



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

*“Estudio molecular del gen de la enfermedad de von
Hippel-Lindau (VHL): detección de portadores y
caracterización funcional de nuevas variantes génicas”*

Autora: Lic. Cecilia Mathó Paciolo

Directora: Dra. Patricia A. Pennisi

Directora Adjunta: Dra. Gabriela Sansó

Consejera de Estudios: Dra. Ana María Adamo

*Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires*

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones Endocrinológicas
“Dr. César Bergadá” (CEDIE), CONICET – FEI – División de
Endocrinología, Hospital de Niños R. Gutiérrez

-2016-

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que me han acompañado y ayudado en estos cinco años, en especial a:

Mi Directora, **Patricia Pennisi**, por haberme recibido en su laboratorio e influido notablemente en mi formación profesional. Por orientarme y transmitirme sus conocimientos y experiencia, y ayudarme a planificar, organizar y prever. Por su cariño y estar siempre en los detalles de cada día.

Mi Directora Adjunta, **Gabriela Sansó**, por su confianza, siendo guía y asesora permanente, siempre con afecto y optimismo. Por ampliar mis perspectivas y darme impulso ante los nuevos desafíos.

Mi Consejera de Estudios, **Ana María Adamo** por su amabilidad, buena predisposición y colaboración en la presentación de esta tesis.

Marta Barontini, por estar siempre presente, a cualquier hora, día y lugar, brindando su ayuda y consejos.

Los Directores del CEDIE: **Doctores Rodolfo Rey y Héctor Chemes**, los Vice-Directores **Doctores Ignacio Bergadá y Stella Campo**, por recibirme y permitirme formar parte del Instituto.

El grupo de trabajo, **Ayelen Martin, Florencia Clément y María Celia Fernández**, por compartir el rol de becarias y amigas, acompañarme y ayudarme en el día a día, compartiendo mesada y reactivos.

Gabriela Gutiérrez Moyano, por compartir su mesada conmigo, por su amistad, consejos y ayuda desde que me uní al CEDIE.

Las demás integrantes del laboratorio 13: **Cecilia Colombero, Susana Nowicki y Mariana Cruz**, por el lindo grupo humano y cálido ambiente laboral que generan, en especial a **Mariana** por su trabajo en el bioterio.

Ana Vieites, Gloria Levin y María Edith Mella, con quienes también compartí el laboratorio, por acompañarme y hacerme sentir como en casa.

Marcela Venara por transmitirme sus conocimientos de histología, por su dedicación y excelente predisposición para ayudarme.

Laura Coitiño y Alicia Merlino, y su grupo de trabajo (Laboratorio de Química Teórica y Computacional, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, UDELAR, Montevideo, Uruguay) por confiar en mí y darme la posibilidad de otra perspectiva para mi trabajo, muchas gracias por el tiempo y horas de trabajo que me han dedicado en mis múltiples estadías en su laboratorio y a distancia.

Dr. Jonasch y la **Beca Jorge Oster de la Fundación Bunge y Born** que permitieron mi estadía de tres meses en su laboratorio en Houston, Texas, USA.

Mercedes Astarloa y Dora Leguizamón por su ayuda para mantener el cuarto de cultivo y estufa en excelente estado, condición indispensable para la realización de los experimentos detallados en esta tesis.

Dr.Rey y su grupo con el que compartimos el laboratorio varios años.

Susana Mancini, nuestra bibliotecaria, por conseguirme los cientos de artículos que cito en esta tesis.

Todos los miembros del CEDIE por su excelente hospitalidad, generosidad, colaboración, compañerismo y buen clima de trabajo que generan.

Mario Lorenzetti, por su paciencia y ayuda para poder obtener los resultados de la inmunofluorescencia.

Dra. Ericka Trarbach de la Universidad de San Pablo (Brasil) por recibirme en su laboratorio y capacitarme en la técnica MLPA.

Fernanda Castillo y Sandra Zárate, por facilitarme el uso de equipos para la realización de esta tesis.

Mis **amigos**, por su apoyo y compañía, en especial a **las bioquímicas** con quienes además de compartir la vida compartimos la profesión, aunque estemos por el mundo seguimos siempre juntas.

Andrés por estar siempre a mi lado, cerca y lejos estos cinco años. Por alentarme a ser mejor cada día, y por el gran equipo que somos juntos!

Mi **familia**, por acompañarme y apoyarme en todos mis proyectos, en especial a **mis padres**, por su ejemplo de trabajo y tesón, porque adquirí esas características de ustedes, por alentarme siempre, y a mi hermano **Francisco** por darme otra perspectiva de la vida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	11
ENFERMEDAD DE VON HIPPEL-LINDAU	
Generalidades	11
Aspectos Históricos	12
Criterios clínicos para el diagnóstico.....	12
Clasificación	13
Tumores relacionados con VHL.....	13
Hemangioblastomas	14
Angiomas de retina	14
Feocromocitomas.....	14
Carcinoma renal de células claras	15
Alteraciones en páncreas.....	15
Tumores de saco endolinfático.....	16
Quistes de epidídimo y cistoadenomas de ligamento ancho	16
Seguimiento de los pacientes con VHL	16
Bases genéticas de la enfermedad de VHL.....	18
Descubrimiento y descripción del gen	18
Localización y frecuencia de mutaciones	21
Mutaciones <i>de novo</i> y mosaicismos	23
Mutaciones homocigotas de <i>VHL</i> en línea germinal	24
Correlación genotipo-fenotipo	24
Proteína VHL (pVHL).....	26
Expresión en tejidos	26
Síntesis y plegamiento	26
Modificaciones post-traduccionales.....	27
Degradación.....	28
Estructura y dominios	32
Localización subcelular	34
Funciones de pVHL	34
Interacción con HIF	35
Funciones HIF independientes.....	40
Tratamiento	43
Terapias utilizadas y potenciales	43
MARCO DE REFERENCIA	47
OBJETIVOS	48

CAPITULO 1	50
MATERIALES Y MÉTODOS	52
Pacientes	52
Materiales	53
Métodos	53
Extracción de ADN genómico	53
Cuantificación de ADN.....	53
Secuenciación automática	53
Técnicas para cuantificar dosis alélica.....	54
UPQFM-PCR.....	55
MLPA	58
Análisis de datos.....	61
RESULTADOS.....	63
DISCUSIÓN	70
CAPITULO 2	75
Sección 1- Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>.....	80
MATERIALES Y MÉTODOS.....	82
Materiales	82
Métodos	82
Mantenimiento de líneas celulares.....	82
Mutagénesis dirigida.....	82
Generación de las variantes	82
Transformación de bacterias	83
Amplificación de los plásmidos	83
Generación de retrovirus e infección.....	84
Western Blot.....	84
Evaluación de la vida media de las proteínas	85
Inhibición del proteasoma con MG132.....	85
Inmunoprecipitación.....	86
Extracción de ARN	87
Retrotranscripción.....	87
PCR cuantitativa en tiempo real.....	87
Pseudohipoxia con CoCl ₂	88
Deposición de fibronectina.....	88
Estudios <i>In Vivo</i> -Xenotransplantes	89
Histología y expresión de pVHL	90
Análisis estadístico	90

RESULTADOS	93
Estudios <i>in vitro</i>	93
Generación de los vectores con las variantes de VHL	93
Generación de líneas celulares derivadas de las 786-0	94
Verificación de la expresión y localización de pVHL	94
Evaluación formación y funcionalidad del complejo VBC	98
Expresión de genes blanco regulados por HIF-2 α	102
Evaluación de un mecanismo HIF independiente	105
Expresión y deposición de fibronectina.....	105
Estudios <i>in vivo</i>	109
Xenotransplantes en ratones inmunodeficientes	109
Histología y expresión de pVHL en los tumores	112
 Sección 2- Estudios <i>in silico</i>	 116
MATERIALES Y MÉTODOS	118
Preparación de las estructuras	119
Minimización clásica	120
Simulaciones de Dinámica Molecular clásica	120
Cálculo de la energía de unión con MM-PBSA/MM-GBSA	121
RESULTADOS	124
<i>Calibración del estudio computacional en normoxia e hipoxia</i>	124
Simulaciones de Dinámica Molecular clásica	124
Análisis de los enlaces de hidrógeno	126
Cambios estructurales y complementariedad de superficies	127
Cálculo de la energía de unión con MM-PBSA/MM-GBSA.....	128
<i>Aplicación de la metodología para el estudio de las variantes</i>	130
Simulaciones de Dinámica Molecular clásica	131
Análisis de los enlaces de hidrógeno	137
Cambios estructurales y complementariedad de superficies	140
Cálculo de ΔG de unión de los complejos en solución acuosa	141
Lisinas -blanco de modificaciones post-traduccionales	143
DISCUSIÓN	148
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	161
BIBLIOGRAFIA	164
ANEXOS	183
Anexo 1	183
Anexo 2	187

ABREVIATURAS

6-FAM: 6-carboxifluoresceína, colorante fluorescente

786-0: Línea celular humana (ATCC® CRL-1932™)

Å: Ångström, medida de unidad, 1×10^{-10} metros

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNm: ARN mensajero

CHX: Cicloheximida

DM: Dinámica molecular

EdeH: Enlaces de hidrógeno

feo: Feocromocitoma

fs: Fentosegundos (1×10^{-15} segundos)

GAPDH: Gliceraldehido fosfato deshidrogenasa

GFP: Proteína verde fluorescente, del inglés *Green Fluorescent Protein*

GLUT1 : Transportador de glucosa 1, del inglés *Glucose transporter 1*

Hb: Hemangioblastoma

HIF: Factor inducible por hipoxia, del inglés *Hypoxia Inducible Factor*

HIF-1 α : Subunidad α del Factor 1 inducible por Hipoxia

HIF-2 α : Subunidad α del Factor 2 inducible por Hipoxia

HIF-3 α : Subunidad α del Factor 3 inducible por Hipoxia

HRE: Elemento de respuesta a hipoxia, del inglés *Hypoxia Responsive Element*

hs: Horas

Hyp: Hidroxiprolina

K: Kelvin (unidad de temperatura)

KDa: Kilodaltons

min: Minutos

MLPA: Amplificación múltiple de sondas ligadas, del inglés *Multiple Ligation-dependent Probe Amplification*

MM-PBSA/MM-GBSA: del inglés Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area y Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area

NEDD8: Proteína-8 reguladora del desarrollo y expresión de la célula neuronal precursora, del inglés *Neural precursor cell Expressed Developmentally Downregulated protein 8*

ns: Nanosegundos (1×10^{-9} segundos)

pb: Pares de bases

PBS: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDB: Protein Data Bank

PDGF β : Factor de crecimiento derivado de plaquetas

pgl: Paraganglioma

ps: Picosegundos (1×10^{-12} segundos)

pVHL: Proteína de la enfermedad de von Hippel-Lindau

RMSD: del inglés *Root Mean Square Deviation*, representa la distancia que se mueve cada carbono alfa respecto a la estructura inicial.

RMSF: del inglés *Root Mean Square Fluctuation*, representa la fluctuación entre un residuo y otro de referencia.

RSUME: Proteína con dominio RWD que potencia la sumoilación, del inglés RWD domain-containing protein SUMO enhancer

s: Segundos

SDS: Dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes por la utilización de SDS

SFB: Suero fetal bovino

SNC: Sistema Nervioso Central

SOC: Medio de cultivo para bacterias, las iniciales provienen del inglés *Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC)*, es un medio SOB al cual se le agrega glucosa.

SUMO: Pequeño modificador similar a ubiquitina, del inglés *Small Ubiquitin-like Modifier*

TBP: Proteína de unión a la caja TATA, del inglés *TATA Binding Protein*

TGF- α : Factor de crecimiento transformante alfa

UCP: Proteína que transfiere ubiquitina, del inglés *Ubiquitin Carrier Protein*

UPQFM-PCR: PCR multiplex cuantitativa que utiliza cebadores fluorescentes, del inglés *Universal Primer Quantitative Fluorescent Multiplex PCR*

VBC: Complejo multiproteico formado por la proteína pVHL, Elonguina **B** y Elonguina **C**.

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

VHL: von Hippel-Lindau

VHL: Gen humano de la enfermedad de von Hippel-Lindau

WT: Condición nativa o salvaje de una proteína, del inglés *wild type*

Abreviaturas de los aminoácidos

Código (1 letra)	Código (3 letras)	Aminoácido
A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina
V	Val	Valina

RESUMEN

La enfermedad de von Hippel-Lindau (VHL) es un desorden hereditario, autosómico dominante que predispone a la formación de una variedad de quistes y tumores benignos y malignos en diversos órganos. La enfermedad tiene una prevalencia de 1/36000 a 1/45000 nacidos vivos y una penetrancia mayor a 90% a los 65 años de edad.

El gen de la enfermedad de von Hippel-Lindau es un gen supresor tumoral ubicado en el brazo corto del cromosoma 3 (3p25-26). Codifica para una proteína (pVHL) que forma parte de un complejo multiproteico que actúa como E3 ubiquitina ligasa, el cual determina la poliubiquitinación y posterior degradación por el proteasoma 26S de las subunidades α (1,2 y 3) del factor inducible por hipoxia (HIF). Este mecanismo sucede en normoxia, ya que para que HIF- α sea reconocida por pVHL debe estar hidroxilada en residuos prolina específicos por enzimas prolil-4-hidroxilasas. En condiciones de hipoxia, la actividad de estas enzimas se encuentra reducida ya que requieren al oxígeno como sustrato. En estas condiciones se produce una acumulación de las subunidades α de HIF que dimerizan con las subunidades β de HIF, aumentando la expresión de genes de respuesta a la hipoxia, involucrados en el metabolismo, angiogénesis y apoptosis. Este mismo escenario es posible en normoxia si una mutación de pVHL altera la formación del complejo multiproteico o el reconocimiento de HIF- α .

En los últimos años, se han descrito funciones de pVHL, relevantes para el desarrollo tumoral, que son independientes de HIF, pero aún la función más descrita de pVHL es la de regular los niveles de las subunidades α de HIF.

En el Centro de Investigaciones Endocrinológicas “Dr. César Bergadá” se realiza el estudio genético de gen VHL desde el año 2003. Hasta la realización de este trabajo de tesis, este estudio permitía la detección de mutaciones puntuales. Existiendo un grupo de pacientes con clínica y sospecha clínica de VHL en los

que no se detectaron mutaciones puntuales, y dado que las grandes deleciones son detectadas en un 20-37% de los pacientes estudiados en el mundo, surgió la necesidad de implementar la metodología para detectarlas y realizar un diagnóstico certero en estos pacientes así como extender el estudio a sus familiares.

A su vez, dentro del estudio de estas mutaciones puntuales se han encontrado un porcentaje de familias con variaciones génicas que segregan con el fenotipo de la enfermedad que no han sido caracterizadas funcionalmente.

En el presente trabajo de tesis doctoral se detectaron y caracterizaron alteraciones genéticas de pacientes con la enfermedad de VHL. Desarrollamos dos objetivos específicos: el primero consistió en la implementación de un método de detección de deleciones en el gen VHL, para ofrecer un estudio genético completo, y el segundo se enfocó en la caracterización funcional (*in vitro*, *in vivo*, *in silico*) de dos nuevas variantes génicas no caracterizadas previamente en cuanto a su poder patogénico.

El presente trabajo permitió la detección de mutaciones de VHL en línea germinal en 84.2% de los pacientes que cumplieron con el criterio clínico diagnóstico de VHL tipo 1 y en un paciente que no cumplía con el criterio diagnóstico, que presentó un único hemangioblastoma, sin antecedentes familiares de la enfermedad. Se detectaron tres variantes nuevas de VHL, en pacientes sin antecedentes familiares de la enfermedad. El estudio de los casos índice permitió el estudio genético de 39 familiares pertenecientes a 11 familias. Ocho de ellos presentaron mutaciones de VHL: tres con clínica de VHL, otros tres con clínica ignorada por ellos y dos portadores asintomáticos de 59 y 7 años de edad.

Mediante los estudios *in vitro* de las variantes P138R y L163R demostramos que las proteínas codificadas por éstas presentan una vida media reducida, que forman el complejo que media el reconocimiento de HIF-aunque en menor cantidad que la pVHL nativa- y que este complejo es funcional en normoxia, ya que no se observaron diferencias en la expresión de ARNm de dos genes blanco de HIF-2 α . En condiciones de 24 hs de pseudohipoxia, los complejos formados por estas variantes no tienen la misma capacidad que pVHL nativa para regular a HIF-2 α , lo cual fue evidenciado por los niveles de expresión de ARNm de los mismos genes blanco estudiados en normoxia. Evaluamos además una función independiente de HIF: la relación de pVHL con fibronectina. Las variantes mostraron diferencias en la regulación de la expresión de fibronectina en nuestro sistema, aunque fueron deficientes su deposición, y no ensamblaron una matriz como la que se observó en la línea que expresa pVHL nativa.

Los estudios *in silico* aportaron al entendimiento de los resultados obtenidos *in vitro*, señalando posibles argumentos para explicar las diferencias y similitudes encontradas entre ambas variantes. Asimismo, aportan la base para futuros estudios tendientes a determinar la implicancia de las modificaciones estructurales observadas en los procesos de degradación y modificación de la proteína VHL.

In vivo, mediante el xenotransplante de células humanas en ratones inmunodeficientes, demostramos que ambas variantes mantienen la capacidad de formar tumores.

Podemos concluir que la implementación de un método de detección de deleciones en el gen VHL, junto a la secuenciación automática, nos permitió contar con el estudio genético completo en nuestro Centro, para responder a la

demanda e identificación de portadores de la enfermedad. Mediante el estudio funcional de las variantes P138R y L163R hemos demostrado su poder patogénico en base a los resultados obtenidos *in vitro*, *in vivo* e *in sílico*.

INTRODUCCIÓN

ENFERMEDAD DE VON HIPPEL-LINDAU

GENERALIDADES

La enfermedad de von Hippel- Lindau (VHL) (OMIM 193300) es un desorden hereditario, autosómico dominante^{1,2} que predispone a la formación de una variedad de quistes y tumores benignos y malignos en diversos órganos. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad incluyen hemangioblastomas del sistema nervioso central , angiomas de retina, quistes renales, carcinoma renal de células claras, feocromocitoma, quistes y tumores pancreáticos , tumor de saco endolinfático, quistes de epidídimo en los hombres y cistoadenoma de ligamento ancho en las mujeres^{3,4} (**figura 1**) . La enfermedad tiene una prevalencia de 1/36000 a 1/45000 nacidos vivos^{3,5} y una penetrancia mayor a 90% a los 65 años de edad^{3,6}.

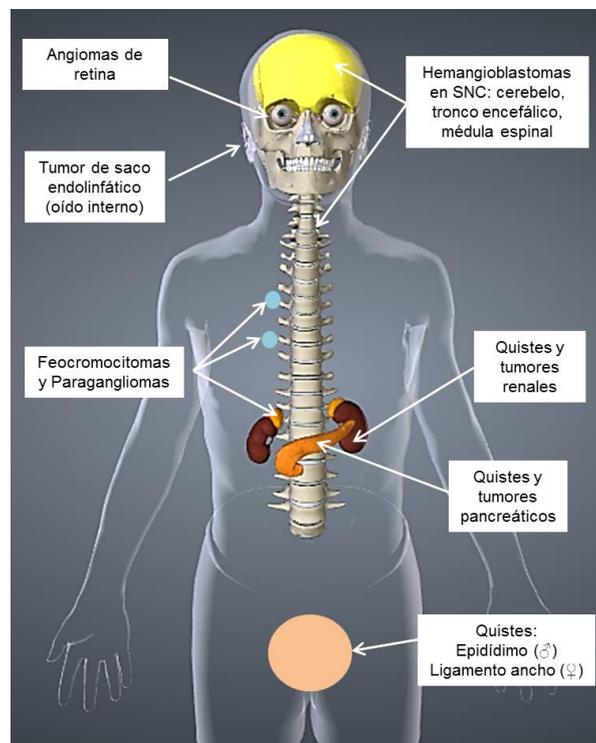


Figura 1- La imagen muestra la localización de los tumores en pacientes con enfermedad de von Hippel-Lindau. SNC: Sistema Nervioso Central. Figura realizada con el software BioDigital Human⁷.

ASPECTOS HISTÓRICOS

Aunque las contribuciones de von Hippel y Lindau fueron decisivas, otros médicos tuvieron un rol importante en la descripción de las manifestaciones clínicas asociadas a la enfermedad. La historia completa de la descripción de la enfermedad se encuentra detallada en las publicaciones de Melmon y Rosen⁸, Lamiell *et al*⁹ y Resche *et al*¹⁰. Brevemente, en el año 1894 Treacher Collins detalló observaciones histopatológicas en las retinas de dos hermanos. Luego el alemán Eugene von Hippel en 1904 describió otra familia en la que observó tumores de retina similares a los descritos por Collins. El patólogo sueco Arvid Lindau en 1927 asoció las lesiones oculares, hemangioblastomas del sistema nervioso central y componentes viscerales de la enfermedad en una única identidad¹¹⁻¹³. El término von Hippel-Lindau fue utilizado por primera vez en 1936^{11,12}.

CRITERIOS CLINICOS PARA EL DIAGNÓSTICO

Melmon y Rosen en 1964⁸ establecieron los criterios, aceptados internacionalmente para el diagnóstico clínico de VHL: En un paciente con historia familiar de VHL, el hallazgo de un hemangioblastoma de Sistema Nervioso Central (SNC), angioma de retina, feocromocitoma o carcinoma renal de células claras es suficiente para el diagnóstico. En ausencia de historia familiar de VHL, dos o más hemangioblastomas de SNC o angiomas de retina o uno de éstos junto con una lesión visceral característica deben estar presentes para realizar el diagnóstico.

CLASIFICACIÓN

Las familias con la enfermedad de VHL son clasificadas en base a sus manifestaciones clínicas en tipo 1 o tipo 2 (ausencia o presencia de feocromocitomas respectivamente^{11,14-17}) (**tabla1**).

Tabla 1 - Características de los tipos de Enfermedad de von Hippel-Lindau

Tipo	Feocromocitoma	Otras Manifestaciones
1	Ausente	Hemangioblastoma de SNC , angioma de retina, cáncer renal, tumores y quistes pancreáticos
2A	Presente	Hemangioblastoma de SNC o angioma de retina
2B	Presente	Hemangioblastoma de SNC o angioma de retina, cáncer renal, tumores y quistes pancreáticos
2C	Presente	No

TUMORES RELACIONADOS CON VHL

La frecuencia y edad de aparición de las manifestaciones clínicas de la enfermedad se encuentran resumidas en la **tabla 2**:

Tabla 2- Frecuencia y edad de aparición de las manifestaciones clínicas.

	Edad al diagnóstico (años)	Edad más común de aparición	Frecuencia en pacientes
Hb. de retina / SNC	0-68	12-25	25-60%
Tumor de saco endolinfático	1-50	24-35	10-25%
Hb. cerebelosos	9-78	18-25	44-72%
Hb. del tronco encefálico	7-36	24-35	10-25%
Hb. de la médula espinal	10-66	24-35	13-50%
Carcinomas renales o quistes	16-67	25-50	25-60%
Feocromocitomas *	4-58	12-25	10-20%
Tumor o quiste pancreático	5-70	24-35	35-70%
Cistoadenoma del epididimo	1-43	14-40	25-60% de varones
Cistoadenoma del lig. ancho	16-64	16-46	≈10% de las mujeres

* Un 20% son feocromocitomas extraadrenales, también llamados paragangliomas.

Recopilado de trabajos entre los años 1976-2004. Hb: hemangioblastoma(s). Adaptada de Villar Gómez de las Heras *et al*, 2011¹⁸.

Hemangioblastomas

Los hemangioblastomas (Hb) son tumores vasculares del SNC, generalmente benignos, cuya sintomatología ocurre por la compresión de las estructuras del SNC¹⁹. Pueden ser esporádicos o presentarse como una manifestación de la enfermedad de von Hippel-Lindau (10 – 40%²⁰⁻²³). Los hemangioblastomas esporádicos se presentan en la cuarta y quinta década de la vida, siendo por lo general solitarios. El tratamiento es la resección quirúrgica completa. Los hemangioblastomas asociados con VHL se presentan a edades más tempranas (segunda y tercera década), y son usualmente múltiples²⁰. Es la lesión más frecuentemente asociada a esta enfermedad, afectando al 60-85% de los pacientes²⁰. Dada la fuerte asociación de estos tumores con VHL se recomienda el estudio genético en todos los pacientes que presenten Hb, especialmente aquellos que los presentan a edades tempranas.

Angiomas de retina

Los angiomas de retina son tumores vasculares, histológicamente idénticos a los hemangioblastomas de SNC²⁴. Entre un 30 a 58% de los individuos con angiomas de retina presentan VHL, por lo cual se recomienda realizar el estudio genético para VHL en pacientes con estos tumores²⁴.

Los angiomas de retina son la típica lesión ocular en esta enfermedad. Un rango de 45 a 60% de los pacientes con VHL desarrolla estos tumores²⁵, que aparecen a una edad temprana, por lo tanto es muy importante el seguimiento de los niños portadores de mutaciones desde el año de vida¹⁸.

Feocromocitomas

Son tumores neuroendocrinos derivados de las células cromafines de la médula adrenal o del tejido cromafín extra adrenal (paraganglioma). Los síntomas

clínicos del feocromocitoma son consecuencia de la excesiva cantidad de catecolaminas secretadas por este tumor. La hipertensión es el síntoma más frecuente, seguido de cefaleas y sudoración²⁶.

Alrededor del 25 al 30% de los pacientes con VHL desarrollan feocromocitomas²⁷, generalmente adrenales, bilaterales y antes de los 40 años de edad. La malignidad en estos tumores es menor al 5% en adultos²⁶, elevándose a 12% en pacientes menores de 20 años²⁸. Existe un alto porcentaje (aproximadamente 38%) de recurrencia de estos tumores^{27,29}.

Carcinoma renal de células claras (ccRCC)

En la mayoría de los carcinomas renales de células claras, tanto esporádicos como hereditarios se encuentran mutaciones del gen *VHL*^{30,31}. Estos tumores causan la muerte del 70% de los pacientes con esta enfermedad^{1,3,32,33}. Se recomienda realizar el estudio genético para VHL en pacientes con carcinoma renal de células claras menores de 46 años aunque no presenten otras manifestaciones clínicas de la enfermedad³⁴.

Alteraciones en páncreas

Los tumores y quistes pancreáticos son muy comunes (35-77%) en pacientes con VHL^{26,35}. La presentación más común en el páncreas son los múltiples quistes en pacientes mayores, mientras que los tumores se presentan en 5-10% de los pacientes¹². Estos tumores pueden ser cistoadenomas, hemangioblastomas, adenocarcinomas o tumores neuroendócrinos²⁶. Se han reportado tumores malignos en 8-50% de los pacientes, que pueden hacer metástasis en hígado²⁶.

Tumores de saco endolinfático

Los tumores de saco endolinfático se observan en 11-16% de los pacientes con VHL^{26,36}. Estos tumores pueden conducir a la pérdida de la audición³⁷, la cual es irreversible y ocurre en la segunda década de la vida. Cuando se presentan en forma bilateral se consideran patognomónicos de VHL¹².

Quistes de epidídimo

Los varones con VHL frecuentemente (50%) presentan cistoadenomas de epidídimo, los cuales son tumores benignos que presentan quistes en su interior¹⁸. Los cistoadenomas no son frecuentes en la población general, por lo tanto se consideran un signo importante de alerta de VHL a edades tempranas.

Los **cistoadenomas de ligamento** ancho no son tan frecuentes en las mujeres con VHL³⁸.

SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES CON VHL

Sin seguimiento clínico, la expectativa de vida promedio de los pacientes con VHL es de entre 41 y 49 años³⁹ de edad, siendo las causas de muerte vinculadas la metástasis del carcinoma renal de células claras y las lesiones producidas por hemangioblastomas del SNC³⁹.

Una vez diagnosticada la enfermedad es necesario el seguimiento de por vida para poder detectar tempranamente las lesiones provocadas en el contexto de la enfermedad y así mejorar la calidad de vida del paciente. La evolución de la enfermedad en cada paciente es impredecible, por ello los controles clínicos son muy importantes a lo largo de su vida⁴⁰.

Las pautas de seguimiento actuales se basan en la noción de que el riesgo de desarrollar tumores es constante durante toda la vida. La **tabla 3** muestra un

resumen del seguimiento clínico que debe realizarse en los pacientes con esta enfermedad¹⁸:

Tabla 3- Protocolo de seguimiento de pacientes con VHL.

Período	Frecuencia	Parámetro a evaluar
Desde el nacimiento	Anual	Evaluación oftalmológica (nistagmo, estrabismo, leucocoria)
1 - 4 años	Anual	Evaluación neurológica
		Examen de retina mediante oftalmoscopio indirecto
5 - 15 años	Anual	Valoración física y neurológica completa
		Examen de retina mediante oftalmoscopio indirecto con pupilas dilatadas
		Evaluación de catecolaminas y sus metabolitos. Si están alteradas TC y/o RMN y/o gammagrafía con MIBG
		Ecografía abdominal (riñones, páncreas y glándulas suprarrenales) a partir de los 8 años
	Cada 2-3 años	Desde los 8-10 años RMN de encéfalo y médula espinal con contraste (gadolinio), se repite anualmente si se observaron tumores
A partir de los 16 años	Anual	Examen otorrinolaringológico (anualmente si hay pérdida auditiva, tinnitus o vértigo). Si hay alteraciones RMN con contraste del conducto auditivo interno para descartar ELST
		Examen físico y valoración neurológica. Examen escrotal en varones
		Examen de retina mediante oftalmoscopio indirecto con pupilas dilatadas
		Evaluación de catecolaminas y sus metabolitos. Si están alteradas TC y/o RMN y/o gammagrafía con MIBG
	Cada 2-3 años	Ecografía abdominal (riñones, páncreas y glándulas suprarrenales), alternando cada 2 años con RMN
		RMN de encéfalo y médula espinal con contraste (gadolinio) con cortes finos
		Examen otorrinolaringológico (anualmente si hay pérdida auditiva, tinnitus o vértigo). Si hay alteraciones RMN con contraste del conducto auditivo interno para descartar ELST

RMN: Resonancia Magnética Nuclear. TC: tomografía computada. ELST: tumor de saco endolinfático.

BASES GENÉTICAS DE LA ENFERMEDAD DE VHL

Descubrimiento y descripción del gen

En el año 1988 Seizinger *et al*⁴¹ asociaron la enfermedad de VHL a un defecto en un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 3. Cinco años después, en 1993 se logró localizar por clonación posicional al gen de la enfermedad de von Hippel-Lindau³. Es un gen supresor tumoral y se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma 3 (3p25-26)³ (figura 2).

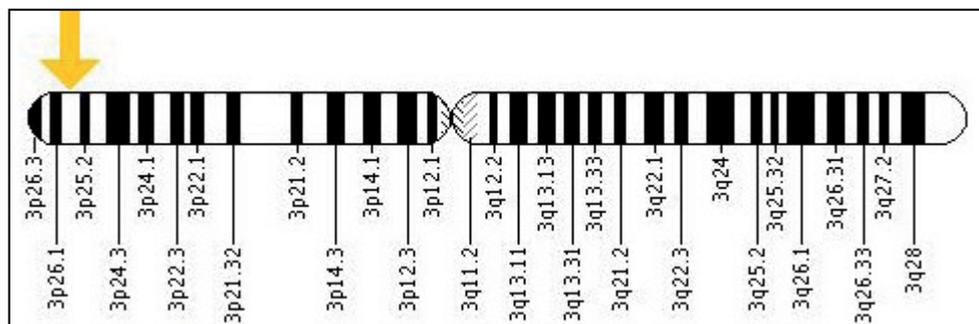


Figura 2- Gen VHL: Se localiza en el brazo corto del cromosoma 3, en la región 3p25-26. La figura fue tomada de la página web <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/VHL>. National Institutes of Health - U.S. National Library of Medicine.

Los ratones “knockout” para el gen de VHL (-/-) mueren durante la embriogénesis (día 10.5-12.5) *in útero* por insuficiencia placentaria^{11,42}. Los ratones VHL(+/-) se desarrollan normalmente y viven al menos 15 semanas sin tumores⁴². Por otro lado los ratones “knockout” condicionales generados por Cre/loxP, con la recombinasa Cre bajo el promotor de β actina sobreviven y desarrollan tumores en hígado, bazo y páncreas⁴³.

La secuencia del gen está altamente conservada en roedores y primates^{44,45} (ratón, rata, gorila, chimpancé y humanos), y tiene homólogos en la mosca de la fruta⁴⁶⁻⁴⁸ (*Drosophila melanogaster*) y el nemátodo *Caenorhabditis elegans*⁴⁴. Estas secuencias están conservadas particularmente en las regiones involucradas en la unión a otras proteínas. Si bien el homólogo en *Drosophila* no

posee alta homología en su secuencia, conserva los residuos esenciales, manteniendo su estructura y función^{46,48}.

Su región codificante consta de tres exones y codifica una proteína (pVHL) de 213 aminoácidos (Ensembl GRCh38.p5) que migra con un peso molecular aparente de 24-30 KDa⁴⁹ (p30). Existe una isoforma más corta de aproximadamente 19 KDa (p19) que se produce como resultado de una traducción que se inicia en un codón de iniciación interno (codón 54). Las dos isoformas de la proteína parecen mantener la actividad supresora de tumores⁴⁹. En la **figura 3** se detalla qué codones son codificados por cada exón del gen, y se marca en la misma el inicio de las dos isoformas (en el codón 1 y 54, para p30 y p19 respectivamente).

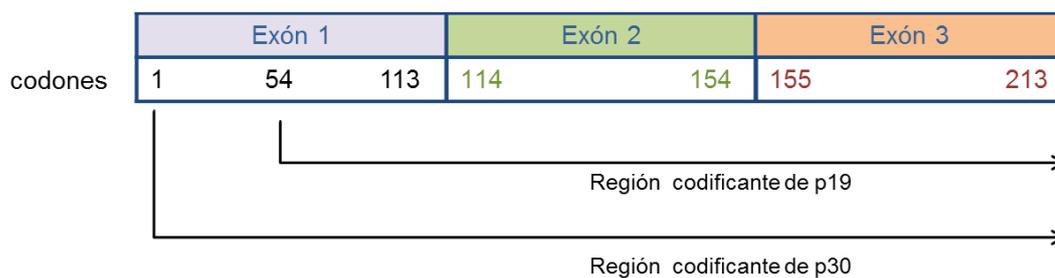


Figura 3- Esquema de los codones codificados por los exones de pVHL.

El promotor de este gen ha sido secuenciado, contiene alto porcentaje de GC, y no contiene cajas TATA ni CCAAT. La transcripción del gen comienza 60 pares de bases río arriba (“*upstream*”) del primer codón de iniciación⁵⁰, y aunque su promotor tiene potenciales sitios de unión para factores de transcripción, aún se desconoce cómo se regula la expresión de *VHL*⁵¹. Su región 3’UTR (del inglés *untranslated region*) también ha sido caracterizada⁵².

En los portadores de mutaciones en el gen *VHL* el desarrollo de la enfermedad comienza con la pérdida o inactivación del alelo salvaje (*wild type*) de acuerdo a la hipótesis de dos eventos de Knudson⁵³ (**figura 4**). Esta

inactivación del alelo remanente “sano” conocida como pérdida de heterocigocidad, se da por anomalías citogenéticas, mutaciones o hipermetilación en el tejido sensible^{11,14,54–56}. Actualmente se desconoce por qué el segundo evento se da en ciertos tejidos y no en otros¹¹.

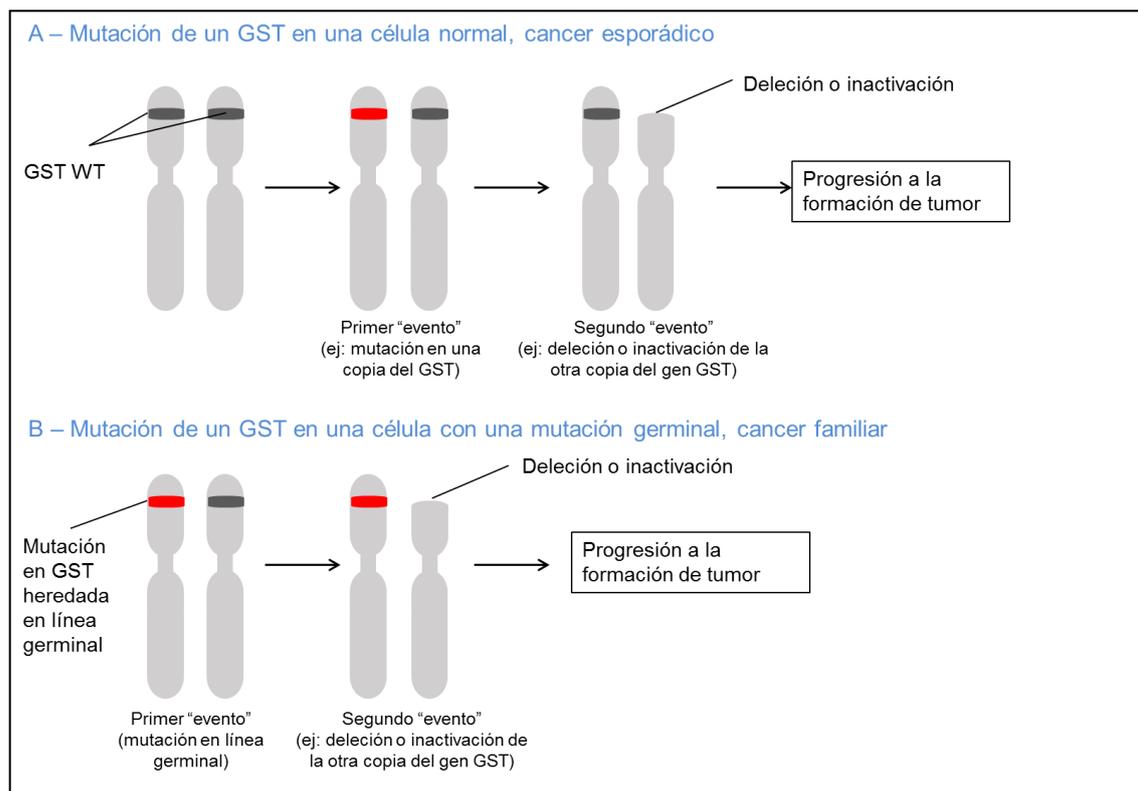


Figura 4 –Esquema que explica la Hipótesis de Knudson de dos eventos para la formación de tumores dada por alteraciones en un GST (gen supresor tumoral). Se esquematiza un par de cromosomas, con un alelo salvaje (marcado en color negro), con el gen mutado (marcado en color rojo) y con delección o inactivación del gen (con la parte superior del cromosoma ausente en el esquema). A) Los Individuos sanos tienen dos copias normales del GST, por lo tanto dos “eventos” independientes son requeridos en la misma célula para desarrollar el cáncer. B) Los individuos portadores de una mutación germinal del GST ya tienen el primer “evento” en todas las células de su organismo, y requieren solamente de un “evento” adicional para desarrollar el cáncer. WT: del inglés *wild type*, alelo salvaje. Adaptada de Richards *et al*, 2001⁵¹.

Localización y frecuencia de mutaciones

Más de 500 mutaciones en *VHL* han sido identificadas y se encuentran listadas en la base de datos HGMD®⁵⁷ (Human Gene Mutation Database -HGMD® Professional 2015.2).

Las mutaciones descritas se encuentran dispersas a lo largo de todo el gen (**figura 5**), principalmente a partir del codón de iniciación interno (codón 54) que codifica para la metionina de la isoforma corta de proteína pVHL^{49,58}.

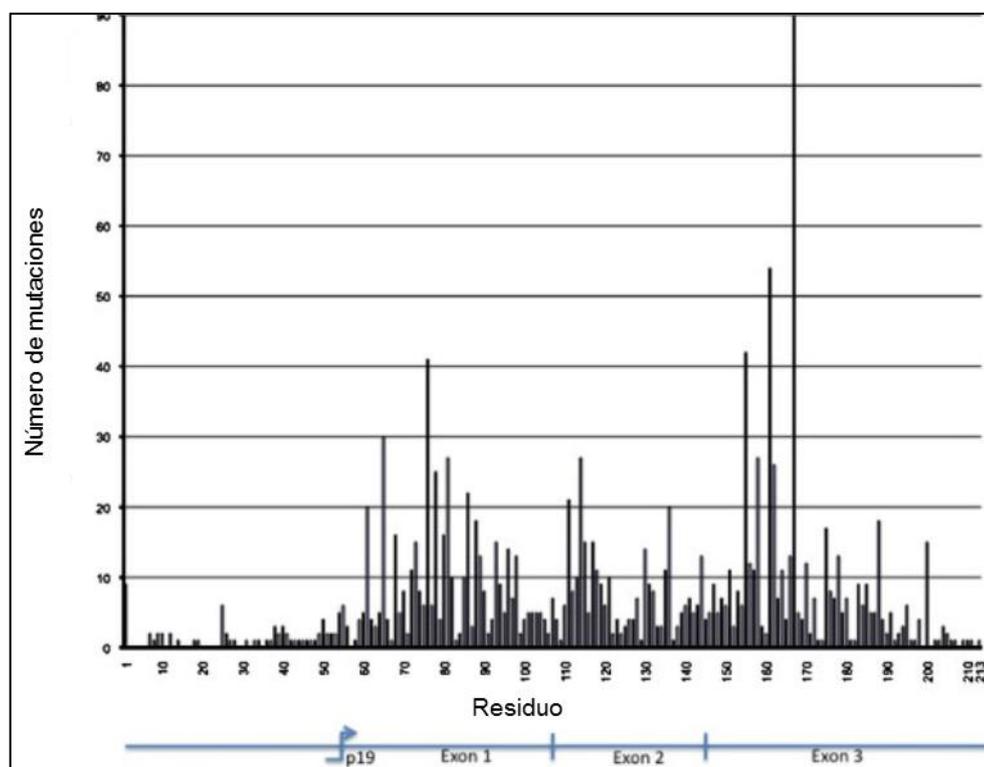


Figura 5- Distribución de las mutaciones en el gen *VHL*. Numero de mutaciones (eje y) vs Numero de residuo (eje x). La línea en azul marca los límites de los exones. También se marca señalado como p19 al codón 54, ya que es codón de iniciación para la isoforma de 19 KDa. Adaptada de Nordstrom-O'Brein *et al*, 2010⁵⁹.

La frecuencia de las diferentes variaciones del gen *VHL*^{5,14,58,60-66} que causan enfermedad se resumen en la **tabla 4**.

Tabla 4- Frecuencia de las diferentes variaciones del gen *VHL* que causan la enfermedad

Frecuencia (%)	Modificaciones observadas en el gen <i>VHL</i>
20-37	Deleciones
30-38	Mutaciones con cambio de sentido
23-27	Mutaciones sin sentido o con cambio en el marco de lectura

Respecto a la ubicación de estas mutaciones se han identificado regiones con mayor frecuencia: los codones 74 a 98, 111 a 131 y 157 a 189^{15,58,67}. Estudios poblacionales han determinado que las mutaciones en el codón 167 se encuentran presentes en familias de diferentes nacionalidades, siendo este un *hot spot*, que se asocia a la presencia de feocromocitoma^{15,65}.

Las deleciones representan un porcentaje elevado de las mutaciones en esta enfermedad, son diversas en tamaño, y posición⁵. Se clasifican según su extensión en: grandes (>20pb) o pequeñas (≤ 20pb). Las grandes deleciones de este gen se producen por recombinación mediada por transposones Alu⁶⁸.

La frecuencia general de deleciones es de 20-37%, (3-9% del gen entero, y 23% deleción parcial del gen)⁴⁹. Se ha sugerido que grandes deleciones de *VHL* que involucren a *BRK1* (también conocido como *C3orf10* y *HSPC 300*) tendrían bajo riesgo de cáncer renal. *BRK 1* codifica para una proteína altamente conservada que posee un rol en la organización del citoesqueleto⁶⁹.

Mutaciones *de novo* y mosaicismos

Las mutaciones *de novo* representan aproximadamente un 20-23 % de los casos de VHL^{39,64,70-72}. Debemos tener en cuenta que algunos de estos pacientes podrían haber heredado esta mutación de padres fenotípicamente normales pero portadores mosaicos^{73,74}. Alrededor de 5% de los pacientes con VHL presentan mosaicismos^{70,75,76}. Por mosaico se entiende a un individuo en el que coexisten dos o más poblaciones celulares con distinto genotipo⁷⁷⁻⁷⁹. Por ejemplo, estos padres podrían no presentar la mutación en sus células somáticas pero sí en sus espermatozoides u óvulos.

Esta condición dificulta el diagnóstico de los pacientes, ya que para realizarlo por las técnicas convencionales (Secuenciación de Sanger, MLPA y UPQFM-PCR) deben presentar un porcentaje detectable de linfocitos de sangre periférica con la mutación. El límite de detección inferior de la secuenciación de Sanger es de aproximadamente 15-20%, mientras que el superior es de 60-70%, por lo tanto tiene limitaciones en ambos extremos del espectro de detección, es insensible a niveles menores de mosaicismo, y sobreestima a los niveles mayores de 70%^{80,81}.

Un grupo francés ha detectado mosaicismos en muy baja proporción utilizando Next Generation Sequencing⁷⁵. En casos en los que se sospeche mosaicismos es importante tener acceso a muestras de los tumores del paciente para confirmar el estado de mosaico.

Diversos grupos que han estudiado a pacientes con VHL, no han encontrado mutaciones en alrededor de 5% de los que presentaban clínica de la enfermedad, lo cual es difícil de explicar^{60,63,72}. Coinciden en que podría tratarse de mosaicismos o una fenocopia, es decir que no posee alteraciones de *VHL* pero

que presenta el mismo fenotipo de la enfermedad VHL, el cual podría estar dado por otro gen no descrito aún.

Mutaciones homocigotas de *VHL* en línea germinal

Algunos individuos poseen mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas del gen *VHL* en línea germinal⁸²⁻⁸⁵. Hasta el momento sólo se han descrito casos que presentan mutaciones con cambio de sentido (*missense*) que se localizan en la región C terminal de la proteína, siendo la más frecuente la Arg200Trp. Se cree que estas mutaciones afectan levemente la función de pVHL⁵⁹ ya que los pacientes presentan policitemia (hematocrito >55%), hemangiomas vertebrales y niveles elevados de VEGF en sangre, mortalidad prematura como consecuencia de eventos cerebrovasculares y trombosis periférica, pero no desarrollan los tumores característicos de la enfermedad de VHL⁵⁹.

Correlación genotipo-fenotipo

Diversos autores correlacionan las alteraciones observadas en el gen y el fenotipo presentado por los pacientes (**figura 6**). Se ha observado que la mayoría de las familias que presentan feocromocitoma (VHL tipo 2) poseen una mutación con cambio de sentido, mientras que las familias con VHL tipo 1 por lo general presentan deleciones en el gen o mutaciones que resultan en una proteína trunca^{62,65,69,86-89}. Pacientes con la misma mutación, aún dentro de la misma familia, pueden presentar manifestaciones diferentes.



Figura 6- Relación genotipo-fenotipo observada en pacientes con VHL.

Un estudio reciente ha demostrado que los pacientes que presentan mutaciones con cambio de sentido (*missense*) tienen una tasa menor de aparición de nuevas manifestaciones si se los compara con los que presentan mutaciones que generan una proteína trunca -mutaciones sin sentido (*nonsense*) o con cambio en el marco de lectura (*frameshift*)⁴⁰ (**figura 7**). Esta diferencia puede deberse a que el producto resultante de mutaciones con cambio de sentido es una proteína VHL alterada que puede presentar alguna función residual mientras que las proteínas truncas que resultan de las mutaciones sin sentido o mutaciones con cambio en el marco de lectura son, en general, no funcionales o simplemente no son traducidas a proteínas dada la inestabilidad de su ARN mensajero (*nonsense mediated RNA decay*)^{40,90}.

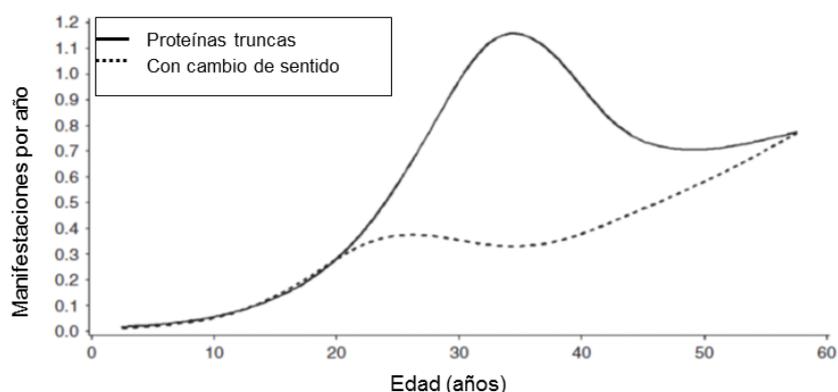


Figura 7-Efecto del genotipo en la tasa de nuevas manifestaciones en función de edad del paciente. Se representa en línea continua el número de manifestaciones por año en función de la edad para los pacientes que presentan mutaciones que generan proteínas truncas y en línea punteada para aquellos que presentan mutaciones con cambio de sentido. Adaptada de Binderup *et al*, 2016⁴⁰.

PROTEINA VHL (pVHL)

En el año 1995 Duan *et al*^{β1,92}, Kibel *et al*^{β3} y Aso *et al*^{β4} evidenciaron que pVHL inmunoprecipitaba junto con otras proteínas, y demostraron que forma parte de un complejo multiproteico junto a las Elonguinas B y C, al cual luego se lo denominó VBC (pVHL-Elonguina **B**- Elonguina **C**).

Dado que la estructura de pVHL es importante para la formación y función de este complejo, se detallará a continuación información sobre su plegamiento y degradación.

Expresión en tejidos

La proteína codificada por este gen está ampliamente expresada en todos los tejidos de fetos y adultos humanos^{11,95}.

Síntesis y plegamiento

Las chaperonas moleculares son mediadores esenciales del plegamiento y control de calidad de la mayoría de las proteínas celulares. Luego de la síntesis en los ribosomas, el plegamiento de la pVHL es el resultado de la interacción de ésta con chaperonas celulares. La pVHL recién traducida es estabilizada por la chaperona Hsp70 (del inglés *Heat Shock Proteins* o proteínas de choque térmico de 70 KDa) y luego se pliega apropiadamente en su estructura terciaria gracias a la asistencia de la chaperonina TRiC (del inglés *TCP-1 Ring Complex*, también llamada CCT-del inglés *Chaperonin Containing TCP-1*) (**figura 8**). TRiC asiste al plegamiento de numerosas proteínas que como pVHL forman complejos oligoméricos. La estructura de TRiC es similar a un barril, conformada por dos anillos superpuestos, y una cavidad central donde los polipéptidos se unen y pliegan. El plegamiento de pVHL se encuentra acoplado a la formación del complejo VBC⁹⁶⁻¹⁰⁰ (VHL con Elonguina B y Elonguina C) esencial para su

función de regulación de los niveles de las subunidades alfa del Factor Inducible por Hipoxia (HIF, del inglés *Hypoxia Inducible Factor*) (ver sección Funciones de pVHL). Una vez formado el complejo VBC maduro, se libera de la unión a TRiC. La unión de pVHL a TRiC ocurre en los aminoácidos 114 a 199 y 148 a 155 (regiones conocidas como Box 1 y 2 respectivamente)⁹⁶. Mutaciones en Box 1 y Box 2 impiden la asociación de pVHL a TRiC, dando lugar a una proteína mal plegada y a la ausencia de un complejo VBC maduro^{59,97}. Las mutaciones que alteran la unión a Elonguina C (aminoácidos 155 a 181), pueden unirse a TRiC pero no de manera estable a las Elonguinas B y C⁵⁹, se cree que esta deficiencia en la unión podría impedir la liberación de la unión de pVHL-TRiC, por tanto llevar a la falta del complejo VBC maduro⁹⁸.

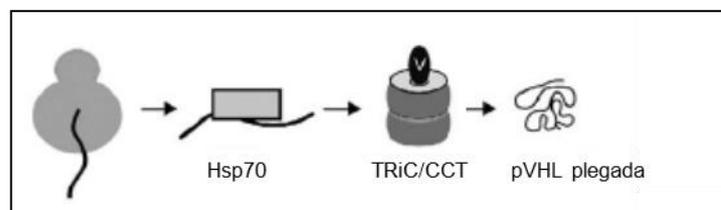


Figura 8- El plegamiento de pVHL requiere la ayuda de la chaperona Hsp70 y de la chaperonina TRiC/CCT. Adaptada de McClellan *et al*, 2005⁹⁸.

Modificaciones post-traduccionales

Ubiquitinación

pVHL es poliubiquitinada, lo que determina su degradación por el proteasoma, por lo que esta modificación será discutida en detalle en la sección Degradación.

NEDDilación

La NEDDilación es la unión covalente de la proteína NEDD8 (proteína-8 reguladora del desarrollo y expresión de la célula neuronal precursora, del inglés

Neural precursor cell Expressed Developmentally Downregulated protein 8) a una proteína de interés. La misma ocurre en residuos lisina. Existen en pVHL tres posibles sitios de NEDDilación, que son las lisinas en las posiciones 159, 171 y 196 de las cuales el principal aceptor de NEDD8 es el residuo lisina 159¹⁰¹⁻¹⁰³. La unión de NEDD8 a pVHL es necesaria para la posterior interacción entre pVHL y fibronectina¹⁰³. Sin embargo, esta NEDDilación sería transitoria, según los resultados obtenidos mediante inmunoprecipitación¹⁰¹.

Por otro lado la NEDDilación de pVHL imposibilita la unión de Culina 2 al complejo VBC. La inhibición de la NEDDilación o mutaciones en el sitio de conjugación de NEDD8 disminuyen la interacción entre pVHL y fibronectina, pero mantienen el complejo VBC funcional.

SUMOilación

La SUMOilación consiste en la conjugación covalente de proteínas de la familia SUMO (pequeños modificadores parecidos a la ubiquitina, del inglés “Small Ubiquitin-like Modifiers”) a otra proteína. Recientemente se ha demostrado que la proteína RSUME SUMOila a pVHL, siendo la Lisina 171 el principal blanco de SUMOilación^{104,105}. Esta modificación impide la unión de pVHL a las Elonguinas B y C y por lo tanto la degradación de las subunidades alfa (1, 2 y 3) de HIF^{104,106}.

Degradación

Si pVHL se encuentra mal plegada o no se forma el complejo VBC maduro, ésta será degradada por el sistema ubiquitina-proteasoma. La poliubiquitinación es una modificación post-traducciona por la cual se transfieren varios residuos de ubiquitina a las lisinas de la proteína que se degradará, lo cual determina la degradación de la proteína por el proteasoma 26S.

En el proceso de conjugación covalente de la ubiquitina (76 aminoácidos, 8.6 KDa) con la proteína a degradar intervienen tres reacciones enzimáticas secuenciales que resultan en la unión del grupo carboxilo del residuo glicina ubicado en el dominio C terminal de la ubiquitina con el grupo ϵ amino de la cadena lateral de un residuo de lisina de la proteína blanco, formando un enlace amida denominado isopeptídico (si el grupo amino y/o el grupo carboxilo que forman el enlace amida no están en posición alfa, se habla de enlace isopeptídico) (**figura 9**).

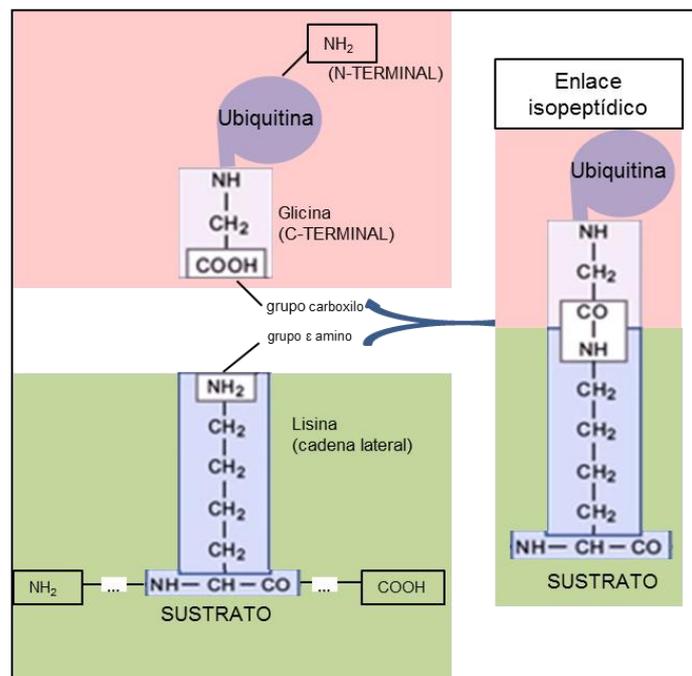


Figura 9-Conjugación de la ubiquitina a los residuos lisina de la proteína blanco. La figura muestra la formación del enlace amida entre el grupo carboxilo del residuo glicina de la ubiquitina y el grupo ϵ amino de la cadena lateral de un residuo de lisina de la proteína blanco.

Una vez que la ubiquitina se ha unido a la lisina de la proteína blanco, ocurren sucesivas rondas de ubiquitinación, en las cuales las moléculas de ubiquitina se unen entre sí formando el enlace mencionado entre la glicina del dominio C terminal con residuos lisina específicos de la última ubiquitina de la cadena, formándose así la cadena de poliubiquitina. Dado que la ubiquitina posee varios residuos lisina, la posición de la unión entre las ubiquitinas determina la

señal de esta ubiquitinación. En el caso de la degradación, las ubiquitinas se unen entre sí por su lisina 48. Finalmente, las proteínas unidas a la cadena de poliubiquitina son reconocidas y degradadas por el proteasoma 26 S (**figura 10**).

En el proceso de ubiquitinación participan 3 proteínas diferentes denominadas E1, E2 y E3. El primer paso es la conjugación de la ubiquitina mediante un enlace tioéster a la E1 (enzima activadora de la ubiquitina), la cual requiere ATP. Luego la ubiquitina conjugada a E1 es transferida a un grupo SH de la enzima conjugadora de ubiquitina (E2). Finalmente, la unión de la proteína blanco a la E3 ubiquitina ligasa, permite la transferencia de la ubiquitina activada unida a E2 a la lisina de la proteína sustrato, formando el enlace antes descrito (**figura 10**). Existen diversas proteínas que cumplen los roles E1, E2 y E3, las más abundantes son las E3 y las menos frecuentes son las que cumplen el rol E1.

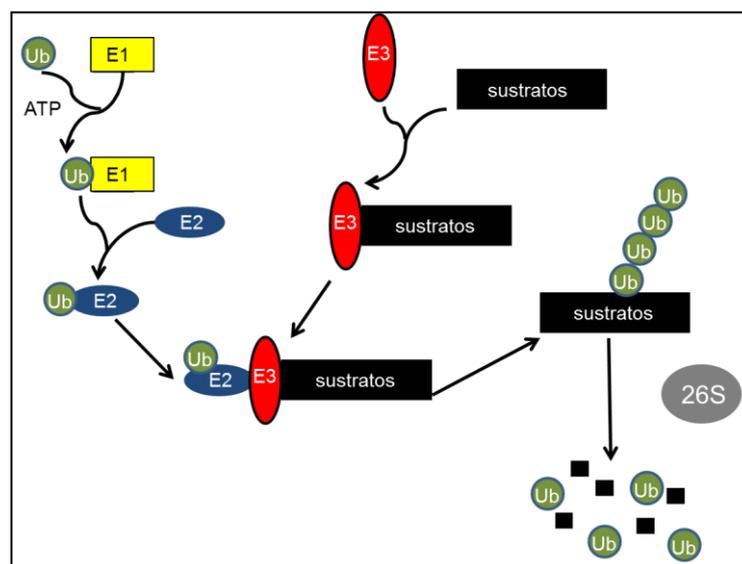


Figura 10-Eschema de la ubiquitinación. La ubiquitina (Ub) es conjugada a la E1, requiriéndose ATP para esta reacción, luego transferida a la enzima conjugadora de ubiquitina (E2). Finalmente, la unión de la proteína blanco a la E3 ubiquitina ligasa, permite la transferencia de la ubiquitina activada unida a E2 a la lisina de la proteína sustrato. Luego de la transferencia de varios residuos de ubiquitina, este sustrato con una cadena de poliubiquitina es degradado por el proteasoma 26 S. Adaptada de Sun, 2003¹⁰⁷.

Como se mencionó anteriormente pVHL posee tres residuos lisina en las posiciones 159, 171 y 196. Se ha demostrado que pVHL es poliubiquitinada por una proteína denominada E2-EPF UCP más conocida como UCP (del inglés *ubiquitin carrier protein*). UCP actúa como enzima E2 (enzima conjugadora de ubiquitina) y se ha demostrado que puede catalizar la conjugación de ubiquitina al sustrato, de manera dependiente e independiente de una E3 ubiquitina ligasa¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Se ha postulado que en el caso de pVHL, UCP cataliza la conjugación a ubiquitina de manera E3-independiente¹⁰⁸. Hasta la fecha se desconoce a qué región de pVHL se une UCP para ubiquitinarla. Se ha observado que la expresión de UCP se encuentra elevada en tumores¹¹¹.

También participa en la degradación otra chaperona: Hsp 90 (del inglés *Heat Shock Proteins* o proteínas de choque térmico de 90 KDa)⁹⁸. La identificación de dos vías independientes, una para el plegamiento y otra para la degradación mediadas por diferentes chaperonas sugiere que el destino de pVHL pueda estar controlado por una jerarquía de interacciones entre chaperonas¹⁰⁰.

Conocer y comprender el mecanismo por el cual las mutantes de pVHL son blanco para su degradación por el proteasoma podría guiar estrategias para lograr plegar de manera adecuada la proteína y estabilizar estas mutantes de modo que formen un complejo maduro estable con las Elonginas B y C¹⁰⁰. Los inhibidores del proteasoma como Bortezomib y MG132 son capaces de aumentar los niveles de pVHL¹⁰⁰. También se han identificado otros compuestos que aumentan los niveles intracelulares de las pVHL mutadas¹¹².

Estructura y dominios

pVHL aislada no ha sido cristalizada a la fecha. Se ha descrito que cuando se encuentra libre adquiere un estado conformacional intermedio entre su conformación nativa (totalmente plegada) y la totalmente desplegada (descrita en inglés como *molten globule*)^{113,114}. Sutovsky *et al*¹¹⁴ especulan que este estado conformacional le permitiría a pVHL tener mayor flexibilidad para reconocer sus proteínas blanco para ejercer sus diversas funciones.

La estructura cristalográfica de pVHL fue descrita en el año 1999 por Stebbins *et al*¹¹⁵, quienes lograron cristalizar la proteína pVHL formando parte del complejo VBC. Luego, en el año 2002, dos grupos publicaron con días de diferencia la estructura cristalográfica de este complejo VBC unido a un péptido de HIF-1 α ^{116,117}.

pVHL posee dos dominios, uno NH₂- terminal rico en hoja plegada β (dominio β) y un dominio rico en α -hélice más pequeño, unidos por conectores y una interfaz polar¹¹⁵. El dominio α interactúa directamente con la Elonguina C, mientras que el β participa de la unión a HIF- α ¹¹³, la cual se discutirá en la sección funciones de pVHL.

El dominio β consiste de 7 hojas plegadas β (residuos 63-154) y una α -hélice (residuos 193-204) que se mantiene contra una de las hojas plegadas β mediante interacciones hidrofóbicas¹¹⁵. El dominio α de pVHL (residuos 155-192) consiste de 3 α -hélices. Los dominios α y β se encuentran conectados por dos pequeñas cadenas de polipéptidos (residuos 154 a 156 y 189 a 194) (**figura 11**).

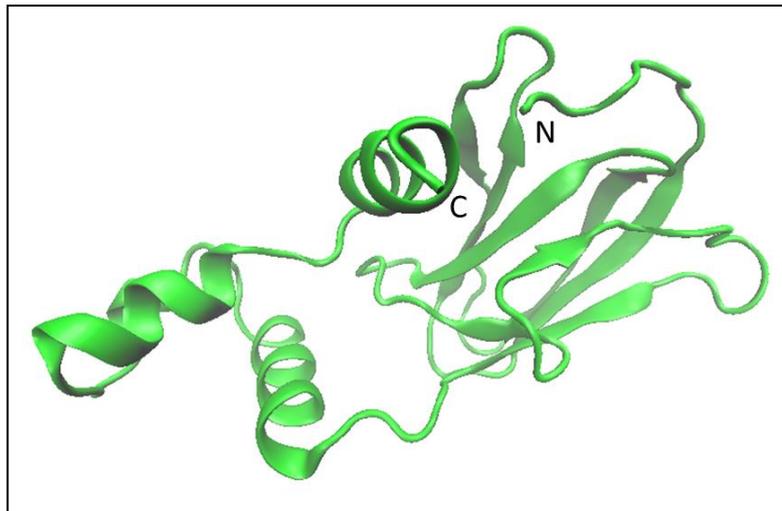


Figura 11-Estructura de pVHL cuando parte del complejo VBC. N y C marcan los extremos amino y carboxilo de la proteína respectivamente. Imagen de la estructura cristalográfica realizada con el software VMD.

Los codones 14 a 53 de pVHL codifican para 8 repeticiones en tándem de 5 aminoácidos ($(GXEEEX)_8$). Se desconoce la función de este dominio ácido, el cual no se encuentra presente en el gen *VHL* de roedores⁴⁸, ni en la isoforma de aproximadamente 19 KDa (p19) que como ya mencionó, se produce como resultado de una traducción iniciada en el codón 54.

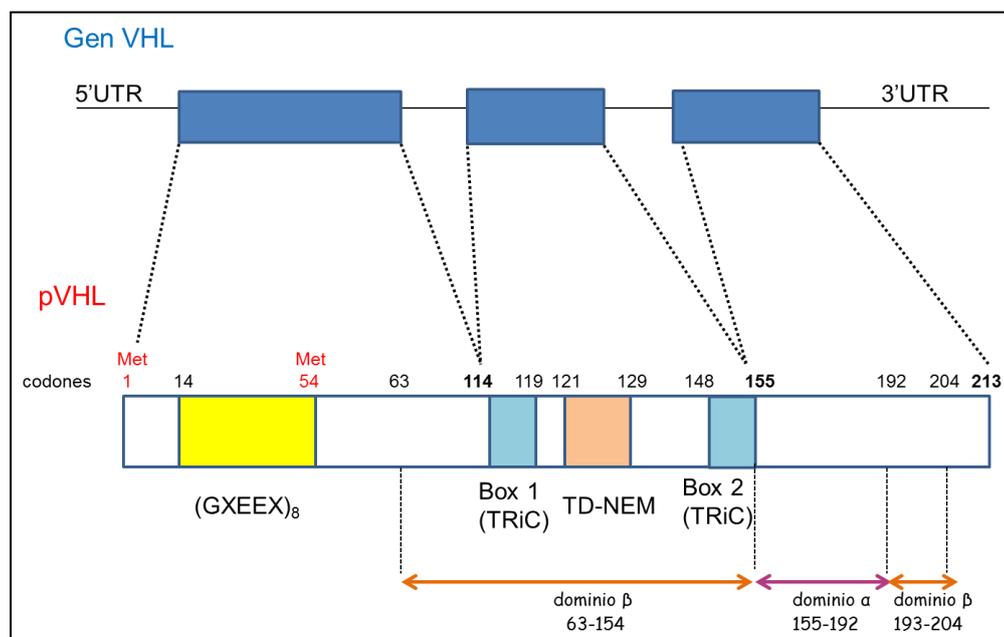


Figura 12 –Esquema de la proteína pVHL señalando la ubicación de sitios de interacción importantes. $(GXEEEX)_8$ = dominio ácido del cual se desconoce su función. Unión a TRiC: residuos 114-119 (Box 1) y 148-155 (Box 2)^{97,112}. TD-NEM: (del inglés Transcription-Dependent Nuclear Export Motif), motivo descrito por Khacho *et al*¹¹⁸, será discutido a continuación. En rojo se encuentran señaladas las 2 metioninas (Met) de iniciación que dan lugar a la isoforma de 30 KDa (Met 1) y 19 KDa (Met 54). Las flechas indican la ubicación de los dominios α y β ya descritos, involucrados en la unión de Elonguina C y HIF- α respectivamente.

Localización subcelular

pVHL fue inicialmente descrita como citoplasmática⁹⁵, luego se demostró que se encuentra predominantemente en el citoplasma pero circula entre el núcleo y el citoplasma¹¹⁹⁻¹²¹. Este tráfico constante o, “*shuttling*” requiere de un motivo aminoacídico de exportación nuclear, diferente a la secuencia NES (Del inglés *Nuclear Export Sequence*) que es rica en leucina y que ha sido descrita para otras proteínas¹²². Este motivo aminoacídico DXGX₂DX₂L que permite salir del núcleo a las proteínas que lo contienen, ha sido descrito por Khacho *et al*¹¹⁸. Este motivo está presente en proteínas como PABP1 (Poly(A)-Binding Protein 1) y se denomina TD-NEM (del inglés Transcription-Dependent Nuclear Export Motif) ya que depende de la transcripción de la ARN polimerasa II. El motivo TD-NEM en pVHL corresponde a los residuos 121 a 129 de la proteína (DAGTHDGLL), codificados por el exón 2 del gen. Se han descrito mutaciones en esta región (D121G, D126A y G123A) en pacientes que presentan la enfermedad de VHL. En estos casos el defecto en el tránsito entre núcleo y citoplasma de la pVHL mutada sería el responsable del fenotipo en los pacientes, ya que se demostró *in vitro* que la interacción de estas variantes con HIF se mantiene intacta¹¹⁸.

FUNCIONES DE pVHL

En los últimos años, se han descrito funciones de pVHL, relevantes para el desarrollo tumoral, que son independientes de HIF (estabilización de microtúbulos y regulación de cilias primarias, regulación de la apoptosis, ensamblaje de la matriz extracelular³⁸). Recientemente, se han descrito nuevos blancos de pVHL¹²³, pero aún la función más descrita de pVHL es la de regular los niveles de las subunidades α de HIF¹².

Interacción con HIF

En el año 1996, Iliopoulos *et al*¹²⁴ observaron que en ausencia de pVHL, las células mostraban una mayor expresión de ARN mensajero de genes inducidos por hipoxia, sin pensar en la interacción de pVHL con HIF. Gnarra *et al* observaron que en ausencia de pVHL los niveles de ARNm de VEGF se encontraban aumentados¹²⁵.

Maxwell *et al*¹²⁶ en el año 1999, fueron los primeros en demostrar que pVHL une a la subunidad α de HIF, determinando su degradación en normoxia. Postularon que en hipoxia, esta degradación no se producía y especularon que podría existir una posible modificación crítica en HIF- α , que no ocurriera en hipoxia. En el año 2001 tres grupos demostraron que la modificación crítica para el reconocimiento es la hidroxilación de residuos prolina (prolina 402¹²⁷ y prolina 564^{128,129} en el caso de HIF-1 α).

Como se mencionó anteriormente, en el año 2002, Min *et al*¹¹⁶ y Hon *et al*¹¹⁷ obtuvieron la estructura cristalográfica del complejo VBC, del cual pVHL forma parte, unido a un fragmento del dominio ODD del péptido HIF-1 α que contiene al residuo prolina en la posición 564. (códigos en PDB:1LM8 and 1LQB, respectivamente). La interacción proteína-proteína entre el complejo VBC y HIF-1 α está mediada por pVHL. Esta interacción entre pVHL y HIF-1 α hidroxilada se encuentra mediada por una red de enlaces de hidrógeno que involucra varios residuos de pVHL y a la hidroxiprolina 564 de HIF-1 α .

El complejo VBC forma parte de una E3 Ubiquitina Ligasa

El complejo VBC tiene como blanco a las subunidades α de HIF para su ubiquitinación y degradación por el proteasoma en normoxia^{11,130}.

El complejo VBC forma parte de una E3 ubiquitina ligasa junto a Culina 2¹³¹, y la *ring box protein 1* (Rbx-1). Como se mencionó anteriormente, las E3

ubiquitina ligasa son responsables de la unión a la proteína que será degradada. En este caso, el dominio β de pVHL actúa como el dominio de reconocimiento de este complejo E3 ubiquitina ligasa¹³², ya que es el que media la interacción con las subunidades α del Factor Inducible por Hipoxia (HIF). La Culina 2 actúa como conjugadora de ubiquitina (E2) en este sistema¹³² (**figura 13**).

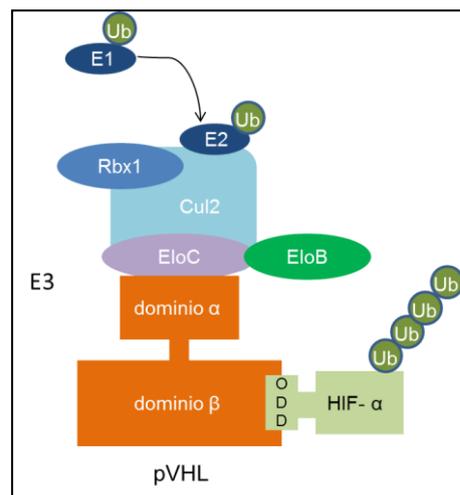


Figura 13-pVHL forma parte de un complejo E3 ubiquitina ligasa. pVHL interactúa por su dominio β con HIF- α y por su dominio α con la Elonguina C (EloC), formando parte del complejo con Elonguina B (EloB), Culina 2 (Cul2) y Rbx1 (*Ring box Protein 1*). pVHL formando parte del complejo VBC-Cul2 reconoce a HIF- α por su dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), permitiendo que la Culina 2 (E2) le transfiera los residuos ubiquitina (Ub) a HIF- α determinando su degradación por el proteasoma. Adaptada de Krek *et al*, 2000¹³³.

HIF detecta cambios en la concentración de oxígeno y está formado por subunidades α y β . Estas últimas se expresan constitutivamente, mientras que las subunidades α se encuentran reguladas por la concentración de oxígeno¹³⁴. En normoxia, las subunidades de HIF alfa (HIF- α) (1,2 y 3) son poliubiquitinadas y de esta manera se determina su degradación por el proteasoma 26 S. Esta interacción depende de la concentración de oxígeno ya que, como se mencionó, la misma es determinada por la hidroxilación de dos residuos de prolina de HIF- α . Como consecuencia, la expresión de genes regulados por el factor de transcripción heteromérico HIF (α/β)³¹ es inhibida por pVHL.

Hidroxilación y Prolil-hidroxilasas

La hidroxilación de los residuos prolina es catalizada por una familia de enzimas con actividad prolil-4-hidroxilasas^{128,129,135,136} y requiere de 2-oxoglutarato y oxígeno molecular como sustratos y de hierro(Fe^{2+}) y ascorbato como cofactores, obteniéndose como producto succinato y dióxido de carbono¹³⁷ (**figura 14**).

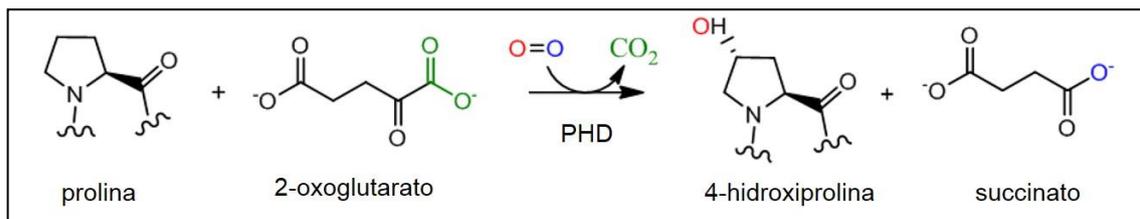


Figura 14- Hidroxilación de las prolinas de las subunidades α de HIF. PHD: Prolil-hidroxilasas

Aunque las proteínas HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α comparten alrededor de 50% (49 a 55%) de su secuencia aminoacídica^{134,138,139}, las prolinas que se hidroxilan (en posiciones 402 y 564 en HIF-1 α humana¹⁴⁰, 405 y 531 en HIF-2 α humana¹⁴⁰, y 490¹⁴¹ en HIF-3 α humana) se encuentran muy conservadas en varias especies¹⁴². Estas prolinas se localizan en un motivo aminoacídico LXXLAP reconocido por las prolil.-hidroxilasas¹²⁷ (**figura 15**).

		402 ODD	564 ODD
Humano	HIF-1 α	³⁹⁷ LTLLAPAAGDT ⁴⁰⁷	⁵⁵⁸ DLEMLAPY ⁵⁶⁵
Ratón	HIF-1 α	³⁹⁷ LTLLAPAAGDT ⁴⁰⁷	⁵⁷¹ DLEMLAPY ⁵⁷⁸
Bovino	HIF-1 α	³⁹⁷ LTLLAPAAGDT ⁴⁰⁷	⁵⁵⁸ DLEMLAPY ⁵⁶⁵
Pollo	HIF-1 α	³⁹⁷ LTVLAPAAGDT ⁴⁰⁷	⁵⁵⁶ DLEMLAPY ⁵⁶³
Rana	HIF-1 α	³⁹⁸ LTLLAPDAGDE ⁴⁰⁸	⁵⁵² DLEMLAPY ⁵⁵⁹
Gusano	HIF-1 α		⁶¹⁶ DLSCCLAPF ⁶²⁶
Humano	HIF-2 α	⁴⁰⁰ LAQLAPTPGDA ⁴¹⁰	⁵²⁵ DLETLAPY ⁵³²
Ratón	HIF-2 α	⁴⁰⁰ LAQLAPTPGDA ⁴¹⁰	⁵²⁴ DLETLAPY ⁵³¹
Bovino	HIF-2 α	⁴⁰⁰ LAQLAPTAGDT ⁴¹⁰	⁵²⁴ DLETLAPY ⁵³¹
Pollo	HIF-2 α	³⁹⁷ LAQLAPTPGDA ⁴⁰⁷	⁵²⁴ DLETLAPY ⁵³¹
Humano	HIF-3 α		⁴⁸⁴ DLEMLAPY ⁴⁹¹

Figura 15- Conservación de las prolinas que son hidroxiladas en las distintas subunidades α de HIF de diferentes especies. ODD: dominio de degradación dependiente de oxígeno. Adaptada de Chan *et al*, 2005¹⁴².

Chan *et al*¹⁴², sugieren para HIF-1 α , que la hidroxilación de la prolina en la posición 564 ocurre primero y es necesaria para la hidroxilación de la prolina en la posición 402¹⁴². Al ser HIF-1 α hidroxilada en la prolina 564, se favorece su posterior interacción con otra prolil-hidroxilasa o con pVHL, resultando en la hidroxilación de la prolina 402 o su degradación, respectivamente (**figura 16**).

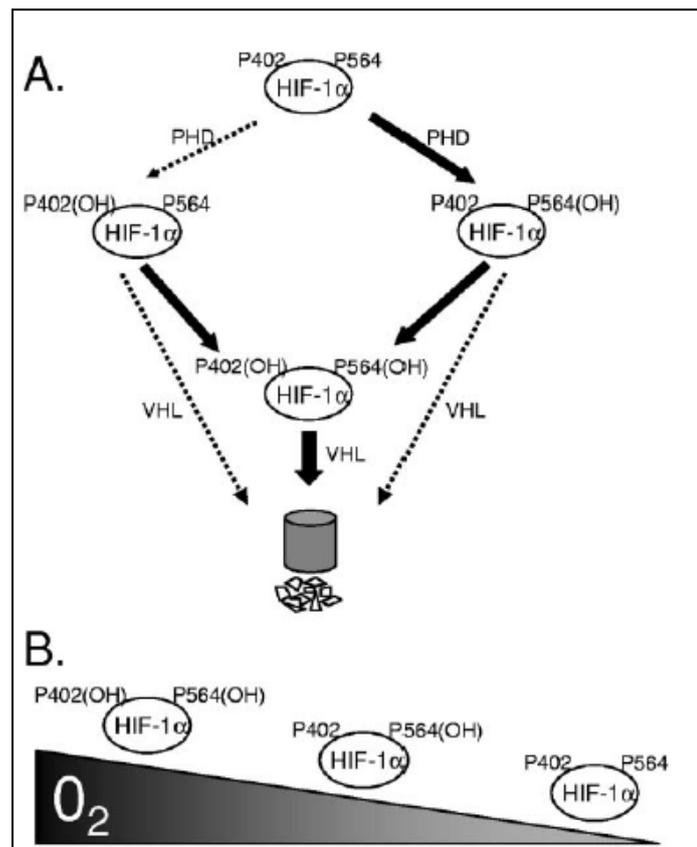


Figura 16- Modelo de la hidroxilación de HIF-1 α . Panel **A**: En condiciones de normoxia la prolina 564 es reconocida e hidroxilada por Prolil-hidroxilasas (PHD). Luego de esta modificación HIF-1 α puede ser reconocida por pVHL o por otra prolil-hidroxilasa. Si HIF-1 α es reconocida por pVHL será poliubiquitinada y degradada. En cambio si HIF-1 α es reconocida por otra prolil- hidroxilasa, será hidroxilada en la prolina 402. De esta manera HIF-1 α presenta dos sitios posibles que le permiten ser reconocida y degradada por pVHL. Panel **B**: Cuando descienden los niveles de oxígeno, la hidroxilación de la prolina 402 se inhibe antes que la de la prolina 564. Adaptada de Chan *et al* 2005¹⁴².

En condiciones de hipoxia, la actividad de las prolil-4-hidroxilasas se encuentra reducida ya que requieren al oxígeno como sustrato¹⁴². Se ha demostrado que HIF-1 α no hidroxilada tiene ~1000 veces menos afinidad por el complejo VBC que la HIF-1 α hidroxilada¹¹⁷. En estas condiciones se produce una

acumulación de las subunidades α de HIF que dimerizan con las subunidades β de HIF, aumentando la expresión de genes de respuesta a la hipoxia (**figura 17**).

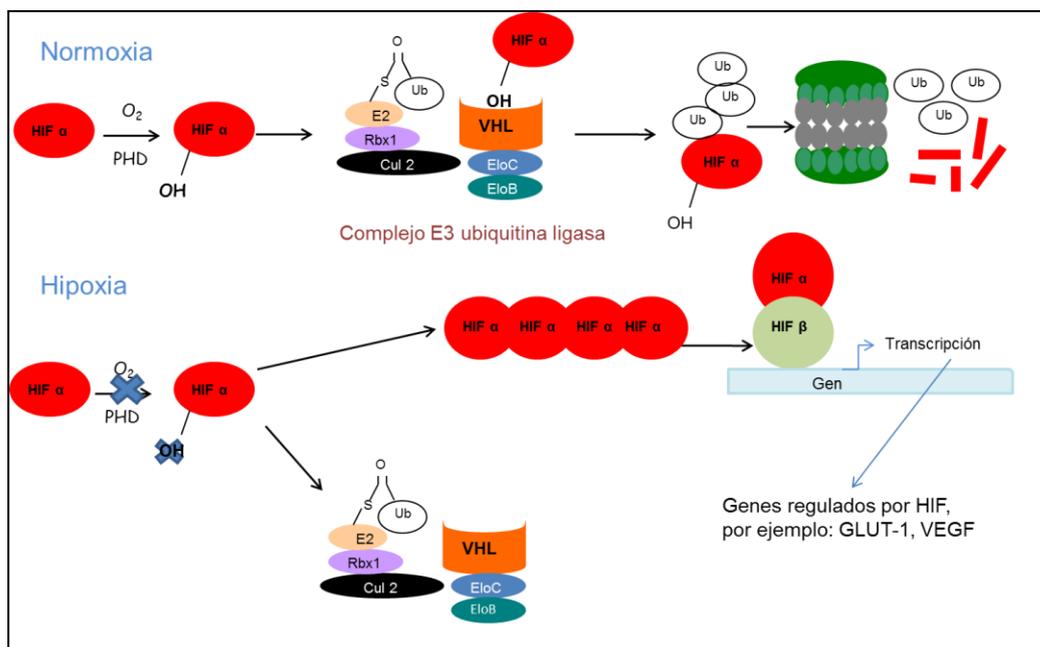


Figura 17-Esquema de la función de pVHL en la regulación de HIF. En condiciones de normoxia (panel superior) pVHL une a HIF- α hidroxilada y esta última es poliubiquitinada y degradada por el proteasoma. En condiciones de hipoxia (panel inferior) HIF- α sin hidroxilar escapa al reconocimiento de pVHL y dimeriza con HIF- β y actúa como factor de transcripción.

Genes regulados por HIF

El factor de transcripción HIF α/β reconoce y une a la secuencia nucleotídica 5'-RCGTG-3' (donde R=purina) de los elementos de respuesta a hipoxia (HRE- del inglés *Hypoxia Response Elements*) localizados en las regiones regulatorias de los genes blanco^{139,142,143}. Como consecuencia de esta unión se transcriben los genes involucrados en el metabolismo, angiogénesis y apoptosis como el VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular por *Vascular Endothelial Growth Factor*), GLUT1 (del inglés *Glucose transporter 1 / transportador de glucosa 1*), PDGF β (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y TGF- α (factor de crecimiento transformante alfa)³¹, entre otros. Este mismo escenario es posible en normoxia si una mutación de pVHL altera la formación del complejo VBC¹² o el reconocimiento de HIF- α .

Funciones HIF independientes

Se ha demostrado que pVHL tiene funciones que son independientes de la regulación de HIF. La mayoría de estas funciones han sido descubiertas mediante interacciones bioquímicas. Estudios de expresión génica han demostrado que también existen cambios en la expresión de diferentes genes (que no dependen de HIF) y que son inducidos por la pérdida del gen *VHL*^{144,145}. A continuación se mencionarán algunas de las funciones HIF independientes.

Regulación de p53

El dominio α de pVHL interactúa con p53¹⁴⁶. Dado que este dominio está involucrado en la unión de la Elonguina C, ésta compite con p53 por este sitio. La interacción entre pVHL y p53 impide la ubiquitinación de p53 mediada por la proteína Mdm2 (del inglés *murine double minute 2*). A su vez pVHL coopera con una serina quinasa y acetiltransferasas estabilizando a p53, que actúa como factor de transcripción induciendo genes que llevan al arresto del ciclo celular y la apoptosis, ante el daño en el ADN^{147,148}. Alteraciones en pVHL podrían atenuar la activación de p53 ante un daño en el ADN. Esta función de pVHL podría relacionarse con la resistencia de los carcinomas renales de células claras (que no expresan pVHL) a los agentes citotóxicos convencionales.

Estabilización de los microtúbulos

Hergovich *et al*¹⁴⁹ han demostrado que pVHL se asocia y estabiliza a los microtúbulos. No es necesario que pVHL forme parte del complejo VBC para cumplir esta función, ya que se observó que mutaciones que disminuyen la formación de este complejo tienen la capacidad de unirse y estabilizar a los microtúbulos de manera similar que la pVHL nativa. Se ha demostrado que los residuos 95-123 de pVHL se encuentran involucrados en esta función.

La desestabilización de los microtúbulos se relaciona con su orientación incorrecta, y lleva a la inestabilidad cromosómica dado que se producen alteraciones en la segregación cromosómica, dando lugar a aneuploidías, promoviendo la formación tumores¹⁵⁰.

Formación de cilias primarias

Las cilias primarias son una estructura especializada en superficie celular que sirve como antena regulando la transducción de señales químicas y mecánicas^{151,152}. El axonema de las cilias primarias está formado por microtúbulos, organizados en 9 dobletes periféricos desde el centriolo. Por lo tanto la dinámica de los microtúbulos y el mantenimiento de las cilias primarias están íntimamente relacionados¹⁴⁴.

Alteraciones de las cilias primarias han sido asociadas con la formación de quistes, los cuales son frecuentes en riñón y páncreas en los pacientes con la enfermedad de VHL^{26,151,153–155}.

Otros blancos de pVHL

Dado que pVHL forma parte de un complejo E3 ubiquitina ligasa, es razonable pensar que este complejo pueda tener otras proteínas blanco además de HIF- α . Se ha demostrado que pVHL media la degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma de la otras proteínas^{156,157}, entre ellas la proteína ERK5 (*Extracellular signal-regulated kinase 5*) también conocida como BMK1 (*big mitogen-activated Protein kinase 1*) involucrada en varios procesos celulares que incluyen a la proliferación y vascularización¹²³.

Fibronectina

El mecanismo HIF independiente más descrito es la interacción de pVHL con fibronectina, la cual fue descrita en el año 1998.

La fibronectina es una glicoproteína extracelular que se une a sus receptores denominados integrinas, ubicados en la superficie celular¹⁵⁸.

Se ha demostrado que pVHL interactúa con fibronectina, y que las células que no expresan pVHL no son capaces de ensamblar una matriz organizada de fibronectina, aunque puedan secretarla^{103,158-160}. La pérdida de la matriz de fibronectina apropiada ha sido reconocida por varios autores como una característica de la transformación celular¹⁶¹⁻¹⁶⁴. La fibronectina tiene la capacidad de disminuir el comportamiento metastásico de las células malignas, aumentando la interacción entre las células tumorales y su microambiente mediada por sus receptores (integrinas)¹⁶⁵. A su vez puede revertir algunos aspectos del fenotipo maligno, incluyendo la proliferación y migración^{164,166}.

La fibronectina inmunoprecipita con pVHL^{101,158,160,167}, pero se desconoce qué región de pVHL media esta interacción. Varios autores coinciden en que todas las variantes de pVHL asociadas a la enfermedad han demostrado una capacidad reducida o indetectable respecto a la unión de fibronectina^{103,144,158}, sugiriendo que la unión a fibronectina contribuye al rol de supresor tumoral de pVHL.

Se ha demostrado que pVHL formando parte del complejo VBC interactúa con fibronectina, y como se mencionó anteriormente en la sección modificaciones post traduccionales, pVHL debe ser NEDDilada, aunque esta modificación es transitoria. Esta NEDDilación puede ocurrir en las lisinas en las posiciones 159, 171 y 196 de pVHL, de las cuales la lisina 159¹⁰¹⁻¹⁰³ es la principal aceptora de NEDD8. Esta NEDDilación actúa como determinante molecular^{101,103} ya que si

pVHL se encuentra NEDDilada, la Culina 2 no se une al complejo VBC. Por lo tanto la NEDDilación es un factor que determinaría la funcionalidad HIF dependiente o HIF independiente de pVHL.

A su vez, en el año 2004 Bluysen *et al*¹⁶⁶ han demostrado que la expresión de ARNm de fibronectina se encuentra regulada por pVHL. Las células que no expresan pVHL presentan menor expresión de ARNm de fibronectina que las que sí expresan pVHL^{166,168}. En la actualidad se desconoce cómo pVHL regula la expresión de fibronectina, si es actuando como factor de transcripción o si ejerce esta función de manera indirecta.

TRATAMIENTO

No existe al día de hoy un tratamiento médico efectivo para la prevención y tratamiento de las manifestaciones clínicas que presentan los individuos afectados, aunque se están utilizando nuevas terapias como se describirá a continuación.

Terapias utilizadas

Los tumores con alteraciones en el gen *VHL* sobreexpresan VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular por *Vascular Endothelial Growth Factor*), PDGF β (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y TGF α (factor de crecimiento transformante alfa). Se utilizan terapias que tienen como blanco a estas moléculas³⁸, pero su efectividad es limitada. Otra estrategia utilizada es bloquear los receptores tirosina quinasa ya que VEGF, PDGF β , TGF α y otros genes blancos de HIF dependen en su actividad para su señalización². Los más utilizados son sunitinib¹⁶⁹⁻¹⁷² y sorafenib¹⁷³.

Los ccRCC representan los tumores sólidos que producen los niveles más altos del factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGFA)¹⁷⁴. Agentes anti-

angiogénicos que unen al VEGFA (por ejemplo: bevacizumab¹⁷⁵⁻¹⁷⁷) o a sus receptores (ejemplo: sunitinib¹⁶⁹⁻¹⁷² y sorafenib¹⁷³) son utilizados para tratar estos tumores, pero los pacientes pueden desarrollar resistencia innata o adaptativa a esta terapia^{33,170}.

Tratamientos locales (oculares) y sistémicos que tienen como blanco al VEGF y al PDGF están siendo utilizados en pacientes con angiomas de retina¹³⁴. Inhibidores del proteasoma como el bortezomib¹⁷⁸ se utilizan actualmente para el tratamiento del mieloma múltiple, y se están llevando a cabo estudios clínicos para su uso en pacientes con carcinoma renal de células claras¹⁷⁹.

Potenciales terapias

Para mutaciones que generan proteínas truncas

La droga Ataluren¹⁸⁰ (también conocida como PTC124 -del inglés *Premature Termination Codon*) se encuentra en la fase III de ensayos clínicos para el tratamiento de la fibrosis quística¹⁸¹. Esta droga se puede potencialmente utilizar para el tratamiento de pacientes con enfermedades que presenten mutaciones sin sentido o con cambio de sentido que generen codones de terminación prematuros. Teóricamente permite “saltar” los codones de terminación prematuros de los ARN mensajeros, permitiendo traducir los ARN mensajeros que codifican para la proteína completa, restaurando la función normal. Todavía existe poca información disponible sobre su uso y eficacia¹⁸²⁻¹⁸⁴.

¿Terapia génica?

Restaurar la función normal de pVHL en células VHL -/- es suficiente para suprimir la habilidad de formar tumores en ratones inmunodeficientes^{38,185}. En los pacientes que padecen VHL la administración de la proteína pVHL nativa o de alguna manera lograr su expresión, en teoría suprimiría la formación de tumores.

Recientemente, el sistema de edición del genoma CRISPR/Cas9 (del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/ CRISPR-associated nuclease 9*) ha comenzado a ser utilizado masivamente. Utilizando el mismo, se ha editado el genoma de ratones^{186,187}, con lo cual no resulta imposible pensar que esto sea factible en humanos en un futuro cercano, y se pueda editar el genoma de los pacientes con mutaciones para revertirlas. Esto resultaría beneficioso para el tratamiento de muchas enfermedades.

OBJETIVOS

MARCO DE REFERENCIA

En nuestro Instituto (Centro de Investigaciones Endocrinológicas “Dr. César Bergadá” -CEDIE- CONICET) se realiza el estudio genético de gen VHL desde el año 2003. Específicamente hasta la realización de este trabajo de tesis, este estudio se basaba sólo en la detección de mutaciones puntuales. Asimismo, existe un grupo de pacientes con sospecha clínica de VHL en los que no se ha detectado ninguna mutación puntual. En ellos se sospecha la presencia de deleciones, no existiendo en ese momento en el país un método para diagnosticar las mismas. Dado que las grandes deleciones son detectadas en un 20-37% de los pacientes estudiados en el mundo, surgió la necesidad de implementar la metodología para detectarlas y poder realizar un diagnóstico certero en los pacientes con sospecha clínica de VHL en los que no se ha detectado ninguna mutación puntual, así como extender el estudio a sus familiares.

A su vez, dentro del estudio de estas mutaciones puntuales se han encontrado un porcentaje de familias con variaciones génicas que segregan con el fenotipo de la enfermedad que no han sido caracterizadas funcionalmente. La presente tesis muestra la caracterización funcional de dichas variantes para evaluar el rol patogénico de éstas en el desarrollo de la enfermedad.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo de tesis doctoral es detectar y caracterizar las alteraciones genéticas de los pacientes con la enfermedad de VHL. La caracterización de las variantes génicas contribuirá al conocimiento y comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad de VHL, lo cual en el futuro podría contribuir al desarrollo de mejores herramientas terapéuticas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Implementar un método de detección de deleciones en el gen VHL, para ofrecer junto a la secuenciación automática, un estudio genético completo y de esta manera responder a la demanda de pacientes con clínica de VHL tipo 1 y 2.
- 2- Realizar la caracterización funcional (*in vitro*, *in vivo*, *in silico*) de variantes génicas detectadas en nuestro centro en pacientes con la enfermedad de von Hippel-Lindau, que no se encuentran actualmente caracterizadas en la literatura, en cuanto a su poder patogénico (HGMD® Professional 2015.2)

Cada objetivo será tratado en un capítulo.

CAPÍTULO 1

Como se mencionó en la introducción, aproximadamente un 30% de los pacientes con VHL poseen deleciones parciales o completas del gen, las cuales se asocian con la enfermedad de VHL tipo 1. Dado que estas deleciones se presentan en heterocigosis en línea germinal, al realizar PCR convencional se amplifica al alelo normal enmascarando una posible deleción del alelo causal de la patología; por este motivo para la detección de deleciones es necesario utilizar técnicas que permitan evidenciar o cuantificar la dosis alélica.

Históricamente, para el estudio de deleciones se utilizó FISH (hibridación fluorescente *in situ*, del inglés Fluorescence *In Situ* Hybridization)⁷⁴, pero esta metodología no permite detectar deleciones parciales. Luego se utilizó el Southern Blot, pero es una técnica muy laboriosa y costosa que requiere gran cantidad de ADN^{5,61,63,65,188}. En los últimos años se han desarrollado técnicas más rápidas y menos laboriosas que el Southern Blot como UPQFM-PCR^{49,64,189,190} (*Universal Primer Quantitative Fluorescent Multiplex PCR*), MLPA^{5,72,191} (*Multiple Ligation-dependent Probe Amplification*/Amplificación múltiple de sondas ligadas), y PCR cuantitativa en tiempo real^{60,61,63}, las cuales han sido utilizadas para la detección de grandes deleciones en nuestro gen de interés así como en otros genes.

Este capítulo responde al primer objetivo de esta tesis que es implementar un método de detección de deleciones en el gen VHL.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

Pacientes

Se incluyeron en este estudio todos los pacientes (n=40) con diagnóstico clínico o sospecha clínica de VHL tipo 1 derivados para estudio genético al Centro de Investigaciones Endocrinológicas “Dr. César Bergadá” (CEDIE), del Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez” desde el año 2003. Los pacientes fueron divididos en dos grupos: aquellos que al momento de la consulta cumplían con el criterio clínico diagnóstico de VHL y aquellos que solo presentaban manifestaciones clínicas asociadas a VHL en forma aislada: hemangioblastoma de Sistema Nervioso Central (SNC), angioma de retina o carcinoma renal de células claras (ccRCC). El primer grupo incluyó 19 pacientes, con edades comprendidas entre 13 y 60 años (mediana: 29 años), 7 de sexo femenino y 12 de sexo masculino. El segundo grupo incluyó 21 pacientes, con edades comprendidas entre 3 y 61 años (mediana: 33 años), 11 de sexo femenino y 10 de sexo masculino. Los pacientes con VHL tipo 2 fueron excluidos de este estudio. La presencia de feocromocitoma fue descartada en todos los pacientes realizando la determinación de adrenalina, noradrenalina y ácido vainillinmandélico en orina de 24 hs.

En base a trabajos previos que indican que el VHL tipo 1 (sin feocromocitoma) es comúnmente causado por deleciones o mutaciones puntuales sin sentido en el gen *VHL*⁶⁹ es que se utilizaron metodologías que permiten la cuantificación de dosis alélica para el estudio de este grupo de pacientes.

Ante el hallazgo de una mutación en el caso índice, se extendió el estudio genético a sus familiares.

El presente proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez”, y se desarrolló de acuerdo a los Principios Éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la Declaración Mundial de

la Asociación Médica de Helsinki. Todos los pacientes o sus tutores legales fueron informados y firmaron un consentimiento o asentimiento según correspondiera, el cual se encuentra archivado en el CEDIE.

Materiales

El listado de los materiales así como la secuencia de los cebadores utilizados se encuentra en el Anexo 1.

Métodos

Extracción de ADN genómico

El ADN genómico fue extraído a partir de linfocitos de sangre periférica utilizando el detergente catiónico CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) y el método previamente descrito por Del Sal *et al*¹⁹².

Cuantificación de ADN

El ADN obtenido fue cuantificado utilizando NanoDrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, ThermoFisher Scientific).

Secuenciación automática

Se realizó la secuenciación automática de los exones 1, 2 y 3 del gen *VHL* en busca de mutaciones puntuales. La secuencia de los cebadores utilizados fue la descrita por Sansó *et al*¹⁹³ y se encuentra en la **tabla A1.1** del Anexo 1. Se amplificaron por PCR los tres exones y las regiones flanqueantes del gen *VHL*. La amplificación fue realizada en un volumen de 50µl conteniendo 1.5 µl de ADN molde, 20 picomoles de cada cebador, 0.2 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), 1.5 mM MgCl₂, 1.25 unidades de ADN polimerasa y 10 µl de buffer 5X (incluido con la ADN polimerasa). Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 1 ciclo de 3 minutos a 95°C, seguido

por 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a temperatura de hibridación correspondiente según el exón, 1 minuto 30 segundos a 72°C, y un ciclo final de 10 minutos a 72°C. Las temperaturas de hibridación utilizadas fueron 64°C, 60°C y 57°C para los exones 1,2 y 3, respectivamente. Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 1.2%, y teñidos con bromuro de etidio para verificar la presencia del fragmento de interés en cada caso. Los productos de PCR fueron purificados utilizando el AccuPrep®PCR Purification Kit y secuenciados utilizando un secuenciador automático ABI 3730xl.

Técnicas para cuantificar dosis alélica

Existen técnicas que permiten cuantificar la dosis alélica entre las que se encuentran UPQFM PCR (*Universal Primer Quantitative Fluorescent Multiplex PCR*), y MLPA (*Multiple Ligation-dependent Probe Amplification*/Amplificación múltiple de sondas ligadas). Ambas consisten en realizar una amplificación por PCR, una electroforesis capilar y posterior cuantificación del pico fluorescente. La diferencia entre ambas técnicas radica en que la UPQFM PCR consiste en amplificar por PCR el ADN del individuo, mientras que para MLPA, se utilizan sondas que hibridan con el ADN genómico, las cuales se ligan y luego amplifican mediante PCR. Por lo tanto con MLPA se amplifican las sondas ligadas (como su nombre lo indica) y con UPQFM PCR se amplifica directamente el ADN genómico. MLPA es considerada el "*gold standard*" para la detección de grandes deleciones. La ventaja de la MLPA respecto a la UPQFM PCR es que relativiza la dosis del gen de interés respecto a doce genes control, mientras que la UPQFM PCR lo realiza con un solo gen (la β globina). La desventaja del MLPA respecto a la UPQFM PCR es el alto costo. Una alternativa para reducir los costos, evitando la compra de un kit comercial, sería mejorar la técnica de UPQFM PCR, incluyendo una mayor cantidad de genes control, adquiriendo una mayor certeza en el

resultado. De esta manera resultaría una técnica tanto accesible como confiable para su implementación en un servicio hospitalario.

PCR multiplex cuantitativa que utiliza cebadores fluorescentes (UPQFM-PCR)

Se realizaron dos PCR consecutivas para amplificar los tres exones de VHL y un fragmento del gen de la β globina (control interno) como lo describieron Cybulski *et al*⁴⁹. La β globina se utiliza ya que es un gen que se expresa constitutivamente en todos los individuos y permite detectar las variaciones de expresión en cada uno de ellos. Brevemente, se utilizaron 100 ng de ADN genómico como molde para la primer PCR. La segunda PCR fue realizada en un volumen final de 50 μ l, utilizando 4 μ l del producto de la primer PCR como molde. El cebador antisentido de la segunda PCR está marcado en su extremo 5' con el colorante fluorescente 6-FAM (6-carboxifluoresceína), por lo tanto todos los productos de PCR obtenidos contienen este colorante fluorescente. La ventaja de utilizar los cebadores universales, es que se requiere un solo cebador fluorescente, en lugar de uno por cada fragmento amplificado, reduciendo así el costo de esta metodología. El diseño de esta metodología se muestra en la **figura**

18.

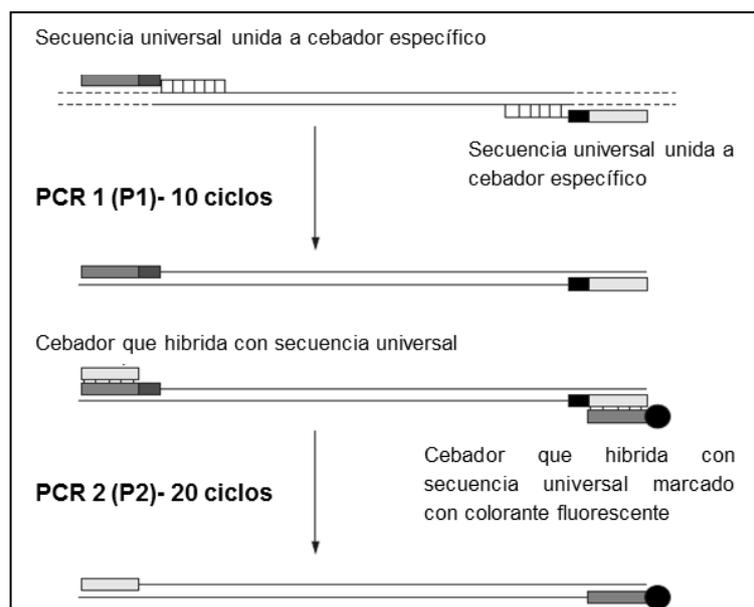


Figura 18- Esquema de la UPQFM PCR. Adaptada de Heath *et al*, 2000¹⁸⁹.

Los cebadores y las condiciones de ciclado utilizadas para ambas PCR fueron las descritas previamente por Cybulski *et al*⁴⁹ y se muestran en las **tablas A1.2 y A1.3** del Anexo 1. Los productos de PCR obtenidos fueron separados de acuerdo a su longitud por electroforesis capilar utilizando un secuenciador ABI 3730xl, y el GeneScan® Analysis Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para analizar los resultados. La detección de grandes deleciones se basó en la comparación de la altura del pico de fluorescencia obtenido para los exones de VHL y el gen de la β globina utilizando el Peak Scanner™ Software v1.0, como se muestra en la **figura 19**.

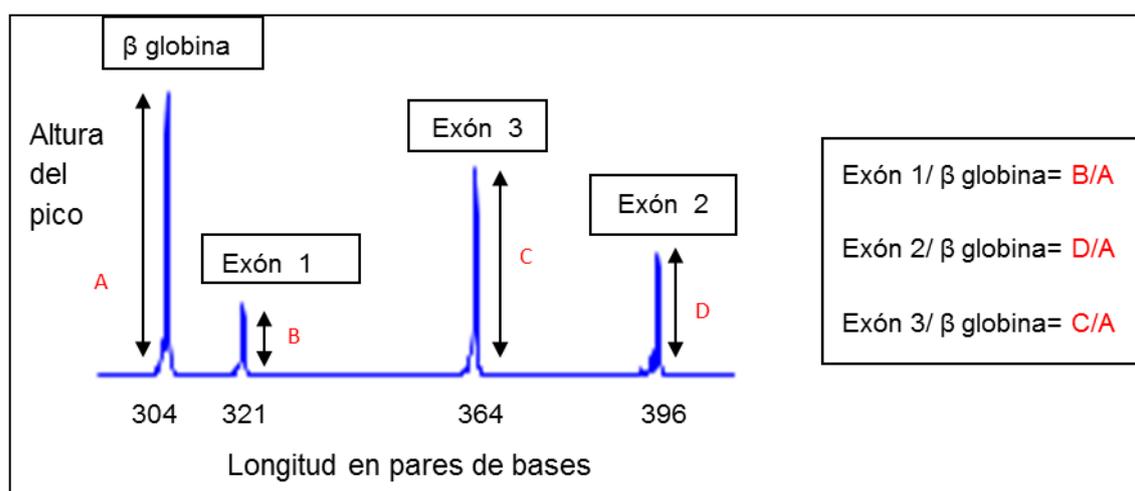


Figura 19- Imagen generada con el Peak Scanner de un control negativo. El análisis estadístico de los datos se realizó calculando la relación entre la altura del pico de cada exón y la β globina.

Para poner a punto esta metodología, se utilizaron muestras de 26 individuos controles y se calcularon las relaciones entre el pico obtenido para cada exón y el gen de la β globina y se determinó un rango normal para cada uno (siendo este el promedio \pm 2 desvíos estándar). A modo de ejemplo se muestra la **tabla 5**. Las mismas relaciones fueron calculadas para cada uno de los pacientes. La presencia de una deleción en estado heterocigota fue determinada cuando la relación era inferior-y aproximadamente la mitad- que el rango de los controles.

También se procesaron 10 muestras de pacientes con grandes deleciones confirmadas del gen VHL como controles positivos, que fueron gentilmente cedidas por el Prof. Dr. Hartmut Neumann (Universidad de Freiburg, Alemania). Se incluyeron controles positivos y negativos en cada corrida.

Tabla 5- Relación entre la altura del pico del exón 1 (E1), exón 2 (E2) y exón 3 (E3) de VHL en relación a la β globina (β glob)

	Controles					Promedio	Rango(promedio \pm 2SD)
	1	2	3	4	5		
E1/ β glob	0,26	0,26	0,25	0,28	0,31	0,27	0,23-0,31
E2/ β glob	0,58	0,43	0,44	0,37	0,36	0,43	0,35-0,51
E3/ β glob	0,71	0,74	0,73	0,71	0,75	0,73	0,70-0,76

A modo de ejemplo se muestran electroferogramas obtenidos (**figura 20**), en los que se puede observar la clara disminución de la señal fluorescente en los controles positivos respecto al promedio de los controles negativos, verificando así las deleciones.

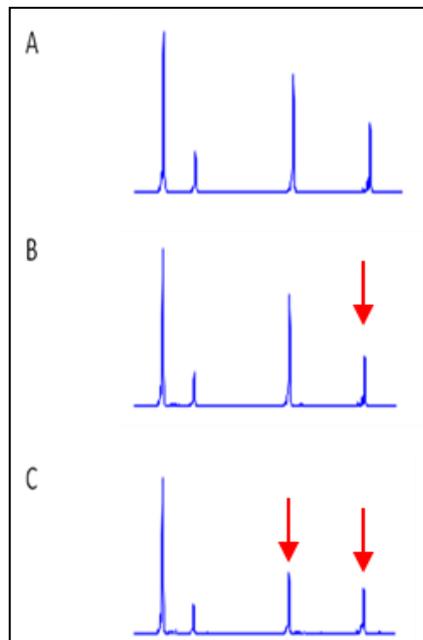


Figura 20-Electroferogramas obtenidos en: A) Control negativo. B) Control positivo de deleción del exón 2. C) Control positivo de deleción de los exones 2 y 3. Las flechas indican la disminución de la altura del pico, que reflejan la presencia de deleción.

Dado que por esta metodología se amplifican los exones del gen directamente, se pueden detectar pequeñas inserciones y deleciones. En estos casos el alelo que posee una pequeñas inserción o deleción será observado en el electroferograma como otro producto de PCR, con un tamaño mayor o menor al esperado para ese exón según el caso.

Amplificación múltiple de sondas ligadas (MLPA)

En esta técnica el ADN genómico es hibridado con un grupo de sondas específicas para los genes de interés. Cada sonda es bipartita. Una de las mitades es específica de la secuencia molde y contiene además una secuencia complementaria a un cebador universal. La otra mitad contiene la región específica de la secuencia molde, una secuencia complementaria a un cebador universal y una secuencia de largo predefinido (*stuffer*). Las sondas son ligadas y amplificadas por PCR. Sólo cuando ambas sondas adyacentes están hibridadas se pueden ligar (**figura 21**, paso 1). La secuencia *stuffer* permite generar amplicones de diferentes tamaños, permitiendo la resolución electroforética de los productos. Las sondas se encuentran marcadas con compuestos fluorescentes y la intensidad de la señal medida será proporcional al número de copias del ADN molde. Las sondas no ligadas sólo poseen un cebador por lo tanto no serán amplificadas por la PCR y no generan señal fluorescente, como consecuencia no es necesario separar las sondas ligadas de las no ligadas, facilitando el método. Si una muestra posee una deleción la sonda no hibridará en esa región. La señal obtenida en el caso de una deleción heterocigota será la mitad de la esperada, mientras que si es homocigota, se verá una ausencia de señal. El esquema de la MLPA se muestra en la **figura 21**.

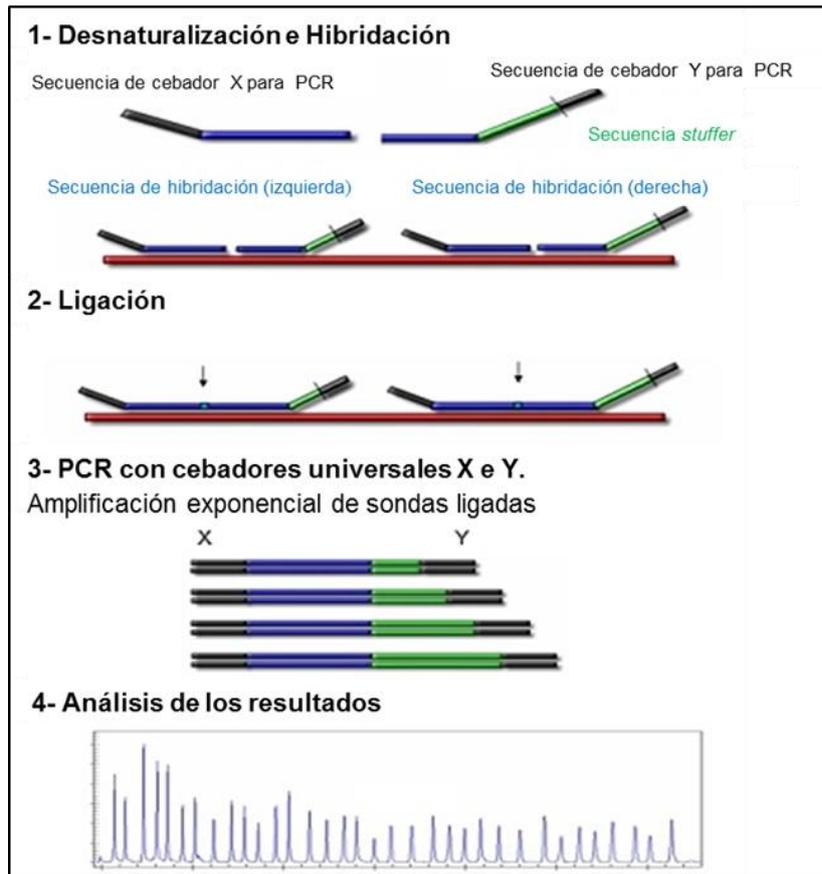


Figura 21- Esquema de MLPA. Esta técnica se divide en cinco pasos:1)Desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas, 2) Reacción de ligación,3) PCR, 4) Separación por electroforesis capilar de los productos,5) Análisis de los resultados. Adaptada del sitio web de MRC-Holland.

Se utilizó el kit SALSA MLPA KIT P016-C2 VHL (MRC Holland, Amsterdam, Holanda) el cual posee nueve sondas para el gen *VHL* (cuatro para el exón 1, tres para el exón 2 y dos para el exón 3), así como seis sondas para genes localizados cerca de *VHL* (*FANCD2*, *C3orf10/HSPC300*, *IRAK2* y *GHRL*) y dos sondas que se ubican en el centro y en el extremo del brazo corto del cromosoma 3 (3p). Además posee doce sondas de referencia que hibridan en otros cromosomas. En total el kit utiliza veintinueve sondas (detalladas en **tabla A1.4** del Anexo 1). Adicionalmente posee sondas de control interno para verificar la cantidad de ADN, la desnaturalización del mismo y el sexo del paciente.

Para la reacción, se partió de 1µl de molde de ADN genómico en una concentración de 100 ng/µl, el cual fue desnaturalizado e hibridado con 3,0 µl de la mezcla de sondas e incubado por 16 hs. Luego las sondas bipartitas fueron

ligadas agregándose 3 μ l el tampón (buffer) de ligación A, 3 μ l el tampón (buffer) de ligación B, 25 μ l de dH₂O y 1 μ l de enzima ligasa. Posteriormente fueron amplificadas por una PCR con los cebadores universales SALSA FAM PCR en el termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de reacción utilizadas para cada una de las etapas de MLPA están descritas en la **figura A1.2** del Anexo 1.

Las sondas utilizadas se encuentran marcadas con el colorante fluorescente 6-FAM y los productos obtenidos fueron separados por electroforesis capilar utilizando capilar utilizando un secuenciador ABI 3730xl, el marcador de peso molecular GeneScan™ -500 ROX™ STANDARD (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y el GeneScan® Analysis Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para analizar los resultados. Se utilizó el Peak Scanner™ Software v1.0 para visualizar y obtener las alturas de los picos de fluorescencia de los productos. El análisis de los datos fue realizado utilizando el Coffalyser.Net Software (MRC Holland, Amsterdam, Holanda), la altura de los picos de los pacientes fueron comparadas con la media de la altura de los picos de tres individuos controles. Un cociente de dosis de 0.7-1.3 fue considerado normal y un valor por debajo de 0.7 fue considerado como delección. En cada corrida se incluyeron 3 muestras de individuos controles para determinar la dosis normal.

A modo de ejemplo se puede ver en la **figura 22** los perfiles de dosis (“*DNA dosage profiles*”) de ADN. La dosis obtenida de cada sonda en cada paciente fue obtenida comparando cada uno de ellos con tres individuos controles normales.

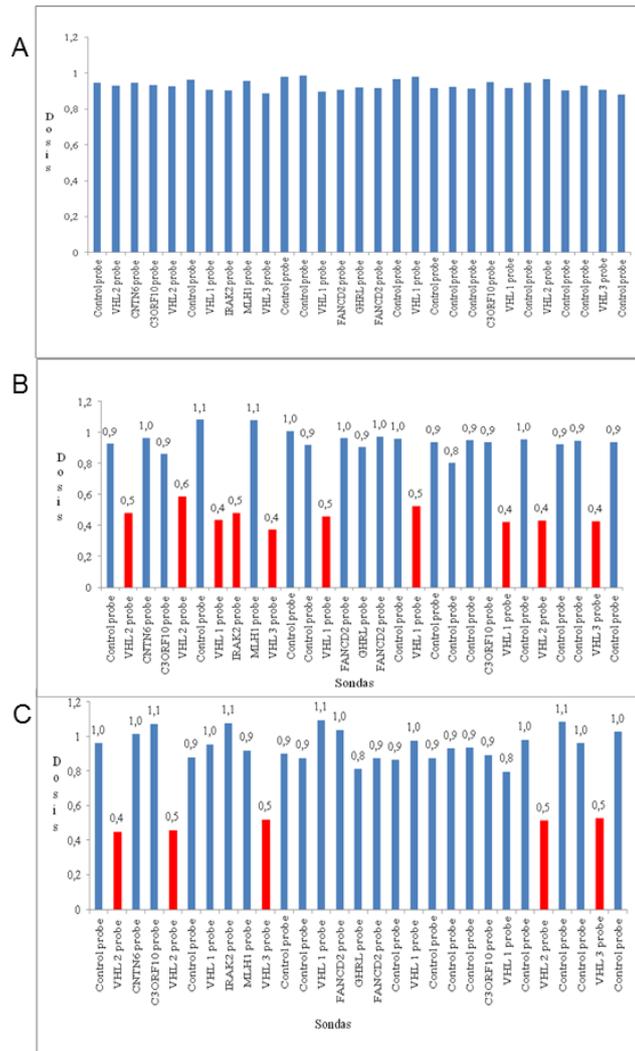


Figura 22- Perfiles de dosis para: A) Individuo control B) Control de delección de exón 1, 2,3 del gen *VHL* e *IRAK 2*. C) Control con delección de exones 2 y 3. En azul las sondas amplificadas con dosis alélica superior a 0.7 y menor a 1.3, en rojo se marcan las sondas amplificadas cuya dosis alélica es inferior a 0.7 e indica delección.

Análisis de datos

Tanto para analizar los resultados de UPQFM-PCR como de MLPA se utilizó el Peak Scanner™ Software v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

RESULTADOS

La **tabla 6** detalla las características de los 40 pacientes estudiados. Diecinueve pacientes cumplieron con el criterio clínico diagnóstico de VHL tipo 1, de los cuales 7 además tienen historia familiar de la enfermedad de von Hippel-Lindau. El hemangioblastoma de SNC fue la principal manifestación en estos pacientes, seguida por el angioma de retina y las alteraciones en riñón (quistes y ccRCC). Detectamos mutaciones de *VHL* en línea germinal en 16/19 (84.2%) de estos pacientes. La secuenciación automática de los tres exones de *VHL* permitió la detección de 12/16, y las mutaciones halladas fueron: sin sentido (6/12), *frameshift* (cambio en el marco de lectura) (4/12), *missense* (con cambio de sentido) (1/12) y de *splicing* (1/12). De éstas, tres resultaron ser nuevas, no descritas previamente en la literatura: una es una duplicación de 1 pb (c.217dupC, p.Q73Pfs*59, paciente #10), otra es una duplicación de 53 pb (c.343_395dup, p.Q132Hfs*45, paciente #7) y otra una pequeña delección de 14 pb (c.219_232delGGTCATCTTCTGCA, p.V74Sfs*53, paciente #12). Estos nuevos hallazgos también fueron visualizados por UPQFM-PCR (ya que al ser duplicaciones y delecciones el alelo mutado presentó un producto de PCR de longitud diferente y consistente con los hallazgos por secuenciación automática). El paciente #12 que pertenece al grupo de los pacientes que cumple con el criterio clínico diagnóstico de VHL tipo 1, quien presentó Hb de SNC, angioma de retina, quistes renales y de epidídimo, posee una mutación *de novo*, ya que sus padres no la portan. Hasta la fecha no hemos tenido la posibilidad de estudiar a los padres ni otros familiares de los pacientes #7 y #10 (por lo cual en ninguno de los tres casos pudimos confirmar que la mutación se hereda con el fenotipo de la enfermedad). En los restantes 4/16 pacientes se detectaron grandes delecciones utilizando las técnicas UPQFM-PCR y MLPA. No se encontró ninguna alteración

de *VHL* en los restantes 3/19 pacientes con diagnóstico clínico de *VHL*, uno de ellos con antecedentes familiares de la enfermedad.

En el grupo de pacientes que no cumplieron con el criterio diagnóstico clínico de *VHL* (n=21), detectamos una mutación sin sentido mediante secuenciación automática en una paciente (#22) -que no tiene antecedentes familiares de la enfermedad- y presentó un único Hb de SNC a los 13 años de edad.

Tabla 6- Características de los pacientes estudiados. La tabla muestra los pacientes en orden creciente de edad de diagnóstico dentro de dos grupos: aquellos que cumplen el criterio clínico diagnóstico de VHL tipo 1 (pacientes #1 a #19) y aquellos que no cumplen (pacientes #20 a #40).

Paciente	Edad diag	Cumple criterio clínico VHL tipo 1 (SI/NO)	Antecedentes familiares (SI/NO)	Manifestaciones clínicas				Resultado mutaciones VHL en línea germinal
				Hb SNC / AR	ccrCC o rCy	pCy	Otras	
1	13	SI	NO	x			x	c.481C>T, p.R161*
2	19	SI	NO	x	x		x	DEL 2-3
3	20	SI	NO	x	x		x	c.481C>T, p.R161*
4	21	SI	NO	x	x		x	c.481C>T, p.R161*
5	21	SI	SI	x	x		x	c.430G>T, p.G144*
6	22	SI	SI	x	x		x	c.486C>G, p.C162W
7	22	SI	NO	x	x			c.343_395dup, p.Q132Hfs*45
8	23	SI	NO	x	x		x	negativo
9	25	SI	NO	x	x		x	c.481C>T, p.R161*
10	29	SI	NO	x	x			c.217dupC, p.Q73Pfs*59
11	30	SI	NO	x	x			c.263G>A, p.W88*
12	32	SI	NO	x	x		x	c.219_232delGGTCATCTCTGCA, p.V74Sfs*53
13	34	SI	NO	x	x			c.463+1G>A
14	34	SI	NO	x				negativo
15	34	SI	SI		x		x	DEL3
16	41	SI	SI	x	x		x	DEL 2-3
17	44	SI	SI	x	x			negativo
18	57	SI	SI	x	x			c.361delG, p.D121Mfs*38
19	60	SI	SI	x	x			DEL 2-3
20	3	NO	NO	x				negativo
21	12	NO	NO	x				negativo
22	13	NO	NO	x				c.264G>A, p.W88*
23	14	NO	NO	x				negativo
24	14	NO	NO	x				negativo
25	20	NO	NO	x				negativo
26	23	NO	NO	x				negativo
27	24	NO	NO	x				negativo
28	26	NO	NO		x			negativo
29	28	NO	NO	x				negativo
30	33	NO	NO	x				negativo
31	34	NO	NO		x		x	negativo
32	37	NO	NO		x			negativo
33	40	NO	NO	x				negativo
34	46	NO	NO	x				negativo
35	48	NO	NO	x				negativo
36	50	NO	NO	x				negativo
37	54	NO	NO		x			negativo
38	54	NO	NO	x				negativo
39	55	NO	NO	x				negativo
40	61	NO	NO	x				negativo

La secuencia de VHL de referencia utilizada es la de NM_000551.3 del NCBI. Abreviaturas: diag: diagnóstico, Hb SNC: hemangioblastoma del Sistema Nervioso Central, AR: angioma de retina, ccrCC: carcinoma renal de células claras, Cy: quistes, pCy: pancreáticos, rCy: renales.

La **tabla 7** muestra el fenotipo de todos los pacientes que presentaron una mutación del gen VHL (n=17). Dieciséis (94%) presentaron hemangioblastoma de SNC y/o angioma de retina. Respecto a la primera manifestación de la enfermedad (celdas resaltadas): 12 pacientes (70%, mediana de edad: 23) presentaron Hb de SNC. Uno de ellos presentó además angioma de retina. En los restantes cuatro, las primeras manifestaciones fueron: angioma de retina bilateral (n=1), quistes de epidídimo (n=2: al nacimiento y a los 23 años) y tumor de saco endolinfático a los 13 años de edad (n=1), Tres pacientes presentaron múltiples manifestaciones a las edades de 21, 30 y 34.

Tabla 7-Fenotipo de los pacientes con mutaciones de VHL.

Paciente	Cumple criterio clínico VHL tipo 1 (SI/NO)	Antecedentes familiares (SI/NO)	Manifestaciones clínicas							
			Hb SNC	AR	ccRCC	pCy	rCy	eCy	ELST	
1	SI	NO		16						13
2	SI	NO	19,25,26		29	25	25	31		
3	SI	NO	20,25,26		27	25	25	25		
4	SI	NO	22	21		23		nacimiento		
5	SI	SI	21,26,31	21		21	21			
6	SI	SI	22	22		29	29			
7	SI	NO		22 (2)			23			
9	SI	NO	22		22	22	22			
10	SI	NO	29		30		30			
11	SI	NO	30	30		30	30			
12	SI	NO	32	32			32	23		
13	SI	NO	34				34			
15	SI	SI			34	34	34			34
16	SI	SI	41	46	46	46				
18	SI	SI	24,34,35,43,50,56	35	41,52					
19	SI	SI	32,57			32				
22	NO	NO	13							

Los números indican la edad en años en la cual el paciente presentó la manifestación. Las celdas resaltadas indican la primer manifestación de la enfermedad. Abreviaturas: Hb SNC: hemangioblastoma del Sistema Nervioso Central, AR: angioma de retina, ccRCC: carcinoma renal de células claras, Cy: quistes, pCy: pancreáticos, rCy: renales, eCy: epididimarios, ELST: tumor del saco endolinfático. (2): bilateral.

Dieciséis pacientes presentaron otras manifestaciones de la enfermedad entre 1 a 9 años después de la primera (**tabla 7**) en edades de entre 16 y 46. Cinco pacientes tuvieron recidiva de Hb de SNC, pasados 5 años del primer tumor. Uno de éstos pacientes murió luego de su tercera operación de Hb de SNC. La paciente que presentó hemangioblastoma como la única manifestación de la enfermedad a los 13 años de edad (paciente #22) es la única que no presentó otra manifestación de la enfermedad en los 5 años de su seguimiento.

El estudio de los casos índice permitió el estudio genético de 39 familiares pertenecientes a 11 familias (**tabla 8**). Ocho de ellos presentan mutaciones de *VHL*: tres con clínica de *VHL*, tres en los cuales la manifestación fue inadvertida por ellos y dos portadores asintomáticos de 59 y 7 años de edad.

Tabla 8- Familiares estudiados.

Paciente	Número de familiares		
	estudiados	portadores	afectados
1	5	0	0
2	1	0	0
3	3	1	1
4	4	0	0
5	4	2	1, 1*
6	7	1	1, 3*
7	NE	-	-
9	2	0	0
10	NE	-	-
11	NE	-	-
12	2	0	0
13	NE	-	-
15	1	0	1*
16	NE	-	-
18	0	0	5*
19	9	4	3, 1*
22	1	0	0

* indica a los afectados que murieron sin el estudio genético, NE: no estudiados.

Además otros 11 familiares murieron a causa de clínica relacionada con la enfermedad de VHL (edades comprendidas entre 28 y 66), antes de que se pudiera realizar el estudio genético.

DISCUSIÓN

El presente trabajo permitió la detección de mutaciones de VHL en línea germinal en 84.2% de los pacientes que cumplieron con el criterio clínico diagnóstico de VHL tipo 1 y en un paciente con un único hemangioblastoma, sin antecedentes familiares de la enfermedad.

Nuestros resultados están en concordancia con la relación genotipo-fenotipo reportada por otros autores, ya que la mayoría de nuestros pacientes presentó grandes deleciones y mutaciones sin sentido o que alteran el marco abierto de lectura (*frameshift*). La única excepción es la paciente #6 quien posee la mutación con cambio de sentido (*missense*) p.C162W que fue descrita previamente en pacientes con VHL tipo 2^{15,25,194}. Aunque la asociación entre una mutación con cambio de sentido y VHL tipo 1 no es frecuente, otros autores también han encontrado esta mutación asociada con VHL tipo 1¹⁹⁴. La clasificación de la paciente #6 como VHL tipo 1 está basada en la ausencia de feocromocitoma/paraganglioma (feo/pgl) luego de 14 años de seguimiento. A su vez, 3 familiares de primer grado de esta paciente murieron a edades comprendidas entre 39 y 51 años como consecuencia de tumores relacionados a la enfermedad, sin registro de feo/pgl, apoyando la clasificación de esta familia como VHL tipo 1.

La mutación que altera el sitio de *splicing* encontrada en el paciente #13 así como la mutación *frameshift* que presenta el paciente #18 han sido descritas previamente y asociadas solamente con VHL tipo 1^{58,88}.

Las mutaciones p.R161*, p.G144* y p.W88* han sido reportadas y asociadas con VHL tipo 1^{15,25,49,64,72,195,196}.

Se detectaron tres variantes nuevas (no listadas en la base de datos HGMD® Human Gene Mutation Database) en pacientes sin antecedentes familiares de la enfermedad, las tres producen un corrimiento del marco abierto de

lectura, lo cual resulta en un codón de terminación prematuro. El paciente #12 presenta una mutación *de novo* y no tiene descendientes. Hasta la actualidad no hemos podido estudiar a los padres o familiares cercanos de los pacientes #7 y #10 (por lo cual en ninguno de los tres casos pudimos confirmar que la mutación se hereda con el fenotipo de la enfermedad). Diversas mutaciones han sido descritas cerca de estas tres regiones por otros grupos de investigación ^{3,5,25,49,58,72,113,194,197}, sugiriendo que podrían ser regiones inestables del gen, susceptibles a mutaciones. De acuerdo a los estándares y guías del American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)¹⁹⁸, se considera que estas tres variantes nuevas tienen evidencia fuerte de patogenicidad. Estas nuevas variantes serán objeto de caracterización funcional en un futuro cercano.

No detectamos ninguna alteración en tres de los diecinueve pacientes con diagnóstico clínico de la enfermedad de VHL. Otros autores han reportado observaciones similares ^{60,72}. Se ha descrito que alrededor de 5% de los pacientes con VHL presentan mosaicismos^{70,75,76}. Recientemente, Coppin *et al*⁷⁵ han encontrado mutaciones de *VHL* utilizando NGS (*next-generation sequencing*) en pacientes que no presentaban alteraciones al ser estudiados por las técnicas convencionales (PCR y secuenciación automática, UPQFM-PCR, MLPA) . En este artículo los autores describen dos pacientes con mosaicismo en los que solamente 5.7 y 1.7% de sus linfocitos de sangre periférica portan la mutación. Esta baja proporción es indetectable por los métodos convencionales utilizados en este trabajo¹⁹⁹. Por lo tanto, una posible explicación sería que nuestros pacientes presenten mosaicismos con una baja frecuencia en sangre periférica, como los reportados por estos autores ⁷⁵, o que este fenotipo se deba a alteraciones en otro gen no descrito aún.

Algunos autores consideran que la enfermedad de VHL está subestimada ya que los tumores que se desarrollan en el contexto de la enfermedad también se desarrollan esporádicamente³⁸. En el caso de los hemangioblastomas, 10-40% de ellos se asocian con VHL^{20,21} y frecuentemente son la primera manifestación de la enfermedad. La prevalencia de la enfermedad de VHL en pacientes con angiomas de retina es de 30-58%²⁴, y actualmente se recomienda que los pacientes con esta patología se realicen el estudio genético de VHL. La alta proporción de mutaciones *de novo* de *VHL* apoya la importancia de realizar el estudio genético en pacientes que presentan manifestaciones de la enfermedad sin antecedentes familiares de la misma⁷². En nuestro grupo de pacientes que no cumplen con el criterio clínico de diagnóstico, 13 de ellos presentaron hemangioblastoma de SNC. En este grupo detectamos una mutación de *VHL* en 1 paciente (4.8 %) que presentó hemangioblastoma a los 13 años de edad. En un estudio colaborativo entre varios centros, Hes *et al*²¹ estudiaron la frecuencia de mutaciones de *VHL* en un gran grupo de pacientes que presentaron hemangioblastomas aparentemente esporádicos y encontraron que aproximadamente 4% de éstos pacientes menores de 50 años de edad eran portadores de mutaciones de *VHL* en línea germinal. Estos hallazgos destacan la importancia de realizar el estudio genético para detectar alteraciones de VHL en todos los pacientes menores de 50 años de edad que presenten hemangioblastoma.

En resumen, nuestros resultados destacan la importancia de realizar el estudio genético completo del gen de la enfermedad de von Hippel-Lindau para la confirmación de enfermedad de VHL tipo 1, no sólo en pacientes con diagnóstico clínico de la misma, sino también en pacientes que presentan una única manifestación típica de la enfermedad, permitiendo su diagnóstico y seguimiento

apropiados. Se recomienda el estudio genético en pacientes con hemangioblastoma en edades tempranas. La detección de los casos índice permite extender el estudio a sus familiares y diagnosticar la enfermedad en miembros que no sospechaban estar afectados.

CAPÍTULO 2

Este capítulo responde al segundo objetivo de esta tesis que es realizar la caracterización funcional (*in vitro*, *in vivo*, *in silico*) de dos variantes génicas detectadas en nuestro Centro en pacientes con la enfermedad de von Hippel-Lindau, que no se encuentran actualmente caracterizadas en la literatura en cuanto a su poder patogénico (HGMD® Professional 2015.2).

Los estudios genéticos de VHL se realizan desde el año 2003. En estos años en nuestro Centro, se han identificado nuevas variantes del gen, las cuales no se encuentran disponibles en las bases de datos. Existiendo 7 variantes posibles para estudiar al momento del inicio de esta tesis, se eligieron dos: P138R (CCA→CGA) y L163R (CTC→CGC). La variante P138R fue comunicada (estudiada sólo en tejido tumoral) por Gnarra *et al*²⁰⁰ en el año 1994 y la variante L163R fue comunicada por Sansó *et al*¹⁹³ de nuestro Instituto, en el año 2004 (estudiada en línea germinal), ambas sin su caracterización funcional. Las variantes en cuestión implican el cambio de Prolina y Leucina (ambos aminoácidos con cadena lateral no polar) por Arginina que posee cadena lateral básica. Tanto la Prolina 138 como la Leucina 163 están muy conservadas en muchas especies (**figura 23**).

La variante P138R se presentó en una paciente de sexo femenino que presentó feocromocitoma, quistes hepáticos, pancreáticos y renales a los 16 años de edad (VHL tipo 2B). La variante L163R se presentó en un paciente de sexo masculino que presentó feocromocitoma y paraganglioma a los 11 años de edad (VHL tipo 2C).

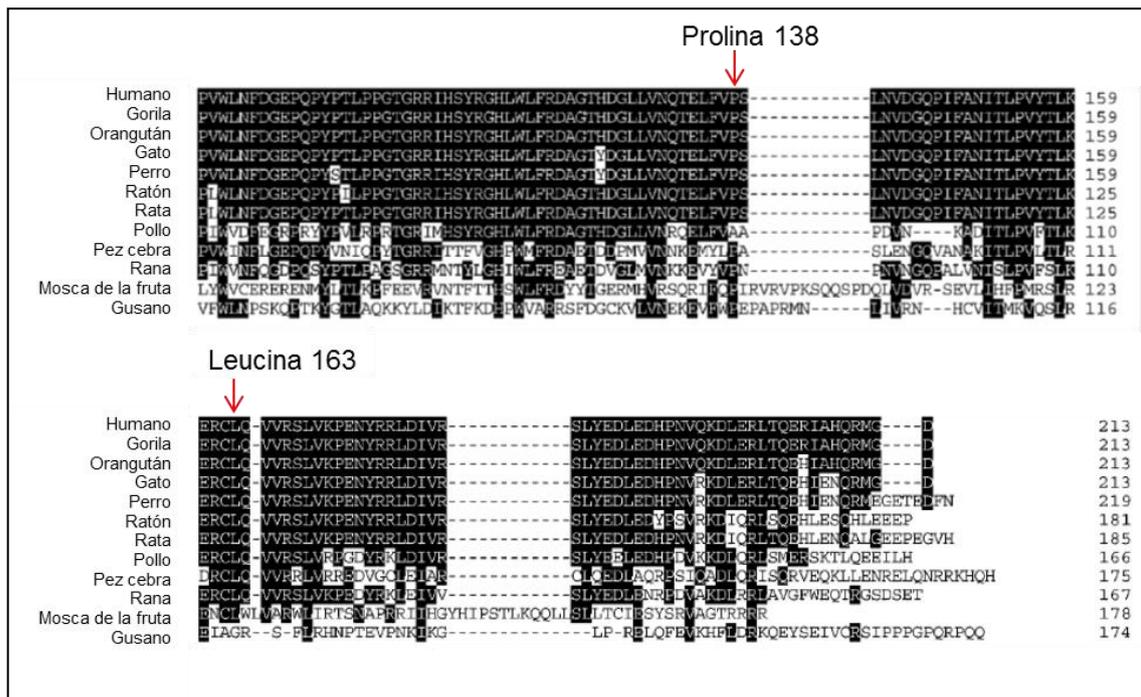


Figura 23- Conservación de los residuos Prolina 138 y Leucina 163 en las distintas especies. Adaptada de Nordstrom- O'Brien *et al*, 2010⁵⁹.

Seleccionamos estas dos variantes ya que se encuentran codificadas por distintos exones del gen, y forman parte de distintos dominios de la proteína: la Prolina 138 se ubica en el dominio β que se encuentra involucrado en la unión a HIF α mientras que la Leucina 163 se encuentra en el dominio α de la proteína, involucrado en la unión a Elonguinas B y C (figura 24)

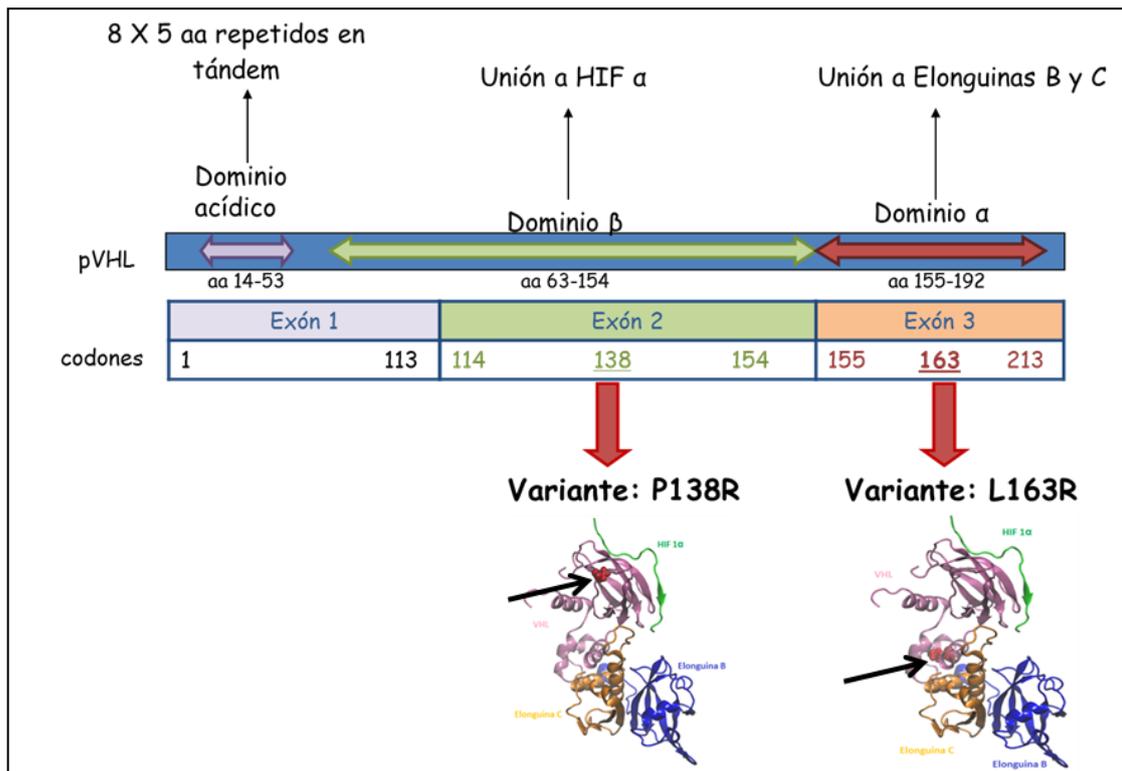


Figura 24- Localización de las variantes de estudio. El esquema de abajo muestra la estructura cristalográfica del complejo VBC-HIF-1 α , marcando en rojo al residuo mutado en cada caso, señalado con una flecha negra. aa: aminoácido.

Para estudiar las nuevas variantes de VHL, se utilizó la línea celular humana 786-0 (ATCC® CRL-1932™). Esta línea celular deriva de un tumor primario de células claras renales. Ha sido caracterizada ampliamente en la literatura^{145,200–204} y utilizada como modelo para estudiar el gen *VHL*. Esta línea celular tiene la particularidad de no expresar una pVHL funcional ya que contiene un solo alelo de *VHL*, el cual posee una mutación que produce un cambio en el marco de lectura (*frameshift*) en el codón 104¹⁴⁵. Además esta línea celular no expresa HIF-1 α pero si constitutivamente HIF-2 α ^{126,203}. La figura 25 resume las características de esta línea celular.

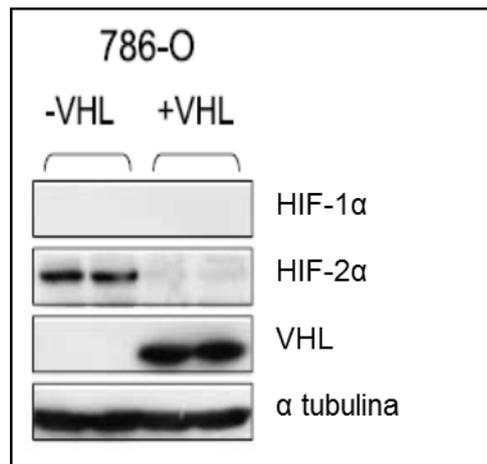


Figura 25- Características de la línea celular 786-0 (VHL -/-) y al introducirle pVHL, (calles de la derecha). Adaptada de Carroll *et al*, 2006²⁰³.

Debido a la falta de efectividad de los métodos convencionales de transfección en esta línea celular, recurrimos a la utilización de retrovirus para lograr incorporar el ADN mediante infección viral. De este modo se generaron las líneas celulares que expresan de manera estable la proteína VHL nativa y las variantes de interés.

Como se trabajó con una línea celular humana, para los experimentos *in vivo* se utilizó un modelo de xenotransplante en ratones inmunodeficientes. Utilizando este modelo, se ha demostrado que en ausencia de VHL funcional las células 786-0 tienen la capacidad de crecer y formar tumores subcutáneos, mientras que si se restaura la función de pVHL en estas células, las mismas pierden su capacidad de formar tumores^{86,160,202,205}.

Las herramientas bioinformáticas disponibles gratuitamente en internet que predicen la consecuencia de variantes (Polyphen-2²⁰⁶, SIFT²⁰⁷⁻²¹¹, Mutation Taster^{212,213}, MutPred²¹⁴, I-Mutant 3²¹⁵, Phd-SNP²¹⁶ y SNPs&GO²¹⁷) sugieren que son patogénicas.

Asimismo, ambas variantes segregan con el fenotipo de la enfermedad, como se puede apreciar en los árboles genealógicos:

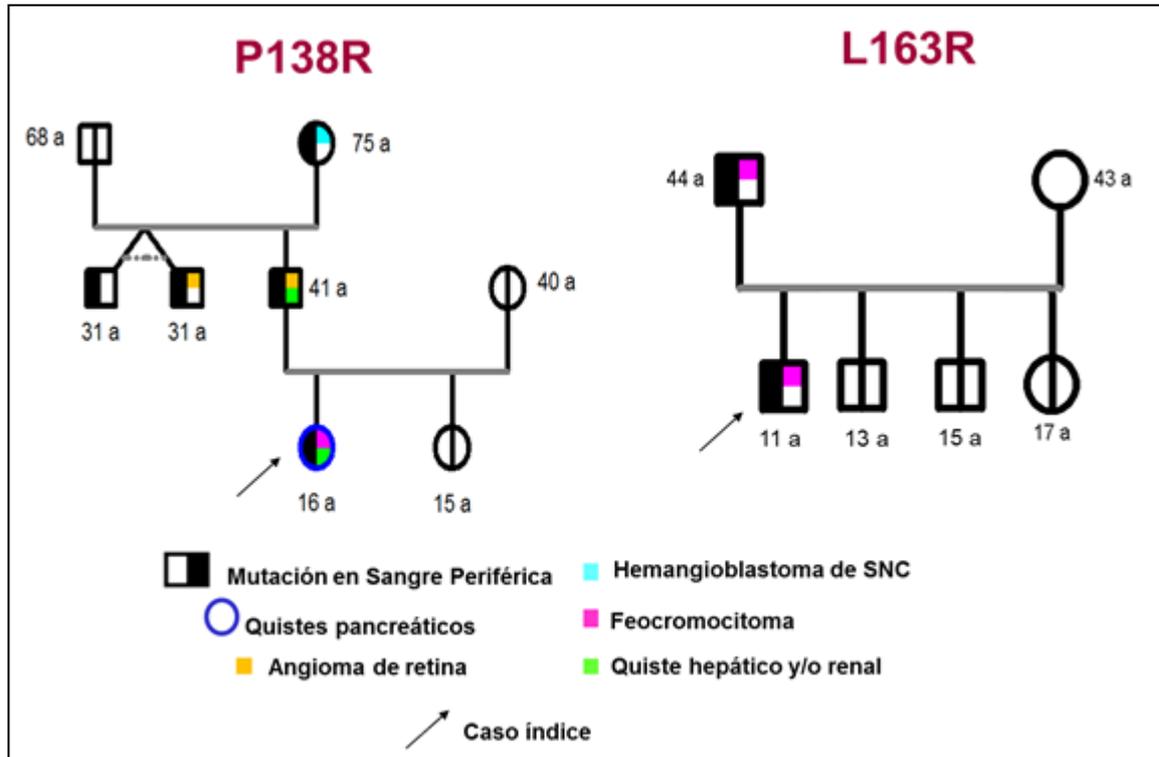


Figura 26-Árboles genealógicos de las familias que poseen las variantes de interés. a: indica la cantidad de años de edad al momento del diagnóstico genético.

Dado que las nuevas variantes del gen VHL (P138R y L163R) no han sido caracterizadas funcionalmente, nos referiremos a ellas como variantes en esta tesis, ya que el término mutante si bien sería correcto porque ambas son mutaciones, induce a pensar que se ha demostrado la patogénesis.

Este capítulo se divide en 2 secciones: la primera incluye los estudios *in vitro* e *in vivo* y la segunda los estudios *in silico*.

Sección 1: Estudios

in vitro e in vivo

MATERIALES

Y

MÉTODOS

Materiales

El listado de los materiales así como la secuencia de los cebadores utilizados se encuentra en el Anexo 2.

Métodos

Mantenimiento de líneas celulares

Las células RCC 786-0 y sus derivadas, así como las HEK293T se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con alta cantidad de glucosa (4,5 g/L) con 10% SFB, y suplementado con GlutaMAX™, Penicilina, Estreptomicina y Anfotericina B en estufa a 37°C con 5% CO₂. Se realizaron dos repiques semanales en una proporción de 1/8. Para los repiques y preparación de las suspensiones necesarias para los estudios *in vitro* e *in vivo* las células fueron lavadas con PBS y tratadas con tripsina (0,25% tripsina-EDTA, dilución 1/10, 5 min).

Mutagénesis dirigida

Generación de las variantes

A partir del plásmido VHL-wt-Venus-Retro¹¹², se realizó mutagénesis dirigida utilizando el Quikchange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, a partir de 10 ng de plásmido y utilizando 125 ng de cada cebador se llevó a cabo la PCR con 1 µl de *PfuUltra* HF DNA Polymerase (2.5 U/ µl) en un volumen final de 50 µl, con las siguientes condiciones de ciclado: 1 ciclo de 1 minuto a 95°C, seguido por 18 ciclos de 50 segundos a 95°C, 50 segundos a 60°C, 8 minutos a 68°C, y un ciclo final de 10 minutos a 68°C. El producto de PCR fue tratado con 1 µl de *Dpn* I (10 U/ µl) por una hora a 37°C de modo de digerir las hebras parentales no mutadas del plásmido.

Transformación de bacterias

La transformación de bacterias fue realizada por choque térmico: Con 2 µl del producto de PCR digerido (idealmente el vector mutado) se transformaron 20 µl de bacterias competentes de la siguiente manera: se incubaron durante 30 minutos en hielo, luego 1 minuto y 30 segundos a 42°C, seguidos de 3 minutos en hielo. Se resuspendieron en 400 µl de medio SOC e incubaron una hora a 37°C con agitación (300 rpm). Se centrifugaron 5 minutos a 4500 rpm a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 100 µl de SOC. Se dejaron reposar durante 15 minutos y luego se sembraron en placas de LB-Agar con 100 µg/ml de ampicilina, las cuales crecieron 16 hs en estufa a 37°C.

Amplificación de los plásmidos mutados

Por cada mutación se seleccionaron y amplificaron dos clones de bacterias en 5 ml de medio LB con agitación durante 16 hs a 37°C, y luego se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit de miniprep. Una vez generadas las variantes, se verificaron por secuenciación automática utilizando el cebador 5'-TTGACGCAAATGGGCGGTAGG-3'. Posteriormente a la confirmación de las mutaciones se amplificó una cantidad mayor de bacterias de modo de obtener una mayor cantidad de ADN plasmídico (utilizando un kit de Maxi Prep) y generar una dilución de stock de cada plásmido mutado.

Generación de retrovirus e infección de células 786-0

La preparación de los Retrovirus y posterior infección fue realizada como se describió previamente por el Dr. Ding²¹⁸. Brevemente, a partir de cada uno de los diferentes plásmidos existentes y las variantes generadas se prepararon Retrovirus en células HEK293T. Para ello, las células HEK293T se cultivaron en placas de 6 pocillos y utilizando 30 µl de Lipofectamina por pocillo, se transfectaron simultáneamente con 1,5 µg de cada uno de tres plásmidos: 1)pcGp, 2) pVSVG y 3)uno de éstos: GFP-Retro/ VHL-wt-Venus-Retro/ VHL-P138R-Venus-Retro/ VHL-L163R-Venus-Retro. A las 48 hs post transfección se recogió el sobrenadante de estos cultivos- que contiene el retrovirus ensamblado que en su interior contiene el plásmido de interés-. Este sobrenadante se utilizó para infectar las células 786-0 parentales (100µl por pocillo de placa de 6). 20 hs post infección con el Retrovirus comenzó la selección de las células infectadas con 1 mg/ml de G418/Geneticina. Luego de 14 días de selección con Geneticina se obtuvieron las 4 líneas celulares derivadas de ésta, que expresan GFP, VHL-wt-Venus, VHL-P138R-Venus y VHL-L163R-Venus. Como control, las células 786-0 parentales (sin infectar) fueron tratadas con Geneticina de modo de verificar su efecto. Para confirmar el establecimiento de cada nueva línea celular se evaluó por Western Blot la expresión de VHL y GFP.

Western Blot

Las células 786-0 y las líneas generadas a partir de éstas se lisaron en buffer de lisis conteniendo inhibidores de proteasas como se describió previamente²¹⁹. Brevemente, los lisados se centrifugaron a 12.000 g por 30 minutos a 4°C y luego se determinó la concentración proteica de las muestras utilizando el método de Bradford. Se sembraron 50 µg de proteínas totales las cuales se separaron por SDS-PAGE (12,5% acrilamida) y se transfirieron a membranas de PVDF, se

bloquearon con 5% leche en buffer TBS-Tween 0,1% e incubaron 16 hs con los diferentes anticuerpos para la detección de VHL, GFP, HIF 2 α , β actina, Elonguina B y Elonguina C. Luego de 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween 0,1% se incubaron durante 2 hs con el anticuerpo secundario correspondiente en cada caso. Luego de 3 lavados de 5 minutos con TBS-Tween 0,1% las membranas se revelaron utilizando el reactivo comercial ECL.

Evaluación de la vida media de las proteínas

Para evaluar la vida media de la pVHL nativa (WT) y de las variantes P138R y L163R, las células fueron tratadas con cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos, crecidas en medio DMEM completo-suplementado y tratadas durante 0, 1,2, 4 y 6 hs con 50 μ g/ml de cicloheximida. Luego del tratamiento se lavaron con PBS y recogieron con buffer de lisis de proteínas para su análisis por Western Blot.

Inhibición del proteasoma con MG132

Para estudiar la degradación de la pVHL nativa (WT) y de las variantes P138R y L163R, las células fueron tratadas con MG132, un inhibidor del proteasoma. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos, crecidas en medio DMEM completo-suplementado y tratadas durante 0, 4, y 8 hs con 5 μ g/ml de MG132. Luego del tratamiento se lavaron con PBS y recogieron con buffer de lisis de proteínas para su análisis por Western Blot.

Inmunoprecipitación

Los lisados de las líneas celulares que expresan GFP, WT VHL-Venus, P138R VHL-Venus, L163R VHL- Venus se centrifugaron por 30 minutos a 12000 g y luego se determinó la concentración proteica de las muestras utilizando el método de Bradford. Para la inmunoprecipitación se utilizó un kit comercial (GFP-Trap®_A) el cual consiste de anticuerpos de alpaca (denominados anticuerpos V_HH ya que sólo poseen el dominio variable V_HH de la cadena pesada de un anticuerpo) unidos a la superficie de microesferas de agarosa. Se siguieron las instrucciones provistas por el fabricante. Brevemente, las microesferas unidas al anticuerpo se equilibraron en buffer de lisis, se incubaron con 1 mg de proteínas totales en un agitador circular durante 1 hora a 4°C. Luego se centrifugaron a 2500 g durante 2 minutos a 4°C para separar las microesferas unidas a GFP del resto de las proteínas. Se lavaron con buffer de lisis y luego se incubaron a 95 °C durante 10 minutos para disociar los inmunocomplejos de las microesferas de agarosa. Se resuspendieron en 30 µl de buffer de siembra SDS 2X. De estos 30 µl, se sembraron 5 µl en un gel de 12,5 % poliacrilamida para separar las proteínas por SDS-PAGE, y se transfirieron a una membrana de PVDF, la cual se incubó con el anticuerpo para la detección de GFP y se utilizó como control de la inmunoprecipitación. Los restantes 25 µl se sembraron en otro gel de 12,5 % poliacrilamida para separar las proteínas por SDS-PAGE, y se transfirieron a una membrana de PVDF para la detección de VHL, Elonguina B y Elonguina C con los anticuerpos ya mencionados. Se utilizó la línea celular que expresa pVHL nativa como control positivo y a la que expresa GFP como control negativo de inmunoprecipitación.

Extracción de ARN

El ARN total de las células fue extraído utilizando el kit comercial Direct-Zol, siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración del ARN y su pureza fue determinada utilizando NanoDrop, registrando su concentración y la relación entre la absorbancia a 260 nm y a 280 nm (260/280).

Retrotranscripción

A partir de 1 µg de RNA se llevaron a cabo las retrotranscripciones (RT-PCR), utilizando *Random hexamers*. El ADNc resultante se diluyó 1/20 a 1/50 para ser utilizado para los experimentos de PCR cuantitativa en tiempo real.

PCR cuantitativa en tiempo real

La PCR en tiempo real fue realizada utilizando la enzima comercial KapaSybrFast en un termociclador StepOne Plus. Brevemente, en un volumen final de 10 µl se colocaron 7 µl de la mezcla comercial y 3 µl de la dilución del ADN copia (ADNc) de cada muestra a analizar. Se realizó una curva de cuantificación para cada gen utilizando diluciones de una mezcla de partes iguales de ADNc de las líneas celulares en estudio, y mediante el método de $\Delta\Delta C_t$ se calcularon las concentraciones relativas de cada gen respecto a un gen de referencia. Los valores fueron evaluados utilizando el método de curva de calibración y se presentan como veces de cambio (*fold change*) en relación a condiciones control, detalladas en cada caso. Se utilizaron como genes de referencia GAPDH (gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa) y TBP (proteína de unión a TATA) según disponibilidad. Los genes Fibronectina, VEGFA y GLUT 1 se normalizaron respecto al gen control TBP, mientras que VHL y HIF-2 α se normalizaron respecto a GAPDH. Se ajustaron las concentraciones para cada cebador, las cuales se muestran en la **tabla A2.1** del Anexo 2. Las condiciones de ciclado fueron

estándar: 1 ciclo de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Luego del ciclado en todos los casos se realizó una curva de disociación (*melting*) del producto de PCR para verificar la formación de un único producto. Esta curva se realizó de la siguiente manera: 1 ciclo de 15 segundos a 95°C, 1 ciclo de 1 minuto a 60°C y luego se aumentó la temperatura de a 0,3°C hasta llegar a 95°C.

Pseudohipoxia con CoCl₂

Para generar pseudohipoxia las líneas celulares de interés fueron sembradas en placas de 6 pocillos, y tratadas con 100µM CoCl₂²²⁰, por períodos de 0 (normoxia), 8 y 24 horas, recogidas en 600 µl de trizol y almacenadas a -70°C hasta el momento de la extracción de ARN.

Deposición de fibronectina

Para evaluar la deposición de la matriz de fibronectina secretada por las líneas celulares que expresan GFP, WT VHL-Venus, P138R VHL-Venus, L163R VHL-Venus se realizó la inmunofluorescencia de acuerdo a la técnica modificada de Debnath *et al*²²¹ utilizando el anticuerpo anti fibronectina y luego revelando con un anti conejo marcado con el fluorocromo Cy5. Brevemente, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos y en cada pocillo se colocaron cubreobjetos de 12 mm de diámetro. Luego de 6 días se lavaron con PBS y fueron fijadas por 20 minutos con 4% paraformaldehído/ 4% sacarosa en PBS y permeabilizadas durante 5 minutos con 0.1% Tritón en PBS. Se bloquearon durante 40 minutos a temperatura ambiente con 5% BSA+5% SFB en PBS. La incubación con el anticuerpo primario (dil 1/100 en solución de bloqueo) se realizó durante 16 horas a 4°C en cámara húmeda, seguida por tres lavados de 5 minutos con PBS y la incubación con el anticuerpo secundario anti conejo (dil 1/150) durante 1 hora a

temperatura ambiente. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst (5 µg/ml) y se utilizó Mowiol para montar los cubreobjetos sobre vidrios. Se utilizó el microscopio Carl-Zeiss AxioScope A1, que posee filtros para DAPI (azul), FITC (verde) y Rodamina (rojo). Las imágenes fueron obtenidas con la cámara AxioCam ERc 5s y el software AxioVision LE.

Estudios In Vivo

Xenotransplantes en ratones inmunodeficientes

De cada línea celular a estudiar (células 786-0 y las derivadas de ésta WT VHL-Venus, P138R VHL-Venus, L163R VHL-Venus) se preparó una solución de 1×10^7 células viables por cada 100 µl de medio DMEM (sin SFB ni suplementos), previa tripsinización y conteo en cámara de Neubauer luego de la tinción con azul tripán. Ratones machos (stock LAE N:NIH (S)-Fox1^{nu}), de 6 a 8 semanas de vida, fueron inyectados subcutáneamente (n=40) en ambos flancos con las suspensiones de las diferentes líneas celulares según el siguiente detalle: en el flanco izquierdo se inyectaron las células 786-0 (n=10), y la línea expresando en forma estable la proteína WT VHL venus (n=30). En el flanco derecho se inyectaron las células expresando de manera estable la variante P138R VHL-Venus (n=20) y la variante L163R VHL-Venus (n=20). Los animales fueron monitoreados semanalmente. Se registró el tiempo de aparición del tumor y el peso corporal. Los animales se sacrificaron a las 16 semanas post-inóculo o cuando los tumores alcanzaron 2 cm de diámetro. Al momento del sacrificio de los ratones, se llevó a cabo la disección de los tumores. La mitad del material se utilizó para histología y la otra mitad se congeló a -70°C para ensayos de expresión.

Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética y el Comité de Docencia e Investigación del Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez”.

Histología de los tumores experimentales desarrollados

Una vez sacrificados los ratones se llevó a cabo la disección de los tumores, los cuales se incubaron por 24 hs con una solución buffer formol (pH 7,4) para la fijación del tejido. Luego se deshidrataron con alcoholes de distinta gradación, xilol y se incluyeron en parafina. Una vez incluidos los tumores en parafina, se prepararon cortes de 3 μm de espesor con micrótopo los cuales se montaron en portaobjetos de vidrio y se realizó la coloración con Hematoxilina y Eosina (H&E). Se utilizó el microscopio óptico Nikon Eclipse 50i, y el programa de imagen NIS-Elements versión 3.0 BR (Nikon Instruments INC, Melville, NY, USA) para adquirir las imágenes.

Evaluación de la expresión de pVHL en los tumores

Se realizó extracción de proteínas totales a partir de las muestras de los tumores experimentales congelados a -70°C . Para ello las muestras fueron resuspendidas en 250 μl de buffer de lisis con inhibidores de proteasas, centrifugadas a 12.000 g por 30 minutos a 4°C y luego se determinó su concentración proteica utilizando el método de Bradford, se realizó Western Blot (como se describió anteriormente) con 50 μg de proteínas totales para evaluar la expresión de VHL utilizando el anticuerpo anti GFP.

Análisis estadístico

Para comparar la expresión de genes obtenida por PCR en tiempo real se utilizó el ANOVA de una vía, con el post test de Tukey. Los valores graficados son

representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado en cada caso.

Para evaluar la diferencia de proporciones en la incidencia de los tumores generados en los distintos grupos experimentales respecto de la línea parental, se confeccionaron tablas de contingencia, que se analizaron utilizando el test de chi cuadrado de dos colas.

Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. Todos los valores graficados se expresan como media \pm desvío estándar, a menos que se especifique lo contrario. Para todos los cálculos estadísticos se utilizó el programa GraphPadPrism Versión 6.

RESULTADOS

ESTUDIOS *IN VITRO*

Generación de los vectores con las variantes de VHL por mutagénesis dirigida

Para estudiar las nuevas variantes de VHL, se utilizó la línea celular 786-0 (ATCC® CRL-1932™) que no expresa una pVHL funcional, por lo tanto la consideraremos “VHL nula” para los fines de este trabajo. A partir de esta línea celular se generaron 4 líneas derivadas de esta, que expresan: GFP, WT VHL-Venus, P138R VHL-Venus, L163R VHL-Venus. Los plásmidos de expresión para GFP y WT VHL-Venus han sido descritos previamente y se utilizaron para obtener las variantes de interés en VHL P138R y L163R, que fueron generadas por mutagénesis dirigida a partir del plásmido VHL-wt-Venus-Retro¹¹². Ambas fueron confirmadas por la secuenciación del ADN plasmídico de dos clones de bacterias por variante, como se muestra en la **figura 27**.

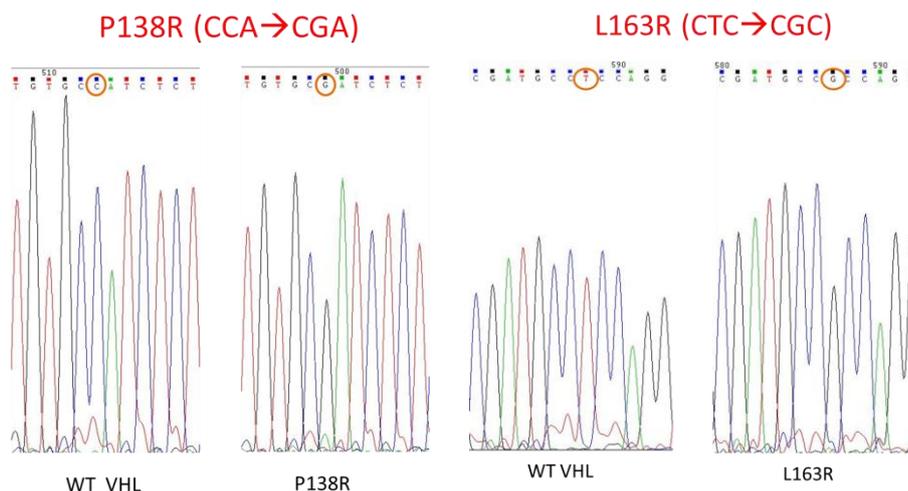


Figura 27- Secuenciación automática de los vectores mutados. Se pudieron verificar las mutaciones generadas.

Generación de líneas celulares derivadas de las 786-0

Una vez obtenidas las construcciones con las variantes de interés se procedió a la generación de las líneas celulares que expresan GFP, WT-VHL-Venus, P138R-VHL-Venus, L163R-VHL-Venus. Para ello, en primera instancia se intentó en repetidas ocasiones realizar transfección de las células 786-0, pero la eficiencia de transfección fue muy baja para esta línea celular, lo cual dificultó el establecimiento de una línea celular estable. Por esta razón, se recurrió a la estrategia de infección con retrovirus: brevemente, las partículas virales conteniendo el plásmido de interés en cada caso (GFP-Retro/ VHL-wt-Venus-Retro/ VHL-P138R-Venus-Retro/ VHL-L163R-Venus-Retro) fueron generadas mediante transfección de células HEK 293T con el plásmido de interés y dos plásmidos comerciales que permiten el empaquetamiento del virus. Transcurridas 48 hs de esta transfección, se recogió el sobrenadante de estas células, conteniendo las partículas virales y se utilizó para infectar las células 786-0 parentales. Luego de 14 días de selección con 1 mg/ml de G418/Geneticina se obtuvieron las 4 líneas celulares derivadas de 786-0, que expresan GFP, VHL-wt-Venus, VHL-P138R-Venus y VHL-L163R-Venus.

Los clones seleccionados fueron sujetos a verificación de la expresión y localización de la pVHL.

Verificación de la expresión y localización de la proteína VHL

En la **figura 28** se muestra que las líneas celulares generadas a partir de la 786-0 efectivamente expresan pVHL. Para la detección de la proteína VHL y sus variantes se utilizaron dos anticuerpos diferentes, dado que los cambios de Prolina por Arginina (P138R), y Leucina por Arginina (L163R) no son menores y podría haber sucedido que las variantes no fueran reconocidas por el anticuerpo anti- VHL. Utilizamos el anticuerpo anti GFP, porción idéntica en todas las

proteínas de fusión expresadas en las líneas celulares y también el anticuerpo anti VHL. Ambos anticuerpos reconocieron tanto a la proteína nativa como a las variantes. Sorprendentemente, los niveles proteicos de las variantes son menores que los de la proteína nativa pVHL. Por ello decidimos evaluar por PCR cuantitativa en tiempo real la expresión del ARN mensajero (ARNm) de VHL en las tres líneas celulares. En la **figura 28**, panel B podemos observar que la expresión del ARN mensajero fue leve aunque significativamente superior en las líneas que expresan las variantes respecto a la que expresa la proteína nativa (se realizó el ANOVA de una vía, con el post test de Tukey), lo cual no explica las diferencias observadas a nivel proteico por Western Blot.

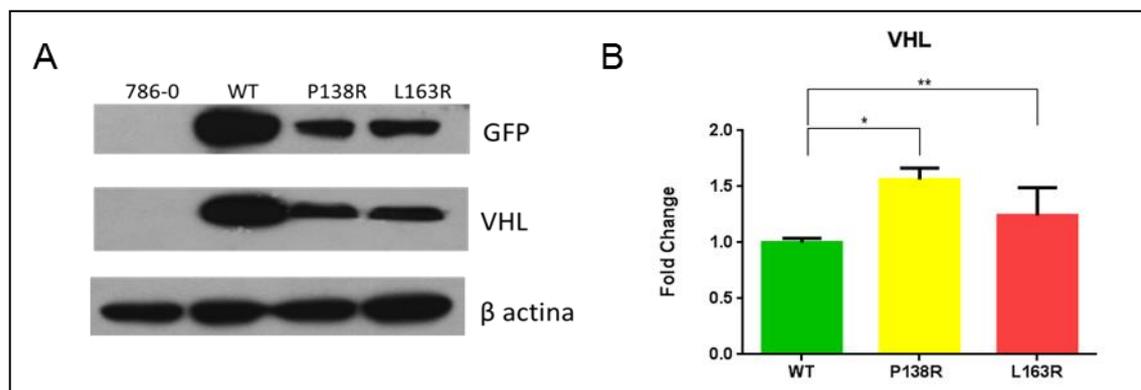


Figura 28-Expresión de la pVHL y su ARNm. Panel A: Western Blot que muestra la expresión de pVHL en las líneas celulares derivadas de 786-0. Las líneas derivadas de 786-0 fueron abreviadas como WT, P138R y L163R según la pVHL que expresan. Panel B: Expresión del ARNm de VHL por PCR cuantitativa en tiempo real, en las líneas que expresan pVHL nativa (WT) y las variantes (P138R y L163R). La expresión fue normalizada con respecto a la línea que expresa el pVHL nativa (WT), tomando este valor como 1. Se grafica el *fold change* o veces de cambio respecto a este valor. * $p < 0.0001$, ** $p = 0.424$, ANOVA de una vía, post test de Tukey.

Dado que los niveles proteicos de las variantes se encuentran reducidos pero no así la expresión de su ARN mensajero, pensamos que es posible que hubiera diferencias en la estabilidad de la proteína producida. Para evaluar la estabilidad de las variantes de pVHL, decidimos inhibir la síntesis proteica de novo. Para ello, cada una de las líneas celulares fue tratada con cicloheximida -

un inhibidor de la síntesis proteica- durante 0, 1, 2, 4 y 6 horas. Luego de los tratamientos se evaluó el nivel de las proteínas por Western Blot (**figura 29**). Cuantificamos las bandas de proteínas observadas utilizando el software Image J, y se relativizaron las cantidades de proteína a los diferentes tiempos (1, 2, 4 y 6 hs) respecto a la cantidad proteína al tiempo 0 de tratamiento con cicloheximida (CHX). Con los datos obtenidos se construyeron las curvas de decaimiento observadas en la **figura 29**:

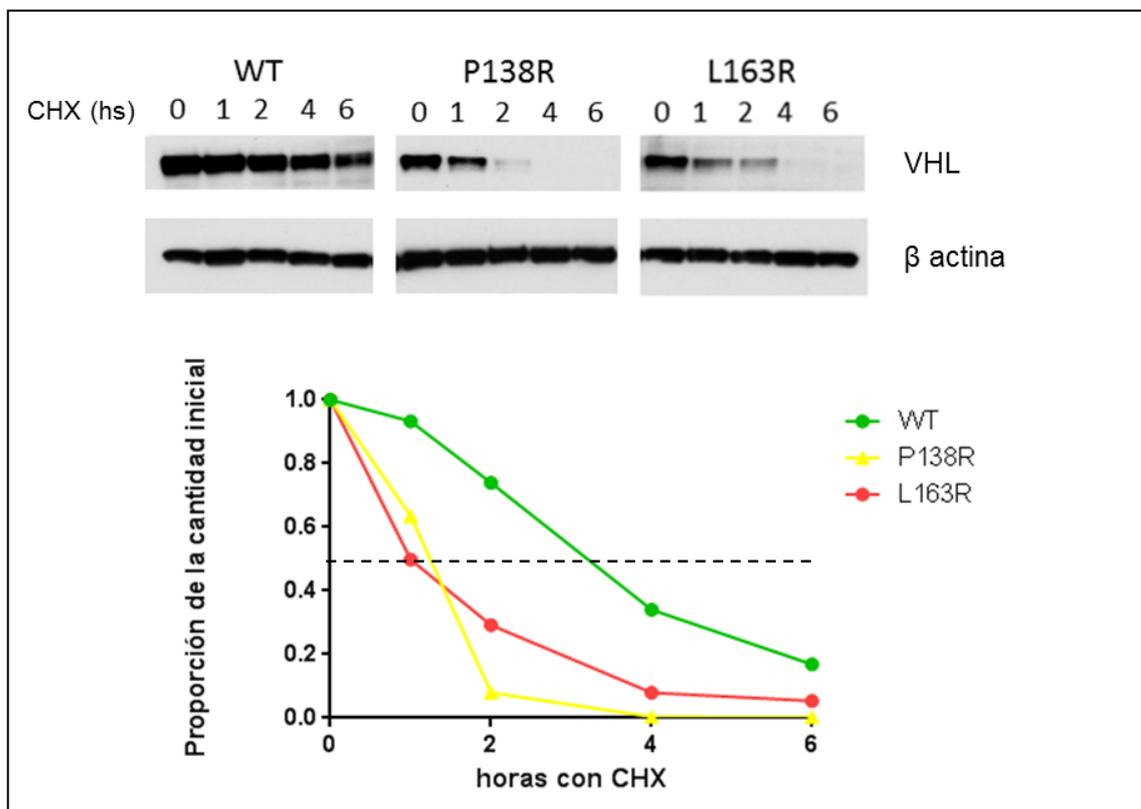


Figura 29-Determinación de la vida media utilizando 50 μ g/ml de cicloheximida. La figura superior muestra el resultado del Western Blot para las líneas celulares derivadas de 786-0 que expresan pVHL nativa (WT) y las variantes P138R y L163R. El gráfico del panel inferior es resultado de la cuantificación y relativización de cada banda respecto a su estado inicial, sin tratar con CHX. La línea punteada marca aproximadamente el 50%.

Las curvas de la **figura 29** muestran que la vida media de las variantes en estudio se encuentran muy disminuidas respecto a la vida media de la proteína nativa. A partir de estos datos se puede estimar que la vida media($t_{1/2}$) de la pVHL nativa es aproximadamente 3,4 hs mientras que $t_{1/2}$ de P138R es de \approx 1,2 hs y

para L163R de ≈ 1 hs. Esta diferencia marcada en la vida media de las variantes respecto a la proteína nativa podría explicar las diferencias observadas por Western Blot.

Dado que la degradación de la pVHL está mediada por el proteasoma, utilizamos un inhibidor del proteasoma como el MG 132 a fin de poner en evidencia dicho mecanismo. Para ello las células fueron tratadas durante 4 y 8 horas con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de MG 132 y luego se lisaron y evaluaron por Western Blot. La **figura 30** muestra que tanto a las 4 como a las 8 hs el tratamiento con MG132 aumentó los niveles de la P138R-pVHL, de la variante L163R-pVHL y de la pVHL nativa, indicando que éste es el mecanismo involucrado en la degradación tanto de la proteína nativa como de las variantes.

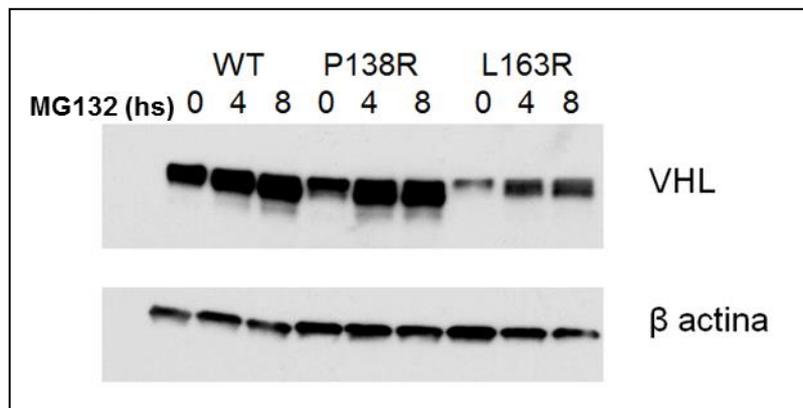


Figura 30- La inhibición del proteasoma aumenta los niveles de pVHL nativa y de las variantes. La figura muestra el resultado del Western Blot para VHL, y como control de carga la β actina para las líneas que expresan pVHL nativa (WT) y las variantes (P138R y L163R). Se muestra el tratamiento de 0, 4 y 8 hs con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de MG 132. Se tomó al valor inicial al tiempo 0 como 1 y se compararon las bandas observadas a las 4 y 8 hs de tratamiento, pudiendo observar pVHL aumenta a 1.32 (4hs) y 1.48 (8hs) de su valor inicial, la variante P138R 1.6 (4 hs) y 1.54 (8hs), y la variante L163R 2.03 (4hs) y 2.07 (8hs).

pVHL circula entre el núcleo y el citoplasma. Como se describió en la sección de introducción existe un motivo aminoacídico DXGX₂DX₂L que permite salir del núcleo a las proteínas que lo contienen¹¹⁸. Ninguna de las variantes en estudio altera este motivo aminoacídico, pero ya que las variantes P138R y L163R no fueron descritas previamente, nos interesó observar su localización.

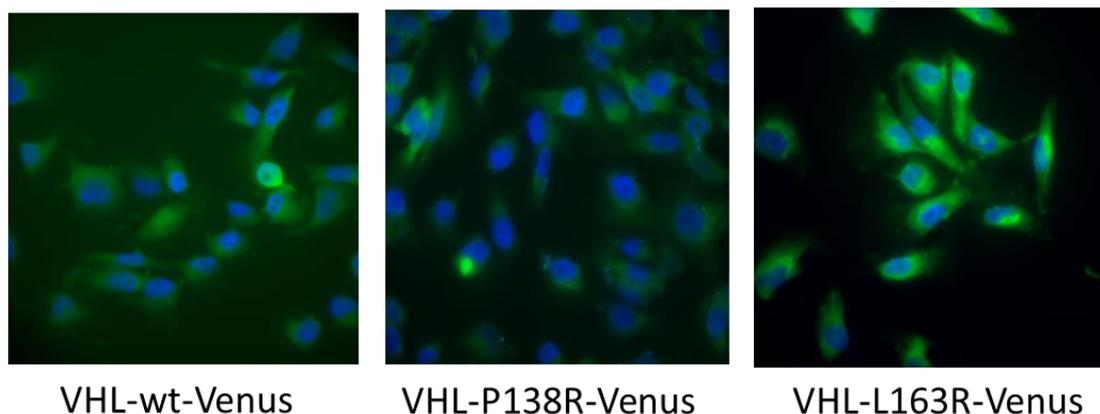


Figura 31- Expresión de pVHL en las líneas celulares derivadas de 786-0. En azul se marcan los núcleos teñidos con DAPI, y en verde pVHL –Venus.

En la **figura 31** se puede apreciar que la expresión de las nuevas variantes y de la proteína nativa VHL es mayoritariamente citoplasmática.

Evaluación de la formación y funcionalidad del complejo pVHL-Elonguina B-Elonguina C

Como se detalló en la Introducción, la función mejor descrita de pVHL es la de regular los niveles de HIF α (Subunidades α del Factor Inducible en estado de Hipoxia). Para ello la proteína codificada por VHL forma parte de un complejo multiproteico junto a Elonguina B, Elonguina C, Culina 2 (Cul2) y la Ring Box protein 1 (Rbx1). Este complejo actúa como una E3 ubiquitina ligasa, cuya función es poliubiquitar a HIF α en condiciones de normoxia y de este modo determina su degradación en el proteasoma.

Dado que las variantes están localizadas en dominios involucrados en la formación de dicho complejo, decidimos en primera instancia evaluar la capacidad de estas variantes de formar el complejo mencionado.

Para evaluar la formación del complejo se realizó inmunoprecipitación con un kit comercial (GFP-Trap®_A) que permite inmunoprecipitar todo aquello que se encuentre unido a GFP y luego por Western Blot se analizaron los componentes

del complejo. Una parte de lo inmunoprecipitado (5 μ l) se sembró en un gel para realizar control de la inmunoprecipitación y luego de la electroforesis y de la transferencia se incubó la membrana entera con el anticuerpo anti GFP. Como se muestra en la **figura 32** la inmunoprecipitación con el kit mencionado fue eficiente, ya que se observó una banda única, que en la línea celular que expresa GFP corresponde a la proteína GFP sola que posee un peso aproximado de 25 KDa y en las restantes líneas a las proteínas VHL (nativa, P138R y L163R) fusionadas a Venus que tienen un peso aproximado de 50 KDa.

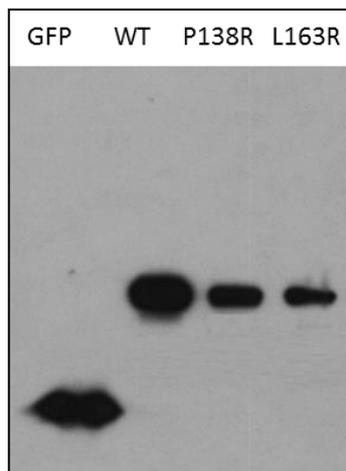


Figura 32-Control de Inmunoprecipitación utilizando GFP-Trap. Las bandas mostradas indican la presencia de GFP en el inmunoprecipitado. Se utilizaron las líneas celulares que expresan GFP, pVHL nativa (WT) y las variantes (P138R y L163R).

Utilizando los restantes 25 μ l del inmunoprecipitado se realizaron Western Blots para detectar la presencia de VHL, Elonguina B y Elonguina C, como se muestra en la **figura 33**.

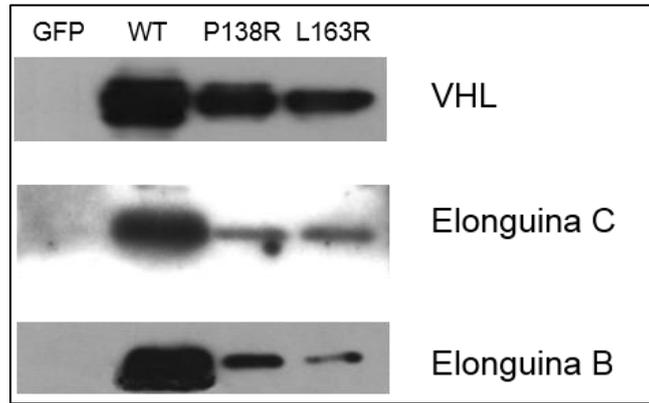


Figura 33-Formación del complejo VHL-Elonguina B-Elonguina C. Se muestran los resultados obtenidos en las líneas que expresan GFP, pVHL nativa (WT) y las variantes (P138R y L163R).

Como se aprecia en la **figura 33** se detectó la presencia de las Elonguinas B y C en los inmunoprecipitados de las células que expresan las variantes, por lo cual podemos afirmar que las variantes P138R y L163R forman el complejo junto a Elonguina B y Elonguina C. Consistente con los resultados mostrados, la cantidad de pVHL inmunoprecipitada fue menor en las variantes respecto a la nativa, y por ello la cantidad de Elonguina B y Elonguina C también lo es. Calculamos la relación entre las bandas obtenidas: Elonguina C/VHL y Elonguina B/VHL para la pVHL nativa y para las variantes y normalizamos las relaciones de las variantes tomando como 1 la relación obtenida para la nativa y pudimos ver que P138R inmunoprecipita menos Elonguina B y Elonguina C (0.6 en cada caso) y que L163R inmunoprecipita cantidad similar de Elonguina C pero menor cantidad de Elonguina B (0.25).

Los resultados obtenidos prueban que las variantes son capaces de formar un complejo multiproteico con Elonguina B y Elonguina C, aunque en menor cantidad que la proteína nativa. Nos cuestionamos si este complejo formado en las variantes mantiene su funcionalidad, degradando a las subunidades α del factor inducible por hipoxia (HIF α). Para ello en primera instancia, en lisados provenientes de las líneas 786-0 y las que expresan pVHL nativa (WT), P138R y

L163R VHL evaluamos por Western Blot los niveles proteicos de HIF-2 α , dado que la línea celular utilizada no expresa HIF 1 α y sobreexpresa HIF-2 α .

Como se muestra en la **figura 34** la línea parental 786-0 expresa los mayores niveles de HIF-2 α ya que al no contar con una proteína VHL funcional estas células no utilizan este mecanismo de degradación de HIF 2 α . Los niveles de HIF 2 α en la línea que expresa pVHL nativa son los menores ya que esta proteína forma el complejo y degrada eficientemente a HIF 2 α . Los niveles proteicos de HIF 2 α obtenidos en las líneas que expresan las variantes fueron intermedios entre 786-0 y la línea que expresa pVHL nativa (WT).

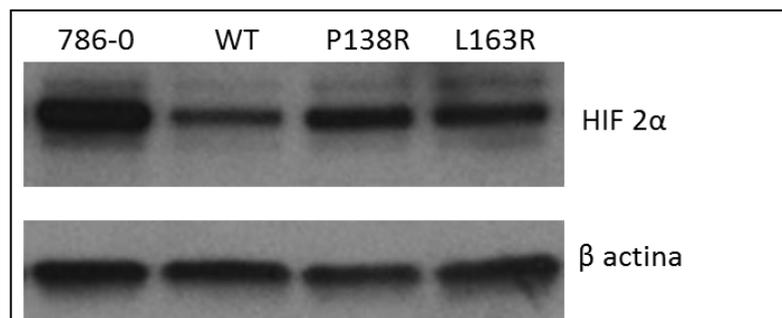


Figura 34-Expresión proteica de HIF-2 α evaluada por Western Blot, utilizando β actina como control de carga. Se muestran los resultados obtenidos en las línea parental (786-0) y sus derivadas que expresan pVHL nativa (WT) y las variantes (P138R y L163R).

Para confirmar que estas diferencias en los niveles de proteína HIF 2 α se deben a la interacción con pVHL que desencadena su degradación y no a diferencias en su expresión, realizamos PCR cuantitativa en tiempo real para evaluar los niveles de expresión del ARN mensajero de HIF 2 α .

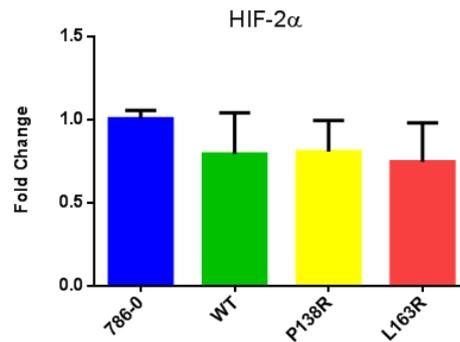


Figura 35-Expresión de ARNm de HIF-2 α en las distintas líneas celulares. Se muestran los resultados obtenidos en la línea parental (786-0) y sus derivadas que expresan pVHL nativa (WT) y las variantes (P138R y L163R). La expresión fue normalizada con respecto a la línea parental 786-0, tomando este valor como 1. Se grafica el *fold change* o veces de cambio respecto a este valor.

Como se aprecia en la **figura 35** no se evidenciaron diferencias entre las 4 líneas celulares respecto a la expresión del ARNm de HIF- 2 α , por lo cual las diferencias en los niveles de proteína observados no son debidos a diferencias en la expresión del ARN mensajero(ANOVA de una vía, post test de Tukey).

Expresión de genes blanco regulados por HIF-2 α

Nos cuestionamos si las diferencias observadas en los niveles de proteína de HIF-2 α en las líneas que expresan las variantes y la proteína VHL nativa tendrían consecuencias en los genes que HIF-2 α regula, actuando como factor de transcripción. Existen varios genes regulados por HIF- 2 α , por ejemplo TGF- α , ciclina D1, VEGF y GLUT1 entre otros²²². Decidimos evaluar la expresión de VEGF y GLUT1 en condiciones de normoxia (20% O₂) por PCR cuantitativa en tiempo real en las diferentes líneas celulares.

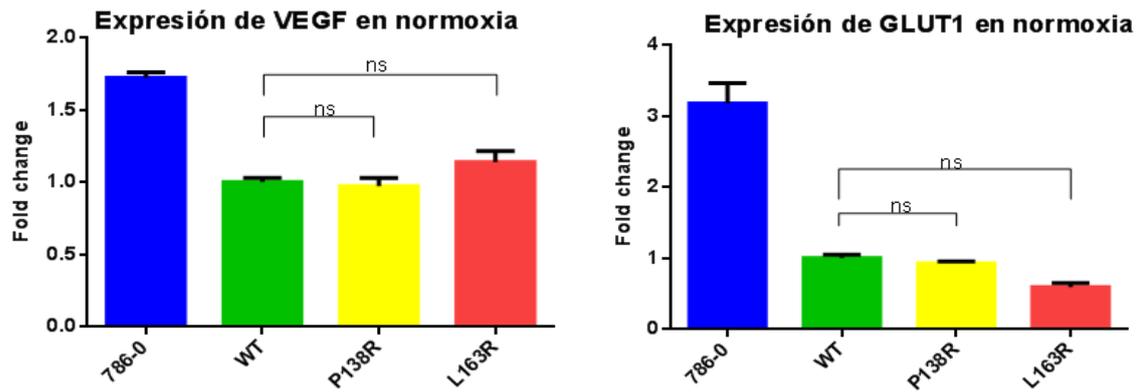


Figura 36-Expresión de genes blanco de HIF 2 α : VEGF y GLUT1 en normoxia. Se muestran los resultados obtenidos en las línea parental (786-0) y sus derivadas que expresan pVHL nativa (WT) y las variantes (P138R y L163R). La expresión fue normalizada con respecto a la línea que expresa la pVHL nativa (WT), tomando este valor como 1. Se grafica el *fold change* o veces de cambio respecto a este valor. ns: no significativa (ANOVA de una vía, post test de Tukey).

Como muestra la **figura 36** no existen diferencias significativas en la expresión de los genes blanco de HIF-2 α entre las líneas celulares que expresan pVHL nativa y las variantes P138R y L163R en estas condiciones (ANOVA de una vía, post test de Tukey).

Al no observar diferencias en la expresión de VEGF y GLUT1 en condiciones de normoxia, nos preguntamos qué sucedería en hipoxia. En este escenario, las células tienen menor capacidad de degradar HIF-2 α por lo cual se incrementa su concentración. Así, hipotéticamente la pVHL nativa podría degradar HIF-2 α en cierta medida, que sería el máximo teórico de nuestro sistema, mientras que en este contexto nuestras variantes podrían resultar menos eficientes dejando concentraciones de HIF-2 α suficientes para evidenciar diferencias en los genes bajo su regulación. Las líneas celulares fueron tratadas durante 8 y 24 hs con 100 μ M de cloruro de cobalto (CoCl₂) para generar una situación de pseudohipoxia. El cobalto reemplaza al hierro en las proli-hidroxilasas impidiendo que estas hidroxilen a HIF-2 α , y por tanto su degradación.

Transcurridas 8 horas de pseudohipoxia, los niveles de expresión de VEGF y GLUT 1 fueron similares a los observados en normoxia (**figura 36**). Sin

embargo, transcurridas 24 hs de pseudohipoxia, observamos un aumento significativo en los niveles de expresión de VEGF así como de GLUT1 en las líneas celulares que expresan las variantes respecto a la línea que expresa pVHL nativa (**figura 37**). Este resultado indicaría que las variantes no responden de igual manera que la proteína nativa en condiciones de mayor exigencia. Sin embargo, las diferencias encontradas son sutiles y no explicarían el fenotipo de los pacientes.

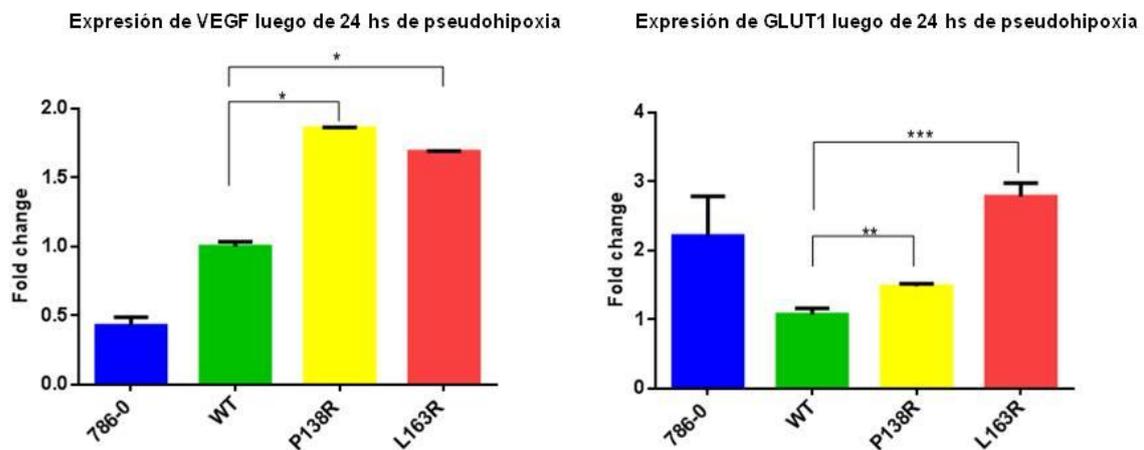


Figura 37-Expresión de ARNm de VEGF y GLUT1 en pseudohipoxia. Se muestran los resultados obtenidos en la línea parental (786-0) y sus derivadas que expresan pVHL nativa (WT) y las variantes (P138R y L163R). La expresión fue normalizada con respecto a la línea que expresa la pVHL nativa (WT), tomando este valor como 1. Se grafica el *fold change* o veces de cambio respecto a este valor* $p < 0.0001$, ** $p = 0.0401$, *** $p = 0.0002$ ANOVA de una vía, post test de Tukey.

Dado que la diferencia observada entre las variantes y la pVHL nativa es sutil, decidimos explorar un mecanismo de acción de pVHL independiente de HIF. Como se mencionó en la introducción, los mecanismos HIF independientes mediados por pVHL son numerosos. Entre ellos, desde 1998 ha sido documentado que pVHL interactúa con la proteína fibronectina, siendo esta la función independiente de HIF más descripta hasta la fecha.

Evaluación de un mecanismo HIF independiente, relación de pVHL con fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína que forma parte de la matriz extracelular. La unión de las células a la fibronectina se encuentra mediada por proteínas de superficie conocidas como integrinas. La fibronectina disminuye el comportamiento metastásico de las células malignas y la pérdida de deposición de fibronectina ha sido correlacionada con la transformación celular *in vitro*.

En el caso de pVHL, se ha demostrado que la proteína nativa se une a fibronectina y que las células que no expresan pVHL son incapaces de ensamblar una matriz extracelular adecuada de fibronectina¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Además, la presencia de pVHL aumenta los niveles de ARNm de fibronectina en algunos tipos celulares¹⁶⁶.

Expresión de fibronectina

Evaluamos por PCR cuantitativa en tiempo real la expresión del ARN mensajero de fibronectina. Como se muestra en la **figura 38** la línea celular parental (786-0) que no expresa pVHL posee niveles de expresión significativamente menores que la línea que expresa la proteína pVHL nativa. Respecto a las variantes, la línea que contiene la variante P138R expresa niveles de fibronectina similares a la línea con la pVHL nativa, mientras que los niveles de expresión de fibronectina en la línea que expresa L163R son significativamente menores que la que expresa pVHL nativa y similares a los observados por la línea parental que no expresa pVHL. Estos resultados indican que parte del mecanismo de patogénesis de la variante L163R podría ser su deficiencia en la regulación de fibronectina.

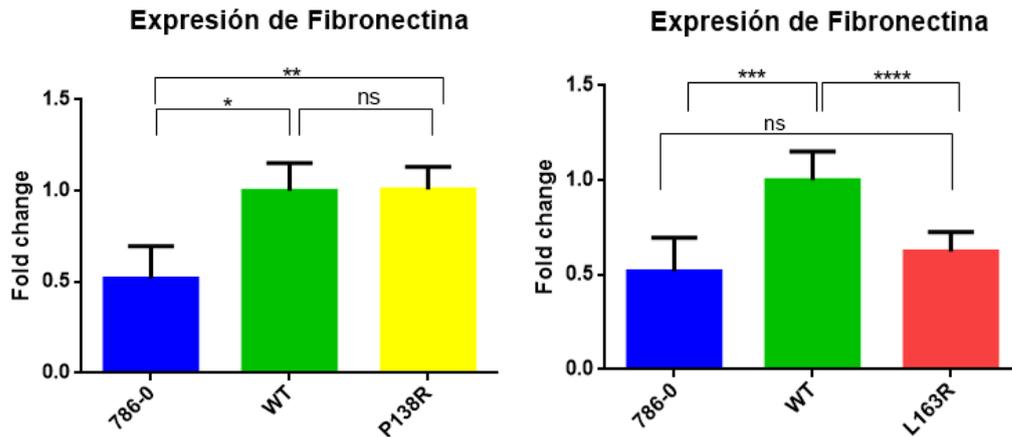


Figura 38- Expresión de ARNm de fibronectina en las diferentes líneas celulares.

* $p=0.0011$, ** $p=0.0030$, *** $p=0.0004$ **** $p=0.0042$ ANOVA de una vía, post test de Tukey.

Deposición de fibronectina

Se realizó inmunofluorescencia para detectar la presencia y deposición de fibronectina en la matriz extracelular de las líneas celulares en estudio. Estas fueron sembradas sobre cubreobjetos y al cabo de 6 días de cultivo evaluadas para detectar la presencia de fibronectina. El anticuerpo secundario utilizado estaba marcado con Cy5(rojo) ya que con azul se marcaron los núcleos(Hoechst) y con verde pVHL (pVHL-Venus).

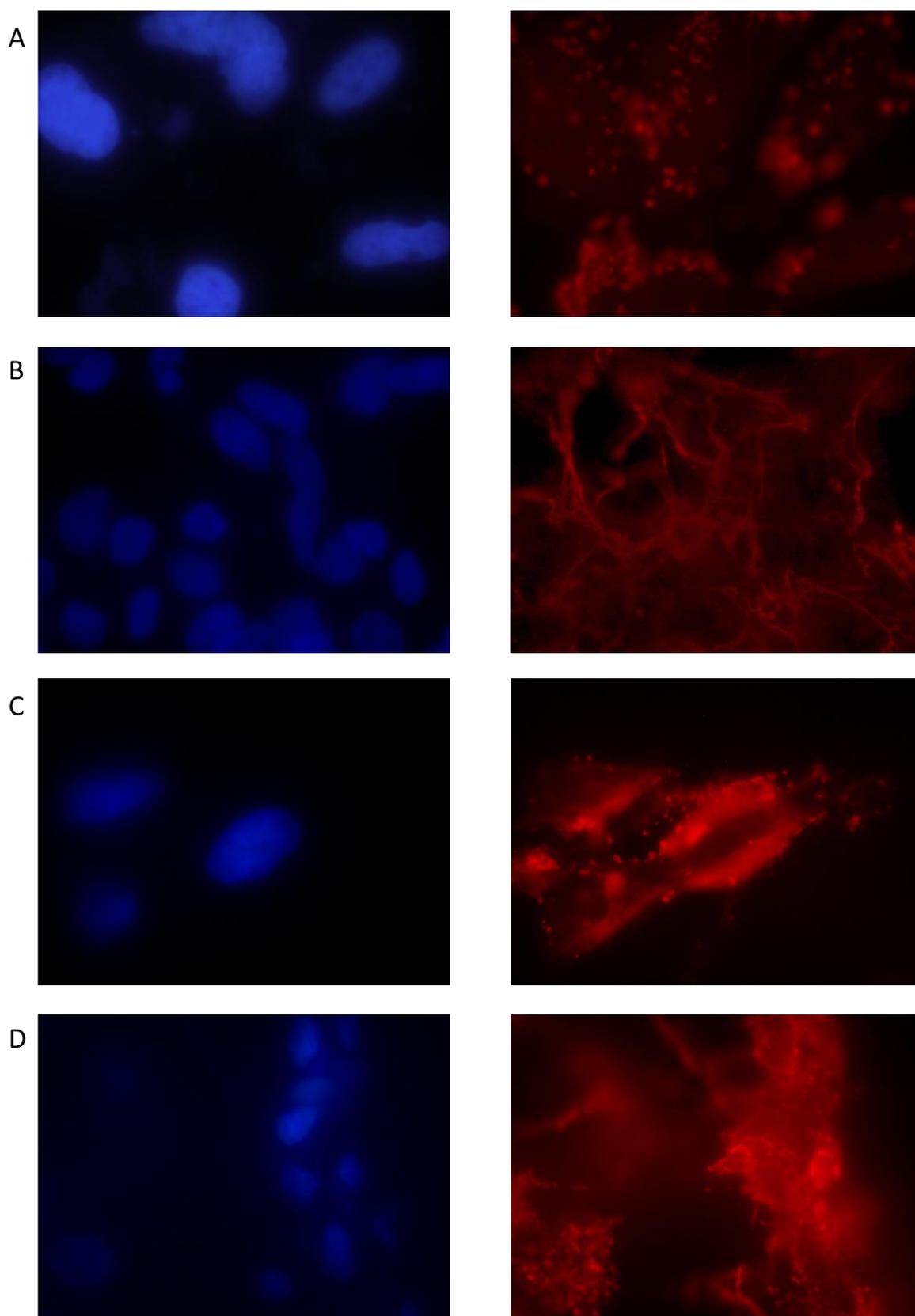


Figura 39- Deposición de fibronectina en las distintas líneas celulares. Las diferentes líneas celulares se encuentran en los diferentes paneles: Panel A:Línea 786-0 (VHL-/-), Panel B: pVHL nativa, Panel C: P138R VHL, Panel D: L163R VHL. Todas las fotos fueron obtenidas a 100x.

Como se puede observar en la **figura 39**, en el panel A, en ausencia de pVHL funcional se depositan acúmulos de fibronectina, visualizados en forma de puntos, en contraposición a la matriz observada cuando las células expresan pVHL nativa como se muestra en el panel B. Las variantes (paneles C y D) presentan un patrón similar a las células 786-0 ya que se puede observar la deposición en forma puntos y no una matriz como la que se visualiza en el panel B.

En base a estos resultados, podemos concluir que estas variantes de pVHL no son capaces de interactuar adecuadamente con la fibronectina para determinar su deposición apropiada como lo hace la pVHL nativa.

ESTUDIOS *IN VIVO*

Xenotransplantes en ratones inmunodeficientes

Se ha demostrado que la línea celular 786-0 inyectada en ratones inmunodeficientes forma tumores, mientras que si se inyecta la línea celular que expresa la proteína nativa VHL no se forman tumores o, en algunos casos, los forma en una baja proporción de los ratones inyectados^{160,202}.

Con el fin de evaluar la capacidad de formar tumores *in vivo* de las variantes de VHL P138R y L163R se inyectaron subcutáneamente las líneas celulares: 786-0, y sus derivadas que expresan VHL-wt-Venus, VHL-P138R-Venus y VHL-L163R-Venus en ratones machos inmunodeficientes (stock LAE N:NIH (S)-Fox1^{nu}), de 6 a 8 semanas de vida (n=40). Los ratones fueron inyectados en ambos flancos con las suspensiones de las diferentes líneas celulares según el siguiente detalle: en el flanco izquierdo se inyectaron las células 786-0 (n=10), y la línea expresando en forma estable la pVHL nativa-Venus (n=30). En el flanco derecho se inyectaron las células expresando de manera estable la variante P138R VHL-Venus (n=20) y la variante L163R VHL-Venus (n=20). La aparición de los tumores fue documentada en la mayoría de los casos en la semana 9 post inyección, no existiendo diferencias entre el tiempo de aparición entre las diferentes líneas celulares inyectadas. La **figura 40** muestra la fotografía de un ratón con tumor, previo a su sacrificio y dos fotografías que muestran macroscópicamente ejemplos de los tumores obtenidos.

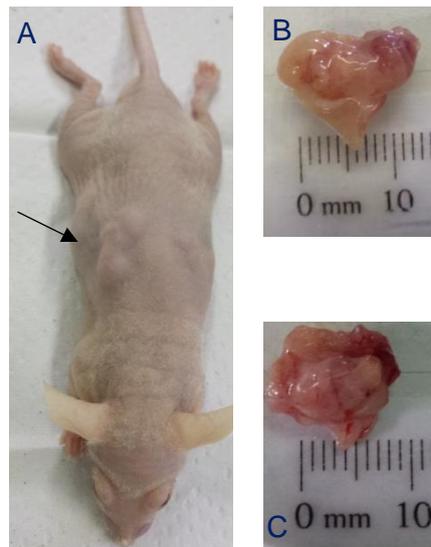


Figura 40-Xenotransplantes en ratones inmunodeficientes. Panel A: Ratón con tumor subcutáneo en el flanco derecho (señalado por la flecha). Paneles B y C: Macroscopía de tumores desarrollados subcutáneamente en los ratones inmunodeficientes.

Se obtuvieron tumores en 55% de los sitios inyectados con las líneas que expresan las variantes P138R-pVHL y L163R-pVHL (11/20), 40% en los inyectados con las células 786-0 (4/10) y 10% en los inyectados con las células que expresan pVHL nativa (3/30). A partir de estos datos se confeccionaron tablas de contingencia, que se analizaron utilizando el test de chi cuadrado. Como se puede observar en la **figura 41** la proporción de tumores fue significativamente mayor en la línea parental y en ambas variantes en comparación con la línea expresando la proteína nativa. Asimismo, la proporción de tumores desarrollados en los ratones inyectados con la línea parental fue similar a cada una de las proporciones de las variantes de estudio.

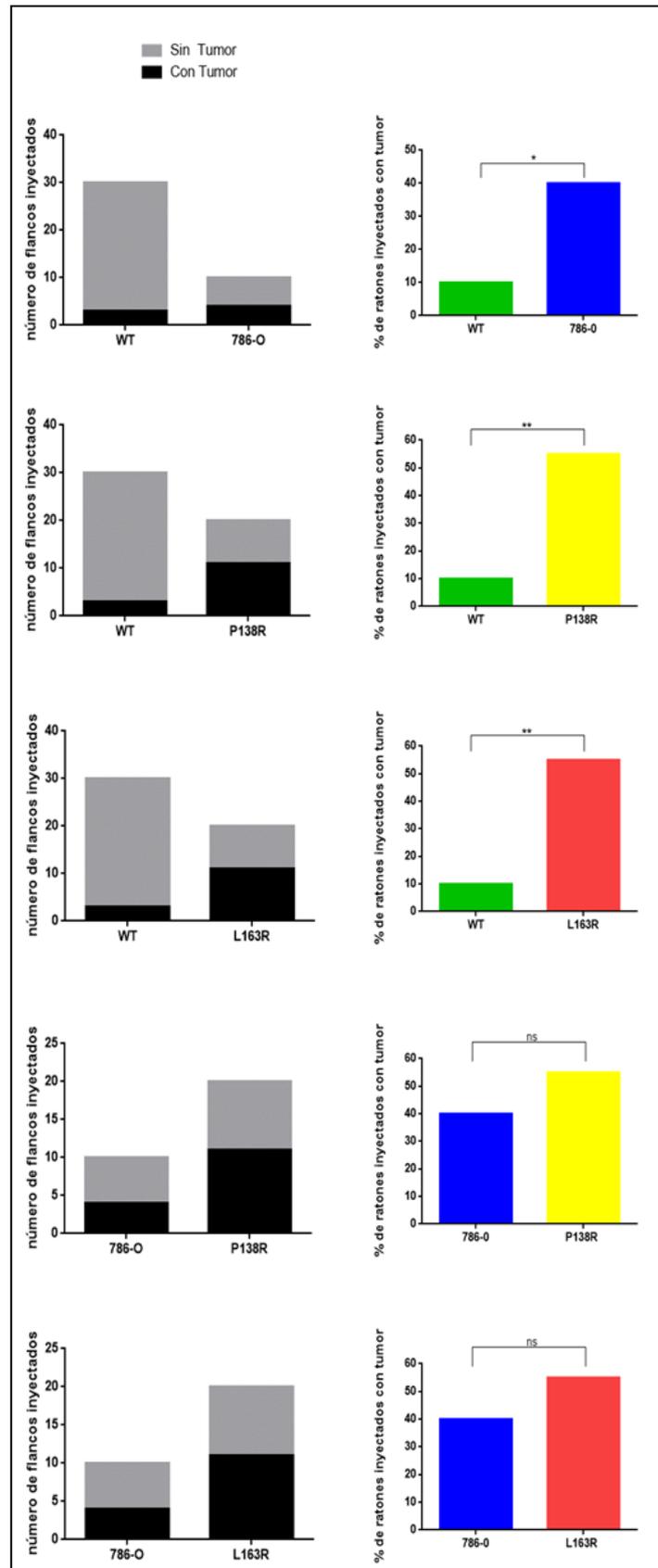


Figura 41- Proporciones de formación de tumores en ratones inmunodeficientes. Los gráficos de la izquierda comparan la incidencia de tumores (negro=presencia, gris=ausencia) de cada línea celular inyectada. Los gráficos de la derecha comparan los porcentajes obtenidos en los gráficos de la izquierda. * $p=0.0306$, ** $p=0.0005$, ns= no significativo. Test de chi cuadrado con dos colas. WT=pVHL nativa.

Histología de los tumores experimentales desarrollados

El análisis histológico reveló que los tumores desarrollados luego de la inyección subcutánea de las líneas celulares (786-0, y sus derivadas que expresan VHL-wt-Venus, VHL-P138R-Venus y VHL-L163R-Venus) en ratones inmunodeficientes resultaron ser tumores sólidos formados por células atípicas, poliédricas que presentan citoplasma amplio, acidófilo u ópticamente vacío y núcleos grandes en los cuales se observa la membrana nuclear engrosada y nucléolo central prominente. Estas células se agrupan en acúmulos separados por delgados tractos de colágeno por donde transcurren pequeños vasos sanguíneos (**figura 42- A y B**). Los tumores tienen crecimiento infiltrante hacia los tejidos vecinos (**figura 42-C**) y muestran signos histológicos de actividad proliferativa, evidenciada por las numerosas figuras mitóticas encontradas (**figura 42-D**). Estas características histológicas son compatibles con el carcinoma renal de células claras.

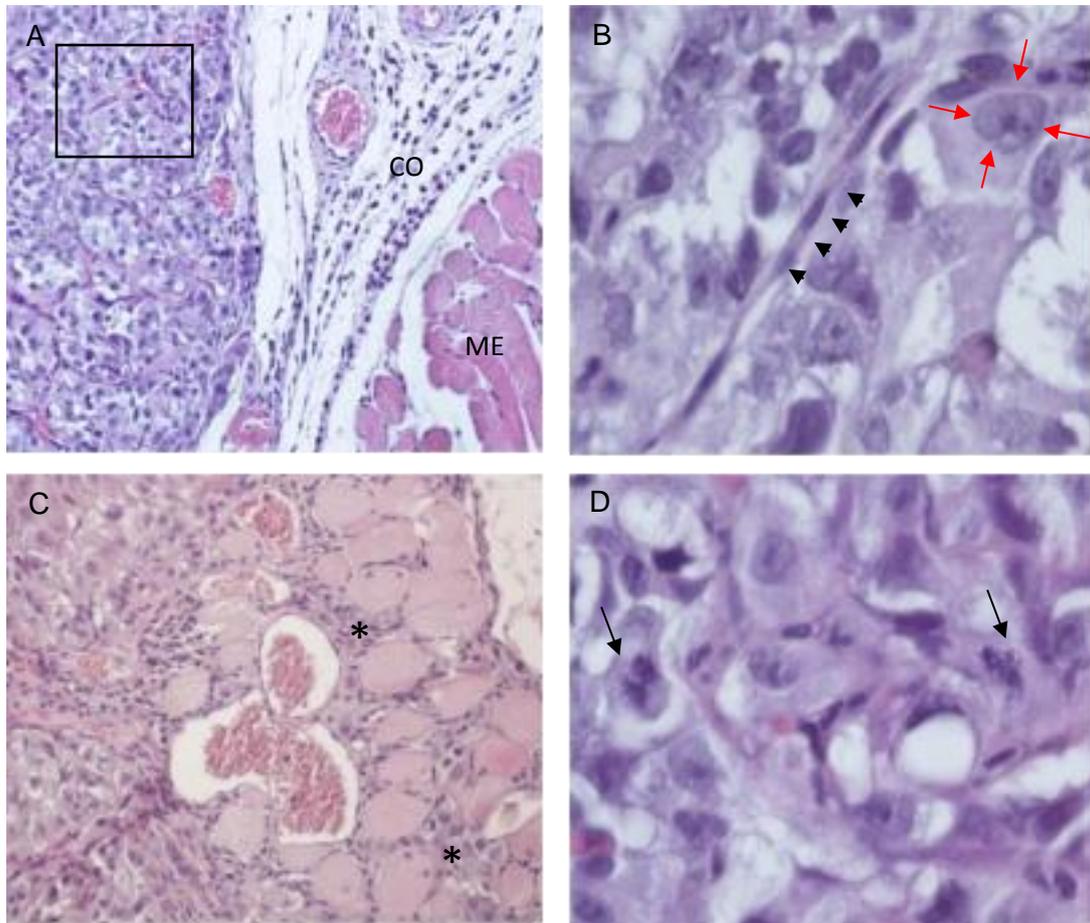


Figura 42- Características histológicas de los tumores obtenidos experimentalmente. Panel A: Tumor sólido formado por lóbulos de células poliédricas separados por finos tabiques; tejido conectivo laxo (CO) y músculo estriado (ME) adyacentes; 20x. Panel B: Magnificación de un sector del panel A, observándose un tabique conectivo con núcleos endoteliales centrales correspondientes a vaso capilar (marcado con puntas de flechas negras), rodeado de células tumorales con núcleos (flechas rojas) con nucléolo prominente central; 100x. Panel C: Tumor infiltrando el músculo estriado vecino, los asteriscos (*) indican el avance tumoral entre los haces musculares. Panel D: Detalle de las células tumorales y de figuras mitóticas (flechas negras); 100x. Tinción Hematoxilina y Eosina.

Para evaluar si las líneas celulares derivadas de 786-0 que expresan VHL-wt-Venus, VHL-P138R-Venus y VHL-L163R-Venus mantenían la expresión de pVHL luego de formar el tumor *in vivo*, se realizó Western Blot a partir de las proteínas extraídas de los tumores congelados a -70°C . También se incluyeron muestras de tumores obtenidos a partir de la línea 786-0 como control negativo. La **figura 43** muestra el resultado de dos tumores representativos de cada línea celular inyectada.

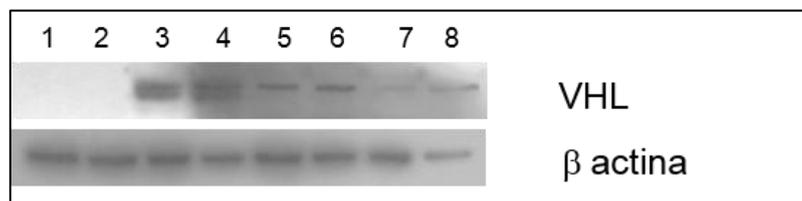


Figura 43- Expresión de pVHL en los tumores generados a partir de las líneas celulares. Las calles 1 y 2 corresponden a los tumores formados por las células 786-0, las 3 y 4 por pVHL nativa, 5 y 6 por P138R-pVHL y 7 y 8 por L163R-pVHL.

Como se puede ver en la **figura 43** los tumores mantuvieron la expresión de pVHL en todos los casos.

Sección 2:
Estudios *in silico*

Los estudios *in silico* de esta tesis han sido realizados gracias a las múltiples pasantías realizadas en el Laboratorio de Química Teórica y Computacional de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay bajo la supervisión de las Doctoras Laura Coitiño y Alicia Merlino.

Los métodos computacionales han sido ampliamente utilizados para entender y explicar datos experimentales (por ejemplo, cambios en la estructura secundaria y terciaria, alteraciones en la naturaleza y fuerza de interacciones, etc). En este campo particular, hay autores que han estudiado al complejo VBC-HIF-1 α utilizando métodos computacionales para describir el cambio producido por variantes tanto de pVHL^{84,113,223–226} así como de HIF-1 α ^{227,228}.

En el presente trabajo se decidió aplicar estas herramientas con el objetivo de comprender a nivel atómico detallado los efectos en la estructura de nuevas variantes de pVHL. La línea celular que hemos utilizado (786-0) sobre-expresa HIF-2 α . A la fecha, el complejo VBC unido a HIF-2 α no se encuentra cristalizado. Como se describió anteriormente en la Introducción, la estructura cristalográfica del complejo VBC unido a un fragmento del dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) de HIF-1 α se encuentra disponible, por ello se recurrió a utilizar esta estructura para modelar nuestro sistema. Este fragmento del dominio ODD de HIF-1 α posee una de las dos prolinas hidroxiladas para ser reconocida por pVHL (hidroxiprolina en la posición 564). Esta prolina 564 se hidroxila primero y favorece la hidroxilación de la segunda prolina (en posición 402 de HIF-1 α)¹⁴². Cabe destacar, que el fragmento de HIF-1 α presente en la estructura cristalográfica (residuos 560-577) posee un 78% de homología de secuencia peptídica con el fragmento análogo de HIF-2 α (residuos 527-544). A partir de esta estructura cristalográfica podemos aplicar modelado molecular para simular en

condiciones similares a las fisiológicas al complejo integrado por la pVHL nativa, así como modelar variantes y evaluar su efecto. Dada la complejidad de estos sistemas (4 proteínas, 360 aminoácidos, y distintas interfaces entre ellas) es necesaria una calibración de la estrategia de modelado a utilizar ajustada a este problema específico.

Recordemos que las estructuras disponibles son cristalográficas y por lo tanto rígidas, entonces, el primer paso para poder representar las condiciones reales de este complejo fue colocar al sistema en solución acuosa, con los contraiones correspondientes. En primera instancia, se decidió modelar a los complejos VBC-HIF-1 α en condiciones de normoxia e hipoxia utilizando dinámica molecular y MM-PBSA/MM-GBSA (del inglés *Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area* y *Molecular Mechanics/Generalized Born Surface Area*), lo cual permite calibrar la metodología. Una vez calibrado el sistema se llevó a cabo el estudio de las variantes P138R y L163R de pVHL.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

Preparación de las estructuras para caracterizar los complejos proteicos VBC-HIF-1 α con pVHL nativa y variantes en solución acuosa

Como punto de partida, se utilizó la estructura cristalográfica del complejo proteico VBC (pVHL-Elonguina B-Elonguina C) humano asociado a un fragmento del factor inducible por hipoxia HIF-1 α conteniendo el dominio de degradación dependiente de oxígeno hidroxilado (código PDB: 1LQB). A dicha estructura, se le removieron las aguas cristalográficas manteniéndose únicamente una molécula de agua presente en la interfaz de interacción VBC-HIF-1 α , a la cual se la definió como una entidad química separada. La diferencia en la estructura primaria entre el complejo VBC-HIF-1 α en situación de normoxia comparado con el complejo en situación de hipoxia es que el residuo Prolina 564 de HIF-1 α se encuentra hidroxilado en normoxia. Para la obtención del complejo VBC-HIF-1 α en condiciones de hipoxia el residuo Hidroxiprolina 564 (Hyp564) fue reemplazado por Prolina (Pro564) de forma manual utilizando el programa Gaussview 5.0²²⁹. De forma análoga se generaron las variantes de interés P138R y L163R de la proteína VHL en condiciones de normoxia. Previo a proceder con la minimización clásica y posteriores simulaciones de dinámica molecular (DM), a cada uno de los sistemas se les agregó átomos de hidrógeno mediante la utilidad *leap* del programa AMBER 14²³⁰, manteniendo los residuos de Arg/Lys protonados y Glu/Asp desprotonados. La carga de cada sistema se neutralizó en condiciones representativas del medio intracelular con iones K⁺. Todos los sistemas fueron tratados con el campo de fuerza *ff03.r1*²³¹. Para describir el residuo de hidroxiprolina se utilizaron los parámetros obtenidos por Park *et al*²³². Los complejos fueron solvatados en una caja octaédrica truncada de aguas utilizando el modelo TIP3P²³³ extendiéndose 15 Ångströms (Å) desde los bordes de la proteína en todas las direcciones.

Minimización clásica de la estructura de los complejos VBC-HIF-1 α en solución acuosa.

Las estructuras preparadas (como se detalló en el punto anterior) fueron optimizadas con el paquete AMBER 14 mediante minimización clásica bajo condiciones periódicas, siguiendo un protocolo estándar por etapas. En primer lugar, se aplicaron restricciones a la posición de los átomos de las proteínas en el complejo multiproteico con una constante de fuerza de 500 kcal/molÅ² y se optimizó la posición de moléculas de agua y contra-iones mediante 500 pasos de minimización con el algoritmo *steepest descent* y 1500 pasos con el algoritmo gradiente conjugado. En segundo lugar, se permitió la relajación de las posiciones nucleares de todos los átomos del sistema aplicando 1000 pasos de *steepest descent* y 5000 pasos de gradiente conjugado. Las minimizaciones se realizaron mediante la utilidad *sander.mpi* en AMBER 14.

Simulaciones de Dinámica Molecular clásica de los complejos VBC-HIF-1 α en solución acuosa

Posteriormente a la minimización, cada sistema fue calentado de 0 a 310 Kelvin (K) durante 100 picosegundos (ps) utilizando un *ensemble* NVT. Este *ensemble* NVT implica que las variables del sistema **N**úmero de partículas, **V**olumen y **T**emperatura son constantes. A continuación, cada sistema se equilibró durante 500 ps a 310 K y 1 atmósfera (atm) de presión en un *ensemble* NPT (**N**úmero de partículas, **P**resión y **T**emperatura constantes). Finalmente, se realizaron 30 nanosegundos (ns) de dinámica productiva para los complejos formados por pVHL nativa con Pro⁵⁶⁴, pVHL nativa con Hyp⁵⁶⁴, y las variantes P138R y L163R de pVHL utilizando el termostato de Langevin²³⁴ y el baróstato de Berendsen²³⁵. Para restringir las distancias de enlace que involucran hidrógenos se empleó el algoritmo SHAKE²³⁶. Para el tratamiento de las interacciones electrostáticas de largo alcance se utilizó el método *Particle Mesh Ewald*

²³⁷, empleándose una línea de corte (*cutoff*) de 10 Å para tratar las interacciones no enlazantes. La integración de las ecuaciones de movimiento se realizó con un tiempo de paso de 2.0 femtosegundos (fs) y las coordenadas se guardaron cada 5 ps. Para cada uno de los sistemas estudiados y considerando la parte estable de las trayectorias se obtuvieron estructuras representativas mediante análisis de *cluster* utilizando el algoritmo *average-linkage*²³⁸. El análisis de *cluster*, cálculos de RMSD/RMSF, análisis de enlaces de hidrógeno y la superficie expuesta al solvente (SASA, del inglés *Solvent-Accessible Surface Area*) se realizaron con la utilidad *cpptraj* de AmberTools14. Para los enlaces de hidrógeno se estableció una distancia máxima de 3,5 Å (entre el dador y el aceptor) y un ángulo mayor a 120°. Para la visualización de las trayectorias y preparación de figuras se usó el programa VMD²³⁹. Para el cálculo del potencial electrostático mapeado sobre la superficie de Connolly se usó el módulo ABPS del programa VMD. Todas las simulaciones se realizaron mediante el módulo *pmemd.cuda* del programa AMBER 14 sobre una tarjeta gráfica GeForce GTX 980.

Cálculo de la energía de unión con MM-PBSA/MM-GBSA

Para el cálculo de energía libre de unión entre HIF-1 α y el complejo VBC (VBC: VHL, Elonguina B, Elonguina C) en solución considerando la proteína pVHL nativa y las variantes P138R y L163R se utilizó la metodología MM-PBSA y MM-GBSA mediante la utilidad *MMPBSA.py.mpi*^{240,241} del programa AMBER 14. Las estructuras separadas de cada uno de los componentes del complejo se obtuvieron a partir de la estructura del complejo en solución de acuerdo al protocolo de trayectoria simple (STP). La energía libre de unión (G) final para cada complejo estudiado y cada uno de sus componentes (VHL, Elonguina B, Elonguina C y HIF- α) se estima estadísticamente aplicando el análisis energético MM-PBSA y MM-GBSA a cada una de las estructuras (1200 en total) presentes

en 6 ns de simulación. Finalmente, la energía libre de unión se obtiene de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta G_{\text{unión}} = G_{\text{complejo}} - (G_{pVHL} + G_{EloB} + G_{EloC} + G_{HIF-1\alpha})$$

Debido a que nuestro interés se enfocó en el cálculo de la diferencia en la energía libre de unión ($\Delta[\Delta G_{\text{unión}}]$) entre los diferentes complejos, la contribución entrópica no fue tomada en cuenta.

RESULTADOS

Calibración del estudio computacional del complejo VBC-HIF-1- α en normoxia e hipoxia

Simulaciones de Dinámica Molecular clásica de los complejos VBC-HIF-1 α en solución acuosa

Se realizaron 30 ns de simulaciones de dinámica molecular para ambos complejos, logrando sistemas estabilizados en ambos casos, lo cual se pudo observar calculando el RMSD (del inglés *Root Mean Square Deviation*) de los carbonos alfa y que representa la desviación que presenta cada carbono alfa respecto a la estructura de referencia. La estructura de referencia fue en todos los casos la estructura al tiempo 0 de la dinámica productiva. Se puede ver en la **figura 44** el gráfico de RMSD en función del tiempo para el complejo nativo en normoxia (panel A) e hipoxia (panel B). El complejo en normoxia se estabiliza a partir de los 15 ns de simulación mientras que en hipoxia luego de los 10 ns.

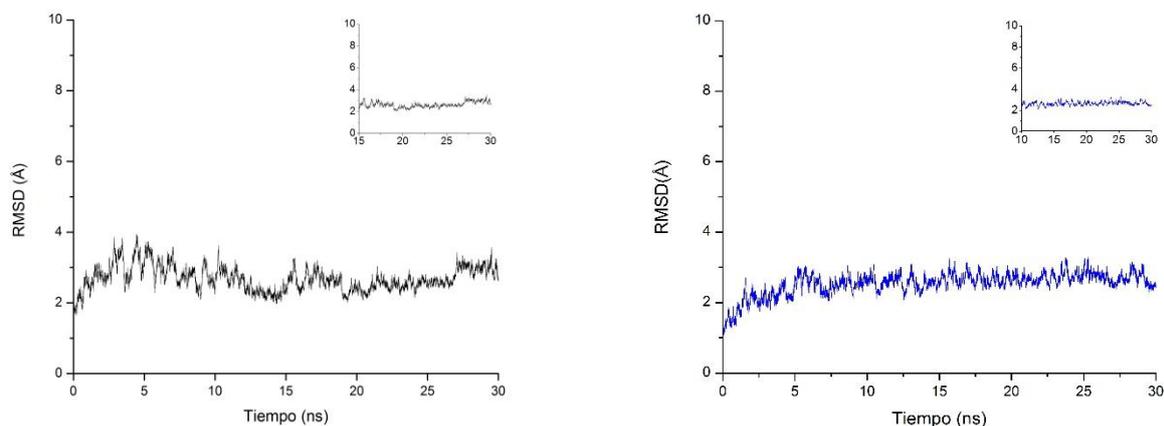


Figura 44-RMSD de los carbonos alfa en función del tiempo en normoxia (panel A) e hipoxia (panel B). La figura pequeña en cada gráfico muestra solamente la zona estabilizada en cada caso.

Además, se calculó el RMSF (del inglés *Root Mean Square Fluctuation*) que representa la fluctuación entre un residuo y otro de referencia. Para este

análisis se evaluaron los carbonos alfa, y se consideró la región estable de la dinámica molecular para cada estructura, la cual se comparó con su respectivo *cluster* (estructura representativa de cada dinámica donde la estructura está más tiempo). La **figura 45** muestra la fluctuación de los residuos de cada proteína del complejo VBC-HIF-1 α . Los valores de RMSF observados son muy similares para todos los integrantes del complejo si comparamos entre normoxia e hipoxia. Dado que el fragmento de HIF-1 α utilizado contiene solamente 18 aminoácidos, es el que presenta mayor RMSF, reflejando su flexibilidad.

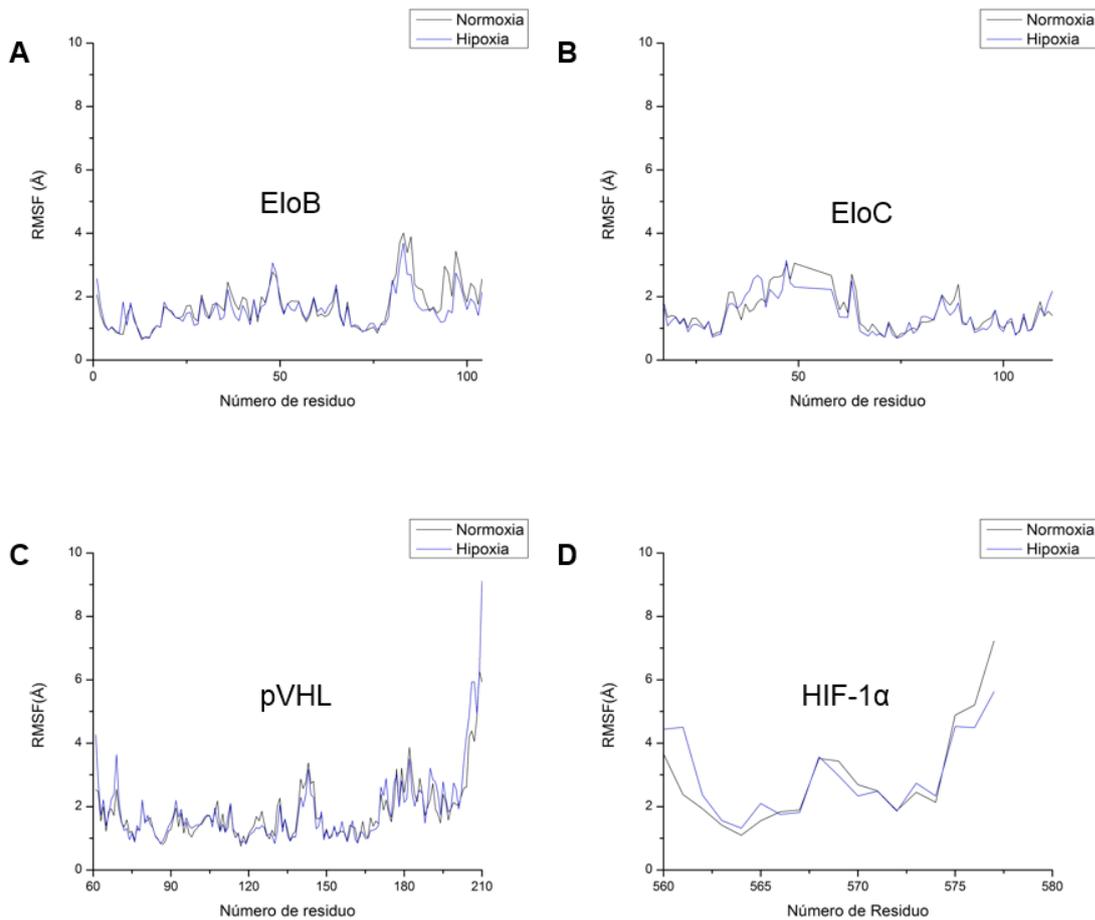


Figura 45- RMSF de cada residuo de Elonguina B (panel A), Elonguina C (panel B), pVHL (panel C) y HIF-1 α (panel D).

Análisis de los enlaces de hidrógeno del complejo VBC-HIF-1 α en normoxia e hipoxia

Los enlaces de hidrógeno (EdeH) son interacciones predominantemente no covalentes (90%), que poseen 10% de carácter covalente que define su direccionalidad. Los EdeH son responsables parcialmente de la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas. Son una de las posibles interacciones entre las cadenas laterales de los aminoácidos que median las interacciones proteína-proteína.

En condiciones de hipoxia no se pueden formar los enlaces de hidrógeno entre pVHL y HIF-1 α que se encuentran mediados por el oxígeno de la hidroxiprolina, lo cual contribuye a la desestabilización de este complejo. A su vez, en hipoxia se forman mayor cantidad de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre residuos de pVHL.

En concordancia con lo reportado por Hon *et al*¹¹⁷, en condiciones de normoxia se observa que una molécula de agua participa en la red de enlaces de hidrógeno entre pVHL y HIF-1 α (**figura 46**). En condiciones de hipoxia esta molécula de agua no se encuentra presente en la interfaz pVHL- HIF-1 α .

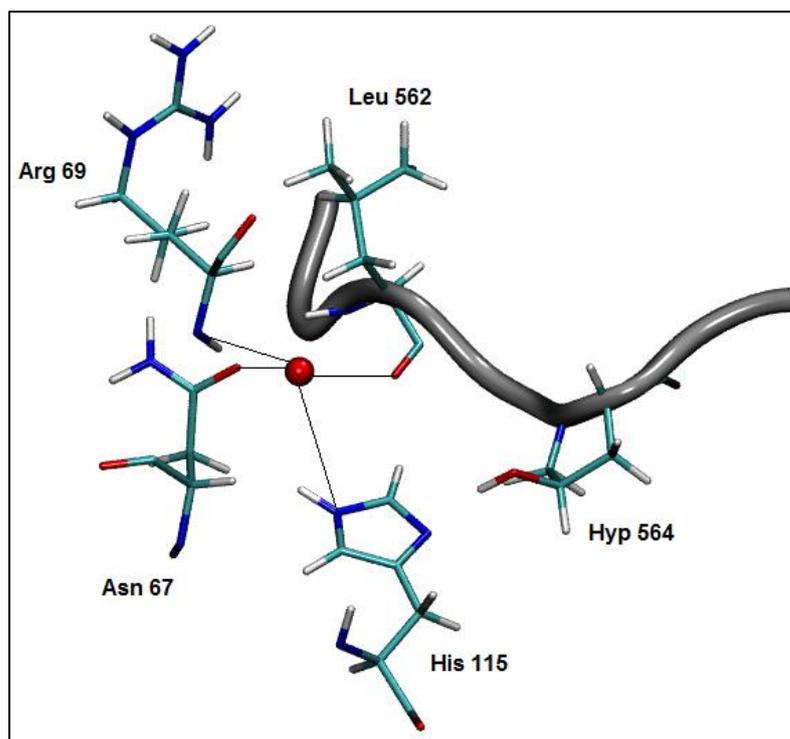


Figura 46- Red de enlaces de hidrógeno entre pVHL y HIF-1 α mediada por una molécula de agua en normoxia. El agua (marcada como esfera roja) participa formando EdeH con los residuos de pVHL: Asn 67, Arg 69, His 115, y con el residuo Leu 562 de HIF-1 α . En gris: fragmento de HIF-1 α .

Cambios estructurales en el péptido HIF-1 α y complementariedad de superficies en normoxia e hipoxia

En normoxia (Hyp564) HIF-1 α se dispone en una conformación extendida que favorece su posicionamiento en el surco de unión de pVHL. En hipoxia, el residuo Prolina causa una pequeña torsión que podría alterar la complementariedad con el surco de pVHL (**figura 47**). La sustitución de Hidroxiprolina por Prolina altera la complementariedad electroestática entre HIF-1 α y pVHL debido a una diferente orientación del dominio *N*-terminal. El plegamiento de la Metionina 561 (Met561) sobre la Tirosina 565 (Tyr565) favorece el potencial electrostático positivo y complementariedad observados en normoxia (**figura 47**).

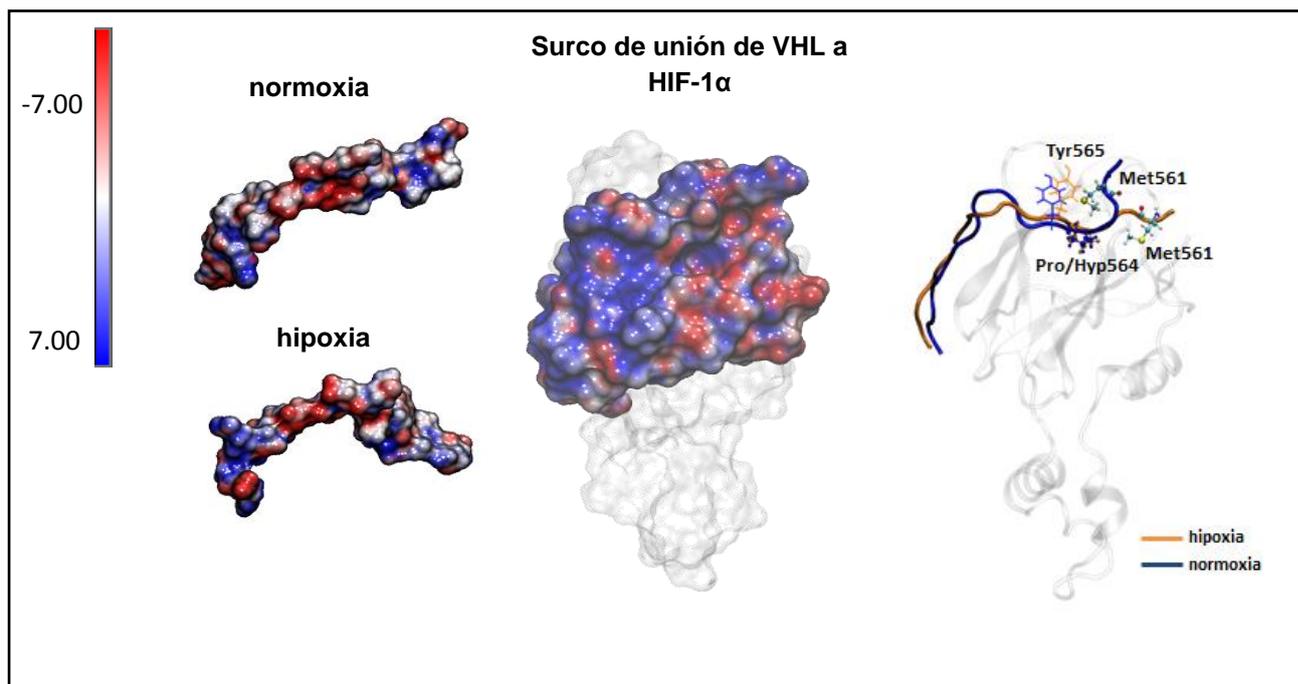


Figura 47-Conformación del péptido HIF-1 α en normoxia e hipoxia. Se marca en colores el potencial electrostático en la superficie molecular de Connolly. La unidad del potencial es kT/e .

Cálculo de la energía de unión con MM-PBSA/MM-GBSA

Para calcular la energía de unión de cada complejo, se obtuvieron estructuras representativas de cada uno de sus integrantes, por medio de *snapshots* tomados a intervalos de 5 ps de la parte estable de la trayectoria de la DM de los complejos. A partir de estos *snapshots* se estimó la energía libre (G) para cada complejo y sus integrantes utilizando la herramienta MMPBSA.py de AMBER 14. Estas energías se calcularon utilizando dos modelos de solvente implícito (que tratan al solvente como un medio continuo): Poisson-Boltzmann (PB) y Born Generalizado (GB). La contribución electrostática del solvente se puede calcular mediante la resolución de la ecuación de Poisson-Boltzmann o su aproximación (modelo de Born Generalizado).

Tabla 9- ΔG de unión en normoxia e hipoxia calculados por MM-PBSA y MM-GBSA.

Método	ΔG unión (kcal/mol) Normoxia	ΔG unión(kcal/mol) Hipoxia	$\Delta[\Delta G$ unión] normoxia-hipoxia(kcal/mol)
MM-PBSA	-22,72±0,19	-3,40±0,20	-19,32
MM-GBSA	-83,89±0,15	-70,21±0,22	-13,68

Los resultados obtenidos indican que la formación del complejo en ambas situaciones es termodinámicamente favorable, ya que presentan un ΔG negativo (**tabla 9**). Ambas metodologías, si bien varían en los valores de energía, coinciden en que en hipoxia el complejo VBC-HIF-1 α es menos estable que en normoxia dado que posee una energía de unión mayor. En base a los resultados obtenidos por otros autores, que han demostrado que los resultados teóricos obtenidos por MM-PBSA muestran una buena correlación con los valores obtenidos experimentalmente^{242–244}, es que elegimos esta metodología para estudiar nuestras variantes.

En nuestro trabajo la temperatura utilizada fue 310 K (37 °C) para simular las condiciones fisiológicas y la diferencia de energía libre de interacción VBC-HIF-1 α obtenida por MM-PBSA es de -19,32 kcal/mol entre la formación del complejo en normoxia e hipoxia. Hon *et al*¹¹⁷ han determinado experimentalmente que existe una diferencia de energía libre de interacción VBC- HIF-1 α de -4.0 kcal/mol (a 298 K) entre la formación del complejo en normoxia e hipoxia. Esta diferencia entre los resultados teóricos y experimentales podría deberse a que no consideramos la entropía, ya que partimos del supuesto que afectaría de igual manera a ambos sistemas en estudio y al calcular el $\Delta\Delta G$ de unión nos independizaríamos de esta variable. Aunque nuestros cálculos teóricos no han podido reproducir el valor del resultado experimental, tienen el mismo significado en cuanto a que el complejo VBC-HIF-1 α es más inestable en hipoxia que en normoxia.

Aplicación de esta metodología computacional para el estudio de las variantes P138R y L163R de pVHL

Como se mencionó al inicio del Capítulo 2, las variantes de pVHL de interés en esta tesis (P138R y L163R) se encuentran en distintas regiones de la proteína. En la **figura 48** se marcan las posiciones de la Prolina y Leucina sustituidas en cada caso.

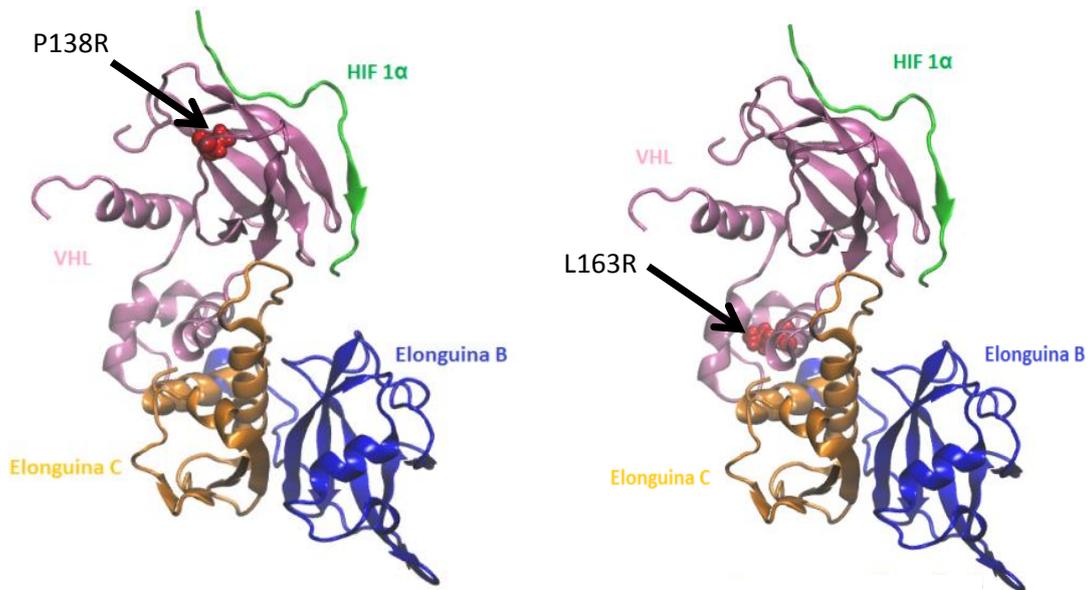


Figura 48-Ubicación de las variantes P138R y L163R de pVHL. Se representan HIF-1 α (verde), pVHL (rosa), Elonguina C (Amarillo) y Elonguina B (Azul). El panel de la izquierda representa la estructura del complejo VBC unido al fragmento de HIF-1 α . La flecha señala a la representación en color rojo de la Prolina que es sustituida en la variante P138R de pVHL. El panel de la derecha representa el complejo pero en este caso la flecha marca en color rojo el residuo Leucina que es sustituido por Arginina en la variante L163R. Figura realizada con el software VMD.

Simulaciones de Dinámica Molecular clásica de los complejos VBC-HIF-1 α con las variantes P138R y L163R de pVHL en solución acuosa

Para el estudio de los complejos formados por las variantes de pVHL fueron necesarios 30 ns de dinámica molecular. Los gráficos de RMSD obtenidos se muestran en la **figura 49**.

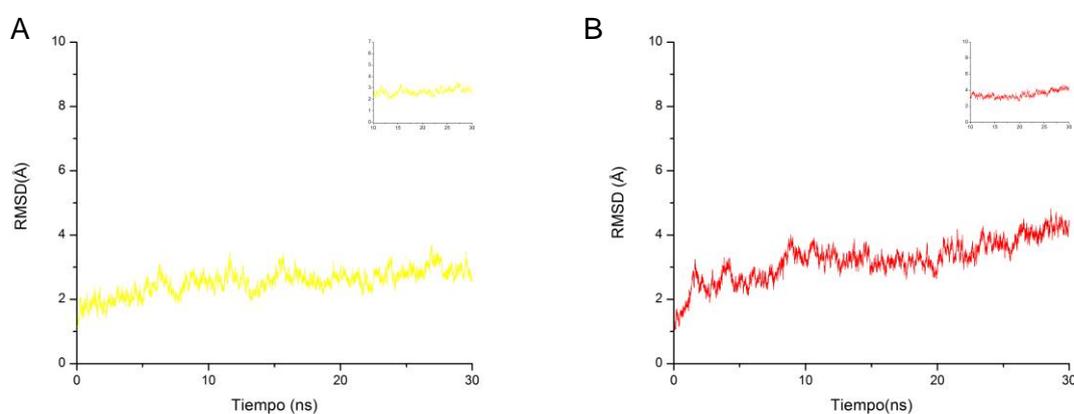


Figura 49-RMSD en función del tiempo para el sistema formado por P138R (panel A) y L163R (panel B). La figura pequeña en cada gráfico muestra solamente la zona estabilizada en cada caso.

Tanto el cambio de Prolina por Arginina en la posición 138, como el de Leucina por Arginina en la posición 163 de pVHL repercuten sobre toda la estructura del complejo VBC-HIF-1 α . En la **figura 50** se muestra la superposición de la estructura de cada uno de los complejos VBC-HIF-1 α formado por las variantes de pVHL con el formado por pVHL nativa.

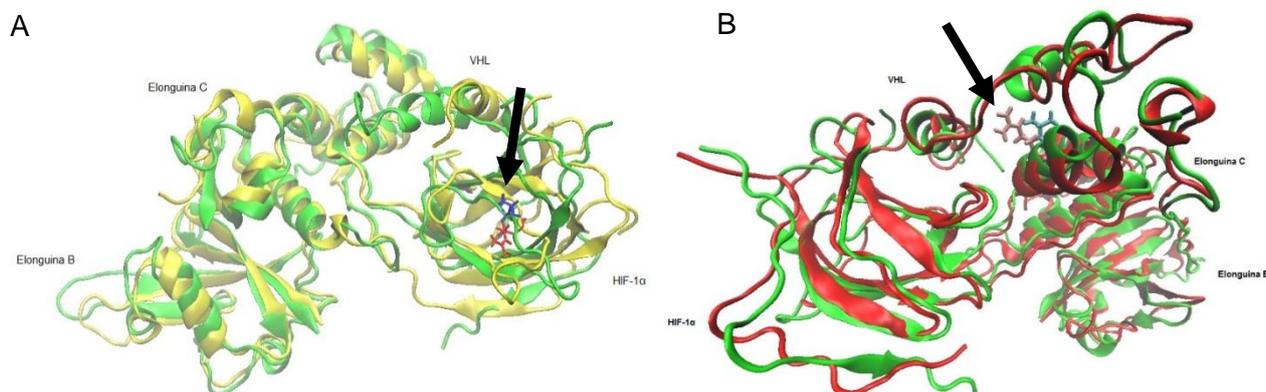


Figura 50- Superposición de las estructuras obtenidas. Panel A-P138R: En color verde se representa al complejo formado por pVHL nativa, y en amarillo el complejo formado por pVHL-P138R. La flecha marca el residuo 138, Prolina (azul) para pVHL nativa y Arginina (rojo) en P138R-pVHL. **Panel B-L163R:** En color verde se representa al complejo formado por pVHL nativa, y en rojo el complejo formado por pVHL-L163R. La flecha marca el residuo 163, Leucina (celeste) para pVHL nativa y Arginina (rosa) en L163R-pVHL. Nótese que la orientación de los paneles A y B es diferente, esto se debe a la dificultad en la visualización de ambas variantes desde el mismo ángulo, ya que se encuentran en diferentes regiones de pVHL.

Los cambios en la estructura de la variante P138R se propagan en ambos sentidos de la proteína, hacia el *N* y *C* terminal, siendo más notoria en los residuos 138-145 y 191-210, ubicados desde la variante hacia el *C* terminal de la proteína (**figura 51**).

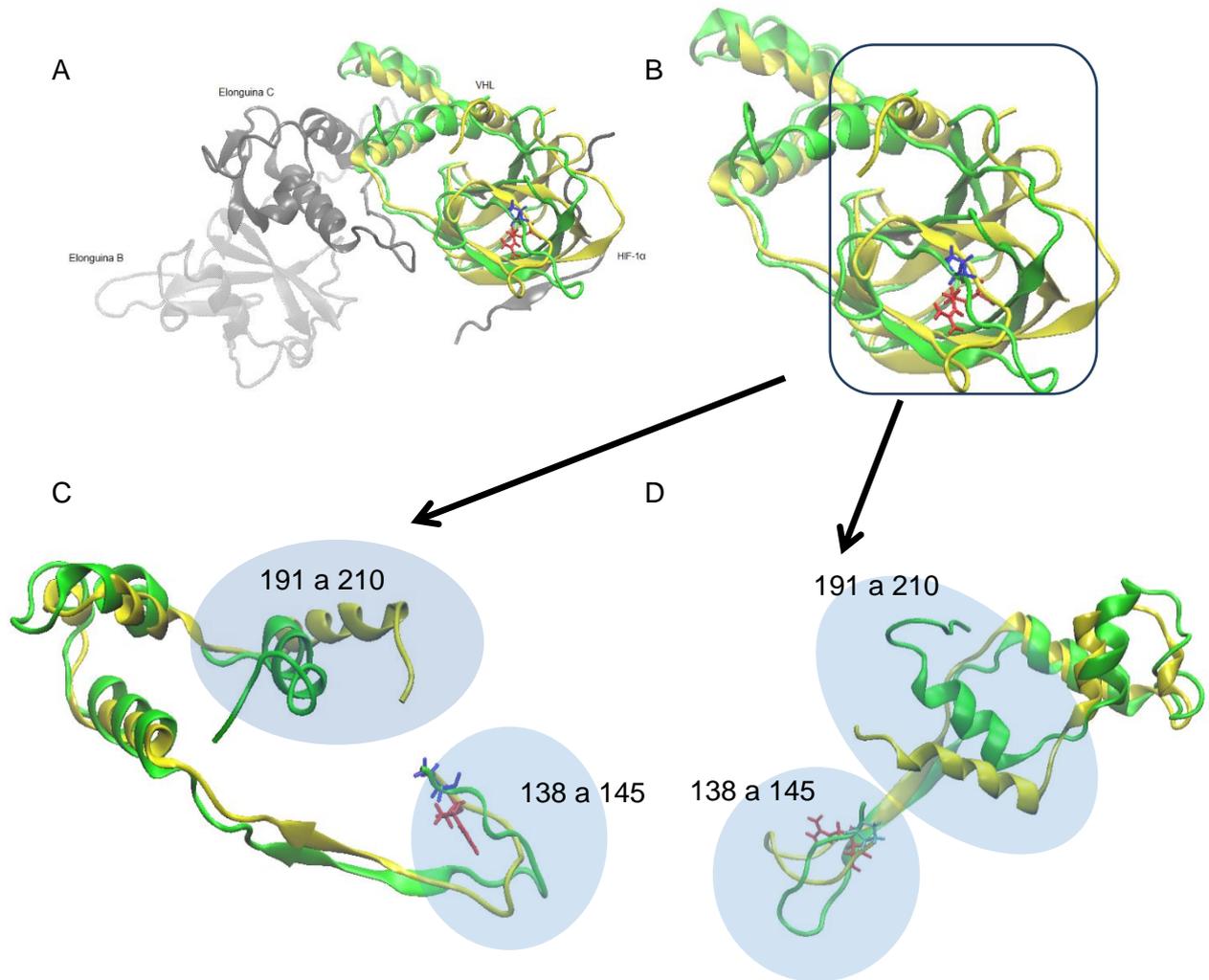


Figura 51- Superposición de los complejos VBC-HIF-1 α formados por pVHL nativa y P138R-pVHL, representados en verde y amarillo respectivamente. La Prolina de pVHL nativa se encuentra dibujada en azul mientras que la Arginina de la variante en rojo. El **panel A** muestra la superposición, marcando en verde y amarillo a la pVHL de cada complejo y al resto de los integrantes en gris. El **panel B** muestra la superposición de pVHL solamente, nativa (verde) y P138R (amarillo). Los paneles **C** y **D** muestran desde dos ángulos diferentes la amplificación de la región marcada en el panel B, los residuos 138 a 210 de pVHL, donde se destacan en el sombreado celeste las regiones que más varían (138 a 145 y 191 a 210).

La Leucina 163 forma parte de una estructura α hélice. Al reemplazarla por Arginina, podría haber sucedido un cambio profundo en esta estructura. Sin embargo, si se mira con mayor aumento la estructura α hélice, la misma no se altera de manera drástica (**figura 52**) pero sí se puede apreciar que la disposición de los aminoácidos posteriores a la Arginina 163 forman una estructura distorsionada respecto de la proteína pVHL nativa, en especial en los residuos 170 a 192 sombreados en violeta (**figura 52** panel C).

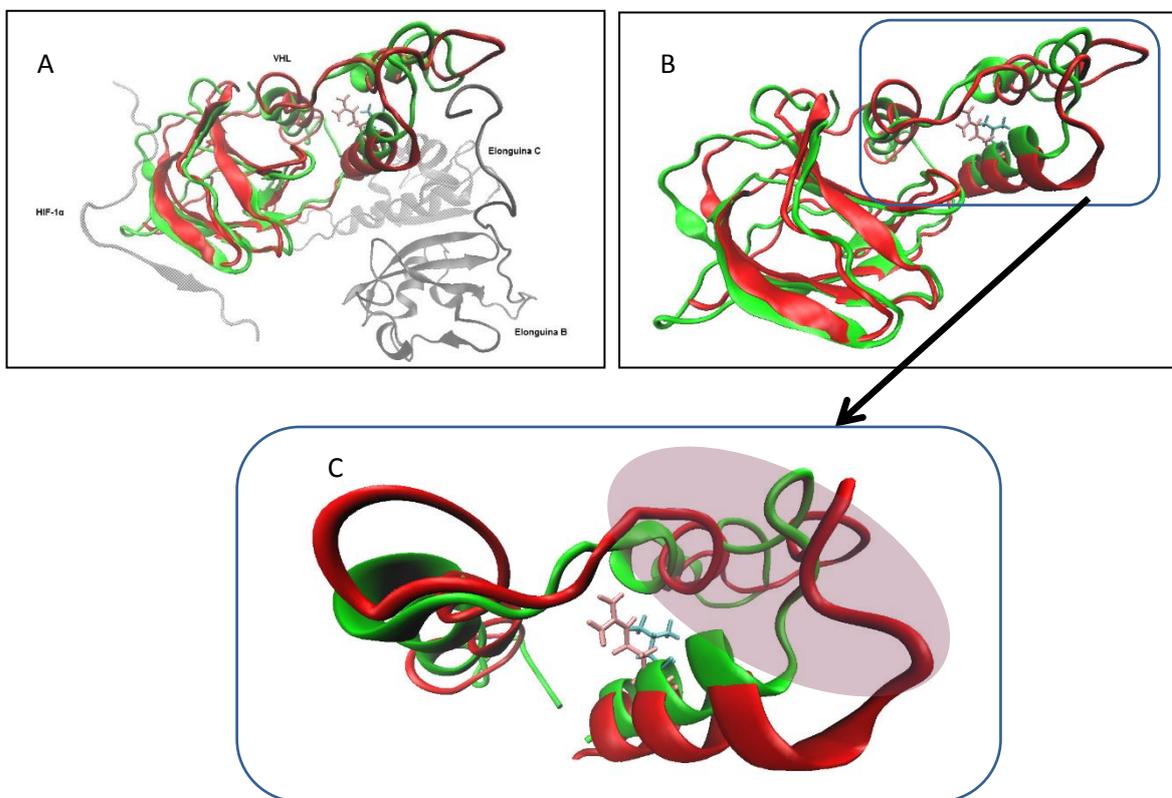


Figura 52- Superposición de los complejos VBC-HIF-1 α formados por pVHL nativa y L163R-pVHL, representados en verde y rojo respectivamente. La Leucina de pVHL nativa se encuentra dibujada en celeste mientras que la Arginina de la variante en rosa. El **panel A** muestra la superposición, marcando en verde y rojo a la pVHL de cada complejo y al resto de los integrantes en gris. El **panel B** muestra la superposición de pVHL solamente, nativa (verde) y L163R (rojo). El **panel C** muestra la ampliación de la región marcada en el panel B, los residuos 158 a 210 de pVHL, donde se destaca en el sombreado violeta la región que más varía (170 a 192).

Al calcular los RMSF, podemos observar un comportamiento similar en pVHL nativa y sus variantes, en todos los componentes del complejo multiproteico VBC-HIF-1 α , salvo regiones específicas detalladas a continuación (**figura 53**).

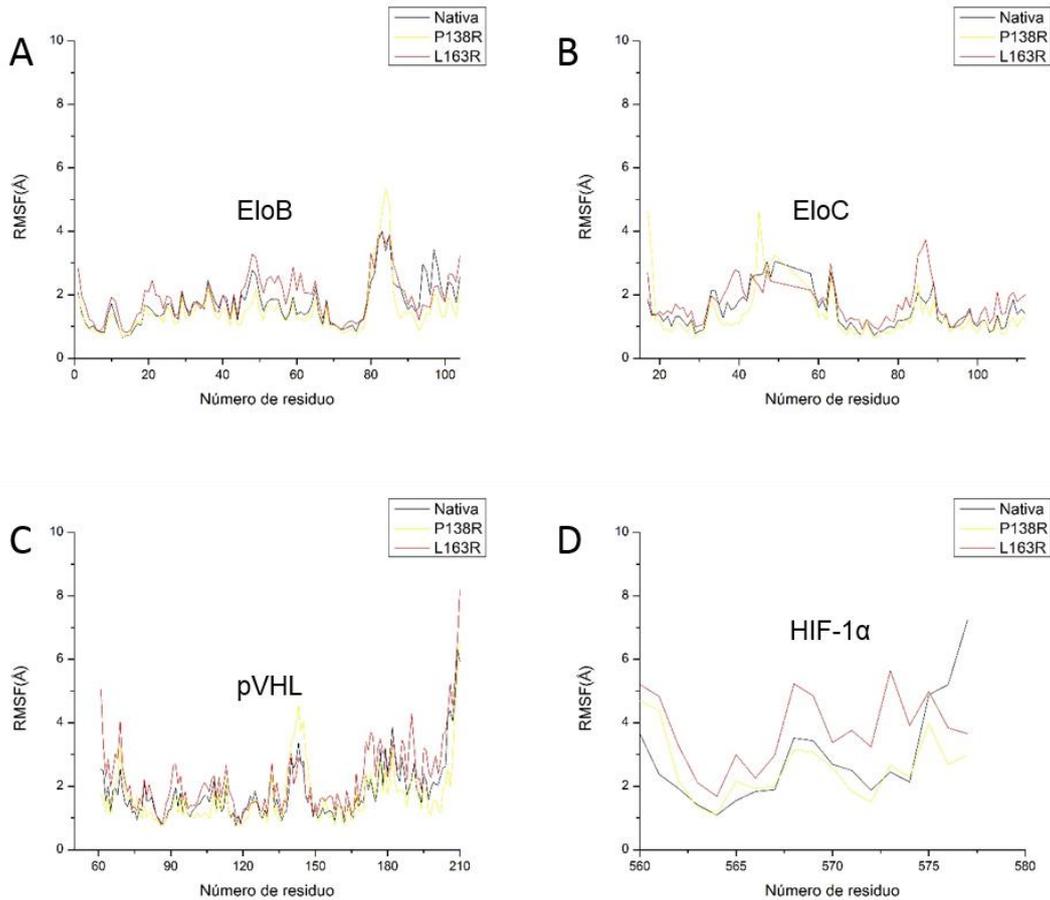


Figura 53-RMSF de cada uno de los integrantes de los complejos VBC-HIF-1 α . Panel A: Elonguina B. Panel B: Elonguina C, Panel C: pVHL. Panel D: HIF-1 α . Gráfico obtenido para el complejo formado por pVHL nativa representado en negro, la variante P138R en color amarillo y L163R en color rojo

Los residuos 190 a 210 de pVHL presentan notoriamente mayor flexibilidad en la variante L163R respecto a la pVHL nativa. Si observamos con detalle esta zona de la proteína, se puede apreciar que la proteína nativa mantiene una α hélice mientras que la L163R la pierde (**figura 54** paneles A y B). En la proteína pVHL nativa se señalan cuatro enlaces de hidrógeno (**figura 54** panel C), que se encuentran presentes en más del 80% de la simulación (Gly93-Gln195: 90.65%,

Asp197-Leu201: 90.55%, Gln203-Ala207:97.85% y Gln203-Ile206: 84.06%) y se pierden en la pVHL-L163R.

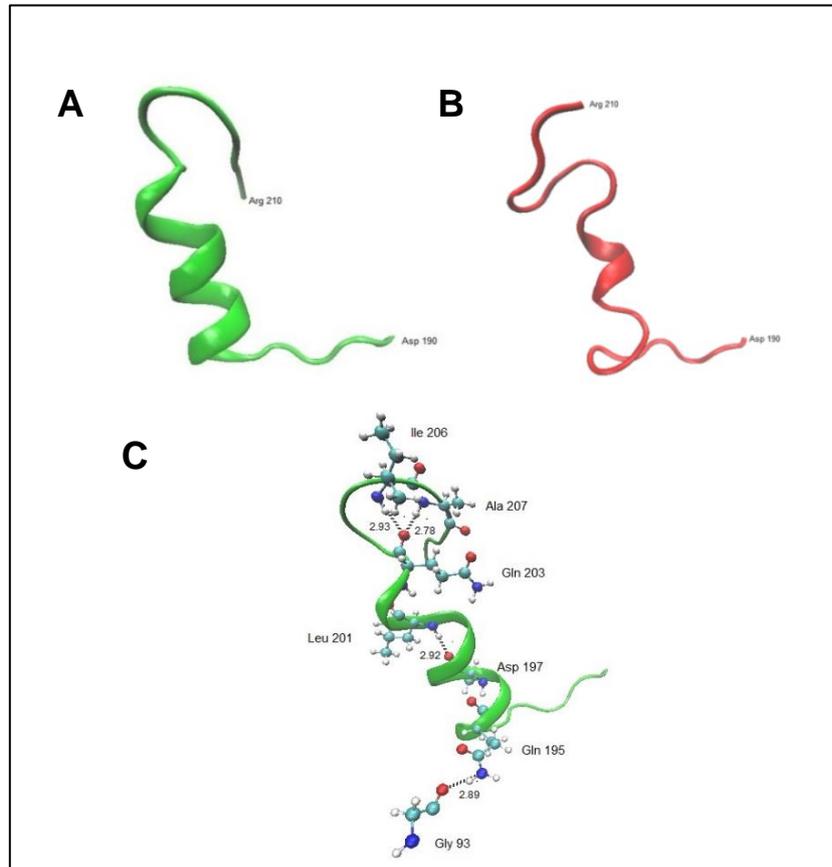
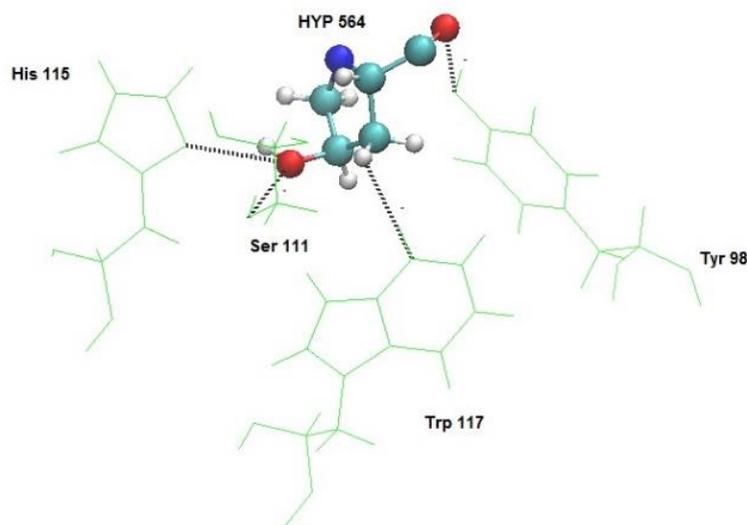


Figura 54-Análisis de la estructura formada por los residuos 190 a 210 de pVHL nativa y L163R-pVHL. Panel A: pVHL nativa. Panel B: L163R-pVHL. Panel C: detalle de los EdeH formados en la pVHL nativa, que se pierden al introducir la variante L163R.

La pérdida de la estructura secundaria y por lo tanto de los EdeH involucrados en mantener la estructura de α -hélice, explican el aumento de flexibilidad observado en esta región en los gráficos de RMSF (**figura 53**).

Análisis de los enlaces de hidrógeno en la interfaz con HIF-1 α

Se evaluaron los enlaces de hidrógeno formados durante los 30 ns de dinámica y se pudo apreciar que existen cambios entre las variantes y la proteína nativa en cuanto a la formación de enlaces de hidrógeno que median la unión con HIF-1 α , tanto en la zona de reconocimiento donde pVHL se une a la hidroxiprolina 564 de HIF-1 α , como en otras regiones de contacto entre pVHL y HIF-1 α . A su vez, el agua que mediaba la interacción entre pVHL nativa y HIF-1 α en condiciones de normoxia (**figura 46**) no se encuentra en la interfaz pVHL-HIF-1 α al analizar las variantes. La tabla de la **figura 55** muestra los EdeH que forma pVHL con la hidroxiprolina (HYP) y la tabla de la **figura 56** otros enlaces entre pVHL y HIF-1 α . La ocupación refiere al porcentaje del tiempo de la simulación que ese enlace se encuentra presente.



Enlaces de Hidrógeno		Nativa		P138R		L163R	
Aceptor	Dador	Distancia(Å)	Ocupación(%)	Distancia(Å)	Ocupación(%)	Distancia(Å)	Ocupación(%)
His115@ND1	Hyp564@OD1	2,97	94,7	2,9	83,9	2,92	92,95
Hyp564@OD1	Tyr98@OH	2,83	85,4	2,82	50,1	2,85	80
Hyp564@HB2	Trp117@CZ2	3,27	54,5	3,27	31,2	3,23	53,74
Hyp564@OD1	Ser111@OG	2,73	58,4	2,77	10,9	2,76	92,8

Figura 55- Enlaces de Hidrógeno entre pVHL y el residuo HYP 564 de HIF-1 α . El panel superior muestra una figura de esta red de enlaces de hidrógeno en la cual se señalan los residuos de pVHL: Tyr 98, Ser 111, His 115, Trp 117 y de HIF-1 α : HYP 564. El panel inferior una tabla que muestra la distancia de enlace y porcentaje de ocupación de estos enlaces de hidrógeno en los 30 ns de simulación.

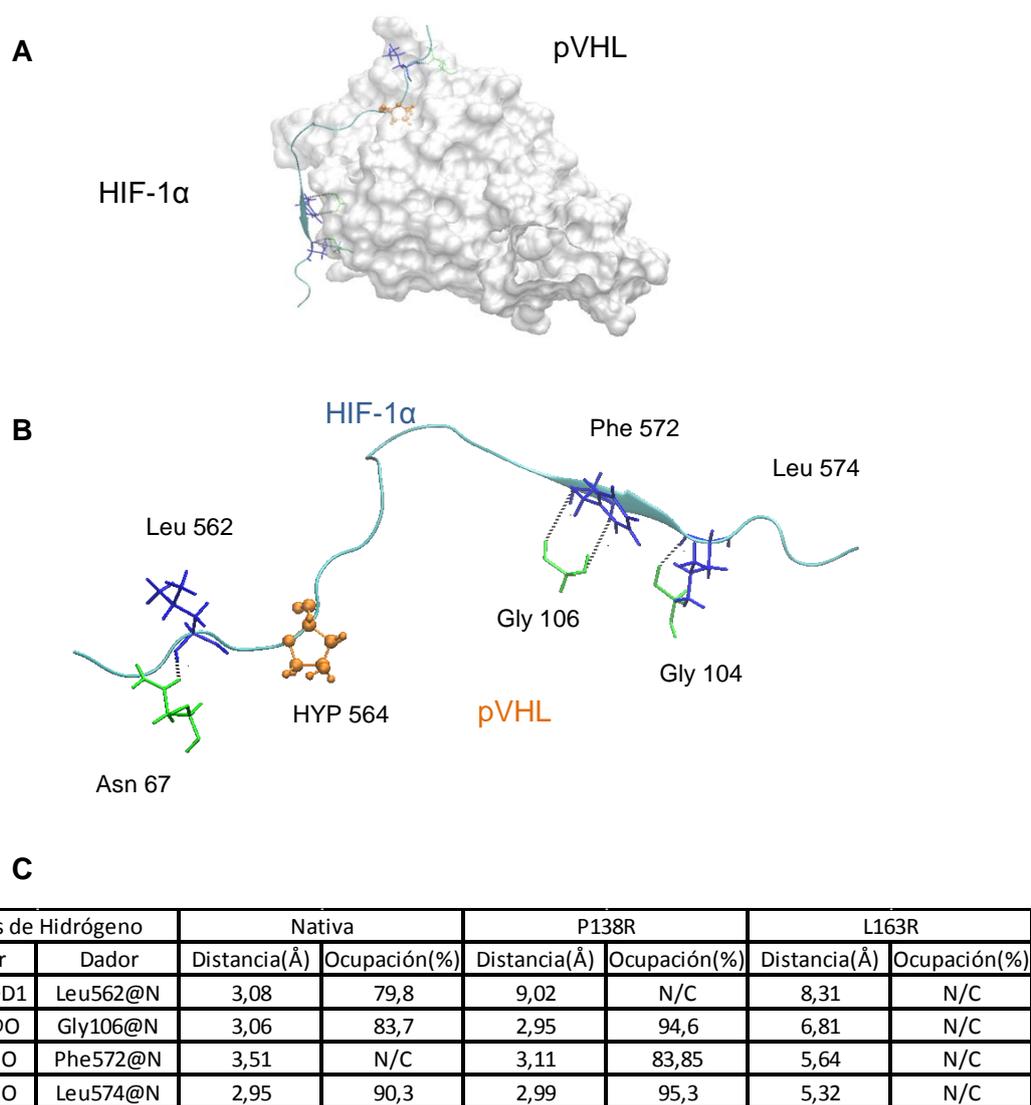


Figura 56- EdeH entre pVHL y HIF-1 α que no involucran a la Hyp 564. **Panel A:** superficie de pVHL en gris, y HIF-1 α representada como cinta en el costado izquierdo. **Panel B:** Representación de HIF-1 α como cinta, destacándose en azul los residuos que pertenecen a HIF-1 α y en verde los que pertenecen a pVHL, que participan formando 4 enlaces de hidrógeno entre estas proteínas. Se representa en color naranja a la hidroxiprolina en este esquema solo para utilizar como referencia para la ubicación de los residuos que participan en estos EdeH. **Panel C:** se muestra el porcentaje de ocupación en los 30 ns de simulación de los enlaces de Hidrógeno entre pVHL y HIF-1 α . El símbolo N/C indica que no corresponde ya que la distancia es mayor a 3,5 Å (entre dador y aceptor).

Si observamos la tabla de la **figura 55** podemos apreciar que existe una disminución importante (>20%) en el porcentaje de ocupación de tres de los cuatro EdeH al introducir la variante P138R-pVHL.

Por otra parte, observamos otros cuatro enlaces de hidrógeno en la interfaz pVHL-HIF-1 α , que no involucran a la hidroxiprolina(**figura 56**). Si comparamos el % del tiempo de la simulación (% de ocupación) en el que estos enlaces están formados en los tres complejos (tabla de la **figura 56**) podemos observar que P138R-pVHL al igual que pVHL nativa mantiene 3 EdeH con HIF-1 α en esta región, con la diferencia que pierde el que se forma entre la Asn67 de pVHL y Leu562 de HIF-1 α , pero mantiene el enlace entre Gly106 de pVHL y Phe572 de HIF-1 α , que en pVHL nativa está a 3.51 Å.

En el complejo VBC-HIF-1 α formado por la variante P138R el residuo Leucina en posición 562 (Leu562) de HIF-1 α adopta una conformación diferente a la que posee en el complejo formado por pVHL nativa (**figura 57**). Esta variación causa la pérdida del EdH entre el N del esqueleto de Leu562 y el O del grupo amida del residuo Asparagina en posición 67 (Asn67) de pVHL, ya que en el caso de la variante los grupos dador y aceptor de EdH se ubican a 9,02 Å.

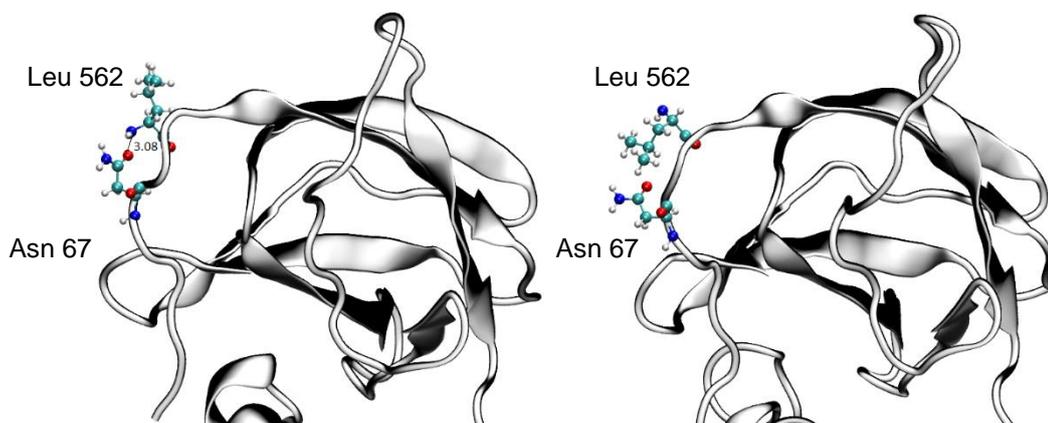


Figura 57-Diferencias en la orientación de los residuos Asn67 de pVHL y Leu562 de HIF-1 α en los complejos VBC-HIF-1 α formados por pVHL nativa (**figura de la izquierda**) y la variante P138R (**figura de la derecha**). En gris se encuentra representada parte de pVHL y en color los residuos involucrados en el EdeH.

Por otro lado, si se observan los porcentajes de ocupación de los EdeH que involucran a la hidroxiprolina (tabla de la **figura 55**) para la variante L163R-pVHL son similares en tres de los cuatro EdeH y en el restante EdeH (entre Hyp564 y Ser 111) se incrementa sorprendentemente, aumentando de 58.4% (pVHL nativa) a 92.8 % (L163R-pVHL).

Sin embargo, para esta misma variante (L163R), cuando observamos los EdeH entre pVHL y HIF-1 α que no involucran a la hidroxiprolina podemos apreciar que existe un incremento importante en las distancias entre los residuos que participan en estos EdeH, imposibilitando esta interacción a lo largo de los 30 ns de la simulación (tabla de la **figura 56**).

Cambios estructurales y complementariedad de superficie de unión a HIF-1 α en las variantes P138R y L163R respecto a la proteína pVHL nativa

Se evaluaron la conformación y el potencial electroestático del complejo con pVHL nativa y los mismos en los complejos que poseen las variantes P138R y L163R de pVHL. Como se muestra en la **figura 58** el sitio de unión de HIF-1 α en el complejo VBC tiene dos regiones claramente definidas con potencial electroestático positivo y negativo que podría estar guiando el reconocimiento y posicionamiento adecuado de HIF-1 α . El cambio de la Leucina 163 por Arginina no sólo afecta el potencial electroestático del sitio de unión a HIF-1 α sino también la distribución de carga total del complejo VBC que adquiere un potencial electroestático más neutro, un hecho que afecta a todos los eventos de reconocimiento molecular. El cambio de la Prolina 138 por Arginina distorsiona el potencial electroestático y además desencadena cambios conformacionales notorios que alteran la zona de unión a HIF-1 α .

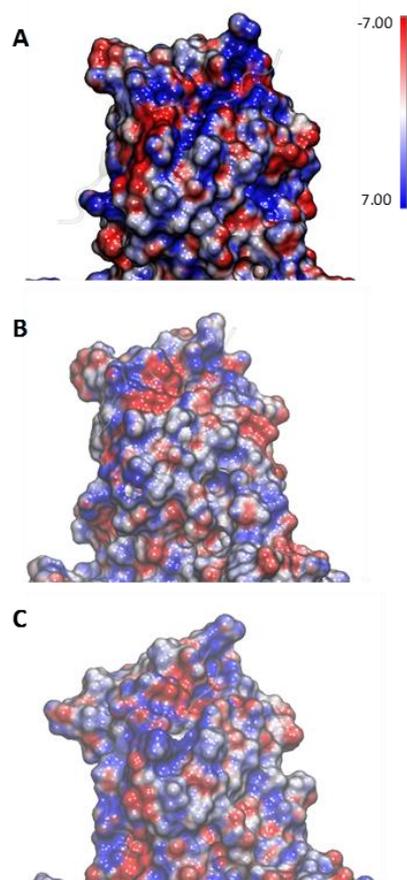


Figura 58- Mapa del potencial electrostático en la superficie molecular de Connolly para el complejo VBC formado por pVHL nativa (panel A), y las variantes de pVHL: L163R (panel B) y P138R (panel C). La barra de color es la misma para las 3 imágenes. Las unidades de potencial son en kT/e .

Cálculo de ΔG de unión de los complejos en solución acuosa

Al igual que para el complejo formado por pVHL nativa en normoxia e hipoxia, para los complejos formados por las variantes se obtuvieron estructuras representativas de cada uno de sus integrantes a partir de *snapshots* a intervalos de 5 ps de la parte estable de la trayectoria de la DM de los complejos. Utilizando estos *snapshots* se estimó la energía libre (G) para cada complejo y sus integrantes (**tabla 10**).

Tabla 10- Cálculo de ΔG (MM-PBSA) de unión en solución acuosa para los diferentes complejos VBC unidos a HIF-1 α .

Complejo VBC- HIF-1 α integrado por pVHL	ΔG unión (kcal/mol) Normoxia	$\Delta[\Delta G$ unión] nativa-variante(kcal/mol)
Nativa	-22,72 \pm 0,19	-
P138R	-10,92 \pm 0,23	-11,8
L163R	-19,64 \pm 0,19	-3,08

Los ΔG de unión entre HIF-1 α y cada una de las variantes del complejo VBC mostrados en la **tabla 10** fueron calculados utilizando MM-PBSA. Se puede observar que los complejos formados por las variantes P138R y L163R poseen energías de unión intermedias entre el complejo formado por pVHL nativa en situación de normoxia (-22.72 kcal/mol) e hipoxia (-3.40 kcal/mol).

El complejo formado por la proteína VHL nativa posee un ΔG de unión más negativo (-22.72 kcal/mol) y por lo tanto más favorable que los complejos formados por las variantes P138R y L163R (-10.92 y -19.64 kcal/mol respectivamente). Podemos notar que ambas mutaciones causan una disminución en la estabilidad del complejo formado siendo el efecto más notorio para la variante P138R, la cual posee un $\Delta[\Delta G \text{ unión}]$ mayor en términos absolutos. Esta diferencia entre las variantes podría haber sido anticipada, ya que la variante P138R se encuentra más cercana a la zona de interacción pVHL-HIF-1 α que la L163R.

Este resultado es consistente con los análisis de los EdeH y potencial electroestático que mostraron una disminución (>20%) en el porcentaje de ocupación de tres EdeH (**figura 55**) y pérdida de un EdeH (**figuras 56 y 57**) y distorsiones del potencial electroestático y cambios conformacionales notorios que alteran la zona de unión a HIF-1 α , más notorios para P138R que para L163R.

Características de las lisinas 159, 171 y 196 de pVHL-blanco de modificaciones post-traduccionales.

Como se mencionó en la Introducción, pVHL es modificada post-traduccionamente. Estas modificaciones (ubiquitinación, SUMOilación y NEDDilación) involucran la conjugación de las moléculas de interés a las lisinas 159, 171 y 196. Por ello, decidimos evaluar qué sucedía con estas lisinas al introducir las variantes, con el objeto de especular si serían más o menos susceptibles a estas modificaciones.

Al superponer cada una de las variantes con la pVHL nativa se observan diferencias en la orientación de estas lisinas (**figura 59**).

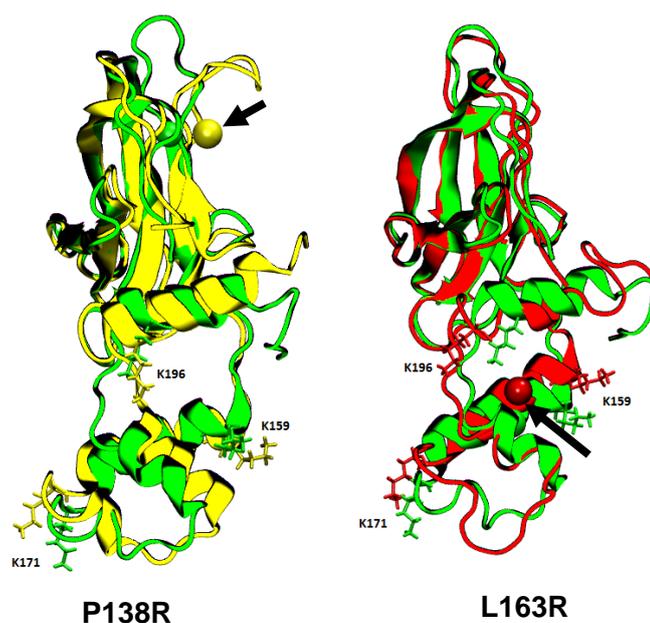


Figura 59- Conformación de las lisinas (K) 159, 171 y 196 de pVHL. Se observa la superposición de pVHL nativa (representada en color verde) con la variante P138R y la variante L163R (representadas en amarillo y rojo respectivamente). Las esferas amarilla y roja (señaladas por flechas) marcan la ubicación de los residuos involucrados en las variantes (138 y 163 respectivamente).

Para observar si estas diferencias de orientación podrían repercutir en su posibilidad de ser blanco de las modificaciones post-traduccionales mencionadas, decidimos calcular la superficie expuesta al solvente (SASA, del inglés *Solvent-Accessible Surface Area*) para cada una de las tres lisinas de las variantes y pVHL

nativa de modo de compararlas entre sí. Como se puede apreciar en la **figura 60**, la lisina 159 muestra una exposición al solvente similar en las tres estructuras de pVHL analizadas, mientras que la lisina 171 se encuentra más expuesta en el caso de la variante L163R y la lisina 196 menos expuesta en la variante P138R. Estas diferencias podrían sugerir que la variante L163R se encuentre más expuesta a estas modificaciones, en especial a la SUMOilación que ocurre preferentemente en esta posición, mientras que la variante P138R se encuentre menos expuesta a estas en la lisina 196.

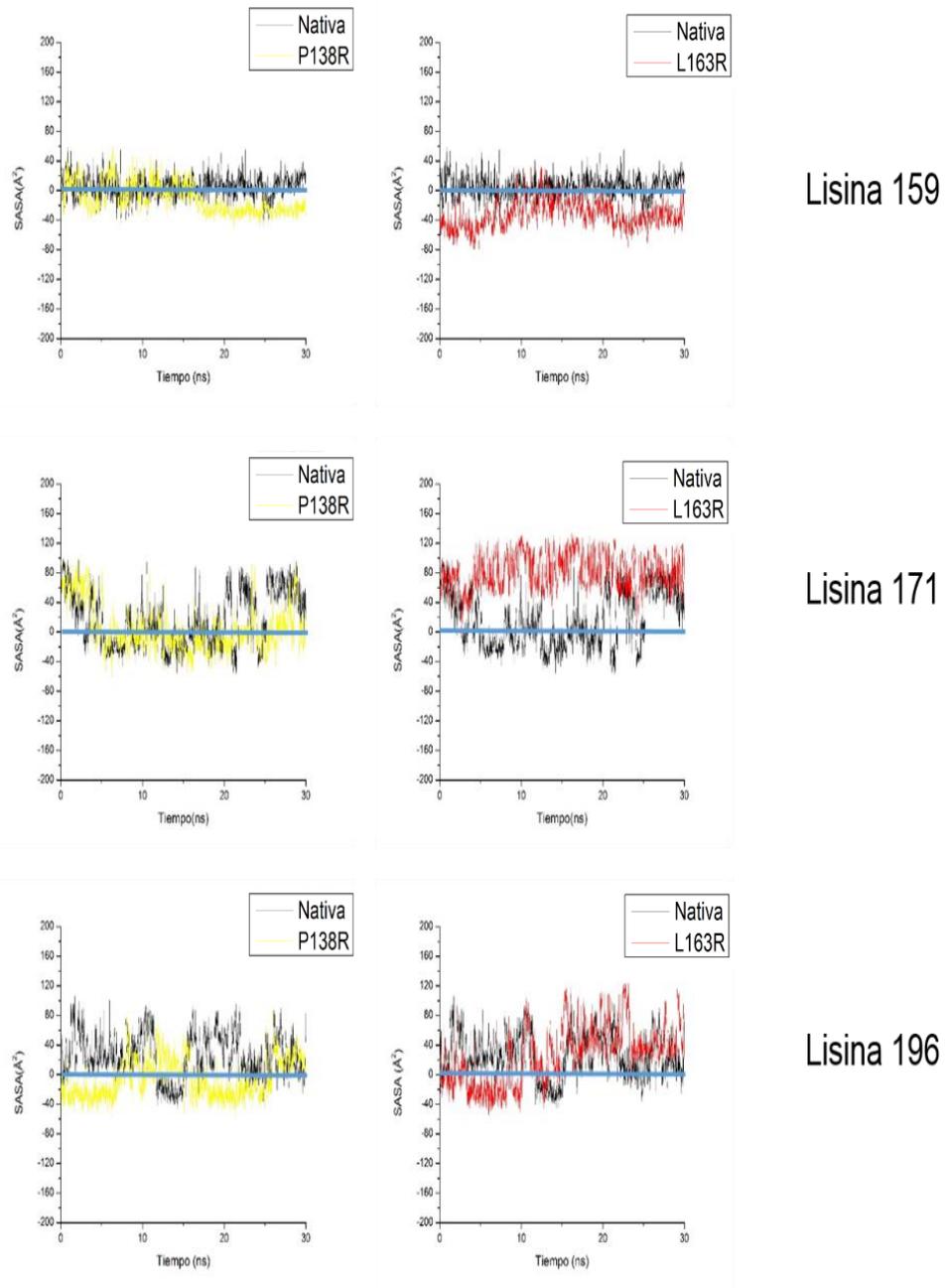


Figura 60-Exposición al solvente de las lisinas 159, 171 y 196 de pVHL. Se observan los gráficos que muestran la superficie expuesta al solvente (SASA) en función del tiempo de simulación para cada lisina, comparando las variantes P138R y L163R (representadas en amarillo y rojo respectivamente) con la pVHL nativa (representada en color verde). Los valores mayores a 0 de SASA indican exposición al solvente, mientras que valores iguales o menores a 0 indican que el residuo no se encuentra expuesto al solvente. Para facilitar la visualización de estos gráficos se marcó en azul una línea en cada uno de ellos en el valor 0 de SASA, de modo de poder diferenciar rápidamente la exposición del residuo.

En resumen, los estudios *in silico* descritos en la presente sección han demostrado detalladamente cómo los cambios de un único aminoácido de pVHL en las variantes P138R y L163R se propaga a lo largo de toda la estructura de todo el complejo VBC-HIF-1 α , alterando la red de enlaces de hidrógeno formada entre pVHL y HIF-1 α , así como el potencial electrostático de pVHL, y la energía de unión entre el complejo VBC y HIF-1 α . Aun existiendo cambios en la estructura e interacciones, los complejos VBC formados por las variantes a HIF-1 α poseen una energía de unión (ΔG) negativa, indicando que esta unión es termodinámicamente favorable.

CAPÍTULO 2

DISCUSIÓN

En este capítulo hemos caracterizado *in vitro*, *in vivo* e *in silico* a las variantes P138R y L163R de pVHL. El primer obstáculo que afrontamos fue la generación de las líneas celulares que expresan la pVHL nativa y las variantes a partir de la línea 786-0. Si bien se encuentran disponibles otras líneas celulares que no expresan una pVHL funcional como por ejemplo: A-498, RCC4 y RCC10, se eligió la línea 786-0, ya que es la más utilizada según la información disponible en la base de datos Human Gene Mutation Database (HGMD®⁵⁷). En esta base de datos se incorpora cada nueva mutación o variante en un gen de interés luego de la publicación, detallando si ha sido caracterizada funcionalmente. En una muestra de 30 artículos (entre los años 1995 y 2015) que se refieren a la caracterización funcional variantes del gen: 28 de éstos, utilizan la línea celular 786-0, lo cual representa aproximadamente el 93% de las publicaciones mencionadas. Como desventaja, esta línea celular posee una muy baja eficiencia de transfección lo que dificulta la utilización de los métodos más tradicionales para la obtención de las líneas con expresión de las variantes en estudio. Luego de numerosos intentos fallidos, se recurrió a la utilización de Retrovirus para lograr la infección de las células con los plásmidos de interés y así establecer las líneas que expresan de manera estable la pVHL nativa y las variantes. Otros autores, al igual que nosotros, han recurrido a la utilización de Retrovirus para la generación de líneas celulares derivadas de 786-0 con resultados satisfactorios^{112,205,220,245-249}.

Como se mencionó en los resultados, se observó por Western Blot una disminución en la cantidad de proteína en las líneas celulares expresando las variantes respecto a la que expresa pVHL nativa. Una posible explicación podría ser que se expresara menor cantidad de ARNm. Verificamos la expresión de los vectores y observamos que era similar e incluso significativamente mayor para las

variantes, por lo tanto estos niveles diferentes de proteína no podían ser explicados por una menor transcripción a ARNm. Otra posibilidad para explicar esta diferencia de nivel proteico podría ser un problema en la síntesis o en la degradación. Al inhibir la síntesis *de novo* mediante el uso de cicloheximida, se estudió cómo se degradan las proteínas y se demostró que ambas variantes presentan una vida media muy reducida respecto a la pVHL nativa siendo estas de aproximadamente 1,2 hs (P138R) y 1 hs (L163R), mientras que la proteína nativa tiene una vida media de ≈ 3.4 hs. Al construir los gráficos y calcular la vida media las bandas obtenidas en el Western Blot, nos independizamos de los niveles iniciales de cada proteína pVHL ya que relativizamos las bandas obtenidas para cada línea en los distintos puntos del tratamiento respecto a su tiempo 0. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por otros autores quienes han demostrado esta disminución en la estabilidad de otras variantes de pVHL: S65W²⁴⁵, N78S²⁴⁵, Y98H^{245,250}, W117A¹¹², P138L⁸⁴, V155A²⁵¹, L158P²⁴⁵, L158Q²⁵¹, Q164R²⁵¹, R167Q^{245,246}, R167W²⁵⁰, L188Q²⁴⁵, L188V²⁵¹, H191D⁸⁴. Existen grandes diferencias entre los autores respecto al valor absoluto en horas de la vida media de la pVHL nativa y de las variantes, incluso entre los que utilizan la misma cantidad de cicloheximida (50 μ g/ml). Entonces, para poder comparar nuestros resultados con los obtenidos por otros grupos, se calculó la relación entre el tiempo de vida media de la pVHL nativa y las variantes, siendo esta relación de 2.8 (P138R) y 3.4 (L163R) aproximadamente. En el caso de la variante P138R, Lanikova *et al*⁸⁴ han descrito la variante P138L en la cual la Prolina 138 es sustituida por Leucina, obteniéndose resultados que en valor absoluto son diferentes a los nuestros pero la relación entre la vida media de la variante y la proteína nativa podría asemejarse a lo obtenido en nuestro trabajo. Sin embargo, a nivel experimental, un detalle no menor del trabajo citado es que

al cabo del tiempo máximo de tratamiento (10 hs), la proteína pVHL nativa sigue estando a más de 60% de su nivel original. En este sentido, nuestro trabajo tiene la fortaleza de poder concluir sin dudas respecto a la vida media de ambas proteínas. Si comparamos las mutaciones cercanas a la variante en posición 163: Park *et al*²⁵¹ han mostrado que la vida media de Q164R se ve reducida ≈ 3 veces en comparación con la de la pVHL nativa, mientras que la de las variantes V155A y L158Q $\approx 5.5-6$ veces. Ding *et al*²⁴⁶ han demostrado que la vida media de R167Q se reduce aproximadamente 3 veces comparado con la pVHL nativa (130 minutos pVHL nativa vs 40 minutos). Los resultados obtenidos por Bangiyeva *et al*²⁴⁵ muestran que al cabo de las 2 hs de tratamiento con CHX, los niveles de las variantes L158P y R167Q disminuyen drásticamente y se vuelven muy bajos o indetectables por Western Blot. Este resultado se asemeja al obtenido en nuestro laboratorio en términos absolutos de tiempo. Sin embargo, en este trabajo los datos no permiten calcular la vida media de las proteínas mencionadas (nativas y variantes) ya que los tiempos utilizados no son los adecuados para mostrar el descenso al 50% de la cantidad inicial de proteína.

Por otro lado, al utilizar el inhibidor del proteasoma MG132 se observó la acumulación de pVHL a las 4 y 8 horas de tratamiento tanto de la nativa como de las variantes. Ambas variantes incrementaron sus niveles de pVHL acumulada en mayor proporción que la pVHL nativa. Este resultado sugiere que la degradación por el proteasoma de las variantes P138R y L163R es responsable al menos en parte por los niveles menores de proteínas observadas como consecuencia de sus vidas medias disminuidas respecto a la pVHL nativa.

El mecanismo más estudiado de regulación de la degradación pVHL por el proteasoma 26S es la poliubiquitinación mediada por UCP. Otros autores han

demostrado que UCP media la degradación de variantes de pVHL tales como V155A, L158Q y Q164R²⁵¹.

Se ha postulado que mutaciones que alteran a los residuos lisina (blanco de la ubiquitinación) de pVHL podrían aumentar la vida media, dada la imposibilidad de ser modificadas y por lo tanto ser blanco de degradación. Si bien las variantes caracterizadas en este estudio no involucran en forma directa las lisinas mencionadas, una posibilidad es que su entorno se vea perturbado, favoreciendo su exposición y por lo tanto su modificación. En particular en el caso de la variante L163R, los estudios *in silico* indican que la lisina 171 de la misma se encuentra más expuesta al solvente que la misma lisina en la pVHL nativa lo cual podría favorecer su poliubiquitinación. En el caso de la variante P138R la diferencia obtenida *in silico* es una menor exposición al solvente de la lisina 196, resultado que no favorecería el mecanismo mencionado anteriormente. Se desconoce por qué UCP poliubiquitina más a las mutantes que a pVHL nativa²⁵¹. Dado que no se ha demostrado con qué región de pVHL interactúa UCP, se podría especular que ésta región varía su conformación cuando se introducen cambios en la proteína y aumenta la afinidad de UCP por pVHL, lo cual podría marcar el aumento de la degradación de las mutantes en comparación con la pVHL nativa.

Como se mencionó en la introducción, inhibidores del proteasoma como el bortezomib están siendo utilizados en ensayos clínicos para el tratamiento de la enfermedad de VHL. Algunos autores sugieren que actuar sobre UCP podría resultar en una terapia para mutaciones que son funcionales en reconocer y degradar a HIF pero que son inestables (presentan una vida media disminuida).

Dado que la cantidad de proteína que se encuentra en un determinado momento en las células es el resultado del equilibrio entre su síntesis y su degradación, no podemos descartar que los niveles observados de las variantes estudiadas sean producto, además, de una menor síntesis proteica. Sin embargo, los niveles del ARN mensajero de ambas variantes fueron similares y hasta más elevados que los de la proteína nativa, lo cual hace menos probable esta posibilidad.

Como se mencionó previamente, pVHL se encuentra predominantemente en el citoplasma pero circula entre el núcleo y el citoplasma¹¹⁹⁻¹²¹. Este tráfico constante requiere de un motivo aminoacídico de exportación nuclear descrito por Khacho *et al*¹¹⁸ que en pVHL corresponde a los residuos en las posiciones 121 a 129. Si bien nuestras variantes de interés no se ubican en este motivo, decidimos evaluar su localización subcelular, observando que es mayoritariamente citoplasmática tanto en la proteína nativa como en las variantes estudiadas.

Dado que la formación del complejo VBC es necesaria para que pVHL cumpla su función más descrita, que es la de regular a las subunidades α de HIF, evaluamos la capacidad de las variantes de interés de formar este complejo. Demostramos que ambas variantes mantienen la capacidad de formar el complejo VBC aunque se forma en menor proporción: la variante P138R une menos Elonguina B y Elonguina C, mientras que la L163R une igual proporción de Elonguina C pero menor cantidad de Elonguina B. Si recordamos la estructura del complejo, la Elonguina C se encuentra en contacto con pVHL y la Elonguina B unida a la Elonguina C.

Estos resultados están de acuerdo con la bibliografía, puesto que la mayoría de las mutaciones heredadas de VHL son defectuosas en la unión de las Elonguinas B y C^{202,247,252,253}. Se ha demostrado mediante la interacción de pVHL con las Elonguinas B y C, que variantes cercanas a P138R y L163R como D121G¹⁷, Q145H²²⁴, F148A²⁴⁶, V155A²⁵¹, Q164R²⁵¹ y R167Q^{17,246,254} forman menos complejo VBC que la pVHL nativa, mientras que las variantes L158P¹⁶⁷ y C162F^{247,255} no forman este complejo, por lo tanto no tienen la capacidad de degradar a HIF^{160,167,256}.

Por otro lado, la formación del complejo VBC *per se* no implica necesariamente que éste cumpla su función, ya que para ello debe reconocer a las subunidades α de HIF. Otros autores han demostrado que las variantes W117A y F148A forman menos complejo VBC, y además pierden la capacidad de unir a HIF-2 α ²⁴⁶. Nos cuestionamos si estos complejos VBC formados por las variantes de pVHL, en menor cantidad que los formados en presencia de pVHL nativa, lograban la interacción y posterior degradación de HIF-2 α en nuestro sistema. Dado que los resultados obtenidos por Western Blot mostraron niveles intermedios de HIF-2 α entre los niveles proteicos en la línea celular VHL nula (786-0) y la que expresa pVHL nativa, decidimos observar su consecuencia: la expresión (ARNm) de dos genes blanco de HIF-2 α , los cuales se han estudiado ampliamente en este contexto: GLUT1 y VEGF. Demostramos que en condiciones de normoxia estos genes se encontraban regulados de igual manera por las variantes que por pVHL nativa. Sin embargo, al generar una situación de pseudohipoxia por 24 hs se evidenciaron diferencias significativas, aunque sutiles, en los niveles de expresión de estos genes en las líneas expresando las variantes respecto a la que expresa pVHL nativa. Por lo tanto los complejos VBC formados por las variantes no lograron regular adecuadamente los niveles de HIF-2 α en

esta condición experimental. Los resultados obtenidos *in silico* sugieren que los complejos VBC-HIF-1 α integrados por las variantes de pVHL siendo termodinámicamente favorables porque presentan un ΔG negativo, son menos estables que el complejo VBC- HIF-1 α integrado por pVHL, ya que su energía de formación es mayor . Recordemos que un ΔG negativo indica que se forma en la naturaleza, pero no hace referencia a la cinética de esta formación, puede que se forme pero a menor velocidad y que esta diferencia sea evidente solo en situaciones exigentes como la pseudohipoxia.

Una limitación de nuestro trabajo es la generación de la situación de pseudohipoxia con cloruro de cobalto. Idealmente, este experimento debería realizarse en una cámara de hipoxia, donde se trabaja a diferentes % de Oxígeno, (y se puede simular también una re oxigenación), situación que representa mejor a lo que sucede con las células tumorales *in vivo*, pudiendo obtener más información que pueda explicar este fenómeno. En este sentido, Ding *et al*²⁴⁶ han demostrado para la variante R167Q que degrada menos a HIF-2 α tanto en la situación de hipoxia (1, 3, 5 y 10% de oxígeno), como en la etapa de re oxigenación. Lamentablemente no tuvimos acceso a esta metodología.

Como se mencionó al inicio de este capítulo, las variantes P138R²⁰⁰ (estudiada sólo en tejido tumoral) y la variante P138T²⁵⁷ fueron comunicadas previamente, pero sin su caracterización funcional. La variante P138L fue descrita por Lanikova *et al*⁸⁴ quienes demostraron que en la línea celular que expresa P138L, esta variante posee una menor capacidad de unión y poliubiquitinación de HIF-1 α . Este grupo no estudió la consecuencia de esta menor poliubiquitinación ni la regulación de los genes blanco de HIF-1 α .

Las variantes L163F²⁵⁸ y L163H¹⁶ han sido comunicadas pero no caracterizadas funcionalmente. L163P fue descrita^{5,256} y caracterizada por

Wiesener *et al*²⁵⁶ quienes demuestran mediante un ensayo de síntesis y unión *in vitro* que la variante L163P no interacciona con HIF-1 α , en esas condiciones. En este caso esta variante produce el cambio de una Leucina por Prolina, y los autores especulan que la Prolina introducida podría impedir la formación de la estructura alfa hélice formada en esa región de la pVHL nativa. En nuestro trabajo, los datos obtenidos *in silico* demuestran que la estructura alfa hélice está conservada al introducir una arginina en esta posición, reafirmando la idea de que cambios en el mismo residuo pueden tener consecuencias diferentes según el aminoácido introducido. Por ejemplo, Knauth *et al*²⁵⁵ han mostrado que las variantes Y98H y Y112H producen un fenotipo del subtipo 2A de VHL y mantienen la capacidad de poliubiquitinar a HIF- α , mientras que las variantes Y98N y Y112N producen un fenotipo del subtipo 2B y poliubiquitinan a HIF- α pero en menor cantidad que las variantes en los mismos residuos vinculadas a VHL subtipo 2A. En este mismo sentido, Clifford *et al*¹⁶⁷ han demostrado que la variante L188V asociada al subtipo 2C, forma un complejo VBC funcional, mientras L188Q no forma este complejo y se asocia a VHL tipo 1. Por lo tanto, en este contexto, cobran relevancia otros posibles mecanismos relacionados con funciones que cumple VHL en la célula y que no dependen de su capacidad de regular los niveles de HIF, y que intentan explicar la diversidad fenotípica. Estos mecanismos, denominados HIF independientes comenzaron a describirse a fines de los años 90 y aún hoy continúan siendo objeto de intensa investigación. Así, cada fenotipo se podría comprender como la resultante de la sumatoria de varios mecanismos algunos HIF dependientes y otros HIF independientes.

Los mecanismos HIF independientes son variados, incluyendo la regulación de p53, estabilización de microtúbulos, formación de cilias primarias y la interacción con fibronectina, entre otros. El más estudiado hasta el momento es

el que involucra la interacción de VHL con fibronectina y la capacidad de modular la expresión y deposición adecuada de ésta en la matriz extracelular.

Al evaluar la expresión de fibronectina en nuestro sistema, notamos que en la línea celular que expresa la variante P138R los niveles de ARNm de fibronectina son similares a los detectados en la línea que expresa pVHL nativa. Por el contrario, los niveles de ARNm de fibronectina en la línea parental y en la que expresa L163R son similares entre sí y están disminuidos respecto de la línea que expresa la pVHL nativa. En concordancia con estos resultados, otros autores han demostrado que las células que no expresan pVHL presentan menor expresión de ARNm de fibronectina que las que sí expresan pVHL^{166,168}. En la actualidad se desconoce cómo pVHL regula la expresión de fibronectina, si es actuando como factor de transcripción o si ejerce esta función de manera indirecta. Nuestros resultados sugieren que en la variante L163R se altera esta función mientras que en la P138R se mantiene intacta.

Al estudiar la capacidad de las líneas celulares que expresan las variantes P138R y L163R de depositar fibronectina en la matriz extracelular observamos que ambas son deficientes en este aspecto ya que depositan acúmulos y no ensamblan una matriz como la que se observa en la línea que expresa pVHL nativa. Este resultado es similar al obtenido por otros grupos de trabajo^{103,158,160}. Se ha demostrado que pVHL interactúa con fibronectina, y que las células que no expresan pVHL no son capaces de ensamblar una matriz organizada de fibronectina, aunque puedan secretar fibronectina¹⁵⁹. Varios autores coinciden en que todas las variantes de pVHL asociadas a la enfermedad han demostrado una capacidad reducida o indetectable respecto a la unión de fibronectina^{103,158}, sugiriendo que la unión a fibronectina contribuye al rol de supresor tumoral de pVHL. Se sabe que para que ocurra esta interacción entre pVHL y fibronectina,

pVHL debe formar parte del complejo VBC y ser NEDDilada, aunque esta modificación es transitoria. Esta NEDDilación puede ocurrir en las lisinas en los residuos ubicados en posición 159, 171 y 196 de pVHL, de las cuales la lisina 159¹⁰¹⁻¹⁰³ es la principal aceptora de NEDD8. Se ha demostrado que la variante K159E forma complejo VBC activo, pero no se modifica por NEDD8 y como consecuencia no se une a fibronectina^{40,103}. La variante C162F se NEDDila¹⁰¹ en mayor cantidad, pero no forma un complejo VBC funcional, por lo tanto no une a fibronectina¹⁰³. Estos trabajos dan soporte a la idea de que tanto la NEDDilación como la formación del complejo VBC funcional son requeridas para la interacción con fibronectina. Si bien nuestras variantes de interés forman el complejo VBC y éste es activo, podrían existir cambios conformacionales en el entorno de las lisinas sujetas a NEDDilación impidiendo la unión covalente de NEDD8 o su posterior remoción lo cual en teoría podría incidir en su capacidad de interactuar con fibronectina. Este mecanismo podría estar involucrado en ambas variantes, dada la modificación de la exposición al solvente que muestran las lisinas 171 en el caso de la variante L163R y de la lisina 196 en el caso de la variante P138R.

La fibronectina inmunoprecipita con pVHL^{101,158,160,167}, pero se desconoce qué región de pVHL media esta interacción. Se desconoce cómo pVHL siendo una proteína intracelular regula la deposición de fibronectina en la matriz extracelular.

En nuestro trabajo hemos podido demostrar que a pesar de las diferencias en el impacto que ambas variantes tienen en la capacidad de regular la transcripción de fibronectina, el efecto sobre la deposición de ésta es similar, lo cual sugiere un mecanismo común de acción patogénica.

La capacidad de formar tumores *in vivo* se encuentra conservada en las líneas que expresan las variantes P138R y L163R, y está significativamente aumentada respecto de la proteína nativa. El tamaño muestral utilizado para la comparación

de las incidencias tumorales (proporciones) fue adecuado ya que con un nivel de confianza de 95% (es decir $\alpha=0,05$) y un poder estadístico de 90% el número necesario de ratones inyectados hubiera sido 17. Se inyectaron 20 ratones por variante de pVHL y 30 con la línea que expresa pVHL nativa. El número de ratones inyectado con la línea 786-0 fue inferior (10), ya que varios autores y nuestro grupo de trabajo en un estudio piloto, hemos documentado que forma tumores *in vivo*^{103,104,160,202,205,246,249,259,260}. En esta oportunidad la línea 786-0 fue inyectada solamente como control positivo de formación de tumores, ya que nuestro objetivo principal era demostrar que las variantes de pVHL presentan un comportamiento diferente respecto a la pVHL nativa en esta capacidad.

Este resultado obtenido *in vivo* pone de manifiesto que las variantes estudiadas, independientemente de los mecanismos involucrados, no cumplen con el rol de supresor tumoral que tiene la proteína VHL nativa, confirmando su rol patogénico en este contexto.

En un artículo reciente, Ding *et al*²⁴⁶ estudian el impacto de los niveles de expresión de una variante con cambio de sentido (R167Q) sobre la capacidad de formar tumores *in vivo*. Esta variante retiene la capacidad de formar el complejo VBC y de degradar parcialmente a HIF-2 α . Sorprendentemente, la expresión más elevada de la variante R167Q logra restaurar la función supresora tumoral de pVHL inhibiendo la capacidad de formar tumores en el modelo de xenotransplante, mientras que expresada en menores niveles esta capacidad se conserva. Así, los autores sugieren que la utilización de inhibidores del proteasoma permitiendo la acumulación de las variantes con cambio de sentido podría ser una alternativa terapéutica innovadora para este tipo de pacientes. Sin embargo, utilizando el mismo sistema experimental y vector de alta expresión que estos autores, demostramos que nuestras variantes conservan la capacidad de

formar tumores *in vivo*. Estos resultados sugieren que los elevados niveles de estas proteínas modificadas no pueden compensar sus defectos funcionales. Es posible que haya otros mecanismos aún no descritos que estén relacionados con funciones que se pueden alterar en algunas variantes y ser compensados de alguna manera por la presencia del exceso de proteína. Asimismo, nuestro trabajo pone de manifiesto que es importante conocer los mecanismos alterados que explican la patogénesis en cada variante estudiada a fin de determinar el tratamiento adecuado para los pacientes con esta patología.

CONCLUSIONES

GENERALES

Y

PERSPECTIVAS

El presente trabajo de Tesis tuvo como objetivo tanto detectar como caracterizar alteraciones genéticas de los pacientes con la enfermedad de VHL.

La implementación de un método de detección de deleciones en el gen VHL, junto a la secuenciación automática, nos permitió contar con el estudio genético completo en nuestro Centro, que es referencia para el estudio del gen responsable de esta enfermedad.

Nuestros resultados demuestran la importancia de realizar el estudio genético completo del gen de la enfermedad de von Hippel-Lindau para la confirmación de enfermedad de VHL tipo 1, no sólo en pacientes con diagnóstico clínico de la misma, sino también en pacientes que presentan una única manifestación típica de la enfermedad, permitiendo su diagnóstico y seguimiento apropiados. Asimismo, la detección de los casos índice permite extender el estudio a sus familiares y diagnosticar la enfermedad en miembros que no sospechan su presencia.

Mediante el estudio funcional de las variantes P138R y L163R hemos demostrado su poder patogénico en base a los resultados obtenidos *in vitro*, *in vivo* e *in silico*. Los estudios *in vitro* demostraron una menor vida media de ambas variantes proteicas, así como un compromiso de funciones HIF dependientes y HIF independientes.

Los estudios *in vivo* demuestran que la capacidad de formar tumores de ambas variantes estudiadas está conservada, confirmando su poder patogénico.

Los estudios *in silico* aportan al entendimiento de los resultados obtenidos *in vitro*, señalando posibles argumentos para explicar las diferencias y similitudes encontradas entre ambas variantes. Asimismo, aportan la base para futuros estudios tendientes a determinar la implicancia de las modificaciones

estructurales observadas en los procesos de degradación y modificación de la proteína VHL.

Dadas las múltiples funciones en las que se encuentra involucrada la pVHL, y la compleja relación genotipo-fenotipo existente, se puede inferir que el fenotipo de cada variante del gen es el resultado de la sumatoria de la deficiencia de la pVHL alterada en cada una de sus funciones. Sería interesante poder caracterizar mediante un perfil de expresión de genes utilizando microarrays a las líneas celulares que expresan las variantes y compararlas con la línea que expresa la pVHL nativa, para intentar dilucidar qué otras vías y/o mecanismos se encuentran mayormente alterados en ellas.

Cecilia Mathó Pacielo
Doctorando

Dra. Patricia A. Pennisi
Directora de Tesis

Dra. Gabriela Sansó
Directora Adjunta de Tesis

Dra. Ana María Adamo
Consejera de Estudios

BIBLIOGRAFÍA

1. Friedrich, C. A. Von Hippel-Lindau syndrome. A pleomorphic condition. *Cancer* **86**, 2478–2482 (1999).
2. Clark, P. E., Cookson, M. S. The von Hippel-Lindau gene: turning discovery into therapy. *Cancer* **113**, 1768–1778 (2008).
3. Latif, F., Tory, K., Gnarr, J., *et al.* Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science (80-)*. **260**, 1317–1320 (1993).
4. Maher, E. R., Kaelin, W. G. von Hippel-Lindau disease. *Medicine (Baltimore)*. **76**, 381–391 (1997).
5. Cho, H. J., Ki, C. S., Kim, J. W. Improved detection of germline mutations in Korean VHL patients by multiple ligation-dependent probe amplification analysis. *J Korean Med Sci* **24**, 77–83 (2009).
6. Chou, A., Toon, C., Pickett, J., *et al.* von Hippel-Lindau syndrome. *Front. Horm. Res.* **41**, 30–49 (2013).
7. BioDigital. Available at: <https://www.biodigital.com/>.
8. Melmon, K. L., Rosen, S. W. Lindau's disease. Review of the Literature and Study of a Large Kindred. *Am. J. Med.* **36**, 595–617 (1964).
9. Lamiell, J. M., Salazar, F. G., Hsia, Y. E. von Hippel-Lindau disease affecting 43 members of a single kindred. *Medicine (Baltimore)*. **68**, 1–29 (1989).
10. Resche, F., Moisan, J. P., Mantoura, J., *et al.* Haemangioblastoma, haemangioblastomatosis, and von Hippel-Lindau disease. *Adv. Tech. Stand. Neurosurg.* **20**, 197–304 (1993).
11. Kim, W. Y., Kaelin, W. G. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* **22**, 4991–5004 (2004).
12. Maher, E. R., Neumann, H. P., Richard, S. von Hippel-Lindau disease: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* **19**, 617–623 (2011).
13. Richard, S., Graff, J., Lindau, J., *et al.* Von hippel-lindau disease. *Lancet* **363**, 1231–1234 (2004).
14. Crossey, P. A., Richards, F. M., Foster, K., *et al.* Identification of intragenic mutations in the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene and correlation with disease phenotype. *Hum Mol Genet* **3**, 1303–1308 (1994).
15. Zbar, B., Kishida, T., Chen, F., *et al.* Germline mutations in the Von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in families from North America, Europe, and Japan. *Hum Mutat* **8**, 348–357 (1996).
16. Chen, F., Kishida, T., Yao, M., *et al.* Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: correlations with phenotype. *Hum Mutat* **5**, 66–75 (1995).
17. Hacker, K. E., Lee, C. M., Rathmell, W. K. VHL type 2B mutations retain VBC complex form and function. *PLoS One* **3**, e3801 (2008).
18. Villar Gómez de las Heras, K. Enfermedad de von Hippel-Lindau. Guía básica para profesionales de la salud. (2011).
19. Liu, X., Zhang, Y., Hui, X., *et al.* Surgical management of medulla oblongata

- hemangioblastomas in one institution : an analysis of 62 cases. **8**, 5576–5590 (2015).
20. Bamps, S., Calenbergh, F. Van, Vleeschouwer, S. De, *et al.* What the neurosurgeon should know about hemangioblastoma, both sporadic and in Von Hippel-Lindau disease: A literature review. *Surg. Neurol. Int.* **4**, 145 (2013).
 21. Hes, F. J., McKee, S., Taphoorn, M. J., *et al.* Cryptic von Hippel-Lindau disease: germline mutations in patients with haemangioblastoma only. *J. Med. Genet.* **37**, 939–943 (2000).
 22. Rasmussen, A., Nava-Salazar, S., Yescas, P., *et al.* Von Hippel-Lindau disease germline mutations in Mexican patients with cerebellar hemangioblastoma. *J. Neurosurg.* **104**, 389–394 (2006).
 23. Shankar, G. M., Taylor-Weiner, A., Lelic, N., *et al.* Sporadic hemangioblastomas are characterized by cryptic VHL inactivation. *Acta Neuropathol. Commun.* **2**, 1–12 (2014).
 24. Niemelä, M., Lemeta, S., Sainio, M., *et al.* Hemangioblastomas of the retina: impact of von Hippel-Lindau disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 1909–1915 (2000).
 25. Dollfus, H., Massin, P., Taupin, P., *et al.* Retinal hemangioblastoma in von Hippel-Lindau disease: a clinical and molecular study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **43**, 3067–3074 (2002).
 26. Barontini, M., Dahia, P. L. VHL disease. *Best Pr. Res Clin Endocrinol Metab* **24**, 401–413 (2010).
 27. Aufforth, R. D., Ramakant, P., Sadowski, S. M., *et al.* Pheochromocytoma screening initiation and frequency in von Hippel-Lindau syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 4498–4504 (2015).
 28. Barontini, M., Levin, G., Sanso, G. Characteristics of pheochromocytoma in a 4- to 20-year-old population. *Ann N Y Acad Sci* **1073**, 30–37 (2006).
 29. Bausch, B., Wellner, U., Bausch, D., *et al.* Long-term prognosis of patients with pediatric pheochromocytoma. *Endocr. Relat. Cancer* **21**, 17–25 (2014).
 30. Linehan, W. M., Rubin, J. S., Bottaro, D. P. VHL loss of function and its impact on oncogenic signaling networks in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 753–756 (2009).
 31. Haase, V. H. The VHL/HIF oxygen-sensing pathway and its relevance to kidney disease. *Kidney Int* **69**, 1302–1307 (2006).
 32. Friedrich, C. A. Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau syndrome. *Hum Mol Genet* **10**, 763–767 (2001).
 33. Kaelin Jr., W. G., Kaelin, W. G. Treatment of kidney cancer: insights provided by the VHL tumor-suppressor protein. *Cancer* **115**, 2262–2272 (2009).
 34. Ho, T. H., Jonasch, E. Genetic Kidney Cancer Syndromes. *J Natl Compr Canc Netw.* **12**, 1347–1355 (2014).
 35. Hammel, P. R., Vilgrain, V., Terris, B., *et al.* Pancreatic involvement in von

- Hippel-Lindau disease. The Groupe Francophone d'Etude de la Maladie de von Hippel-Lindau. *Gastroenterology* **119**, 1087–1095 (2000).
36. Manski, T. J., Heffner, D. K., Glenn, G. M., *et al.* Endolymphatic sac tumors. A source of morbid hearing loss in von Hippel-Lindau disease. *JAMA* **277**, 1461–1466 (1997).
 37. Bausch, B., Wellner, U., Peyre, M., *et al.* Characterization of endolymphatic sac tumors and von Hippel-Lindau disease in the International Endolymphatic Sac Tumor Registry. *Head Neck* (2015). doi:10.1002/hed.24067
 38. Richard, S., Gardie, B., Couvé, S., *et al.* Von Hippel-Lindau: how a rare disease illuminates cancer biology. *Semin. Cancer Biol.* **23**, 26–37 (2013).
 39. Poulsen, M. L., Budtz-Jorgensen, E., Bisgaard, M. L. Surveillance in von Hippel-Lindau disease (vHL). *Clin Genet* **77**, 49–59 (2009).
 40. Binderup, M. L. M., Budtz-Jørgensen, E., Bisgaard, M. L. Risk of new tumors in von Hippel-Lindau patients depends on age and genotype. *Genet. Med.* **18**, 89–97 (2016).
 41. Seizinger, B. R., Rouleau, G. A., Ozelius, L. J., *et al.* Von Hippel-Lindau disease maps to the region of chromosome 3 associated with renal cell carcinoma. *Nature* **332**, 268–269 (1988).
 42. Gnarr, J. R., Ward, J. M., Porter, F. D., *et al.* Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 9102–9107 (1997).
 43. Ma, W., Tessarollo, L., Hong, S.-B., *et al.* Hepatic vascular tumors, angiectasis in multiple organs, and impaired spermatogenesis in mice with conditional inactivation of the VHL gene. *Cancer Res.* **63**, 5320–5328 (2003).
 44. Woodward, E. R., Buchberger, A., Clifford, S. C., *et al.* Comparative sequence analysis of the VHL tumor suppressor gene. *Genomics* **65**, 253–265 (2000).
 45. Gao, J., Naglich, J. G., Laidlaw, J., *et al.* Cloning and characterization of a mouse gene with homology to the human von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene: implications for the potential organization of the human von Hippel-Lindau disease gene. *Cancer Res.* **55**, 743–747 (1995).
 46. Shmueli, M. D., Schnaider, L., Herzog, G., *et al.* Computational and experimental characterization of dVHL establish a Drosophila model of VHL syndrome. *PLoS One* **9**, e109864 (2014).
 47. Adryan, B., Decker, H. J., Papas, T. S., *et al.* Tracheal development and the von Hippel-Lindau tumor suppressor homolog in Drosophila. *Oncogene* **19**, 2803–2811 (2000).
 48. Aso, T., Yamazaki, K., Aigaki, T., *et al.* Drosophila von Hippel-Lindau tumor suppressor complex possesses E3 ubiquitin ligase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 355–361 (2000).
 49. Cybulski, C., Krzystolik, K., Murgia, A., *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.* **39**, E38 (2002).
50. Kuzmin, I., Duh, F. M., Latif, F., *et al.* Identification of the promoter of the human von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Oncogene* **10**, 2185–2194 (1995).
 51. Richards, F. M. Molecular pathology of von Hippel–Lindau disease and the VHL tumour suppressor gene. *Expert Rev. Mol. Med.* **3**, 1–27 (2001).
 52. Renbaum, P., Duh, F. M., Latif, F., *et al.* Isolation and characterization of the full-length 3' untranslated region of the human von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Hum Genet* **98**, 666–671 (1996).
 53. Knudson, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 820–823 (1971).
 54. Richard, S., Ladroue, C., Gad, S., *et al.* Genetics and angiogenesis: the example of von Hippel-Lindau disease. *Bull Cancer* **94**, 170–179 (2007).
 55. Muscarella, L. A., Barbano, R., Augello, B., *et al.* An 11-bp duplication in the promoter region of the VHL gene in a patient with cerebellar hemangioblastoma and renal oncocytoma. *J Hum Genet* **52**, 485–491 (2007).
 56. Lemeta, S., Aalto, Y., Niemelä, M., *et al.* Recurrent DNA sequence copy losses on chromosomal arm 6q in capillary hemangioblastoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **133**, 174–178 (2002).
 57. Cooper, DN; Ball; Stenson P.D.; Phillips A.D.; Howells K.; Heywood, S.; Hayden M.J.; Mort, M.E.; Horan, M. P. . The Human Gene Mutation Database at the at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. Available at: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
 58. Yoshida, M., Ashida, S., Kondo, K., *et al.* Germ-line mutation analysis in patients with von Hippel-Lindau disease in Japan: an extended study of 77 families. *Jpn. J. Cancer Res.* **91**, 204–212 (2000).
 59. Nordstrom-O'Brien, M., van der Luijt, R. B., van Rooijen, E., *et al.* Genetic analysis of von Hippel-Lindau disease. *Hum Mutat* **31**, 521–537 (2010).
 60. Ebenazer, A., Rajaratnam, S., Pai, R. Detection of large deletions in the VHL gene using a Real-Time PCR with SYBR Green. *Fam. Cancer* **12**, 519–524 (2013).
 61. Hoebeeck, J., van der Luijt, R., Poppe, B., *et al.* Rapid detection of VHL exon deletions using real-time quantitative PCR. *Lab Invest* **85**, 24–33 (2005).
 62. Hes, F., Zewald, R., Peeters, T., *et al.* Genotype-phenotype correlations in families with deletions in the von Hippel-Lindau (VHL) gene. *Hum Genet* **106**, 425–431 (2000).
 63. Hattori, K., Teranishi, J., Stolle, C., *et al.* Detection of germline deletions using real-time quantitative polymerase chain reaction in Japanese patients with von Hippel-Lindau disease. *Cancer Sci* **97**, 400–405 (2006).
 64. Wu, P., Zhang, N., Wang, X., *et al.* Family history of von Hippel-Lindau disease was uncommon in Chinese patients: suggesting the higher

- frequency of de novo mutations in VHL gene in these patients. *J Hum Genet* **57**, 238–243 (2012).
65. Stolle, C., Glenn, G., Zbar, B., *et al.* Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Hum Mutat* **12**, 417–423 (1998).
 66. Rocha, J. C., Silva, R. L., Mendonca, B. B., *et al.* High frequency of novel germline mutations in the VHL gene in the heterogeneous population of Brazil. *J Med Genet* **40**, e31 (2003).
 67. Gao, Y., Huang, Y., Tu, X., *et al.* Genetic characterization and protein stability analysis of a Chinese family with Von Hippel-Lindau disease. *Chin. Med. J. (Engl)*. **126**, 3690–3693 (2013).
 68. Franke, G., Bausch, B., Hoffmann, M. M., *et al.* Alu-Alu recombination underlies the vast majority of large VHL germline deletions: Molecular characterization and genotype-phenotype correlations in VHL patients. *Hum Mutat* **30**, 776–786 (2009).
 69. McNeill, A., Rattenberry, E., Barber, R., *et al.* Genotype-phenotype correlations in VHL exon deletions. *Am J Med Genet A* **149A**, 2147–2151 (2009).
 70. Sgambati, M. T., Stolle, C., Choyke, P. L., *et al.* Mosaicism in von Hippel-Lindau disease: lessons from kindreds with germline mutations identified in offspring with mosaic parents. *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 84–91 (2000).
 71. Richards, F. M., Payne, S. J., Zbar, B., *et al.* Molecular analysis of de novo germline mutations in the von Hippel-Lindau disease gene. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 2139–2143 (1995).
 72. Hes, F. J., van der Luijt, R. B., Janssen, A. L., *et al.* 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* **72**, 122–129 (2007).
 73. Lonser, R. R., Glenn, G. M., Walther, M., *et al.* von Hippel-Lindau disease. *Lancet (London, England)* **361**, 2059–2067 (2003).
 74. Pack, S. D., Zbar, B., Pak, E., *et al.* Constitutional von Hippel-Lindau (VHL) Gene Deletions Detected in VHL Families by Fluorescence in Situ Hybridization Constitutional von Hippel-Lindau (VHL) Gene Deletions Detected in VHL Families. 5560–5564 (1999).
 75. Coppin, L., Grutzmacher, C., Crépin, M., *et al.* VHL mosaicism can be detected by clinical next-generation sequencing and is not restricted to patients with a mild phenotype. *Eur. J. Hum. Genet.* **22**, 1149–1152 (2014).
 76. Wu, P., Zhang, N., Wang, X., *et al.* Mosaicism in von Hippel-Lindau disease with severe renal manifestations. *Clin. Genet.* **84**, 581–584 (2013).
 77. Zlotogora, J. Germ line mosaicism. *Hum. Genet.* **102**, 381–386 (1998).
 78. Campbell, I. M., Shaw, C., Stankiewicz, P., *et al.* Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics. *Trends Genet.* 1–11 (2015).

79. Biesecker, L. G., Spinner, N. B. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 307–320 (2013).
80. Jamuar, S. S., Lam, A.-T. N., Kircher, M., *et al.* Somatic Mutations in Cerebral Cortical Malformations. *N. Engl. J. Med.* **371**, 733–743 (2014).
81. Rohlin, A., Wernersson, J., Engwall, Y., *et al.* Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: Comparison with four diagnostic DNA screening techniques. *Hum. Mutat.* **30**, 1012–1020 (2009).
82. Miasnikova, G. Y., Sergueeva, A. I., Nouraie, M., *et al.* The heterozygote advantage of the Chuvash polycythemia VHLR200W mutation may be protection against anemia. *Haematologica* **96**, 1371–1374 (2011).
83. Lorenzo, F. R., Yang, C., Lanikova, L., *et al.* Novel compound VHL heterozygosity (VHL T124A/L188V) associated with congenital polycythaemia. *Br J Haematol* **162**, 851–853 (2013).
84. Lanikova, L., Lorenzo, F., Yang, C., *et al.* Novel homozygous VHL mutation in exon 2 is associated with congenital polycythemia but not with cancer. *Blood* **121**, 3918–3924 (2013).
85. Gordeuk, V. R., Sergueeva, A. I., Miasnikova, G. Y., *et al.* Congenital disorder of oxygen sensing: association of the homozygous Chuvash polycythemia VHL mutation with thrombosis and vascular abnormalities but not tumors. *Blood* **103**, 3924–3932 (2004).
86. Gnarr, J. R., Duan, D. R., Weng, Y., *et al.* Molecular cloning of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and its role in renal carcinoma. *Biochim Biophys Acta* **1242**, 201–210 (1996).
87. Kumar, P. S., Venkatesh, K., Srikanth, L., *et al.* Novel three missense mutations observed in Von Hippel-Lindau gene in a patient reported with renal cell carcinoma. *Indian J. Hum. Genet.* **19**, 373–376 (2013).
88. Maher, E. R., Webster, A. R., Richards, F. M., *et al.* Phenotypic expression in von Hippel-Lindau disease: correlations with germline VHL gene mutations. *J Med Genet* **33**, 328–332 (1996).
89. Wittström, E., Nordling, M., Andréasson, S. Genotype-phenotype correlations, and retinal function and structure in von Hippel-Lindau disease. *Ophthalmic Genet.* **35**, 91–106 (2014).
90. Micale, L., Muscarella, L. A., Marzulli, M., *et al.* VHL frameshift mutation as target of nonsense-mediated mRNA decay in drosophila melanogaster and human HEK293 cell line. *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, 860761 (2009).
91. Duan, D. R., Pause, A., Burgess, W. H., *et al.* Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science* **269**, 1402–1406 (1995).
92. Duan, D. R., Humphrey, J. S., Chen, D. Y., *et al.* Characterization of the VHL tumor suppressor gene product: localization, complex formation, and the effect of natural inactivating mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6459–6463 (1995).
93. Kibel, A., Iliopoulos, O., DeCaprio, J. A., *et al.* Binding of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein to Elongin B and C. *Science* **269**, 1444–

- 1446 (1995).
94. Aso, T., Lane, W. S., Conaway, J. W., *et al.* Elongin (SIII): a multisubunit regulator of elongation by RNA polymerase II. *Science* **269**, 1439–1443 (1995).
 95. Los, M., Jansen, G. H., Kaelin, W. G., *et al.* Expression pattern of the von Hippel-Lindau protein in human tissues. *Lab. Invest.* **75**, 231–238 (1996).
 96. Feldman, D. E., Thulasiraman, V., Ferreyra, R. G., *et al.* Formation of the VHL-elongin BC tumor suppressor complex is mediated by the chaperonin TRiC. *Mol. Cell* **4**, 1051–1061 (1999).
 97. Feldman, D. E., Spiess, C., Howard, D. E., *et al.* Tumorigenic mutations in VHL disrupt folding in vivo by interfering with chaperonin binding. *Mol. Cell* **12**, 1213–1224 (2003).
 98. McClellan, A. J., Scott, M. D., Frydman, J. Folding and quality control of the VHL tumor suppressor proceed through distinct chaperone pathways. *Cell* **121**, 739–748 (2005).
 99. Melville, M. W., McClellan, A. J., Meyer, A. S., *et al.* The Hsp70 and TRiC / CCT Chaperone Systems Cooperate In Vivo To Assemble the Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Complex The Hsp70 and TRiC / CCT Chaperone Systems Cooperate In Vivo To Assemble the Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Complex. **23**, 3141–3151 (2003).
 100. Jonasch, E., Futreal, P. A., Davis, I. J., *et al.* State of the science: an update on renal cell carcinoma. *Mol. Cancer Res.* **10**, 859–880 (2012).
 101. Russell, R. C., Ohh, M. NEDD8 acts as a ‘molecular switch’ defining the functional selectivity of VHL. *EMBO Rep.* **9**, 486–491 (2008).
 102. Watson, I. R., Irwin, M. S., Ohh, M. NEDD8 Pathways in Cancer, *Sine Quibus Non.* *Cancer Cell* **19**, 168–176 (2011).
 103. Stickle, N., Chung, J., Klco, J., *et al.* pVHL modification by NEDD8 is required for fibronectin matrix assembly and suppression of tumor development. *Mol Cell Biol* **24**, 3251–3261 (2004).
 104. Gerez, J., Tedesco, L., Bonfiglio, J. J., *et al.* RSUME inhibits VHL and regulates its tumor suppressor function. *Oncogene* **34**, 4855–4866 (2015).
 105. Cai, Q., Verma, S. C., Kumar, P., *et al.* Hypoxia inactivates the VHL tumor suppressor through PIASy-mediated SUMO modification. *PLoS One* **5**, e9720 (2010).
 106. Antico Arciuch, V. G., Tedesco, L., Fuertes, M., *et al.* Role of RSUME in inflammation and cancer. *FEBS Lett.* **589**, 3330–3335 (2015).
 107. Sun, Y. Targeting E3 Ubiquitin Ligases for Cancer Therapy. *Cancer Biol. Ther.* **2**, 621–627 (2003).
 108. Jung, C.-R., Hwang, K.-S., Yoo, J., *et al.* E2-EPF UCP targets pVHL for degradation and associates with tumor growth and metastasis. *Nat. Med.* **12**, 809–816 (2006).
 109. Baboshina, O. V., Haas, A. L. Novel multiubiquitin chain linkages catalyzed by the conjugating enzymes E2EPF and RAD6 are recognized by 26 S

- proteasome subunit 5. *J. Biol. Chem.* **271**, 2823–2831 (1996).
110. Liu, Z., Haas, A. L., Diaz, L. A., *et al.* Characterization of a novel keratinocyte ubiquitin carrier protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 2817–2822 (1996).
 111. Ohh, M. pVHL's kryptonite: E2-EPF UCP. *Cancer Cell* **10**, 95–97 (2006).
 112. Ding, Z., German, P., Bai, S., *et al.* Agents that stabilize mutated von Hippel-Lindau (VHL) protein: results of a high-throughput screen to identify compounds that modulate VHL proteostasis. *J. Biomol. Screen.* **17**, 572–580 (2012).
 113. Limaverde-Sousa, G., de Andrade Barreto, E., Ferreira, C. G., *et al.* Simulation of the mutation F76del on the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: Mechanism of the disease and implications for drug development. *Proteins* **2**, 349–363 (2013).
 114. Sutovsky, H., Gazit, E. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a molten globule under native conditions: implications for its physiological activities. *J. Biol. Chem.* **279**, 17190–17196 (2004).
 115. Stebbins, C. E., Kaelin Jr., W. G., Pavletich, N. P. Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB complex: implications for VHL tumor suppressor function. *Science (80-.)*. **284**, 455–461 (1999).
 116. Min, J.-H. H., Yang, H., Ivan, M., *et al.* Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science (80-.)*. **296**, 1886–1889 (2002).
 117. Hon, W. C., Wilson, M. I., Harlos, K., *et al.* Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 α by pVHL. *Nature* **417**, 975–978 (2002).
 118. Khacho, M., Mekhail, K., Pilon-Larose, K., *et al.* Cancer-causing mutations in a novel transcription-dependent nuclear export motif of VHL abrogate oxygen-dependent degradation of hypoxia-inducible factor. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 302–314 (2008).
 119. Lee, S., Neumann, M., Stearman, R., *et al.* Transcription-dependent nuclear-cytoplasmic trafficking is required for the function of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* **19**, 1486–1497 (1999).
 120. Groulx, I., Lee, S. Oxygen-dependent ubiquitination and degradation of hypoxia-inducible factor requires nuclear-cytoplasmic trafficking of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* **22**, 5319–5336 (2002).
 121. Lewis, M. D., Roberts, B. J. Role of nuclear and cytoplasmic localization in the tumour-suppressor activity of the von Hippel-Lindau protein. *Oncogene* **22**, 3992–3997 (2003).
 122. Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y., *et al.* Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**, 463–473 (1995).
 123. Arias-González, L., Moreno-Gimeno, I., del Campo, A. R., *et al.* ERK5/BMK1 is a novel target of the tumor suppressor VHL: implication in clear cell renal carcinoma. *Neoplasia* **15**, 649–659 (2013).
 124. Iliopoulos, O., Levy, A. P., Jiang, C., *et al.* Negative regulation of hypoxia-

- inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10595–10599 (1996).
125. Gnarr, J. R., Zhou, S., Merrill, M. J., *et al.* Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10589–10594 (1996).
 126. Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G. W., *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* **399**, 271–275 (1999).
 127. Masson, N., Willam, C., Maxwell, P. H., *et al.* Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.* **20**, 5197–5206 (2001).
 128. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., *et al.* HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* **292**, 464–468 (2001).
 129. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., *et al.* Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science (80-.).* **292**, 468–472 (2001).
 130. Satija, Y. K., Bhardwaj, A., Das, S. A portrayal of E3 ubiquitin ligases and deubiquitylases in cancer. *Int. J. Cancer* **133**, 2759–2768 (2013).
 131. Pause, A., Lee, S., Worrell, R. A., *et al.* The von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene product forms a stable complex with human CUL-2, a member of the Cdc53 family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2156–2161 (1997).
 132. Pause, A., Peterson, B., Schaffar, G., *et al.* Studying interactions of four proteins in the yeast two-hybrid system: Structural resemblance of the pVHL/elongin BC/hCUL-2 complex with the ubiquitin ligase complex SKP1/cullin/F-box protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 9533–9538 (1999).
 133. Krek, W. VHL takes HIF's breath away. *Nat. Cell Biol.* **2**, E121–123 (2000).
 134. Wang, Y., Abu-Asab, M. S., Shen, D., *et al.* Upregulation of hypoxia-inducible factors and autophagy in von Hippel-Lindau-associated retinal hemangioblastoma. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **252**, 1319–1327 (2014).
 135. Yu, F., White, S. B., Zhao, Q., *et al.* HIF-1 α binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 9630–9635 (2001).
 136. Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **13**, 83–89 (2003).
 137. Myllyharju, J., Koivunen, P. Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylases: common and specific roles. *Biol. Chem.* **394**, 435–448 (2013).
 138. Krieg, M., Haas, R., Brauch, H., *et al.* Up-regulation of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α under normoxic conditions in renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss of function. *Oncogene* **19**, 5435–5443 (2000).

139. Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L. A., *et al.* Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 9361–9374 (2003).
140. Smirnova, N. A., Hushpalian, D. M., Speer, R. E., *et al.* Catalytic mechanism and substrate specificity of HIF prolyl hydroxylases. *Biochem. Biokhimiia* **77**, 1108–1119 (2012).
141. Maynard, M. A., Qi, H., Chung, J., *et al.* Multiple splice variants of the human HIF-3?? locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex. *J. Biol. Chem.* **278**, 11032–11040 (2003).
142. Chan, D. A., Sutphin, P. D., Yen, S.-E., *et al.* Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6415–6426 (2005).
143. Shen, C., Kaelin Jr., W. G. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol* **23**, 18–25 (2013).
144. Li, M., Kim, W. Y. Two sides to every story: The HIF-dependent and HIF-independent functions of pVHL. *J. Cell. Mol. Med.* **15**, 187–195 (2011).
145. Jiang, Y., Zhang, W., Kondo, K., *et al.* Gene expression profiling in a renal cell carcinoma cell line: dissecting VHL and hypoxia-dependent pathways. *Mol. Cancer Res.* **1**, 453–462 (2003).
146. Roe, J. S., Kim, H., Lee, S. M., *et al.* p53 stabilization and transactivation by a von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell* **22**, 395–405 (2006).
147. Essers, P. B., Klasson, T. D., Pereboom, T. C., *et al.* The von Hippel-Lindau tumor suppressor regulates programmed cell death 5-mediated degradation of Mdm2. *Oncogene* **34**, 771–779 (2015).
148. Roe, J.-S. S., Youn, H.-D. D. The positive regulation of p53 by the tumor suppressor VHL. *Cell Cycle* **5**, 2054–2056 (2006).
149. Hergovich, A., Lisztwan, J., Barry, R., *et al.* Regulation of microtubule stability by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein pVHL. *Nat. Cell Biol.* **5**, 64–70 (2003).
150. Thoma, C. R., Toso, A., Gutbrodt, K. L., *et al.* VHL loss causes spindle misorientation and chromosome instability. *Nat. Cell Biol.* **11**, 994–1001 (2009).
151. Satir, P., Pedersen, L. B., Christensen, S. T. The primary cilium at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 499–503 (2010).
152. Singla, V., Reiter, J. F. The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* **313**, 629–633 (2006).
153. Kuehn, E. W., Walz, G., Benzing, T. Von hippel-lindau: a tumor suppressor links microtubules to ciliogenesis and cancer development. *Cancer Res* **67**, 4537–4540 (2007).
154. Pan, J., Seeger-Nukpezah, T., Golemis, E. A. The role of the cilium in normal and abnormal cell cycles: emphasis on renal cystic pathologies. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 1849–1874 (2013).
155. Basten, S. G., Giles, R. H. Functional aspects of primary cilia in signaling,

- cell cycle and tumorigenesis. *Cilia* **2**, 6 (2013).
156. Iturrioz, X., Durgan, J., Calleja, V., *et al.* The von Hippel-Lindau tumour-suppressor protein interaction with protein kinase Cdelta. *Biochem. J.* **397**, 109–120 (2006).
 157. Zhou, L., Yang, H. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein promotes c-Cbl-independent poly-ubiquitylation and degradation of the activated EGFR. *PLoS One* **6**, e23936 (2011).
 158. Ohh, M., Yauch, R. L., Lonergan, K. M., *et al.* The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein Is Required for Proper Assembly of an Extracellular Fibronectin Matrix. *Mol. Cell* **1**, 959–968 (1998).
 159. Tang, N., Mack, F., Haase, V. H., *et al.* pVHL function is essential for endothelial extracellular matrix deposition. *Mol Cell Biol* **26**, 2519–2530 (2006).
 160. Hoffman, M. A., Ohh, M., Yang, H., *et al.* von Hippel-Lindau protein mutants linked to type 2C VHL disease preserve the ability to downregulate HIF. *Hum Mol Genet* **10**, 1019–1027 (2001).
 161. Hynes, R. O., Ali, I. U., Destree, A. T., *et al.* A large glycoprotein lost from the surfaces of transformed cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **312**, 317–342 (1978).
 162. Hynes, R. O., Destree, A. T. Relationships between fibronectin (LETS protein) and actin. *Cell* **15**, 875–886 (1978).
 163. Vaheri, A., Alitalo, K., Hedman, K., *et al.* Fibronectin and the pericellular matrix of normal and transformed adherent cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **312**, 343–353 (1978).
 164. Pasqualini, R., Bourdoulous, S., Koivunen, E., *et al.* A polymeric form of fibronectin has antimetastatic effects against multiple tumor types. *Nat. Med.* **2**, 1197–1203 (1996).
 165. Giancotti, F. G., Ruoslahti, E. Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell* **60**, 849–859 (1990).
 166. Bluysen, H. A. R., Lolkema, M. P. J. K., Van Beest, M., *et al.* Fibronectin is a hypoxia-independent target of the tumor suppressor VHL. *FEBS Lett.* **556**, 137–142 (2004).
 167. Clifford, S. C., Cockman, M. E., Smallwood, A. C., *et al.* Contrasting effects on HIF-1alpha regulation by disease-causing pVHL mutations correlate with patterns of tumorigenesis in von Hippel-Lindau disease. *Hum Mol Genet* **10**, 1029–1038 (2001).
 168. Wykoff, C. C., Sotiropoulos, C., Cockman, M. E., *et al.* Gene array of VHL mutation and hypoxia shows novel hypoxia-induced genes and that cyclin D1 is a VHL target gene. *Br. J. Cancer* **90**, 1235–1243 (2004).
 169. Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., *et al.* Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **356**, 115–124 (2007).
 170. Liu, X.-D., Hoang, A., Zhou, L., *et al.* Resistance to Antiangiogenic Therapy

- Is Associated with an Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunol. Res.* **3**, 1017–1029 (2015).
171. Brugarolas, J. Renal-cell carcinoma--molecular pathways and therapies. *N. Engl. J. Med.* **356**, 185–187 (2007).
172. Jimenez, C., Cabanillas, M. E., Santarpia, L., *et al.* Use of the tyrosine kinase inhibitor sunitinib in a patient with von Hippel-Lindau disease: targeting angiogenic factors in pheochromocytoma and other von Hippel-Lindau disease-related tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **94**, 386–391 (2009).
173. Jonasch, E., Corn, P., Pagliaro, L. C., *et al.* Upfront, randomized, phase 2 trial of sorafenib versus sorafenib and low-dose interferon alfa in patients with advanced renal cell carcinoma: clinical and biomarker analysis. *Cancer* **116**, 57–65 (2010).
174. Kaelin Jr., W. G. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer* **8**, 865–873 (2008).
175. Linehan, W. M. Genetic basis of kidney cancer: Role of genomics for the development of disease-based therapeutics. *Genome Res* **22**, 2089–2100 (2012).
176. Yang, J. C., Haworth, L., Sherry, R. M., *et al.* A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N. Engl. J. Med.* **349**, 427–434 (2003).
177. Yang, J. C. Bevacizumab for patients with metastatic renal cancer: an update. *Clin. Cancer Res.* **10**, 6367–6370 (2004).
178. Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., *et al.* Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr. Cancer Drug Targets* **11**, 239–253 (2011).
179. Kondagunta, G. V., Drucker, B., Schwartz, L., *et al.* Phase II trial of bortezomib for patients with advanced renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **22**, 3720–3725 (2004).
180. Ryan, N. J. Ataluren: first global approval. *Drugs* **74**, 1709–1714 (2014).
181. Shoseyov, D., Cohen-Cymbarknoh, M., Wilschanski, M. Ataluren for the treatment of cystic fibrosis. *Expert Rev. Respir. Med.* 1–5 (2016). doi:10.1586/17476348.2016.1150181
182. McElroy, S. P., Nomura, T., Torrie, L. S., *et al.* A lack of premature termination codon read-through efficacy of PTC124 (Ataluren) in a diverse array of reporter assays. *PLoS Biol.* **11**, e1001593 (2013).
183. Lentini, L., Melfi, R., Di Leonardo, A., *et al.* Toward a rationale for the PTC124 (Ataluren) promoted readthrough of premature stop codons: a computational approach and GFP-reporter cell-based assay. *Mol. Pharm.* **11**, 653–664 (2014).
184. Karijolich, J., Yu, Y.-T. Therapeutic suppression of premature termination codons: mechanisms and clinical considerations (review). *Int. J. Mol. Med.* **34**, 355–362 (2014).

185. Kaelin, W. G., Kaelin Jr., W. G. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* **2**, 673–682 (2002).
186. Yin, H., Xue, W., Chen, S., *et al.* Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol.* **32**, 551–553 (2014).
187. Sánchez-Rivera, F. J., Jacks, T. Applications of the CRISPR–Cas9 system in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 387–395 (2015).
188. Olschwang, S., Richard, S., Boisson, C., *et al.* Germline mutation profile of the VHL gene in von Hippel-Lindau disease and in sporadic hemangioblastoma. *Hum. Mutat.* **12**, 424–430 (1998).
189. Heath, K. E., Day, I. N., Humphries, S. E. Universal primer quantitative fluorescent multiplex (UPQFM) PCR: a method to detect major and minor rearrangements of the low density lipoprotein receptor gene. *J Med Genet* **37**, 272–280 (2000).
190. Yau, S. C., Bobrow, M., Mathew, C. G., *et al.* Accurate diagnosis of carriers of deletions and duplications in Duchenne/Becker muscular dystrophy by fluorescent dosage analysis. *J. Med. Genet.* **33**, 550–558 (1996).
191. Perne, A., Zhang, X., Lehmann, L., *et al.* Comparison of multiplex ligation-dependent probe amplification and real-time PCR accuracy for gene copy number quantification using the beta-defensin locus. *Biotechniques* **47**, 1023–1028 (2009).
192. Del Sal, G., Manfioletti, G., Schneider, C. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques* **7**, 514–520 (1989).
193. Sansó, G., Rudaz, M. C. G., Levin, G., *et al.* Familial isolated pheochromocytoma presenting a new mutation in the von Hippel-Lindau gene. *Am. J. Hypertens.* **17**, 1107–1111 (2004).
194. Zhang, J., Huang, Y., Pan, J., *et al.* Germline mutations in the von Hippel-Lindau disease (VHL) gene in mainland Chinese families. *J Cancer Res Clin Oncol* **134**, 1211–1218 (2008).
195. Ruiz-Llorente, S., Bravo, J., Cebrian, A., *et al.* Genetic characterization and structural analysis of VHL Spanish families to define genotype-phenotype correlations. *Hum Mutat* **23**, 160–169 (2004).
196. Siu, W. K., Ma, R. C., Lam, C. W., *et al.* Molecular basis of von Hippel-Lindau syndrome in Chinese patients. *Chin Med J* **124**, 237–241 (2011).
197. Gomy, I., Molfetta, G. A., de Andrade Barreto, E., *et al.* Clinical and molecular characterization of Brazilian families with von Hippel-Lindau disease: a need for delineating genotype-phenotype correlation. *Fam Cancer* **9**, 635–642 (2010).
198. Richards, S., Aziz, N., Bale, S., *et al.* ACMG Standards and Guidelines Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants : a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* **17**, 405–424 (2015).

199. Altimari, A., De Biase, D., De Maglio, G., *et al.* 454 next generation-sequencing outperforms allele-specific PCR, sanger sequencing, and pyrosequencing for routine KRAS mutation analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded samples. *Onco. Targets. Ther.* **6**, 1057–1064 (2013).
200. Gnarra, J. R., Tory, K., Weng, Y., *et al.* Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* **7**, 85–90 (1994).
201. Pause, A., Lee, S., Lonergan, K. M., *et al.* The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene is required for cell cycle exit upon serum withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 993–998 (1998).
202. Iliopoulos, O., Kibel, a, Gray, S., *et al.* Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat. Med.* **1**, 822–826 (1995).
203. Carroll, V. A., Ashcroft, M. Role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha versus HIF-2alpha in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res.* **66**, 6264–6270 (2006).
204. Sourbier, C., Srivastava, G., Ghosh, M. C., *et al.* Targeting HIF2 α translation with Tempol in VHL-deficient clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* **3**, 1472–1482 (2012).
205. Kondo, K., Klco, J., Nakamura, E., *et al.* Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* **1**, 237–246 (2002).
206. Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* **7**, 248–249
207. Kumar, P., Henikoff, S., Ng, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* **4**, 1073–1081 (2009).
208. Ng, P. C., Henikoff, S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**, 61–80 (2006).
209. Ng, P. C., Henikoff, S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* **11**, 863–874 (2001).
210. Ng, P. C., Henikoff, S. Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome Res.* **12**, 436–446 (2002).
211. Ng, P. C., Henikoff, S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3812–3814 (2003).
212. Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., *et al.* MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods* **11**, 361–362 (2014).
213. Schwarz, J. M., Rodelsperger, C., Schuelke, M., *et al.* MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* **7**, 575–576 (2010).
214. Li, B., Krishnan, V. G., Mort, M. E., *et al.* Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics* **25**, 2744–2750 (2009).

215. Capriotti, E., Fariselli, P., Casadio, R. I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res.* **33**, W306–310 (2005).
216. Capriotti, E., Calabrese, R., Casadio, R. Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics* **22**, 2729–2734 (2006).
217. Calabrese, R., Capriotti, E., Fariselli, P., *et al.* Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum. Mutat.* **30**, 1237–1244 (2009).
218. Ding, Z., Liang, J., Lu, Y., *et al.* A retrovirus-based protein complementation assay screen reveals functional AKT1-binding partners. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 15014–15019 (2006).
219. Pennisi, P. A., Barr, V., Nunez, N. P., *et al.* Reduced expression of insulin-like growth factor I receptors in MCF-7 breast cancer cells leads to a more metastatic phenotype. *Cancer Res* **62**, 6529–6537 (2002).
220. Liu, X.-D., Yao, J., Tripathi, D. N., *et al.* Autophagy mediates HIF2 α degradation and suppresses renal tumorigenesis. *Oncogene* **34**, 2450–2460 (2015).
221. Debnath, J., Muthuswamy, S. K., Brugge, J. S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* **30**, 256–268 (2003).
222. Raval, R. R., Lau, K. W., Tran, M. G. B., *et al.* Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 5675–5686 (2005).
223. Domene, C., Illingworth, C. J. R. Effects of point mutations in pVHL on the binding of HIF-1 α . *Proteins* **80**, 733–746 (2012).
224. Miller, F., Kentsis, A., Osman, R., *et al.* Inactivation of VHL by tumorigenic mutations that disrupt dynamic coupling of the pVHL-hypoxia-inducible transcription factor-1alpha complex. *J Biol Chem* **280**, 7985–7996 (2005).
225. John, A. M. C., Doss, G. P., Ebenazer, A., *et al.* P.Arg82Leu von Hippel-Lindau (VHL) gene mutation among three members of a family with familial bilateral pheochromocytoma in India: molecular analysis and in silico characterization. *PLoS One* **8**, e61908 (2013).
226. Liu, J., Nussinov, R. Allosteric effects in the marginally stable von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and allostery-based rescue mutant design. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 901–906 (2008).
227. Kageyama, Y., Koshiji, M., To, K. K. W., *et al.* Leu-574 of human HIF-1alpha is a molecular determinant of prolyl hydroxylation. *FASEB J.* **18**, 1028–1030 (2004).
228. Minervini, G., Masiero, A., Moro, S., *et al.* In silico investigation of PHD-3 specific HIF1- α proline 567 hydroxylation: a new player in the VHL/HIF-1 α interaction pathway? *FEBS Lett.* **587**, 2996–3001 (2013).
229. *GaussView 5.0, Gaussian Inc., Wallingford CT.* (2008).

230. Case, D.A., Darden, T.E, Cheatham, C.L., et al. AMBER 12, University of California, San Francisco. (2012).
231. Duan, Y., Wu, C., Chowdhury, S., et al. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J. Comput. Chem.* **24**, 1999–2012 (2003).
232. Park, S., Radmer, R. J., Klein, T. E., et al. A new set of molecular mechanics parameters for hydroxyproline and its use in molecular dynamics simulations of collagen-like peptides. *J. Comput. Chem.* **26**, 1612–1616 (2005).
233. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926 (1983).
234. Pastor, R. W., Brooks, B. R., Szabo, A. An analysis of the accuracy of Langevin and molecular dynamics algorithms. *Mol. Phys.* **65**, 1409–1419 (2006).
235. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684 (1984).
236. Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., Berendsen, H. J. C., et al. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **23**, 327–341 (1977).
237. Essmann, U., Perera, L., Berkowitz, M. L., et al. A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **103**, 8577 (1995).
238. Shao, J., Tanner, S. W., Thompson, N., et al. Clustering Molecular Dynamics Trajectories: 1. Characterizing the Performance of Different Clustering Algorithms. *J. Chem. Theory Comput.* **3**, 2312–2334 (2007).
239. Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–8, 27–8 (1996).
240. Fogolari, F., Brigo, A., Molinari, H. Protocol for MM/PBSA molecular dynamics simulations of proteins. *Biophys J* **85**, 159–166 (2003).
241. Miller, B. R., Mcgee, T. D., Swails, J. M., et al. MMPBSA.py: An Efficient Program for End-State Free Energy Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 3314–3321 (2012).
242. Hou, T., Wang, J., Li, Y., et al. Assessing the Performance of the MM / PBSA and MM / GBSA Methods . I . The Accuracy of Binding Free Energy Calculations Based on Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Inf. Model* **51**, 69–82 (2010).
243. Xu, L., Sun, H., Li, Y., et al. Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 3. the impact of force fields and ligand charge models. *J. Phys. Chem. B* **117**, 8408–8421 (2013).
244. Genheden, S., Ryde, U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. *Expert Opin. Drug Discov.* **441**, 1–13 (2015).
245. Bangiyeva, V., Rosenbloom, A., Alexander, A. E., et al. Differences in regulation of tight junctions and cell morphology between VHL mutations from disease subtypes. *BMC Cancer* **9**, 229 (2009).

246. Ding, Z., German, P., Bai, S., *et al.* Genetic and pharmacological strategies to refunctionalize the von Hippel Lindau R167Q mutant protein. *Cancer Res.* **74**, 3127–3136 (2014).
247. Hansen, W. J., Ohh, M., Moslehi, J., *et al.* Diverse effects of mutations in exon II of the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene on the interaction of pVHL with the cytosolic chaperonin and pVHL-dependent ubiquitin ligase activity. *Mol Cell Biol* **22**, 1947–1960 (2002).
248. Li, L., Zhang, L., Zhang, X., *et al.* Hypoxia-inducible factor linked to differential kidney cancer risk seen with type 2A and type 2B VHL mutations. *Mol Cell Biol* **27**, 5381–5392 (2007).
249. Lee, S. J., Lattouf, J.-B. B., Xanthopoulos, J., *et al.* Von Hippel-Lindau tumor suppressor gene loss in renal cell carcinoma promotes oncogenic epidermal growth factor receptor signaling via Akt-1 and MEK-1. *Eur Urol* **54**, 845–853 (2008).
250. Schoenfeld, A. R., Davidowitz, E. J., Burk, R. D. Elongin BC complex prevents degradation of von Hippel-Lindau tumor suppressor gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8507–8512 (2000).
251. Park, K.-S., Kim, J. H., Shin, H. W., *et al.* E2-EPF UCP regulates stability and functions of missense mutant pVHL via ubiquitin mediated proteolysis. *BMC Cancer* **15**, 800 (2015).
252. Lonergan, K. M., Iliopoulos, O., Ohh, M., *et al.* Regulation of hypoxia-inducible mRNAs by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein requires binding to complexes containing elongins B/C and Cul2. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 732–741 (1998).
253. Kishida, T., Stackhouse, T. M., Chen, F., *et al.* Cellular proteins that bind the von Hippel-Lindau disease gene product: mapping of binding domains and the effect of missense mutations. *Cancer Res.* **55**, 4544–4548 (1995).
254. Rathmell, W. K., Hickey, M. M., Bezman, N. A., *et al.* In vitro and in vivo models analyzing von Hippel-Lindau disease-specific mutations. *Cancer Res* **64**, 8595–8603 (2004).
255. Knauth, K., Bex, C., Jemth, P., *et al.* Renal cell carcinoma risk in type 2 von Hippel-Lindau disease correlates with defects in pVHL stability and HIF-1 α interactions. *Oncogene* **25**, 370–377 (2006).
256. Wiesener, M. S., Seyfarth, M., Warnecke, C., *et al.* Paraneoplastic erythrocytosis associated with an inactivating point mutation of the von Hippel-Lindau gene in a renal cell carcinoma. *Blood* **99**, 3562–3565 (2002).
257. Leonardi, E., Martella, M., Tosatto, S. C., *et al.* Identification and in silico analysis of novel von Hippel-Lindau (VHL) gene variants from a large population. *Ann Hum Genet* **75**, 483–496 (2011).
258. Tong, A. L., Zeng, Z. P., Li, H. Z., *et al.* von Hippel-Lindau gene mutation in non-syndromic familial pheochromocytomas. *Ann N Y Acad Sci* **1073**, 203–207 (2006).
259. Zimmer, M., Doucette, D., Siddiqui, N., *et al.* Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL $^{-/-}$ tumors. *Mol. Cancer Res.* **2**, 89–95 (2004).

260. Kim, M., Yan, Y., Lee, K., *et al.* Ectopic expression of von Hippel-Lindau tumor suppressor induces apoptosis in 786-O renal cell carcinoma cells and regresses tumor growth of 786-O cells in nude mouse. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 945–950 (2004).
261. QuikChange® Primer Design.
<http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgra>
262. Wang, X., Seed, B. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Res.* **31**, e154 (2003).
263. Wang, X., Spandidos, A., Wang, H., *et al.* PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic Acids Res.* **40**, D1144–1149 (2012).
264. Spandidos, A., Wang, X., Wang, H., *et al.* A comprehensive collection of experimentally validated primers for Polymerase Chain Reaction quantitation of murine transcript abundance. *BMC Genomics* **9**, 633 (2008).
265. Spandidos, A., Wang, X., Wang, H., *et al.* PrimerBank: a resource of human and mouse PCR primer pairs for gene expression detection and quantification. *Nucleic Acids Res.* **38**, D792–799 (2010).
266. Roche Universal Probe Library. Available at:
<https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?tab=Assay+Design+Center&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1>.
267. Qian, W. F., Guan, W. X., Gao, Y., *et al.* Inhibition of STAT3 by RNA interference suppresses angiogenesis in colorectal carcinoma. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **44**, 1222–1230 (2011).

ANEXOS

ANEXO 1

MATERIALES

-Extracción de ADN: Se utilizó CTAB (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y para purificar los fragmentos amplificados el kit AccuPrep®PCR Purification Kit (Bioneer Corporation, Korea).

-Detección de mutaciones puntuales: Los cebadores utilizados se muestran en la tabla A1.1

Tabla A1.1- Secuencia de los cebadores utilizados para la PCR de los exones de *VHL*

Exón	Dirección	Secuencia
1	Sentido	5' CCA TCC TCT ACC GAG CGC GCG 3'
1	Antisentido	5' GGG CTT CAG ACC GTG CTA TCG 3'
2	Sentido	5' CAA AGT GCT GGG ATT ACA GGT GTG G 3'
2	Antisentido	5' TCA GGC AAA AAT TGA GAA CTG GGC 3'
3	Sentido	5' TGT TGG CAA AGC CTC TTG TTC G 3'
3	Antisentido	5' AAA CTA AGG AAG GAA CCA GTC C 3'

UPQFM PCR:

Los cebadores y las condiciones de ciclado utilizados se muestran en las **tablas A1.2 y A1.3.**

Tabla A1.2-Secuencia de los cebadores utilizados para la UPQFM PCR.

Reacción	Región amplificada	Cebadores		Cantidad de cebador agregado (picomoles)	Largo del producto final (pb)	
		Nombre	Secuencia			
PCR 1	Exón 1	E1 F	P2UnivF- TAC GGC CCT GAA GAA GAC G	5	321	
		E1 R	P2UnivR- TAC CTC GGT AGC TGT GGA TG	5		
	Exón 2	E2 F	P2UnivF- AGA CGA GGT TTC ACC ACG TT	2		396
		E2 R	P2UnivR- GGG CTT AAT TTT TCA AGT GGT C	2		
	Exón 3	E3 F	P2UnivF- TAC TGA GAC CCT AGT CTG TCA	1,5		364
			CTG			
	β globina	B F	P2UnivR- CTA AGG AAG GAA CCA GTC CTG	1,5		364
			TAT			
β globina	B R	P2UnivF- CAC ACC CTA GGG TTG GCC AA	2	304		
		P2UnivR- ACC TGT CTT GTA ACC TTG ATA C	2			
PCR 2	Todas las anteriores	P2UnivF	TCC GTC TTA GCT GAG TGG CGT A	8		
		P2UnivR	6-Fam AGG CAG AAT CGA CTC ACC GCT A	8		

Tabla A1.3- Condiciones de ciclado para las dos PCR necesarias en la UPQFM PCR

Reacción	Desnaturalización inicial a 94°C	Cada ciclo de			Nº de ciclos	Elongación final a 72°C	Molde	Volumen final de reacción (µl)
		Desnaturalización a 95°C	Hibridación a 60°C	Elongación a 72°C				
PCR 1	10 minutos	1 minuto	2 minutos	1 minuto	9	5 minutos	100 ng de ADN genómico	25
PCR 2	4 minutos	1 minuto	2 minutos	1 minuto	20	5 minutos	4 µl de producto de PCR 1	50

MLPA: Se utilizó el kit SALSA MLPA KIT P016-C2 VHL (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda). En la **figura A1.1** se muestra la ubicación de las 9 sondas utilizadas para el gen VHL.

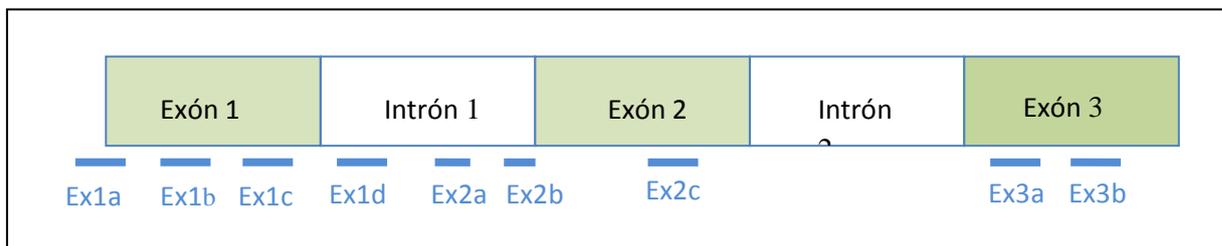


Figura A1.1- Esquema del gen *VHL* y las sondas utilizadas por el kit. Las abreviaturas de las sondas se encuentran descritas en la tabla A1.4 (El tamaño de los exones y sondas no está realizado a escala).

Tabla A1.4- Descripción de las sondas del kit de MLPA utilizado.

Largo (nt)	Posición	Nombre de la sonda	Abreviatura utilizada
166	16p13	Reference Probe 09890-L10303	
175	Exón 2	VHL probe 13624-L16363	Ex2a
184	3p26.3	CNTN6 probe 06307-L05830	
193	3p25.3	C3ORF10 probe 14676-L16328	
201	Exón 2	VHL probe 02390-L16140	Ex2b
211	5q31	Reference Probe 13450-L14905	
219	Exón 1	VHL probe 01626-L01211	Ex1a
229	3p25.3	IRAK2 probe 02264-L01750	IRAK 2
238	3p22.1	MLH1 probe 00892-L0480	
247	Exón 3	VHL probe 01162-L00718	Ex3b
256	17q21	Reference probe 01055-L00628	
265	15q21	Reference probe 02454-L01898	
274	Exón 1	VHL probe 01628-L01213	Ex1b
283	3p25.3	FANCD2 probe 02138-L01631	
301	3p25.3	GHRL probe 02266-L01752	
310	3p25.3	FANCD2 probe 02140-L01633	
319	20p12	Reference probe 05981-L05406	
328	Exón 1	VHL probe 13625-L15079	Ex1d
337	22q11	Reference probe 01082-L00660	
346	7q11	Reference probe 01335-L00879	
355	11q22	Reference probe 00547-L00116	
364	3p25.3	C3ORF10 probe 14675-L16327	
373	Exón 1	VHL probe 01158-L13266	Ex1c
382	10q22	Reference probe 00973-I00560	
391	Exón 2	VHL probe 13322-L14735	Ex2b
400	13q14	Reference probe 00801-L00639	
409	11p12	Reference probe 00669-L00373	
418	Exón 3	VHL probe 01161-L00717	Ex3a
427	7q35	Reference probe 00680-L00121	

Las condiciones de ciclado se muestran en la **figura A1.2**:

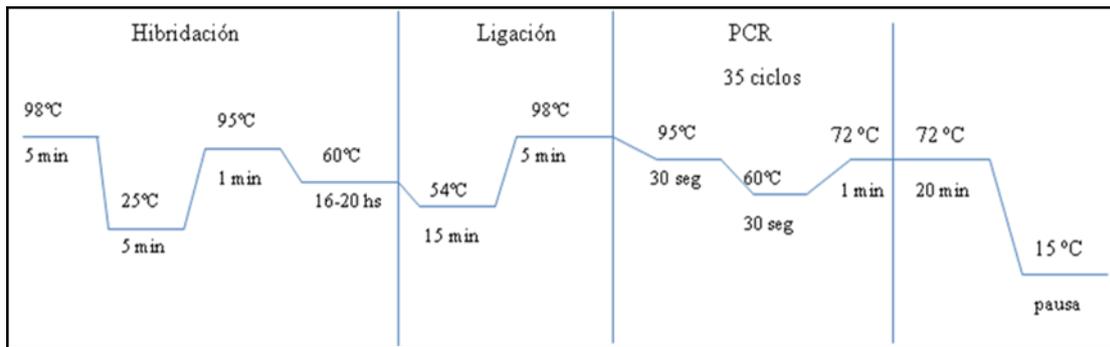


Figura A1.2– Condiciones de ciclado para cada reacción de MLPA

Las secuenciaciones automáticas así como las separaciones por electroforesis capilar fueron realizadas en un secuenciador automático ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Otros reactivos utilizados: Agarosa (Invitrogen, Carlsbad, CA, US), Bromuro de etidio (Promega, Madison, WI, USA), Cebadores (Eurofins MWG Operon, Huntsville, AL, USA), dNTPs (Genbiotech, Buenos Aires, Argentina), Go Taq® DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA), MgCl₂ (Promega, Madison, WI, USA), 100bp DNA Ladder (Promega, Madison, WI, USA) .

ANEXO 2

MATERIALES

-Líneas celulares: Las líneas celulares 786-0 (ATCC® CRL-1932™) y HEK293T (ATCC® CRL-3216™) fueron obtenidas en ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA).

-Medio de cultivo y suplementos utilizados :El medio de cultivo utilizado para el crecimiento células RCC 786-0 y sus derivadas, así como las HEK293T fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con alta cantidad de glucosa (4,5 g/L) (11995-040, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) estéril irradiado e inactivado (30 minutos a 56°C), (Natocor, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina), 1X de GlutaMAX™ (dilución 1/100, 35050-061, Gibco), 2,5 µg/ml de anfotericina B (Fungizone®, 15290-026, Gibco), Pen Strep (15140-122, Gibco): 100 U/ml Penicilina y 100 µg/ml Estreptomicina. Para preparar suspensiones celulares las mismas se trataron con 0,25% Tripsina-EDTA (25200-072, Gibco).

-Plásmidos: Los plásmidos: GFP-Retro (pLEGFP-N1, 6059-1, BD Biosciences Clontech) , VHL-wt-Venus-Retro¹¹² (derivado del pLEGFP-N1 que contiene un derivado de la proteína verde fluorescente GFP denominado Venus), pcGP y pVSVG (requeridos para la formación del retrovirus) fueron gentilmente cedidos por el Dr. Zhiyong Ding (The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA).

-Mutagénesis dirigida: para la misma se utilizó el kit Quikchange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (200521, Agilent Technologies). Los cebadores utilizados para generar las variantes fueron diseñados con el programa QuikChange® Primer Design²⁶¹ (Agilent Technologies) y son los siguientes:

P138R sentido(*forward*)5'-ccaaactgaattatttgtgcatctctcaatggtgacggac-3'

antisentido(reverse)5'-gtccgtcaacattgagagatcgcacaaataattcagtttg-3'

L163R: sentido5'-gaaagagcggatgccgccaggtgtccgga-3'

antisentido5'-tccggacaacctggcgcatcgctctttc-3'.

Las bacterias competentes XL 10- Gold® y la enzima de restricción *Dpn I* utilizadas fueron las provistas en el kit de mutagénesis. Para la transformación y crecimiento de las bacterias se utilizaron los medios LB, LB Agar(12795-027y 22700-025, Invitrogen) y SOC (B90205, New England Biolabs). Para extraer el ADN plasmídico de las bacterias se utilizaron los kits QIAprep Spin Miniprep Kit y QIAGEN Plasmid Maxi Kit (27106 y 12162, QIAGEN). Los plásmidos mutados fueron secuenciados utilizando el cebador 5'-TTGACGCAAATGGGCGGTAGG-3'.

-Generación de retrovirus e infección de células 786-0: Los plásmidos requeridos para el ensamblado de los retrovirus en las células HEK 293T (pcGP y pVSVG) fueron gentilmente cedidos por el Dr. Zhiyong Ding. Para la transfección de las HEK 293T con los plásmidos del virus y el plásmido de expresión se utilizó Lipofectamina (Lipofectamine 2000 Reagent, 11668-027, Invitrogen) y el medio de cultivo Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (31985062, ThermoFisherScientific). La selección de las células 786-0 infectadas con los retrovirus se realizó con G418/Geneticina (10131027, ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA).

-Western Blot: el lisado de las células para extracción de proteínas se realizó con buffer de lisis pH 7,5: 10mM Tris, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 100 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₄, 1% Tritón, 10 mM Na₃VO₄, suplementado con el inhibidor de proteasas Complete Mini EDTA-free (Ref 11836170001, Roche, 1 tableta cada 10 ml de buffer de lisis). Para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford se utilizó el reactivo Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (#500-0006, Bio-Rad). Los geles para la separación de proteínas por SDS-PAGE se prepararon a partir de una solución 40% Acrilamida/ Bis acrilamida (#161-0146, Bio Rad). El estándar de peso molecular utilizado fue Amersham ECL Rainbow Molecular Weight Markers (RPN800E, GE Healthcare Life Sciences) y las membranas de PVDF de 0,45 µm : Amersham Hybond™- P, RPN303F (GE Healthcare Life Sciences). Para el revelado se utilizaron ECL (Amersham ECL Prime Reagent, RPN 2232, GE Healthcare Life Sciences) y las placas autorradiográficas CL-Xposure Film (34089, Thermo Fisher Scientific)

-Los anticuerpos primarios utilizados para Western Blot fueron: VHL (BD Biosciences556347, dil1/5000), GFP (Santa Cruz sc-8334, dil 1/1000), HIF 2α (Novus Biologicals NB100-122, dil 1/1000), β actina (Cell Signaling #4970, dil 1/1000), Elonguina B (Santa Cruz sc-133090, dil 1/500) Elonguina C (Santa Cruz sc-1559, dil 1/500). Los anticuerpos secundarios: anti conejo (Cell Signaling #7074, dil 1/5000), anti cabra (Santa Cruz sc 2020, dil 1/2000) y anti ratón (Cell Signaling #7076, dil 1/2000).

-Inmunoprecipitación: se utilizó un kit comercial, GFP-Trap®_A (ChromotekGmbH, Alemania).

-Extracción de ARN: se utilizó el kit Direct-Zol (ZymoResearch, Irvine, CA). Las retrotranscripciones fueron catalizadas por la enzima Superscript II (Life

Technologies) utilizando *Random hexamers* (Random primers, B070-40, Biodynamics).

-PCR en tiempo real: fue realizada utilizando la enzima comercial KapaSybrFast (KapaBiosystems, Boston, MA) en el equipo StepOne Plus (Life Technologies)

Los cebadores utilizados para la PCR en tiempo real se muestran en la **tabla A2.1**. Los cebadores para VHL y TBP fueron diseñados utilizando la herramienta Primer-Blast del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Los restantes fueron obtenidos de las siguientes referencias:

Fibronectina (FN): Harvard PrimerBank^{262–265}, ID 47132556c1.

HIF2A y GAPDH: Liu *et al*, 2014²²⁰.

GLUT 1 probe: #67, cat.no. 04688660001, Universal Probe Library, Roche²⁶⁶.

VEGFA: Qian *et al*, 2011²⁶⁷.

Tabla A2.1- Información sobre los cebadores utilizados para PCR en tiempo real

Gen	Secuencia cebador	Tamaño del amplicón (pb)	Concentración de cebadores
Fibronectina (FN1)	f 5' CGGTGGCTGTCAGTCAAAG 3'	130	500nM
	r 5' AAACCTCGGCTTCCTCCATAA 3'		
GAPDH	f 5' CAATGACCCCTTCATTGACC3'	159	500 nM
	r 5' TTGATTTTGGAGGGATCTCG 3'		
GLUT 1	f 5' GGTTGTGCCATACTCATGACC 3'	66	900 nM
	r 5' CAGATAGGACATCCAGGGTAGC 3'		
HIF2A	f 5' TTGATGTGGAACGGATGAA 3'	196	500 nM
	r 5' GGAACCTGCTCTTGCTGTTC 3'		
TBP	f 5' GATCAAACCCAGAATTGTTCTCC 3'	134	900 nM
	r 5' ATGTGGTCTTCCTGAATCCCTTT 3'		
VEGFA	f 5' GAACTTTCTGCTGTCTTGGGT 3'	167	350 nM
	r 5' TCTCGATTGGATGGCAGTA 3'		
VHL	f 5' CCCAGGTCATCTTCTGCAAT 3'	235	500 nM
	r 5' TTGGCAAAATAGGCTGTCC 3'		

-Modelo de xenotransplante murino: Los ratones inmunodeficientes (stock LAE N:NIH (S)-Fox1^{nu}), fueron obtenidos del Bioterio del Laboratorio de Animales de Experimentación de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata, Argentina

-Deposición de fibronectina: Anticuerpo anti-fibronectina (dil 1/100,12111-019, Life Technologies) fue gentilmente cedido por la Dra. Marina Simian, anticuerpo anti conejo marcado con fluorocromo Cy5 (dil 1/ 150, 711-175-152 Jackson Immuno Research Laboratories Inc,West Grove, PA, USA), Hoechst (Hoechst 33258, B2883, Sigma Aldrich), Mowiol (Mowiol®4-88, 81381, Sigma Aldrich), Paraformaldehído (18501, TED Pella Inc, Redding, CA, USA), Sacarosa(84100, Sigma Aldrich), Triton™ X-100 (X100, Sigma Aldrich).

Otros reactivos utilizados:

Agar Base (101614, Merck Millipore), Cicloheximida (C7698, Sigma Aldrich), β-mercaptoetanol (M6250 Sigma Aldrich),CoCl₂ (232696 Sigma Aldrich),Dodecilsulfato sódico-SDS (15525-017, Invitrogen), Persulfato de amonio-APS (V3131, Promega), TEMED (T9281, Sigma Aldrich), TRIzol® Reagent (15596-026, Life Technologies), TWEEN® 20 (P2287, Sigma Aldrich).Botellas de cultivo de 75 cm², placas de 6 pocillos, placas de 60 mm de diámetro y todos los materiales de plástico descartables utilizados en el cuarto de cultivo fueron obtenidos de la firma Corning (Corning, MA, USA).

Buffers utilizados

PBS: 10 mM PO_4^{3-} , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7,4.

Buffer de lisis para proteínas pH 7,5: 10mM Tris, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 100 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_4$, 1% Tritón, 10 mM Na_3VO_4 .

Buffer de siembra: 31.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 1% SDS, 0.005% azul de bromofenol, 10% β mercaptoetanol.

Buffer de siembra SDS 2X (utilizado para separación de proteínas luego de GFP-Trap) 120 mM Tris-HCl pH 6.8; 20% glicerol, 4% SDS, 0,04% azul de bromofenol, 10% β mercaptoetanol.

TBS: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6

TBS-Tween 0,1%: TBS + 0,1 % TWEEN® 20