

# Retinoblastom Genetiği

Zuhal SUYUGÜL\*

## ÖZET

*Retinoblastoma, hem sporadik olarak ortaya çıkan, hem de herediter geçiş gösteren intraoküler bir çocukluk çağı tümörüdür. 13.cü kromozomun uzun kolunun (q) 14.cü bandında lokalize olan retinoblastom geni hücre siklusunda regülasyon görevi yapmaktadır. Genin her iki allelinin mutasyon sonucu inaktivasyona uğraması ile retinoblastom ortaya çıkmaktadır. Mutant retinoblastom geninin penetransı%90'dır. Retinoblastom genindeki mutasyonları gösteren birçok DNA analiz yöntemi geliştirilmiştir. Böylece Retinoblastomlu olgularda prenatal tanı yapmak da mümkündür. Özellikle %40 gibi yüksek ailevi geçiş gösteren olgularda geliştirilmiş, bu DNA analizi yöntemleri ile Genetik Danışma vermek artık olası hale gelmiştir.*

Anahtar Kelimeler: Retinoblastom, Genetik

T Klin Oftalmoloji 1996. 5:55-59

## SUMMARY

### GENETICS OF RETINOBLASTOMA

*Either sporadic or hereditary retinoblastoma is one of the most, serious intraocular tumor in childhood. Retinoblastoma gene regulates cell cycle that is located on chromosome 13q 14 band. A mutation of both alleles of the chromosome 13, results in an inactivation of the gene causing retinoblastoma. The mutant retinoblastoma gene penetrance is 90%. A variety of DNA analysis techniques have been developed to demonstrate the retinoblastoma gene mutations. Therefore, prenatal diagnosis can be achieved in the retinoblastoma cases. Especially those methods have been developed in hereditary form of retinoblastoma which is seen in 40% of the whole cases. Now it's possible for genetic counselling with the help of DNA analysis methods.*

Key Words: Retinoblastoma, Genetic

T Klin J Ophthalmol 1996, 5:55-59

## Giriş

Retinoblastom (Rb) çocukluk çağı tümörleri içinde en sık görülen intraoküler yerleşimli bir tümördür. Kalı-

tımla geçebilen birkaç çocukluk çağı kanserinden biridir. Sıklığının 17.000-34.000 canlı doğumda bir olduğu bildirilmektedir (1-3).

Genellikle 1-3 yaşları arasında ortaya çıkmışlardır. 5 yaşından sonra görülmesi oldukça nadirdir. Son yıllarda erken tanı ve tedavi olanaklarının gelişmesi ile Rb'li anne ve babaların Rb'li çocuklara sahip oldukları, ayrıca bir ailede anne ve baba sağlam olduğu halde birden fazla çocukta Rb'ye rastlanması bu konuda yoğun genetik çalışmalara neden olmuştur. Uzun yıllar pedigr analizi üzerinde yapılan çalışmalar günümüzde yoğun moleküler genetik çalışmaları ile devam etmektedir.

Geliş Tarihi: 12.04 1995

\* Uzm.Dr. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Genetik ve Teratoloji Uygulama Merkezi (GETAM), İSTANBUL

Yazışma Adresi: Zuhal SUYUGÜL

İstanbul Üniversitesi  
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi  
Genetik ve Teratoloji Uygulama Merkezi  
(GETAM), İSTANBUL

Retinoblastoma unilateral veya bilateral görülebil- diği gibi sporadik veya herediter formda da ortaya çık- maktadır. Tüm Rb olgularının %60-70'ini sporadik olgu- lar oluştururken, %30 ile %40'ını herediter olgular oluşturmaktadır. Herediter olguların %10'unda hasta anne veya babada Rb öyküsü varken, %30'unda yeni germinal mutasyon söz konusudur. Yani anne ve baba sağlıklı olup ailede birden fazla çocukta hastalık söz konusu olabilmektedir (1-3,4).

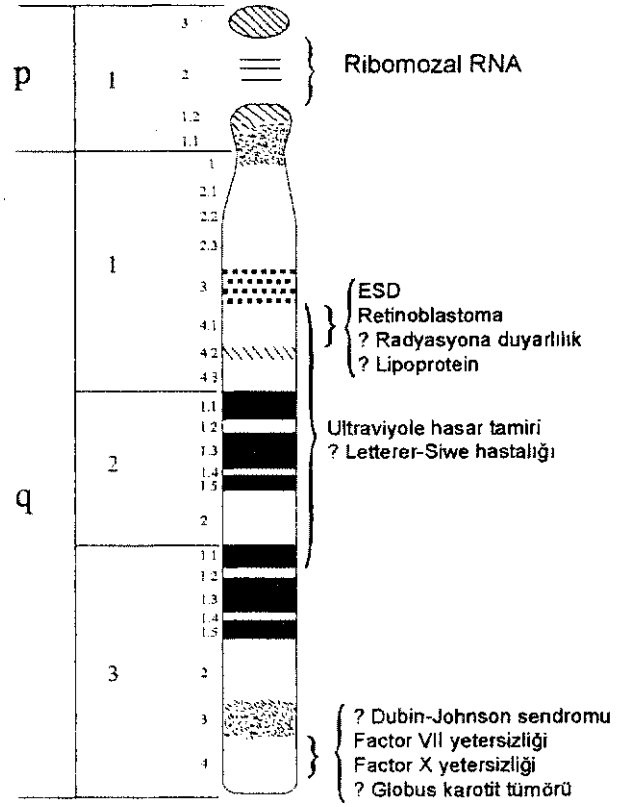
Retinoblastoma üzerindeki ilk genetik çalışmalar pedigrî analizlerini takiben kromozomal düzeyde başla- mıştır. Takibeden çalışmalarla Rb geninin 13.cü kromo- zomda olduğu bildirilirken, sitogeneük yöntemlerden ileri çözümüleme (High resolution) denen bantlama teknikleri ile genin 13.cü kromozomun uzun kolunun (q) 14.cü bandında olduğu gösterilmiştir (5,6) (Şekil 1). Daha sonraları Liberfarb ve ark. aynı yöntemle, 10 olgunun ikisinde bu bölgede delesyon saptamışlardır (7). Tüm Rb olgularının %1 ile %3'ünde saptanan bu delesyona "13q14 delesyon sendromu" denmiştir. Klinikte dele- syonun uzunluğuna bağlı olarak Rb'ye ilaveten mental gerilikle birlikte bazı konjenital malformasyonlar bildiril- miştir. Rb'li bir çocukta delesyon saptanırsa sağlıklı bile olsa, anne ve babada mutlaka sitogenetik analiz yapılmalıdır (8). Zira sağlıklı oldukları bilinen anne ve baba- nın delesyon taşıyıcısı oldukları saptanırsa, bunu diğer çocuklarına geçirme riski vardır. "13q14 delesyonu gös- teren Rb'li hastalarda yapılan kantitatif ESD (Esteraz D) enzim aktivitesi çalışmaları ile bu enzimin Rb geni- lokusuna çok yakın olduğu gösterilmiştir. Delesyon gös- teren Rb olgularında enzim aktivitesinin %50 azalmış olduğu gözlenmiştir. Bu yöntem, sitogenetik incelemeler ile tanı konamayan delesyon taşıyıcılarını saptamak için kullanılan dolaylı bir yöntem olarak kullanılmaktadır (6).

Rb geni 1987 yılında klonlanmış ve tanımlanmıştır (9). Rb geni klonlanan ilk tümör süpresör genidir. Gen ürünü 928 amino asit içeren bir fosfoproteindir. P110<sup>sup</sup> olarak tanımlanan bu protein, hücre siklusunda regüla- tör görev yapmaktadır. Rb geni anmetile bir CpG adası taşımaktadır. Bu bölgenin hipermetilasyonunun, genin aktivitelinde azalmaya neden olduğu bildirilmektedir. Ayrıca genin promoter bölgesinin metilasyonu da, gen aktivitesini azaltmaktadır (10-12).

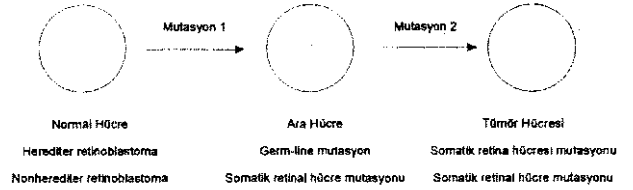
Hücre büyümesini kontrol edici görevi olan Rb ge- ninin iki normal alleli vardır. Allellerden birinin mutas- yon sonucu inaktive olması Rb geninin fonksiyonunu değiştirmez. Zira ikinci allel hücre çoğalması kontrolü görevini devam ettirir. Bir anlamda retinoblastoma için süpresör görevi yapmaktadır. Bu nedenle bu gene tüm- ör supüratör gen denmektedir.

Ancak ikinci alleldeki inaktivasyon, Rb geninin hücre üzerindeki kontrol görevini tümüyle kaldırarak, hücredeki kontrolsüz çoğalmaya ve giderek tümör ge- lişimine neden olmaktadır.

Knudson'nın 1970 yılında retinoblastoma onkoge- nes konusunda geliştirdiği çift vuruş (two hit) hipotezi,



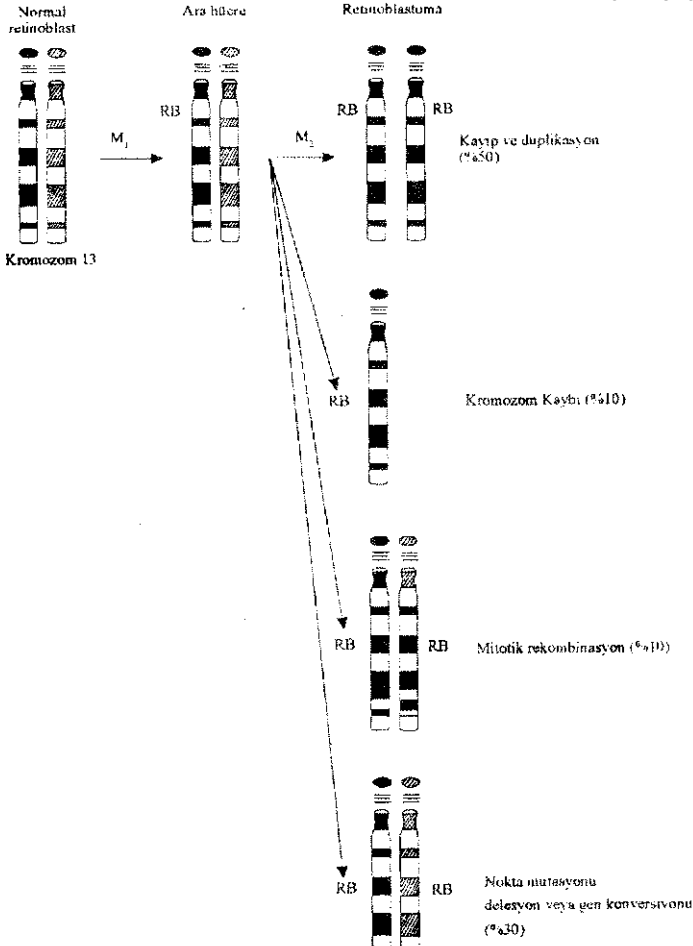
Şekil 1. 13. kromozomun gen haritası.



Şekil 2. Knudson hipotezi.

yukarıda anlatılan inaktivasyon mekanizmasını açıkla- maktadır (13). Bu hipoteze göre: Rb geninin alicilerin- den birinde inaktivasyona neden olan bir mutasyon, anne veya babanın germ hücrelerinden birinde meydana gelmişse, bu mutant alleli bir sonraki kuşağa aktaracaklardır. Prezigt döneminde anne veya babada bu mutasyon sonucunda oluşan mutant gen, embriyonun hem retina hücrelerinde hem de vücudun diğer somatik hücrelerinde bulunacaklardır. Bir önceki kuşaktan alı- nan bu mutasyona "germinal mutasyon" denmektedir. Böylece herediter (ailevi) retinoblastomaların gelişimini bu mutasyon geçişi ile açıklayabiliriz (14). Bu mutas- yonu taşıyan retina hücrelerinde hiç bir patoloji ge- lişmez. Bu kişilere aynı zamanda Rb'ye predispoze veya Rb mutant allel taşıyıcısı denir. Ancak, aynı retina hücrelerinin ikinci mutasyona maruz kalmaları ile bu hücrelerde Rb gelişme eğilimi artar.

## RETİNOBLASTOM GENETİĞİ



**Şekil 3.** Retinoblastoma lokusundaki mutant allelin homozigotluğuna neden olan kromozomal mekanizmalar.

Pedigri düzeyinde otosomal dominant olarak bir sonraki kuşağa %50 oranda geçen germlinal mutasyonu taşıyan hücrelerin ikinci bir mutasyona maruz kalması ile birlikte diğer normal allelin de inaktivasyona uğraması tümör gelişimine yol açmaktadır (Şekil 2). İkinci mutasyon bir anlamda o hücreyi Rb lokusunda hemizigot veya homozigot duruma sokmaktadır. Homolog kromozomun kaybı (delesyon) ve duplikasyonu; Homolog kromozomun basit kaybı (delesyonu); Mitotik rekombinasyon; Nokta mutasyonu veya gen konversiyonu ve uygun olmayan metilasyon hücreyi Rb lokusunda hemizigot veya homozigot duruma sokmaktadır (Şekil 3).

Rb geninin her iki allelinin inaktivasyona uğraması sonucu tümörün ortaya çıkması, her iki allelin de hücresel düzeyde otosomal resesif gibi davrandıklarını göstermektedir. Eğer ardarda olan bu iki mutasyon bireyin somatik retina hücrelerinde meydana gelirse sadece o kişide retinoblastom gelişecek ve bir sonraki kuşağa aktarılamayacaktır (Şekil 2). Sporadik dediğimiz olguların büyük bir bölümü bu şekilde oluşmaktadır. Ancak sporadik olguların %15'inde germlinal mutasyona bağlı herediter geçiş saptanmıştır. Herediter retinobla-

stomanın. sporadik retinoblastomalı olgulardan daha erken yaşta, bilateral ve multifokal bir gelişim göstermeleri, prezigot dönemde oluşan germlinal mutasyonla açıklanmaktadır. Ayrıca bazı bilateral retinoblastomalı olgularda, tümörün somatik 13q mozaizmi sonucu olabileceği de gösterilmiştir. Sporadik olgular ise postzigot dönemden sonra tek bir retina hücresinde ard arda oluşan çift somatik mutasyon sonucu oluşmaktadır. Bu yüzden sporadik olguların yaklaşık %85'i unilateral ve tek odaklı olarak ortaya çıkmaktadır.

Rb'ye yol açan mutasyonlar aşağıdaki şekilde sınıflandırılır (15):

1. Mutasyonun tipine göre;
  - a) Missense veya nonsense nokta mutasyonları,
  - b) Delesyon, insersiyon ve yeniden düzenlemeler (rearrangement),
  - c) Translokasyonlar,
2. Mutasyonların büyüklüğüne göre;
  - a) Işık mikroskopisi ile görülebilen büyük kromozoma! değişiklikler (büyük delesyon, insersiyon ve translokasyonlar),
  - b) Submikroskopik düzeyde oluşan mutasyonlar,
    - i. Makromoleküler düzeyde mutasyonlar,
    - ii. Mikromoleküler düzeyde mutasyonlar,

Mutasyonların çoğu null mutasyon şeklindedir ve bu durumda protein yokluğu söz konusudur. Rb geninde meydana gelen mutasyon tipleri ne olursa olsun genetik bilginin değişmesine yol açarak retinoblastomaya neden olmaktadır.

Işık mikroskopisi ile tanınabilen büyük çaptaki mutasyonlar (delesyon) tüm mutasyonların ancak %1 ile %3'ünü oluşturmaktadır. Bu mutasyonlar sitogenetik analiz yöntemlerinden "high resolution" bantlama tekniği ile gösterilir. Translokasyonlar ise "fluoresan in situ hibridizasyon" (FISH) metodu ile de gösterilebilir.

Submikroskopik makromoleküler düzeydeki mutasyonlar ise tüm mutasyonların %15 ile %20'sini oluşturmaktadır. Germlinal mutasyonların çoğu bu düzeydeki mutasyonların ortaya çıkarılmasında RFLP (restriction fragment length polymorphism) analizi ve Southern blotting hibridizasyon metodu gibi DNA analiz yöntemleri kullanılır.

Mutasyonların %75 ile %80'ini oluşturan submikroskopik mikromoleküler mutasyonların çoğu nokta mutasyonlarıdır. Bu mutasyon tipi ise SSCP (Single strand conformation polymorphism) ve genomik. DNA'nın ampifikasyonu yardımıyla direkt dizi analizi yapılarak tanımlanır.

Herediter Rb olgularında mutant alleli taşıyan kromozom, polimorfik DNA markerları kullanılarak segregasyon analizi yolu ile belirlenebilir (16,17). Retinoblastomaya predispoze mutasyon taşıyıcılarının saptanmasında şu metodlar kullanılır; Yüksek oranda informatif intragenik variabl number tandem repeats (VNTR) mar-

kerin, intragenik markerların izole edilmesi ve informatif flanking markerlar (17-19). Cavenee ve ark., VViggs ve ark., Yandell ve ark., herediter Rb olgusu gösteren geniş aile serilerinde adı geçen metodları kullanmışlardır (20-23).

Unilateral veya bilateral ailevi Rb olgularında, tüm aile bireylerine DNA analizi yapılması gerekir. Çünkü aile bireyleri DNA molekül düzeyinde bilgilendiricidir (informatif). Retinoma veya osteosarkom bulunan aileler de mutant Rb alleli taşıyıcısı olarak kabul edilip ayrıca araştırılmalıdır.

Ailesinde Rb, retinoma veya osteosarkom hikayesinin olmadığı sporadik bilateral Rb olgularının büyük bir bölümü ovum, spermium ve/veya erken embriyonal dönemde meydana gelen yeni germinai mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir (14,15). Bu olguların kardeşleri ve çocukları da risk altında olacağı için, germinai DNA analiz çalışmaları yapılmalıdır. Zira bu kişiler Rb dışında ileri yaşlarda diğer bazı malign tümörlere aday olabilirler. Örneğin bu olgularda osteosarkom görülme oranı genel popülasyondaki görülme oranının üç katıdır. Osteosarkom dışında diğer bazı kanser türlerinin de daha sık görüldüğü bildirilmektedir. Örneğin meme kanseri, yumuşak doku sarkomları, akciğer kanseri ve genitouriner sistem kanserleri gibi (24). Gen ürünü olan P110<sup>sup</sup> (fosfoprotein) yokluğu bu kanserlerin bir bölümünde gösterilmiştir. Özellikle ionize radyasyon ikincil kanser için gerekli somatik mutasyona neden olarak adı geçen kanserleri oluşturmaktadır. Bu nedenle radyoterapi gören hastalar yüksek risk grubu oluşturmaktadırlar. P110<sup>sup</sup> yokluğu veya çok azalmasına bazı lösemi tiplerinde de rastlanmıştır (Akut miyeloid lösemi, akut lenfositik lösemi, kronik miyeloid lösemi gibi).

Sporadik unilateral Rb gösteren fakat ailede Rb hikayesi bulunmayan olgularda ise, kardeşler DNA analizi ile yakın akrabaların ise RFLP analizi ile mutasyon taşıyıcısı olup olmadıkları saptanmalıdır. Ancak bu olguların sadece %15'inde Herediter Rb'ye neden olan germinai mutasyonun varlığı gösterilmiştir (2,16,24).

Tümör süpressör gen Rb'nin inaktivasyonu, gerek sporadik ve herediter Rb'nin, gerekse sekonder bazı tümörlerin ortaya çıkmasında en büyük rolü oynamaktadır. Özellikle herediter tipte Rb bulunan ailelerde kardeşler ve çocuklar yüksek risk altındadırlar. Bu nedenle risk taşıyan ailelerde taşıyıcıların saptanması erken tanı ve doğru bir genetik danışma için son derece önemlidir. Bu konuda geliştirilmiş birçok mutasyon analiz metodları vardır. Ancak genin 200 bp kadar büyük olması analiz metodlarını oldukça kompleks hale getirmektedir. Bu yüzden gittikçe daha gelişmiş ve spesifik analiz metodları geliştirilmektedir. Çünkü %40 gibi yüksek herediter kalıtım gösteren Rb olgularında duyarlı ve doğru bir genetik danışma vermek ülkemizde hızla gelişmekte olan "Genetik Danışma Merkezlerinin" başlıca sorumluluklarından biri olduğunu düşünmekteyiz.

## Kaynaklar

1. Musarella M, Gallie BL. Retinoblastoma, Goldberg's genetic and metabolic eye disease. In: Renie WA, ed. Little Brown and Company, 1986: 423-35.
2. Shields JA, Shields CL. Genetics of retinoblastoma. Intraocular tumors. WB Saunders Company, 1992: 333.
3. Roberts DF, Aherna GES. Retinoblastoma. In: Emery AEH, Rimon DL, ed. Principles and practice of medical genetics, 2nd ed 1990: 705-21.
4. Cowell JK. The genetics of retinoblastoma. Br J Cancer 1990; 63:333-6.
5. Cavenee WK, Hansen MF, Nordenskjöld M, Kock E, et al. Genetic origin of mutations predisposing to retinoblastoma. Science 1985; 228:501-3
6. Sparkes RS, Sparkes MC, Wilson MG, et al. Regional assignment of genes for human esterase D and retinoblastoma to chromosome band 13q14, Science 1980; 208:1042-44.
7. Ljberfarb RM, Bustos T, Miller WA, Sang D. Incidence and significance of a deletion of chromosome band 13q14 in patients with retinoblastoma and in their families. Ophthalmology 1984; 91:1695-99.
8. Kloss K, Wahrlich P, Greger V, Messmer E, Fritze H, Hopping W, Passarge E, Horsthemke B. Characterization of deletions at the retinoblastoma locus in patients with bilateral retinoblastoma. Am J Med Genet 1991; 39:196-200.
9. Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, et al. Human retinoblastoma susceptibility gene: Cloning, identification, and sequence. Science 235:1394-99
10. Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. Am J Human Genet 1991; 48:880-8.
11. Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, Ositchin NE, Robbins PD, Sakai T. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumour-suppressor gene. Oncogene 1993; 8:1063-67.
12. Greger V, Debus N, Lohmann D, Hopping W, Passarge E, Horsthemke B. Frequency and parental origin hypermethylated alleles in retinoblastoma. Hum Genet 1994; 94:491-6.
13. Knudson AG. Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. Cancer Res 1985; 45:1437-43.
14. Zhu X, Dunn JM, Philips RA, Goddard AD, et al. Preferential germline mutation of the paternal allele in retinoblastoma. Nature 1989; 340:312-3.
15. Murphree AL. Molecular genetics of retinoblastoma. Ophthalmology Clinics of North America 1995; 8:155-65.
16. Onadim Z, Hykin PK, Hungerford JL, Cowell JK. Genetic counselling in retinoblastoma: importance of ocular fundus examination of first degree relatives and linkage analysis. Br J of Ophthalmol 1991; 75:147-50.

## RETINOBLASTOM GENETIĞİ

17. Onadim Z, Hungerford JL, Cowell JK. Follow-Qp retinoblastoma patients having prenatal and perinatal predictions for mutant gene carrier status using intragenic polymorphic probes from the RBI gene. *Br J Cancer* 1992; 65:711-6.
18. Blanquet V, Creau-Goldberg N, Grouchy J, Turleau C. Molecular detection of constitutional deletions in patients with retinoblastoma. *Am J Med Genet* 1991; 39:355-61.
19. Dryja TP, Mukai S, Petersen R, Rapaport JM, et al. Parental origin of mutations of the retinoblastoma gene. *Nature* 1989; 339:556-8.
20. Cavenee WK, Murphree AL, Shull MM, Benedict WF, Sparkes RS, Kock E, Nordenskjold M. Prediction of familial predisposition to retinoblastoma. *New Engl J Med* 1986; 314:1201-07.
21. Yandel DW, Campbell TA, Dayton SH, et al. Oncogenic point mutation in the human retinoblastoma gene. Their application to genetic counseling. *New Eng J Med* 1989; 321:1689-95.
22. Wiggs JL, Dryja TP. Predicting the risk of hereditary retinoblastoma. *Am J Ophthalmol* 1988; 106:346-51.
23. Wiggs JL, Nordenskjold M, Yandel D, et al. Prediction of the risk of hereditary retinoblastoma, using DNA polymorphisms within the retinoblastoma gene. *New Engl J Med* 1988; 318:151-7.
24. Weir-Thomson E, Condie A, Leonard RCF, Prosser JA. Familial RBI mutation by HOT technique homozygous in a second primary neoplasm. *Oncogene* 1991; 6:2353-56.