

Спектр мутаций гена *VHL* при спорадическом светлоклеточном почечно-клеточном раке

Н. Н. Мазуренко¹, И. В. Цыганова¹, В. В. Стрельников², А. В. Балбуцкий¹, Т. Ф. Маливанова¹, Е. Б. Кузнецова², В. А. Драудин-Крыленко¹, О. В. Шаньгина¹, А. Ф. Мукерия¹, В. Б. Матвеев¹, Д. Г. Заридзе¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. акад. Н. П. Бочкова»; Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье, 1

Контакты: Наталья Николаевна Мазуренко nmazurenko@mail.ru

Нарушения гена *VHL* являются ранней и характерной особенностью светлоклеточного почечно-клеточного рака (скПКР). Проведен анализ мутаций *VHL* в 98 образцах скПКР для определения их локализации относительно функционально значимых мотивов белка *VHL*. Анализ мутаций *VHL* проводили в ДНК из свежесзамороженных тканей опухоли секвенированием по Сэнгеру, параллельно 62 образца скПКР подвергли секвенированию нового поколения (*next generation sequencing*, NGS). В 73 (74,4 %) из 98 образцов скПКР обнаружены нон-сайлент-мутации в кодирующей части гена *VHL*. Мутации, нарушающие функции белка *VHL* (нон-сенс-мутации, мутации в сайтах сплайсинга и делеции/инсерции со сдвигом рамки считывания), выявлены в 40 (40,8 %) образцах скПКР, миссенс-мутации – в 35 (35,7 %). Всего обнаружено 76 мутаций, влияющих на функции белка *VHL* в 72 (73 %) образцах скПКР, причем 15 мутаций не были описаны ранее (делеции/инсерции *VHL* со сдвигом или без сдвига рамки считывания). В 4 случаях скПКР выявлено по 2 мутации *VHL*. Большинство миссенс-мутаций нарушают сайты взаимодействия белка *VHL* с HIF, PKC или кинезином. Рассмотрен вопрос о патогенности сайлент-мутации p.P154P и мутаций в интронах вблизи сайтов сплайсинга. Полученные результаты важны для изучения роли мутаций *VHL* в прогрессировании и прогнозе скПКР.

Ключевые слова: светлоклеточный почечно-клеточный рак, мутации *VHL*, секвенирование по Сэнгеру, NGS-анализ

Для цитирования: Мазуренко Н. Н., Цыганова И. В., Стрельников В. В. и др. Спектр мутаций гена *VHL* при спорадическом светлоклеточном почечно-клеточном раке. Успехи молекулярной онкологии 2020;7(3):48–57.

DOI: 10.17650/2313-805X-2020-7-3-48-57



Spectrum of *VHL* mutations in clear cell renal cell carcinoma

N. N. Mazurenko¹, I. V. Tsyganova¹, V. V. Strelnikov², A. V. Balbutsky¹, T. F. Malivanova¹, E. B. Kuznetsova², V. A. Draudin-Krilenko¹, O. V. Shangina¹, A. F. Mukeria¹, V. B. Matveev¹, D. G. Zaridze¹

¹N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²N. P. Bochkov Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115522, Russia

The *VHL* gene alterations are the early and characteristic feature of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). We have examined *VHL* mutations in sporadic 98 ccRCC cases to evaluate their localization in relation to functionally important motifs of the *VHL* protein. The DNA samples were obtained from snap-frozen carcinoma biopsies and used for Sanger sequencing, while 62 ccRCC DNA cases were studied by *next generation sequencing* (NGS) analysis in parallel. In 73 (74.4 %) of 98 ccRCC cases the somatic non-silent *VHL* mutations were identified. Loss of function *VHL* mutations (nonsilent, frameshifts or in splicing sites) were detected in 40 (40.8 %) ccRCC, while missense mutations – in 35 (35.7 %) ccRCC. In total 76 mutations important for *VHL* functioning were detected in 72 (73 %) ccRCC samples, of them 15 mutations (deletion/insertion in-frame or frameshifts) were identified for the first time. Four ccRCC cases contained two mutations each. Most of missense mutations disturb the sites of *VHL* interactions with HIF, PKC or kinesin. The pathogenicity of p.P154P silent mutation and intronic mutations near mRNA *VHL* splicing sites was discussed. The obtained results are important for understanding the role of *VHL* mutations in ccRCC progression and prognosis.

Key words: clear cell renal cell carcinoma, *VHL* mutations, Sanger sequencing, NGS analysis

For citation: Mazurenko N. N., Tsyganova I. V., Strelnikov V. V. et al. Spectrum of *VHL* mutations in clear cell renal cell carcinoma. Uspekhii molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2020;7(3):48–57. (In Russ.).

Введение

Рак почки занимает 9-е место по распространенности в структуре онкологической заболеваемости в мире [1]. Ежегодно регистрируют более 330 тыс. новых случаев заболевания раком почки и более 140 тыс.

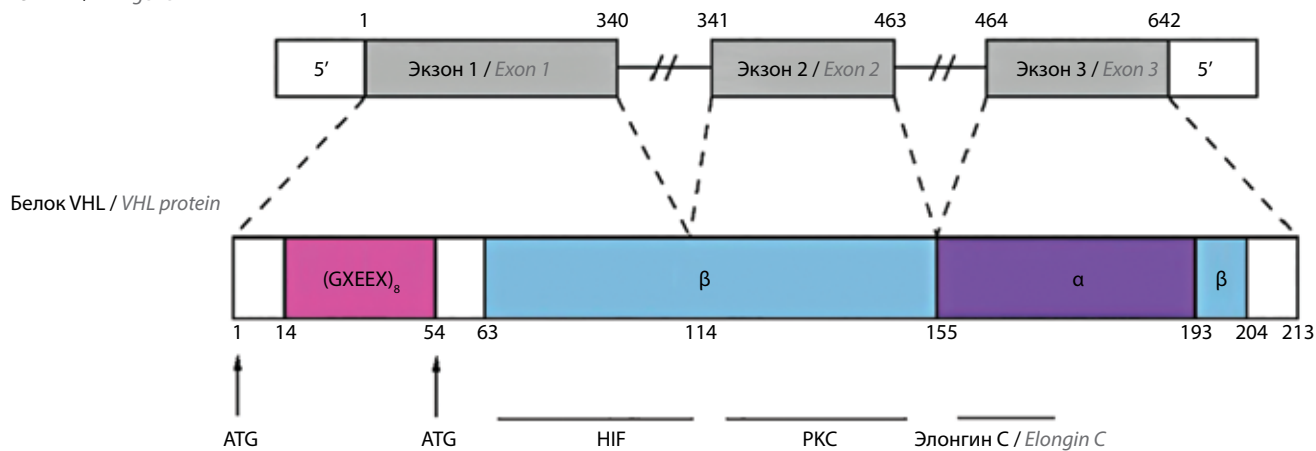
смертей от этой патологии. В России в 2017 г. было зарегистрировано 24 779 новых случаев рака почки, от него умерли 8386 человек, причем заболеваемость с 1990 г. выросла с 5,5 до 13,8 случая на 100 тыс. населения [2, 3].

Рак почки представлен различными гистологическими формами, наиболее распространен (80–85 %) светлоклеточный почечно-клеточный рак (скПКР), который отличается наибольшей агрессивностью. Для скПКР характерны нарушения гена von Hippel–Lindau (*VHL*), которые присутствуют как у пациентов с семейным раком почки с наследственным синдромом von Hippel–Lindau (2–4 %), так и у больных спорадическим раком почки. Изменения гена *VHL* являются ранним и общим событием в канцерогенезе спорадического скПКР. В 85–98 % случаев имеет место потеря гетерозиготности на 3p, что в сочетании с мутациями приводит к биаллельной инактивации гена *VHL*, при этом выявляют разнообразные соматические мутации: делеции/инсерции со сдвигом рамки считывания, нонсенс- и миссенс-мутации, мутации, затрагивающие сайты сплайсинга [4–6]. В 8–19 % случаев скПКР инактивация гена *VHL* происходит за счет гиперметилирования промотора [7–9]. Нарушения *VHL* характерны именно для скПКР [10], тогда как гиперметилирование промотора выявляется в равной степени в различных гистологических подтипах почечно-клеточного рака (ПКР) [11].

Ген *VHL* размером 10 kb расположен в локусе 3p25.3, состоит из 3 экзонов и кодирует 2 белковых изоформы VHL 30 (экзоны 1, 2, 3; 213 ак) и VHL19 (экзоны 1 и 3; 160 ак). Каноническая изоформа VHL30 является компонентом E3 убиквитинлигазного комплекса VCB-cul2, содержащего элонгины C и B, белки Cullin-2 и Rbx1. Белок VHL связывается более чем с 30 белками для их последующей убиквитинзависимой деградации, в том числе с индуцируемыми гипоксией факторами (HIF), протеинкиназой C, ретинолсвязывающим белком 1 [12]. Среди мишеней VHL наиболее изучены субъединицы HIF1 α /2 α , регулирующие транскрипцию большого числа генов, в том числе *VEGF*, *PDGF*, *EPO*, *CA9* и *CXCR4*, важных для клеточного метаболизма, ангиогенеза, инвазии и метастазирования [13].

Белок VHL30 имеет N-концевой домен в 53 аминокислотных остатка (включает 8 копий кислых пентамерных повторов GXEEX), который связывается с фибрином и, как принято считать, не несет функциональной нагрузки (см. рисунок). Однако имеются указания, что фосфорилирование этого домена влияет на супрессивные свойства белка VHL [14]. Изучение кристаллической структуры показало, что центральная и C-концевая части VHL30 состоят из β -сэндвич домена, распознающего субстрат (63–154 ак, кодируются экзонами 1 и 2; 193–204 ак, кодируются экзонами 2 и 3), и α -спирального домена (155–192 ак, кодируются экзонами 2 и 3), который контактирует с элонгином C. В нормальных условиях в присутствии кислорода субъединицы HIF после гидроксирования пролилгидроксилазой PHD приобретают способность связываться с β -доменом белка VHL, который через α -домен формирует третичный комплекс с элонгинами C и B, компонентами E3 убиквитинлигазного комплекса. При этом молекулы убиквитина взаимодействуют с HIF и осуществляют его протеолиз. В условиях гипоксии негидроксированные субъединицы HIF1 α образуют гетеродимеры с HIF1 β , поступают в ядро и активируют транскрипцию генов, ответственных за функционирование клеток при низком содержании кислорода. Кроме дестабилизации HIF1 α белок VHL участвует в активации многих эффекторных белков, регулирующих активацию p53, стабильность микротрубочек, клеточную сценесценцию и анеуплоидию клеток, апоптоз нейронов, убиквитинизацию РНК-полимеразы, активность NF- κ B [15].

При анализе публикаций выявляются значительные различия в частоте мутаций *VHL* при скПКР – от 41 до 82 % [4, 7, 11, 16–21]. Вариации в частоте мутаций частично связаны с тем, что одни авторы изучают только нон-сайлент-мутации в экзонах, влияющие на структуру белка VHL [21], тогда как другие описывают все мутации, включая мутации в первых

Ген *VHL* / *VHL* geneСтруктура гена и белка *VHL*
VHL gene and protein structure

53 кодонах экзона 1, сайлент-мутации, а также мутации в интронах. Различия в результатах также могут быть связаны с выборкой пациентов, процентным соотношением опухолевой и нормальной ткани в исследуемом образце, субъективной оценкой гистологии опухоли, а также с методом определения мутаций. В частности, отмечается более низкая частота мутаций при секвенировании нового поколения (next generation sequencing, NGS), чем при секвенировании по Сэнгеру [18, 19].

Изучение связи мутаций *VHL* с этиологией, прогрессированием и прогнозом скПКР привело к накоплению большого количества противоречивых данных. Метаанализ результатов 10 публикаций, включивших 1082 пациента со скПКР, показал, что изменения гена *VHL* незначительно ассоциированы с клиническими характеристиками заболевания и общей выживаемостью пациентов [22]. Тем не менее изучение мутаций *VHL* важно, так как для прогрессирования скПКР и, возможно, для прогноза заболевания определенное значение имеет сочетание мутаций *VHL* и других генов [23–25]. При этом независимо от нарушений других генов слабая экспрессия белка VHL была ассоциирована с более высокой стадией заболевания ($p = 0,023$) и меньшей общей выживаемостью пациентов ($p = 0,013$) [26].

Цель исследования – изучение спектра мутаций гена *VHL* в образцах спорадического скПКР у российских больных.

Материалы и методы

Клинический материал. В исследование включено 98 образцов первичного скПКР от пациентов, которые находились на лечении в отделении онкоурологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Больные были отобраны из базы данных молекулярно-эпидемиологического исследования рака почки, проводимого в отделе эпидемиологии и профилактики злокачественных опухолей [27]. Исследование одобрено комитетом по этике при НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Диагноз был установлен на основании клинической картины и гистологической верификации опухолевых образцов в отделении патологической анатомии опухолей человека.

Опухолевую ДНК выделяли из свежемороженых операционных биоптатов ПКР с использованием протеиназы К и последующей фенол-хлороформной экстракцией. Для всех образцов был определен процент опухолевых клеток в серийных срезах свежемороженых тканей, в исследование вошли образцы ПКР, которые содержали 60–100 % опухолевых клеток. Для 8 образцов скПКР ДНК была получена из опухолевых клеток, собранных с депарафинизированных срезов опухолевых биоптатов при использовании протеиназы К.

Анализ мутаций. Анализ мутаций гена *VHL* проводили секвенированием по Сэнгеру и NGS.

Аmplification участков кодирующей последовательности *VHL* в ДНК из свежемороженых тканей проводили в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами к экзонам 1–3, как описано [11]: *VHL1_F*: cta-cgg-agg-tcg-act-cgg-gag; *VHL1_R*: ggg-ctt-cag-acc-gtg-cta-tcg; *VHL2_F*: ccg-tcg-cca-gcc-acc-ggt-gtg; *VHL2_R*: gga-taa-cgt-gcc-tga-cat-cag; *VHL3_F*: cgt-tcc-ttg-tac-tga-gac-cct-ag; *VHL3_R*: gaa-cca-gtc-ctg-tat-vta-gat-caa-g.

ПЦР-продукты разделяли в 2 % агарозном геле и после электрофореза выделяли из геля для секвенирования по Сэнгеру с помощью набора Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher, США).

Параллельно было проведено NGS для 62 препаратов ДНК скПКР (54 препарата ДНК из свежемороженых тканей и 8 препаратов ДНК из парафиновых срезов) с праймерами: *NGS_VHL1_F*: ggt-cat-ctt-ctg-caa-tcg-cag-t; *NGS_VHL1_R*: gct-tca-gac-cgt-gct-act-gt; *NGS_VHL2_F*: tac-ggt-gct-gga-gga-tcc-tt; *NGS_VHL2_R*: tac-tct-tcg-acg-cct-gcc-tcc; *NGS_VHL3_F*: aca-ttc-agt-tag-tta-aag-caa-tca-caa-gc; *NGS_VHL3_R*: cgc-tct-ttc-aga-gta-tac-act-gga-ag; *NGS_VHL4_F*: cca-ccg-gtg-tgg-ctc-tt; *NGS_VHL4_R*: cta-tcc-tgt-act-tac-cac-aac-aac-ctt-ctc; *NGS_VHL5_F*: ctg-gat-cgc-gga-ggg-aat; *NGS_VHL5_R*: tgc-gat-tgc-aga-aga-tga-cct; *NGS_VHL6_F*: ccc-tag-tct-gcc-act-gag-gat-t; *NGS_VHL6_R*: atc-agt-acc-ctc-aaa-agg-tga-gat-ga.

Высокопроизводительное полупроводниковое параллельное секвенирование ДНК выполняли на приборе Ion S5 (Thermo Fisher, США). Подготовку библиотек фрагментов ДНК проводили с использованием набора реактивов Ion AmpliSeq Library Kit 2.0.

Поиск данных о выявленных мутациях и их патогенетическом значении осуществляли в базах COSMIC (the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer; <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) и HGMD (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>).

Результаты и обсуждение

В данной работе не проводили выявление герминальных мутаций гена *VHL*, так как исследовали ДНК только из опухолевых клеток скПКР, но не из нормальных тканей пациентов.

По функциональной значимости все мутации гена *VHL* можно разделить на 3 группы.

1. Мутации, приводящие к утрате белка VHL или нарушению его функций (LOF, loss of function)

В 1-ю группу вошли различные мутации, приводящие к нарушению функций белка VHL (loss of function, LOF), которые обнаружены в 40 (40,8 %) из 98 образцов скПКР (табл. 1):

- 1) 6 вариантов нонсенс-мутаций обнаружены в 7 (7,1 %) из 98 образцов скПКР, все описаны в базе COSMIC;
- 2) делеции/инсерции *VHL*, вызывающие сдвиг рамки считывания, выявлены в 27 (27,5 %) из 98 образцов скПКР, причем 11 из 27 мутаций являются новыми и отсутствуют в базе COSMIC (данные

Таблица 1. Мутации, приводящие к утрате белка VHL или нарушению его функциональности в образцах спорадического светлоклеточного почечно-клеточного рака

Table 1. Loss of function mutations in the VHL gene in sporadic clear cell renal cell carcinoma samples

№	Эк-зон Exon	Мутация мРНК Mutation mRNA change	Мутация белка VHL VHL protein mutation	Тип мутации Mutation type	COSMIC	Патоген- ность Pathoge- nicity	Домен Domain	Мишень связывания Proteins binding site
1	1	c.159_166 del 8nt	p.E53FS*	FS*			N-концевой N-end	
2	1	c.163G>T	p.E55X	Nonsense	COSM249129	Патоген Pathogen	β	HIF
3	1	c.164 ins 4nt	p.E55FS*	FS*			β	HIF
4	1	c.166 dupG	p.A56FS*	FS*	COSM3734689		β	HIF
5	1	c.176_180 del 5nt	p.P59FS*	FS*			β	HIF
6	1	c.198_207 del 10nt	p.N67FS*	FS*			β	HIF
7	1	c.217C>T	p.Q73X	Nonsense	COSM17872	0,82	β	HIF
8	1	c.221 delT	p.V74FS*	FS*	COSM4186011	N/a	β	HIF
9	1	c.225 delC	p.I75FS*	FS*			β	HIF
10	1	c.236_237 del	p.R79FS	FS*	COSM17719	N/a	β	HIF
11	1	c.251 delT	p.84VFS*	FS*			β	HIF
12	1	c.263 delG	p.W88FS*	FS*	COSM26785	N/a	β	HIF
13	1	c.263G>A	p.W88X	Nonsense	COSM18070	0,98	β	HIF
14	1	c.310_339 del 30nt	p.G104_ R113 del	In frame Splicing effect			β	HIF
15	1	c.315_316 ins 7nt	p.T105_ T106FS*	FS*			β	HIF Kinesin
16	1	c.319 delC	p.R107FS*	FS*	COSM17891	N/a	β	HIF Kinesin
17	1	c.320_323 delins CA	p.R107FS*	FS*			β	HIF Kinesin
18	1	c.G340C	p.G114R	Missense Splicing effect	COSM18065	0,98	β	HIF Kinesin
19	2	c.341_11 del 37nt	c.341_11 del 37nt	Splicing effect			β	HIF Kinesin
20, 21	2	c.341-1G>T	p.G114C	Splicing effect	COSM17642	0,98	β	HIF Kinesin
22	2	c.369 delG	p.T124FS*	FS*	COSM17895	N/a	β	Kinesin
23	2	c.408 delT	p.F136FS*	FS*	COSM18059	N/a	β	PKC
24	2	c.419_420 del	p.L140FS*	FS*	COSM17930	N/a	β	PKC
25	2	c.431 delG	p.G144FS*	FS*	COSM14412	N/a	β	PKC
26	2	c.439 delA	p.I147FS*	FS*	COSM17976	N/a	β	PKC
27	2	c.444 delT	p.F148FS*	FS*	COSM14410	N/a	β	PKC
28	2	c.463G>A	p.V155M	Missense Splicing effect	COSM18152	0,87	β	PKC
29	3	c.475A>T	p.K159X	Nonsense	COSM422840	0,93	α	Elongin C

Окончание табл. 1

End of table 1

№	Эк- зон Exon	Мутация мРНК Mutation mRNA change	Мутация белка VHL VHL protein mutation	Тип мутации Mutation type	COSMIC	Патоген- ность Pathoge- nicity	Домен Domain	Мишень связывания Proteins binding site
30, 31	3	c.481C>T	p.R161X	Nonsense	COSM17612	0,87	α	Elongin C
32	3	c.483_490 del8	p.C161FS*	FS*			α	Elongin C
33	3	c.493 delG	p.V165FS*	FS*	COSM14332	0,93	α	Elongin C
34	3	c.500_501 ins GA	p.S168FS*	FS*			α	Elongin C
35	3	c.525C>A	p.Y175X	Nonsense	COSM17789	0,71	α	Elongin C
36	3	c.532 delC	p.L178FS*	FS*	COSM18265	N/a	α	Elongin C
37	3	c.548_549 del 2nt	p.L184FS*	FS*			α	Elongin C
38	3	c.562 delC	p.L188FS*	FS*	COSM14337	N/a	α	Elongin C
39	3	c.576_586 del 11nt	p.P192FS*	FS*			α	Elongin C
40	3	c.607_608 del CA	p.Q203FS*	FS*	COSM3358443	N/a	С-концевой C-end	

Примечание. Здесь и в табл. 2: мРНК – матричная РНК; FS* – мутация со сдвигом рамки считывания; n/a – нет данных; kinesin – кинезин; elongin – элонгин.

Note. Here and in the table 2: mRNA – messenger RNA; FS* – frameshift mutation; n/a – data non-available.

на июль 2020 г.). Делеции обнаружены в 22 случаях скПКР, инсерции – в 4, мутация p.R107 FS* (c.320_323 delins CA) – в 1;

3) мутации, затрагивающие сайты сплайсинга, разнообразны и выявлены в 6 (6,1 %) образцах скПКР:

- в 2 образцах скПКР выявлены ранее не описанные делеции, затрагивающие сайты сплайсинга мРНК *VHL*:

- c.341_11 del 37nt начинается в интроне 1 и включает 26 кодонов экзона 2,

- c.310_339 del 30nt, p.104_113 del захватывает донорный сайт сплайсинга экзона 1;

- в 2 образцах скПКР выявлены миссенс-мутации, затрагивающие сайты сплайсинга матричной РНК (мРНК) *VHL*. Это патогенные миссенс-мутации в акцепторном сайте сплайсинга экзона 2: c.340 G>C, p.G114R, COSM18065 (Pathogenic score 0,98) и в донорном сайте сплайсинга экзона 2: c.463G>A, p.V155M, COSM18152 (Pathogenic score 0,97);

- в 2 образцах скПКР выявлена мутация в интроне в сайте сплайсинга: c.341-1G>T, COSM17642 (Pathogenic score 0,98).

2. Мутации, не нарушающие рамку считывания *VHL*

Во 2-ю группу включены делеции/инсерции, не нарушающие рамку считывания *VHL*, и миссенс-мутации.

Выявлены 4 ранее не описанные делеции *VHL* без сдвига рамки считывания:

- 2 мутации в экзоне 1 *VHL* кодируют сайт взаимодействия белка *VHL* с HIF: p.V74_V83 del (c.220_249 del); p.C77_N78 del (c.228_233 del);

- 2 мутации в экзоне 2 *VHL* кодируют сайты взаимодействия белка *VHL* с PKC: p.G123 del (c.367_369 del); p.P146_A149 del (c.437_445 del).

Миссенс-мутации гена *VHL* встречаются в 28–35 % случаев скПКР, причем до 40 % этих мутаций существенно влияют на функции белка *VHL* [18, 20].

В нашей работе при анализе 98 образцов скПКР обнаружено 30 вариантов миссенс-мутаций в 35 (35,7 %) случаях, включая 2 вышеописанные мутации p.G114R и p.V155M в сайтах сплайсинга (табл. 2). Все выявленные мутации описаны в базе COSMIC, большинство высокопатогенны (0,85–0,99). Исключение составляет мутация в начале экзона 1 в N-концевом домене *VHL*: c.116G>A, p.G39D (COSM14345; Neutral, Pathogenic score 0,39).

Особый интерес представляет локализация мутаций в белке *VHL*, поскольку это определяет их роль в связывании белков, взаимодействующих с *VHL*. При анализе локализации мутаций в белке *VHL* в образцах скПКР подтверждено, что большинство миссенс-мутаций нарушают сайты взаимодействия *VHL* с HIF, PKC или кинезином (см. табл. 2). В 20 (57 %) из 35 образцов скПКР миссенс-мутации локализованы в β-домене

в сайте взаимодействия с HIF, в 10 (29 %) – в сайте взаимодействия с PKC. В 4 образцах скПКР миссенс-мутации затрагивают α -домен, сайт взаимодействия с элонгином С.

Встречаются различные замены в одной позиции: р.S65, р.N78, р.P86, р.H115 и р.I151. Некоторые мутации выявлены в 2–3 опухолях: р.S65L, р.L89P, р.L118P (см. табл. 2), что соответствует данным литературы. Кодоны р.S65, р.N78, р.W117 и р.L184 описаны как «горячие точки», а миссенс-мутации р.W117 и р.L184 дестабилизируют VHL [20]. Выявленные нами мутации р.S65, р.N78, р.P86, р.W117, р.L118, р.L158 совпадают с «горячими точками», описанными ранее [28].

В 4 образцах скПКР выявлено по 2 мутации VHL, наблюдалось сочетание миссенс-мутации в экзоне 1 и миссенс-мутации в экзоне 2 или делеции со сдвигом рамки считывания в экзоне 3 (табл. 3). Присутствие двух мутаций VHL в одном образце скПКР наблюдали и ранее [16, 20]. Возможно, наличие нескольких мутаций VHL в скПКР связано с поликлональностью опухолей почки [28, 29], поскольку ДНК в каждом случае была получена из достаточно крупного фрагмента свежезамороженной опухолевой ткани.

3. Мутации, не влияющие на функции белка VHL

В 3-ю группу выделены мутации, влияние которых на функции белка VHL неочевидно или требует изучения. К ним относятся мутации, локализованные в 5'UTR (с.73C>T), и упомянутая выше миссенс-мутация в N-концевом домене VHL: с.116G>A, р.G39D (COSM14345; Neutral, Pathogenic score 0,39).

В VHL обнаружено также достаточно много сайлент-мутаций и полиморфизмов, изучение которых не входило в задачу данной работы. Однако наше внимание привлекла сайлент-мутация вблизи сайта сплайсинга экзона 2 – с.462A>T, р.P154P (COSM144976, Pathogenic score 0,87), патогенность которой вызывает сомнение. Мы выявили эту мутацию в 3 образцах скПКР, причем в двух опухолях помимо нее обнаружены мутации в экзоне 1 (р.W88 FS*) или экзоне 2 (р.V130I), а в 3-й – в интроне 3 (с.463+9G>T). По консенсусной последовательности донорного сайта сплайсинга тимин (урацил в РНК) в положении «-2» не должен нарушить сплайсинг. Выявление других патогенных вариантов VHL в тех же образцах также свидетельствует в пользу непатогенности р.P154P.

В 25 образцах скПКР не выявлено нон-сайлент-мутаций в кодирующей части VHL. С помощью ПЦР со специфичными праймерами проанализированы последовательности интронов, граничащие с сайтами сплайсинга. В результате в 2 образцах скПКР выявлена мутация в интроне 1, влияющая на сплайсинг (с.341-1G>T), которая была учтена ранее в 1-й группе мутаций. Выявлены также мутации в интронах гена VHL вблизи экзона: с.341-20G>T (интрон 1), с.463+9G>T (интрон 2), с.464-3C>T (интрон 2). Данных о патогенности этих мутаций нет, и они скорее всего

непатогенны, исходя из консенсуса акцепторного сайта сплайсинга человека. В пользу этого свидетельствует и то, что замены в интронах наблюдались иногда в тех же образцах скПКР, где отмечены мутации в экзонах. Помимо точечных замен в интронах обнаружены делеции (например, делеции del 5033G в интроне 1 в 2 образцах скПКР и др.).

Таким образом, всего выявлено 77 нон-сайлент-мутаций гена VHL в 73 (74,4 %) из 98 образцов скПКР, из которых 76 влияют на функциональность белка. При этом мутации в экзоне 1 выявлены в 36 (36,6 %) случаях скПКР, в экзоне 2 – в 26 (26,5 %), в экзоне 3 – в 15 (15,3 %).

Считается, что для скПКР характерны мутации, которые связаны с дестабилизацией VHL [6, 20, 28]. Мутации консервативных остатков глицина G93 или пролина могут разрушить и дестабилизировать VHL. Мутация N78 разрушает водородные связи, которые стабилизируют участок VHL, связывающий 2 петли, важные для взаимодействия с HIF и элонгином С. В то же время выявлено 3 разных мутации в позиции р.H115N/Y/P, которая непосредственно взаимодействует с HIF α – гидроксипролинсвязывающим сайтом. Эти мутации нарушают способность белка VHL связывать HIF α для последующей убиквитинизации, при этом дестабилизации структуры белкового комплекса VHL с элонгином С и элонгином В (VCB) не происходит [6].

В настоящей работе выявлено 15 образцов скПКР с мутациями в α -домене белка VHL в участке взаимодействия с элонгином С, причем 4 из них – миссенс, приводящие к аминокислотным заменам в сайте сплайсинга мРНК VHL: р.L158R, р.L169P, р.Y175D и р.V155M.

Несмотря на то что мы не исследовали нормальную ткань почки, обнаруженные мутации р.S65L, р.G114R, р.L118P, р.V130I, р.I151T и р.L169P описаны как герминальные и могут встречаться при семейном ПКР [6].

Мутация в позиции р.L169P интересна тем, что находится между 2 сайтами фосфорилирования белка VHL по серину S168 и тирозину Y175, связанными с NEK1-киназой, которая фосфорилирует VHL по этим сайтам, способствуя его протеосомной деградации и цилиарной дестабилизации. Аминокислотная замена р.L169P может индуцировать накопление фосфорилированных CDK1 или родственных CDK- или MAP-киназ. Инактивация VHL связана с повышением уровней CDK1 и CDK2 и стабилизацией транскрипционных факторов HIF, которые являются мишенями VHL [30].

Заключение

Спектр мутаций VHL в скПКР достаточно разнообразен и представлен большим числом генетических нарушений. Всего выявлено 77 нон-сайлент-мутаций в кодирующей части гена VHL в 73 (74,4 %) из 98 образцов скПКР. Мутации, приводящие к утрате функций

Таблица 2. Миссенс-мутации белка VHL в образцах светлоклеточного почечно-клеточного рака

Table 2. VHL missense mutations in sporadic clear cell renal cell carcinoma samples

№	Экзон Exon	Мутация Mutation	Изменения в белке Aminoacid change	COSMIC HGMD	Патогенность Pathogenicity	Домен Domen	Мишень связывания Proteins binding site
1	1	c.116G>A	p.G39D	COSM14345	0,39	N-концевой N-end	
2	1	c.193T>A	p.S65T	COSM97135	0,99	β	HIF
3	1	c.193T>C	p.S65P	COSM18074	0,99	β	HIF
4–6	1	c.194C>T	p.S65L	COSM14400 CM941364 germline mutation	0,98	β	HIF
7	1	c.233A>C	p.N78T	COSM14319	0,98	β	HIF
8	1	c.234T>G	p.N78K	COSM17875	0,85	β	HIF
9	1	c.254T>C	p.L85P	COSM17859	0,89	β	HIF
10	1	c.257C>T	p.P86L	COSM18028	0,97	β	HIF
11	1	c.257C>G	p.P86R	COSM30234	0,97	β	HIF
12–14	1	c.266T>C	p.L89P	COSM14346	0,97	β	HIF
15	1	c.278G>A	p.G93D	COSM97143	0,99	β	HIF
16	1	c.280G>A	p.E94K	COSM3734682	0,93	β	HIF
17	1	c.313A>C	p.T105P	COSM18064	0,95	β	HIF
18	1	c.340G>C	p.G114R	COSM18065 CM951284 germline mutation	0,98	β	HIF Kinesin
19	2	c.343C>A	p.H115N	COSM17752	0,98	β	HIF Kinesin
20	2	c.343C>T	p.H115Y	COSM14375	0,98	β	HIF Kinesin
21	2	c.344A>C	p.H115P	COSM17962	0,98	β	HIF Kinesin
22	2	c.351T>G	p.W117G	COSM 30297	0,97	β	PKC Kinesin
23, 24	2	c.353T>C	p.L118P	COSM14312 CM941373 germline mutation	0,98	β	PKC Kinesin
25	2	c.388G>A	p.V130I	COSM1757303	0,98	β	PKC
26	2	c.391A>T	p.N131Y	COSM17758	0,98	β	PKC
27	2	c.393C>A	p.N131K	COSM1731999	0,95	β	PKC
28	2	c.403T>A	p.L135I	COSM33993	0,98	β	PKC
29	2	c.451A>T	p.I151F	COSM17978	0,99	β	PKC
30	2	c.452T>C	p.I151T	COSM17934	0,97	β	PKC
31	2	c.461C>T	p.P154L	COSM18266	0,96	β	PKC
32	3	c.463G>A	p.V155M	COSM18152	0,87	α	Elongin C
33	3	c.473T>G	p.L158R	COSM30286	0,89	α	Elongin C
34	3	c.506 T>C	p.L169P	COSM17837 CM003060 germline mutation	0,90	α	Elongin C
35	3	c.523T>G	p.Y175D	COSM17917	0,90	α	Elongin C

Таблица 3. Образцы светлоклеточного почечно-клеточного рака с 2 мутациями *VHL*

Окончание табл. 2

Table 3. Cases of clear cell renal cell carcinoma with two *VHL* mutations

End of table 2

№	Мутация 1 мРНК Mutation 1 mRNA change	Изменения в белке Aminoacid change	COSMIC	Мутация 2 мРНК Mutation 2 mRNA change	Изменения в белке Aminoacid change	COSMIC
1	Ex1 c.313A>C	p.T105P	COSM18064	Ex3 c.492 delG	p.V165FS*	COSM14332
2	Ex1 c.266T>C	p.L89P	COSM14346	Ex3 c.532 delC	p.L178FS*	COSM18265
3	Ex1 c.233A>C	p.N78T	COSM14319	Ex3 c.483_490 del 8nt	p.R161FS*	
4	Ex1 c.194C>T	p.S65L	COSM14400	Ex2 c. 404T>A	p.L135I	COSM33993

Примечание. мРНК – матричная РНК.

Note. mRNA – messenger RNA.

белка *VHL*, обнаружены в 40 (40,8 %), а миссенс-мутации – в 35 (35,7 %) образцах скПКР. Особое внимание привлекают ранее не описанные мутации – делеции/инсерции со сдвигом и без сдвига рамки считывания в 15 образцах скПКР. Анализ мутаций *VHL* в образцах скПКР показал, что большинство миссенс-мутаций нарушают сайты взаимодействия белка

VHL с HIF, РКС или кинезином. В дальнейшем предполагается использовать полученные результаты для сравнения показателей выживаемости пациентов с различными мутациями и «диким» типом *VHL*, а также для изучения распространенности мутаций в скПКР в зависимости от эпидемиологических и клинических характеристик опухолевого процесса.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Znaor A., Lortet-Tieulent J., Laversanne M. et al. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur Urol* 2015;67(3):519–30. DOI: 10.1016/j.eururo.2014.10.002.
- Заридзе Д.Г. Рак почки: клинические и экспериментальные исследования. Молекулярная эпидемиология рака почки. М.: РАН, 2019. С. 67–92. [Zaridze D.G. Kidney cancer: clinical and experimental research. *Molecular epidemiology of kidney cancer*. Moscow: RAN, 2019. Pp. 67–92. (In Russ.)].
- Заридзе Д.Г., Мукерия А.Ф., Шаньгина О.В., Матвеев В.Б. Молекулярная эпидемиология рака почки. *Онкоурология* 2018;14(3):107–19. [Zaridze D.G., Mukeriy A.F., Shan'gina O.V., Matveev V.B. Molecular epidemiology of renal cancer. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2018;14(3):107–19. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9776-2018-14-3-107-119.
- Banks R.E., Tirukonda P., Taylor C. et al. Genetic and epigenetic analysis of von Hippel–Lindau (*VHL*) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Res* 2006;66(4):2000–11. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3074.
- Nordstrom-O'Brien M., van der Luijt R.B., van Rooijen E. et al. Genetic analysis of von Hippel–Lindau disease. *Hum Mutat* 2010;31(5):521–37. DOI: 10.1002/humu.21219.
- Gossage L., Pires D.E., Olivera-Nappa A. et al. An integrated computational approach can classify *VHL* missense mutations according to risk of clear cell renal carcinoma. *Hum Mol Genet* 2014;23(22):5976–88. DOI: 10.1093/hmg/ddu321.
- Nickerson M.L., Jaeger E., Shi Y. et al. Improved identification of von Hippel–Lindau gene alterations in clear cell renal tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14(15):4726–34. DOI: 10.1158/1078-0432.
- Cowey C.L., Rathmell W.K. *VHL* gene mutations in renal cell carcinoma: role as a biomarker of disease outcome and drug efficacy. *Curr Oncol Rep* 2009;11(2):94–101. DOI: 10.1007/s11912-009-0015-5.
- Mehdi A., Riazalhosseini Y. Epigenome Aberrations: Emerging driving factors of the clear cell renal cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 2017;18(8):1774. DOI: 10.3390/ijms18081774.
- Wang J., Xi Z., Xi J. et al. Somatic mutations in renal cell carcinomas from Chinese patients revealed by whole exome sequencing. *Cancer Cell Int* 2018;18:159. DOI: 10.1186/s12935-018-0661-5.
- Moore L.E., Nickerson M.L., Brennan P. et al. Von Hippel–Lindau (*VHL*) inactivation in sporadic clear cell renal cancer: associations with germline *VHL* polymorphisms and etiologic risk factors. *PLoS Genet* 2011;7(10):e1002312. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002312.
- Iwai K., Yamanaka K., Kamura T. et al. Identification of the von Hippel–Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(22):12436–41. DOI: 10.1073/pnas.96.22.12436.
- Shen C., Kaelin W.G. The *VHL*/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2013;23(1):18–25. DOI: 10.1016/j.semcancer.2012.06.001.
- Lolkema M.P., Gervais M.L., Sniijckers C.M. et al. Tumor suppression by the von Hippel–Lindau protein requires phosphorylation of the acidic domain. *J Biol Chem* 2005;280:22205–11. DOI: 10.1074/jbc.M503220200.
- Frew I.J., Moch H.A. Clearer view of the molecular complexity of clear cell renal cell carcinoma. *Annu Rev Pathol* 2015;10:263–89. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012414-040306.
- Young A.C., Craven R.A., Cohen D. et al. Analysis of *VHL* gene alterations and their relationship to clinical parameters in sporadic conventional renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009;15(24):7582–92. DOI: 10.1158/1078-0432.

17. Taylor C., Craven R.A., Harnden P. et al. Determination of the consequences of VHL mutations on VHL transcripts in renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2012;41(4):1229–40. DOI: 10.3892/ijo.2012.1561.
18. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013;499(7456):43–9. DOI: 10.1038/nature12222.
19. Scelo G., Riazalhosseini Y., Greger L. et al. Variation in genomic landscape of clear cell renal cell carcinoma across Europe. *Nat Commun* 2014;5:5135. DOI: 10.1038/ncomms6135.
20. Razafinjato C., Bihr S., Mischo A. et al. Characterization of VHL missense mutations in sporadic clear cell renal cell carcinoma: hotspots, affected binding domains, functional impact on pVHL and therapeutic relevance. *BMC Cancer* 2016; 16:638. DOI: 10.1186/s12885-016-2688-0.
21. Mikhailenko D.S., Zhinzhiro T.A., Kolpakov A.V. et al. Specific localization of missense mutations in the *VHL* gene in clear cell renal cell carcinoma. *Bull Exp Biol Med* 2017;163(4):465–8. DOI: 10.1007/s10517-017-3829-4.
22. Kim H.S., Kim J.H., Jang H.J. et al. Clinicopathologic significance of *VHL* gene alteration in clear-cell renal cell carcinoma: An Updated Meta-Analysis and Review. *Int J Mol Sci* 2018;19(9): E2529. DOI: 10.3390/ijms19092529.
23. Casuscellia J., Vanob Y.A., Fridman W.H., Hsieh J.J. Molecular classification of renal cell carcinoma and its implication in future clinical practice. *Kidney Cancer* 2017;1(1): 3–13. DOI: 10.3233/KCA-170008.
24. Poehlman W.L., Hsieh J.J., Feltus F.A. Linking binary gene relationships to drivers of renal cell carcinoma reveals convergent function in alternate tumor progression paths. *Sci Rep* 2019;9(1):2899. DOI: 10.1038/s41598-019-39875-y.
25. Huang Y., Wang J., Jia P. et al. Clonal architectures predict clinical outcome in clear cell renal cell carcinoma. *Nat Commun* 2019;10(1):1245. DOI: 10.1038/s41467-019-09241-7.
26. Högner A., Krause H., Jandrig B. et al. PBRM1 and VHL expression correlate in human clear cell renal cell carcinoma with differential association with patient's overall survival. *Urol Oncol* 2018;36(3):94.e1–14. DOI: 10.1016/j.urolonc.2017.10.027.
27. Заридзе Д.Г., Мазуренко Н.Н., Бежанова С.Д. и др. Прогностическая роль экспрессии маркера PBRM1 при светлоклеточном раке почки. *Онкоурология* 2019;15(1):23–31. [Zaridze D.G., Mazurenko N.N., Bezhanova S.D. et al. Prognostic role of PBRM1 marker expression in clear-cell renal-cell carcinoma. *Onkourologiya* = *Cancer Urology* 2019;15(1):23–31. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9776-2019-15-1-23-31.
28. Minervini G., Quaglia F., Tabaro F., Tosatto S.C.E. Insights into the molecular features of the von Hippel–Lindau-like protein. *Amino Acids* 2019;51(10–12):1461–74. DOI: 10.1007/s00726-019-02781-8.
29. Gerlinger M., Rowan A.J., Horswell S. et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012;366:883–92. DOI: 10.1056/NEJMoa1113205.
30. Krassowski M., Paczkowska M., Cullion K. et al. Active Driver DB: human disease mutations and genome variation in post-translational modification sites of proteins. *Nucleic Acids Res* 2018;46(D1):D901–10. DOI: 10.1093/nar/gkx973.

Вклад авторов

Н.Н. Мазуренко: анализ полученных данных, обзор публикаций, написание текста и редактирование статьи;
 И.В. Цыганова: проведение генетических исследований;
 В.В. Стрельников: анализ результатов NGS, редактирование статьи;
 А.В. Балбуцкий: проведение генетического анализа;
 Т.Ф. Маливанова: проведение генетического анализа;
 Е.Б. Кузнецова: проведение NGS-исследования;
 В.А. Драудин-Крыленко: создание клинико-эпидемиологической базы данных;
 О.В. Шаньгина: создание клинико-эпидемиологической базы данных;
 А.Ф. Мукерия: создание клинико-эпидемиологической базы данных;
 В.Б. Матвеев: организация и предоставление клинического материала;
 Д.Г. Заридзе: разработка дизайна исследования, создание клинико-эпидемиологической базы данных, редактирование статьи.

Authors' contributions

N.N. Mazurenko: analysis of the obtained data, reviewing of publications, article writing, article editing;
 I.V. Tsyganova: genetic research;
 V.V. Strelnikov: analysis of NGS results, article editing;
 A.V. Balbutsky: genetic analysis;
 T.F. Malivanova: genetic analysis;
 E.B. Kuznetsova: NGS analysis;
 V.A. Draudin-Krilenko: creation of a clinical and epidemiological database;
 O.V. Shangina: creation of a clinical and epidemiological database;
 A.F. Mukeria: creation of a clinical and epidemiological database;
 V.B. Matveev: organization and provision of clinical material;
 D.G. Zaridze: study design development, creation of a clinical and epidemiological database, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.Н. Мазуренко / N.N. Mazurenko: <https://orcid.org/0000-0003-4767-6983>
 В.В. Стрельников / V.V. Strelnikov: <https://orcid.org/0000-0001-9283-902X>
 А.В. Балбуцкий / A.V. Balbutsky: <https://orcid.org/0000-0001-6809-3221>
 Т.Ф. Маливанова / T.F. Malivanova: <https://orcid.org/0000-0001-9699-2603>
 Е.Б. Кузнецова / E.B. Kuznetsova: <https://orcid.org/0000-0002-7857-6320>
 В.А. Драудин-Крыленко / V.A. Draudin-Krilenko: <https://orcid.org/0000-0003-2205-8345>
 О.В. Шаньгина / O.V. Shangina: <https://orcid.org/0000-0003-2431-068X>
 А.Ф. Мукерия / A.F. Mukeria: <https://orcid.org/0000-0002-6847-9295>
 В.Б. Матвеев / V.B. Matveev: <https://orcid.org/0000-0001-7748-9527>
 Д.Г. Заридзе / D.G. Zaridze: <https://orcid.org/0000-0002-2824-3704>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia.

All patients gave written informed consent to participate in the study.