

99 Molekulární diagnostika Rb1 genu u dětí s retinoblastomem: od DNA k RNA diagnostice.

Kepák T.¹, Kratochvílová A.², Valášková I.², Zajíčková V., Autrata R.³, Gaillyová R.², Štěrbá J.¹

1) Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno

2) Oddělení lékařské genetiky FN Brno

3) Dětská oční klinika LF MU a FN Brno

Východiska

Retinoblastom (RB) je vzácný maligní nádor oka u dětí. Vyskytuje se s incidencí 1:18.000 – 30.000 živě narozených. RB je modelovým příkladem genetické dispozice ke vzniku nádorového onemocnění. Tumor supresorový gen Rb1 hraje v tumorigenезi retinoblastomu zásadní roli. Přítomnost alespoň jedné funkční alely genu vede k normální produkci funkčního proteinu pRB, její nepřítomnost pak ke vzniku nádorového bujení. Ztráta nebo inaktivace Rb1 genu vede ke vzniku a rozvoji onemocnění. Různé formy inaktivace (zejména mutace) Rb1 genu vedou k rozdílné penetranci a expresivitě genu, a tudíž rozdílným klinickým projevům onemocnění. **Přesná analýza a určení změn ve statusu Rb1 genu u dětí s RB proto zásadním způsobem ovlivňuje stratifikaci léčebně preventivních opatření zaměřených na pacienta s RB a jeho rodinu.**

Stávající léčebné postupy vedou ve vyspělých zemích k dlouhodobým remisím až u 99% nemocných. I když jsou léčebné výsledky stran přežití velmi dobré, stále přichází nemalá část dětí s RB o zrak, a to zejména těch, kteří mají dědičnou formu onemocnění. Čím je časnější záchyt onemocnění, tím je šance na záchranu zraku větší. Téměř polovina dětí s retinoblastomem má hereditární formu onemocnění způsobenou mutací (případně jinou inaktivací) tumor supresorového genu Rb1 na úrovni germinální buňky. Pouze 6% dětí má však pozitivní rodinnou anamnézu. U ostatních vzniká mutace na úrovni germinální buňky de novo. Penetrance hereditární formy onemocnění je přibližně 80%. U nehereditární (sporadické) formy onemocnění pak nacházíme mutace/inaktivace Rb1 genu pouze na úrovni somatických buněk sítnice. Mutace Rb1 genu je diagnostikovatelná u 95% dětí s bilaterální a 15% dětí s unilaterální formou onemocnění. Rozlišení hereditární a nehereditární formy onemocnění v době záchytu onemocnění má zásadní vliv na (i) způsob léčby a prognózu nemocného dítěte; (ii) genetické poradenství rodině s rozhodnutím o nutnosti pravidelných oftalmologických vyšetření dalších členů rodiny. **Na přítomnost germinální mutace jsou dnes testovány všechny děti s RB.**

Jednotlivé techniky testování změn ve statusu Rb1 genu se podstatně liší v senzitivitě. Konvenční cytogenetika detekuje 8% známých změn ve statusu Rb1 genu (velké delece, translokace), FISH cca 10% (velké delece, translokace, je-li k dispozici vhodná sonda), Southern blot hybridizace 16% (delece, inserce, přestavby), PCR s následnou sekvenací detekuje 75% známých mutací (delece, inserce, krátké mutace, substituce bází), specifická metylační PCR rozliší 6% onkogenních mutací v tumoru (hypermetylace v promotoru genu). Dnes je známo více než 500 odlišných somatických nebo germinálních mutací. Molekulárně genetická analýza je schopna detekovat většinu z nich.

Metody a výsledky

Ve FN Brno jsme v roce 2006 rozpracovali metodiku mutační analýzy statusu genu Rb1 prostřednictvím DNA analýzy periferní krve. Metodika kombinuje PCR amplifikující všech 27 exonů genu RB1 s následnou sekvenací analýzou amplifikovaných fragmentů. Patognomickou mutaci Rb1 genu jsme identifikovali v periferní krvi u 6 pacientů s hereditární formou RB. Sekvenace kódující oblasti genu je však velmi nákladná a pracná. Proto jsme v rámci urychlení a zefektivnění metodiky zavedli více-
stupňovou metodiku: (i) nejprve analýzu RNA izolované z periferní krve, v případě nálezu mutace doplněné (ii) DNA analýzou a v případě negativy (iii) MLPA analýzou. K dalšímu zvýšení záchytu mutace plánujeme zavedení analýzy methylačního statusu promotoru. Mimoto to bychom chtěli realizovat populační studii k verifikaci kauzality nalezených mutací Rb1 genu, ideálně v rámci spolupráce s dalšími centry dětské onkologie.

Literatura

1. Abramson DH, Scheffler AC.: Update on retinoblastoma. 2004 Dec;24(6):828-48.
2. Goddard AG, Kingston JE, Hungerford JL.: Delay in diagnosis of retinoblastoma: risk factors and treatment outcome 83(12):1320-3, 1999.
3. Lohmann DR: Rb1 gene mutations in retinoblastoma. Hum Mutat, 14, 283-288, 1999.
4. Lohmann D: Best practice guidelines for molecular analysis of retinoblastoma. European Molecular Genetics Quality Network. EMQN, 2002.
5. Nichols KE, Houseknecht MD, Godmilow L, Bunin G, Shields C, Meadows A, Ganguly A.: Sensitive multistep clinical molecular screening of 180 unrelated individuals with retinoblastoma detects 36 novel mutations in the RB1 gene. 2005 Jun;25(6):566-74.
6. Shields CL, Shields JA.: Diagnosis and management of retinoblastoma. 2004 Sep-Oct;11(5):317-27.

Práce je podpořena grantem IGF FN Brno č. 8/06.