al. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 409 (6822): 928-33
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839): 487-91

- Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (4732): 1350-4
- Sakashita N., Takeya M., Kishida T., Stackhouse T.M., Zbar B., Takahashi K. (1999). Expression of von Hippel-Lindau protein in normal and pathological human tissues. *Histochem J* 31 (2): 133-44
- Salceda S., Caro J. (1997). Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272 (36): 22642-7.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (12): 5463-7
- Sarkar G., Yoon H.S., Sommer S.S. (1992). Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Res* 20 (4): 871-8
- Schinkel A.H. (1997). The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* 8 (3): 161-70
- Schoenfeld A., Davidowitz E.J., Burk R.D. (1998). 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* 95 (15): 8817-22
- Semenza G.L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *J Lab Clin Med* 131 (3): 207-14.
- Semenza G.L. (2000). Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol* 59 (1): 47-53
- Sgambati M.T., Stolle C., Choyke P.L., Walther M.M., Zbar B., Linehan W.M., Glenn G.M. (2000). Mosaicism in von Hippel-Lindau disease: lessons from kindreds with germline mutations identified in offspring with mosaic parents. *Am J Hum Genet* 66 (1): 84-91
- Shuin T., Kondo K., Torigoe S., Kishida T., Kubota Y., Hosaka M., Nagashima Y., Kitamura H., Latif F., Zbar B., et al. (1994). Frequent somatic mutations and loss of heterozygosity of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in primary human renal cell carcinomas. *Cancer Res* 54 (11): 2852-5
- Sieben N.L., ter Haar N.T., Cornelisse C.J., Fleuren G.J., Cleton-Jansen A.M. (2000). PCR artifacts in LOH and MSI analysis of microdissected tumor cells. *Hum Pathol* 31 (11): 1414-9
- Siegmund M., Brinkmann U., Schaffeler E., Weirich G., Schwab M., Eichelbaum M., Fritz P., Burk O., Decker J., Alken P., et al. (2002). Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors. *J Am Soc Nephrol* 13 (7): 1847-54

- Siemeister G., Weindel K., Mohrs K., Barleon B., Martiny-Baron G., Marme D. (1996). Reversion of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res* 56 (10): 2299-301.
- Skowrya D., Koepp D.M., Kamura T., Conrad M.N., Conaway R.C., Conaway J.W., Elledge S.J., Harper J.W. (1999). Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGrr1 and Rbx1. *Science* 284 (5414): 662-5
- Stebbins C.E., Kaelin W.G., Jr., Pavletich N.P. (1999). Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 284 (5413): 455-61
- Stolle C., Glenn G., Zbar B., Humphrey J.S., Choyke P., Walther M., Pack S., Hurley K., Andrey C., Klausner R., et al. (1998). Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum Mutat* 12 (6): 417-23
- Störkel S., Eble J.N., Adlakha K., Amin M., Blute M.L., Bostwick D.G., Darson M., Delahunt B., Iczkowski K. (1997). Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer* 80 (5): 987-9
- Sutter C.H., Laughner E., Semenza G.L. (2000). Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (9): 4748-53
- Tanimoto K., Makino Y., Pereira T., Poellinger L. (2000). Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Embo J* 19 (16): 4298-309
- Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., Gottesman M.M., Pastan I., Willingham M.C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84 (21): 7735-8
- Tisherman S.E., Tisherman B.G., Tisherman S.A., Dunmire S., Levey G.S., Mulvihill J.J. (1993). Three-decade investigation of familial pheochromocytoma. An allele of von Hippel-Lindau disease? *Arch Intern Med* 153 (22): 2550-6
- Tyers M., Rottapel R. (1999). VHL: a very hip ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (22): 12230-2
- Vamvakas S., Bruning T., Bolt H.M., Henschler D., Ulm K. (2000). Renal cell cancer correlated with occupational exposure to trichloroethene. *J Cancer Res Clin Oncol* 126 (3): 178-80
- Vamvakas S., Brüning T., Bolt H.M., Henschler D., Ulm K. (2001a). Exposure estimates in studies on workplace exposures to trichloroethylene in relation to renal cell cancer formation (reply). *J Cancer Res Clin Oncol* 127: 403-404
- Vamvakas S., Brüning T., Bolt H.M., Henschler D., Ulm K. (2001b). Renal cell cancer correlated with occupational exposure to trichloroethylene. *J Cancer Res Clin Oncol* 127: 267-268

- Vamvakas S., Brüning T., Thomasson B., Lammert M., Baumuller A., Bolt H.M., Dekant W., Birner G., Henschler D., Ulm K. (1998). Renal cell cancer correlated with occupational exposure to trichloroethene. *J Cancer Res Clin Oncol* 124 (7): 374-82
- van der Harst E., de Krijger R.R., Dinjens W.N., Weeks L.E., Bonjer H.J., Bruining H.A., Lamberts S.W., Koper J.W. (1998). Germline mutations in the vhl gene in patients presenting with pheochromocytomas. *Int J Cancer* 77 (3): 337-40
- Velickovic M., Delahunt B., Storkel S., Grebem S.K. (2001). VHL and FHIT locus loss of heterozygosity is common in all renal cancer morphotypes but differs in pattern and prognostic significance. *Cancer Res* 61 (12): 4815-9
- von Hippel E. (1904). Über eine seltene Erkrankung der Netzhaut. *Graefes Arch Ophthalmol*: 59-83
- Wagner T., Stoppa-Lyonnet D., Fleischmann E., Muhr D., Pages S., Sandberg T., Caux V., Moeslinger R., Langbauer G., Borg A., et al. (1999a). Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations. *Genomics* 62 (3): 369-76
- Wagner T.M., Hirtenlehner K., Shen P., Moeslinger R., Muhr D., Fleischmann E., Concin H., Doeller W., Haid A., Lang A.H., et al. (1999b). Global sequence diversity of BRCA2: analysis of 71 breast cancer families and 95 control individuals of worldwide populations [published erratum appears in *Hum Mol Genet* 1999 Apr;8(4):717-9]. *Hum Mol Genet* 8 (3): 413-23
- Wagner T.M., Moeslinger R.A., Muhr D., Langbauer G., Hirtenlehner K., Concin H., Doeller W., Haid A., Lang A.H., Mayer P., et al. (1998). BRCA1-related breast cancer in Austrian breast and ovarian cancer families: specific BRCA1 mutations and pathological characteristics. *Int J Cancer* 77 (3): 354-60
- Wartenberg D., Reyner D., Scott C.S. (2000). Trichloroethylene and cancer: epidemiologic evidence. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 2: 161-76
- Weirich G., Klein B., Wohl T., Engelhardt D., Brauch H. (2002). VHL2C phenotype in a German von Hippel-Lindau family with concurrent VHL germline mutations P81S and L188V. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (11): 5241-6
- Weiss N.S. (1996). Cancer in relation to occupational exposure to trichloroethylene. *Occup Environ Med* 53 (1): 1-5
- Wenger R.H., Gassmann M. (1997). Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol Chem* 378 (7): 609-16.
- Whaley J.M., Naglich J., Gelbert L., Hsia Y.E., Lamiell J.M., Green J.S., Collins D., Neumann H.P., Laidlaw J., Li F.P., et al. (1994). Germ-line mutations in the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene are similar to somatic von Hippel-Lindau aberrations in sporadic renal cell carcinoma [published erratum appears in *Am J Hum Genet* 1995 Jan;56(1):356]. *Am J Hum Genet* 55 (6): 1092-102



- Wiedorn K.H., Olert J., Stacy R.A., Goldmann T., Kuhl H., Matthus J., Vollmer E., Bosse A. (2002). HOPE--a new fixing technique enables preservation and extraction of high molecular weight DNA and RNA of > 20 kb from paraffin-embedded tissues. Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect. *Pathol Res Pract* 198 (11): 735-40
- Wiegand P., Domhoyer J., Brinkmann B. (1996). [DNA degradation in formalin fixed tissues]. *Pathologie* 17 (6): 451-4
- Wiesener M.S., Munchenhagen P.M., Berger I., Morgan N.V., Roigas J., Schwiertz A., Jurgensen J.S., Gruber G., Maxwell P.H., Loning S.A., et al. (2001). Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. *Cancer Res* 61 (13): 5215-22
- Williams C., Ponten F., Moberg C., Soderkvist P., Uhlen M., Ponten J., Sitbon G., Lundeberg J. (1999). A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 155 (5): 1467-71
- Wizigmann-Voos S., Breier G., Risau W., Plate K.H. (1995). Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its receptors in von Hippel-Lindau disease-associated and sporadic hemangioblastomas. *Cancer Res* 55 (6): 1358-64
- Wong C., DiCioccio R.A., Allen H.J., Werness B.A., Piver M.S. (1998). Mutations in BRCA1 from fixed, paraffin-embedded tissue can be artifacts of preservation. *Cancer Genet Cytogenet* 107 (1): 21-7
- Woodward E.R., Buchberger A., Clifford S.C., Hurst L.D., Affara N.A., Maher E.R. (2000). Comparative sequence analysis of the VHL tumor suppressor gene. *Genomics* 65 (3): 253-65.
- Woodward E.R., Eng C., McMahon R., Voutilainen R., Affara N.A., Ponder B.A., Maher E.R. (1997). Genetic predisposition to pheochromocytoma: analysis of candidate genes GDNF, RET and VHL. *Hum Mol Genet* 6 (7): 1051-6
- Wykoff C.C., Beasley N.J., Watson P.H., Turner K.J., Pastorek J., Sibtain A., Wilson G.D., Turley H., Talks K.L., Maxwell P.H., et al. (2000a). Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res* 60 (24): 7075-83
- Wykoff C.C., Pugh C.W., Maxwell P.H., Harris A.L., Ratcliffe P.J. (2000b). Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor by mRNA differential expression profiling. *Oncogene* 19 (54): 6297-305
- Yamagata M., Hasuda K., Stamato T., Tannock I.F. (1998). The contribution of lactic acid to acidification of tumours: studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase. *Br J Cancer* 77 (11): 1726-31
- Yao M., Latif F., Orcutt M.L., Kuzmin I., Stackhouse T., Zhou F.W., Tory K., Duh F.M., Richards F., Maher E., et al. (1993). von Hippel-Lindau disease: identification of deletion mutations by pulsed-field gel electrophoresis. *Hum Genet* 92 (6): 605-14

- Ye Y., Vasavada S., Kuzmin I., Stackhouse T., Zbar B., Williams B.R. (1998). Subcellular localization of the von Hippel-Lindau disease gene product is cell cycle-dependent. *Int J Cancer* 78 (1): 62-9
- Yoshida M., Ashida S., Kondo K., Kobayashi K., Kanno H., Shinohara N., Shitara N., Kishida T., Kawakami S., Baba M., et al. (2000). Germ-line mutation analysis in patients with von Hippel-Lindau disease in Japan: an extended study of 77 families. *Jpn J Cancer Res* 91 (2): 204-12
- Zatyka M., da Silva N.F., Clifford S.C., Morris M.R., Wiesener M.S., Eckardt K.U., Houlston R.S., Richards F.M., Latif F., Maher E.R. (2002). Identification of cyclin D1 and other novel targets for the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene by expression array analysis and investigation of cyclin D1 genotype as a modifier in von Hippel-Lindau disease. *Cancer Res* 62 (13): 3803-11
- Zbar B., Brauch H., Talmadge C., Linehan M. (1987). Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature* 327 (6124): 721-4.
- Zbar B., Kishida T., Chen F., Schmidt L., Maher E.R., Richards F.M., Crossey P.A., Webster A.R., Affara N.A., Ferguson-Smith M.A., et al. (1996). Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum Mutat* 8 (4): 348-57

---

## Lebenslauf

**Name** Bettina Klein  
**Geburtsdatum** 05.06.1969  
**Geburtsort** Bietigheim-Bissingen  
**Familienstand** verheiratet

### Schulbesuch

1976 - 1980 Grundschule Hillerschule, Bietigheim-Bissingen  
1980 - 1989 Gymnasium Ellental, Bietigheim-Bissingen  
1989 Abitur

### Studium

1991 – 1999 Studium der Biologie an der Universität Hohenheim, Stuttgart  
1996 – 1997 Anfertigung der Diplomarbeit „Isoenzym-Charakterisierung einer Kollektion der tropischen Weideleguminose *Desmodium ovalifolium* am *Centro International de Agricultura Tropical* (CIAT), Cali, Kolumbien, unter Anleitung von Prof. Dr. R. Schultze-Kraft vom Institut für Pflanzenproduktion in den Tropen und Subtropen der Universität Hohenheim, gefördert durch ein Stipendium der Eiselen-Stiftung, Ulm.

1999 - 2003 Anfertigung der hier vorliegenden Dissertation „Mutationsanalyse des *VHL*-Tumorsuppressorgens vor dem Hintergrund der erblichen *VHL*-Erkrankung und Karzinogenexposition beim sporadischen Nierenzellkarzinom“ am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart, unter Anleitung von Priv.-Doz. Dr. H. Brauch.