

Retinoblastom Yatkinlık Geni ve Retinoblastom

THE RETINOBLASTOMA SUSCEPTIBILITY GENE, AND RETINOBLASTOMA

Dr.Süleyman AYDIN,^a Dr.Emrah ÇAYLAK,^a Dr.Süleyman YILDIRIM,^b
Dr.Nermin KILIÇ,^a Dr.Fazilet ERMAN,^a Dr.Nimet KABAKUŞ^c

^aBiyokimya AD, ^bGöz Hastalıkları AD, ^cÇocuk Nörolojisi AD, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, ELAZIĞ

Özet

Onkojenik uyarımın transformasyona karşı normal hücrelerde, bir çok yolu harekete geçirdiği düşünülmektedir. Bir çok paket proteinlerle ilişkili olan retinoblastom tümör- suppressör proteini (pRB)/ E2F, transkripsiyon faktörünü inaktive ederek hücre döngüsünü G1/S safhasında kontrol eder. Retinoblastoma protein (Rb)/E2F yolu normal hücre gelişiminde, apoptosiste, kanseri önlemede, ökaryotik hücre döngüsü sürecinde ve terminal farklılaşmada esas rolü oynar. pRB, E2F cevap promotorunda kromotin yapısını değiştirerek E2F' nun transkripsiyonel aktivitesini kontrol eder.

Siklin bağımlı kinazlar pRB' yi fosforile ederek pRB ve E2F arasındaki bağlantıyı bozar. Aynı zamanda retinoblastoma (RB) proteini tarafından kontrol edilen E2F1 de hücre proliferasyonunda önemli rol oynar. Ek olarak büyümenin engellenmesi p21 ve p27'ye siklin bağımlı kinazların artmasıyla ilgili olup Cdk2 kinaz aktivitesi önlenir. Cdk2' nin sitoplazma içinde değişimi nükleer retinoblastom tümör repressör proteininin defosforilasyonu ile bağlantılı olup nükleer Cdk2 aktivitesini düşürür.

Retinoblastom, retinal duyu kök hücrelerinden kaynaklanan gözün malign bir tümördür. Kalıtsal veya sporadik olabilir. Kalıtsal formu genellikle bilateral ve multifokal olurken sporadik formu ise unifokal ve unilateraldır. Sporadik veya ailesel retinoblastom, 13. kromozomun uzun kolundaki RB1 gen mutasyonlarıyla meydana gelir.

Retinoblastom (Rb) geninde olan değişikliklerin insanda oluşan bir çok tümörle bağlantısı olduğundan bu çalışmanın amacı, retinoblastom ve RB1 geni hakkında yapılan araştırmaları ve gelişmeleri gözden geçirip değerlendirmektir.

Anahtar Kelimeler: Retinoblastom, malign tümör, RB1 geni

T Klin Tıp Bilimleri 2004, 24:173-177

Abstract

Oncogenic stimuli are thought to induce many pathways in normal cells in order to protect against transformation. Retinoblastoma tumor-suppressor protein (pRB) (related with many pocket proteins) controls the G1/S transition in the cell cycle by binding and inactivating E2F transcription factor. Retinoblastoma protein (Rb)/E2F pathway play a pivotal role in regulating eukaryotic cell cycle progression (normal development and cancer prevention) apoptosis, and terminal differentiation. pRB changes the chromatin structure at the E2F-responsive promoter, thus controlling the transcriptional activity of E2F.

Cyclin-dependent kinases (Cdks) phosphorylate pRB and disrupt association between pRB and E2F. Also, E2F1 plays a critical role in cell proliferation, and its function is controlled by the retinoblastoma (RB) protein. Furthermore, growth arrest correlated with increased binding of p21 and p27 to cyclin-dependent kinase-2 (Cdk2), and inhibition of Cdk2 kinase activity. Cdk2 relocalization to the cytoplasm correlated with dephosphorylation of nuclear retinoblastoma tumor suppressor protein and lowered nuclear Cdk2 activity

Retinoblastoma is a malignant tumor of the eye, originating from progenitors of retinal sensory cells. It might be either hereditary or sporadic in appearance. The hereditary form is generally bilateral and multifocal, whereas the sporadic form is unifocal or unilateral. Retinoblastoma occurs with RB1 gene mutation in the long arm of chromosome 13.

Changes in the retinoblastoma (Rb) gene have been correlated with a large number and wide variety of human tumors. Thus, the goal of this study was to review and evaluate the recent investigation regarding retinoblastoma gene (RB1) and associated gene product.

Key Words: Retinoblastoma, malignant tumor, RB1 gene

T Klin J Med Sci 2004, 24:173-177

Tümör baskılayıcı genler, onkojenik genleri inaktif halde tutarlar. Bir retina kanseri olan retinoblastom, retinal duyu kök hücrelerinden kaynaklanan çocukluk çağının en sık görülen (15.000-20.000 canlı doğumda bir

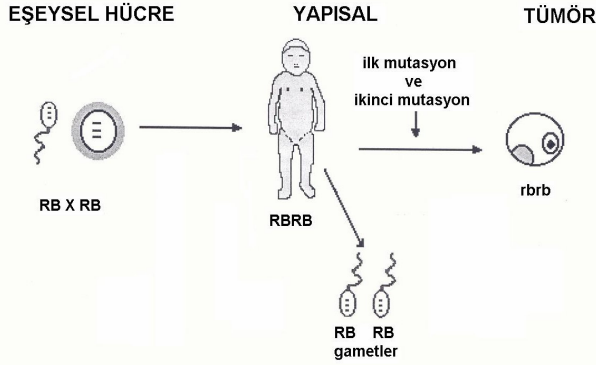
oranında) gözün habis bir tümörüdür.¹ Tedavi edilmezse ölümlerle sonuçlanan retinoblastomda yaşama oranı, moleküler çalışmaların katkısıyla %90'nın üzerine çıkmıştır.² Retinoblastom gelişiminden 13. kromozomdaki q14 segmentinin mutasyonu sorumludur ve iki tipi bulunmaktadır.¹⁻³ Birincisi sporadik olup, daha önce ailede bir geçmişi yoktur ve olguların % 94'ünü oluşturur. Çoğunlukla da somatik mutasyon sonucu gelişir (Şekil 1). Genellikle tümör tek bir gözde solid kitle

Geliş Tarihi/Received: 07.06.2002 Kabul Tarihi/Accepted:01.10.2003

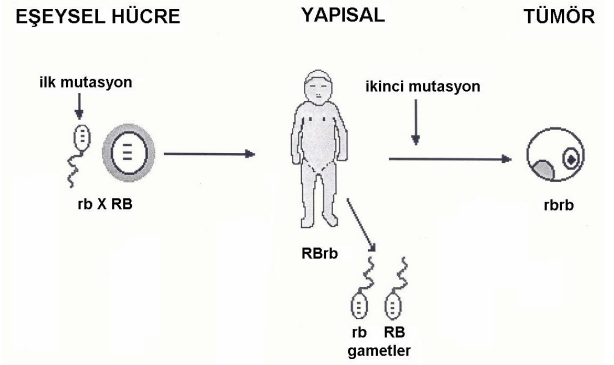
Yazışma Adresi/Correspondence: Dr. Süleyman AYDIN
Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, ELAZIĞ

Copyright © 2004 by Türkiye Klinikleri

T Klin J Med Sci 2004, 24



Şekil 1. Kalıtsal olmayan retinoblastom



Şekil 2. Kalıtsal retinoblastom

şeklinde (unilateraldir). İkinci tip ise germinal mutasyon sonucu gelişir ve olguların %6' sını oluşturur (Şekil 2). Bu olgularda pedigr analizinde otozomal dominantlık gösterdiği belirlenen yüksek kalıtsal predizpozisyonluk (yatkınlık) söz konusudur. Tümör ilk yaşlarda ortaya çıkar. Sık olarak her iki gözün de etkilendiği görülür (bilateraldir) ve çok odaklıdır. İleri yaşlarda gözden başka osteosarkom, pineoblastom gibi sekonder malignite gelişme riski fazladır.²⁻⁷ Bu maligniteler radyoterapi uygulanan yerlerde olabildiği gibi bağımsız olarak herhangi bir bölgede de gelişebilir.^{4,7}

Southern blot hibridizasyonda komplementer DNA (cDNA) ve genomik klonlar kullanılarak bilateral ya da ailesel retinoblastomlu hastaların %10'unda küçük delesyon (silinme) mutasyonları tanımlanmıştır.^{8,9} Kalıtsal retinoblastom hastalarının periferal kanındaki DNA'da %42 oranında tek baz değişim mutasyonları ya da %26 oranında kılma mutasyonları tespit edilmiştir.⁸

Erken çocukluk devresinde bu hastalar retinoblastoma predisposedirler. Çünkü normal tip alleldeki bir mutasyon, RB1 geninin biallellik inaktivasyonuna yol açarak tümör odağının gelişimini başlatır.¹⁰ Normal tip alleller, tümör oluşumunu önleyebilir ve baskılayabilirler.¹¹ Lenfosit ve keratinositlerden kaynaklanan tümör hücreleri ile fibroblastlar arasındaki bölünme hücrelerinde oluşan tümörlerin, normal hücredeki dominant baskılayıcı faktör aracılığıyla önlenmediği bildirilmiştir.^{5,12}

Moleküler ve sitogenik analizler, retinoblastom hücrelerinin insan kromozomunda 13q14 üzerinde yerleşmiş tek bir gen olan RB1 geninin iki defektif allelik kopyasını taşıdığını göstermiştir.¹¹ Retinoblastom proteininin (RB), moleküler ağırlığı başlangıçta 94 kDa olarak tespit edilmiştir. Oysa bu protein, 816 amino aside sahip olup, 105 kDa molekül ağırlığındadır ve pek çok hücre tipinde de hücre bölünmesini düzenlediği anlaşılmıştır.^{4,5,8,9} RB1'in fonksiyonu, gözün bu spesifik tümörünün önlenmesi için gereklidir. RB1 defektleri, küçük hücreli akciğer kanserlerinden başka meme ve mesane karsinomu hücre serilerinde de görülmüştür.⁹

Rb1 Geninin Özellikleri

13q14 kromozomu üzerinde yerleşmiş olan RB1 geni, 180 kb'lik bir alan kaplamakta ve 27 ekzondan oluşmaktadır.^{7,8,12} Bu gen 4.8 kb' lik bir mRNA üretir. Bu mRNA, 928 amino asitlik bir protein olan pRB' ye aracılık eder. pRB de paket protein ailesinden olup 105 kb' lik bir nükleer proteindir.^{7,8,12} Aynı zamanda RB1, N terminal bölgesinde santral A ve B domainleri ve C terminal domain olmak üzere üç farklı domain ihtiva eder. Bu üç domainin ana fonksiyonları; büyümenin düzenlenmesi, hücre farklılaşması, viral ve selüler proteinlerin interaksyonu ve transkripsiyonel regulasyondur.^{13,14} pRB biyolojik etkisini transkripsiyonu seviyesinde hem pozitif hem de negatif regulasyonla düzenler. Pozitif gen regulasyonu hücrelerin farklılaşması ile bağlantılıdır. Transkripsiyon seviyesinde baskılama

hücre döngüsünün inhibisyonuna yol açar. E2F familyası spesifik bir DNA sekansına sahip olup transkripsiyon faktörlerine bağlanarak hücre regulasyon döngüsünde bir çok genin ekspresyon seviyesini ve zamanlamasını düzenler (Şekil 3). Bilinen 6 E2F familya üyelerinden beşi, C- terminal trans aktivasyon domaininin içine gömülmüş bir şekilde pRB bağlayıcı bir protein motifine sahiptir.¹⁴

PRB, transkripsiyonu çeşitli mekanizmalarla baskılar. Şöyle ki;

1) pRB, E2F'nin Trans bağlayıcı protein (TBP) interaksyonunu önler, yani kompatativ aktivasyon domainini baskılar.

2) pRB, E2F tarafından bir kez promotora bağlanınca, sürekli olarak diğer aktivatör domainlerine bağlanır. Böylece iki aktivatör aynı zamanda baskılanır.

3) E2F/pRB kompleksi, pRB bölgesinde bağlanma olmasa bile diğer aktivatörleri engeller. Yani bu tip direk veya aktif baskılamaya pRB aracılık eder. E2F nin fonksiyonu yoktur (Şekil 3). pRB' nin bu fonksiyonuna bir veya daha fazla baskılayıcı eşlik eder.¹⁵

RB1 geninin RB proteini, çekirdekte yer almaktadır ve dinlenme fazındaki (Go veya G1) hücrelerinde fosforile olmamış haldedir. PRB, siklin D-cdk4/t ve siklin E-cdk tarafından fosforile olur. Erken G1 fazında hipofosforile olmuş pRB, M fazında yeniden ortaya çıkar. Hipofosforile olmuş pRB, G1 fazında hedef proteinlere bağlanır ve siklüs durur. PRB'nin hiperfosforile formu yani serin ve treonin bölgesinden fosforile olmuş formu ise geç G1 fazı

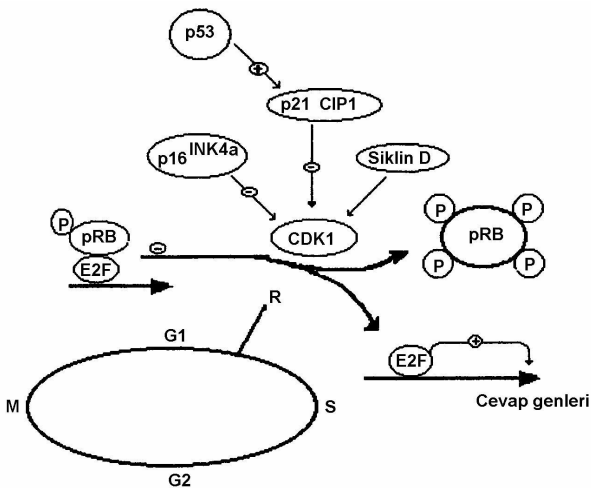
dahil S, G2 ve M fazlarında mevcuttur (Şekil 3). PRB'nin fosforile olmasının G1 fazındaki duraklamayı ortadan kaldırdığı sanılıyor.¹⁶ Çünkü fosforile olmuş pRB, ilişkili olduğu E2F2 ve HDACs ile artık interaksiyona giremez ve DNA sentezinin S fazında gerekli gen transkripsiyonunu aktive eder. Bu esnada yine E2F siklin E ve A ekspresyonunu artırarak pRB nin fosforilasyonunu tamamlamasını sağlar (Şekil 3).^{16,17}

SV40 T gen antijeni, Go/G1 fazında fosforile olmuş RB proteinine (p110) bağlanmaktadır¹⁸. Böylece dominant olmayan transforme eleman olarak SV40 T'nin RB proteinine bağlanarak; Go/G1 fazını büyüme baskılayıcı etkisiyle düzenleneceği ve inhibe edeceği öne sürülmüştür.^{17,19} Transforme olmamış ebeveyn hücreleri, sadece p110 RB proteini mevcut olduğunda Go fazına girmektedir. Teorik olarak; SV40 T'nin bu etkiyi p110 RB proteinine bağlanarak engellediği bilinmektedir. Bu proteinin yüksek bir afinite ile DNA'ya bağlanması en önemli fonksiyonudur. Böylece RB proteini, gen düzenleyici bir fonksiyona da sahip olmaktadır. Sonuç olarak, hücre siklusunda G1'den S fazına geçişi, RB proteini kontrol etmektedir.²⁰

Rb Geninin Mekanizmaları

De Caprio ve ark., 1989'da p110 Rb proteininin inaktif bir protein olduğunda hücre siklüsünü engelleyici etkisiyle RB proteininin hücre büyümesini nasıl baskıladığını gösteren bir model açıklamışlardır. P110 Rb proteini, bazı viral onkojenik ürünler veya spesifik kinazlarla inaktive edilerek hücrenin DNA replikasyonuna girmesine yol açmaktadır.^{9,11, 21}

Yine LeCouter ve ark.,²⁴ 1989'da p110 RB gibi antionkojen ürünlerin hücrenin çevresel habercilere cevabında bir eleman olabileceğine dair diğer bir modeli ortaya koymuşlardır. Bu modelde RB geni veya proteininin santral dogma ara yollarında gerekli bir bağlantı olduğunu ve kaybıyla transdüksiyon sinyalini kestiğini açıklamışlardır. Böylece hücrenin normal inhibitör sinyale karşı cevap kabiliyeti kaybolurken proliferasyon



kabiliyeti devam etmektedir (Şekil 3). Bu sinyaller, hücre farklılaşmasını arttırıcı, siklusunu düzenleyici veya blok yapan sinyalleri taşıyan faktörler olabilir.^{17,22}

RB geni, transkripsiyonel veya translasyonel düzeydeki büyüme faktörü stimülasyonunu baskılamayla ilişkilendirilebilir. Bu durum, birçok onkogenlerle (fos, myc, mos, erb) desteklenebilir.²³

Retinoblastomdaki Somatik Mutasyonlar

Tümörlerin yaklaşık olarak %65'inde kromozom 13 üzerinde yerleşik polimorfik lokuslardaki bireysel heterozigotluğun kaybı ile RB1 geninin biallel inaktivasyonu sonucu mutasyonlar meydana gelmektedirler.^{2,3,7,24} Bireysel heterozigotluğun kaybı, mitotik rekombinasyon veya ayrılmama gibi birkaç kromozomal mekanizma ya da delesyonlardan kaynaklanmaktadır.^{7,9,12,13,25}

RB1 geni, normalde metillenmemiş olmasına rağmen retinoblastomaların %10'unda RB1 geninin 5' ucundaki SpG'ce zengin bölgenin hipermetilasyonu görülmüştür.²⁶ Şu ana kadar sadece bir hastada bireysel hücrelerin DNA'sının bu bölgesinde hatalı metilasyon görülmüştür. Bu hastanın bir RB1 allelinin fonksiyonlarının ortadan kalkması sonucu 13. kromozomdaki translokasyon ve X geninin inaktivasyonu ile sonuçlanan mutasyonu taşıdığı bildirilmiştir.²⁷

Retinoblastomun Klinik Önemi ve Tanı

Retinoblastomun erken teşhisi hem gözün daha iyi görüşü hem de hayati yönden hastanın prognozu için çok önemlidir. Ailesel olgularda hayatın ilk yılında sporadik olgularda ise 1-3 yaşında tanı konulurken 5 yaşından sonra tanı konması nadir olup en önemli bulgusu lökokeridir. Daha az sıklıkla görülen bulgular sekonder glokom, hifema ve periokular inflamasyondur. Tümör endofitik veya ekzofitik gelişim gösterebilir. Tümörün başlangıçta tanısı için erişkin retinoblastomlu hastaların akrabalarının oftalmolojik yönden takibi gerekir. Oftalmoskopik görüntü ile genelde tanı konulurken tipik intralezyonel kalsifikasyonun tomografi ve

ultrasonografi ile de gösterilmesi tanıyı destekler.^{2,3,8,19,28}

Retinoblastomlu hastalardaki mutasyonların bilinmesi tüm akrabaların muhtemel bir risk altında olduğunu gösterir.²⁹ Hastalık riski taşıyan bireylerin mutasyon analizi ile taranması daha az sağlık harcaması giderlerine sebep olacaktır.^{11,24,28,30} Bu nedenle retinoblastomlu hastaların takibinde mutasyon analizleri hastaların izlenmesinde önemlidir.^{5,6,7,31}

Sonuç ve Tartışma

Retinoblastom, bir çocukluk dönemi hastalığıdır. RB geninin tek bir defektli kopyasını taşıyan çocuklarda 13. kromozom üzerinde küçük bir kayıp görülmektedir. RB gen ürününün fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Fakat çekirdekte bulunan bir protein olduğu için transkripsiyonu etkileyebileceği ortadadır. Daha önce de belirttiğimiz gibi bu proteinin kaybı habis bir transformasyona sebep olmaktadır.

Birçok çalışma, RB geni protein ürününün retinoblastomda antionkojenik etkisinin olduğunu göstermiştir. Tümör baskılamadaki moleküler mekanizmasının tamamen bilinmemesine rağmen, RB geninin hücrelerdeki proliferasyonu bloke ettiği bulunmuştur ve bu sebeple RB geni antionkojen veya tümör baskılayıcı gen olarak adlandırılmıştır.

Klinik olarak ortaya çıkan habis tümörlerin tedavisinde bu gibi tümör baskılayıcı genlerin tümör hücrelerine yerleştirilmeleri temel strateji olmaktadır. Diğer birçok bilimsel çalışmada da olduğu gibi RB geni ve ürünleri çok fazla cevaplanmayan soruyu bünyesinde barındırmaktadır. Sonuç olarak, gelecekte RB geni hakkında elde edilecek daha fazla bilgi onun çok daha iyi anlaşılmasına ve retinoblastomlu hastaların tedavisine daha fazla yardımcı olacaktır.

Teşekkür

Şekillerin çiziminde yardımcı olan sayın Doçent Dr. İhsan Halifeoğlu'na teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Gallie BL, Campbell C, Devlin H, Duckett A, Squire JA.

- Developmental basis of retinal-specific induction of cancer by RB mutation. *Cancer Res* 1999; 59: 1731-5.
2. Batchu RB, Shamma MA, Wang JY, Freeman J, Rosen N, Munshi NC. Adeno-associated virus protects the retinoblastoma family of proteins from adenoviral-induced functional inactivation. *Cancer Res* 2002; 62: 2982-5.
 3. Bartova E, Kozubek S, Gajova H, et al. Cytogenetics and cytology of retinoblastomas: *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129(2): 89-99.
 4. Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Arjona D, et al. CpG island methylation of tumor-related genes in three primary central nervous system lymphomas in immunocompetent patients. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 142(1): 21-4.
 5. Richter S, Vandezande K, Chen N, et al. Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 2003; 72(2): 253-69.
 6. Kloss K, Währisch P, Greger V, et al. Characterization of deletions at the retinoblastoma locus in patients with bilateral retinoblastoma. *Am J Med Genet* 1991; 39: 196-4.
 7. Aydın P, Akova YA. Temel Göz Hastalıkları: Güneş Kitabevi. 2001. p. 423.
 8. Lohmann DR. RB1 gene mutations in retinoblastoma. *Hum Mutat* 1999; 14(4): 283-8.
 9. Lohmann DR, Gerick M, Brandt B, et al. Constitutional RB1 gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 282-94.
 10. Eng C, Li FP, Abramson DH, et al. Mortality from second tumors among long-term survivors of retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1121-8.
 11. Chen PL, Chen YM, Bookstein R, Lee WH. Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 1990; 250: 1576-80.
 12. Lee C, Cho Y. Interactions of SV40 large T antigen and other viral proteins with retinoblastoma tumour suppressor. *Rev Med Virol* 2002; 12: 81-92.
 13. Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, et al. Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2775-9.
 14. Zeng X, Lee H, Zhang Q, Lu H. p300 does not require its acetylase activity to stimulate p73 function. *J Biol Chem* 2001; 276(1): 48-52.
 15. Kelly BL, Wolfe KG, Roberts JM. Identification of a substrate-targeting domain in cyclin E necessary for phosphorylation of the retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(5): 2535.
 16. DiCiommo D, Gallie BL, Bremner R. Retinoblastoma: the disease, gene and protein provide critical leads to understand cancer. *Semin Cancer Biol* 2000; 10(4): 255-69.
 17. Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* 1998; 18(2): 753-61.
 18. Nesnow S, Cavaneer W, Gilmer TM, et al. Cancer Conference: workshop on mechanisms of toxicity and carcinogenesis. *Mol Carcinog* 1999; 25: 99-106.
 19. Toguchida J, McGee TL, Paterson JC, et al. Complete genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Genomics* 1993; 17: 535-43.
 20. Taya Y. RB kinases and RB-binding proteins: new points of view. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 14-7.
 21. Choy KW, Pang CP, To KF, Yu CB, Ng JS, Lam DS. Impaired Expression and Promotor Hypermethylation of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase in Retinoblastoma Tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 1344-9.
 22. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81: 323-30.
 23. De Caprio JA, Ludlow JW, Figge J, et al. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988; 54: 275-83.
 24. LeCouter JE, Kablar B, Whyte PF, Ying C, Rudnicki MA. Strain-dependent embryonic lethality in mice lacking the retinoblastoma-related p130 gene. *Development* 1998; 125: 4669-79.
 25. Lohmann DR, Brandt B, Höpping W, Passarge E, Horsthemke B. Spectrum of RB1 germline mutations in hereditary retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 940-9.
 26. Lai H, Ma F, Lai S. Identification of the novel role of pRB in eye cancer. *J Cell Biochem* 2003; 88(1): 121-7.
 27. Klutz M, Horsthemke B, Lohmann DR. RB1 gene mutations in peripheral blood DNA of patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 666-7.
 28. Jones C, Booth C, Rita D, et al. Bilateral retinoblastoma in a male patient with an X; 13 translocation: evidence for silencing of the RB1 gene by the spreading of X inactivation. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1558-62.
 29. Watts P, Westa C, Colpa L, et al. Visual results in children treated for macular retinoblastoma. *Eye* 2002; 16: 75-80.
 30. Noorani HZ, Khan HN, Gallie BL, Detsky AS. Cost comparison of molecular versus conventional screening of relatives at risk for retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 301-7.
 31. Gallie BL. Predictive testing for retinoblastoma comes of age. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 279-81.