

Zentrum für Humangenetik  
Ingelheim, Bioscientia Institut  
für medizinische Diagnostik und  
III. Medizinische Klinik, Hämatologie,  
Onkologie, Johannes Gutenberg  
Universität Mainz

## Zusammenfassung

Das von Hippel-Lindau-Syndrom (VHL) ist eine tumorprädisponierende hereditäre Kondition, die gekennzeichnet ist durch Tumore des zentralen Nervensystems, der Netzhaut und der Nebenniere, sowie durch Nierenzellkarzinome (NZK) und multiple Zysten. Der Erkrankung liegt eine Keimbahnmutation im VHL-Tumorsuppressor-Gen zugrunde. Seit seiner Identifizierung im Jahre 1993 in der Chromosomenregion 3p25-26 zeigt sich zunehmend die große zellbiologische und klinische Bedeutung des Genproduktes, einem Multifunktionsprotein. Die am besten verstandene Funktion des VHL-Proteins ist die Sauerstoff-abhängige Regulation von HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor) und seiner etwa 60 Zielgene, u.a. VEGF (vascular endothelial growth factor) und EPO (erythropoietin). Daraus ergeben sich die ersten Ansätze für Therapien, die vor allem für die wesentlich häufiger auftretenden sporadischen Tumorformen, insbesondere für das NZK, bedeutsam sind. Neben dieser eindeutig vaskulär-zystischen Qualität weisen VHL assoziierte Anomalien auch eindeutig nicht-vaskuläre Eigenschaften auf. So zeigt das Phäochromozytom solide Gewebeproliferationen, die ursächlich vom bekannten VHL/HIF-pathway abweichen. Diese Dichotomie spiegelt sich auch in der Qualität der Keimbahnmutationen wider. Die Tumorentstehung folgt dem Knudsonschen two-hit-Modell, wobei zusätzlich zur VHL-Alteration weitere genetische Veränderungen als notwendig für die Tumorgenese angenommen werden. Aus Genotyp-, Phä-

notyp-Korrelationen ergeben sich die ersten unmittelbaren Konsequenzen für die genetische Beratung, zum Teil auch schon für ein differenziertes Krankheits-Management.

## Schlüsselwörter

von Hippel-Lindau, Nierenzellkarzinom, Phäochromozytom, Tumorangiogenese, Hypoxie

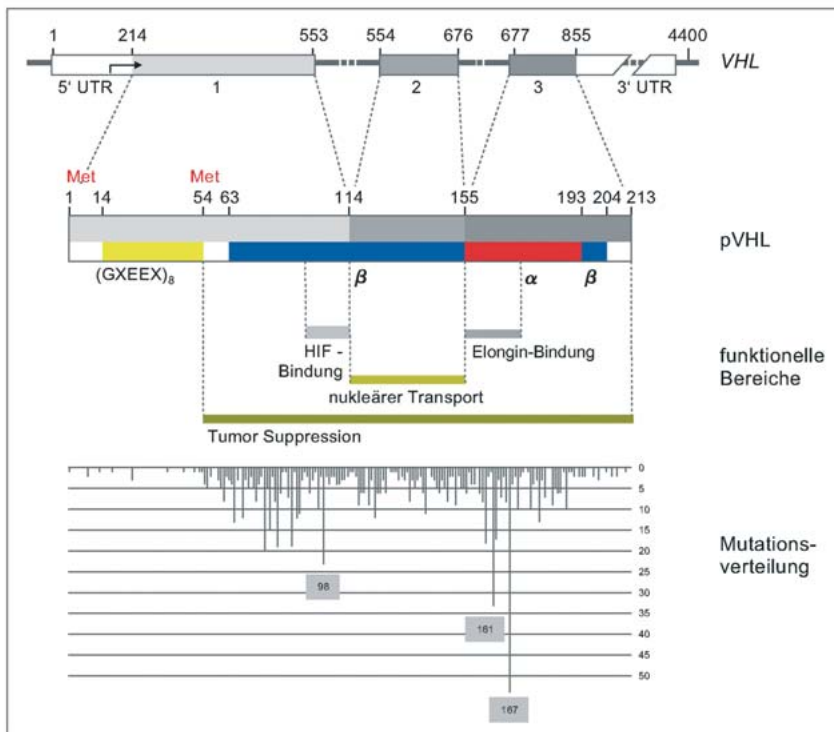
## Abstract

The von Hippel-Lindau syndrome (VHL) is a tumor predisposing condition which is characterized by tumors of the central nervous system, angiomas of the retina, pheochromocytoma, clear cell renal carcinomas and multiple cysts. The disease is caused by a germline mutation in the VHL tumor suppressor-gene. Since its identification in 1993 in the chromosomal region 3p25-26, multiple functions for the VHL-gene product with important significance for our understanding of carcinogenesis and for clinical applications have been elucidated. The pVHL function best known so far is the oxygen dependent regulation of HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor) and its approximately 60 target genes, such as VEGF (vascular endothelial growth factor), and EPO (erythropoietin). Understanding these mechanisms results in first therapeutic approaches which are also beneficial for the more common sporadic tumor counterparts, especially for renal cell carcinomas. In addition to these vascular-cystic features, there are VHL associated

characteristics that are explicitly non-vascular. For instance, pheochromocytomas present with proliferation in a solid tissue pattern that might not be caused by the classical VHL/HIF pathway. This dichotomy is also reflected by the quality of the germline mutation seen. Tumorigenesis follows the two-hit model of Knudson, however it is obvious that in addition to VHL alterations, additional genetic alterations are needed for complete carcinogenesis. Genotype-, phenotype-correlations directly result in clinical consequences for genetic counseling and for an individualized disease management of VHL.

## Key words

von Hippel-Lindau, renal cell carcinoma, pheochromocytoma, tumorangiogenesis, hypoxia



**Abb 1 a** *VHL*-Struktur mit der genomischen Organisation, den Funktionsbereichen des *VHL*-Proteins und der Häufigkeitsverteilung der beschriebenen Keimbahnmutationen

## 1. Einleitung

Das von Hippel-Lindau-Syndrom (OMIM 193300) ist ein autosomal dominantes Tumorprädispositionssyndrom mit einem pleiotropen klinischen Bild. Es zeichnet sich durch eine große Zahl verschiedenartiger gut- und bösartiger Tumore, sowie vermehrter Zystenbildung in einer Reihe parenchymatöser Organe aus. Namensgebend sind der deutsche Ophthalmologe Eugen von Hippel (1867-1939) und der schwedische Neuropathologe Arvid Lindau (1892-1958). Von Hippel beschrieb 1896 die typischen Netzhauttumore und prägte den Begriff Angiomasia retinae, während Lindau 1926 die Assoziation dieser Veränderungen mit histologisch ähnlichen Hirnkomplikationen in Verbindung brachte. Die Inzidenz beträgt 1: 53.000 bis 1: 39.000, die Prävalenz ist 1:85.000 bis 1: 31.000 (Decker, 2001). *VHL* wurde in verschiedenen ethnischen Gruppen beschrieben. Die Angaben zur Häufigkeit der *de novo*-Fälle schwanken erheblich und werden zwischen 5- 35% angegeben, gelegentlich sogar noch höher. Die Penetranz im Alter von 60 Jahren liegt bei über 95%. Keimbahnmutationen sind auch als Mosaik beschrieben worden. Wegen der Unkenntnis des Krankheitsbildes wird *VHL* auch heute noch oft nicht oder nicht rechtzeitig diagnostiziert.

## 2. Isolierung und Charakterisierung des Gens

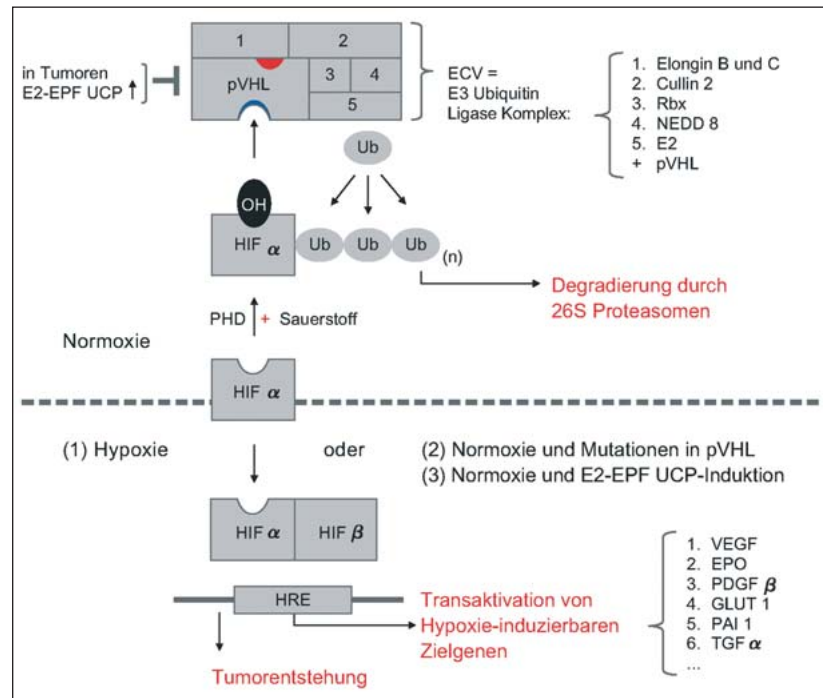
Im Jahr 1988 ergaben Keimbahn-Analysen (Seizinger, 1988) und genetische Untersuchungen somatischer Störungen in *VHL*-assoziierten Tumo-

ren die ersten Hinweise auf die Lokalisation des *VHL*-Gens: Genkoppelungsanalysen und zytogenetische Untersuchungen an einem *VHL*-assoziierten Nierenzellkarzinom (Decker, 1988) kartierten das *VHL*-Gen in den kurzen Arm des Chromosoms 3. 1993 gelang es schließlich, das *VHL*-Gen in der chromosomalen Bande 3p25-26 zu identifizieren (Latif, 1993). Die genaue Lokalisation wird heute mit 3p25.3 (bp 10 158 319 – 10 168 744, ENSG00000134086) angegeben. Damit liegt das Gen in einer Region, die auch häufig beim sporadischen klarzelligen Nierenzellkarzinom und vielen anderen Tumoren deletiert gefunden wird.

Das *VHL*-Gen (Abb. 1a) besteht aus drei Exons, die sich über eine genomische Region von mehr als 10 kb verteilen. Die 642 Nucleotide dieser Region werden in eine messengerRNA von 4,7 kb transkribiert, die in ein Polypeptid von 213 Aminosäuren translatiert wird. Es gibt zwei Translationsstartpunkte: neben dem ersten Methionin findet sich ein zweites im Codon 54, von welchem aus vornehmlich transkribiert wird. Dadurch entsteht ein Protein von 160 Aminosäuren Länge. Zusätzlich erfolgt ein alternatives Splicing: ein kleinerer Anteil des *VHL*-Proteins liegt in einer kürzeren Form (Isoform 2) vor. Dabei wird das Exon 2 nicht transkribiert, wodurch ein um 41 Aminosäuren kürzeres Polypeptid entsteht. Wegen struktureller und funktioneller Unstimmigkeiten im 5' Bereich wurde initial keine einheitliche Zählweise der Nucleotide verwandt. Heute wird all-

gemein beginnend mit dem Nucleotid 214 das Codon 1 festgelegt. Dieses Codon stellt das erste Methionin dar (GenBank Accession No. L15409). Im Jahr 1995 wurde der *VHL*-Promotor isoliert. Dabei handelt es sich um einen GC-reichen Promotor ohne die typischen TATA- und CCAAT-reichen Sequenzen (GenBank Accession No. AF010238). Putative Bindungsstellen für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wurden in diesem Promotor beschrieben. Neben dem 5' Bereich finden sich auch im 3' Bereich von *VHL* nicht translatierte Regionen (UTRs).

Das *VHL*-Gen wird ubiquitär in fötalem und adultem Gewebe exprimiert; interessanterweise findet sich eine relevante Expression auch in Organen, die typischerweise nicht beim *VHL*-Syndrom betroffen sind. Es ist evolutionär hoch konserviert. *VHL*-Orthologe wurden in anderen Säugern, Fliegen, Würmern und Fischen identifiziert. Die Sequenz des *VHL*-Gens ist einzigartig, d.h. *VHL* gehört keiner bekannten Genfamilie an. Lediglich Codon 14 bis 53 codieren für einen sauren Pentamer-Repeat (Gly-X-Glu-Glu-X), der sich in einem Membranprotein von *Trypanosoma brucei* wiederfindet. Da sich diese Sequenz aber in dem Bereich vor dem zweiten und bevorzugt gewählten Transkriptionsstart befindet, dieser Genabschnitt evolutionär nicht konserviert ist und sich dort fast keine somatischen oder Keimbahn-Mutationen fanden, ist eine funktionelle Bedeutung trotz der beschriebenen Homologie eher unwahrscheinlich.



**Abb 1 b VHL/HIF pathway** (Details vgl. Text)

Im oberen Bildabschnitt wird der normale Zustand bei physiologischer intrazellulärer Sauerstoffspannung angegeben. Unten sind die drei heute bekannten Zustände dargestellt, die zu einer Hochregulation der Hypoxie-abhängigen Gene führen: (1) Sauerstoffmangel, (2) Mutationen im *VHL*-Gen oder (3) Hochregulation eines *VHL*-Regulators.

### 3. Das Genprodukt, seine Funktion und Regulation

Von den beiden Startcodons (Codon 1 und 54, s.o.) werden zwei *VHL*-Proteine translatiert: pVHL(19) und pVHL(30), entsprechend ihrer molekularen Massen von 18-19 kDa, bzw. 24-30 kDa. Beide Genprodukte haben Tumorsuppressor-Funktion. In normalen, nicht-transformierten Zellen wurde bisher keine der alternativen Spleiß-Varianten (Isoform 2 ohne Exon 2) nachgewiesen. Jüngst wurde gezeigt, dass pVHL differentiell im sauren N-terminalen Bereich, bzw. am Serin 68 durch die Casein Kinase 2, bzw. durch die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) phosphoryliert wird. Die funktionelle Relevanz dieser Modifizierungen muss weiter abgeklärt werden, es besteht wahrscheinlich ein Bezug zur Tumorgenese. pVHL ist ein intrazelluläres Protein, das eingebunden ist in einen aktiven nukleozytoplasmatischen Transport. Es findet sich sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma, dies in Abhängigkeit von der Zelldichte, bzw. vom Zellzyklus. So erscheint pVHL bei ruhenden, konfluierenden Zellen vermehrt im Nukleus.

Röntgenbeugungsanalysen der 3D-Strukturen (<http://www.rcsb.org/pdb/> (PDB ID: 1 vgb) sind sowohl am Wildtyp, als auch an mutierten Formen des Genproduktes durchgeführt worden. Zusätzlich haben funktionelle Analysen und Mutationsstudien dazu geführt, dass bestimmte Proteinbereiche spezifischen Funktionen zugeordnet werden konnten (Abb. 1a). Die  $\beta$ -Domäne besteht aus sieben  $\beta$ -Sand-

wich-Strukturen (AA 63-154) und einer  $\alpha$ -Helix (AA 193-204). Die kleinere dazwischen liegende  $\alpha$ -Region besteht aus drei  $\alpha$ -Helices (AA155-192). Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Domäne sind notwendig für die Tumorentstehung und binden spezifisch an Elongin, bzw. an HIF-1 $\alpha$  als Substrat (Abb. 1b).

Das *VHL*-/-knock out-Mausmodell hat sich als embryonal lethal erwiesen, interessanterweise aufgrund plazerarter vaskulärer Insuffizienz. Für den scheinbaren Widerspruch zu den stark vaskularisierten *VHL*-defizienten NZK ergab ein *VHL*-Modell in *Drosophila* Klärungsansätze. Aus diesem Modell ließ sich folgern, dass eine *VHL*-Defizienz unterschiedliche Effekte auf die physiologische Angiogenese im Normalgewebe und auf die Vaskularisation in Tumoren haben kann (Adryan, 2000).

Es existieren mehrere konditional induzierbare Mausmodelle, von denen bis heute keines dem humanen *VHL*-Krankheitsbild ausreichend nahe zu kommen scheint. Die Wiederherstellung der *VHL*-Funktion in *VHL*-defekten Nierenzellkarzinomen führt zu einer *in vivo* Tumorentstehung.

Mittels Immunpräzipitation, *two hybrid*-Systemen und funktionalen Assays konnte eine große Zahl verschiedener Bindungspartner von pVHL beschrieben werden. Hier sei die bis heute am besten verstandene Funktion von pVHL (Abb. 1 b) zusammen mit den beteiligten Bindungspartnern dargestellt: die von der intrazellulären Sauerstoffkonzentration abhängige

Regulation des Hypoxie induzierbaren Faktors 1 $\alpha$  (*hypoxia inducible factor* = HIF-1 $\alpha$ ). pVHL ist substratbindender Bestandteil des sogenannten E3 Ubiquitin Ligase (ECV) Komplexes (Elongin B und C/Cul2/pVHL), der aus sieben Untereinheiten besteht. Eine der bekannten Hauptaufgaben dieser Enzymkomplexe ist die Ubiquitinisierung von spezifischen Substraten mit dem Ziel einer quantitativ regulierbaren Degradierung der Substrate durch die 26S Proteasomen. Die  $\alpha$ -Domäne von pVHL ist verantwortlich für die spezifische Substratbindung von HIF-1 $\alpha$ . HIF-1 $\alpha$  gehört zur Familie der durch Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren, die Heterodimere bilden (HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$ ) und durch entsprechende Induktion Hypoxie-abhängige Zielgene regulieren. Die intrazelluläre sehr genau regulierte Konzentration des mit wenigen Minuten Halbwertszeit sehr kurzlebigen HIF-1 $\alpha$  ist dabei die kritische Stellgröße. In Abhängigkeit von der intrazellulären Sauerstoffspannung wird HIF-1 $\alpha$  durch die PHD (Prolyl-Hydroxylase) an einem spezifischen Prolinrest hydroxyliert und kann erst danach an den ECV Komplex gebunden, ubiquitiniert und konsekutiv im Proteasom abgebaut werden. Ist der Sauerstoffgehalt der Zelle zu gering, erfolgt keine Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$ . Dadurch steigt die Konzentration von HIF-1 $\alpha$  so an, dass es als Heterodimer mit HIF-1 $\beta$  als Transkriptionsfaktor an HRE (*hypoxia responsive elements*) von spezifischen sauerstoffspannungsabhängigen Zielgenen binden kann. Es sind bis heute über 60 verschiedene Gene bekannt, die in dieser Weise in ihrer

**Tab 1 VHL-Genotyp-, Phänotyp-Korrelation: Genetische und molekulare Grundlagen sowie klinische Charakteristika der VHL-Untergruppen**

VHL Untergruppe	VHL-Mutationstyp	Molekularer Effekt	Klinisches Bild
<b>Typ 1</b>	vollständiger Verlust von pVHL oder Mutationen, die die Proteinfaltung beeinträchtigen	Hochregulation von HIF- $\alpha$ und von HIF-Zielgenen	Hämangioblastome*, reduziertes Risiko für Phäochromozytome Nierenzellkarzinome
<b>Typ 2 A</b>	Missense-Mutationen	Hochregulation von HIF- $\alpha$ und von HIF-Zielgenen, Mikrotubuli destabilisiert	Hämangioblastome*, Phäochromozytome, niedriges Risiko für Nierenzellkarzinome
<b>Typ 2 B</b>	Missense-Mutationen	Hochregulation von HIF- $\alpha$ und von HIF-Zielgenen	Hämangioblastome*, Phäochromozytome, hohes Risiko für Nierenzellkarzinome
<b>Typ 2 C</b>	Missense-Mutationen	pVHL behält die Fähigkeit, HIF- $\alpha$ zu degradieren, verminderte Bindung an Fibronectin	ausschließlich Phäochromozytome
<b>Sonderform</b>			
<b>Typ Chuvash</b> (OMIM 263400)	Homozygotie Missense-Mutationen	??	ausschließlich Polyzythämie <sup>§</sup>

Anmerkungen: \*) Cerebelläre, spinale und retinale Hämangioblastome

§) Für diese erst vor kurzem beschriebene Untergruppe (OMIM 263400) ist zur Zeit nur eine kleine Zahl von unabhängigen Familien beschrieben, in denen die Polyzythämie oft bei sehr jungen Patienten beobachtet wurde. Es bleibt abzuwarten, ob tatsächlich keine anderen Symptome auftreten.

Expression adaptiv reguliert werden. Dazu gehören *VEGF (vascular endothelial growth factor)*, *EPO (erythropoietin)*, *GLUT-1 (glucose transporter 1)*, *PDGF (platelet derived growth factor)*, *TGF  $\alpha$  (transforming growth factor alpha)* und viele andere Gene. Dieser Mechanismus der Sauerstoff-abhängigen Regulation von spezifischen Zielgenen ist die bisher am besten erforschte Funktion von pVHL. In Tumoren wie NZK und Hämangioblastomen konnte die inverse Regulation von VHL und VEGF gezeigt werden (Brieger, 1999). Umgekehrt wurde vor wenigen Monaten ein negativer post-translationaler Regulator für pVHL identifiziert: E2-EPF ist ein Ubiquitin Carrier Protein (E2-EPF UCP), das seinerseits pVHL der Ubiquitin-abhängigen Degradierung zuführt und somit invers mit der pVHL-Konzentration korreliert ist. Es wurde in Tumoren ohne VHL Mutationen hochreguliert gefunden. Dies könnte so den Hypoxie-stimulierenden VHL/HIF-pathway ohne VHL-Mutationen induzieren und damit ebenso zur Tumorgenese beitragen. Dem detaillierten Verständnis dieser molekularen Pathomechanismen kommt große Bedeutung für zukünftige individualisierte Tumorthapieformen zu (s. 5. Ausblick, *smart drugs*). pVHL ist ein multifunktionales Protein, dem eine Reihe weiterer Funktionen zugeschrieben werden konnten (Richards, 2001). So spielt pVHL eine Rolle bei der Induktion des Zellzyklusarrests (*quiescent state*), bei der Anordnung der extrazellulären Fibronectin-Matrix, der Regulation des UTPA-Systems (*urokinase-type plasminogen activator*) und

bei der Inhibition der HGF-(*hepatocyte growth factor*-)vermittelten Invasion beim NZK. Kürzlich konnte eine direkte Interaktion zwischen pVHL und der atypischen PKC (Protein Kinase C) gezeigt werden (s. Phäochromozytome).

#### 4. Genetische Beratung: Klinik und Mutationsanalysen

##### 4. 1. Klinisches Bild

Die Assoziation spezifischer Symptome in einem Individuum oder innerhalb seiner Familie definiert klinisch die Krankheitsentität „VHL“. Abbildung 2 gibt die Art, die Häufigkeit und die altersabhängige Wahrscheinlichkeit des Auftretens der verschiedenen Symptome wieder. Es finden sich gut- und bösartige Tumore, sowie eine große Zahl von Zysten, vornehmlich in den Nieren und im Pankreas. Inselzelltumore des Pankreas werden sehr selten gefunden. Das Nierenzellkarzinom (NZK) stellt den einzigen Tumor dar, der sich biologisch bösartig verhält. Es ist histologisch ausnahmslos vom klarzelligen (kz) Subtyp, welcher auch beim sporadischen Nierenzellkarzinom etwa 75 % ausmacht. Diese Tumoren weisen eine enge Beziehung zu vaskulären oder zystischen Strukturen auf. Dies zeigt sich nicht beim Phäochromozytom, das als ein solider Tumor wächst. Wie später noch ausgeführt, liegen diesen beiden VHL-Qualitäten wahrscheinlich zwei sehr verschiedene molekulare Pathomechanismen zugrunde.

Seit einigen Jahren ist klar, dass die verschiedenen Symptome in unter-

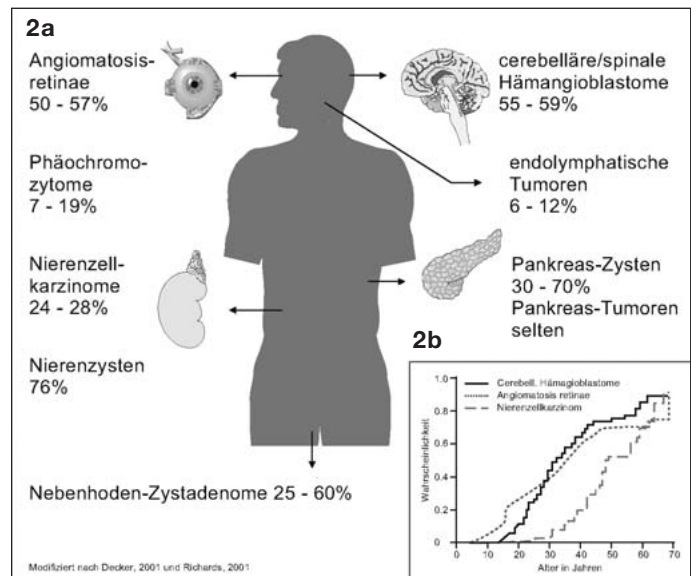
schiedlicher Häufigkeit miteinander auftreten. Dementsprechend wurde eine Subklassifikation des VHL-Syndroms vorgenommen (s. Tabelle).

##### 4.2. Genotyp-, Phänotyp-Korrelationen

Die klinische Subklassifikation lässt sich auch mit einem qualitativen Unterschied der in der Keimbahn gefundenen Mutationen assoziieren. Bei der Gesamtheit aller VHL-Patienten fanden sich bisher bei etwa 50–60 % Missense Mutationen, 20–30 % große Deletionen, 12–20 % Mikrodeletionen und Insertionen, sowie 7–11 % Nonsense Mutationen. Dieses Verhältnis verschiebt sich beeindruckend, wenn hierbei die beiden Typen 1 und 2 getrennt berücksichtigt werden: So finden sich beim Typ 2 fast ausschließlich Missense Mutationen (> 90 %), durch die das VHL-Protein nur geringfügig alteriert wird. Dahingegen verändern die beim Typ 1 gefundenen Mutationen das VHL-Protein bzgl. seiner räumlichen Struktur erheblich. Der Typ 1 (etwa 80 %) wird häufiger gesehen als der Typ 2 (etwa 20 %). Bis heute sind weltweit etwa 1000 VHL-Mutationen beschrieben und in Datenbanken (<http://www.umd.be:2020/u.a.>) aufgelistet worden, wobei über 140 Mutationen als *unique* angesehen werden. Häufig beschriebene Mutationen sind: del Phe76, Asn78 Ser, Arg161Stop, Arg 167Gln/Trp und Leu178Pro, die in allen Ethnien gefunden wurden (Zbar, 1996). Lediglich die „Schwarzwald-Mutation“ Tyr98His ist keine *hot spot*-, sondern eine *founder*-Mutation, die in

**Abb 2 a** Klinisches Bild mit Angabe der befallenen Organe und der Manifestationshäufigkeit

**Abb 2 b** Klinisches Bild der altersabhängigen Wahrscheinlichkeit des Auftretens der einzelnen VHL-assoziierten Symptome



deutschstämmigen Nachfahren gefunden werden und dem Typ 2A entsprechen. Die bei weitem am häufigsten gefundene, unabhängig auftretende Mutation ist die Arg167Gln bzw. Arg167Trp-Mutation, die einen VHL 2B-Phänotyp aufweist. Mutationen werden gehäuft in den funktional bedeutsamen Regionen gesehen; die Mehrzahl interferiert mit der Elongin- oder HIF-Bindung. Typische, aber seltene VHL 2C-Mutationen sind Leu 188Val und Pro81Ser. Dieser Typ ist die phänotypische „Minimalvariante“ und ausschließlich mit Phäochromozytomen assoziiert.

In der Tabelle sind die verschiedenen VHL-Typen mit den Mutationsarten, deren funktionellen Konsequenzen sowie dem klinischen Bild wiedergegeben. Der entscheidende Unterschied zwischen den Typen 1 und 2 liegt im Auftreten von Phäochromozytomen, wobei dieser Tumor bei Patienten des Typs 1 nicht gefunden wird. Es wird heute angenommen, dass die Missense-Mutationen, die für den Typ 2 C verantwortlich sind, *gain-of-function*-Mutationen darstellen, die zur Entstehung der Phäochromozytome beitragen.

War 1996 die Detektionsrate mit den zur Verfügung stehenden molekulargenetischen Untersuchungsverfahren etwa 60 %, so beträgt sie durch die Anwendung komplementärer Nachweismethoden heute nahezu 95 %. Neben der Sequenzierung als Standard haben sich heute vor allem Methoden zum Nachweis größerer Deletionen, wie Southern blotting, Q-RT-

PCR (*quantitative real time polymerase chain reaction*) und neuerdings MLPA (*multiple ligase-dependent probe analysis*) bewährt. Möglicherweise ist der Anteil von größeren, ganze Exons betreffenden Deletionen noch höher als bisher angenommen. Dies ist im Zusammenhang mit der Prädiktion des NZK besonders bedeutsam. 2004 konnte für über 120 Patienten aus 55 VHL Familien gezeigt werden (Maranchie, 2004), dass die Größe und Lokalisation des zusammen mit dem *VHL*-Gen deletierten Bereichs mit der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von NZKs korreliert. Interessanterweise fand sich, dass bei kompletter Deletion des *VHL*-Gens unter Einschluß einer 30 kb großen Region (telomerisch zu *VHL*), die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines NZKs mit 19–23 % deutlich geringer war, als bei Retention dieser Region, die ein relevantes Kandidatengen (*HSPC 300*) enthält. Im letzteren Fall war die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von NZKs auf 49–52 % erhöht ( $p < 0.001$ ).

### 4.3. Hämatologische Sonderform

#### Homozygote *VHL*-Keimbahnmutationen und die Chuvash Polyzythämie

Ein kleiner Teil von Polyzythämien (= Erythrozytosen) ist hereditär und dabei genetisch sehr heterogen. Die autosomal rezessive familiäre Erythrozytose vom Typ 2 (OMIM # 263400, \*133100), ist eine Unterform dieser seltenen kongenitalen Polyzythämien. Das klinische Bild zeigt einen deutlichen Anstieg der Erythrozyten, einen

erhöhten Serumspiegel von Erythropoietin bei normaler Sauerstoffaffinität. Typische Komplikationen stellen Thrombosen und kardiovaskuläre Ereignisse dar. In der Republik Chuvash der Russischen Föderation wird diese Form als endemisch beschrieben. 2002 konnte die homozygote *VHL*-Keimbahnmutation R200W (C598T) als Ursache für diese Erkrankung identifiziert werden.

Bis heute sind auch in anderen Ethnien *VHL*-Keimbahnmutationen in Assoziation mit isolierten Polyzythämien gefunden worden. Hierbei fanden sich sowohl die beschriebene Mutation im homozygoten, wie im compound heterozygoten Zustand, als auch eine andere homozygote *VHL*-Mutation H191D (C571G). Interessanterweise konnte bisher in keinem dieser Patienten eine *VHL*-typische Komplikation mit Sicherheit nachgewiesen werden.

### 4.4. Differentialdiagnostische Überlegung zum hereditären Nierenzellkarzinom

Nierenzellkarzinome als Symptome eines *VHL*-Syndroms sind regelhaft vom klarzelligen Subtyp und oft mit Zysten vergesellschaftet. Familiäre Nierenzellkarzinome finden sich auch in anderem Kontext ohne *VHL*-Bezug. So finden sich Keimbahnmutationen im *MET*-Onkogen beim hereditären papillären Nierenzellkarzinom vom Typ 1, und im *FH*-Gen (= Fumarat Hydratase) beim papillären Typ 2. Die Unterscheidung wird hier aufgrund der Tumorhistologie möglich. Ein anderes histologisches Bild zeigen Nie-

rentumoren im Birt-Hogg-Dubé-Syndrom, für welches 2005 das in der Keimbahn alteriert gefundene Gen *Folliculin* identifiziert wurde. Zwei weitere diagnostische Zielgene für hereditäre NZK stellen die beiden Gene für die tuberöse Sklerose *TSC1* und *TSC2* dar. Im Gegensatz zu den papillären NZK haben die drei zuletzt genannten hereditären Konditionen wegweisende zusätzliche klinische Symptome. Bis heute wurden mehrere Familien mit hereditären kzNZK beschrieben, bei denen unterschiedliche zytogenetische Rearrangements des Chromosoms 3 gefunden wurden, die mit der Erkrankung segregierten. Oft wurde als zweiter somatischer Schritt eine sporadische *VHL*-Mutation in den Tumoren dieser Patienten gefunden.

#### 4.5. Familiäres Phäochromozytom

Eine besondere differentialdiagnostische Herausforderung stellt das hereditäre Phäochromozytom dar, welches durch Keimbahnmutationen in einer Reihe von Regulatorgenen des NGF/TrkA/jun/Apoptose *pathways* seine Ursache haben kann. TrkA (Rezeptor für NGF = *nerve growth factor*) wird durch das Genprodukt von *NF-1* (*Neurofibromin*) negativ und durch das cRET-Protein (Multiple Endokrine Neoplasie 2A und 2B) positiv reguliert. Entsprechend sind inaktivierende bzw. aktivierende Keimbahnmutationen in diesen beiden Genen krankheitsauslösend. Weiter downstream finden sich die *VHL2C*-Mutationen, die über die aPKC/JunB-Signalkaskade (atypische Proteinkinase C) auf das Onkogen *cJUN* proliferationsfördernd wirken können. Schließlich haben Keimbahnmutationen in den *SDH*-Genen (*succinat dehydrogenase*) *B*, *C* oder *D* über EglN3 (= HIF-Prolyl-Hydroxylase 3) einen wachstumsfördernden Effekt auf die Phäochromozytom-Vorläuferzellen. Diese Mutationen führen letztlich durch die Inhibition der neuronalen Apoptose zum Phäochromozytom. Somit ergeben sich hier neben *VHL* heute insgesamt mindestens fünf weitere Zielgene: *NF-1*, *cRET* und die Gene des *SDH*-Komplexes.

#### 4.6. Somatische Mutationen im Vergleich zu Keimbahn-Mutationen

Die *VHL*-abhängige Karzinogenese folgt dem klassischen Knudsonschen Zweitrefferkonzept für Tumorsuppressorgene. Hierdurch ergibt sich die große Bedeutung der Aufklärung des molekularen Pathomechanismus für innovative Therapien auch für die häufigeren sporadischen Tumorformen. Nicht-hereditäre Nierenzellkarzinome bzw. Hämangioblastome weisen somatische *VHL*-Mutationen in 50-80 % bzw. in bis zu 30% der Fälle auf, wobei die Mutationen sich nicht wesentlich in ihrer Verteilung über das Gen unterscheiden. Der Anteil der trunkierenden Mutationen ist allerdings höher als bei den *VHL*-Keimbahnmutationen. Ein Zusammenhang mit beruflicher Exposition (Trichlor-Äthylen) konnte gezeigt werden. Die zweite *VHL*-Alteration betrifft in der Regel den Verlust größerer chromosomaler Regionen. Die initiale *VHL*-Inaktivierung hat beim NZK neben der genomischen Mutation in etwa 20 % der Fälle auch eine Hypermethylierung als Ursache. Wichtig ist, dass die *VHL*-Alteration nahezu ausschließlich in der klarzelligen Form gefunden wird, seltener in der papillären Form, in den anderen histologischen Formen überhaupt nicht (Brauch, 2000). Diese klarzellige Variante ist auch die histologische NZK-Form, die beim *VHL*-Syndrom ausschließlich gefunden wird. Insofern gilt pVHL bei der renalen Karzinogenese als *gate keeper*. Zur vollständigen Ausbildung des malignen Phänotyps sind weitere genetische Alterationen notwendig. In sporadischen Phäochromozytomen ist die Zahl der detektierten somatischen *VHL*-Mutationen sehr gering, was für diesen Tumor auf eine qualitativ andersartige Tumorgenese schließen lässt.

#### 4.7. Vorsorgeuntersuchungen für VHL-Betroffene

Die Betreuung von *VHL*-Patienten ist eine multidisziplinäre Aufgabe. Idealerweise sollten dafür entsprechend spezialisierte Zentren zur Verfügung stehen. Hauptaugenmerk sollten dabei den Kardinalsymptomen geschenkt werden, die die Lebenserwartung und -qualität am meisten be-

einträchtigen: NZK, ZNS und Auge. Da die molekulargenetische Untersuchung zur Entscheidung für den Ein- oder Ausschluss in ein Vorsorgeprogramm beitragen kann und ernste vermeidbare Komplikationen bereits im Kindesalter auftreten, sollte hier eine frühzeitige molekulare Klärung mit den bekannten Vor- und Nachteilen diskutiert und in Erwägung gezogen werden. Ist eine Mutation nachgewiesen oder besteht klinisch die Wahrscheinlichkeit oder der Verdacht, ein Mutationsträger zu sein, sollte früh ein Status erhoben werden. Dazu gehören augenärztliche, neurologische, gegebenenfalls auch neurochirurgische, internistische und radiologische Untersuchungen, einschließlich Kernspintomographie von Kopf und Rückenmark und des Bauchraumes, eine Katecholaminbestimmung im 24-Stunden-Urin und eine Ultraschalluntersuchung der Nebenhoden. Werden hierbei keine behandlungsbedürftigen Symptome gefunden, sollten die Untersuchungsintervalle und diagnostischen Verfahren individuell festgelegt werden. Bei Genträgern ohne jegliche Veränderungen werden derzeit Fristen von 1–2 Jahren diskutiert. Neu aufgetretene Symptome sollten sofort abgeklärt werden. Ist bis zum 60. Lebensjahr kein Symptom aufgetreten, sinkt die Wahrscheinlichkeit einer späten Symptomatik deutlich ab (Abb. 2b). Durch die oben angeführten Genotyp-, Phänotyp-Korrelationen ergeben sich die ersten Hinweise für Situationen, in denen eine besonders kritische Gewichtung von klinischen Symptomen gegeben ist. So sollte z.B. bei Patienten, die eine Hochrisikomutation für ein NZK tragen, erwogen werden, auch bei eher unverdächtigen Nierenzysten die Untersuchungen in kürzeren Intervallen und offensiver durchzuführen.

#### 5. Ausblick: Therapie

Wie derzeit für alle monogenen Erkrankungen steht auch für *VHL* keine Keimbahntherapie zur Verfügung. Durch das frühzeitige Entdecken von Komplikationen kann heute die Lebenserwartung und -qualität von Betroffenen deutlich verbessert werden. An spezialisierten Zentren stehen heute augenärztliche, neurochirurgische und urologische, an die *VHL*-Er-

krankung adaptierte Spezialverfahren zur Verfügung. So kann einem Visusverlust durch rechtzeitige Laserbehandlung entgegengewirkt werden. Nierengewebe erhaltende Spezialoperationstechniken stehen beim NZK zur Verfügung. Neurochirurgisch minimalinvasive Operationsverfahren tragen den oft wiederholt notwendig werdenden Eingriffen intracranialer und intraspinaler Komplikationen Rechnung und werden an spezialisierten Zentren angeboten. Zur Zeit sind sogenannte „*smart drugs*“, also Medikamente, deren Entwicklung auf der Kenntnis der molekularen Pathomechanismen beruht (s. oben 3. Funktion), vielversprechende innovative Therapie-Ansätze. So wurden Inhibitoren von HIF, VEGF, PDGF, TGF $\alpha$  u.v.m. zellbiologisch und tierexperimentell weiterentwickelt. Einige von ihnen finden bereits in klinischen Studien bei den sporadischen Tumorformen ihren Einsatz. Darüberhinaus wurde bereits im letzten Jahr in den USA mit Sorafenib (Nexavar<sup>®</sup>) ein Inhibitor u.a. der VHL/VEGF/PDGF-Signalkaskade als Medikament für die Therapie des metastasierten NZK zugelassen. Ähnlich erfolgversprechend sind die ersten Anwendungsversuche von VEGF Inhibitoren bei Gefäßkomplikationen der altersbedingten Makuladegeneration, die wahrscheinlich auch für VHL assoziierte Augenkomplikationen richtungsweisend sein werden. Es steht zu erwarten, dass Medikamente aus dieser Gruppe der Antiangiogenetika auch bei ZNS Komplikationen ihren klinischen Einsatz finden werden.

#### Widmung und Danksagung

Diese Arbeit ist den Betroffenen der von Hippel-Lindau Erkrankung und den sie behandelnden Ärzten gewidmet. Der Autor dankt der DFG, dem NCI/EORTC, dem NMFZ, der Stiftung Rheinland Pfalz für Innovation, der Sanderstiftung, sowie dem Bioscientia Institut für medizinische Diagnostik für ihre Unterstützung seiner Forschungsarbeit über die letzten 20 Jahre.

#### Literatur

- Adryan B, Decker HJ, Papas TS, Hsu T (2000) Tracheal development and the von Hippel-Lindau tumor suppressor homolog in *Drosophila*. *Oncogene* 19:2803-2811.
- Brauch H, Weirich G, Brieger J, Glavac D, Rodl H, Eichinger M, Feurer M, Weidt E, Puranakittha C, Neuhaus C, Pomer S, Brenner W, Schirmacher P, Storkel S, Rotter M, Masera A, Gugeler N, Decker HJ (2000) VHL alterations in human clear cell renal cell carcinoma: Association with advanced tumor stage and a novel hot spot mutation. *Cancer Research* 60:1942-1948.
- Brieger J, Weidt EJ, Schirmacher P, Storkel S, Huber C, Decker HJ (1999) Inverse regulation of vascular endothelial growth factor and VHL tumor suppressor gene in sporadic renal cell carcinomas is correlated with vascular growth: an in vivo study on 29 tumors. *J Mol.Med.* 77:505-510.
- Decker HJ, Neumann HP, Walter TA, Sandberg AA (1988) 3p involvement in a renal cell carcinoma in von Hippel-Lindau syndrome. Region of tumor breakpoint clustering on 3p. *Cancer Genet Cytogenet* 33:59-65.
- Decker HJ, Brauch H (2001) von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene. In: Schwab M Hrsg *Encyclopedic Reference of Cancer*. Springer, Berlin 957-963.
- Latif F, Tory K, Gnarr J, Masahiro Y, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L, Schmidt L, Zhou F, Li H, Wei MH, Chen F, Glenn G, Choyke P, Walther MM, Weng Y, Duan DSR, Dean M, Glavac D, Richards FM, Crossey PA, Ferguson-Smith MA, Paslier DL, Chumakov I, Cohen D, Chinault C, Maher E, Linehan WM, Zbar B, Lerman MI (1993) Identification of the von Hippel-Lindau Disease Tumor Suppressor Gene. *Science* 260:1317-1320.
- Maranchie JK, Afonso A, Albert PS, Kalyandrug S, Phillips JL, Zhou S, Peterson J, Ghadimi BM, Hurley K, Riss J, Vasselli JR, Ried T, Zbar B, Choyke P, Walther MM, Klausner RD, Linehan WM (2004) Solid renal tumor severity in von Hippel Lindau disease is related to germline deletion length and location. *Hum. Mutat.* 23:40-46.
- Richards FM (2001) Molecular pathology of von Hippel-Lindau disease and the VHL tumour suppressor gene. *Expert.Rev.Mol.Med.* 2001:1-27.
- Seizinger BR, Rouleau GA, Ozelius LJ, Lane AH, Farmer GE, Lamiell JM, Haines J, Yuen JW, Collins D, Majoor Krakauer D (1988) Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature* 332:268-269.
- 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. (1996) Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum.Mutat.* 8:348-357.

#### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. H. Jochen Decker  
Zentrum für Humangenetik Ingelheim  
Bioscientia Institut für medizinische Diagnostik  
Konrad Adenauer Straße 17  
D-55218 Ingelheim  
Tel./Fax 06132 781 133/298  
decker@mail.uni-mainz.de