

DERLEME / REVIEW

VON HIPPEL-LINDAU TÜMÖR BASKILAYICI GENİNE MOLEKÜLER YAKLAŞIM MOLECULAR APPROACH TO VON HIPPEL-LINDAU TUMOR SUPPRESSOR GENE

Hasan Saygın DEMİREL¹, İlknur ÇINAR²

¹Tusem Eğitim Kurumları, İSTANBUL

²Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, KONYA

ÖZ

von Hippel-Lindau (VHL) gen proteininin tümör baskılamasıyla ilgili en iyi tanımlanmış fonksiyonu substrat tanıyıcı olarak bir E3 ubiquitin ligaz kompleksinde yer almasıdır. Bu kompleks normoksik koşullarda, hipoksi indüklenebilir faktör 1- α 'nın (HIF-1 α) alt birimini hedefleyerek, ubiquitinasyon yoluyla HIF-1 α 'nın hızlı proteazomal degradasyonunu sağlamaktadır. Mutasyon veya promotör metilasyonu ile oluşan VHL fonksiyon aberrasyonları hücrede HIF-1 α toplanmasına sebep olur ki bu da bir dizi hipoksi cevap genlerinin transkripsiyonunu aktifler ve böylece bir tümörün gelişimi için önkoşul olan kan damarı oluşumunu hızlandırır. Bu derlemede, tümör baskılanmasını içeren VHL-E3 ubiquitin ligaz kompleksi ve onkogenezi VHL/HIF-1 regülasyonunda önemli roller alan moleküler mekanizmaları incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: von Hippel-Lindau, tümör baskılayıcı gen, hipoksi, kanser.

ABSTRACT

von Hippel-Lindau (VHL) gene protein related to tumor suppression, well-defined function is taking part of E3 ubiquitin ligase complex as a substrate recognizer. In normoxia conditions this complex provides rapid proteasomal degradation of , hipoksi indüklenebilir faktör 1- α (HIF-1 α) via the ubiquitination by targeting HIF-1 α . VHL function aberrations that occurs by mutation or promoter methylation, lead to accumulation of HIF-1 α in the cell, so this also activate transcription of a series of hypoxia response genes and so accelerate blood vessel formation that prerequisite for development of a tumor. In this review, we wanted to examine VHL-E3 ubiquitin ligase complex containing tumor suppression and molecular mechanisms that have important roles in the VHL/HIF-1 regulation in oncogenesis.

Keywords: von Hippel-Lindau, tumor suppressor gene, hypoxia, cancer.

GİRİŞ

İnsan neoplazmalarında bulunan birçok stimülatör "onkogenler" ve baskılayıcı "tümör supressör genler" 1980'lerden günümüze yoğun araştırmaların odağı olmuş olup hem tümörogenezisin hem de normal düzenleyici büyüme yollarının ne kadar karmaşık olduğunun anlaşılmasını sağlamıştır (1,2). Tümörogenezisten onkogenler, tümör baskılayıcı genler ve genetik kararlılığı koruyucu genler sorumludurlar (3). Genellikle hücrenin normal çoğalmasını denetleyen sinyal yollarında görev yapan hücresel genlere protoonkogenler denir. Hücrede bazı değişimlere eklenen, bir protoonkogenin bir allelindeki aktive edici somatik bir mutasyon, hücreye seçici çoğalma avantajı sağlamaya yeterli olabilir, yani bir onkogen haline gelebilir (4). Genetik değişimler tümör baskılayıcı genleri zıt yönde etkilemektedir; bu durum gen ürünlerinin aktivitelerini azaltarak veya ortadan kaldırarak gen fonksiyonlarının kaybına sebep olurlar (3,5). Dominant etkili tümör baskılayıcı genlerin iki vuruş hipotezine (two genetic hits) göre her iki allelinin de etkisizleşmesi gerekmektedir (6). Hücreye seçici bir avantaj kazandırmak için gerekli mutasyonlardan biri tümör baskılayıcı genlerin maternal veya paternal alellerini etkileyen genetik (epigenetik de olabilir) değişimler olabilir. Böyle bir durumda inaktivasyon, bir allelin delesyonu ya da kalıtsal olarak heterozigotluğu üzerine diğer allelin de somatik mutasyonu; sonuçta tümör baskılayıcı genin her iki allelinin de etkisizleşmesinden kaynaklanabilir (7). Kanseri genlerinin, mutasyona uğradığında tümörogenezisi tamamen farklı bir yoldan kolaylaştıran üçüncü bir sınıfı ise stabilizeyi koruyucu genlerdir. Bunlar normal DNA replikasyonu sırasında oluşan hata veya mutajenlere maruz kalma sonucu indüklenen yanlışlıkların düzeltilmesinden sorumludurlar (4,8-10).

Mutasyonlardan potansiyel olarak tüm genlerin fonksiyonları farklı şekilde etkilenebilir; ancak sadece onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar net olarak hücre büyümesini ve bölünmesini etkileyerek mutant hücreye seçici bir çoğalma avantajı sağlayabilirler (3). Moleküler çalışmalardan elde edilen kanıtlar, tümörogenezisin çok aşamalı bir süreç olarak

geliştiğini göstermektedir. Bu süreç içerisinde, genetik değişimler sonucu, normal bir hücre sürekli transformasyonla malign bir tümöre dönüşebilmektedir (11,12). Kanserin temelinde yatan çoklu mutasyonların birbirini izlemesi için özellikle genetik kararsızlığın gerekliliği vurgulanmıştır. Genetik kararsızlık neoplazi için gerekli olan karmaşık bir takım değişikliklerin hücrede birikmesini hızlandırmaktadır (13,14). Bu konuda yapılan ayrıntılı çalışmaların sonuçları ve hızla gelişen moleküler bilgi artışı tıp uygulamalarında yeni ufuklar açmış, kanserden korunma ve tedavi konusunda etkili olanaklar sunmuştur (15-18).

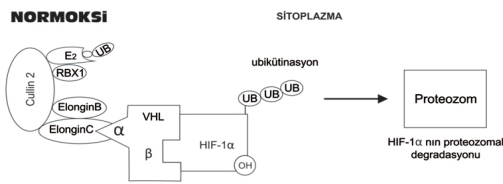
İNSAN VHL GENİ VE PROTEİNLERİ

İnsanlarda tümör baskılayıcı bir gen olan VHL kromozom 3'ün kısa kolunda lokalize (3p25-26) 3 ekzonlu bir gendir. VHL gen promotörünün transkripsiyon faktörleri için pek çok bağlanma yerlerine sahip olduğu öngörülmekte olup, VHL ekspresyonunun nasıl kontrol edildiği açıklanmaya çalışılmaktadır. Bu genin kodladığı 4-7 kb uzunluğundaki mRNA'dan, bilinen herhangi bir proteine benzemeyen farklı büyüklükte iki protein sentezlenir. Bunlardan biri 30 kDa moleküler ağırlıklı bir protein olup VHL30 diye adlandırılır. Diğer alternatif translasyonla sentezlenen yaklaşık 18-19 kDa'luk daha kısa bir VHL19 proteindir. Her iki molekül de tümör baskılayıcı aktiviteyi sağlar ve VHL terimi jenerik olarak benzer fonksiyona sahip olmalarından dolayı her iki izoform için de kullanılır (19,20).

VHL PROTEİNİNİN İŞLEVLERİ

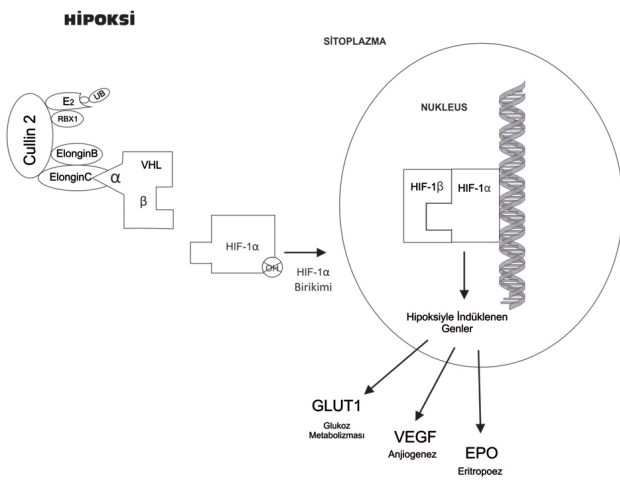
VHL gen ürünü olan VHL proteini birçok hücre proteini ile etkileşir; anjiyogenezin kontrolünde, ekstrasellüler matriksin formasyonunda, hücre metabolizmasında ve mitogenezde rol alır (21-24). Bunun yanı sıra, VHL proteininin en iyi tanımlanmış fonksiyonu substrat tanıyıcı olarak bir E3 ubiquitin ligaz kompleksinde yer almasıdır. HIF aktivitesinin başlıca regülatörü olan bu kompleks normoksik koşullarda, HIF'in HIF-1 α alt birimini hedefleyerek, ubiquitinasyon yoluyla HIF-1 α 'nın hızlı protozomal degradasyonunu sağlar (25-27). Oksijen varlığında HIF-1 α 'nın hidroksilasyonu ile etkinleşen VHL proteini fonksiyonel hedefi olan iki regülatör altyapıya, Elongin C ve Elongin B'ye (hücresel transkripsiyon

yon faktörleri) bağlanır ve bağlantı sonrası Cul-2 (Cul2) diye adlandırılan dördüncü bir proteinle etkileşir (28-30). Bu VHL/elonginCB/Cul2 kompleksi ring box protein 1 (Rbx1) denilen bir proteinle daha etkileşerek poliubikitinasyon için uygun bir hedef oluşur. Yapıya eklenen bu enzimler genellikle ubikitin ligazlar (E2, E3 kompleksleri) olarak bilinir ve böylece oluşan poliubikitin kuyruğu yıkıma uğrayacak substrata bir sinyal ya da flama hizmeti yaparak intrasellüler yıkım için hedef proteinle bağlanırlar (**Şekil 1**) (31,32). Hipoksik koşullarda ise HIF-1 α hidrosillenemez, hidrosillenemeyen HIF-1 α



Şekil 1: Normoksi koşullarda HIF-1 α hidrosilasyonuyla VHL'nin düzenlenmesi.

yıkım için VHL proteinine bağlanamaz ve birikir. Bu durumlarda yıkılmayarak stabil hale gelen HIF-1 α alt ünitesinin nükleusa geçtiği, HIF'in diğer alt ünitesi HIF-1 β ile birleşerek özel DNA sekanslarına bağlandığı, Vascular endothelial growth factor (VEGF) ve Eritropoietin (Epo) gibi bir takım hedef genlerin aktivasyonları aracılığı ile VHL/HIF-1 α yolağının tümör ilerlemesi ve metastazında özel bir role sahip olduğu gösterilmiştir (**Şekil 2**) (33-35).



Şekil 2: Hipoksi koşullarında VHL'nin inaktivasyonu.

Hücrelerde VHL proteininin yetersiz olması durumunda, ortamda oksijen olsa bile, HIF-1 α alt ünitesinin yıkımı gerçekleşmez (20,27,36-38). VHL hastalıklarında VHL'nin elongin B ve elon-

gin C'ye bağlandığı yerlerinin sıklıkla mutasyona uğradıkları gösterilmiştir (19,39,40). VHL'de oluşan bu değişimler nedeniyle hipoksiyle indüklenebilir proteinler uygun şekilde yıkılmaz, birikir ve stabil hale gelerek HIF tarafından regüle edilen hedef genleri indükleyebilir ve yeni kan damarları oluşabilir (41). Böylece VHL yetersizliğinde, HIF degradasyonu bozulur ve hücreler oksijensizmiş gibi davranabilirler. Bu durumun, solid tümörlerin damarlanmasını ve gelişimini kolaylaştırarak tümör büyümesine yardımcı olduğu gösterilmiştir (34,42-44).

VHL HASTALIKLARININ GENETİK MEKANİZMALARI

Azalmış oksijene adaptasyon, yaşayan bütün organizmalar için temel bir gereksinimdir. Moleküler seviyede, hipoksiye karşı bu adaptasyonda Epo ve VEGF gibi hipoksi cevap genleri görev alırlar. Burada Epo kanda taşınan oksijen kapasitesini artırırken, VEGF kan akışını artırır. Vasküler permeabilite faktörü olarak da bilinen VEGF in vitro ve in vivo olarak hipoksi tarafından regüle edilen etkili bir anjiyogenik faktör olarak denenmiş, birçok tümör hücre yolaklarının gereğinden çok VEGF ürettikleri gösterilmiştir (45,46). Anjiyogenezis hücre ve doku hipoksisi için diğer bir adaptasyon cevabıdır (23). Başka bir deyişle tümör büyümesi için gerekli tümör anjiyogenezisi hipoksiye bir cevap olarak tanımlanır. Solid tümör büyümesi, tümör içinde anjiyogenez oluşumuna bağlıdır ki bu da VEGF gibi büyüme faktörleriyle sağlanır. Damarlanma, tümöre oksijen ve besin sağlarken metastaz oluşmasını da dolaşım sistemi yoluyla kolaylaştırmaktadır (47,48).

EPİGENETİK MEKANİZMALAR VE PROMOTÖR HİPERMETİLYASYONU

Dominant etkili tümör baskılayıcı gen inaktivasyonunda, bazı durumlarda genetik ve epigenetik mekanizmalar paralel etki yapabilirler; deneysel olarak mutasyonel ve epigenetik bir kombinasyonla her iki allelde de inaktivasyon meydana gelebileceği doğrulanmıştır (49-51). Kanserin temelde genetik bir hastalık olduğuna dayalı halen yapılmakta olan çalışmalara ek olarak, elde edilen veriler epigenetik olayların da önemli katkıları olduğunu ortaya koymaktadır (52,53). Kalıtsal modifikasyonların DNA yapı-

sındaki değişimlerden ziyade gen ekspresyon motifindeki değişimlere dayalı olarak ortaya çıkmasına epigenetik değişimler denir. Genlerin promotör bölgesindeki metilasyonunu da kapsayan bu epigenetik değişimler, genlerin transkripsiyonel aktivitesini veya onların ifadelerini etkileyebilir. DNA metilasyonu, genomik imprinting, kromozom stabilitesi ve gelişim sürecinde gen inaktivasyonunun sürekliliği ile korunmasını da içeren birçok olayın regülasyonunda yer alan kritik bir genom modifikasyonudur (9,53). Metilasyon hızının genetik mutasyon hızından büyük olduğu göz önüne alınırsa, epigenetik değişimlerin genetik mutasyonlardan ziyade neoplazmaları başlatabileceği görüşü önem kazanabilir (52). Anormal promotör metilasyonu ve imprinting kaybı gibi epigenetik değişimler, insan kanserlerinde yaygın değişimler olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda gen fonksiyon bozuklukları için tümör baskılayıcı genlerin promotör hipermetilasyonu genetik değişimlere alternatif olarak bilinir ve bunlar dokuya özel ya da tümöre özel tipte olabilirler (49,54,55).

DNA molekülleri sitozin bazlarına kovalent olarak bağlanan metil gruplarıyla değişikliğe uğrayabilirler, genomik DNA'nın bu modifikasyonu tümör baskılayıcı genleri devre dışı bırakan bir mutasyon kadar önemli olabilir. DNA metilasyonu, sitozin-fosfoguanin dinükleotidlerinde (CpG) zengin olan ve CpG adaları diye bilinen bölgelerdeki sitozinlerde yer almakla sınırlıdır. Bu adalar genellikle genin 5' ucunda, yani promotör çevresinde bulunurlar ki bu bölge DNA'nın RNA'ya transkripsiyonunun yapıldığı bölgelerle ilgili olup genellikle metillenmemişlerdir (56-58). Bu metillenmemiş bölgelerdeki hipermetilasyon RNA transkripsiyonunu etkileyebilir ve gen fonksiyon kaybının nedeni olabilir (57,59). Birçok tümörde promotör bölgedeki hipermetilasyonun, tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonunu hem transkripsiyonel aktivatörlerin bağlanmasını engelleyerek hem de metillenmiş DNA'ya özgül olarak bağlanan represörlerin katılımını sağlayarak engellediği keşfedilmiştir. VHL geninde promotör bölge hipermetilasyonunun fonksiyon kaybına neden olabileceği renal hücre karsinomu, kapiller hemangioblastoma, meme, over kanserleri ve lenfomaların çoğunda gösterilmiştir (25,43,52).

Son 15 yılda VHL promotör hipermetilasyonu ya da mutasyonları en çok tümör bağımlı anjiyogeneziste aldıkları rol nedeniyle böbrek hücreli tümörlerde (BHT) araştırılmış vesporadik BHT'lerin çoğunda VHL promotör bölgesinde hipermetilasyon olduğu belirtilmiştir. VHL geninin metilasyon paternini değiştiren durumların ya da VHL promotör bölgesindeki mutasyonların hastalığın patogeneğinde etkili olabileceği savunulmuştur (27,51,60-62). VHL gen mutasyonu olmaksızın ortaya çıkan BHT'lerde ise mutasyonların bir kısmının diğer tümör baskılayıcı genlerden kaynaklanabileceği belirtilmiştir (63).

NORMOKSİDE HIF-1A BİRİKİMİ

HIF-1 α ile yapılan çalışmalarda başka bir ayrıntı ortaya çıkmıştır. HIF-1 α ekspresyonunun sadece oksijen basıncı tarafından kontrol edilmediği; rat sarcoma viral on-cogene (Ras), sarcoma (Src), fosfoinositol 3-ki-naz gibi onkogenlerin aktivasyonu ya da VHL, p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı ile normoksik koşullar altında da HIF-1 α proteininin tümör hücrelerinde normal dokulardakinden daha fazla toplandığı gösterilmiştir (64). Özellikle bir tümör baskılayıcı gen olan VHL'nin HIF'in baskılanması ve ubiquitin aracılığı ile degradasyonunu sağlamadaki rolü BHT'ler başta olmak üzere birçok hastalıkta incelenmiş; mutasyon veya promotör metilasyonuyla oluşan VHL fonksiyon aberasyonlarının HIF-1 α proteininin yıkılamayarak toplanmasına sebep olduğu ve bunun da bir dizi hipoksiye cevap genlerinin transkripsiyonuna yol açtığı gösterilmiştir (43,65). Diğer yandan VHL geninde bulunan mutasyonların HIF-1 α ile bağlanma kapasitesini değiştirerek HIF-1 α 'nın zayıf bir bağ yapmasına sebep olduğu ve bu durumun kanser ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (48,66-69).

VHL İLE P53 ARASINDAKİ ETKİLEŞİM

VHL ile hücre döngüsünün kontrolünde ve apoptozda çok önemli regülatör olan bir diğer tümör baskılayıcı gen p53 arasında beklenmeyen bir bağlantı rapor edilmiş olup; VHL proteininin, Mdm2 (onkogenik E3 ubiquitin ligase murine double minute 2) aracılığı ile ubiquitinasyonunu baskıladığı p53'e direkt bağlanıp, onu stabilize ettiği gösterilmiştir (70). Daha sonra yapılan çalışmalar bu bulguları desteklemiş, VHL

proteininin Mdm2 aracılığı ile p53 ubikitinasyonunu baskılayarak, pozitif düzenleyici olduğu gösterilmiştir (43,71). Daha sonra bu bulgular BHT hücrelerinde denenmiş, VHL bloke edildiğinde BHT hücrelerinde apoptozun durduğu ve DNA hasarı nedeniyle anormal hücre döngüsü oluştuğu, VHL restore edildiğinde ise normale dönmenin mümkün olduğu rapor edilmiştir (43,70).

Domene ve Illingworth, hayvan hücrelerinde VHL'nin hipoksi cevap yolu regülasyonunun temel olaylarını incelemişlerdir. Bilgisayar simülasyonuna bağlı olarak yapılan çalışmada HIF-1 α ve VHL'nin mutant formu arasındaki etkileşmelerde yapısal re-organizasyonlar için atomik detayların durumu matematiksel analiz çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Farklı hesaplamalar ile elde edilen sonuçlar, VHL geninde oluşan her türlü mutasyonunun VHL proteininin doğal yapısındaki stabiliteyi bozduğunu göstermiştir (44). VHL-HIF kompleksi gibi proteinlerde atomik seviyede yeniden yapılanma sırasında enerji değişimlerini de içeren hesaplamalar yapılması ve araştırmaların bu boyutlara ulaşmasının, ileride kanser dahil birçok hastalığın tanı ve tedavisi için ümit verici gelişmelerin habercisi olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Macleod K. Tumour suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10(1):81-93.
2. Nowell PC. Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol* 2002;12(4):261-6.
3. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004;10(8):789-99.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Bayru N, Dalay N, Özgüç M, Öztürk M, Sakızlı M (Çeviri editörleri). Hücrenin moleküler biyolojisi. 4üncü Baskı, Ankara, Türkiye Bilimler Akademisi, 2008:1313-62.
5. Knudson AG. Cancer genetics. *Am J Med Genet* 2002;111(1):96-102.
6. Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1(2):157-62.
7. Cvetkovic D, Pisarcik D, Lee C, Hamilton TC, Abdollahi A. Altered expression and loss of heterozygosity of the LOT1 gene in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2004;95(3):449-55.
8. Friedberg EC. DNA damage and repair. *Nature* 2003;421(6921):436-40.
9. Cooper GM, Hausman RE. *The Cell A Molecular Approach*. 3rd ed. ASM Press Washington, Sinauer Associates 2004:632-666.
10. Apeessos A, Papadopoulou E, Belogiani I, et al. Inherited cancer predisposition in Greece. *Anticancer Res* 2008;28(2B):1341-1347.
11. Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog*. 1993; 7(3): 139-146.
12. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1): 57-70.
13. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396(6712):643-9.
14. Sieber O, Heinemann K, Tomlinson I. Genomic stability and tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* 2005;15(1):61-6.
15. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* 2006;6(6):425-36.
16. Qin C, Cao Q, Ju X, et al. The polymorphisms in the VHL and HIF1A genes are associated with the prognosis but not the development of renal cell carcinoma. *Annals of Oncology* 2012;23(4):981-9.
17. Schwab LP, Peacock DL, Majumdar D, et al. Hypoxia-inducible factor 1a promotes primary tumor growth and tumor-initiating cell activity in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2012;14(1):6-8.
18. Shimomura M, Hinoi T, Kuroda S, et al. Overexpression of Hypoxia Inducible Factor-1 Alpha is an independent risk factor for recurrence after curative resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg Oncol* 2013;20(3):527-36.
19. Duan DR, Pause A, Burgess WH, et al. Inhibition of transcription elongation by the VHL tumour suppressor protein. *Science* 1995;269(5229):1402-6.
20. Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 2004;22(24):4991-5004.
21. Iliopoulos O, Levy AP, Jiang C, Kaelin WG, Goldberg MA. Negative regulation of hypoxia-inducible genes by the von Hippel-Lindau protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(20):10595-9.
22. Zatyka M, Morrissey C, Kuzmin I, et al. Genetic and functional analysis of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor gene promoter. *J Med Genet* 2002;39(7):463-72.
23. Kaelin W. The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338(1):627-38.

- 24.** Chen J, Wu Y, Shao P, et al. Association Between VHL Single Nucleotide Polymorphism (rs779805) and the Susceptibility to Prostate Cancer in Chinese. *DNA and Cell Biology* 2012;31(5):790-6.
- 25.** Kaelin W. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007b;13(2):680-684.
- 26.** Haase VH. The VHL tumor suppressor: Master regulator of HIF. *Curr Pharm Des* 2009;15(33):3895-903.
- 27.** Altıntaş R, Durmaz AA, Turna B, Onay H, Özkınay F, Cüreklibatır İK. Böbrek tümörlü hastalarda VHL gen mutasyonu. *Türk Üroloji Dergisi - Turkish Journal of Urology* 2011;37(3):191-197.
- 28.** Kinshasa T, Stackhouse TM, Chen F, Lerman MI, Zbar B. Cellular proteins that bind the von Hippel-Lindau disease gene product: Mapping of binding domains and the effect of missense mutations. *Cancer Res* 1995;55(20):4544-8.
- 29.** Zimmer M, Doucette D, Siddiqui N, Iliopoulos O. Inhibition of hypoxia-inducible factor is sufficient for growth suppression of VHL tumours. *Mol Cancer Res* 2004;2(2):89-95.
- 30.** Illingworth CJR, Loenarz C, Schofield CJ, Domene C. Chemical basis for the selectivity of the von Hippel Lindau tumor suppressor pVHL for prolyl-hydroxylated HIF-1 α . *Biochemistry* 2010;49(32):6936-44.
- 31.** Maina EN, Morris MR, Zatyka M, et al. Identification of novel VHL target genes and relationship to hypoxic response pathways. *Oncogene* 2005;24(28):4549-58.
- 32.** Maynard MA, Ohh M. Molecular targets from VHL studies into the oxygen-sensing pathway. *Curr Cancer Drug Targets* 2005;5(5):345-56.
- 33.** Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3(10):721-32.
- 34.** Hes FJ, Höppener WM, Luijt RB, Lips CJM. Von Hippel-Lindau Disease. *Hereditary Cancer Clinical Practice* 2005;3(4):171-178.
- 35.** Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(2):225-239.
- 36.** Cockman ME, Masson N, Mole DR, et al. Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein. *J Biol Chem* 2000;275(33):25733-41.
- 37.** Kaelin W. von Hippel-Lindau disease. *Annu Rev Pathol* 2007a;2:145-73.
- 38.** Bahig M, Christina A, Stockwell B, et al. von Hippel-Lindau (VHL) Disease An update on the Clinico-pathologic and Genetic Aspects. *Adv Anat Pathol* 2008;15(3):165-171.
- 39.** Kibel A, Iliopoulos O, DeCaprio JA, Kaelin WG. Binding of the von Hippel-Lindau tumour suppressor protein to Elongin B and C. *Science* 1995;269(5229):1444-6.
- 40.** Maxwell PH. The HIF pathway in cancer. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16(4-5):523-30.
- 41.** Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 1999;399(6733):271-5.
- 42.** Michelle JN, Gerald C, O'sullivan and Sharon LM. Role of the VHL (von Hippel-Lindau) gene in renal cancer: a multifunctional tumour suppressor. *Biochem society transaction* 2008;36(Pt 3):472-8.
- 43.** Arjumand W, Sultana S. Role of VHL gene mutation in human renal cell carcinoma. *Tumor Biol* 2012;33(1):9-16.
- 44.** Domene C, Illingworth CJR. Effects of point mutations in pVHL on the binding of HIF-1 α . *Proteins* 2012;80(3):733-46.
- 45.** Levy AP, Levy NS, Iliopoulos O, Jiang C, Kaplin WG, Goldberg MA. Regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia and its modulation by the von Hippel-Lindau tumour suppressor gene. *Kidney Int* 1997;51(2):575-8.
- 46.** Semenza GL. Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Physiology* 2008;24:97-106.
- 47.** White FC, Carroll SM, Kamps MP. VEGF mRNA is reversibly stabilized by hypoxia and persistently stabilized in VEGF-overexpressing human tumour cell lines. *Growth Factors* 1995;12(4):289-301.
- 48.** Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current Opinion in Genetics & Development* 2010;20(1):51-6.
- 49.** Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3(6):415-28.
- 50.** Arima T, Kamikihara T, Hayashida T, et al. ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic Acids Res* 2005;33(8):2650-60.
- 51.** Moore LE, Nickerson ML, Brennan P, et al. von Hippel-Lindau (VHL) Inactivation in sporadic clear cell renal cancer: Associations with germline VHL polymorphisms and etiologic risk factors. *PLOS Genetics* 2011;7(10):e1002312.
- 52.** Baylin SB, Belinsky SA, Herman JG. Aberrant methylation of gene promoters in cancer-concepts, misconceptions, and promise. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(18):1460-1461.
- 53.** Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005; 6(8):597-610.
- 54.** Belinsky SA. Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4(9):707-17.
- 55.** Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006;7(1):21-33.
- 56.** Laird P, Jaenisch R. DNA methylation and cancer. *Human Molecular Genetics* 1994;3:1487-1495. 1994;3 Spec No:1487-95

- 57.** Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16(1):6-21.
- 58.** Laird P. Cancer epigenetics. *Human Molecular Genetics* 2005;14(1):65-76.
- 59.** James GH, Stephen BB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New Engl journal of Medicine* 2003;349(21):2042-54.
- 60.** Ohh M, Park CW, Ivan M, et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the β -domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol* 2000;2(7):423-7.
- 61.** Davidowitz EJ, Schoenfeld AR, Burk RD. VHL induces renal cell differentiation and growth arrest through integration of cell-cell and cell-extracellular matrix signaling. *Mol Cell Biol* 2001;21(3):865-71.
- 62.** Rannala B. Finding genes influencing susceptibility to complex diseases in the post-genome era. *Am J Pharmacogenomics* 2001;1(3):203-21.
- 63.** Martinez A, Fullwood P, Kondo K, et al. Role of chromosome 3p12-p21 tumour suppressor genes in clear cell renal cell carcinoma: analysing of VHL dependent and VHL independent pathways of tumorigenesis. *Mol Pathol* 2000;53(3):137-44.
- 64.** Bardos JI, Ashcroft M. Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioessays* 2004;26(3):262-269.
- 65.** Manohar SM, Padgaonkar AA, Jalota-Badhwar A, et al. A novel inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 α P3155 also modulates PI3K pathway and inhibits growth of prostate cancer cells. *BMC Cancer* 2011;11:338-348.
- 66.** Min JH, Yang H, Ivan M, Gertler F, Kaelin WG, Pavletich NP. Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 2002;296(5574):1886-9.
- 67.** Lonser RR, Glenn GM, Walther M, et al. von Hippel-Lindau disease. *Lancet* 2003;361(9374):2059-67.
- 68.** Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, et al. Mutation of the von Hippel-Lindau (VHL) gene in human colorectal carcinoma: Association with cytoplasmic accumulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1. *Cancer Sci* 2004;95(2):149-53.
- 69.** Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 2005;105(2):659-69.
- 70.** Roe JS, Kim H, Lee SM, Kim ST, Cho EJ, Youn HD. P53 stabilization and trasactivation by a von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell* 2006;22(3):395-405.
- 71.** Hupp TR, Hayward RL, Vojtesek B. Strategies for p53 reactivation in human sarcoma. *Cancer Cell* 2012;22(3):283-5.