

Genetik des Retinoblastoms

Dietmar Lohmann, Bernhard Horsthemke, Institut für Humangenetik der Universität Essen

Das Retinoblastom ist ein bösartiger Tumor der kindlichen Netzhaut, der weltweit mit einer Häufigkeit von 1 auf 15.000 bis 20.000 lebend geborene Kindern auftritt. Bei etwa 60% der erkrankten Kinder bleibt die Tumorbildung auf ein Auge beschränkt (einseitiges Retinoblastom). In den Familien dieser Kinder ist überwiegend keine weitere Erkrankung an Retinoblastom bekannt (isoliertes Retinoblastom). Durch ophthalmologische Kontrolluntersuchungen bei Angehörigen müssen jedoch klinisch stumme

Verlaufsformen, insbesondere ein Retinom, ausgeschlossen werden. Etwa 40% der Kinder entwickeln Tumorherde in beiden Augen (beidseitiges Retinoblastom). In den Familien von etwa 1/4 dieser Kinder sind weitere Erkrankungen entweder schon bekannt oder sie werden bei Untersuchungen entdeckt (familiäres Retinoblastom).

Die Behandlung des Retinoblastom richtet sich nach Größe, Zahl und Lage der Tumoren sowie nach Anwesenheit von Glaskörperaussaat und Netzhautablösung. Der Tumor kann unter Erhalt des Auges durch Hitze (Lichtkoagulation), Kälte (Cryokoagulation), Bestrahlung (perkutane oder Brachytherapie) zerstört werden. Größere Tumoren können durch die Ausschälung des Augapfels (Enukleation) sicher entfernt werden. Mit neueren Therapieansätzen wird versucht, eine Bestrahlung oder Enukleation bei der Behandlung größerer Tumore zu vermeiden (Bornfeld et al. 1997). Bei den meisten Patienten mit intraokulärem Retinoblastom ist die Behandlung erfolgreich und die 5-Jahres Überlebensrate liegt über 90%. Die Langzeitprognose bei Patienten mit Retinoblastom wird wesentlich durch das erhöhte Risiko für das Auftreten primärer Tumoren außerhalb des Auges (Zweitumoren) und der daraus resultierenden Sterblichkeit getrübt. Zu diesen Zweitumoren zählen insbesondere bösartige Geschwülste des Knochens und der Bindegewebe, das maligne Melanom sowie bösartige Tumoren des Hirns und der Meningen (Eng et al. 1993). Zweitumoren treten vor allem bei Patienten auf, die ein beidseitiges Retinoblastom hatten. Patienten, die eine perkutane Strahlentherapie erhalten haben, zeigen eine im Vergleich zu nicht bestrahlten Patienten fast fünffach erhöhte Sterblichkeit an Zweitumoren. Daher ist es zur Verbesserung der Langzeitprognose wichtig, die Anwendung externer Strahlentherapie zu vermeiden.

Klinische Genetik

Patienten mit familiärem Retinoblastom und beidseitig erkrankte Patienten können die Disposition zu Entwicklung von Retinoblastom als autosomal dominant erbliches Merkmal vererben. Die Penetranz ist bei Nachkommen von beidseitig erkrankten Patienten nahezu vollständig und daher beträgt das Risiko für Retinoblastom bei Nachkommen fast 50% (Abb. 1 A). In den seltenen Familien mit überwiegend einseitig Erkrankten ist die Penetranz jedoch deutlich reduziert (Abb. 1 B). In diesen Familien kann die Disposition zu Retinoblastom daher auch über nicht erkrankte Angehörige weitergegeben werden. Ein erbliches Retinoblastom liegt auch bei einigen Kindern mit isolierter Erkrankung nur eines Auges vor. Klinisch können diese nicht von einseitig erkrankten Patienten mit nicht-erblichem Retinoblastom unterschieden werden. Auch wenn sie keine Zeichen der Erkrankung aufweisen können Eltern von erkrankten Kindern die Disposition zu Retinoblastom an weitere Kinder vererben (Abb. 1 C). Empirisch haben Geschwister von isoliert beidseitig erkrankten Patienten ein Risiko von 2%, bei Geschwistern von isoliert beidseitig erkrankten Patienten ist mit einem Risiko von 1% für Retinoblastom zu rechnen (Draper et al. 1992).

Hat ein Kind die Disposition zu Retinoblastom geerbt, so sind erste Tumorherde oft schon in der ersten Lebenswoche erkennbar. Da eine frühe Erkennung der Tumoren für die Prognose entscheidend ist, muß mit den engmaschigen ophthalmologischen

Kontrolluntersuchungen nach Möglichkeit schon in der ersten Lebenswoche begonnen werden. Bei kleinen Kindern müssen diese Untersuchungen in Narkose durchgeführt werden.

Molekulare Genetik

Knudson veröffentlichte 1971 eine Hypothese, wonach für die Entstehung des Retinoblastoms zwei Mutationereignisse hinreichend sind (Knudson 1971): bei der dominant erblichen Form wird eine Mutation über Keimzellen ererbt und die zweite Mutation tritt in einer somatischen Zelle auf, bei der nicht-erblichen Form sind beide Mutationen somatischer Herkunft. Die Beobachtung zytogenetischer Deletionen der Bande 13q14 bei Patienten mit Retinoblastom und die Kosegregation der Disposition mit Markern aus dieser Region gab den Hinweis für die Lokalisation des Retinoblastomgens (RB1). Durch die Untersuchung polymorpher Loci auf 13q in DNA aus Blut und Tumoren wurde erkannt, daß die zwei, für die Entstehung des Retinoblastoms ursächlichen Mutationen nacheinander die beiden Allele des RB1-Gens inaktivieren: die erste Mutation führt zu einer lokal beschränkten genetischen Veränderungen und erst der Verlust des nicht mutierten Allels leitet die Entwicklung des Tumors ein (Cavenee et al. 1983). Durch weitere Analyse der kleinsten von Allelverlust betroffenen Region konnte ein Gen identifiziert werden, das Eigenschaften des RB1-Gen zeigte (Friend et al. 1986). Der Nachweis von Mutationen, die in ihrer Ausdehnung auf

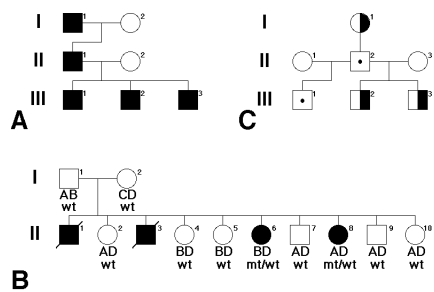
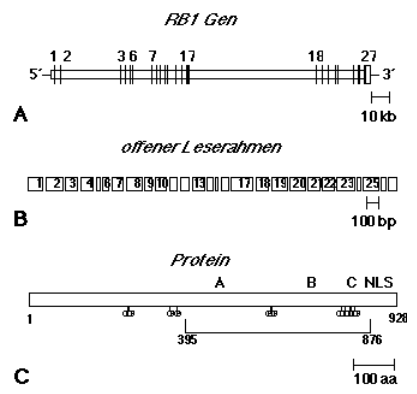


Abb 1
 Stammbäume von Familien mit mehreren an Retinoblastom erkrankten Angehörigen. Halb ausgefüllte Symbole: einseitiges Retinoblastom; ganz ausgefüllte Symbole: beidseitiges Retinoblastom.

A Familiäres Retinoblastom mit vollständiger Penetranz (Segregation der Mutation R579X).
B Familiäres Retinoblastom mit Keimbahnmosaik bei Mutter (-2). Die Haplotypen der Allele RB1-intragenere Polymorphismen sind mit A bis D bezeichnet; in DNA aus Blut: wt, nicht mutiertes Allel; mt, IVS12+1G>A.
C Familiäres Retinoblastom mit verminderter Expressivität und unvollständiger Penetranz. Symbol mit Punkt bezeichnet nicht penetrante Träger der in der Familie segregierenden Mutation R661W.

Abb 2
A Genomische Organisation des RB1-Genes und Funktionsdomänen des kodierten Proteins. Die 27 Exons des Gens liegen 180 kb genomischer Sequenz verteilt.
B Die Länge der Introns reicht von 80 bp (Intron 15) bis über 70 kb (Intron 17). Die 27 Exons kodieren für ein Transkript mit einem offenen Leserahmen von 2,7 kb.



C Der kodierende Bereich einzelner Exons ist zwischen 32 bp (Exon 15) und 197 bp (Exon 17) lang. Das Gen wird ubiquitär in ein Protein von 928 Aminosäuren (aa) Länge translatiert. Dieses wird in Abhängigkeit vom Zellzyklus an mehreren Stellen phosphoryliert (symbolisiert durch eingekreiste „P“). In der kleinsten, für die Wachstumshemmung erforderlichen Region (aa395 bis aa876) liegen die Funktionsdomänen A, B und C sowie ein Signalmotiv (NLS), das für die nukleäre Lokalisation des Proteins erforderlich ist.

dieses Gen beschränkt sind bestätigte, daß es sich hier um das gesuchte RB1-Gen handelt.

Aufbau und Funktion des RB1-Gens.

Das RB1-Gen hat eine Größe von über 180 kb (Toguchida et al. 1993) (Abb. 2 A). Die exprimierte Sequenz ist auf 27 Exons verteilt (Abb. 2 B). Das 5'-Ende des Gens weist eine unmethylierte CpG-Insel auf, die für konstitutiv exprimierte Gene („Housekeeping“-Gene) typisch ist (Greger et al. 1988). Das Gen wird in allen untersuchten Geweben in eine mRNA von 4,7 kb Länge transkribiert (T'Ang et al. 1988). Der offene Leserahmen kodiert für ein Protein mit 928 Aminosäuren (Abb. 2 C). Das RB1-Gen kodiert für ein Phosphoprotein von 110 kD (pRB), das im Zellkern lokalisiert ist (Lee et al. 1987). pRB liegt während der G0/G1-Phase des Zellzyklus unterphosphoryliert vor und wird vor dem Übertritt in die S-Phase phosphoryliert (Weinberg 1995). Unterphosphoryliertes pRB hemmt, vermittelt durch Bindung an E2F, den G1/S-Übergang. Für die Ausbildung des pRB-E2F-Komplexes sind zwei nicht zusammenhängende Domänen (A und B) wichtig, an die auch virale Onkoproteine binden können (Weinberg 1995). Über die durch die Kontrolle des G1/S-Übergangs vermittelte Wachstumshemmung hinaus zeigt das RB1-Gens ein Spektrum von Funktionen, das von der Art der Zelle und ihrem Differenzierungsstadium beeinflusst wird. Welche Funktionsverluste für die Entstehung des Retinoblastoms kritisch sind, ist noch nicht bekannt (Otterson et al. 1997). Die Störung der Differenzierung der unreifen Netzhaut-

zellen scheint dabei jedoch eine wesentliche Rolle zu spielen.

Mutationsspektrum.

Substitutionen einzelner Basen stellen mit über 40% den größten Teil der prädisponierenden Mutationen des RB1-Gens (Lohmann et al. 1996; Lohmann et al. 1997) (Abb. 3 A). An 12 CpG-Dinukleotiden, die Teil von CGA-Codons oder Splicesignalen sind, treten Transitionen unabhängig voneinander wiederholt auf. Kleine Längenmutationen (Deletionen bzw. Insertionen >50 bp) machen etwa 25% der Mutationen aus (Abb. 3 B). Ein wiederholtes Auftreten dieser Mutationen betrifft Bereiche repetitiver Sequenzmotive. Mutationen konnten in nahezu allen Exons des RB1-Gens identifiziert werden. Lediglich in den terminalen Exons 25 bis 27 wurden bislang noch keine kleinen Mutationen gefunden. Dies ist umso erstaunlicher, da das Exon 27 zwei CGA-Codons enthält. Es ist daher möglich, daß Mutationen in diesen Bereichen des Gens nicht onkogen sind. Große Deletionen, die ausgedehnte Abschnitte oder das gesamte RB1-Gen betreffen, sind in Blut-DNA von fast 20% der Patienten mit beidseitigem Retinoblastom erkennbar (Kloss et al. 1991). Bei etwa 5% der bilateral betroffenen Patienten sind diese Deletionen auch zytogenetisch erkennbar (Bunin et al. 1989).

Die in Tumoren gefundenen Basensubstitutionen und kleinen Längenmutationen zeigen ein Verteilungsmuster, das dem der Keimbahnmutationen entspricht (Abb. 3 A). Ein Verlust konstitutioneller Heterozygotie (LOH) po-

lymorpher Loci kann bei 60 bis 70% der Tumoren festgestellt werden (Lohmann et al. 1997; Zhu et al. 1992). Große Deletion führen oft zu LOH. Der häufigste, dem LOH zugrundeliegende Mutationsmechanismus ist jedoch eine mitotische Rekombination (Zhu et al. 1992). Bei etwa 10% der Tumoren besteht eine Hypermethylierung der normalerweise nicht methylierten CpG-Insel im 5'-Bereich des RB1-Gens (Greger et al. 1989; Sakai et al. 1991b). Durch diese Mutation wird der Promoter funktionell inaktiviert (Silencing) (Greger et al. 1994). In konstitutioneller DNA, konnte bislang keine Hypermethylierung dieses Bereiches gefunden werden (Greger et al. 1989).

Beziehung zwischen der Art der Mutation und dem klinischen Bild.

Mehr als 80% der Punktmutationen des RB1-Gens führen zu einem vorzeitigen Stop-Codon. Transkripte dieser Allele sind außerhalb des Tumors nicht nachweisbar (Dunn et al. 1989; Kato et al. 1994). Daher ist es wahrscheinlich, daß diese mutanten Allele außerhalb des Tumors nicht auf Proteinebene exprimiert werden (Null-Mutationen). Träger von Null-Mutationen entwickeln im Durchschnitt mehr als 6 Tumoren in beiden Augen (Lohmann et al. 1996). Nur sehr selten (unter 1%) bleibt ein erkennbares Tumorwachstum bei einem Mutationsträger aus (unvollständige Penetranz). Patienten mit Deletionen, die so groß sind, daß neben dem RB1-Gen auch weitere, in der Nachbarschaft liegende Gene mit erfaßt werden, entwickeln durchschnittlich deutlich weniger als 6 Tumoren (Matsunaga 1980). Bei diesen Patienten sind

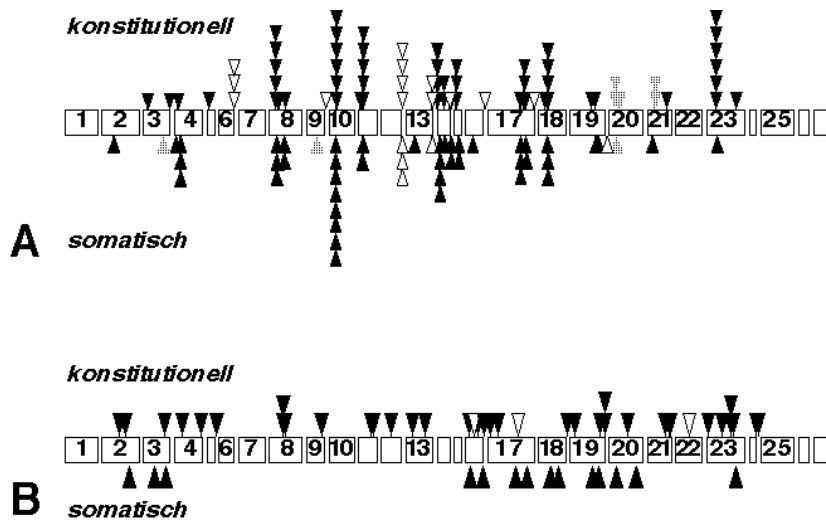


Abb 3
Verteilung onkogener Mutationen im RB1-Gen (Lohmann et al. 1996; Lohmann et al. 1997 und unveröffentlichte eigene Daten). Nach unten weisende Pfeile: konstitutionelle Mutationen; nach oben weisende Pfeile: somatische Mutationen in Tumoren.

A Basensubstitutionen: schwarze Pfeilköpfe: nonsense Mutationen; offene Pfeilköpfe: Mutationen an Splice-Sequenzen; graue Pfeilköpfe: missense Mutationen.

B Verteilung kleiner Deletionen und Insertionen (<50bp). schwarze Pfeilköpfe: frameshift Mutationen; offene Pfeilköpfe: in-frame Deletionen.

daher einseitige Erkrankung oder gar das Ausbleiben von Tumorentwicklung nicht selten.

Bei wenigen der bekannten Mutationen bleiben Funktionen des RB-Proteins erhalten (Otterson et al. 1997). Einige dieser mutanten Allele sind mit einer milderer Ausprägung der Erkrankung verbunden: in den betroffenen Familien überwiegen einseitige Erkrankung (reduzierte Expressivität) und bei nahezu 25% der Mutationsträger wird kein Tumor festgestellt (inkomplette Penetranz). Mutationen im Promoterbereich können ebenfalls zu diesem Low-penetrance Phänotyp führen (Sakai et al. 1991a).

Für die Ausprägung der Tumordisposition ist neben der Art der Mutation auch von Bedeutung, zu welchem Zeitpunkt in der Entwicklung des Individuums und in welcher Zelle die Mutation aufgetreten ist. Bei einem Teil der Patienten mit erblichem Retinoblastom tritt die erste Mutation während der frühen Embryonalentwicklung auf und ist daher im Mosaik vorhanden. Da die Tumorentwicklung jedoch nur von den retinalen Vorläuferzellen ausgeht, die die prädisponierende Mutation tragen, wird die Zahl der Tumoren bei Patienten mit Mutationsmosaik durch ein Mosaik wesentlich mitbestimmt. Nicht selten kann ein Mosaik bei einseitig oder nicht erkrankten Eltern von Kindern mit beidseitigem Retinoblastom gefunden werden (Abb. 1 B, 4).

Prädiktive Diagnostik

Die Diagnose eines Retinoblastoms hat

Auswirkungen auf die Familie des Patienten. Da einige Mutationen des RB1-Gens verminderte Expressivität und unvollständige Penetranz zeigen, haben selbst entfernte Angehörige von isoliert einseitig erkrankten Patienten ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Retinoblastoms. Alle Kinder mit einem erhöhten Risiko müssen während der für die Entstehung des Retinoblastoms relevanten Zeit engmaschig ophthalmologisch kontrolliert werden. Mittels molekulargenetischer Analysen kann ein erhöhtes Risiko festgestellt oder ausgeschlossen werden. So können die Vorsorgeuntersuchungen auf die Kinder beschränkt bleiben, welche eine prädisponierende Mutation geerbt haben. Durch Kosten-Nutzen-Analysen konnte gezeigt werden, daß die Aufwendungen für eine molekulare Diagnostik geringer sind als die Kosten, welche durch die ansonsten erforderlichen Vorsorgeuntersuchungen entstehen (Noorani et al. 1996). Die molekulare Diagnostik bringt neben den ökonomischen Vorteilen aber auch eine wesentliche psychische Entlastung für die betroffenen Familien.

Der Erfolg der molekularen Risikoprädiktion ist wesentlich von der Verfügbarkeit der erforderlichen Proben abhängig. Nach Möglichkeit sollte immer von dem erkrankten Kind und seinen Eltern EDTA-Blut bereitgestellt werden. In Einzelfällen ist mit Heparin versetztes Vollblut für eine Chromosomenanalyse erforderlich. Insbesondere bei isolierten Erkrankungen muß – wenn der Tumor enukleiert wurde – eine tiefgekühlte Gewebsprobe des Tumors für die DNA-Analyse asserviert werden. In formalinfixiertem Archivmaterial dagegen ist die

DNA degradiert und Analysen sind nur sehr eingeschränkt möglich. Zweitumoren sind für die Untersuchung wertvoll und können auch für die prädiktive Diagnostik herangezogen werden.

Beratung und Diagnostik bei familiärem Retinoblastom.

In den meisten Familien sind alle Betroffenen beidseitig erkrankt und die Penetranz ist nahezu vollständig. In diesen Familien beträgt das Risiko für Retinoblastom bei Kindern von Mutationsträgern nahezu 50%. Seltener ist die Erkrankung in der ersten betroffenen Generation einseitig geblieben. Diese Konstellation weist auf ein genetisches Mosaik hin und im Falle eines Keimbahnmosaiks ist das Risiko bei Kindern vermindert. In wenigen Familien ist einseitige Erkrankung häufiger als beidseitiges Retinoblastom anzutreffen. In diesen Familien ist unvollständige Penetranz nicht selten. Ursächlich für den low-penetrance Phänotyp sind bestimmte Mutationen im RB1-Gen. Das Erkrankungsrisiko bei Kindern von Mutationsträgern ist auf etwa 38% reduziert. Ein besonderes Problem stellen Familien dar, in denen Retinoblastom nur bei weit entfernten Verwandten aufgetreten ist. Oft kann in solchen Familien durch eine Segregationsanalyse jedoch gezeigt werden, daß die Erkrankungen nicht auf gemeinsame RB1-Genmutationen zurückzuführen sind (Dryja et al. 1993; Munier et al. 1993 und eigene unveröffentlichte Daten).

Steht DNA von zumindest zwei betroffenen Familienmitgliedern zur Verfügung, so kann durch eine Segregati-

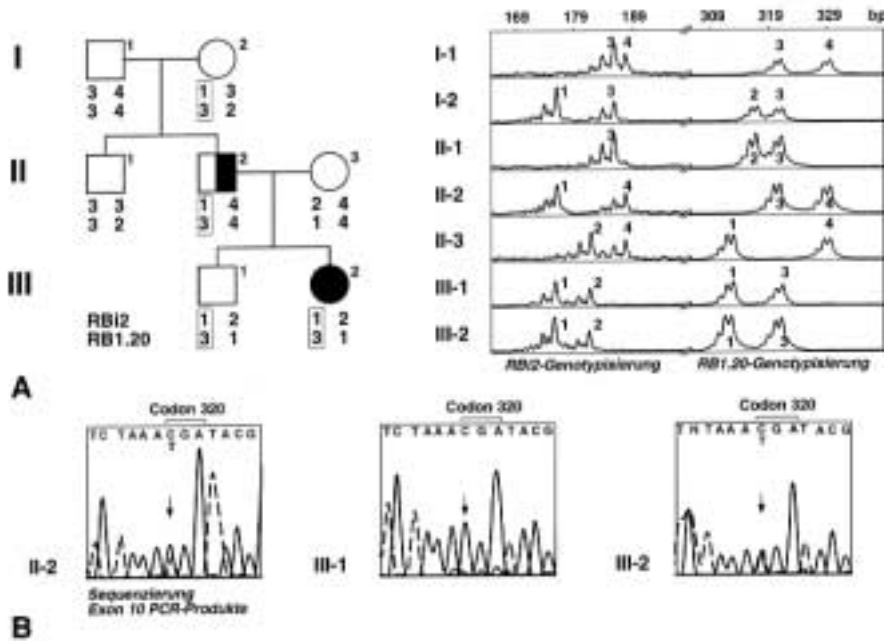


Abb 4
Prädiktive Diagnostik bei familiärem Retinoblastom mit Keimbahnmosaik beim einseitig betroffenen Vater (II-1).

A Die Genotypisierung intragener polymorpher Loci zeigt, daß der nicht erkrankte Sohn (III-1) und die beidseitig erkrankte Tochter (III-2) dasselbe RB1-Allel vom Vater II-2 geerbt haben.

B Die Sequenzanalyse bei der Tochter (III-2) zeigt eine heterozygote Nonsense-Mutation (Codon 320 CGA>TGA, R320X). Diese Mutation ist auch beim Vater (II-2) zu erkennen. Der Bruder (III-1) zeigt hingegen nur die normale Sequenz.

onsanalyse die Kopplungsphase sicher bestimmt werden. Die Mutationsanalyse an DNA aus peripherem Blut ist bei familiärem Retinoblastom überwiegend erfolgreich (>85%) (Lohmann et al. 1996) und durch die Kenntnis der Mutation kann sowohl die Sicherheit der prädiktiven Diagnose erhöht als auch die zu erwartende Expressivität und Penetranz abgeschätzt werden. In Verbindung mit der Segregationsanalyse erlaubt die Mutationsbestimmung desweiteren auch die Erkennung eines genetischen Mosaiks (Abb. 1 B und 4).

Beratung und Diagnostik bei isoliert beidseitigem und einseitig multifokalem Retinoblastom. Ein Patient mit isoliert bilateralem Retinoblastom hat mit hoher Wahrscheinlichkeit die erbliche Form des Retinoblastoms und eigene Kinder haben daher in Abhängigkeit von der Art der Mutation und modifiziert durch ein mögliches Keimbahnmosaik ein Risiko von nahezu 50%, an Retinoblastom zu erkranken. Bei weiteren Kindern nicht erkrankter Eltern beträgt das Risiko für die Entwicklung von Retinoblastom etwa 2% (Draper et al. 1992).

Schon durch die Segregationsanalyse kann ein erhöhtes Risiko bei Geschwistern manchmal ausgeschlossen werden. Wenn Tumormaterial für eine Untersuchung zur Verfügung kann bei Allelverlust auf die Kopplungsphase geschlossen werden. Die Mutationsanalyse an DNA aus peripherem Blut erlaubt bei der Mehrzahl der Patienten (>70%) mit isoliert beidseitigem Retinoblastom die Identifikation der onkogenen RB1-Genmutation (Lohmann et al. 1996). Kann diese Mutation in DNA

aus Blut der Eltern nicht nachgewiesen werden, so ist aufgrund der Möglichkeit eines Keimbahnmosaiks ein erhöhtes Wiederholungsrisiko bei weiteren Kindern dennoch nicht ausgeschlossen. Mosaik sollen bei etwa 8% der Familien vorkommen (Sippel et al. 1998). Ein Mosaik kann auch bei dem erkrankten Kind vorliegen. Dies betrifft insbesondere Kinder mit einseitig multifokalem Retinoblastom. Daher kann bei einem Teil der Kinder die prädisponierende Mutation im Tumor, nicht aber in DNA aus Blut identifiziert werden (Lohmann et al. 1997; Shimizu et al. 1994). Deshalb müssen zur Mutationsanalyse also auch bei beidseitig und multifokal erkrankten Kindern Tumorproben für molekulargenetische Untersuchungen asserviert werden.

Beratung und Diagnostik bei isoliert einseitigem Retinoblastom. Das isoliert einseitige Retinoblastom stellt bezüglich der Beratung und Diagnostik die größten Probleme. Nach Vogel tragen 10-12% der Patienten mit isoliert einseitigem Retinoblastom eine Keimzellmutation (Vogel 1979). Demzufolge hätten eigene Kinder der Patienten ein Risiko von etwa 5% dafür, an einem Retinoblastom zu erkranken. Draper et al. ermittelten unter der Annahme verminderter Penetranz hingegen eine Wahrscheinlichkeit von 2,3% dafür, daß ein Patient mit einseitigem Retinoblastom Träger einer Keimzellmutation ist (Draper et al. 1992). Nach ihren Schätzungen ist mit unter 1% Wahrscheinlichkeit mit einem Retinoblastom bei Kindern von Patienten zu rechnen. Für weitere Geschwister von

Patienten mit isoliert einseitigem Retinoblastom wurde ein Wiederholungsrisiko von 1% ermittelt. Bei etwa 10% der Patienten mit einseitigem Retinoblastom können RB1-Mutationen in DNA aus Blut gefunden werden (Blanquet et al. 1995; Lohmann et al. 1997). Bislang sind jedoch noch keine Daten von den Nachkommen dieser Patienten gesammelt worden. Daher bleibt abzuwarten, ob der Nachweis einer Mutation im Blut einseitig erkrankter Patienten hinreichend für die Erkennung eines erblichen Retinoblastoms ist.

Die molekulargenetische Diagnostik erlaubt in den meisten Fällen eine genaue Risikoprognose bei Angehörigen. Oft ist dazu die Untersuchung von adäquat asserviertem Tumormaterial erforderlich. Durch Untersuchung des Tumors kann – wenn es zu LOH gekommen ist – die Kopplungsphase zur möglichen Keimbahnmutation bestimmt werden (Abb. 5). Die Mutationsanalyse von Tumor-DNA erlaubt in den meisten Fällen die Erkennung der ursächlichen RB1-Mutationen. Sind diese nicht in DNA aus Blut des Patienten nachweisbar, so sind sie somatischer Herkunft und damit nicht erblich. Ein Wiederholungsrisiko kann dann bei Geschwistern mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Bei eigenen Nachkommen besteht jedoch ein gering erhöhtes Risiko für Retinoblastom, da auch die Keimbahn betroffen sein kann. Kann eine der im Tumor gefundenen Mutationen auch in DNA aus Blut nachgewiesen werden, so muß für die prädiktive Diagnostik bei den Geschwistern

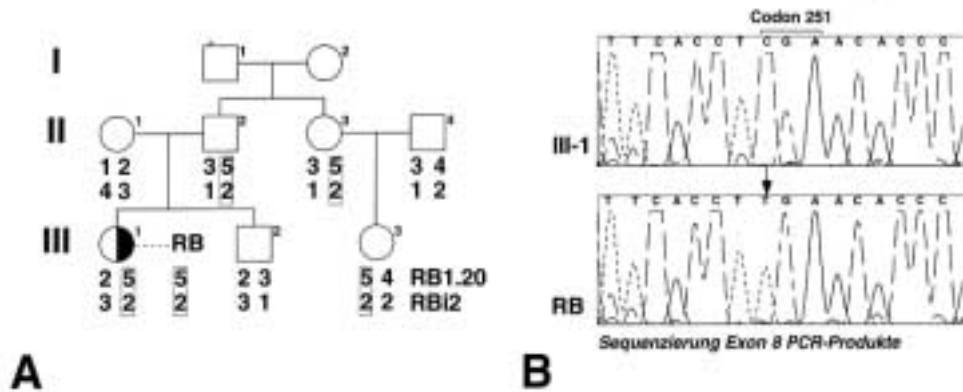


Abb. 5 Familie mit einem an isoliert einseitigem Retinoblastom erkrankten Kind (III-1).

A Da der Bruder (III-2) nicht den Haplotyp geerbt hat, der im Tumor verblieben ist, kann ein erhöhtes Risiko für Retinoblastom bei ihm ausgeschlossen werden. Der bezüglich der Herkunft identische Haplotyp liegt jedoch bei der Cousine (III-3) vor.

B Ergebnis der Sequenzierung von Exon 8 PCR-Produkten. Der Tumor (RB) zeigt eine Nonsense-Mutation (Codon 251 CGA>TGA, R320X).

In DNA aus peripherem Blut der Patientin ist diese Mutation nicht feststellbar. Daher kann nun auch bei der Cousine (III-3) ein erhöhtes Risiko für Retinoblastom ausgeschlossen werden.

eine Mutationsanalyse durchgeführt werden.

Literaturverzeichnis

Blanquet V, Turleau C, Gross-Morand S, Sénamaud-Beaufort C, Doz F, Besmond C (1995) Spectrum of germline mutations in the RB1 gene: a study of 232 patients with hereditary and non hereditary retinoblastoma. *Hum. Molec. Genet.* 4: 383 – 388

Bunin GR, Emanuel BS, Meadows AT, Buckley JD, Woods WG, Hammond GD (1989) Frequency of 13q abnormalities among 203 patients with retinoblastoma. *Journal of the National Cancer Institute* 81: 370-374

Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 305: 779 - 784

Draper GJ, Sanders BM, Brownbill PA, Hawkins MM (1992) Patterns of risk of hereditary retinoblastoma and applications to genetic counselling. *Br. J. Cancer* 66: 211 - 219

Dryja TP, Rapaport J, McGee TL, Nork TM, Schwartz TL (1993) Molecular etiology of low-penetrance retinoblastoma in two pedigrees. *Am J Hum Genet* 52: 1122-8

Dunn JM, Phillips RA, Zhu X, Becker A, Gallie BL (1989) Mutations in the RB1 gene and their effects on transcription. *Mol. Cell. Biol.* 9: 4596 – 4604

Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323: 643 - 646

Greger V, Debus N, Lohmann D, Höpping W, Passarge E, Horsthemke B (1994) Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Hum. Genet.* 94: 491 – 496

Greger V, Passarge E, Höpping W, Messmer E, Horsthemke B (1989) Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 83: 155-8

Kato MV, Ishizaki K, Toguchida J, Kaneko A, Takayama J, Tanooka H, Kato T, Shimizu T, Sasaki MS (1994) Mutations in the retinoblastoma gene and their expression in somatic and tumor

cells of patients with hereditary retinoblastoma. *Hum. Mutat.* 3: 44 – 51

Kloss K, Währisch P, Greger V, Messmer E, Fritze H, Höpping W, Passarge E, Horsthemke B (1991) Characterization of deletions at the retinoblastoma locus in patients with bilateral retinoblastoma. *Am J Med Genet* 39: 196-200

Knudson AG (1971) Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 820-823

Lee WH, Shew JY, Hong FD, Sery TW, Donoso LA, Young LJ, Bookstein R, Lee E (1987) The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature* 329: 642-645

Lohmann DR, Brandt B, Höpping W, Passarge E, Horsthemke B (1996) Spectrum of RB1 germ-line mutations in hereditary retinoblastoma. *Am. J. Hum. Genet.* 58: 940 - 949

Lohmann DR, Gerick M, Brandt B, Oelschläger U, Lorenz B, Passarge E, Horsthemke B (1997) Constitutional RB1-gene mutations in patients with isolated unilateral Retinoblastoma. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 282 - 294

Matsunaga E (1980) Retinoblastoma: host resistance and 13q- chromosomal deletion. *Hum Genet* 56: 53-8

Munier FL, Wang MX, Spence MA, Thonney F, Balmer A, Pescia G, Donoso LA, Murphree AL (1993) Pseudo low penetrance in retinoblastoma. Fortuitous familial aggregation of sporadic cases caused by independently derived mutations in two large pedigrees. *Arch Ophthalmol* 111: 1507-11

Noorani HZ, Khan HN, Gallie BL, Detsky AS (1996) Cost comparison of molecular versus conventional screening of relatives at risk for retinoblastoma. *American Journal of Human Genetics* 59: 301-307

Otterson GA, Chen Wd, Coxon AB, Khleif SN, Kaye FJ (1997) Incomplete penetrance of familial retinoblastoma linked to germ-line mutations that result in partial loss of RB function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12036-40

Sakai T, Ohtani N, McGee TL, Robbins PD, Dryja TP (1991a) Oncogenic germ-line mutations in Sp1 and ATF sites in the human retinoblastoma gene.

Nature 353: 83 – 6

Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP (1991b) Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* 48: 880-8

Shimizu T, Toguchida J, Kato MV, Kaneko A, Ishizaki K, Sasaki S (1994) Detection of mutations of the RB1 gene in retinoblastoma patients by using exon-by-exon PCR-SSCP analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 54: 793 – 800

Sippel KC, Fraioli RE, Smith GD, Schalkoff ME, Sutherland J, Gallie BL, Dryja TP (1998) Frequency of somatic and germ-line mosaicism in retinoblastoma: implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet* 62: 610-9

Toguchida J, McGee TL, Paterson JC, Eagle JR, Tucker S, Yandell DW, Dryja TP (1993) Complete genomic sequence of the human retinoblastoma susceptibility gene. *Genomics* 17: 535-543

T'Ang A, Varley JM, Chakraborty S, Murphree AL, Fung YKT (1988) Structural rearrangement of the retinoblastoma gene in human breast carcinoma. *Science* 241: 263-266

Vogel F (1979) Genetics of Retinoblastoma. *Hum. Genet.* 52: 1 – 54

Weinberg RA (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330

Zhu X, Dunn JM, Goddard AD, Squire JA, Becker A, Phillips RA, Gallie BL (1992) Mechanisms of loss of heterozygosity in retinoblastoma. *Cytogenet Cell Genet* 59: 248-52

Korrespondenzadresse

Dr. Dietmar Lohmann
 Institut für Humangenetik
 Universitätskliniken Essen
 Hufelandstr. 55
 45122 Essen
 Tel 0201-723-4562
 Fax 0201-723-5900
 dr.lohmann@uni-essen.de