

- ³ Ledergerber B, Mocroft A, Reiss P, Furrer HJ, Kirk O, Bickel M, et al. Discontinuation of secondary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection who have a response to antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 2001;344:168-74.
- ⁴ Goudsmit J, Weverling GJ, Hoek L van der, Ronde A de, Miedema F, Coutinho RA, et al. Carriage rate of zidovudine-resistant HIV-1: the impact of failing therapy on transmission of resistant strains. *AIDS* [ter perse].
- ⁵ Ronde A de, Dooren M van, Hoek L van der, Bouwhuis D, Rooij E de, Gemen B van, et al. Establishment of new transmissible and drug-sensitive human immunodeficiency virus type 1 wild types due to transmission of nucleoside analogue-resistant virus. *J Virol* 2001;75:595-602.
- ⁶ Daniel MD, Kirchhoff F, Czajak SC, Sehgal PK, Desrosiers RC. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 1992;258:1938-41.
- ⁷ Ruprecht RM. Live attenuated AIDS viruses as vaccines: promise or peril? *Immunol Rev* 1999;170:135-49.
- ⁸ Baba TW, Jeong YS, Pennick D, Bronson R, Greene MF, Ruprecht RM. Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science* 1995;267:1820-5.
- ⁹ Berkhout B, Verhoef K, Wamel JLB van, Back NKT. Genetic instability of live, attenuated human immunodeficiency virus type 1 vaccine strains. *J Virol* 1999;73:1138-45.
- ¹⁰ Baba TW, Liska V, Khimani AH, Ray NB, Dailey PJ, Penninck D, et al. Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat Med* 1999;5:194-203.
- ¹¹ Sawai ET, Hamza MS, Ye M, Shaw KE, Luciw PA. Pathogenic conversion of live attenuated simian immunodeficiency virus vaccines is associated with expression of truncated Nef. *J Virol* 2000;74:2038-45.
- ¹² Gundlach BR, Lewis MG, Sopper S, Schnell T, Sodroski J, Stahl-Hennig C, et al. Evidence for recombination of live, attenuated immunodeficiency virus vaccine with challenge virus to a more virulent strain. *J Virol* 2000;74:3537-42.
- ¹³ HIV vaccines – accelerating the development of preventative HIV vaccines for the world. Summary report and recommendations of an international ad hoc scientific committee. October 27-28, 1994. Le Val de Grace, Paris France. New York: The Rockefeller Foundation; 1994.
- ¹⁴ Baalen CA van, Pontesilli O, Huisman RC, Geretti AM, Klein MR, Wolf F de, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Rev- and Tat-specific cytotoxic T lymphocyte frequencies inversely correlate with rapid progression to AIDS. *J Gen Virol* 1997;78(Pt 8):1913-8.
- ¹⁵ Ogg GS, Kostense S, Klein MR, Jurriaans S, Hamann D, McMichael AJ, et al. Longitudinal phenotypic analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with disease progression. *J Virol* 1999;73:9153-60.
- ¹⁶ Pontesilli O, Klein MR, Kerkhof-Garde SR, Pakker NG, Wolf F de, Schuitemaker H, et al. Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte responses: a predominant gag-specific response is associated with nonprogressive infection. *J Infect Dis* 1998;178:1008-18.
- ¹⁷ Klein MR, Baalen CA van, Holwerda AM, Kerkhof Garde SR, Bende RJ, Keet IP, et al. Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med* 1995;181:1365-72.
- ¹⁸ Barouch DH, Santra S, Schmitz JE, Kuroda MJ, Fu TM, Wagner W, et al. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* 2000;290:486-92.
- ¹⁹ Goudsmit J, Bogaards JA, Jurriaans S, Wolf F de, Schuitemaker H, Miedema F, et al. Naturally HIV-1 infected people with lowest virus load have best prognosis, but in time lose control of viremia. *Lancet* [ter perse].
- ²⁰ IAVI scientific blueprint 2000: accelerating global efforts in AIDS vaccine development, July 2000 appendices. New York: IAVI; 2000.
- ²¹ AIDS vaccines for the world: preparing now to assure access. An IAVI blueprint, July 9, 2000.
- ²² What if we had an AIDS vaccine? *Lancet* 2000;356:85.
- ²³ Accelerating an AIDS vaccine for developing countries. Recommendations for the World Bank. Washington, D.C.: World Bank; 2000.
- ²⁴ Lukashov VV, Goudsmit J. Evolutionary relationships among parvoviruses: virus-host coevolution among autonomous primate parvoviruses and links between adeno-associated and avian parvoviruses. *J Virol* 2001;75:2729-40.

Aanvaard op 14 maart 2001

Medische vignetten

Van gen naar ziekte; retinoblastoom en het RBI-gen

H.SCHEFFER, S.M.IMHOF EN A.C.MOLL

DE ZIEKTE

Het retinoblastoom is een maligne tumor die ontstaat uit de nucleaire lagen van de retina. De diagnose wordt gewoonlijk gesteld vóór de leeftijd van 6 jaar wanneer strabisme of een verkleurde/witte reflex ('kattenog') wordt onderzocht. De klinische symptomen van retinoblastoom zijn leukocorie, strabisme of een rood oog. De diagnostiek vindt plaats door middel van funduscopie bij een kind onder algehele narcose, echografie en MRI. Bij funduscopie worden één of meerdere witgrijzige tumo-

ren aan één of beide ogen gezien. Het echografisch beeld is karakteristiek en vertoont een irregulier aspect met calcificaties. MRI geeft informatie over de extraoculaire doorgroei. De aandoening kan voorkomen als eenzijdige of als tweezijdige tumor en is in ongeveer 40% van de gevallen erfelijk (ongeveer 15% van de patiënten met de eenzijdige vorm; alle patiënten met de tweezijdige vorm).

HET GEN

Het retinoblastoom wordt veroorzaakt door mutaties in het gen voor retinoblastoom (*RBI*),^{1,3} dat gelegen is op chromosoom 13 in band q14.1-q14.2. Het gen bestaat uit 27 exonen en omvat ongeveer 200 kb genomisch DNA; het transcript codeert voor een eiwit van 928 aminozuren. Het ontstaan van de erfelijke en de niet-erfelijke vorm van retinoblastoom wordt verklaard vanuit het

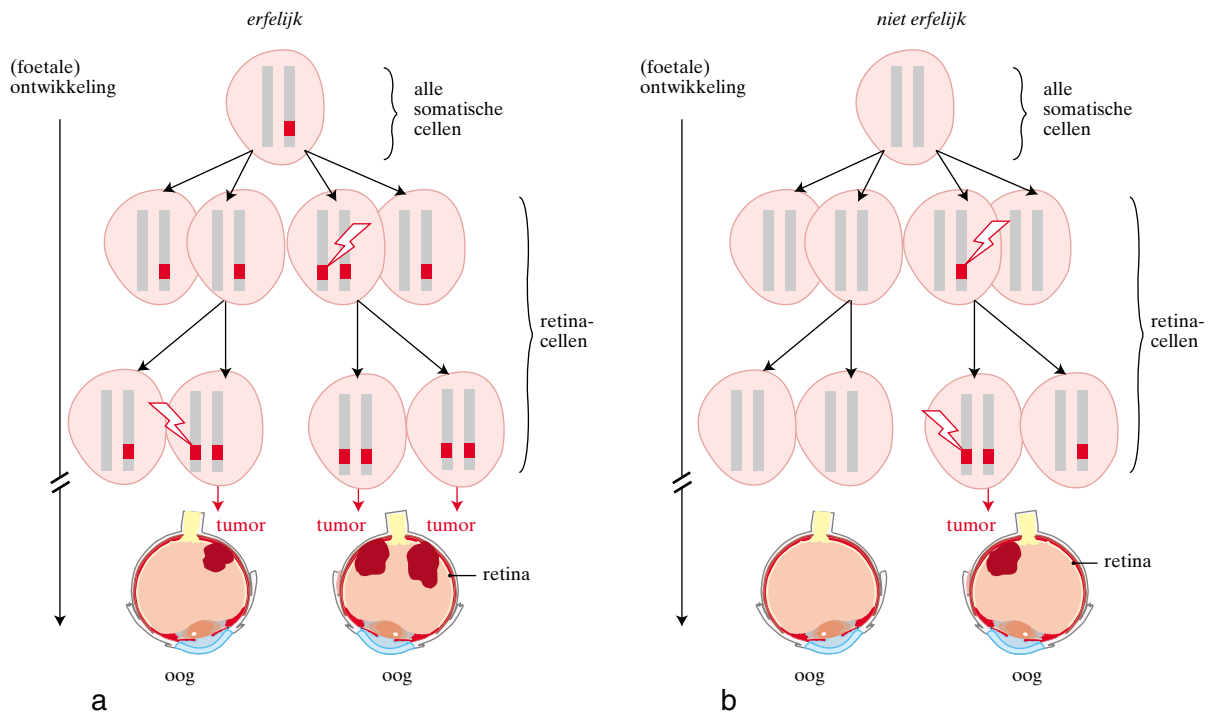
Rijksuniversiteit, afd. Medische Genetica, Antonius Deusinglaan 4, 9713 AW Groningen.

Dr.H.Scheffer, moleculair geneticus.

Academisch Ziekenhuis Vrije Universiteit, afd. Oogheelkunde, Amsterdam.

Mw.dr.S.M.Imhof en mw.dr.A.C.Moll, oogartsen.

Correspondentieadres: dr.H.Scheffer (h.scheffer@medgen.azg.nl).



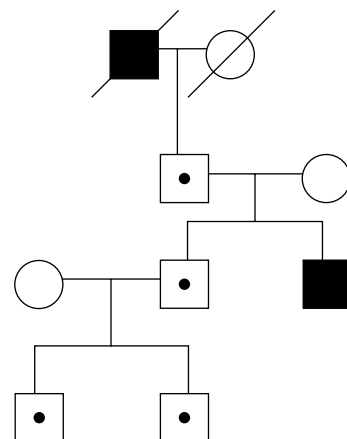
FIGUUR 1. 'Two-hit'-model volgens Knudson.⁴ Mutaties in beide *RB1*-allelen van een retinacel resulteren in retinoblastoom. Bij de erfelijke vorm van retinoblastoom (a) is de eerste mutatie ontstaan in de kiembaan van (meestal) vader of moeder, dus in de zaadcel- of eicelproducerende cellen. De tweede mutatie in het andere *RB1*-allel ontstaat op somatisch niveau in een retinacel. De erfelijke *RB1*-mutatie is in alle lichaamscellen aanwezig en kan derhalve als autosomaal dominant erfelijke predispositie worden doorgegeven aan het nageslacht. De niet-erfelijke vorm van retinoblastoom (b) wordt veroorzaakt door twee somatische mutaties in beide *RB1*-allelen van een retinacel.

'two-hit'-model, voor het eerst door Knudson geformuleerd.⁴ Het principe is weergegeven in figuur 1. Feitelijk is het familiair voorkomen van retinoblastoom het archetype van de erfelijke kankersyndromen, aan de hand waarvan Knudson deze two-hit-hypothese ontwikkelde. Retinoblastoom is ook de eerste tumor waarbij deze hypothese moleculair bevestigd kon worden.⁵ Ongeveer 95% van alle *RB1*-mutatiedragers krijgt de aandoening. Deze onvolledige penetrantie wordt veroorzaakt door het feit dat bij ongeveer 5% van de mutatiedragers er geen tweede, somatische mutatie optreedt in één van de retinacellen gedurende de embryonale ontwikkeling. Bij bepaalde families is er een nog veel lagere penetrantie door de aard van de voor retinoblastoom predisponerende *RB1*-mutatie (figuur 2). Draggers van een *RB1*-mutatie hebben een verhoogde kans op het krijgen van osteosaroom of wekedelensaroom als tweede primaire tumor. Op jonge leeftijd treden met name rhabdomyosaromen op, in de adolescentie (osteosarcomen en op latere leeftijd melanomen). Tevens kunnen pinealblastomen (trilateraal retinoblastoom) optreden tot de leeftijd van 4 jaar.

HET EIWIT

Het eiwitproduct p105-rb, ook 'pp110' genoemd, is een tumorsuppressor en werkt waarschijnlijk als regulator van andere genen. Het vormt een complex met het ade-

novirus-E1A-eiwit en het SV40-'large T-antigen', beide virale eiwitten met oncogene werking. Het kan bepaalde andere cellulaire eiwitten binden en functioneel moduleren, die kunnen concurreren met de adenovirus-



FIGUUR 2. Stamboom van een retinoblastoomfamilie met verlaagde penetrantie: (■) overleden man met retinoblastoom; (∅) overleden vrouw; (◻) man die drager is van een mutatie doordat met DNA-analyse de *RB1-R661W*-mutatie werd aangetoond, maar bij wie zich geen retinoblastoom heeft ontwikkeld; (○) vrouw; (■) man met retinoblastoom.

eiwitten E1A en T voor binding aan het 'pocket-domain' van p105-rb. Het eiwit bindt normaliter aan de E2F-familie van transcriptiefactoren. Tevens kan p105-rb eiwitten van het humaan papillomavirus binden, een virus dat een belangrijke rol speelt bij het ontstaan van cervixcarcinoom en van huidtumoren.

DE CEL

Het p105-rb-eiwit bevindt zich in de celkern. Het kan gedurende de celcyclus in twee vormen voorkomen: gefosforyleerd van de S-fase tot de M-fase en gedefosforyleerd in G1. Het eiwit speelt dus een centrale rol als controlepost van de celcyclus; het remt progressie van de G1-fase naar de S-fase. Ook de producten van andere genen, zoals *TP53* en *CDKN2A*, spelen hierbij een rol. Gedefosforyleerd rb-eiwit remt de celproliferatie en deze activiteit moet tijdelijk worden opgeheven door cyclische fosforylering om de celcyclus te voltooien. Het p105-rb/E2F-complex houdt de cellen in de G1-fase door actieve repressie van DNA-transcriptie. Een tekort aan rb-eiwit, hetzij door mutatie, hetzij doordat het wordt weggevangen door virale eiwitten, leidt tot progressie in de celcyclus, via activering van de transcriptie.

DE POPULATIE

Retinoblastoom komt voor bij ongeveer 1:20.000 levendgeborenen, ongeacht etnische afkomst, en vertegenwoordigt ongeveer 2% van alle maligniteiten bij kinderen.

DE DIAGNOSTIEK

Mutatieanalyse van het *RB1*-gen is belangrijk (a) om vast te stellen of er een erfelijke vorm bestaat (bij eenzijdig retinoblastoom), en (b) voor pre- of postnatale diagnostiek (om kinderen die 'at risk' zijn voor deze oogtumor te identificeren of juist om retinoblastoom bij familieleden uit te sluiten) bij alle patiënten en hun familieleden met een erfelijke vorm (onder wie alle patiënten met een tweezijdige en/of familiale vorm). Bij kinderen at risk kan periodieke controle helpen de tumor tijdig te ontdekken en te behandelen.

Er zijn meer dan 350 onafhankelijke mutaties bekend in de *RB1*-mutatiedatabase (<http://www.d-lohmann.de/Rb/mutations.html>).

Bij ruim 2% van de patiënten met erfelijk retinoblastoom is met chromosomenonderzoek op leukocyten een interstitiële deletie of andere chromosomale afwijking in chromosoom 13, band q14.1-q14.2, detecteerbaar. Bij ongeveer 8% is een dergelijke deletie alleen met DNA-onderzoek vast te stellen. De grote meerderheid van de *RB1*-mutaties zijn subtiele DNA-veranderingen ('nonsense'-, 'frame shift'- en de meeste 'splice-site'-mutaties), die leiden tot een verkort en dus niet-functioneel eiwit. Bij een klein deel (ongeveer 4%) van de patiënten

met een *RB1*-mutatie wordt een 'missense'-mutatie aangetoond, leidend tot een verminderd functioneren van het eiwit. Missensemutaties kunnen, evenals bepaalde splice-sitemutaties en mutaties in de regulerende sequenties van het *RB1*-gen, leiden tot verlaagde penetrantie. Het effect van dergelijke mutaties is dus niet bij elke drager pathogeen. Enkele relatief frequent voorkomende nonsensemutaties kunnen de novo ontstaan. Hierbij ontstaat een stopcodon uit bijvoorbeeld een codon voor arginine of glutamine.

Op basis van deze gegevens wordt in Groningen bij DNA-onderzoek naar retinoblastoom een scanning van de volledige coderende *RB1*-sequentie inclusief flankerende intronsequenties uitgevoerd. Tevens wordt onderzocht of een volledig *RB1*-allel gedeleteerd is. Met deze strategie wordt bij ongeveer 85% van de patiënten met tweezijdig en/of familiair retinoblastoom de pathogene mutatie aangetoond. In de overige gevallen zal de *RB1*-mutatie zich waarschijnlijk bevinden in een niet-routinematig onderzochte regelsequentie van het *RB1*-gen of ver in een intron. Het niet kunnen detecteren van de pathogene *RB1*-mutatie in DNA uit leukocyten bij een deel van de sporadische patiënten met de erfelijke vorm van retinoblastoom kan waarschijnlijk verklaard worden door somatisch mozaïcisme, waardoor niet in alle lichaamcellen de *RB1*-mutatie aanwezig is.

ABSTRACT

From gene to disease; retinoblastoma and the RB1 gene. – Retinoblastoma is caused by mutations in the *RB1* gene. The penetrance is 95%, as in approximately 5% of the mutation carriers, no second somatic mutation occurs in one of their retina cells during embryonic development. Molecular diagnosis is performed by a complete scanning of the *RB1* coding sequence which includes flanking intronic sequences. Approximately 85% of pathogenic mutations can be identified.

LITERATUUR

- 1 Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986;323:643-6.
- 2 Fung YK, Murphree AL, T'Ang A, Qian J, Hinrichs SH, Benedict WF. Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science* 1987;236:1657-61.
- 3 Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EY. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* 1987;235:1394-9.
- 4 Knudson jr AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:820-3.
- 5 Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, et al. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 1983;305:779-84.

Aanvaard op 26 januari 2001
