

## Z á r ó b e s z á m o l ó

### Genetikai interakciók és a GAS6 szerepe az időskori makuladegeneráció patomechanizmusában

#### Bevezetés

Az időskori makula degeneráció (AMD) az időskori vakság vezető oka a fejlett országokban, különösképpen a .kaukázusi populációkban. A betegség prevalenciája a 85 év feletti korcsoportban eléri a 15%-ot. (1) Az AMD multifaktoriális betegség, melyet a retina éleslátásért felelős régiójában, a maculában a pigment epithelium pusztulása és szubretinális depozitumok (drusenek) megjelenése jellemez. Az előrehaladott betegséget a pigment epithelium kiterjedt pusztulása (un. térképatrófia) vagy a szubretinális neovaszkularizációs membrán megjelenése jellemzi. A betegség klinikai klasszifikációjára több módszer is alkalmazható, ezek közül az epidemiológiai vizsgálatokra az egyszerűen alkalmazható CARMS klasszifikáció az egyik legalkalmasabb. (2) A neovascularisatioval járó formát exudatív vagy nedves típusnak, míg a neovascularisatio komponensét nem tartalmazó típust non-exudatív vagy száraz formának nevezzük. Habár a betegség etiológiája nagyrészt ismeretlen, háttérében több rizikófaktort ismerünk. Egyértelműen fokozza a betegség kockázatát a kaukázusi rassz, a dohányzás és az életkor. A magas koleszterinszint, obezitás, tartós napfény-expozíció, kék írisz, oxidatív stressz, krónikus gyulladással járó állapotok kóroki szerepével több közlemény is foglalkozik, de az eredmények ellentmondásosak. (3) Az elmúlt években számos genetikai polimorfizmus kóroki szerepére derült fény. Ezek nagy része a komplement rendszert alkotó, illetve annak szabályozásában résztvevő fehérjék génjében található és a komplement rendszer szabályozási egyensúlyának felbomlásához vezet. Számos közlemény több populációban bizonyította az AMD és a komplement faktor H (CFH) Y402H aminosavcserét okozó polimorfizmusának kapcsolatát, mely a homozigóta genotípus és az előrehaladott betegségforma között a legerősebb. Egy nemrégiben megjelent metaanalízis szerint az európai eredetű populációkban a polimorfizmus allélenként kétszeres rizikót jelent. (4) A komplement rendszer más génjeiben is találtak betegségre hajlamosító polimorfizmusokat. A komplement faktor 3 (C3) R102G polimorfizmusa (rs2230199) heterozigóta formában 1,7-szeres, homozigóta formában 2,6-szoros kockázatnövekedést

jelent. (5) A komplement faktor I (CFI) a C3b-t inaktiváló proteolitikus enzim rs10033900 polimorfizmusának szerepe ellentmondásos, az irodalomban található szerepe mellett és ellen is bizonyítékokat. (6-7)

A komplement rendszer három útvonalon keresztül aktiválódhat: a klasszikus, az alternatív és a lektin útvonalakon. Mindhárom esetben proteolitikus kaszkád vezet a komplement rendszer központi molekulájának, a C3-nak az aktiválódásához. A szabad plazmaproteint a komplement faktor B (B) köti meg, ezzel téve lehetővé, hogy a komplement faktor D a B-t Ba és Bb alegységekre hasítsa. Ezzel jön létre a C3 konvertáz komplex (C3bBb), melynek kialakulását a komplement rendszer számos eleme korlátozza. Az AMD pathogenezis szempontjából legfontosabbak a CFH és a CFI. A legjelentősebb szolubilis komplement regulátor a CFH, mely a C3 konvertáz komplexet és a C3b-t gátolja. (8) Az Y402H polimorfizmus befolyásolja CFH C-reaktív protein kötő képességét, a retinális pigment epithelium MAC (membrane attack complex) mennyiségét, és fokozott komplement aktiválódáshoz vezet. (9)

A CFH Y402H polimorfizmustól független, szoros kapcsolatot igazoltak az AMD kialakulása és a 10q26 kromoszóma régióban található LOC387715 jelű ismeretlen funkciójú fehérje Ser69Ala (rs 10490924) polimorfizmusa között. A két gén hatása egymástól független és additív természetű. (10) Ugyanebben a kromoszóma régióban. A HTRA1 nevű szerin peptidáz promóter régiójában lévő rs11200638 polimorfizmust is szoros kapcsolat köt az AMD-hez. A LOC387715 és a HTRA1 gének egymás szoros szomszédságában helyezkednek el, és a szakirodalomban ma is parázs vita folyik arról, hogy a két gén közül melyik jelent valódi kockázatot az AMD kialakulására. Habár az első közlemények a LOC387715 szerepét találták a fontosabbnak, ma már mindkét gén szerepére találunk meglehetősen nagy mennyiségű evidenciát: a LOC387715 mRNS-e kevésbé stabil, a HTRA1 mRNS szintje megnő a mutációk hatására, a HTRA1 részt vesz a retinális pigment epithelium által szekretált és a komplement rendszer szabályozásában résztvevő fehérjék lebontásában, az okuláris angiogenezis szabályozásában, de epidemiológiai módszerekkel is azt bizonyították a két gén együttes szerepét. (11) Ezen kívül egerekben bizonyították, hogy a retinális pigment epithel sejtek fokozott HTRA1 termelése a Bruch membrán lebomlásához vezet, mely kulcsfontosságú lépés az AMD pathogenezisében.

A Growth Arrest-specific Gene 6 (GAS6) K-vitamin-függő fehérje, melyet a fehérvérsejtek és endothelsejtek szekretálnak elsősorban sérülések hatására. A GAS6 nagymértékű szerkezeti hasonlóságot mutat a véralvadás szabályozásában fontos szerepet betöltő antikoaguláns hatású Protein S-sel. A fehérje és génje AMD-ben betöltött esetleges

szerepéről eddig semmilyen információval nem rendelkezünk. Ugyanakkor a fehérje számos olyan tulajdonsággal rendelkezik, melyek alapján az AMD pathomechanizmusában is szerepet játszhat. A GAS6 fehérjének növekedési faktor-szerű hatását a tyrozin-kináz receptorain (Tyro3, Axl és Mer TK) keresztül fejt ki. Ezeken keresztül részt vesz az angiogenezis, sejt túlélés, apoptózis, proliferáció, migráció és adhézió szabályozásában. A GAS6 c.834 + 7GA polimorfizmusa csökkenti a stroke és az akut koronária szindróma kockázatát. (12, 13) Figyelemre méltó, hogy a GAS6 Mer TK receptora részt vesznek a fotoreceptor külső szegmentum pigment epithel sejtek általi fagocitózisában. A Mer TK knock-out egerekben teljes pigment epithel sejt degeneráció alakul ki 10 hetes korukra. (14) Mindezek alapján érdekesnek tartottuk megvizsgálni a GAS6 gén és a GAS6 receptorok ismert gyakori polimorfizmusainak és az AMD kapcsolatát.

A lipid transzportban szerepet játszó génekre elsősorban azért terelődött a figyelem, mert ismert, hogy a drusenben jelentős mennyiségű lipid halmozódik fel. Bizonyították a LIPC gén egyik polimorfizmusának kóros szerepét, illetve az ApoE epsilon 2-3-4 alléljeinek kapcsolódását a betegséghez. Ugyanakkor az ApoE allélek vizsgálata ellentmondásos eredményeket szült. A legtöbb közlemény a kaukázusi populációban talált eredmények alapján az E4 allél protektív és az E2 allél rizikót növelő hatásáról tudósít, de találunk példát ennek fordítottjára is. Ezért tartottuk fontosnak megvizsgálni, hogy a hazai populációban jelent-e fokozott vagy csökkent kockázatot valamely ApoE allél hordozása. Egy korábbi debreceni tanulmányban nem tudtak összefüggést kimutatni az ApoE és az AMD között, ugyanakkor feltűnő volt, hogy a fő szakirodalmi trenddel ellentétben az E4 allél a betegekben, az E2 allél a kontrollokban volt felül reprezentált. Ugyanebben a vizsgálatban a CFH, LOC387715 és HTRA1 homozigóta polimorfizmusok korai AMD-re vetített kockázata 4.9-szeres (95% konfidencia intervallum [CI] 1.7–14.2), 7.4-szeres (95% CI 2.1–26.2) és 10.1-szeres (95% CI 2.5–40.8) volt. A késői AMD-ben ugyanez 10.7-szeres (95% CI 3.7–31.0), 11.3-szeres (95% CI 3.2–40.4) és 13.5-szeres (95% CI 3.3–55.4) kockázatnak adódott. (15)

Munkánk egyik célja annak vizsgálata volt, hogy az AMD ismert genetikai rizikó faktorai milyen kockázatot jelentenek a hazai populációban. Nagyon érdekesnek találtuk a kérdést, hogy a GAS6 és receptorainak génjeiben lévő gyakori polimorfizmusok jelentenek-e fokozott vagy csökkent rizikót az AMD kialakulását tekintve. Emellett a véralvadás XIII-as faktorának artériás és vénás trombózisokban vitatott szerepet játszó VAL34Leu esetleges kockázati hatását is vizsgálni kívántuk. A Val34Leu polimorfizmusa azért is volt számunkra érdekes, mert a fehérje a véralvadáson kívül az angiogenezis szabályozásában is szerepet játszik.

## **Betegek és Módszerek**

Összesen 386 egyént vontunk be az eset-kontroll vizsgálatba. 213 beteg nedves típusú, 67 beteg száraz típusú makuladegenrációban szenvedett. A 106 kontroll semmilyen AMD-re jellemző makula eltérést nem mutatott. A betegeket a CARMS klasszifikáció szerint osztályoztuk. (2). Statisztikai adatelemzés céljából a betegeket száraz és nedves típusú csoportba soroltuk a súlyosabban érintett szemük alapján. A vizsgálatához helyi Kutatásetikai Bizottsági engedéllyel rendelkezünk. A vizsgálatok során a Helsinki Deklaráció irányelveit maradéktalanul betartottuk. A vizsgálatba a 2005 és 2011 között ambuláns rendelésen megjelenő AMD-ben szenvedő betegeket vontunk be, részletes betegtájékoztató és beleegyező nyilatkozat aláírás után. A kontrollokat a fénytörési hiba (leggyakrabban presbyopia) miatt jelentkező időskorú populációból választottuk úgy, hogy életkoruk minimum 75 év legyen, így biztosítva, hogy életkoruk a betegek átlagéletkorát meghaladja, illetve minél kisebb eséllyel kerüljenek a későbbiekben a betegség tüneteit mutató egyének a kontroll csoportba. A betegekről színes fundusfotó és fluoreszcein angiográfia készült. A betegeket és kontrollokat két vizsgáló egybehangzó véleménye alapján soroltuk csoportba. A betegektől és kontrolloktól a könyökvénából vettünk vért, melyet kóddal láttunk el és így juttattunk el a genetikai vizsgálatot végző laboratóriumba. A vizsgálatba bevont egyének kérdőívet töltöttek ki, melyen a belgyógyászati betegségekre, dohányzási szokásokra, munkahelyre, testmagasságra és testtömegre, vonatkozó kérdések álltak. A dohányzást dobozévben mértük, ahol napi 1 doboz cigaretta egy éván át történő fogyasztása jelentett 1 dobozév mennyiséget. A genetikai vizsgálati módszerek tekintetében utalunk korábbi közleményekre (5, 6, 12, 15)

## **Statisztikai elemzés**

A kontroll csoport genotípus eloszlásának Hardy-Weinberg egyensúlyát a genotípus különbségek Chi-négyzet próbájával vizsgálatuk. A folyamatos változókat a Student-féle T-teszttel elemeztük. A különböző genotípusokhoz tartozó relatív kockázatot esélyhányadosként adtuk meg (odds ratio, OR) és logisztikus regresszió módszerével vizsgáltuk. A polimorfizmusokat alacsony rizikójú (vad típus és heterozigóta) és magas rizikójú (homozigóta) csoportosításban vizsgálatuk, mert a hazai populációt vizsgáló korábbi közlemény lényegesen nagyobb esélyhányadosokat írt le a homozigóta polimorfizmusok esetén, mint a heterozigóta formáknál. (Az egyes polimorfizmusok egymástól függő hatását

interakció vizsgálattal alogisztikus modellben azonosítottuk. Az elemzést hamisan befolyásoló faktornak az életkort, cataracta műtétet, kültéri munkát, dohányzást, nemet, testtömeg indexet tekintettük. A statisztikai elemzés során az AMD kialakulását potenciálisan befolyásoló faktorokra korrigáltunk.

## Eredmények

Tulajdonság	száraz AMD N=67	nedves AMD N=213	Kontrollok N=106	p
<b>Nők N (%)</b>	34 (50.7)	125 (58.7)	53 (50.0)	0,2569
<b>Férfiak N (%)</b>	33 (49.3)	88 (41.3)	53 (50.0)	0,2569
<b>Kor (év, átlag±SD)</b>	75.4 (11.5)	76.0 (7.3)	79.1 (6.1)	0,0047
<b>dohányzás (dobozév, átlag±SD)</b>	12.0 (20.1)	11.2 (19.8)	11.4 (21.9)	0,7601
<b>BMI (átlag±SD)</b>	27.3 (4.5)	27.3 (4.4)	27.6 (4.7)	0,8306
<b>Hypertonia N (%)</b>	45 (67.2)	159 (75.0)	81 (79.4)	0,2135
<b>MVT N (%)</b>	7 (10.4)	15 (7.1)	15 (14.9)	0,0928
<b>AMI N (%)</b>	6 (9.0)	19 (9.0)	7 (7.4)	0,9054
<b>kültéri szakma N (%)</b>	22 (32.8)	39 (18.5)	38 (38.4)	0,0004
<b>Cataracta műtét N (%)</b>	21 (31.3)	48 (22.6)	73 (70.2)	0,0000

1. Táblázat: A vizsgált populáció tulajdonságai

A vizsgált populáció karakterisztikája látható a fenti táblázatban. Összesen 280 beteget és 106 kontrollt vontunk be a vizsgálatba. A betegség fenotípusa szerint a betegeket száraz (67 beteg) és nedves (213 beteg) típusú AMD alcsoportokba soroltuk. A nedves formába tartozóknál enyhe női dominancia volt észlelhető, ami megfelel az Európában tapasztalható nemi megoszlásnak. A kontrollokat a kor befolyásoló hatásának kiiktatása céljából a betegektől idősebbnek választottuk meg. Nem volt statisztikailag szignifikánsan kimutatható eltérés betegek és kontrollok között a hipertonia, mélyvénás trombózis, szívinfarktus, dohányzás és testtömeg index tekintetében. A cataracta műtét kontrollokban látható magas arányát az magyarázza, hogy ebben az életkorban legfőképpen cataracta miatt keresik fel a szemészetet. A kültéri munka és a következményes UV terhelés magasabb aránya pedig valószínűleg a cataracta magasabb arányával függ össze.

A populáció genotípus és allél eloszlását az alábbi táblázatokban foglaltuk össze. A mintaszámot minden vizsgálatra külön megadjuk. A kontroll csoport egyedül a LOC387715-HTRA1 esetében tért el a Hardy-Weinberg eloszlástól. Ismert, hogy ez a két gén nagyon szoros kapcsolatban helyezkedik el a 10q26 kromoszóma régióban, ami megmagyarázza az eltérést. A minor (rizikót okozó allél) a kontrollokban általában alul reprezentált volt, ez alól kivételt képezett a CFI, a GAS6, az ApoE és két GAS6 receptor polimorfizmusa.

ApoE	Genotípus	n	Gyakoriság
	3/3	71	0,67
	3/4 + 4/4	16	0,15
	2/3 + 2/2	17	0,16
	2/4	2	0,02
	total	106,00	
<b>CFH p.Y402H / rs1410996</b>	TT	42,00	0,40
	TC	51,00	0,49
	CC	11,00	0,11
	total	104,00	
<b>LOC387715 p.A69S / rs10490924</b>	GG	49,00	0,47
	GT	50,00	0,48
	TT	5,00	0,05
	total	104,00	
<b>HTRA1 rs11200638</b>	TT	50,00	0,48
	TC	50,00	0,48
	CC	4,00	0,04
	total	104,00	
<b>C3 p.R102G / rs2230199</b>	CC	66,00	0,62
	CG	37,00	0,35
	GG	3,00	0,03
	total	106,00	
<b>CFI rs10033900</b>	CC	19,00	0,18
	CT	56,00	0,53
	TT	31,00	0,29
	total	106,00	
<b>FXIII p.Val34Leu rs5985</b>	GG	48,00	0,45
	GT	47,00	0,44
	TT	11,00	0,10
	total	106,00	
<b>GAS6 rs8191974 / c.834+7G&gt;A</b>	GG	36,00	0,35
	GA	55,00	0,53
	AA	13,00	0,13
	total	104,00	
<b>Mertk I1a rs86016</b>	GG	37,00	0,36
	GA	51	0,49
	AA	16	0,15
	total	104,00	
<b>Mertk I1b rs17835605</b>	CC	60,00	0,57
	CT	39,00	0,37
	TT	6,00	0,06
	total	105,00	
<b>Mertk I1c rs10496440</b>	AA	91,00	0,87
	AC	14,00	0,13
	CC	0,00	0,00
	total	105,00	
<b>Mertk I4 rs7573344</b>	AA	69,00	0,66
	AG	33,00	0,31
	GG	3,00	0,03
	total	105,00	

2. Táblázat: A kontrollok genotípuseloszlása

ApoE	Genotípus	száraz AMD		nedves AMD		összes AMD	
		n	gyakoriság	n	gyakoriság	n	gyakoriság
	3/3	49	0,73	148	0,70	197	0,71
	3/4 + 4/4	11	0,16	34	0,16	45	0,16
	2/3 + 2/2	7	0,10	24	0,11	31	0,11
	2/4	0	0,00	4	0,02	4	0,01
	total	67		210		277	
<b>CFH p.Y402H / rs1410996</b>	TT	23	0,34	35	0,17	58	0,21
	TC	24	0,36	89	0,44	113	0,42
	CC	20	0,30	80	0,39	100	0,37
	total	67		204		271	
<b>LOC387715 p.A69S / rs10490924</b>	GG	25	0,37	45	0,21	70	0,25
	GT	31	0,46	95	0,45	126	0,45
	TT	11	0,16	71	0,34	82	0,29
	total	67		211		278	
<b>HTRA1 rs11200638</b>	TT	25	0,38	47	0,22	72	0,26
	TC	31	0,47	94	0,45	125	0,45
	CC	10	0,15	69	0,33	79	0,29
	total	66		210		276	
<b>C3 p.R102G / rs2230199</b>	CC	34	0,52	118	0,56	152	0,55
	CG	28	0,42	81	0,39	109	0,40
	GG	4	0,06	10	0,05	14	0,05
	total	66		209		275	
<b>CFI rs10033900</b>	CC	16	0,25	45	0,21	61	0,22
	CT	32	0,49	110	0,52	142	0,51
	TT	17	0,26	56	0,27	73	0,26
	total	65		211		276	
<b>FXIII p.Val34Leu rs5985</b>	GG	39	0,58	118	0,56	157	0,56
	GT	25	0,37	73	0,35	98	0,35
	TT	3	0,04	20	0,09	23	0,08
	total	67		211		278	
<b>GAS6 rs8191974 / c.834+7G&gt;A</b>	GG	27	0,42	96	0,47	123	0,45
	GA	28	0,43	89	0,43	117	0,43
	AA	10	0,15	21	0,10	31	0,11
	total	65		206		271	
<b>Mertk I1a rs86016</b>	GG	25	0,39	76	0,37	101	0,37
	GA	30	0,47	97	0,47	127	0,47
	AA	9	0,14	33	0,16	42	0,16
	total	64		206		270	
<b>Mertk I1b rs17835605</b>	CC	40	0,62	129	0,62	169	0,62
	CT	15	0,23	65	0,31	80	0,29
	TT	10	0,15	15	0,07	25	0,09
	total	65		209		274	
<b>Mertk I1c rs10496440</b>	AA	60	0,92	179	0,85	239	0,87
	AC	5	0,08	31	0,15	36	0,13
	CC	0	0,00	1	0,00	1	0,00
	total	65		211		276	
<b>Mertk I4 rs7573344</b>	AA	45	0,70	149	0,71	194	0,71
	AG	19	0,30	56	0,27	75	0,27
	GG	0	0,00	4	0,02	4	0,01
	total	64		209		273	

3. Táblázat: A betegek genotípuseloszlása

	Allele	Dry AMD	Wet AMD	Controls
ApoE	E2	0.06	0.07	0.09
	E3	0.86	0.84	0.82
	E4	0.08	0.09	0.09
CFH p.Y402H / rs1410996	T	0.52	0.39	0.65
	C	0.48	0.61	0.35
LOC387715 p.A69S / rs10490924	G	0.6	0.53	0.71
	T	0.4	0.47	0.29
HTRA1 rs11200638	T	0.61	0.45	0.72
	C	0.39	0.55	0.28
C3 p.R102G / rs2230199	C	0.73	0.76	0.8
	G	0.27	0.24	0.2
CFI rs10033900	C	0.49	0.47	0.44
	T	0.51	0.53	0.56
FXIII p.Val34Leu rs5985	G	0.77	0.73	0.67
	T	0.23	0.27	0.33
GAS6 rs8191974 / c.834+7G>A	G	0.63	0.68	0.62
	A	0.37	0.32	0.38
Mertk I1a rs86016	G	0.62	0.61	0.6
	A	0.38	0.39	0.4
Mertk I1b rs17835605	C	0.72	0.77	0.75
	T	0.28	0.23	0.25
Mertk I1c rs10496440	A	0.96	0.92	0.93
	C	0.04	0.08	0.07
Mertk I4 rs7573344	A	0.81	0.85	0.81
	G	0.19	0.15	0.19

Az alábbi polimorfizmusok esetén nem tudtuk igazolni az AMD-re gyakorolt hatást:

5. Táblázat: AMD-val kapcsoltást nem mutató polimorfizmusok

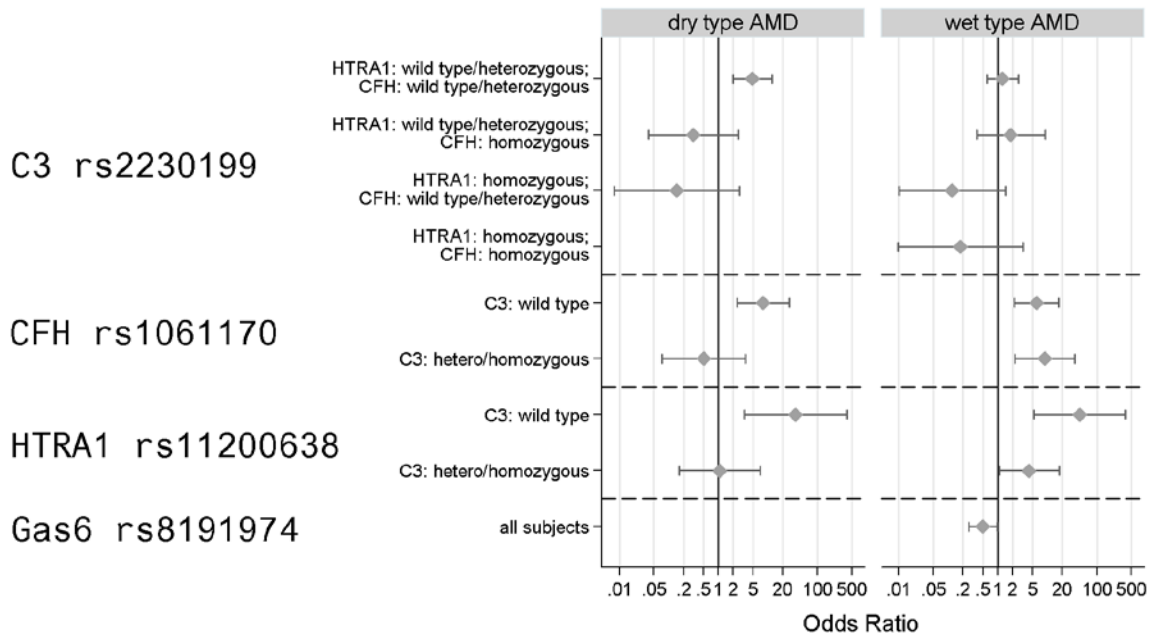
ApoE	összehasonlított genotípusok		OR (95%CI)	p
	3/4 + 4/4	vs 3/3		
	2/3 + 2/2	vs 3/3	1.01 (0.54; 1.91)	0,9665
CFI rs10033900	CC	vs CT + TT	0.66 (0.34; 1.26)	0,2062
	CC	vs TT	1.30 (0.73; 2.30)	0,3699
FXIII p.Val34Leu rs5985	GT	vs GG	1.36 (0.70; 2.65)	0,3607
	TT	vs GG	0.64 (0.40; 1.03)	0,0690
Mertk I1a rs86016	GA + AA	vs GG	0.64 (0.29; 1.41)	0,2657
	AA	vs GG	0.92 (0.58; 1.48)	0,7424
Mertk I1b rs17835605	TT	vs CC + CT	0.96 (0.48; 1.91)	0,9113
	TT	vs CC	1.66 (0.66; 4.18)	0,2789
Mertk I1c rs10496440	AC	vs AA	1.48 (0.58; 3.78)	0,4135
	CC	vs AA	0.98 (0.50; 1.90)	0,9502
Mertk I4 rs7573344	AG + GG	vs AA	NA (shortage of CC genotype)	
	GG	vs AA	0.78 (0.48; 1.26)	0,3120
			0.47 (0.10; 2.17)	0,3367

4. Táblázat: A vizsgált polimorfizmusok allélfrekvenciái

A teljes AMD populációban a CFH és a HTRA1 polimorfizmusok jelentős kockázatot jelentettek (OR=5.3, 95%CI: 2.5-11.5, p<0.0001, and OR=9.8, 95%CI: 3.3-29.5, p<0.0001). A GAS6 polimorfizmusa a teljes populációban nem volt szignifikáns hatással a betegség



kialakulására, habár az alacsony esélyhányados protektív hatásra utalt (OR=0.59, 95%CI: 0.33-1.06, p=0.077).



A fenti ábrán a száraz és nedves AMD kialakulására hatással bíró polimorfizmusok esélyhányadosai láthatóak. Kiemelendő, hogy a LOC387715 és a HTRA1 polimorfizmus szoros kapcsoltsága miatt a kölcsönhatások statisztika elemzésekor csak a HTRA1 polimorfizmust vizsgáltuk. A heterozigóta/homozigóta C3 polimorfizmus a vad típusal szemben jelentős kockázatot jelentett a száraz AMD kialakulására abban az esetben, ha nem volt jelen homozigóta CFH és HTRA1 polimorfizmus (OR=4.93, 95%CI: 1.98-12.25, p=0.0006). Az eredmény fordítva is igaz volt: vad típusú C3 esetében mind a CFH, mind a HTRA1 jelentős esélyhányadossal bírt a száraz AMD csoportjában (OR=7.96, 95%CI: 2.39-26.50, p=0.0007, és OR=36.02, 95%CI: 3.30-393.02, p=0.0033). A nedves AMD csoportjában a CFH és a HTRA1 más genotípustól függetlenül is jelentős kockázati tényezők voltak, míg a GAS6 polimorfizmusa szignifikáns protektív hatást mutatott a nedves AMD kialakulásával szemben (OR=0.50, 95%CI: 0.26-0.97, p=0.04). A C3 hatását a nedves csoportban nem tudtuk igazolni.

## Konklúzió

Vizsgálatunkban az időskori makuladegeneráció kialakulására nézve fokozott kockázatot jelentő környezeti és genetikai hatásokat vizsgálatuk eset-kontroll tanulmány keretében. A szakirodalom egyöntetű adataival ellentétben nem találtunk összefüggést a dohányzás és a

betegség kialakulása között. Ennek oka többértű lehet. Egyrészt a dohányzást sokan szégyellik, ezért nem lehetünk biztosak a válaszok 100%-os őszinteségében, másrészt a hazai dohányzási szokások eltérhetnek a más országokban tapasztaltaktól, harmadrészt elképzelhető, hogy a vizsgálatunk nem rendelkezett megfelelő statisztikai erővel az összefüggés kimutatásához. Ezt a negatív eredményt ezért semmiképp sem tekinthetjük a dohányzás kóroki szerepét megkérdőjelező eredménynek.

Vizsgálatunkban igazoltuk, hogy az időskori makuladegeneráció ismert rizikófaktorai a hazai populációban is jelentős kockázatnövelő hatással bírnak a betegség kialakulására nézve. Ugyanakkor nem tudtuk igazolni a CFI polimorfizmus egyébként is vitatott hatását, ami arra utal, hogy a polimorfizmusnak vagy valóban nincs hatása a betegségre, vagy pedig az ismert erős rizikófaktorokhoz képest annyira kis mérték hatással bír, hogy vizsgálatunkban azt nem tudtuk detektálni. Nagyon érdekes eredménye a vizsgálatnak, hogy a C3 polimorfizmusát csak a száraz AMD-ben szenvedő betegcsoportban és az erős rizikófaktorokkal interakcióban tudtuk detektálni. A C3 polimorfizmusának elsősorban a nedves formában van ismert és enyhe hatása a kaukázusi populációban, de az ázsiai populációkban hatását igazolni nem tudták a rizikó allél alacsony előfordulási aránya miatt. (16,17) A hazai populációban detektálható interakciónak oka lehet, hogy a C3 a komplement rendszer központi molekulája, melyre mindhárom komplement aktivációs útvonal konvergál, így az útvonalak szabályozási egyensúlyának felborulása végeredményben a C3 fokozott aktivációjához vezet. Így elképzelhető, hogy ezek a polimorfizmusok és a C3 polimorfizmusa között valódi biológiai interakció is kialakuljon. Ennek eldöntésére a későbbiekben funkcionális vizsgálatok és további epidemiológiai vizsgálatok szükségesek. A vizsgálatunk másik újdonsága, hogy igazoltuk, hogy az AMD pathomechanizmusában eddig ismeretlen GAS6 gén egyik polimorfizmusa protektív hatással bír a nedves AMD kialakulására. A polimorfizmus kardiovaszkuláris betegségek ellen is véd, ennek ellenére az eredmény meglepő, és a kardiovaszkuláris betegségek és az AMD kapcsoltságát erősíti. Amennyiben biológiai hatást keresünk a jelenség mögött, az időskori makuladegeneráció pathomechanizmusában valószínűleg az apoptózist és angiogenezist szabályozó hatásai révén vesz részt. Eredményeink között a C3 interakciós hatása és a GAS6 protektív hatása tekinthető teljesen új, eddig ismeretlen eredménynek. Ezek megerősítése más populációkban és a polimorfizmusok hatásának funkcionális vizsgálata közelebb vihet bennünket az AMD pathomechanizmusának megértéséhez, a fehérjék interakciójának pontosabb feltárásához.

Negatív eredményünk is volt sajnos: nem sikerült közölhető eredményt produkálnunk a nedves típusú AMD kezelésének hatékonysága és a genetikai polimorfizmusok közötti

összefüggésről. Az ApoE polimorfizmusok 6 hónapnál mért hatásukat a 12 hónapos követési időnél elvesztették, illetve a többi polimorfizmus nem mutatott összefüggést a kezelés hatékonyságával. Eredményeinket a PlosOne folyóirathoz küldtük be, a bírálók válaszait várjuk.

Submissions Being Processed for Author Gergely Losonczy, M.D., Ph.D.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Current Status
<a href="#">Action Links</a>	PONE-D-12-18388	Effect of the Gas6 c.834+7G>A polymorphism and the interaction of known risk factors on AMD pathogenesis in Hungarian patients	Jun 25 2012 9:13PM	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

## Referenciák

1. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PT, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004; 122(4):564-72.
2. Seddon JM, Sharma S, Adelman RA. Evaluation of the clinical age-related maculopathy staging system. *Ophthalmology*. 2006;113:260–266.
3. Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, Piau E, Evans C, Zlateva G, Buggage R, Pleil A, Mitchell P. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol*. 2010 Dec 13;10:31.
4. Sofat R, Casas JP, Webster AR et al. Complement factor H genetic variant and age-related macular degeneration: effect size, modifiers and relationship to disease subtype. *Int J Epidemiol*. 2012 Jan 31.
5. Yates JR, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Hayward C, Morgan J, Wright AF, Armbrecht AM, Dhillon B, Deary IJ, Redmond E, Bird AC, Moore AT; Genetic Factors in AMD Study Group. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2007;357:553-61.
6. Ennis S, Gibson J, Cree AJ, Collins A, Lotery AJ (2010) Support for the involvement of complement factor I in age-related macular degeneration. *Eur J Hum Genet* 18:15–16.
7. Cipriani V, Matharu BK, Khan JC, Shahid H, Hayward C, Wright AF, Armbrecht AM, Dhillon B, Harding SP, Bishop PN, Bunce C, Clayton DG, Moore AT, Yates JR. No evidence of association between complement factor I genetic variant rs10033900 and age-related macular degeneration. *Eur J Hum Genet*. 2012 Jan;20(1):1-2; author reply 3. doi: 10.1038/ejhg.2011.118

8. The significance of the complement system for the pathogenesis of age-related macular degeneration - current evidence and translation into clinical application. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011;2:163-74
9. Smailhodzic D, Klaver CC, Klevering BJ, Boon CJ, Groenewoud JM, Kirchhof B, Daha MR, den Hollander AI, Hoyng CB. Risk Alleles in CFH and ARMS2 Are Independently Associated with Systemic Complement Activation in Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology.* 2012 Feb;119(2):339-46
10. Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, Keilhauer CN, Lichtner P, Meitinger T, et al. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet* 2005; 14(21):3227-36.
11. Yang Z, Tong Z, Chen Y, Zeng J, Lu F, et al. (2010) Genetic and Functional Dissection of HTRA1 and LOC387715 in Age-Related Macular Degeneration. *PLoS Genet* 6(2): e1000836. doi:10.1371/journal.pgen.1000836
12. Jiang L, Liu CY, Yang QF, Wang P, Zhang W. Plasma level of growth arrest-specific 6 (GAS6) protein and genetic variations in the GAS6 gene in patients with acute coronary syndrome. *Am J Clin Pathol.* 2009;131:738-43
13. Lutgens E, Tjwa M, Garcia de Frutos P, Wijnands E, Beckers L, Dahlbäck B, Daemen MJ, Carmeliet P, Moons L. Genetic loss of Gas6 induces plaque stability in experimental atherosclerosis. *J Pathol.* 2008;216:55-63
14. Duncan JL, LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Yang H, Trautmann N, et al. An RCS-like retinal dystrophy phenotype in mer knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:826-838
15. Losonczy G, Fekete Á, Vokó Z, Takács L, Káldi I, Ajzner É, Kasza M, Vajás A, Berta A, Balogh I. Analysis of complement factor H Y402H, LOC387715, HTRA1 polymorphisms and ApoE alleles with susceptibility to age-related macular degeneration in Hungarian patients. *Acta Ophthalmol.* 2011 May;89(3):255-62.
16. Zerbib J, Richard F, Puche N, Leveziel N, Cohen SY, Korobelnik JF, Sahel J, Munnich A, Kaplan J, Rozet JM, Souied EH. R102G polymorphism of the C3 gene associated with exudative age-related macular degeneration in a French population. *Mol Vis.* 2010 Jul 15;16:1324-30.
17. Kim SJ, Lee SJ, Kim NR, Chin HS. Association of polymorphisms in C2, CFB and C3 with exudative age-related macular degeneration in a Korean population. *Exp Eye Res.* 2012;96:42-7.

## **Világossejtes veserák kialakulása egy tizenöt éves VHL szindrómában szenvedő fiúban – 4 új VHL mutáció a hazai populációban**

Munkánk másik ágán a von Hippel-Lindau betegség genetikai hátterét vizsgáltuk. A VHL betegség autoszomális domináns öröklésű tumor szindróma, mely becslések szerint 1 embert érint minden 36.000-ból. A betegség központi idegrendszeri hemangioblastómára, világossejtes veserákra, feokromocitómára, endokrin pankreasz tumorra endolimfatikus tumorokra, és több más, kevésbé gyakori dagantos megbetegedésre hajlamosít. A betegség I. típusát alacsony, II-es típusát magas feokromocitóma rizikó jellemzi. IIA típusban az imsert manifesztációk mellett alacsony, IIB típusban magas a veserák kockázata. IIC típusban csak feokromocitóma fordul elő. A betegek általában egy VHL mutációt örököznek és az érintett szervekben az egészséges VHL allél elvesztése következtében alakul ki daganat (1-2). A VHL fehérje több fehérjéhez tud kapcsolódni. Ezek az Elongin C, Elongin B, HIF-1alpha, Cullin2, Rbx, p53 és fehérjék ubiquitin mediálta lebontásában vesz részt szubsztrát felismerő elemként. Egyik legfontosabb feladata a sejt oxigénérzékelő rendszerében betöltött szerepe: normoxiás körülmények között a HIF-1alpha megkötésével annak ubiquitin mediálta proteolitikus lebontásáért felel (3). A VHL fehérje két funkcionális szubdoménből áll. A béta domén (as. 63-154) a HIF-1alpha megkötéséért felel, míg az alfa domén az Elongin B és C kötőhelye (4). A betegséget okozó misszensz mutációk többsége a két kötőhely valamelyikét érinti. A VHL betegség hátterében több mint 800 genetikai eltérést igazoltak már (5-7). A genotípus-fenotípus összefüggéseket mégsem ismerjük tökéletesen, aminek több oka van: 1. közlés pillanatában nem lehet tudni, hogy a későbbiekben a közölt esetekben esetleg milyen manifesztációk jelentkeznek majd, 2. közlemények utólag nem módosíthatók, 3. a betegek esetleg kikerülnek az addigi vizsgálatokat végző intézményből, 4. ugyanazon ivarsejt-eredetű mutációhoz eltérő életkorban jelentkező és eltérő manifesztációk is társulnak a különböző családokban, 5. nem ismert, hogy a tumorok kialakulását miként befolyásolják a szomatikus mutációk. Mindezek miatt nehéz a genetikai státusból a betegség lefolyására vonatkozó pontos előrejelzést adni, ugyanakkor a saját beteganyagunk és a korábban közölt esetek feldolgozásakor találhatunk olyan összefüggéseket, melyek segítenek a genotípus-fenotípus összefüggés megismerésében és használhatóak a betegség szövődésének predikciójához, illetve legfőképp a betegség szűrővizsgálataink személyre szabásához.

## **Betegek és módszerek**

A VHL családok vizsgálata során 5 család 7 tagjában azonosítottunk VHL gént érintő mutációt. A VHL gént 50 egészséges egyénben is megszekvenáltuk. A betegek részletes szemészeti vizsgálaton estek át, mely magában foglalta a pupillatágítás melletti fundusfoto készítést és szükség esetén a fluoreszcein angiographiát. A belgyógyászati vizsgálatokat a DEOEC Ritka Betegségek Tanszéke koordinálta. Hasi ultrahang és MRI, koponya és gerinc MRI valamint laboratóriumi vizsgálatok történtek, a VHL szűrővizsgálati protokolljával összhangban (2,8,33,34). A vizsgálatok a Helsinki Nyilatkozattal összhangban, írásos beleegyező nyilatkozat aláírása után, a helyi Etikai Bizottság engedélyével történtek.

## **Genetikai módszerek, SIFT analízis, evolúciós konzerváltság analízise, molekulamodellezés**

A genetikai vizsgálatok módszertana tekintetében a mellékelt kézirat idevágó fejezetére hivatkozunk. Az egyes aminosavak evolúciós konzerváltságát a Constraint-based Multiple Alignment Tool (COBALT) on-line felületén végeztük el (9). A misszensz mutáció hatásának predikcióját on-line, a Craig Venter Institute SIFT eszközével végeztük (<http://sift.jcvi.org/>). A SIFT analízis elsősorban az aminosavak konzerváltságai foka alapján jósolja meg a mutációk fehérje funkciót érintő következményét. (10) SIFT analízisünk során nemcsak a saját populációnk misszensz mutációját, hanem az örökletes VHL betegségben eddig leírt minden aminosavcserét okozó mutációkat is megvizsgáltuk. Ezzel arra kerestük a választ, hogy az I-es és II-es típusú betegséget okozó mutációk között mutatkozik-e különbség a fehérje funkcióra kifejtett hatás tekintetében. 33 I-es és 33 II-es típust okozó, összesen 66 mutációt vizsgáltunk.

Az N78Y mutáció hatását VHL-HIF-1 $\alpha$ -Elongin C komplex térszerkezetére in silico modelleztük annak ismert geometriai koordinátáiból kiindulva (11). A modellezés részleteinek tekintetében utalunk a mellékelt kézirat idevágó fejezetére (12-16).

## **Eredmények**

Az 5 független család 7 I-es típusú VHL szindrómában szenvedő tagjának genetikai analízise során 4 új és egy korábban közölt VHL gén mutációt találtunk. Egyik mutációt sem találtuk

meg az 50 egészséges egyén 100 alléljének molekuláris genetikai vizsgálatakor. A betegek klinikai és genetikai adatait az alábbi táblázatban összegezzük.

Család	Betegek	RCC	CNS HB	Phaeo	RA	Egyéb manifesztáció	VHL fenotípus	ivarsejt eredetű mutáció	mutáció fehérjeszintű hatásaa
A	IP	15	-	-	15	-	1	c.163G>T	p.Glu55X
B	IP	-	48	-	48	-	1	c.232A>T	p.Asn78Tyr
	Brother	-	45	-	45	-	1	c.232A>T	p.Asn78Tyr
C	IP		14	-	12	-	1	c.340+1G>A	p.Gly114AspfsX6
	Father	34, bilateral	34	-	38	-	1	c.340+1G>A	p.Gly114AspfsX6
D	IP	25	25	-	-	-	1	c.555C>A	p.Tyr185X
E	IP	-	41	-	41	-	1	c.583C>T	p.195GlnX

1. Táblázat. A VHL szindrómában szenvedő betegek klinikai és genetikai adatai. RCC: világossejtes veserák, CNS HB: központi idegrendszeri hemangioblasztoma, RA: retinális angioma.

Az A jelű család két egészséges szülőből és I-es típusú VHL betegségben szenvedő 15 éves fiukból állt. A betegnek kétoldali retina angioma miatt szerózus retinaleválása volt. A VHL irányú kivizsgálás során hasi ultrahanggal a bal vesében 18 mm-es a jobb vesében 10 mm-es terimét találtak. Az elvégzett kontrasztos MRI vizsgálat idegyszövetre gyanús terimét írt le mindkét oldalon. A hasi műtét során eltávolított tumorok szövettani feldolgozása világossejtes veserákot igazolt. A betegben a c.163G>T azonnali trunkációt okozó borostyán nonszensz mutációt (p.55GluX) igazoltuk. A páciens szüleiben nem sikerült a mutációt kimutatni, ami de novo mutációra utal.

A B jelű család fiú és lány testvérpárjában a p.Asn78Tyr aminosavcserét okozó eddig ismeretlen mutációt (c.232A>T) találtuk. A család felmenőiben ismert volt a VHL betegség. A lánytestvérnél 48 éves korában egyoldali retina angiómát és MRI segítségével mindkét testvérnél cerebelláris hemangioblasztómát diagnosztizáltunk. A betegség más manifesztációját nem tudtuk igazolni.

A C család két szülőből és két lánygyermekükből áll. Az egyik gyermeknél 12 éves korában retina angiómát találtunk, majd a rendszeres szűrővizsgálatok során 14 éves korában gerincvelői hemangioblasztómát fedeztünk fel. Érdekes, hogy a 34 éves édesapja tünetmentes volt, de a VHL kivizsgálás során kétoldali világossejtes veserákot valamint gerincvelői és kisagyi hemangioblasztómát diagnosztizáltunk. A két érintett családtagban a VHL gén 1. intronjának donor helyét érintő splice mutációt (c.340+1G>A) találtunk. A másik gyermek és az édesanya esetében sem VHL manifesztációt, sem VHL gén mutációt nem tudtunk

kimutatni. A mutáció minden bizonnyal az első exon-intron határ splicing helyének elvesztéséhez, olvasási keret eltolódáshoz és korai fehérje terminációhoz vezet (p.Gly114AspfsX6).

A D családban egyetlen páciens volt elérhető a vizsgálatokra, hozzátartozója nem volt. Édesapja évekkor korábban központi idegrendszeri daganat következtében hunyt el, mely valószínűleg VHL szindróma következménye volt. A betegnél központi idegrendszeri hemangioblasztómát és világossejtes veserákot diagnosztizáltunk. A VHL génben a 185. aminosavnál közvetlen trunkációt okozó mutációt találtunk (c.555C>A, p.185TyrX). A genetikai mutáció eddig nem került közlésre, de a 185. aminosavnál trunkációt okozó mutációkat korábban már leírtak (18,6,30).

Az E család egyetlen érintett tagjában a már ismert c.583C>T protein trunkációt (p.195GlnX) okozó mutációt találtuk. Érdekes, hogy ezt a mutációt I-es és II-es típusú VHL betegségben is leírták (18,19, 23).

### SIFT analízis, konzerváltsági fok analízis

Az örökletes VHL betegségben eddig közölt misszensz mutációk döntő többsége a SIFT analízissel a fehérje funkcióra károsnak bizonyult. Ugyanakkor az I-es típusban a mutációk 18%-a, a II-es típusban a mutációk 35%-a a fehérjefunkció szempontjából tolerálhatónak adódott (Fisher's exact test, p=0.048). Megjegyzendő, hogy a tolerálható mutációk legalacsonyabb arányát, 11%-ot, a világossejtes veserákkal szövődött I-es típusban találtuk. Az alábbi ábrán a 78. helyen lévő Asn aminosav magas evolúciós konzerváltságát láthatjuk.

Homo Sapiens	58	RPRPVLR	SVNSREPSQVIFC	N	RS	PRVVL	PVWLN	FDGEPQPY	98
Pongo pygmaeus	58	RPRPVLR	SVNSREPSQVIFC	N	RS	PRVVL	PVWLN	FDGEPQPY	98
Rattus norvegicus	24	RPRPVLR	SVNSREPSQVIFC	N	RS	PRVVL	PLWLN	FDGEPQPY	64
Mus musculus	24	RPRPVLR	SVNSREPSQVIFC	N	RS	PRVVL	PLWLN	FDGEPQPY	64
Canis familiaris	59	-PRPVLR	SVNScEPSQVIFC	N	RS	PRVVL	PVWLN	FDGEPQPY	98
Xenopus tropicalis	12	---	PqLR	fNSR	QPvQ	VVFC	N	RStRtVqPIWVNFQ	GDPQSY 49

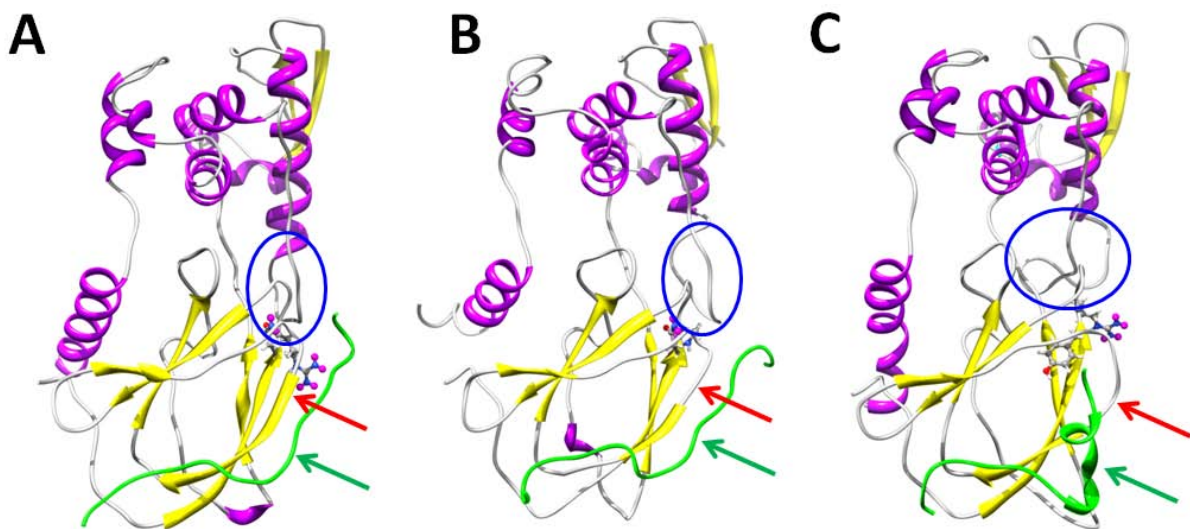
1. ábra. Az Asn 78 aminosav filogenetikailag konzervált.

A SIFT analízis a 78 aminosavat érintő jelenlegi és összes korábban közölt aminosavcserét károsnak jelzett: ebben a pozícióban a tirozin, hisztidin, izoleucin és szerin és treonin 0,0,0, 0.03 és 0.04-es SIFT értékeket mutatott. Minden SIFT analízis 3,25-ös átlagos konzerváltsági érték alatt volt ami a vizsgálatok megbízhatóságát igazolta.

### Az Asn78Tyr aminosavcsere hatása a fehérje térszerkezetére



Az általunk vizsgált időkeretben a vad típusú VHL-HIF1alpha-Elongin C komplex térszerkezete rendkívül stabilnak bizonyult, amit az analízis első és utolsó képkockáit megjelenítő 2-es ábra A és B részábrája mutat. Az Asn78Tyr aminosavcsere azonban a VHL fehérjében a 77-83-as hurkot jelentősen deformálja. Ez a hurkot stabilizáló Asn78.Arg82 H-kötés felbomlásából is látszik, melyet a tirozin aszparaginhoz képest jóval nagyobb oldallánca magyarázhat. Ez a deformáció a Thr100-Arg107 hurok deformációját okozza (piros nyíl), mely végül a VHL-HIF1-alpha interakció felbomlásához vezet (zöld nyíl). Érdekes, hogy habár az Elongin C Arg82-Phe93 hurokját is érinti a deformáció, ennek a két fehérjének a kapcsolata a vizsgálat alatt megmaradt.



2. ábra. Az Asn78Tyr aminosavcsere hatása a VHL-HIF1alpha-ElonginC komplexre. A: vad típus, kezdeti konformáció, B: vad típus, vizsgálati periódus időszakának végén mért konformáció, C: a mutáns fehérje konformációja az analízis időkeretének végén. A piros nyíl a Thr100-Arg107 hurok deformációját, a zöld nyíl a VHL-HIF1alpha disszociációját mutatja.

### Diszkusszió

Öt család 7 tagjában igazoltunk I-es típusú VHL betegséget az irányelveknek megfelelő szemészeti, képalkotó és laboratórimui vizsgálatok alapján. Genetiaki vizsgálatok során 4 új és egy korábban leírt VHL gén pontmutáció találtunk. A jelen és egy korábbi közlés szerint Magyarországon 12 VHL betegséggel érintett család van (32). A nonszensz, misszensz, kereteltolódási és trunkációhoz vezető mutációk aránya a nemzetközi adatokhoz hasonlatos, attól jelentős eltérést nem mutat (7). A c.232A>T (p.Asn78Tyr) új mutáció I-es típusú VHL

betegséget okozott. A 78-as tirozin filogenetikailag konzervált, amit szekvencia összehasonlítással és SIFT analízissel is bizonyítottunk. Eszerint az aminosav a fehérje szerkezet és funkciója szempontjából fontos szerepet tölt be és mutációi térszerkezet változáshoz és funkcióvesztéshez vezethetnek. Ebben a pozícióban más mutációkat (His, Ser, Thr, Ile) már leírták a VHL betegség hátterében és a mi esetünkhöz hasonlóan I-es típusú VHL betegséggel társultak (17-24). A 78-as pozícióban lévő aszparagin a VHL fehérje béta domén mélyén helyezkedik el. Az itt előforduló mutációk általában I-es típusú VHL betegséget okoznak, míg a fehérje felszíni mutációk ettől nagyon gyakorisággal okoznak feokromocitómát (23). Világossejtes veserák nem társult esetünkben a p.Asn78Tyr mutációhoz, ugyanakkor ebben a pozícióban több mutációval kapcsolatban is leírták már (17-24). Egy másik közleményben azt találták, hogy a 74-90. aminosav pozíció közös eső mutációk nagy eséllyel okoznak világossejtes veserákot (18). A p.Asn78Tyr aminosavcsere hatását molekulamodellezéssel vizsgáltuk. Az Asn78 oldallánca annak a huroknak a fő stabilizáló ereje, amelyben elhelyezkedik. a 78-82 H-kötés felbomlása destabilizálja ezt a hurkot, amiben a nagy tirozin oldalláncnak is komoly szerep jut (2.ábra). A mutáció legjelentősebb hatása, hogy a VHL-HIF1alpha kapcsolatot felbontja. Bár a VHL és ElonginC fehérjék között is vannak felbomló sóhidak (Arg79VHL-Glu89Elongin C és Arg82VHL-Glu92Elongin C), a két fehérje kapcsolatának felbomlását nem tudtuk a vizsgálattal megerősíteni. VHL mutáns fehérjék in vitro analízise azt mutatta, hogy a HIF-1alpha ubiquitinációra és lebontásra csak a IIc betegséghez társuló mutációk képesek, minden más mutáció ebben valamilyen mértékű funkcióvesztést okoz. Ugyanakkor a HIF-1alpha reguláció képességének teljes mértékű elvesztését csak a világossejtes veserákot okozó mutációk mutatták (26). Ezzel részben megegyező eredményt adott egy in silico analízis, ugyanakkor nem mutatott fokozatokat a HIF reguláció képességében és azt találta, hogy minden olyan mutáció, ami a béta domén H-kötés hálózatának felbomlását és így térszerkezeti átalakulását okozza, a HIF-1alpha reguláció képességének elvesztéséhez vezet. Az eddigi eredményeket összegezve megállapítható, hogy azok a béta domén mutációk, mely a VHL-HIF-1alpha kapcsolat felbomlásához vezetnek I-es típusú VHL betegséget okoznak és a világossejtes veserák magas kockázatával járnak. Ezen ismeret tükrében és a molekulamodellezésünk eredményének ismeretében azt a következtetést hozhatjuk, hogy p.Asn78Tyr aminosavcsere I-es típusú VHL betegséget okoz és magas veserák valamint alacsony feokromocitóma kockázattal jár. Az örökletes VHL betegségben korábban közölt aminosavcserek SIFT analízise azt mutatta, hogy a II-es típusú VHL betegségben szignifikánsan több tolerálható mutációt írtak le eddig, mint az I-es típusban, ami szintén a fehérje térszerkezeti változást

okozó aminosavcserék és az I-es típusú VHL kapcsoltát támasztja alá. Emellett rámutat, hogy a SIFT analízis a VHL mutációk hatásának gyors predikciójára is alkalmas.

Ahogy várható volt, a nonszensz mutációk mind I-es típusú VHL betegséget és két esetben világossejtes veserákot okoztak. Korábbi közleményekből ismert, hogy a nagy deléciók, a misszensz és olvasási keret eltolódást eredményező mutációk I-es VHL fenotípust okoznak (6,17,18,19,28,30). Szintén ismert, hogy a világossejtes veserák is gyakrabban társul protein trunkációhoz vezető mutációkhoz, mint misszensz mutációkhoz (23,31). A nonszensz mutációk a lokalizációjuktól függetlenül fiatalabb életkorban okoznak VHL szindrómát és az magasabb korfüggő angioma és veserák kockázattal járnak (23). Ezt támasztja alá az általunk leírt 15 éves fiú esete, akinek nonszensz VHL mutációja (p.55X) kétoldali retina angiomát és kétoldali világossejtes veserákot okozott. Ez a világossejtes veserák eddigi legfiatalabb kori megjelenése, melyet VHL betegségben közöltek, az eddigi legfiatalabb veserákos eset ugyanis 16 éves volt (1,29). Ezzel összhangban a VHL betegség követési protokollja szerint a hasi MRI vizsgálatot 16 éves korban, a hasi ultrahang vizsgálatot 8 éves korban kell kezdeni és évente ismételni (2,8,33,34). Ugyanakkor a protokoll nem veszi figyelembe a betegek genetikai státuszát. Az általunk leírt korai veserák megjelenés nonszensz mutációhoz társult, melyről ismert, hogy korai manifesztációt és magas veserák kockázatot jelent. Esetünk azt bizonyítja, hogy az eddig leírt legfiatalabb 16 évnél hamarabb is megjelenhet a veserák, valamint felveti, hogy épp emiatt a genetikai státusz ismeretében a szűrési protokollt személyre szabottan kellene megtervezni. Ha figyelembe vesszük, hogy az MRI nagyobb felbontóképessége miatt hamarabb képes a VHL szövődményeket detektálni, érdemes megfontolni a nonszensz mutációt hordozó betegeket hasi MRI vizsgálatának egy évvel korábbi, azaz 15 évesen történő megkezdését. Esetünket továbbgondolva azonban az is felmerül, hogy a hatalmas genotípus-fenotípus adatmennyiség ismeretében a teljes szűrési protokoll újragondolása és genetikai alapon történő személyre szabása lenne kívánatos.

Munkánk a VHL betegség genotípus-fenotípus összefüggéseinek pontosabb megismeréséhez és megértéséhez, valamint a betegek szűrési, követési vizsgálatainak programozásához ad segítséget. **A kéziratot a BMC Medical Genetics folyóirathoz küldtük be (IF: 2.33)**

Az OTKA pályázat témájához rendkívül közel álló szemészeti genetikai témájú közleményünket itt csak megemlítjük. Az ebben a közleményben szereplő kutatók közül hárman is részesei a jelen OTKA projektnek, és a kutatók munkaidőfordítása miatt feltüntettük az OTKA támogatását (Takács L, Losonczy G, Matesz K, Balogh I, Sohajda Z, Tóth K, Fazakas F, Vereb G, Berta A. TGFBI (BIGH3) gene mutations in Hungary--report of

the novel F547S mutation associated with polymorphic corneal amyloidosis. Mol Vis. 2007 Oct 18;13:1976-83.)

Köleményeink angol nyelvű kéziratái

## **Effect of the Gas6 c.834+7G>A polymorphism and the interaction of known risk factors on AMD pathogenesis in Hungarian patients**

Gergely Losonczy<sup>1</sup>, Attila Vajas<sup>1</sup>, Lili Takács<sup>1</sup>, Erika Dzsudzsák<sup>2</sup>, Ágnes Fekete<sup>3</sup>, Éva Márhoffer<sup>1</sup>, László Kardos<sup>4</sup>, Éva Ajzner<sup>5</sup>, Begoña Hurtado<sup>6</sup>, Pablo Garcia de Frutos<sup>6</sup>, András Berta<sup>1\*</sup> and István Balogh<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, <sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, <sup>3</sup>Department of Anesthesiology and Intensive Care, University of Debrecen, Debrecen, <sup>4</sup>Hygiene and Infection Control Services, Kenézy Gyula County Hospital, Debrecen, <sup>5</sup>Central Laboratory, Jósa András Teaching Hospital, Nyíregyháza, Hungary, <sup>6</sup>Department of Cell Death and Proliferation, Institute of Biomedical Research of Barcelona (IIBB-CSIC, IDIBAPS), Barcelona, Spain.

Corresponding author: Gergely Losonczy MD PhD, University of Debrecen, Medical and Health Science Center, Department of Ophthalmology, H-4032, Nagyerdei krt. 98, Debrecen, Hungary.

Telephone: +36 52 255626, Fax: +36 52 255456

E-mail: losigeri@gmail.com

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

\* These two authors contributed equally

### **Abstract**

Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of blindness in the elderly in the developed world. Numerous genetic factors contribute to the development of the multifactorial disease. We performed a case-control study to assess the risk conferred by known and candidate genetic polymorphisms on the development of AMD. We searched for genetic interactions and for differences in dry and wet AMD etiology. We enrolled 213 patients with exudative, 67 patients with dry AMD and 106 age and ethnically matched controls. Altogether 12 polymorphisms in Apolipoprotein E, complement factor H, complement factor I, complement component 3, blood coagulation factor XIII, HTRA1, LOC387715, Gas6 and MerTK genes were tested. No association was found between either the exudative or the dry form and the polymorphisms in the Apolipoprotein E, complement factor I, FXIII and MerTK genes. Gas6 c.834+7G>A polymorphism was found to be significantly protective irrespective of other genotypes, reducing the odds of wet type AMD by a half (OR=0.50, 95%CI: 0.26-0.97, p=0.04). Multiple regression models revealed an interesting genetic interaction in the dry AMD subgroup. In the absence of C3 risk allele, mutant genotypes of both CFH and HTRA1 behaved as strongly significant risk factors (OR=7.96, 95%CI: 2.39-26.50, p=0.0007, and OR=36.02, 95%CI: 3.30-393.02, p=0.0033, respectively), but reduced to neutrality otherwise. The risk allele of C3 was observed to carry a significant risk in the simultaneous absence of homozygous CFH and HTRA1 polymorphisms only, in which case it was associated with a near-five-fold relative increase in the odds of dry type AMD (OR=4.93, 95%CI: 1.98-12.25, p=0.0006).

Our results suggest a protective role of Gas6 c.834+7G>A polymorphism in exudative AMD development. In addition, novel genetic interactions were revealed between CFH, HTRA1 and C3 polymorphisms that might contribute to the pathogenesis of dry AMD.

## Introduction

Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of visual impairment in the elderly in developed countries, most prominently in white populations [1,2]. The prevalence of the disease increases with age reaching as much as 15% above the age of 80 [3]. AMD is a multifactorial disease characterized by progressive degeneration of the central retina leading to visual deterioration. Early stages of AMD are characterized by retinal pigment abnormalities and accumulation of small deposits called drusen under the macular area of the retina. Two advanced forms of the disease are distinguished: extensive pigment epithelium atrophy also referred to as geographic atrophy (GA) leading to irreversible and untreatable visual deterioration or subretinal neovascular membrane (SRNVM) formation characterized by intra- or subretinal invasion of new vessels arising from the choroid. Multiple methods have been developed to determine the severity of the disease and to estimate the risk of progression from early to late stages. The neovascular form is referred to as exudative or wet type, while AMD without any neovascular component is considered non-exudative or dry type AMD [4]. Although the etiology of the disease is still largely unclear, several risk factors have been unequivocally linked to AMD, including advanced age, European origin and smoking. Other factors including high cholesterol level, sunlight exposure, blue iris, oxidative damage, hypertension, obesity and inflammation have also been linked to AMD development, however, with inconsistent results [5,6]. Cataract surgery has been shown to increase risk exclusively of dry late AMD, however carriers of two complement factor H (CFH) risk alleles are prone to develop all types of AMD [7].

In recent years a growing number of evidence has supported the role of genetic risk factors in AMD pathogenesis. The most widely studied and strongest genetic risk factors map to genes of the alternative complement pathway and its regulators, and are most likely responsible for an imbalance in the complement activation. Additionally, there is a wide range of chromosome regions and genes with different functions implicated in AMD pathogenesis. Because in most studies sharp clinical difference between cases and controls is ascertained by recruiting cases with unequivocally advanced phenotype, little is known about the genetic background of intermediate dry AMD. It is still an open question what makes the difference in the genetic etiology of exudative and non-exudative AMD [8].

After the initial reports [9,10,11], numerous case-control studies have provided supportive evidence for a strong association between AMD and the p.Tyr402His (rs1410996) polymorphism of the CFH gene in different populations. According to a very recent meta-

analysis of 24 case-control studies the p.Tyr402His variant confers a 2-fold higher risk of late-AMD per copy in individuals of European descent [12].

Other components of the complement system have also been implicated in AMD pathogenesis. The initial report demonstrated that the p.Arg102Gly (rs2230199) polymorphism in the Complement factor 3 (C3) gene confers statistically significant risk to AMD with an odds ratio of 1.7 for heterozygotes and 2.6 for homozygotes in comparison to wild type subjects [13]. Later similar odds ratios were reported equally contributing to early and late AMD. The risk was independent of CFH p.Tyr402His and LOC387715 p.Ala69Ser polymorphisms [14,15].

The rs10033900 polymorphism of Complement factor I (CFI), a proteolytic regulatory enzyme inactivating C3b has been shown to be associated with AMD [16,17], however a recent paper failed to confirm this association [18].

Strong association has been confirmed between AMD and the p.Ser69Ala (rs10490924) polymorphism in LOC387715 coding a protein of unknown function [19,20] or a promoter SNP of the HTRA serine peptidase 1 (HTRA1) gene (rs11200638) [21,22,23,24]. These two polymorphisms are located in close vicinity and it is still a subject of debate which of the two plays a role in the pathomechanism of the disease.

Although lipids are major components of drusen, proteins involved in lipid transportation have been linked to AMD pathogenesis only recently [25]. Apolipoprotein E (ApoE), a polymorphic gene with three common allelic variants (E2, E3 and E4) has also been connected to the pathogenesis of AMD. E3 is the major allele among whites. E4 allele has been reported to decrease AMD risk, or at least delay the occurrence of the disease. In contrast, the presence of the E2 allele is associated with increased risk and younger age at diagnosis [26,27,28]. ApoE E4 proved to be protective with an odds ratio of 0.5 (95%CI: 0.29-0.86) in a study comprising of 3137 individuals [29]. Another study demonstrated a protective effect of the E4 allele only in the neovascular AMD patient group with an OR of 0.61 (95%CI: 0.38-0.97) [30]. In contrast with these findings, a Spanish study reported an increased risk for AMD due to the ApoE E4 allele, with an OR of 5.6 [31]. Previously we could not demonstrate statistically significant association between ApoE alleles and AMD in a Hungarian population. However, the potential risk factor E2 allele was less frequent in patients than in controls (0.066 and 0.1, respectively) while the E4 allele was more frequent in the patient group than in controls (0.108 versus 0.084, respectively), interestingly [32]. The somewhat inconsistent findings on the association of AMD and ApoE called for a recently

published pooled analysis (n=21.160) demonstrating that the E2 allele in homozygous form confers risk (OR=1.83, 95%CI: 1.04-3.23) and the E4 allele is protective (OR=0.72 per haplotype; 95%CI: 0.65-0.74) in late AMD [33]. A recent well powered case-control study (including 2187 cases and 2187 age and ethnically matched controls) demonstrated disease risk of the E2 allele compared to the E3/E3 genotype (OR=1.32, 95%CI: 1.11-1.58). However, the E2 allele only conferred risk to early AMD in the never smoker and previously smoker group, while the E4 allele was protective against early AMD exclusively in the current smoker population [34].

The growth arrest-specific gene 6 (Gas6) product is a vitamin K dependent protein secreted by leukocytes and endothelial cells in response to injury. Gas6 has a high structural homology with the natural anticoagulant protein S. It has not been implicated in AMD pathogenesis so far, however there are certain functions of the protein and several reports on its contribution to cardiovascular diseases that make it a possible candidate for AMD. It has growth factor-like properties through its interaction with receptor tyrosine kinases of the TAM family; Tyro3, Axl and MerTK, this way it contributes to the regulation of angiogenesis, cell survival, proliferation, migration and adhesion, making it a relevant participant of biological processes like atherogenesis and thrombosis [35,36,37,38]. Recently, we found that Gas6 is present in the human circulation [39] and a Gas6 polymorphism (c.834+7AA genotype) is associated with decreased risk of stroke (OR: 0.59; 95%CI: 0.37-0.93). Others found similar association with acute coronary syndrome, and type 2 diabetes [36,40,41]. It is important to note that the TAM receptor tyrosine kinases and their ligands Gas6 and Protein S are essential for the phagocytosis of apoptotic cells and membranes in the immune, nervous, and reproductive systems [42]. Moreover, MerTK receptor is the key player involved in photoreceptor outer segment phagocytosis by RPE cells. MerTK knock-out mice develop almost total degeneration of the retinal photoreceptor layer by 10 weeks of age [43,44,45].

The aim of our present case-control study was to refine the association of the known polymorphisms and AMD subtypes in the Hungarian population and to explore the interplay of different polymorphisms. We considered MerTK and its ligand Gas6 as candidate genes to play a role in AMD pathogenesis and searched for association between their polymorphisms and the disease.



## **Patients and Methods**

### **Ethics Statement**

The study was approved by the Institutional Ethics Committee of the University of Debrecen and the procedures strictly adhered to the tenets of the declaration of Helsinki.

### **Patients**

In total, 386 subjects were enrolled in the case-control study: 213 patients with exudative AMD, 67 patients with dry AMD and 106 unrelated ethnically matched healthy controls were ascertained in Eastern-Hungary at the Department of Ophthalmology, University of Debrecen between 2005 and 2011. The control group consisted of individuals attending to the Outpatient Clinic because of refractive disorders, or post-cataract follow-up visits. To maximize the reliability of our study, we deliberately selected controls to be somewhat older than patients. Written informed consent was obtained from all participants. Detailed patient history was recorded with the use of a questionnaire focusing on known or suspected non-genetic risk factors of AMD such as cigarette smoking, exposure to blue light, medical history of acute myocardial infarction, ischemic heart disease and deep venous thrombosis. Cigarette smoking was determined in packyears. Smoking of one pack of cigarettes daily for a period of one year was considered one packyear. Body mass index (BMI) was calculated on the actual body height and weight values when ascertained that no considerable change in body weight occurred in the past 10 years. An average BMI was calculated in patients with significant loss or increase of body weight based on body weight values of the previous 10 years period. Color fundus photographs were taken of patients and controls. Fluorescein angiography was used to investigate patients with exudative AMD. Grading of the severity of the disease was based on the clinical age-related maculopathy staging system (CARMS) [4]. For statistical analysis, patients were classified according to the more severely affected eye into two groups corresponding to either dry or wet AMD. No signs of AMD, such as abnormal pigmentation or soft drusen were observed in controls. Color fundus photographs and fluorescein angiograms were evaluated by two experienced ophthalmologist (T.L. and L.G.). Patients or controls with other ocular diseases interfering with reliable evaluation of AMD were not included in the study.

## **Molecular genetic methods**

Molecular genetic methods for the detection of the common ApoE alleles, CFH p.Tyr402His polymorphism, LOC387715 rs10490924 (p.A69S) and HTRA1 rs11200638 polymorphisms were used as described earlier [32]. Factor XIII Val34Leu polymorphism was detected using fluorescent PCR and hybridization probes [46]. Similar methodology was used for the genotyping of Gas6 rs8191974 (c.834+7G>A) polymorphism and for the MerTK rs86016 (g.2920G>A) polymorphism, as described earlier [47]. Complement C3 rs2230199 (p.Arg102Gly) polymorphism was tested using a PCR-RFLP method. Amplification was performed using the primers: C3R102F: 5'- CAG GGA GTT CAA GTC AGA AAA GG -3' and C3R102R: TCT TGT CTG TCT GGA TGA AGA GG -3'. The 131 bp PCR product was then subjected to the digestion with *Cfo*I restriction endonuclease. The sole restriction site of the enzyme in the PCR product is lost when the mutation is present. The candidate, most likely a tag SNP, that has been shown to be associated with AMD, rs10033900 in the complement factor I (CFI) gene was tested using TaqMan SNP Genotyping assay. TaqMan assays were also used for the detection of the MerTK I1b rs17835605 (g.4916C>T), MerTK I1c rs10496440 (g.8809A>C) and MerTK I4 rs7573344 (g.60127A>G), as described earlier [47].

For the verification of all in-house mutation detection methods described above, randomly selected samples were sequenced with the same primers that were used for PCR amplification. No discrepancy was found in any of the tested samples.

## **Statistical methods**

Biallelic polymorphisms were tested using the chi-square test for the deviation of Hardy-Weinberg equilibrium in the control group. Continuous and categorical variables were described in terms of mean (SD) and frequency (%), respectively, in AMD subtype groups and in controls. Unadjusted between-group comparisons were made using ANOVA or Kruskal–Wallis tests subject to normality and homoscedasticity assumptions (continuous variables), and Fisher's exact test (categorical variables). Unadjusted effects of explanatory variables were estimated using simple logistic regression and expressed as odds ratios and 95% confidence intervals (CI). Continuous variables were transformed with the formula providing the best achievable fit. Categorical variables were regrouped by pooling groups with close to identical effects if applicable. Models were fitted for the total sample and for subsamples formed by restricting cases to dry or wet AMD variants. Adjusted effects were estimated using multiple logistic regression. Age and cataract surgery were included as a

priori adjustment covariates without effect interpretations, due to their association with study group inherent in the control recruitment methods used. Further variable selection was based on an iterative procedure where models were started by including all explanatory variables with significant unadjusted effects, adding each of the rest one by one and keeping if meaningful, and were made parsimonious by eliminating those of neutral behavior. Possible interactions between explanatory variables of models thus developed were systematically evaluated and kept if found significant. For comparability between dry and wet AMD variant models, genetic interactions included in any subtype model were also used in the other. Model fit was checked using Hosmer–Lemeshow tests for all three final models. As HTRA1 rs11200638 and LOC rs10490924 are in linkage disequilibrium, for the analysis HTRA1 rs11200638 was selected.

## **Results**

### **Characteristics of the study population**

In total, 280 patients and 106 controls were enrolled in the present study. Basic characteristics of the study population are summarized in Table 1. Patients were divided into two subgroups according to disease phenotype involving 213 patients in the wet and 67 patients in the dry AMD subgroups. There was a slight female predominance among wet AMD patients which is in line with European data on gender distribution in neovascular AMD [48].

There was no significant difference between the ages of the dry and wet subgroups of patients, however, controls were significantly older than patients as a result of intentionally older control selection. Cataract surgery was also more common in the control group because of controls selection methods and probably because the older age of the controls. There was no statistically significant difference between patients and controls in terms of frequency of hypertension, deep venous thrombosis, myocardial infarct, smoking and body mass index. Interestingly, outdoor profession was significantly more frequent among controls than patients.

### **Genotype distribution and allele frequency of the analyzed polymorphisms**

The genotype distributions in controls and patients are shown in Table 2 and 3, respectively. Allele frequencies of the analyzed polymorphisms are summarized in Table 4. Actual sample number is provided for each test. Small differences are due to the shortage of DNA sample quantity available. The control group showed no statistical difference from Hardy-Weinberg

equilibrium in the case of the tested polymorphisms. Minor alleles of genes unequivocally linked to AMD were more frequent in patients than in controls. However, the minor CFI, FXIII and Gas6 alleles were overrepresented in controls. Except I1a, MerTK receptor polymorphisms showed a very low minor allele frequency and no notable difference between cases and controls. In case of ApoE the most common E3 allele was slightly more frequent in patients than in controls while the potential risk factor E2 allele was less frequent in patients than in controls. The ApoE E4 allele had similar frequency in all the three groups.

### **Multiple regression models**

Polymorphisms that failed to show any significant association with AMD after adjustment and had no interaction with any other polymorphisms are summarized in Table 5.

The model of pooled dry and wet AMD variants revealed strongly significant adjusted risks in case of the presence of homozygous polymorphisms in the CFH and HTRA1 genes, increasing the odds of AMD by more than five and nearly ten times (OR=5.3, 95%CI: 2.5-11.5,  $p<0.0001$ , and OR=9.8, 95%CI: 3.3-29.5,  $p<0.0001$ ), respectively. An indication of a weak protective effect of allele A of the Gas6 c.834+7G>A polymorphism was also apparent (OR=0.59, 95%CI: 0.33-1.06,  $p=0.077$ ). No significant interactions were found between any pairs of these variables.

Factors showing remarkable adjusted associations with dry type AMD are shown in Figure 1. These are genes C3, CFH, and HTRA1, with interactions between both C3 and CFH ( $p=0.020$ ) and C3 and HTRA1 ( $p=0.024$ ). The heterozygous/homozygous genotype of C3 carried a significant risk over wild type genotype in the simultaneous absence of homozygous CFH and HTRA1 polymorphisms only. In this case it was associated with a near-five-fold relative increase in the odds of dry type AMD (OR=4.93, 95%CI: 1.98-12.25,  $p=0.0006$ ). The stratum of subjects with homozygous mutated HTRA1 and CFH genes contained an insufficient number and distribution of observations for C3 effect estimation. In the case of wild type C3 genotype, mutated alleles of both CFH and HTRA1 behaved as strongly significant risk factors (OR=7.96, 95%CI: 2.39-26.50,  $p=0.0007$ , and OR=36.02, 95%CI: 3.30-393.02,  $p=0.0033$ , respectively), but reduced to neutrality otherwise (Figure 1).

Factors found to have significant associations with wet type AMD included the genes Gas6, CFH, and HTRA1 (Figure 1). Gas6 was significantly protective irrespective of other genotypes, reducing the odds of wet type AMD by a half (OR=0.50, 95%CI: 0.26-0.97,  $p=0.04$ ). There was no evidence for the effect of C3 (left in the model for comparability with the dry variant), and although C3's odds ratios specific for different combinations of CFH and

HTRA1 genotypes showed a fairly varied pattern, the interaction was technically not significant, unlike in the case of the dry AMD. However, there was some indication that the effect of HTRA1 (homozygous vs wild type or heterozygous genotype) was modified by the C3 genotype, with estimated odds ratios of 45.04 (95%CI: 5.30-382.83,  $p=0.0005$ ) and 4.34 (95%CI: 1.09-17.28,  $p=0.0372$ ) in C3 wild type and hetero/homozygous mutated genotypes, respectively. Homozygous CFH polymorphism was observed to be a highly significant risk factor for wet type AMD, with odds ratios slightly varying around 7.5 depending on whether mutations in C3 were present or not. All models had a sufficient goodness-of-fit by Hosmer–Lemeshow tests.

## Discussion

Our understanding about the genetic causes and therefore pathological pathways involved in the development of AMD has increased substantially in the last few years. The p.Tyr402His polymorphisms of the CFH gene, the rs11200638 polymorphism of the serine peptidase HTRA1 and the p.Ala69Ser polymorphism of the LOC387715 gene are unequivocally associated to AMD in different populations with robust risks. Our results further support these observations and demonstrate robust and highly significant adjusted risk conferred by these polymorphisms as shown by the analysis of the pooled AMD population. After dividing the patient group to exudative (wet) and non-exudative (dry) subgroups, other associations and an interesting genetic interplay was revealed. The rs2230199 polymorphism of the C3 gene contributed significant disease risk to non-exudative AMD in the simultaneous absence of homozygous CFH and HTRA1 polymorphisms. Alternative complement activation is the major biological process linked to AMD development so far. C3 plays a central role in the alternative pathway and its role in AMD pathogenesis is supported by epidemiological and experimental observations. The C3 polymorphism had no significant effect on the development of wet AMD in our study population.

Epidemiological reports on the p.Arg102Gly C3 polymorphism are usually limited to advanced cases including neovascular AMD and geographic atrophy. This approach, however, falls short of detecting any difference between the etiology of dry and wet AMD. Despite the fact that CFH and C3 are members of the same biological pathway, no evidence of a genetic interplay between these two has been demonstrated so far [49]. Carriers of two risk alleles of the rs2230199 polymorphism of the C3 gene are at moderate risk to develop AMD compared to wild type subjects (OR: 1.88, 95%CI: 1.59-2.23) according to a recent meta-analysis [15]. Besides that, it is well known that, drusen, the hallmark of dry AMD

contains complement factors 3a and 5a among other inflammatory proteins, which therefore could play a role in drusen formation and might even have an effect on neovascularisation [50,51,52,53,54]. Experimental evidence showed that suppression of the complement cascade in the retina delayed and reversed the onset of AMD in a monkey model of dry AMD [55]. The effect of CFH and C3 polymorphisms are mutually exclusive on the risk of dry AMD in our study population. On the other hand, CFH has a robust effect on neovascular AMD independent of the C3 status. Since the two proteins are located in the same biological pathway, our results can be explained with the stronger effect overriding the other. Interestingly, the interaction between C3 and HTRA1 is very similar, which indicates that C3 and HTRA1 are also competing in dry AMD development. This finding underscores previous reports on the role of HTRA1 in complement regulation [56]. Taken together our findings indicate a central role of C3 in dry AMD formation, however, CFH and HTRA1 genotype have an influence on the effect of the C3 p.Arg102Gly polymorphism most likely explained by their complement regulatory activity. CFI has been associated to AMD development with conflicting results. Fagerness et al. reported an OR of 0.7 for the lower risk C allele ( $p=6.46 \times 10^{-8}$ ) of the rs10033900 polymorphism within the CFI gene in a large population of European descent [16]. Chen et al found a statistically significant association of the rs2285714 risk allele and AMD with a moderate OR of 1.31 (95%CI: 1.18-1.45,  $p=3.4 \times 10^{-7}$ ) [57]. Seddon et al. demonstrated that the protective effect of the hepatic lipase (LIPC) rs10468017 polymorphism on AMD pathogenesis was stronger in the presence of double wild type rs10033900 compared to the homozygous polymorphism [58]. The findings of the original article by Fagerness were reflected in three case-controls studies. A report on a Japanese population demonstrated an OR of 0.28 (95%CI: 0.11–0.69,  $p=0.0035$ ) for the rare homozygous CC genotype [59]. The work of Ennis et al. supports the involvement of the CFI gene in AMD development by demonstrating four SNP's in the CFI gene associating to AMD, however the effect of the rs10033900 polymorphism, which had the strongest association signal in the original work of Fagerness, was not statistically significant in their cohort ( $p=0.135$ ). Interestingly, the haplotype including rs10033900 polymorphism and another non-significant polymorphism together conferred statistically significant disease risk (OR=2.15,  $p=0.02$ ) [17]. A very well powered case-control study based on independent samples from England and Scotland failed to detect any statistically significant effect of the rs10033900 polymorphism on AMD (OR=0.95, 95%CI: 0.83-1.09,  $p=0.47$ ) [18]. Similarly to that, in the present study we could not provide any additional support for the association of the rs10033900 polymorphism and AMD. Although our sample size is not as large as some of

the cited works, it is large enough to detect strong or even weak but significant associations with other well established risk factors of AMD as demonstrated by our findings on the CFH, LOC387715, HTRA1 and C3 polymorphisms. Our results are in line with studies showing no effect of the rs10033900 polymorphism. Although one cannot exclude such an association based on a single negative result, there are a growing number of publications falling short of detecting any effect of the polymorphism which clearly indicates that the association is not unequivocal and calls for further epidemiological and functional analysis to clarify the link between CFI and AMD.

No evidence of association with AMD could be demonstrated in the case of ApoE alleles. We neither could confirm previous reports on the protective effect of the E4 allele, nor could we show any risk related to the E2 allele. Two recent very-well powered epidemiological studies [33,34] concluded on the disease causing effect of the E2 allele and the protective role of the E4 allele. Albeit these convincing studies, our results still do not fit in the line. Interestingly, we could not observe any statistically significant disease association with any of the ApoE alleles, moreover the frequency of the E2 risk allele was higher in controls than in patients, while the protective E4 allele showed similar frequencies in the wet AMD and the control group. These data indicate that ApoE is not a key player in AMD pathogenesis in the Hungarian population. This can either be explained by a geographical difference, or by other different environmental factors, probably the different smoking habits of the Hungarian population.

Candidate gene approach is widely used to identify biological pathways and genes involved in pathological processes. Based on their biological functions, we directly tested for disease association of common polymorphisms in the FXIII, Gas6 and in one of the Gas6 receptor genes, MerTK, that is known to be involved in the signaling pathways in the eye. Blood coagulation factor XIII is a plasma transglutaminase that cross links adjacent fibrin chains in the final step of the coagulation cascade. In addition, FXIII is known to participate in wound healing, tissue remodeling and embryo implantation at least partially through its proangiogenic effect [60]. The cardioprotective p.Val34Leu polymorphism of the blood coagulation factor XIII has been associated with accelerated thrombin activation, recurrent subconjunctival haemorrhage, intracerebral haemorrhage, and a decreased immune reaction in humans [61,62,63]. Most importantly, since angiogenesis plays a crucial role in neovascular AMD, we found it reasonable to investigate if the polymorphism had any effect on AMD formation. However, we failed to detect any association of AMD and the polymorphism in

our present study, indicating a neutral polymorphism in relation to both dry and wet AMD development.

Gas6, a Protein S structural homologue, has important functions in the regulation of angiogenesis, cell migration and proliferation. Its common polymorphism Gas6 c.834+7G>A is associated with decreased risk of cardiovascular diseases. Its receptors (TAM) play a crucial role in phagocytosis of apoptotic cells in the immune, nervous, and reproductive systems. These functions make Gas6 and its receptors a potential candidate involved in both dry and wet AMD development. In the pooled early and late AMD population the Gas6 polymorphism associated to AMD with an OR of 0.59 (95% CI 0.33-1.06, p=0.077). Despite the association was not statistically significant, the marginal p value and the 95%CI limits were indicative of a possible association. When analyzing dry and wet subgroups separately, no association with the dry AMD could be demonstrated; however a statistically significant protective effect was detected in the wet AMD subgroup. As formation of new vessels is a hallmark of wet AMD, it is likely that it is this function of Gas6 that is important in the context of the disease. Gas6 is able to inhibit VEGF-A signaling through Axl activation of SHP-2 phosphatases [38]. Recently, a similar inhibitory effect has been shown in metastasis induced angiogenesis [64]. This finding suggests a role of Gas6 in controlling pathological angiogenesis, and that c.834+7G>A polymorphism of the GAS6 gene, which has been linked to disease repeatedly [36,40,41], could have a direct effect on the function of the gene through an unknown mechanism.

In our case-control study we confirmed previous findings on the association of AMD and genetic polymorphisms in the CFH, LOC387715 and HTRA1 genes, however could not demonstrate any association with the CFI gene. More interestingly, we found a genetic interplay of CFH, HTRA1 and C3 genes, showing that the C3 polymorphism is a major contributor of dry AMD in the absence of the other polymorphisms, while has no effect on wet AMD development in our population. This result indicates that C3 plays a critical role in dry AMD rather than wet AMD pathogenesis, and its effect can be overdriven by other known genetic risk factors in the CFH and HTRA1 genes. We detected a protective effect of a common Gas6 c.834+7G>A polymorphism on wet AMD formation. Our results shed light on a new player and novel genetic interactions in AMD pathogenesis, however our data should be confirmed in other populations, especially in the case of the Gas6 polymorphism.



## References

1. Klein R, Peto T, Bird A, Vannewkirk MR (2004) The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 137: 486-495.
2. Friedman DS, Katz J, Bressler NM, Rahmani B, Tielsch JM (1999) Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology* 106: 1049-1055.
3. Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, Tomany SC, McCarty C, et al. (2004) Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol* 122: 564-572.
4. Seddon JM, Sharma S, Adelman RA (2006) Evaluation of the clinical age-related maculopathy staging system. *Ophthalmology* 113: 260-266.
5. Coleman HR, Chan CC, Ferris FL, 3rd, Chew EY (2008) Age-related macular degeneration. *Lancet* 372: 1835-1845.
6. Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, Piau E, Evans C, et al. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol* 10: 31.
7. Ho L, Boekhoorn SS, Liana, van Duijn CM, Uitterlinden AG, et al. (2008) Cataract surgery and the risk of aging macula disorder: the rotterdam study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 4795-4800.
8. Francis PJ, Klein ML Update on the role of genetics in the onset of age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol* 5: 1127-1133.
9. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, et al. (2005) Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308: 385-389.
10. Edwards AO, Ritter R, 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, et al. (2005) Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308: 421-424.
11. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, Scott WK, Olson LM, et al. (2005) Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308: 419-421.
12. Sofat R, Casas JP, Webster AR, Bird AC, Mann SS, et al. Complement factor H genetic variant and age-related macular degeneration: effect size, modifiers and relationship to disease subtype. *Int J Epidemiol* 41: 250-262.
13. Yates JR, Sepp T, Matharu BK, Khan JC, Thurlby DA, et al. (2007) Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 357: 553-561.
14. Despriet DD, van Duijn CM, Oostra BA, Uitterlinden AG, Hofman A, et al. (2009) Complement component C3 and risk of age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 116: 474-480 e472.
15. Thakkinstian A, McKay GJ, McEvoy M, Chakravarthy U, Chakrabarti S, et al. Systematic review and meta-analysis of the association between complement component 3 and age-related macular degeneration: a HuGE review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 173: 1365-1379.
16. Fagerness JA, Maller JB, Neale BM, Reynolds RC, Daly MJ, et al. (2009) Variation near complement factor I is associated with risk of advanced AMD. *Eur J Hum Genet* 17: 100-104.
17. Ennis S, Gibson J, Cree AJ, Collins A, Lotery AJ Support for the involvement of complement factor I in age-related macular degeneration. *Eur J Hum Genet* 18: 15-16.
18. Cipriani V, Matharu BK, Khan JC, Shahid H, Hayward C, et al. No evidence of association between complement factor I genetic variant rs10033900 and age-related macular degeneration. *Eur J Hum Genet* 20: 1-2; author reply 3.

19. Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, Mah TS, Ferrell RE, et al. (2005) Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet* 77: 389-407.
20. Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, Keilhauer CN, Lichtner P, et al. (2005) Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet* 14: 3227-3236.
21. Yang Z, Camp NJ, Sun H, Tong Z, Gibbs D, et al. (2006) A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science* 314: 992-993.
22. Dewan A, Liu M, Hartman S, Zhang SS, Liu DT, et al. (2006) HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science* 314: 989-992.
23. Yoshida T, DeWan A, Zhang H, Sakamoto R, Okamoto H, et al. (2007) HTRA1 promoter polymorphism predisposes Japanese to age-related macular degeneration. *Mol Vis* 13: 545-548.
24. Cameron DJ, Yang Z, Gibbs D, Chen H, Kaminoh Y, et al. (2007) HTRA1 variant confers similar risks to geographic atrophy and neovascular age-related macular degeneration. *Cell Cycle* 6: 1122-1125.
25. Wang L, Clark ME, Crossman DK, Kojima K, Messinger JD, et al. Abundant lipid and protein components of drusen. *PLoS One* 5: e10329.
26. Souied EH, Benlian P, Amouyel P, Feingold J, Lagarde JP, et al. (1998) The epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 125: 353-359.
27. Baird PN, Guida E, Chu DT, Vu HT, Guymer RH (2004) The epsilon2 and epsilon4 alleles of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 1311-1315.
28. Baird PN, Richardson AJ, Robman LD, Dimitrov PN, Tikellis G, et al. (2006) Apolipoprotein (APOE) gene is associated with progression of age-related macular degeneration (AMD). *Hum Mutat* 27: 337-342.
29. Francis PJ, Hamon SC, Ott J, Weleber RG, Klein ML (2009) Polymorphisms in C2, CFB and C3 are associated with progression to advanced age related macular degeneration associated with visual loss. *J Med Genet* 46: 300-307.
30. Yu Y, Reynolds R, Fagerness J, Rosner B, Daly MJ, et al. Association of variants in the LIPC and ABCA1 genes with intermediate and large drusen and advanced age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 4663-4670.
31. Asensio-Sanchez VM, Rodriguez-Martin T, Gala-Molina I, Rodriguez-Fernandez I (2006) [Age-related macular degeneration: its association with the epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 81: 9-12.
32. Losonczy G, Fekete A, Voko Z, Takacs L, Kaldi I, et al. Analysis of complement factor H Y402H, LOC387715, HTRA1 polymorphisms and ApoE alleles with susceptibility to age-related macular degeneration in Hungarian patients. *Acta Ophthalmol* 89: 255-262.
33. McKay GJ, Patterson CC, Chakravarthy U, Dasari S, Klaver CC, et al. Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration: a pooled analysis of 15 studies. *Hum Mutat* 32: 1407-1416.
34. Adams MK, Simpson JA, Richardson AJ, English DR, Aung KZ, et al. Apolipoprotein E gene associations in age-related macular degeneration: the Melbourne Collaborative Cohort Study. *Am J Epidemiol* 175: 511-518.
35. Fernandez-Fernandez L, Bellido-Martin L, Garcia de Frutos P (2008) Growth arrest-specific gene 6 (GAS6). An outline of its role in haemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* 100: 604-610.

36. Jiang L, Liu CY, Yang QF, Wang P, Zhang W (2009) Plasma level of growth arrest-specific 6 (GAS6) protein and genetic variations in the GAS6 gene in patients with acute coronary syndrome. *Am J Clin Pathol* 131: 738-743.
37. Lutgens E, Tjwa M, Garcia de Frutos P, Wijnands E, Beckers L, et al. (2008) Genetic loss of Gas6 induces plaque stability in experimental atherosclerosis. *J Pathol* 216: 55-63.
38. Gallicchio M, Mitola S, Valdembrì D, Fantozzi R, Varnum B, et al. (2005) Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor. *Blood* 105: 1970-1976.
39. Balogh I, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahlback B (2005) Analysis of Gas6 in human platelets and plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 1280-1286.
40. Munoz X, Obach V, Hurtado B, de Frutos PG, Chamorro A, et al. (2007) Association of specific haplotypes of GAS6 gene with stroke. *Thromb Haemost* 98: 406-412.
41. Lee CH, Chu NF, Shieh YS, Hung YJ The growth arrest-specific 6 (Gas6) gene polymorphism c.834+7G>A is associated with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 95: 201-206.
42. Rothlin CV, Lemke G TAM receptor signaling and autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 22: 740-746.
43. Duncan JL, LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Yang H, et al. (2003) An RCS-like retinal dystrophy phenotype in mer knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 826-838.
44. Hall MO, Obin MS, Heeb MJ, Burgess BL, Abrams TA (2005) Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 81: 581-591.
45. Chen YY, Lu QJ, Lu QX, Wang NL Gene expression profile changes caused by the dysfunction of Mer during retinal pigment epithelium phagocytosis. *Chin Med J (Engl)* 124: 1145-1155.
46. Shemirani AH, Muszbek L (2004) Rapid detection of the factor XIII Val34Leu (163 G-->T) polymorphism by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer detection and melting curve analysis. *Clin Chem Lab Med* 42: 877-879.
47. Hurtado B, Abasolo N, Munoz X, Garcia N, Benavente Y, et al. Association study between polymorphisms in GAS6-TAM genes and carotid atherosclerosis. *Thromb Haemost* 104: 592-598.
48. Rudnicka AR, Jarrar Z, Wormald R, Cook DG, Fletcher A, et al. Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalence in populations of European ancestry: a meta-analysis. *Ophthalmology* 119: 571-580.
49. Spencer KL, Olson LM, Anderson BM, Schnetz-Boutaud N, Scott WK, et al. (2008) C3 R102G polymorphism increases risk of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 17: 1821-1824.
50. Mullins RF, Russell SR, Anderson DH, Hageman GS (2000) Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J* 14: 835-846.
51. Johnson LV, Ozaki S, Staples MK, Erickson PA, Anderson DH (2000) A potential role for immune complex pathogenesis in drusen formation. *Exp Eye Res* 70: 441-449.
52. Anderson DH, Mullins RF, Hageman GS, Johnson LV (2002) A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol* 134: 411-431.
53. Johnson LV, Leitner WP, Staples MK, Anderson DH (2001) Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration. *Exp Eye Res* 73: 887-896.

54. Nozaki M, Raisler BJ, Sakurai E, Sarma JV, Barnum SR, et al. (2006) Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2328-2333.
55. Chi ZL, Yoshida T, Lambris JD, Iwata T Suppression of drusen formation by compstatin, a peptide inhibitor of complement C3 activation, on cynomolgus monkey with early-onset macular degeneration. *Adv Exp Med Biol* 703: 127-135.
56. An E, Sen S, Park SK, Gordish-Dressman H, Hathout Y Identification of novel substrates for the serine protease HTRA1 in the human RPE secretome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 3379-3386.
57. Chen W, Stambolian D, Edwards AO, Branham KE, Othman M, et al. Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7401-7406.
58. Seddon JM, Reynolds R, Rosner B Associations of smoking, body mass index, dietary lutein, and the LPC gene variant rs10468017 with advanced age-related macular degeneration. *Mol Vis* 16: 2412-2424.
59. Kondo N, Bessho H, Honda S, Negi A Additional evidence to support the role of a common variant near the complement factor I gene in susceptibility to age-related macular degeneration. *Eur J Hum Genet* 18: 634-635.
60. Dardik R, Loscalzo J, Inbal A (2006) Factor XIII (FXIII) and angiogenesis. *J Thromb Haemost* 4: 19-25.
61. Kovar FM, Marsik CL, Jilma B, Mannhalter C, Joukhadar C, et al. (2009) The inflammatory response is influenced by FXIII VAL 34 LEU polymorphism in a human LPS model. *Wien Klin Wochenschr* 121: 515-519.
62. Balogh I, Szoke G, Karpati L, Wartiovaara U, Katona E, et al. (2000) Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood* 96: 2479-2486.
63. Ariens RA, Philippou H, Nagaswami C, Weisel JW, Lane DA, et al. (2000) The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood* 96: 988-995.
64. Png KJ, Halberg N, Yoshida M, Tavazoie SF A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells. *Nature* 481: 190-194.

**Table 1.** Characteristics of the study population

<b>Attributions</b>	<b>Dry AMD</b>	<b>Wet AMD</b>	<b>Controls</b>	<b>p</b>
	N=67	N=213	N=106	
<b>Female N (%)</b>	34 (50.7)	125 (58.7)	53 (50.0)	0,2569
<b>Male N (%)</b>	33 (49.3)	88 (41.3)	53 (50.0)	0,2569
<b>Age (year, mean±SD)</b>	75.4 (11.5)	76.0 ( 7.3)	79.1 ( 6.1)	0,0047
<b>Smoking (packyear, mean±SD)</b>	12.0 (20.1)	11.2 (19.8)	11.4 (21.9)	0,7601
<b>BMI (mean±SD)</b>	27.3 ( 4.5)	27.3 ( 4.4)	27.6 ( 4.7)	0,8306
<b>Hypertonia N (%)</b>	45 (67.2)	159 (75.0)	81 (79.4)	0,2135
<b>DVT N (%)</b>	7 (10.4)	15 ( 7.1)	15 (14.9)	0,0928
<b>AMI N (%)</b>	6 ( 9.0)	19 ( 9.0)	7 ( 7.4)	0,9054
<b>Outdoor profession N (%)</b>	22 (32.8)	39 (18.5)	38 (38.4)	0,0004
<b>Cataract surgery N (%)</b>	21 (31.3)	48 (22.6)	73 (70.2)	0,0000

BMI: body mass index, DVT: deep vein thrombosis, AMI: acute myocardial infarction

**Table 2.** Genotype distribution of the analyzed polymorphisms in the controls

<b>ApoE</b>	<b>Genotype</b>	<b>n</b>	<b>Frequency</b>
	3/3	71	0,67
	3/4 + 4/4	16	0,15
	2/3 + 2/2	17	0,16
	2/4	2	0,02
	<b>total</b>	<b>106,00</b>	
<b>CFH p.Y402H / rs1410996</b>	TT	42,00	0,40
	TC	51,00	0,49
	CC	11,00	0,11
	<b>total</b>	<b>104,00</b>	
<b>LOC387715 p.A69S / rs10490924</b>	GG	49,00	0,47
	GT	50,00	0,48
	TT	5,00	0,05
	<b>total</b>	<b>104,00</b>	
<b>HTRA1 rs11200638</b>	TT	50,00	0,48
	TC	50,00	0,48
	CC	4,00	0,04
	<b>total</b>	<b>104,00</b>	
<b>C3 p.R102G / rs2230199</b>	CC	66,00	0,62
	CG	37,00	0,35
	GG	3,00	0,03
	<b>total</b>	<b>106,00</b>	
<b>CFI rs10033900</b>	CC	19,00	0,18
	CT	56,00	0,53
	TT	31,00	0,29
	<b>total</b>	<b>106,00</b>	
<b>FXIII p.Val34Leu rs5985</b>	GG	48,00	0,45
	GT	47,00	0,44
	TT	11,00	0,10
	<b>total</b>	<b>106,00</b>	
<b>GAS6 rs8191974 / c.834+7G&gt;A</b>	GG	36,00	0,35
	GA	55,00	0,53
	AA	13,00	0,13
	<b>total</b>	<b>104,00</b>	
<b>Mertk I1a rs86016</b>	GG	37,00	0,36
	GA	51	0,49
	AA	16	0,15
	<b>total</b>	<b>104,00</b>	
<b>Mertk I1b rs17835605</b>	CC	60,00	0,57
	CT	39,00	0,37
	TT	6,00	0,06
	<b>total</b>	<b>105,00</b>	
<b>Mertk I1c rs10496440</b>	AA	91,00	0,87
	AC	14,00	0,13
	CC	0,00	0,00
	<b>total</b>	<b>105,00</b>	
<b>Mertk I4 rs7573344</b>	AA	69,00	0,66
	AG	33,00	0,31
	GG	3,00	0,03
	<b>total</b>	<b>105,00</b>	

**Table 3.** Genotype distribution of the analyzed polymorphisms in the patients

	Genotype	Dry AMD		Wet AMD		All AMD	
		n	frequency	n	frequency	n	frequency
<b>ApoE</b>	3/3	49	0,73	148	0,70	197	0,71
	3/4 + 4/4	11	0,16	34	0,16	45	0,16
	2/3 + 2/2	7	0,10	24	0,11	31	0,11
	2/4	0	0,00	4	0,02	4	0,01
	total	67		210		277	
<b>CFH p.Y402H / rs1410996</b>	TT	23	0,34	35	0,17	58	0,21
	TC	24	0,36	89	0,44	113	0,42
	CC	20	0,30	80	0,39	100	0,37
	total	67		204		271	
<b>LOC387715 p.A69S / rs10490924</b>	GG	25	0,37	45	0,21	70	0,25
	GT	31	0,46	95	0,45	126	0,45
	TT	11	0,16	71	0,34	82	0,29
	total	67		211		278	
<b>HTRA1 rs11200638</b>	TT	25	0,38	47	0,22	72	0,26
	TC	31	0,47	94	0,45	125	0,45
	CC	10	0,15	69	0,33	79	0,29
	total	66		210		276	
<b>C3 p.R102G / rs2230199</b>	CC	34	0,52	118	0,56	152	0,55
	CG	28	0,42	81	0,39	109	0,40
	GG	4	0,06	10	0,05	14	0,05
	total	66		209		275	
<b>CFI rs10033900</b>	CC	16	0,25	45	0,21	61	0,22
	CT	32	0,49	110	0,52	142	0,51
	TT	17	0,26	56	0,27	73	0,26
	total	65		211		276	
<b>FXIII p.Val34Leu rs5985</b>	GG	39	0,58	118	0,56	157	0,56
	GT	25	0,37	73	0,35	98	0,35
	TT	3	0,04	20	0,09	23	0,08
	total	67		211		278	
<b>GAS6 rs8191974 / c.834+7G&gt;A</b>	GG	27	0,42	96	0,47	123	0,45
	GA	28	0,43	89	0,43	117	0,43
	AA	10	0,15	21	0,10	31	0,11
	total	65		206		271	
<b>Mertk I1a rs86016</b>	GG	25	0,39	76	0,37	101	0,37
	GA	30	0,47	97	0,47	127	0,47
	AA	9	0,14	33	0,16	42	0,16
	total	64		206		270	
<b>Mertk I1b rs17835605</b>	CC	40	0,62	129	0,62	169	0,62
	CT	15	0,23	65	0,31	80	0,29
	TT	10	0,15	15	0,07	25	0,09
	total	65		209		274	
<b>Mertk I1c rs10496440</b>	AA	60	0,92	179	0,85	239	0,87
	AC	5	0,08	31	0,15	36	0,13
	CC	0	0,00	1	0,00	1	0,00
	total	65		211		276	
<b>Mertk I4 rs7573344</b>	AA	45	0,70	149	0,71	194	0,71
	AG	19	0,30	56	0,27	75	0,27
	GG	0	0,00	4	0,02	4	0,01
	total	64		209		273	

**Table 4.** Allele frequencies of the analyzed polymorphisms

	Allele	Dry AMD	Wet AMD	Controls
ApoE	E2	0.06	0.07	0.09
	E3	0.86	0.84	0.82
	E4	0.08	0.09	0.09
CFH p.Y402H / rs1410996	T	0.52	0.39	0.65
	C	0.48	0.61	0.35
LOC387715 p.A69S / rs10490924	G	0.6	0.53	0.71
	T	0.4	0.47	0.29
HTRA1 rs11200638	T	0.61	0.45	0.72
	C	0.39	0.55	0.28
C3 p.R102G / rs2230199	C	0.73	0.76	0.8
	G	0.27	0.24	0.2
CFI rs10033900	C	0.49	0.47	0.44
	T	0.51	0.53	0.56
FXIII p.Val34Leu rs5985	G	0.77	0.73	0.67
	T	0.23	0.27	0.33
GAS6 rs8191974 / c.834+7G>A	G	0.63	0.68	0.62
	A	0.37	0.32	0.38
Mertk I1a rs86016	G	0.62	0.61	0.6
	A	0.38	0.39	0.4
Mertk I1b rs17835605	C	0.72	0.77	0.75
	T	0.28	0.23	0.25
Mertk I1c rs10496440	A	0.96	0.92	0.93
	C	0.04	0.08	0.07
Mertk I4 rs7573344	A	0.81	0.85	0.81
	G	0.19	0.15	0.19

**Table 5.** Polymorphisms that failed to show any association with AMD after adjustment

ApoE	Genotypes compared		OR (95%CI)	p
		3/4 + 4/4 vs 3/3		1.01 (0.54; 1.91)
	2/3 + 2/2 vs 3/3		0.66 (0.34; 1.26)	0,2062
CFI rs10033900	CC vs CT + TT		1.30 (0.73; 2.30)	0,3699
	CC vs TT		1.36 (0.70; 2.65)	0,3607
FXIII p.Val34Leu rs5985	GT vs GG		0.64 (0.40; 1.03)	0,0690
	TT vs GG		0.64 (0.29; 1.41)	0,2657
Mertk I1a rs86016	GA + AA vs GG		0.92 (0.58; 1.48)	0,7424
	AA vs GG		0.96 (0.48; 1.91)	0,9113
Mertk I1b rs17835605	TT vs CC + CT		1.66 (0.66; 4.18)	0,2789
	TT vs CC		1.48 (0.58; 3.78)	0,4135
Mertk I1c rs10496440	AC vs AA		0.98 (0.50; 1.90)	0,9502
	CC vs AA		NA (shortage of CC genotype)	
Mertk I4 rs7573344	AG + GG vs AA		0.78 (0.48; 1.26)	0,3120
	GG vs AA		0.47 (0.10; 2.17)	0,3367

Figure 1. The effect of GAS6 c.834+7G>A polymorphism and genetic interactions on the risk of AMD. Polymorphisms and stratum of subjects involved in the analysis are shown on the vertical axis. Adjusted odds ratios and 95% confidence intervals are represented by dots and lines, respectively.



Running Head: VHL mutations in Hungarian patients

Title: Identification of novel germ-line mutations in the VHL gene in Hungarian von Hippel-Lindau patients

Authors: Gergely Losonczy<sup>1</sup>, Ferenc Fazakas<sup>2</sup>, György Pfliegler<sup>3</sup>, Istvan Komáromi<sup>2</sup>, Erzsébet Balázs<sup>1</sup>, Krisztina Péntzes<sup>2</sup>, András Berta<sup>1</sup>

Corresponding author: Gergely Losonczy

Address: Department of Ophthalmology, University of Debrecen, Medical and Health Science Center, 98. Nagyerdei bld. 4012 Debrecen, Hungary

Tel./Fax.: +36-52-255-456

e-mail: [losigeri@gmail.com](mailto:losigeri@gmail.com)

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, <sup>2</sup>Haemostasis, Thrombosis and Vascular Biology Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Clinical Research Center, <sup>3</sup>Division of Rare Diseases, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

## Abstract

**Background:** Von Hippel-Lindau disease is an autosomal dominantly inherited highly penetrant tumor syndrome predisposing to retinal and central nervous system hemangioblastomas, renal cell carcinoma and pheochromocytoma among other less frequent complications. **Patients and Methods:** Seven members of five unrelated families affected with VHL disease were enrolled in the study. All patients suffered from type I VHL disease. **Results:** Molecular genetic investigations detected 4 novel (c.163G>T, c.232A>T, c.340+1G>A, c.555C>A) and one previously described (c.583C>T) germline point mutation in the VHL gene. Molecular modeling of the VHL-ElonginC-HIF-1alpha complex predicted that the p.Asn78Tyr amino acid exchange remarkably alters the 77-83 loop structure of VHL protein and destabilizes the VHL-HIF-1alpha complex suggesting that the mutation causes type I phenotype and has high risk to associate to renal cell carcinoma. The novel c.163G>T (p.55X) nonsense mutation associated to bilateral RCC and retinal angioma in a 15-year-old male patient. **Conclusion:** We describe the earliest onset renal cell carcinoma in VHL disease reported so far in a fifteen-year-old boy with a nonsense VHL mutation. Individual tailoring of screening schedule based on molecular genetic status should be considered in order to diagnose serious complications as early as possible. Our observations add to the understanding of genotype-phenotype correlation in VHL disease and can be useful for genetic counseling and follow-up of VHL patients.

Key words: genotype-phenotype correlation, germline mutation, renal cell carcinoma, von Hippel-Lindau disease

## Background

Von Hippel-Lindau (VHL) disease is an autosomal dominantly inherited highly penetrant tumor syndrome affecting 1 in 36,000 individuals worldwide. VHL disease predisposes to retinal and central nervous system hemangioblastomas (HB), renal cell carcinoma (RCC), pheochromocytoma, pancreatic endocrine tumors, endolymphatic sac tumors among other less frequent complications. Type I diseases is accompanied with low risk of pheochromocytoma, type IIa is associated with high risk of pheochromocytoma and low risk of renal cell carcinoma, while type IIb is linked to high risk of both pheochromocytoma and renal cell carcinoma. In type IIc VHL disease only pheochromocytoma develops. Patients carry a heterozygous germline mutation in the VHL gene. Tumor development is initiated by the somatic inactivation or loss of the remaining wild type VHL allele [1-2]. VHL

protein associates with the elongins B and C, cullin2 and Rbx and functions as the substrate recognition component of an E3-ubiquitin ligase that ubiquitinates HIF-1alpha under normoxic conditions resulting in HIF-1alpha proteolysis [3].

The protein model of pVHL19 contains two functional subdomains; the beta domain (residues 63–154 and residues 193–204) and the helical alpha-domain (residues 155–192). Two important binding sites within VHL protein have been identified; one responsible for elongin C binding in the alpha domain (amino acid residues 157–170) and the other in the beta domain responsible for the binding of HIF1alpha (amino acid residues 91–113) [4]. The majority of disease-causing missense VHL gene mutations are located in one of these two binding sites. Molecular genetic defects identified in the background of the disease have greatly helped to understand the role of VHL protein in the hypoxia sensing pathway and to recognize genotype-phenotype correlation, a prerequisite of efficient genetic counseling and patient follow-up [5]. More than 800 different germline mutations are listed in the VHL mutation database (<http://www.umd.be:2020/>) [6] and also in a comprehensive analysis based on 945 VHL kindreds [7]. Here, we describe 7 members of 5 families with 4 novel and 1 previously reported point mutations in the VHL gene and correlate genetic findings with clinical phenotype.

## **Materials and methods**

### **Patients**

Seven members of five unrelated Hungarian families with von Hippel-Lindau disease were referred to the Department of Ophthalmology, the national center for ocular tumors at the University of Debrecen in Debrecen, Hungary. The diagnosis of VHL disease was based on physical and ophthalmological examinations, abdominal CT, craniospinal and abdominal MRI and laboratory tests (routine blood tests and urine catecholamines and vanillylmandelic acid). All examinations were in line with previously reported screening protocols [2,8,33,34]. Screening and diagnostic investigations were coordinated at the Division of Rare Diseases, University of Debrecen. Fifty healthy controls were enrolled in the study. After the exclusion of any family history and any manifestation of VHL disease controls underwent direct sequencing and MLPA analysis of the VHL gene. Controls, Patients and family members were enrolled after informed consent. All procedures strictly adhered to the declaration of Helsinki. Approval was obtained from local Institutional Ethics Committees at the University of Debrecen.

### **Mutation analysis of the VHL gene**

Blood samples from patients and family members were obtained after informed consent. Genomic DNA was purified from peripheral white blood cells. Exons of the VHL gene were amplified using the following primer pairs: 1AF 5'-TATAGTGGAAATACAGTAACGAG-3', 1AR 5'-GAAGTTGAGCCATACGG-3', 1BF 5'-AGAGTACGGCCCTGAAGAA-3', 1BR 5'-GCTTACGAGCAGCGTCAC-3', 2F 5'-ATCTCCTGACCTCATGATCC-3', 2R 5'-GGGCTTAATTTTTCAAGTGG-3', 3F 5'-TGAGATCCATCAGTAGTACAGG-3', 3R 5'-CTAAGGAAGGAACCAGTCC-3'. After an initial denaturation step at 95°C for 10 minutes, 40 PCR cycles were performed under the following conditions: denaturation at 95°C for 1 minute, annealing at 56°C for exon 1 and 59°C for exons 2 and 3 for 1 minute and extension at 72°C for 1 min. An additional elongation step for 7 minutes at 72 °C followed the final cycle. PCR products purified by ultrafiltration were sequenced by ABIPrism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Clinical and genetic data of previously reported VHL cases were obtained from cited publications and from the Universal Mutation Database [6]. Large deletions were tested using the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) VHL kit (MRC-Holland, Amsterdam, NL).

### **Evolutionary alignment, SIFT analysis and molecular modeling**

Multiple evolutionary protein sequence alignment was performed using the open access source of Constraint-based Multiple Alignment Tool (COBALT) in the case of the p.N78Y mutation [9]. To estimate whether this amino acid substitution affects protein function we also applied the online available SIFT analysis tool (<http://sift.jcvi.org/>). SIFT prediction is based on the degree of conservation of amino acid residues in sequence alignments derived from closely related sequences, collected through PSI-BLAST [10]. We were curious whether the SIFT tool could find any difference in the predicted effect between type I and type II missense mutations, therefore we analyzed all germline missense mutations of familial VHL cases reported in the comprehensive analysis of Nordstrom-O'Brien et al. Sixty-six mutations in both type I and II groups were analyzed.

For molecular modeling, starting geometries for the model complexes of VHL-, Elongin C- and HIF-1 $\alpha$  proteins [11] were obtained from the RCSB protein data bank (pdb ID: 1LM8). The unresolved N- and C-terminal fragments were substituted by acetyl and N-methyl groups on the available protein fragments then the missing hydrogen atoms were added. Molecular dynamics simulations using periodic boundary condition, explicit TIP3P water [12]

molecules, AMBER99SB [13,14] force field and additional Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions (~0.15M ionic strength) were carried out with both the wild- and the Asn78Tyr point mutated VHL protein. 4fs time step and 50ns total time frame was applied for the constant pressure (105Pa), constant temperature (310K), and constant particle number (68612, 68655 and 68548 for the wild and N78Y mutant systems, respectively) simulations. The long range electrostatics forces were calculated by particle mesh Ewald method [15]. The simulations and the analyses of the trajectories were carried out by means of the Gromacs [16] suites of software.

## Results

Molecular genetic analysis of 7 members of 5 VHL families detected 4 novel and 1 previously described point mutations in the VHL gene. No alterations could be detected in the VHL gene with the MLPA test. All mutations associated to type I VHL disease. None of the mutations could be observed in one hundred alleles of the control group. Phenotype characteristics and genetic data of the study population are summarized in Table 1.

Family A consisted of 2 unaffected parents and their (IP), who developed bilateral retinal angioma and serous retinal detachment at the age of 15. In search for VHL manifestations abdominal ultrasound scan detected a mass of 18 mm in diameter in the left kidney. Abdominal MRI scans showed a kidney mass of 15 mm's in the left kidney and a 10 mm's diameter mass in the right kidney. After enucleation, histological analysis verified RCC. MRI of the craniospinal axis could not detect any alterations. No deviation from normal values was observed in the laboratory test. The patient was heterozygous for the novel c.163G>T (p.55GluX) amber nonsense mutation. None of his parents displayed any mutations in the VHL gene indicating a de novo mutation.

Two affected probands of family B, sister (IP) and brother, with a positive family history of VHL disease were examined. The sister developed a retinal angioma of the right eye at the age of 48 years. MRI examination revealed a cerebellar hemangioma in both patients. RCC could not be revealed so far in any of the patients. Molecular genetic analysis detected the novel c.232A>T (p.Asn78Tyr) missense mutation in heterozygous form in both patients.

Family C consisted of two parents and their two daughters. The 12-years old daughter (IP) was investigated because of a retinal angioma. Except a spinal cord hemangioma, no other manifestations have been detected so far in her case. Interestingly, her 34-years-old father was

asymptomatic at the first examination, however radiological investigations revealed bilateral kidney tumors, a cerebellar and a spinal cord hemangioma. Histological analysis of the kidney verified RCC. Four years later, retinal angioma in both eyes developed. The mother and the other daughter were free from any manifestations of the disease. Both affected family members were heterozygous for the novel c.340+1G>A mutation, located at the first exon-intron junction. The mutation destroys the conserved intronic donor splice site and most likely leads to premature protein termination (p.Gly114AspfsX6). The mother and the healthy daughter were wild type.

The 25-years-old male patient (Patient D) was the only available member of the family. His father had died several years ago due to a central nervous system tumor, probably a complication of VHL disease. The patient was diagnosed with cerebellar and spinal cord hemangioma and a subsequently occurring RCC, while other manifestations of VHL disease could not be detected. The novel heterozygous nonsense amber mutation (c.555C>A) was detected in Patient D. The mutation caused a previously reported protein truncation (p.185TyrX) [6,18,30].

Patient E suffered from retinal angioma and cerebellar hemangioblastoma. No other VHL-related manifestations could be revealed so far. Genetic analysis detected the previously described c.583C>T mutation resulting in premature protein termination (p.195GlnX). Interestingly, the mutation has been reported to associate to type I and type II VHL disease as well [18,19,23].

### **SIFT analysis and evolutionary sequence alignment**

The majority of missense mutations reported in the literature in familial VHL were predicted to be damaging by SIFT analysis. However, 18% and 35% of the mutations were predicted to be tolerated among mutations associating to familial cases of type I and type II VHL disease, respectively (Fisher's exact test,  $p=0.048$ ). It is to be noted, that the lowest rate (11%) of tolerable mutations was observed in type I VHL disease associating to RCC. As shown by Fig.1, the Asn78 amino acid represents a highly conserved amino acid among different species including Homo Sapiens, Pongo pygmeus, Rattus norvegicus, Mus musculus, Canis familiaris and Xenopus tropicalis. SIFT analysis of the current and previously reported amino acid exchanges at this position also indicated damaging effect on protein function with SIFT scores of 0, 0, 0, 0.03 and 0.04 in case of conversion to Tyrosine, Histidine, Isoleucin, Serine

and Threonin, respectively. Median conservation values were below 3,25 in each SIFT analysis indicating high confidence predictions.

### **Effect of the Asn78Tyr protein exchange on the molecular structure**

Molecular simulation on the model wild type VHL- ElonginC - HIF-1alpha complex shows the protein complex to be remarkably stable as it is demonstrated by the first (Fig2A) and last (Fig2B) snapshots from the corresponding trajectory. Whereas comparing the simulation trajectories for the wild type and the Asn78Tyr mutant (Fig2C) VHL proteins it is clearly demonstrated that this mutation remarkably deforms the 77-83 loop structure in the VHL protein. It can be interpreted by the breaking of the loop-stabilizing H-bond interaction between Asn78 and Arg82 as well as by a larger space filling property of the tyrosine side chain. This deformation spreads over the Thr100-Arg107 loop of VHL (marked by red arrow) which finally resulted in a weakened interaction between this loop and the HIF-1 alpha protein (shown by green arrow). Interestingly, the deformed loop structure in VHL deforms substantially the neighboring loop (Arg82-Phe93) structure in Elongin C (shown in blue ellipse) as well. However, this deformation did not disrupt the interaction between VHL and Elongin C in our simulation.

### **Discussion**

We have investigated seven VHL patients from five unrelated Hungarian families. After detailed physical, ophthalmological, radiological and laboratory investigations all patients were found to have type 1 VHL disease. Molecular genetic investigations detected 4 novel and 1 previously described point mutations in the VHL gene. According to the present and a previous report [32], there are 12 VHL families in Hungary identified so far. Nonsense, missense, frame shift mutations and exon deletions were detected in 4,4,2 and 2 families, respectively. These proportions show no major deviation from those of other populations and are comparable to proportions reported by the comprehensive analysis of Nordstrom-O'Brien et al [7]. The novel c.232A>T (p.Asn78Tyr) missense mutation associated to type I VHL phenotype. The site is evolutionary conserved suggesting it is an important amino acid position to maintain protein structure and function. Other mutations at the same codon,

namely p.Asn78His, p.Asn78Ser and p.Asn78Thr, p.Asn78Ile associated with type I disease phenotype as well [17-24]. This mutation site is buried within the protein core where mutations were found to associate with lower risk of pheochromocytoma compared to protein surface missense mutations [23]. N78H, N78I and N78S missense mutations were all reported to coincide with RCC, however the N78T mutation did not show this association [17-24]. According to a later publication RCC associates with high risk to missense mutations located between codon 74 and 90 [27]. The effect of the novel p.Asn78Tyr mutation on VHL protein structure was assessed using molecular modeling. The Asn78 side chain participates in the stabilization of the turn where it can be found. The breaking of the loop-stabilizing H-bond interaction between Asn78 and Arg82 as well as the replacement of this residue with a larger one obviously destabilizes this turn (Fig. 2). It can cause partial or global misfolding. The most remarkable effect of this structural reorganization on protein interactions is the high probability of dissociation of the VHL and HIF-1alpha proteins. Despite molecular modeling predicted that the turn deformation is accompanied by cessation of the Arg79(VHL)-Glu89(Elongin C) as well as the Arg82(VHL)-Glu92(Elongin C) interchain salt bridges (Fig. 2) the disruption of the VHL-Elongin C interaction could not be observed during the simulation. In vitro analysis of pVHL mutants showed reduced ability to bind and ubiquitinate HIF-1alpha in case of type I, IIa and IIb mutations, on contrary, mutations associated to IIc phenotype showed normal binding and ubiquitination of HIF-1alpha protein. Completely absent HIF-1alpha binding was only observed in consequence of mutations associating to RCC in this study [26]. However, a recent computational study could not confirm the dose-dependent effect of VHL-HIF-1alpha dissociation and suggests that the canonical configuration of the wild-type beta domain is vital for the efficient functioning of the complex and that mutation of any of the residues implicated in the H-bond network in the binding site disrupts HIF binding [25]. Taken together, mutations in the beta domain disrupting the VHL-HIF-1alpha interaction lead to type I disease phenotype with an increased risk of RCC. Based on these data and our molecular modeling results we can conclude that the novel p.Asn78Tyr mutation associates to type I disease and has a high chance to associate to RCC as well, while only minor risk to associate to pheochromocytoma. In an attempt to assess the effect of all previously reported missense mutations in familial VHL, we applied SIFT analysis and found that in type II disease the rate of tolerable mutations is significantly higher than in type I mutations. This finding further supports that deleterious mutations disrupting protein integrity are more prone to cause type I phenotype. Besides, it suggests that SIFT analysis can be a useful tool when quick prediction of a novel mutation is necessary.



As expected, nonsense mutations associated with type I VHL phenotype. Two of the three nonsense mutations associated to RCC as well. Previous publications show that large germline deletions, nonsense and frameshift mutations associate with type I VHL phenotype [6,17,18,19,28,30]. Consistent with previous publications indicating that RCC coincides more frequently with nonsense mutations than missense mutations, RCC only associated to MLTP in our patients [23,31]. Nonsense mutations independent of their exonic location associate with earlier age at onset and higher age-related risk of RA and RCC compared to missense mutations and large deletions [23]. Supporting this observation, the patient with the p.55GluX mutation was 15-years-old when bilateral retinal angioma and bilateral RCC was diagnosed, which represents the earliest occurrence of RCC in VHL disease reported so far [1,29]. VHL screening guidelines [2,8,33,34] recommend a screening schedule for VHL patients regardless of their genetic status in order to recognize VHL complications in a curable stage. The earliest occurrence of RCC was reported in a sixteen-year-old boy. Accordingly, screening guidelines recommend yearly or biannual abdominal MRI from sixteen years of age and yearly abdominal ultrasound starting at 8 years of age. The occurrence of RCC in a fifteen-years old boy with a truncating germline VHL mutation highlights that renal cell carcinoma can be detected in patients with nonsense VHL mutations younger than sixteen years of age. Taken into account that abdominal MRI scans with a higher resolution can detect RCC earlier than ultrasound, patients with nonsense mutations known to associate to RCC and early onset of the VHL disease [23] could be considered for earlier MRI scans. In general, genetic status might be considered to help tailoring individual screening schedules in the future.

Genotype-phenotype correlation was analyzed and related to the findings reported in previous publications. In our study population we confirmed that the disruption of the VHL protein integrity leading to the dysregulation of HIF-1 $\alpha$  associate to type I phenotype. Accordingly, we also showed that the proportion of non-deleterious mutations is higher in type II than in type I missense mutations among mutations reported in familial VHL cases. Here we show the earliest occurrence of RCC reported in VHL disease so far and suggest individual tailoring of screening schedule based on molecular genetic status. Clinical and genetic data presented in our study can help the routine of genetic counseling and patient follow-up, as well as the presymptomatic molecular genetic diagnostics and contribute to a better understanding of genotype-phenotype correlations.

## **Abbreviations**

CNS – central nervous system

MLTP – mutation leading to protein truncation

Phaeo – pheochromocytoma

RA – retinal angioma

RCC – renal cell carcinoma

VHL – von Hippel-Lindau

## **Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Authors' contributions**

Acquisition of clinical data: AB, GL, EB, GP. FF and KP performed the molecular genetic analysis. Three dimensional protein modeling was carried out by IK. SIFT and Alignment analysis: GL. Analysis and interpretation of data: AB, IK, FF, GL. Drafting of the manuscript: GL, IK. Revision of the manuscript for important intellectual content: GL, FF, GF, EB, AB. Study supervision: AB.

## **Acknowledgements**

The authors are indebted to Ms Henrietta Bratu for her excellent technical assistance. The study was supported by a grant from the Hungarian National Research Fund (OTKA K68616). The authors thank László Kardos for the statistical analysis.

## **References**

1. Maher ER: Von Hippel-Lindau Disease. *Curr Mol Med* 2004, 4: 833-842.
2. Lonser RR, Glenn GM, Walther MC, Chew EY, Libutti SK, Linehan WM, Oldfield EH: Von Hippel-Lindau Disease. *Lancet* 2003, 361: 2059-2061.
3. Kapitsinou PP and Hase VH: The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice. *Cell Death Differ* 2008, 15:650-9.
4. Stebbins CE, Kaelin WG Jr & Pavletich NP: Structure of the VHL–ElonginC–ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science* 1999, 284:455–461.

5. Friedrich CA: Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau syndrome. *Hum Mol Genet* 2001, 10:763-7.
6. Beroud C, Collod-Beroud G, Boileau C, Soussi T, Junien C: UMD (Universal mutation database): a generic software to build and analyze locus-specific databases. [Hum Mutat](#) 2000, 15: 86-94.
7. Nordstrom-O'Brien M, van der Luijt RB, van Rooijen E, van den Ouweland AM, Majoor-Krakauer DF, Lolkema MP, van Brussel A, Voest EE, Giles RH: Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. *Hum Mutat* 2010, 31:521-37.
8. Maher ER, Yates JR, Harries R, Benjamin C, Harris R, Moore AT, Ferguson-Smith MA: Clinical features and natural history of von Hippel-Lindau disease. *Q J Med* 1990, 77: 1151-1163.
9. Constraint-based Multiple Alignment Tool (COBALT). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/>.
10. Kumar P, Henikoff S, Ng PC: Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 2009, 4:1073-81.
11. Min JH, Yang HF, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG, Pavletich NP: Structure of an HIF-1 alpha-pVHL complex: Hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 2002, 296:1886-89.
12. Jorgensen WL, Chandrasekhar J., Madura J. D., Impey R.W., Klein M. L: Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J Chem Phys* 1983, 79:926-35.
13. Hornak V, Abel R, Okur A, Strockbine B, Roitberg A, Simmerling C: Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins Struct Funct Bioinf* 2006, 65:712-25.
14. Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, Shaw DE: Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins Struct Funct Bioinf* 2010, 78:1950-58.
15. Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald-an NlogN method for Ewald sums in large systems. *J Chem Phys* 1993, 98:10089-92.
16. Hess B, Kutzner C, van der Spoel D, Lindahl E: GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theor Comp* 2008,4:435-47.

17. [Chen F, Kishida T, Yao M](#), Hustad T, Glavac D, Dean M, Gnarr JR, Orcutt ML, Duh FM, Glenn G, et al.: Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum Mutat* 1995, 5:66-75.
18. [Crossey PA, Richards FM, Foster K, Green JS, Prowse A, Latif F, Lerman MI, Zbar B, Affara NA, Ferguson-Smith MA, et al.](#): Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum Mol Genet* 1994, 3:1303-1308.
19. Zbar B, Kishida T, Chen F, Schmidt L, Maher ER, Richards FM, Crossey PA, Webster AR, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Brauch H, Glavac D, Neumann HP, Tisherman S, Mulvihill JJ, Gross DJ, Shuin T, Whaley J, Seizinger B, Kley N, Olschwang S, Boisson C, Richard S, Lips CH, Lerman M, et al.: Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum Mutat* 1996, 8:348-357.
20. Kanno H, Shuin T, Kondo K, Ito S, Hosaka M, Torigoe S, Fujii S, Tanaka Y, Yamamoto I, Kim I, Yao M: Molecular genetic diagnosis of von Hippel-Lindau disease: analysis of five Japanese families. *Jpn J Cancer Res*, 1996, 87:423-428.
21. No authors listed: Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in Japanese VHL. Clinical Research Group for VHL in Japan. *Hum Mol Genet* 1995, 4:2233-2237.
22. Hes FJ, van der Luijt RB, Janssen AL, Zewald RA, de Jong GJ, Lenders JW, Links TP, Luyten GP, Sijmons RH, Eussen HJ, Halley DJ, Lips CJ, Pearson PL, van den Ouweland AM, Majoor-Krakauer DF: Frequency of Von Hippel-Lindau germline mutations in classic and non-classic Von Hippel-Lindau disease identified by DNA sequencing, Southern blot analysis and multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Genet* 2007, 72:122-9.
23. Ong KR, Woodward ER, Killick P, Lim C, Macdonald F, Maher ER: Genotype-phenotype correlations in von Hippel-Lindau disease. *Hum Mutat* 2007, 28:143-9.
24. Cybulski C, Krzystolik K, Murgia A, Górski B, Debniak T, Jakubowska A, Martella M, Kurzawski G, Prost M, Kojder I et al: Germline mutations in the von Hippel-Lindau (VHL) gene in patients from Poland: disease presentation in patients with deletions of the entire VHL gene. *J Med Genet* 2002, 39:E38.
25. Forman JR, Worth CL, Bickerton GR, Eisen TG, Blundell TL: Structural bioinformatics mutation analysis reveals genotype-phenotype correlations in von

- Hippel-Lindau disease and suggests molecular mechanisms of tumorigenesis. *Proteins* 2009, 77:84-96.
26. Clifford SC, Cockman ME, Smallwood AC, Mole DR, Woodward ER, Maxwell PH, Ratcliffe PJ, Maher ER: Contrasting effects on HIF-1 $\alpha$  regulation by disease-causing pVHL mutations correlate with patterns of tumourigenesis in von Hippel-Lindau disease. *Hum Mol Genet* 2001, 10:1029-38.
  27. Gallou C, Chauveau D, Richard S, Joly D, Giraud S, Olschwang S, Martin N, Saquet C, Chrétien Y, Méjean A, Correas JM, Benoît G, Colombeau P, Grünfeld JP, Junien C, Bérourd C: Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau families with renal lesions. *Hum Mutat* 2004, 24: 215-224.
  28. Maher ER, Webster AR, Richards FM, Green JS, Crossey PA, Payne SJ, Moore AT: Phenotypic expression in von Hippel-Lindau disease: correlations with germline VHL gene mutations. *J Med Genet* 1996, 33: 328-332.
  29. Keeler LL, Klauber GT: Von Hippel Lindau disease and renal cell carcinoma in a 16-year-old boy. *J Urol* 1992, 147:1588-1591.
  30. Stolle C, Glenn G, Zbar B, Humphrey JS, Choyke P, Walther M, Pack S, Hurley K, Andrey C, Klausner R, Linehan WM: Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum Mutat* 1998, 12:417-423.
  31. Gallou C, Joly D, Mejean A, Staroz F, Martin N, Tarlet G, Orfanelli MT, Bouvier R, Droz D, Chrétien Y, Maréchal JM, Richard S, Junien C, Bérourd C: Mutations of the VHL gene in sporadic renal cell carcinoma: definition of a risk factor for VHL patients to develop an RCC. *Hum Mutat* 1999, 13:464-475.
  32. Gergics P, Patocs A, Toth M, Igaz P, Szucs N, Liko I, Fazakas F, Szabo I, Kovacs B, Glaz E, Racz K: Germline VHL gene mutations in Hungarian families with von Hippel-Lindau disease and patients with apparently sporadic unilateral pheochromocytomas. *Eur J Endocrinol.* 2009,161:495-502.
  33. Maher ER, Neumann HP, Richard S: Von Hippel-Lindau disease: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* 2011, 19:617-23.
  34. The VHL handbook. (<http://www.vhl.org/handbook/vhlhb4.php>)

## Legends to figures and tables

Table 1. Summary of clinical and genetic findings. The age at diagnosis is indicated in brackets. RCC: clear cell renal cell carcinoma, CNS HB: central nervous system haemangioblastoma, Phaeo: pheochromocytoma, RA: retinal angioma

Figure 1. Multiple sequence alignment of VHL protein. Asn78 is highly conserved

Figure 2. Ribbon and balls and sticks rendering of a representative snapshot from molecular simulations carried out for model VHL-Elongin C-HIF-1 alpha complexes. The ribbon model of VHL and Elongin C protein are colored yellow and purple, respectively, while HIF-1alpha is shown in green. The first and last snapshots from the simulation trajectory of the complex including wild type VHL protein indicates a remarkably stable protein complex (A,B). The Asn78Tyr mutation (C) remarkably deforms the 77-83 loop structure in the VHL protein. This deformation spreads over the Thr100-Arg107 loop of VHL (marked by red arrow) which finally results in a weakened interaction between this loop and the HIF-1alpha protein (shown by green arrow). The deformed loop structure in VHL deforms substantially the neighboring loop (Arg82-Phe93) structure in Elongin C (shown in blue ellipse in Fig1B and Fig1C).

Atomtype coloring (C, N, O, H atoms are colored grey, blue, red and white, respectively) was used for the balls and sticks model which were applied for residues which are supposed to play key role in intercahin interactions.

Figures and tables

Family	Patients	RCC	CNS HB	Phaeo	RA	other manifestations	VHL disease type	germline mutation	Predicted protein modification
A	IP	15	-	-	15	-	1	c.163G>T	p.Glu55X
B	IP	-	48	-	48	-	1	c.232A>T	p.Asn78Tyr
	Brother	-	45	-	45	-	1	c.232A>T	p.Asn78Tyr
C	IP		14	-	12	-	1	c.340+1G>A	p.Gly114AspfsX6
	Father	34, bilateral	34	-	38	-	1	c.340+1G>A	p.Gly114AspfsX6
D	IP	25	25	-	-	-	1	c.555C>A	p.Tyr185X
E	IP	-	41	-	41	-	1	c.583C>T	p.195GlnX

Table 1.

Homo Sapiens	58	RPRPVLR	SVNSREPSQVIFC	N	RS	PRVVL	PVWLNFD	GEPQPY	98				
Pongo pygmaeus	58	RPRPVLR	SVNSREPSQVIFC	N	RS	PRVVL	PVWLNFD	GEPQPY	98				
Rattus norvegicus	24	RPRPVLR	SVNSREPSQVIFC	N	RS	PRVVL	PLWLNFD	GEPQPY	64				
Mus musculus	24	RPRPVLR	SVNSREPSQVIFC	N	RS	PRVVL	PLWLNFD	GEPQPY	64				
Canis familiaris	59	-PRPVLR	SVNS	c	EPSQVIFC	N	RS	PRVVL	PVWLNFD	GEPQPY	98		
Xenopus tropicalis	12	---	PqLRSf	NSRQP	vQ	VVFC	N	R	StR	tVq	PIWVNFQ	GDPQSY	49

Figure 1.

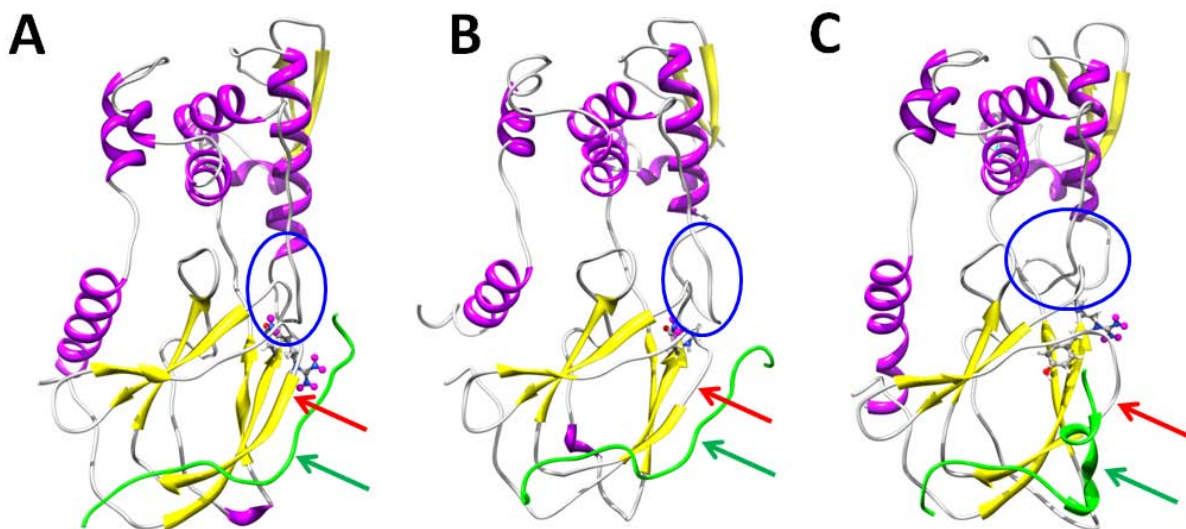


Figure 2.