



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SIENA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Specializzazione in Genetica Medica

Indirizzo Clinico

**RETINOBLASTOMA:
DALLA CLINICA ALLA RICERCA**

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa

ALESSANDRA RENIERI

Tesi di Specializzazione di:

Dott.ssa ANNABELLA MAROZZA

Anno Accademico 2010-2011

*A tutte le famiglie
incontrate in questi anni*

INDICE

| | | |
|--|------|----|
| 1. Esperienza clinica personale | pag. | 1 |
| 1.1. Consulenze preconcezionali | pag. | 4 |
| 1.2 Consulenze prenatali | pag. | 6 |
| 1.3 Consulenze postnatali: pazienti con deficit intellettivo isolato o sindromico | pag. | 8 |
| 1.4 Consulenze postnatali: altre patologie | pag. | 12 |
| 1.5 Consulenze oncologiche | pag. | 14 |
| | | |
| 2. Retinoblastoma | pag. | 17 |
| 2.1 Panoramica storica | pag. | 20 |
| 2.2 Genetica del Retinoblastoma | pag. | 22 |
| 2.3 Penetranza incompleta ed espressività variabile | pag. | 23 |
| 2.4 Quadro clinico | pag. | 24 |
| 2.5 Aspetti oftalmoscopici e istologici | pag. | 27 |
| 2.6 Aspetti terapeutici | pag. | 30 |
| 2.7 Gene <i>RBI</i> e proteina pRB | pag. | 34 |
| 2.8 Spettro delle mutazioni nel gene <i>RBI</i> | pag. | 37 |
| 2.9 Sindrome da microdelezione 13q14 | pag. | 39 |
| | | |
| 3. Materiali e Metodi | pag. | 42 |
| 3.1 Analisi di mutazioni puntiformi | pag. | 44 |
| 3.11 PCR | pag. | 44 |
| 3.12 DHPLC | pag. | 45 |
| 3.13 Sequenziamento | pag. | 48 |
| 3.2 Analisi di grandi riarrangiamenti | pag. | 49 |
| 3.21 MLPA | pag. | 49 |
| 3.22 Array-CGH | pag. | 51 |
| | | |
| 4. Consulenza genetica nel Retinoblastoma: esperienza clinica personale | pag. | 54 |
| 4.1 Caso 1 | pag. | 59 |
| 4.2 Caso 2 | pag. | 61 |
| 4.3 Caso 3 | pag. | 63 |
| 4.4 Caso 4 | pag. | 65 |

| | | |
|---|---------|----------|
| 4.5 | Caso 5 | pag. 67 |
| 4.6 | Caso 6 | pag. 69 |
| 4.7 | Caso 7 | pag. 71 |
| 4.8 | Caso 8 | pag. 73 |
| 4.9 | Caso 9 | pag. 75 |
| 4.10 | Caso 10 | pag. 77 |
| 5. Attività di ricerca | | pag. 79 |
| 6. Discussione | | pag. 101 |
| 7. Bibliografia | | pag. 109 |
| Appendice 1 | | pag. 104 |
| <p>Sampieri K, Amenduni M, Papa FT, Katzaki E, Mencarelli MA, <u>Marozza A</u>, Epistolato MC, Toti P, Lazzi S, Bruttini M, De Filippis R, De Francesco S, Longo I, Meloni I, Mari F, Acquaviva A, Hadjistilianou T, Renieri A, Francesca A. Array comparative genomic hybridization in retinoma and retinoblastoma tissues. <i>Cancer Sci.</i> 2009;100(3)465-71.</p> | | |
| Appendice 2 | | pag. 112 |
| <p>Livide G, Epistolato MC, Amenduni M, Disciglio V, <u>Marozza A</u>, Mencarelli MA, Toti P, Lazzi S, Hadjistilianou T, De Francesco S, D'Ambrosio A, Renieri A, Ariani F. Epigenetic and Copy Number Variation Analysis in Retinoblastoma by MS-MLPA. <i>Pathol. Oncol. Res.</i> January 2012.</p> | | |
| Appendice 3 | | pag. 123 |
| <p>Epistolato MC, Disciglio V, Livide G, Berchiolla P, Mencarelli MA, <u>Marozza A</u>, Amenduni M, Hadjistilianou T, De Francesco S, Acquaviva A, Toti P, Cetta F, Ariani F, De Marchi M, Renieri A, Giachino D. p53 Arg72Pro and MDM2 309 SNPs in hereditary retinoblastoma. <i>J Hum Genet.</i> 2011;56:685-6.</p> | | |

1. ESPERIENZA CLINICA PERSONALE

Durante la frequenza della Scuola di Specializzazione in Genetica Medica presso la U.O.C Genetica Medica del Policlinico Universitario S. Maria alle Scotte di Siena, diretta dalla Prof.ssa Alessandra Renieri, mi sono prevalentemente dedicata alla consulenza genetica ed ho attivamente partecipato a 920 consulenze genetiche.

La consulenza genetica è il processo comunicativo, guidato dal genetista clinico, attraverso il quale i pazienti affetti da una malattia geneticamente determinata, o i loro familiari, ricevono informazioni relative alle *caratteristiche* della malattia stessa, alle *modalità di trasmissione*, al rischio di *ricorrenza* e alle possibili *terapie*, incluse le opzioni riproduttive, che sono pertinenti alla loro condizione. Il processo conoscitivo ed informativo della consulenza genetica è volto a far comprendere la storia medica personale e familiare del consultando, inclusa la diagnosi, la prognosi, le modalità di assistenza e terapia, ed il rischio di ricorrenza nei familiari, al fine di organizzare azioni preventive e raggiungere una più cosciente pianificazione familiare. La consulenza genetica, che dunque non è rivolta solo al probando, ma all'intera famiglia, non è mai direttiva, non potendo e non dovendo influenzare le possibili decisioni del probando o della famiglia. Le sessioni di acquisizione dei dati, comunicazione dei risultati e valutazione del rischio globale dovrebbero porre i richiedenti nella migliore condizione per effettuare scelte consapevoli.

La diagnosi precisa della condizione in esame costituisce premessa fondamentale e necessaria per poter effettuare la migliore consulenza genetica. In alcuni casi la diagnosi può essere esclusivamente clinica, ovvero basata sulla valutazione del genetista clinico insieme ai dati derivati da indagini strumentali, in assenza di indagini genetiche a disposizione per la conferma. In altri casi la diagnosi è raggiungibile tramite l'impiego di test genetici. A volte diagnosi che precedentemente erano solo cliniche, grazie all'avanzare delle metodiche di laboratorio, hanno la possibilità di essere confermate da indagini genetiche.

Talvolta, la consulenza genetica si articola in più sedute e sessioni, generalmente una pre-test ed una post-test genetico. Durante la prima valutazione, il consulente genetista valuta la motivazione della richiesta di consulenza, raccoglie l'anamnesi familiare del probando tramite la compilazione dell'albero genealogico in almeno tre generazioni e registra l'anamnesi personale del probando, valutando cartelle cliniche e documentazioni sanitarie. In alcuni tipi di consulenze, soprattutto quelle dismorfologiche, è fondamentale l'esame obiettivo e la raccolta di materiale fotografico

del probando a diverse età. Al termine della prima consulenza genetica possono essere richieste ulteriori visite specialistiche nel probando e nei familiari ed inoltre vengono spiegati gli eventuali test genetici disponibili per la condizione in esame. Prima dell'effettuazione di un test genetico, è necessario che vengano spiegati i limiti e le conseguenze derivanti dagli esami programmati e che venga acquisito un consenso informato scritto da parte del probando o dagli eventuali genitori/tutori. Dalle prime valutazioni inoltre, verrà determinato il rischio di ricorrenza, ossia la possibilità che una patologia genetica presente nel probando si verifichi nuovamente in altri membri della famiglia. Il calcolo del rischio si basa sulla modalità di trasmissione della malattia, e quindi sulla posizione del probando all'interno della famiglia, sui dati strumentali e di laboratorio disponibili. Una migliore definizione del rischio si ottiene alla conclusione del test genetico avviato. In alcune situazioni, soprattutto quando il risultato dell'indagine genetica potrebbe avere un significativo impatto emotivo sul consultando, la consegna del referto avviene in presenza di un consulente psicologo. Al termine di ogni sessione è importante chiarire dubbi o concetti non compresi da parte del consultando.

I motivi principali per cui è indicata una consulenza genetica sono:

- storia di infertilità di coppia ed aborti ripetuti
- gravidanze a rischio per cromosomopatie e/o malattie monogeniche
- esposizione a teratogeni in gravidanza
- difetti congeniti e/o deficit intellettivo
- malattia ereditaria nota o sospetta in un paziente o in una famiglia
- test genetici predittivi di malattia ad insorgenza nell'adulto
- storia familiare di cancro con esordio precoce

1.1 CONSULENZE PRECONCEZIONALI

Ho partecipato attivamente a consulenze genetiche preconcezionali (Tabella 1), rivolte a coppie infertili, in attesa di sottoporsi a tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA), o con aborti spontanei ricorrenti. Lo scopo di tali consulenze è quello di valutare se alla base dell'infertilità o della poliabortività di coppia vi può essere una base genetica ed in tal caso procedere con indagini genetiche specifiche. In particolare, nei protocolli di PMA viene raccomandata l'esecuzione di analisi del cariotipo, ricerca di microdelezioni del cromosoma Y e ricerca di mutazioni a carico del gene *CFTR*, responsabile di forme classiche e attenuate di fibrosi cistica.

In altri casi le consulenze hanno riguardato coppie con patologie genetiche che segregano nella famiglia o coppie di consanguinei per una migliore definizione dei rischi di ricorrenza di patologie genetiche.

Tabella 1. Consulenze preconcezionali.

| TIPOLOGIA | NUMERO |
|---|---------------|
| Infertilità di coppia e PMA | 53 |
| Azoospermia | 5 |
| Poliabortività | 30 |
| Precedente feto malformato | 2 |
| Precedente figlio con anomalia cromosomica | 1 |
| Riarrangiamento cromosomico in un partner | 1 |
| Rischio di ricorrenza per Beta-Talassemia | 3 |
| Rischio di ricorrenza per Fenilchetonuria | 1 |
| Rischio di ricorrenza per Carcinoma Mammario Ereditario | 1 |
| Rischio di ricorrenza per Retinoblastoma | 2 |
| Rischio di ricorrenza per Neurofibromatosi 2 | 1 |
| TOTALE | 100 |

1.2 CONSULENZE PRENATALI

Ho partecipato attivamente a consulenze genetiche prenatali (Tabella 2), rivolte a coppie a rischio di malattia genetica (cromosomica o monogenica), al fine di acquisire informazioni riguardanti il rischio di ricorrenza della condizione nella gravidanza in corso per una scelta consapevole, relativamente all'esito della gravidanza stessa (prosecuzione od interruzione). È stata valutata con la coppia la possibilità di procedere con metodiche di diagnosi prenatale non invasiva (ecografia, test di screening) e/o invasiva (villocentesi/amniocentesi), considerando rischi, limiti e benefici di entrambe. In particolare per la diagnosi prenatale invasiva devono essere soddisfatte due condizioni: 1) la malattia che si intende diagnosticare deve essere identificabile in utero mediante un test specifico; 2) devono sussistere fattori di rischio genetico per la gravidanza di entità tale da giustificare un test prenatale invasivo.

L'indicazione principale per la consulenza genetica prenatale è rappresentata dall'età materna avanzata (età al parto pari o superiore a 35 anni), che correla con un rischio aumentato di cromosomopatia nella prole. Altre indicazioni sono rappresentate da:

- precedente figlio con patologia cromosomica;
- genitore portatore di un riarrangiamento cromosomico bilanciato;
- genitori portatori di una mutazione responsabile di una malattia autosomica recessiva;
- genitore portatore di una mutazione responsabile di una malattia autosomica dominante;
- madre portatrice di una mutazione responsabile di una malattia X-legata;
- precedente figlio con difetto di chiusura del tubo neurale;
- malformazioni ecografiche fetali e/o ritardo di crescita intrauterino (IUGR);
- aumento del rischio di cromosomopatia fetale ($>1:250$), per positività al test di screening.

Tabella 2. Consulenze prenatali.

| TIPOLOGIA | NUMERO |
|---|---------------|
| EMA | 282 |
| Test di screening positivo | 9 |
| Malformazione fetale ecografica | 5 |
| Feto con anomalia cromosomica | 3 |
| Teratogeni | 5 |
| Precedente figlio con cromosomopatia | 4 |
| Precedente figlio con malformazioni | 4 |
| Precedente figlia con Sindrome di Rett | 1 |
| Precedente figlio con Sindrome di Cornelia De Lange | 1 |
| Genitore portatore di riarrangiamento cromosomico | 5 |
| Rischio di ricorrenza per Retinoblastoma | 1 |
| Rischio di ricorrenza per Sindrome dell'X-fragile | 1 |
| Rischio di ricorrenza per Beta-talassemia | 3 |
| Rischio di ricorrenza per Fibrosi Cistica | 4 |
| Rischio di ricorrenza per Sindrome di Alport X-legata | 1 |
| Rischio di ricorrenza per Sclerosi Tuberosa | 1 |
| Rischio di ricorrenza per Malattia di Gaucher | 1 |
| Rischio di ricorrenza per Osteogenesi Imperfetta | 1 |
| Rischio di ricorrenza per Piebaldismo | 1 |
| Rischio di ricorrenza per Emofilia A | 1 |
| Ovodonazione | 1 |
| TOTALE | 335 |

1.3 CONSULENZE POSTNATALI: PAZIENTI CON DEFICT INTELLETTIVO ISOLATO E SINDROMICO

Ho partecipato attivamente a consulenze genetiche che hanno riguardato l'inquadramento diagnostico di pazienti in età pediatrica, con un quadro clinico caratterizzato da deficit intellettivo associato in misura variabile ad altre anomalie congenite maggiori/minori (Tabella 3). Un'accurata raccolta dei dati anamnestici e un'attenta valutazione clinica consentono di riconoscere le sindromi genetiche note e, ove possibile di avviare test genetici specifici, per la conferma della diagnosi clinica. L'inquadramento eziologico consente una migliore definizione del rischio di ricorrenza della patologia nella famiglia. Inoltre, sebbene nella maggior parte dei casi la diagnosi genetica non influenza la terapia, può modificare il follow-up pediatrico.

Tra le sindromi genetiche note, mi sono occupata di pazienti affette da forme classiche e varianti di sindrome di Rett¹, per cui l'U.O.C. di Genetica Medica di Siena è centro di riferimento nazionale ed internazionale.

Nei casi nei quali non è stato possibile porre uno specifico sospetto diagnostico, l'impiego dell'analisi di array-CGH ha consentito di individuare sindromi emergenti da microdelezione/microduplicazione²⁻³, riarrangiamenti complessi e regioni di suscettibilità, che possono intervenire come cofattori nello sviluppo del quadro clinico.

Tabella 3. Consulenze in pazienti con deficit intellettivo isolato o sindromico.

| TIPOLOGIA | NUMERO |
|--|---------------|
| Sindrome di Rett | 10 |
| Sindrome di Noonan | 1 |
| Sindrome dell’X-Fragile | 1 |
| Sindrome di Kabuki | 1 |
| Sindrome di Beckwith-Wiedemann | 1 |
| Metilmalonicoaciduria con omocistinuria | 1 |
| Sindrome di Down | 1 |
| Sindrome di Klinefelter | 1 |
| Sindrome di Turner | 2 |
| Trisomia 18 a mosaico | 1 |
| Sindrome di Pallister-Killian | 1 |
| Sindromi da microdelezioni/microduplicazioni | 14 |
| Riarrangiamenti cromosomici complessi | 4 |
| Regioni genomiche di suscettibilità | 6 |
| Altre forme di deficit intellettivo isolato o sindromico | 248 |
| TOTALE | 293 |

1.4 CONSULENZE POSTNATALI: ALTRE PATOLOGIE

Ho partecipato attivamente a consulenze genetiche rivolte a persone affette da patologie a prevalente interessamento neurologico e/o muscolare⁴ o di altri organi e apparati (scheletrico, oculare, cardiaco, polmonare, renale o cutaneo), inviate dagli specialisti di riferimento (Tabella 4). Tali consulenze hanno riguardato non solo i soggetti affetti, ma, come nel caso della corea di Huntington, anche familiari asintomatici. Per molte malattie neurodegenerative, come la corea di Huntington, non esiste una terapia specifica e nel caso venga fatta diagnosi non vi è modo di influenzare la storia naturale della patologia. Pertanto nei familiari asintomatici, in considerazione delle implicazioni psicologiche e legali, oltre che mediche, che accompagnano la diagnosi presintomatica delle malattie ereditarie, è stato adottato un apposito protocollo, che prevede l'effettuazione di un minimo di quattro incontri, in presenza del genetista e dello psicologo. Durante tali incontri l'individuo, con l'aiuto degli specialisti riflette sui benefici e sui rischi che derivano dall'esito dell'indagine genetica, in particolare le ripercussioni sulle scelte riproduttive e lavorative. Al fine di garantire l'autonomia di scelta individuale, vi è un generale accordo nell'eseguire i test predittivi, solo nei soggetti maggiorenni.

Tabella 4. Consulenze postnatali: altre patologie.

| TIPOLOGIA | NUMERO |
|--------------------------------------|---------------|
| Malattie neurologiche | 29 |
| Polineuropatie ereditarie (HNPP/CMT) | 9 |
| Corea di Huntington | 8 |
| Malattia di Parkinson | 5 |
| Morbo di Alzheimer | 3 |
| Atassia di Friedreich | 1 |
| Demenza Fronto-Temporale | 1 |
| Paraparesi spastica | 1 |
| Emicrania emiplegica familiare | 1 |
| Malattie muscolari | 13 |
| Distrofie dei cingoli | 5 |
| FSHD | 3 |
| Distrofia miotonica | 2 |
| Distrofinopatia | 1 |
| Calpainopatia | 1 |
| Titinopatia | 1 |
| Malattie oculari | 9 |
| Coloboma oculare | 2 |
| Microftalmo | 1 |
| Degenerazione tapeto-retinica | 1 |
| Subatrofia ottica | 1 |
| Patterned dystrophy | 1 |
| Malattia di Best | 1 |
| Dermoide oculare | 1 |
| Retinoschisi X-legata | 1 |

| | |
|---------------------------------|-----------|
| Malattie dermatologiche | 11 |
| Ittiosi | 3 |
| Orticaria da freddo familiare | 1 |
| Acrocheratosi verruciforme | 1 |
| Malattia di Darier | 1 |
| Sindrome di Huriez | 1 |
| Lipodistrofia | 1 |
| Alopecia | 2 |
| Depigmentazione dei capelli | 1 |
| | |
| Malattie scheletriche | 7 |
| Bassa statura | 4 |
| Arto ipoplastico | 1 |
| Macrodatilia | 1 |
| Osteogenesi imperfetta | 1 |
| | |
| Malattie cardiovascolari | 7 |
| Dissecazione arteriosa | 3 |
| Trombosi arteriosa neonatale | 1 |
| Cardiomiopatia dilatativa | 1 |
| DIA | 1 |
| Sindrome di Brugada | 1 |
| | |
| Malattie respiratorie | 12 |
| Fibrosi polmonare familiare | 8 |
| Bronchiectasie multiple | 2 |
| Ipoplasi polmonare | 1 |
| Fibrosi cistica | 1 |
| | |
| Malattie renali | 4 |
| Sindrome di Alport | 3 |
| Rene policistico | 1 |

| | |
|-------------------------------|------------|
| Altre | 18 |
| Sindrome di Holt-Oram | 1 |
| Emocromatosi | 6 |
| Febbri ricorrenti | 3 |
| Ipermobilità articolare | 2 |
| Menarca tardivo | 1 |
| Obesità | 1 |
| Ipoacusia neurosensoriale | 1 |
| Sindrome di Moyamoya | 1 |
| Inclusione dentaria familiare | 1 |
| Asimmetria mammaria | 1 |
| <hr/> | |
| TOTALE | 112 |
| <hr/> | |

1.5 CONSULENZE ONCOLOGICHE

Ho partecipato attivamente a consulenze oncologiche (Tabella 5), rivolte sia ad individui affetti da patologia tumorale che ad individui con storia familiare positiva per specifici tumori ereditari, ai quali vengono fornite informazioni riguardo alle possibilità diagnostiche, preventive e terapeutiche e/o il rischio di ricorrenza della patologia nella prole. Se la storia personale e familiare del paziente indirizza verso una specifica sindrome tumorale, si propone l'esecuzione del test e l'individuazione delle misure di prevenzione più indicate. Nel corso della consulenza è importante che venga fornita una corretta informazione sulla storia naturale della patologia e sui vantaggi e gli svantaggi degli strumenti disponibili per la riduzione del rischio, al fine di aiutare il paziente ad effettuare le scelte più appropriate al suo caso. Sulla base della storia personale e familiare o del riscontro di una mutazione in uno dei geni responsabili di sindrome tumorale familiare, i pazienti vengono inseriti in categorie a basso, moderato, o alto rischio di sviluppare tumori. Ai pazienti con rischio moderato o alto vengono proposti screening specifici che consentono una diagnosi precoce ed una migliore prognosi. Particolare attenzione deve essere posta ai test predittivi, rivolti ai familiari asintomatici di pazienti affetti da una sindrome tumorale ereditaria. Questo tipo di consulenze sono svolte in presenza di un collega psicologo, affinché il paziente possa prendere le sue decisioni relativamente all'iter in modo consapevole, indipendente e volontario. Per le chiare questioni di natura, etica, medico-legale e psicologica che entrano in gioco nella consulenza genetica oncologica, nel caso di test predittivi, a meno che la mutazione non predisponga a tumori che si sviluppano nell'infanzia o nell'adolescenza, vi è un generale accordo sull'eseguire tali esami in soggetti maggiorenni, per garantire l'autonomia di scelta individuale.

Durante gli anni di specializzazione mi sono soprattutto occupata di consulenze oncologiche per retinoblastoma, per cui l'U.O.C. di Genetica Medica di Siena è centro di riferimento nazionale ed internazionale. In particolare, ho seguito bambini e adulti con forme familiari o sporadiche di retinoblastoma, nella definizione del rischio di ricorrenza e nella programmazione di una eventuale diagnosi prenatale. Mi sono inoltre occupata di alcuni bambini con sindrome da microdelezione 13q14, nella quale oltre al retinoblastoma sono presenti ritardo psicomotorio di grado variabile e caratteristiche e fisiche e facciali peculiari. In tali pazienti, l'analisi di array-CGH si è rivelata

un'importante ausilio per la definizione dell'estensione e la caratterizzazione dei punti di rottura della delezione.

In questa tesi, ho pertanto deciso di trattare questa specifica patologia, descrivendo sia l'attività clinica che di ricerca svolta durante gli anni di specializzazione.

Tabella 5. Consulenze oncologiche.

| TIPOLOGIA | NUMERO |
|---|---------------|
| Retinoblastoma | 60 |
| Sindromi tumorali familiari con carcinoma del colon | |
| Sindrome di Lynch | 6 |
| Poliposi adenomatosa del colon | 1 |
| Sindrome di Peutz-Jeghers | 1 |
| Sindrome tumorale familiare di mammella e ovaio | 5 |
| Neurofibromatosi | 2 |
| Lipomatosi | 2 |
| Sindrome di Wilms | 1 |
| Casi isolati di tumori multipli | 1 |
| Familiarità per tumori | 1 |
| TOTALE | 80 |

2. RETINOBLASTOMA

Il retinoblastoma (RB, OMIM#180200) è il tumore maligno intraoculare più comune in età pediatrica, con una incidenza di 1/15000-20000^{5, 6} nati vivi e rappresenta il 3-4% di tutti i tumori maligni in età pediatrica. Il retinoblastoma si manifesta con uguale frequenza in entrambi i sessi e in tutti i gruppi etnici, con prevalenza per la razza bianca. Il tumore, il cui più frequente segno clinico di presentazione è la leucocoria (riflesso pupillare bianco), può svilupparsi in un solo occhio (unilaterale) o in entrambi gli occhi (bilaterale) e può presentarsi come focolaio singolo (unifocale) o come più focolai (multifocale). Il tumore origina dai retinoblasti, cellule retiniche dell'epitelio neurale immaturo. L'inattivazione di entrambi gli alleli del gene *RBI* (in accordo con la teoria dei "due colpi" di Knudson, 1971)⁷, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 13 (13q14.2), rappresenta il prerequisito per l'insorgenza del tumore.

In presenza di sospetto retinoblastoma, la diagnosi clinica è, usualmente, stabilita attraverso un esame oftalmologico completo, eseguito in narcosi (esame esterno dell'occhio, biomicroscopia, oftalmoscopia binoculare indiretta con indentazione sclerale, che consente l'individuazione anche di piccoli focolai tumorali in estrema periferia retinica, tonometria, disegno del fundus, documentazione fotografica mediante fundus camera digitale e, in casi selezionati, fluroangiografia), mediante il quale viene solitamente messa in evidenza una massa di colorito biancastro e volume variabile. Per supportare la diagnosi e stadiare il tumore vengono inoltre effettuati l'ecografia A e B scan e la MRI delle orbite e dell'encefalo. L'ecografia orbitaria è molto utile per definire il tipo di sviluppo e l'estensione del tumore, consentendo di rilevare focolai di piccole dimensioni e anche in presenza di mezzo ottico opaco, per l'esistenza di emorragie e "seeding" vitreale; inoltre, può identificare le calcificazioni all'interno del tumore, sebbene presenti una sensibilità inferiore rispetto alla TC, che, tuttavia, ha il limite di non riuscire a differenziare il tumore dall'essudato sottoretinico. La MRI, eseguita con mezzo di contrasto, è molto più sensibile rispetto alla TC nel rilevare un coinvolgimento anche lieve del nervo ottico, ed è anche in grado di dimostrare il coinvolgimento dell'encefalo, dello spazio subaracnoideale e dell'orbita, nelle forme ad estensione extraoculare, e quello della ghiandola pineale, nei casi di "retinoblastoma trilaterale". Nei casi di tumore intraoculare avanzato, con evidenza di interessamento extraoculare viene infine eseguita la puntura lombare, con analisi del liquido cerebrospinale, e l'aspirato del midollo osseo.

Negli anni, l'introduzione di nuove terapie ha consentito non solo di migliorare la prognosi *quoad vitam* dei pazienti ma anche la qualità di vita, consentendo spesso di preservare il bulbo oculare e di mantenere almeno in parte la capacità visiva.

L'analisi molecolare per la ricerca di mutazioni puntiformi e di delezioni a carico del gene *RBI*, viene solitamente eseguita sul DNA estratto dai linfociti del sangue periferico ed è indicata in tutti i pazienti affetti da retinoblastoma, dal momento che anche in un 15% dei casi unilaterali unifocali è presente una mutazione costitutiva del gene *RBI*. Con le tecniche ad oggi disponibili è possibile rilevare una mutazione germinale nella maggior parte degli individui con una predisposizione ereditaria al tumore. È molto importante che l'effettuazione del test molecolare sia preceduta e seguita dalla consulenza genetica, al fine di informare i pazienti riguardo alla modalità di trasmissione della patologia e al rischio di ricorrenza e relativamente ai benefici e ai limiti del test genetico. L'identificazione della mutazione germinale nell'individuo affetto consente di definire l'esatto rischio di ricorrenza, identificare i familiari a rischio ed offrire un test prenatale. In particolare, la diagnosi prenatale viene eseguita sul DNA fetale estratto da villi coriali, tra la 11[^]-12[^] settimana di gestazione, o da amniociti, tra la 15[^]-18[^] settimana di gestazione. In alcuni centri esteri, viene inoltre offerta la possibilità della diagnosi preimpianto, eseguita sullo zigote allo stadio di blastocisti.

2.1 PANORAMICA STORICA

La prima descrizione del tumore risale al 1597, ad opera di Pawius, un medico tedesco. Inizialmente, non vi era un consenso riguardo alla cellula di origine del tumore, che nel 1809 James Wardop ha descritto con il termine di “fungus haematodes”. Solo nel 1896 Collins ha notato la somiglianza con la retina embrionale e nel 1900, in seguito alla dimostrazione da parte di Verhoeff che il tumore deriva dai retinoblasti, la Società Oftalmologica Americana ha adottato il termine Retinoblastoma⁸.

Sin dall’inizio del XIX secolo è stata riconosciuta l’importanza dei fattori ereditari nell’eziologia del retinoblastoma e a partire dal 1821 è stata notata l’aggregazione familiare di tale tumore. Con il tempo, grazie al miglioramento delle terapie, un maggior numero di individui affetti ha raggiunto l’età adulta e ha generato figli affetti da retinoblastoma, mettendo così in evidenza una modalità di trasmissione autosomica dominante. Inizialmente, tutti i casi sono stati considerati ereditari, ma in seguito è stato visto che in una quota significativa di pazienti con retinoblastoma sporadico, l’eziologia non è ereditaria⁹.

Nel 1971, Alfred Knudson, confrontando l’età alla diagnosi dei casi bilaterali ed unilaterali, ha elaborato la teoria dei “two hits” per spiegare l’origine del retinoblastoma. In particolare, il suo studio ha indicato che l’insorgenza del tumore è collegata con il succedersi di due eventi mutazionali “two hits”: l’esordio è più precoce nei casi ereditari per la presenza di una prima mutazione (M1) a livello germinale e pertanto la necessità di acquisire una sola mutazione a livello delle cellule retiniche, e più tardiva nei casi non ereditari per la comparsa di entrambe le mutazioni (M1 e M2) a livello della singola cellula retinica. Successivamente, Comings ha suggerito che questi due eventi mutazionali potessero essere associati alla perdita di entrambi gli alleli di un gene oncosoppressore¹⁰.

Il locus associato al retinoblastoma è stato mappato sul cromosoma 13 in posizione q14 mediante studi di linkage^{11, 12} ed il riscontro di delezioni coinvolgenti tale regione¹³. Nel 1983, l’osservazione che l’allele normale era spesso perso (M2) e che il locus mutato associato al retinoblastoma era duplicato in molti retinoblastomi ha rappresentato la prova che il gene *RBI* è un gene oncosoppressore^{14, 15}. La perdita di eterozigotà è evidente nel 60% dei retinoblastomi ereditari e non ereditari e si

manifesta mediante non disgiunzione e duplicazione dell'intero cromosoma mutato o ricombinazione mitotica¹⁶.

In seguito, Dryja e collaboratori hanno localizzato un clone a livello del locus associato al retinoblastoma, totalmente deleta in un tessuto tumorale. Questo clone è stato poi usato per isolare un cDNA che ha mostrato conservazione della sequenza tra specie diverse¹⁷. Il successivo riscontro di mutazioni non solo somatiche, ma anche costituzionali nel gene *RBI* ha confermato l'identità del gene¹⁸. Nelle persone con mutazioni germinali del gene *RBI*, l'allele normale consente a pRB di esplicare le sue funzioni nelle cellule costituzionali, comprese le cellule della retina. Il processo di perdita di eterozigotà avviene probabilmente in tutti i tessuti, ma solo in specifici tessuti la perdita di funzione di pRB porta alla trasformazione neoplastica. Il contrasto tra l'espressione ubiquitaria di *RBI* e la tumorigenicità tessuto-specifica potrebbe essere dovuta o alla compensazione da parte di altre proteine correlate a pRB¹⁹ o ad un'efficiente eliminazione di certi tipi di cellule *RBI*^{-/-} mediante apoptosi²⁰⁻²².

2.2 GENETICA DEL RETINOBLASTOMA

Lo sviluppo del retinoblastoma è causato dall'inattivazione del gene oncosoppressore *RBI*, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 13, in posizione q14.2. Secondo la teoria dei “two hits” di Knudson, due mutazioni successive (M1 e M2) portano alla perdita di funzione di entrambe le copie del gene e costituiscono il pre-requisito per l'insorgenza del tumore²³. Tale modello si applica a tutti i casi di retinoblastoma, sia *ereditari* che *non ereditari* (Figura 1).

Le forme *ereditarie* rappresentano circa il 40% dei casi e si presentano solitamente come tumori bilaterali o unilaterali multifocali²⁴. In questi casi, la prima mutazione in *RBI* è già presente nella linea germinale e, nel caso delle forme familiari, viene trasmessa da un genitore affetto come caratteristica autosomica dominante ad alta penetranza (90%) oppure, nel caso delle forme sporadiche, viene acquisita come evento “de novo” durante la gametogenesi o la gestazione^{7, 24}. L'inattivazione del secondo allele di *RBI* avviene a livello somatico, direttamente nelle cellule retiniche²⁴.

Le forme *non ereditarie* rappresentano circa il 60% dei casi e si presentano generalmente come tumori unilaterali. In questi casi, entrambi gli eventi mutazionali di *RBI* avvengono a livello somatico²⁴. Tuttavia, circa il 15% dei casi con tumore unilaterale presenta una mutazione a livello germinale²⁵.

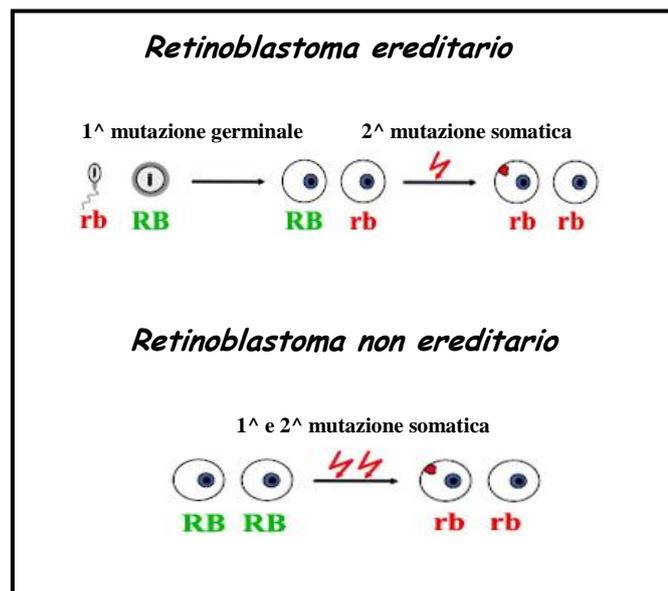


Figura 1. Modelli di sviluppo del retinoblastoma ereditario e non ereditario.

2.3 PENETRAMZA INCOMPLETA ED ESPRESSIVITA' VARIABILE

Tra gli individui con mutazione germinale nel gene *RBI*, solo il 90% sviluppa il retinoblastoma, solitamente bilaterale e multifocale²⁶. Esiste infatti un 10% di individui che, pur in presenza di mutazione germinale nel gene *RBI*, non sviluppa il retinoblastoma nell'arco della vita (penetranza incompleta).

Inoltre, alcuni individui con mutazione germinale del gene *RBI* possono presentare tumori unilaterali o lesioni retiniche benigne dette *retinomi* (espressività ridotta)²⁷.

Il retinoma è considerata una lesione benigna della retina non progressiva, solitamente asintomatica, che si presenta come una massa traslucida grigiastra che sporge nel vitreo. Tipicamente presenta calcificazioni (75%), proliferazione e migrazione dell'epitelio retinico pigmentato (60%). Le caratteristiche istologiche includono foci di differenziazione fotorecettoriale (fleurettes), stroma eosinofilo fibrillare abbondante, assenza di attività mitotica e foci di calcificazioni. La proporzione di individui con mutazione germinale in *RBI* oscilla tra l'1,8% ed il 10%^{28, 29}. In letteratura sono pochi i casi di retinoma che si sono trasformati in retinoblastoma²⁸⁻³¹. Il retinoma è stato inizialmente considerato una regressione spontanea del retinoblastoma, vista la somiglianza con le caratteristiche istologiche presentate dai retinoblastomi sottoposti a radioterapia e chemioterapia. Successivamente, è stato invece proposto che tale lesione rappresenti un primo stadio nello sviluppo del retinoblastoma²⁸⁻³³.

2.4 QUADRO CLINICO

Il retinoblastoma solitamente esordisce nei primi 5 anni di vita, con un'età media alla diagnosi, di 12 mesi per le forme bilaterali e 24 mesi per quelle unilaterali. Talvolta, il tumore può essere rilevato con un'ecografia fetale al terzo mese di gravidanza oppure alla nascita³⁴. L'insorgenza più tardiva, dopo i 5 anni di età, è rara; nell'adulto (età compresa tra i 20 e i 70 anni) sono stati descritti poco più di 20 casi di retinoblastoma^{35, 36}, alcuni, probabilmente, conseguenza della trasformazione maligna di un retinoma. Uno sviluppo più tardivo del tumore è stato associato alla perdita iniziale dell'allele presente sul cromosoma paterno, piuttosto che su quello materno³⁷. I casi unilaterali osservati nei primi sei mesi di vita hanno un elevato rischio di bilateralizzarsi, per cui richiedono un attento controllo oftalmologico. Nei pazienti che presentano retinoma, sono necessari controlli oftalmologici periodici, in quanto quest'ultimo, seppur raramente, può andare incontro a trasformazione maligna (più frequente in quelli diagnosticati nei primi 5 anni di vita). Tutti i bambini, con una storia familiare di retinoblastoma, dovrebbero essere visitati subito dopo la nascita e successivamente, ogni 4 o 6 settimane fino all'età di un anno e ogni 2 o 3 mesi fino all'età di 3 anni. In assenza di storia familiare di malattia nota, finché il tumore non è grande abbastanza, o localizzato in una parte della retina, tale da determinare sintomi visivi, non viene rilevato.

Il segno più comune di presentazione è un riflesso pupillare bianco (leucocoria) (Figura 2), che, generalmente, è notato dai genitori o da un parente e può essere messo in evidenza con il test del riflesso rosso, positivo quando il riflesso è asimmetrico nei due occhi. La leucocoria è dovuta alla localizzazione in sede papillo-maculare e/o alla sporgenza nel vitreo della massa tumorale.



Figura 2. Leucocoria in due pazienti con retinoblastoma

Il secondo segno per frequenza è lo strabismo, che può accompagnare o, talvolta, precedere la leuocoria, e si realizza quando il tumore occupa la zona maculare, con perdita della visione centrale. Segni meno frequenti includono l'ipopion, l'ipoema, la pseudouveite, l'endofalmitide, la cellulite orbitaria e le emorragie vitree, che si riscontrano, soprattutto, nei casi di retinoblastoma tardivo. Segni atipici di presentazione comprendono i segni infiammatori scatenati da necrosi massiva all'interno del tumore (uveite, panofalmitide, esoftalmo o, in tempi più lunghi, ftisi del bulbo), che possono condurre a complicazioni, quali glaucoma, megalocornea, buftalmo, lussazione del cristallino o cataratta. Altri segni atipici sono rappresentati da edema palpebrale, chemosi o congiuntivite. Un'uveite cronica unilaterale, non responsiva al trattamento, può essere l'espressione di un retinoblastoma infiltrante diffuso. Nei paesi del terzo mondo, dove la diagnosi viene posta tardivamente, il tumore può manifestarsi con proptosi, in presenza di una grande massa extraoculare, oppure idrocefalo nei casi di localizzazione posteriore, di metastasi o di retinoblastoma bilaterale associato a pinealoblastoma (definito anche "retinoblastoma trilaterale"); la presenza di quest'ultimo può inoltre provocare cefalea, vomito e meningismo. Il pinealoblastoma è un raro tumore neuroblastico della linea mediana, che si sviluppa in circa l'8-10% dei pazienti con una mutazione germinale nel gene *RBI*³⁸.

Le complicanze del retinoblastoma non trattato comprendono distacco retinico con successiva ischemia retinica, soprattutto in presenza di grandi tumori esofitici, comparsa di neovascolarizzazione secondaria dell'iride con coinvolgimento della camera anteriore (iniziale oscuramento dell'iride ed eterocromia e successivo ipoema e glaucoma neovascolare, con edema e opacizzazione della cornea), necrosi ed invasione dell'orbita, invasione del nervo ottico e del SNC. Il tumore può inoltre diffondere al nervo ottico controlaterale attraverso lo spazio subaracnoideale e al SNC attraverso il liquido cerebrospinale e può raggiungere il polmone, l'osso, il midollo osseo e l'encefalo per via ematogena. In genere, le metastasi compaiono a distanza di 6-24 mesi dalla diagnosi e conducono a morte in 2 anni.

I fattori, che influenzano la sopravvivenza, sono, innanzitutto, la tempestività della diagnosi e la possibilità di accesso alle cure mediche; altrettanto importanti sono le dimensioni e lo spessore del focolaio o dei focolai retinici, la presenza di distacco retinico totale, di "seeding" sottoretinico e/o vitreale diffuso, l'invasione del nervo ottico e l'estensione extraoculare. Inoltre, la sopravvivenza complessiva è complicata

dall'alto rischio di neoplasie maligne secondarie extraoculari, negli individui con mutazioni germinali nel gene *RBI*³⁹, i quali presentano un'incidenza cumulativa del 22% all'età di 25 anni, e in quelli sottoposti a radioterapia esterna⁴⁰, i quali presentano un rischio aumentato di dieci volte. Il periodo di latenza tra la diagnosi di retinoblastoma e la comparsa di neoplasie maligne secondarie è molto variabile ed è compreso tra i 2 e i 48 anni. Si tratta, soprattutto, di osteosarcomi (37%), sarcomi dei tessuti molli (16,8%) e melanomi (7,4%), che, solitamente, si rendono manifesti durante l'adolescenza o l'età adulta; meno frequenti sono i tumori cerebrali (4,5%), la leucemia (2,4%) e i linfomi non-Hodgkin (1,6%); infine, vi è un aumentato rischio di sviluppare carcinomi epiteliali, in particolare a livello di polmone, vescica e mammella. In uno studio recente è stato messo in evidenza che i pazienti con mutazione germinale in *RBI* presentano un rischio cumulativo di seconde neoplasie, 40 anni dopo la diagnosi di retinoblastoma, di circa il 28%⁴¹. La percentuale di sopravvivenza globale a 3 anni è elevata nei paesi sviluppati, in cui la diagnosi è precoce, e supera il 96%⁴²⁻⁴⁴.

Il recupero della visione è influenzato dalle dimensioni e dalla localizzazione del tumore, dalla presenza o meno di “seeding” vitreale e dal tipo di terapia eseguita.

2.5 ASPETTI OFTALMOSCOPICI ED ISTOLOGICI

Il retinoblastoma può presentare due prevalenti modalità di crescita all'esame oftalmoscopico: una endofitica, che è la più comune, si dirige dalla superficie interna della retina verso la cavità vitrea e l'altra esofitica, si spinge dalla superficie esterna della retina, dapprima sollevandola e poi distaccandola, verso la coroide. La forma esofitica è maggiormente associata a glaucoma e causa più spesso distacco retinico e coroidale ed invasione del nervo ottico, con aumentato rischio di metastasi. Più raro è il tipo infiltrante diffuso⁴⁵, nel quale non è riconoscibile una massa, ma una infiltrazione retinica diffusa (retina grigia ed ispessita, e sovente, vitreo opaco) e che, a differenza delle altre due forme, solo sporadicamente presenta calcificazioni. Il tipo infiltrante diffuso è stato osservato solo in casi unilaterali, nei quali provoca sintomi di irritazione e segni di coinvolgimento del segmento anteriore, generando talvolta errori nella diagnosi, ma fortunatamente, la prognosi dopo enucleazione è, generalmente, buona⁴⁶. Quando il tumore è di piccole dimensioni (<1,5 mm di diametro) si presenta come una massa intraretinica giallo-bianca, perfettamente rotonda; raggiunti i 3 mm di diametro, iniziano a comparire capillari con progressivo reclutamento di vasi, che penetrano all'interno del tumore, il quale assume forme irregolari (Figura 3).



Figura 3. Retinoblastoma maculare di grandi dimensioni.

I tumori freschi, contenendo aree di necrosi, possono essere liquidi, ma la maggior parte ha una consistenza pastosa. Gruppi di cellule neoplastiche possono distaccarsi e disperdersi nel vitreo (“seeding” vitreale, aspetto simile a piccole palle di cotone o a fiocchi di neve) o nello spazio sottoretinico (“seeding” sottoretinico); essi sono facilmente distinguibili dai nuovi tumori, per la loro localizzazione inferiore e il tipo di distribuzione.

All’esame istologico si evidenzia la presenza di aggregati cellulari in forma sferica, “le rosette”, in cui le cellule neoplastiche si dispongono con un prolungamento cellulare rivolto verso l’interno, delimitando uno spazio centrale otticamente vuoto: rosette di Flexner-Wintersteiner (specifiche del retinoblastoma) e rosette di Homer-Wright (presenti anche in altri tumori primitivi neuroectodermici). In genere, le cellule neoplastiche sopravvivono nelle aree più prossimali ai vasi, formando le cosiddette “pseudorosette”. Nelle aree necrotiche, si depositano sali di calcio, da cui originano le calcificazioni, mentre detriti molecolari delle cellule necrotiche si possono depositare nelle pareti vascolari e causare basofilia perivascolare.

Diverse classificazioni sono state proposte per stadiare il tumore, ma la più seguita è quella di Reese ed Ellsworth, che si basa sulla valutazione oftalmoscopica dell’estensione tumorale (Tabella 6).

Tabella 6. Classificazione di Reese ed Ellsworth.

| | |
|------------|---|
| Gruppo I | Molto favorevole |
| a) | Tumore unico con diametro < 4 dp, all’equatore o dietro |
| b) | Tumori multipli con diametro < 4 dp, all’equatore o dietro |
| Gruppo II | Favorevole |
| a) | Tumore unico con diametro tra 4-10 dp, all’equatore o dietro |
| b) | Tumori multipli con diametro tra 4-10 dp, all’equatore o dietro |
| Gruppo III | Dubbio |
| a) | Ogni tumore anteriore all’equatore |
| b) | Tumore unico con diametro > 10 dp, dietro all’equatore |
| Gruppo IV | Sfavorevole |
| a) | Tumori multipli, alcuni di diametro > 10 dp |
| b) | Ogni tumore che si estende anteriormente all’ora serrata |
| Gruppo V | Molto sfavorevole |
| a) | Tumori massivi coinvolgenti più della metà della retina |
| b) | Disseminazione nel vitreo |

Tuttavia, la classificazione di Reese-Ellsworth ha il limite di non tener conto del “seeding” vitreale e sottoretinico del tumore, pertanto è stata formulata una classificazione definita A,B,C,D,E (Tabella 7).

Tabella 7. Classificazione A, B, C, D, E

| |
|---|
| Gruppo A: tumori piccoli < 3 mm e a distanza di < 2 dp dal disco o dalla fovea e con “seeding” vitreale assente. |
| Gruppo B: focolai senza “seeding” o solo con minimo “seeding” focale vitreale non DR a < 5 mm da base della neoplasia |
| Gruppo C: fine diffuso “seeding” vitreale DR maggiore del gruppo B o totale DR Diametro tumorale > 15 mm |
| Gruppo D: massivo “seeding” vitreale o subretinico DR maggiore del gruppo B o totale DR Tumore che occupa oltre il 50% della superficie retinica |
| Gruppo E: nessuna possibilità di visus residuo oppure presenza di uno o più dei seguenti quadri clinici: - tumore in camera anteriore - glaucoma secondario con neovascolarizzazione - emorragia intravitrea - occhio ftisico o preftisico - ipoema o pseudoipopion con impronta sull’endotelio corneale - pseudo-cellulite orbitaria - tumore a livello della membrana jaloidea anteriore |

2.6 ASPETTI TERAPEUTICI

La strategia terapeutica è suggerita dalla necessità di preservare la vita, conservare l'occhio, mantenere una funzione visiva utile e ottenere un effetto cosmetico. La scelta del tipo di trattamento deve essere personalizzata e deve tener conto della localizzazione e dimensione del tumore, del numero di focolai, della unilaterale o bilateralità, dall'interessamento focale o diffuso del vitreo, dalla presenza di impianto sottoretinico focale o diffuso, dall'età del paziente, dalla familiarità e dal rischio di seconda neoplasia maligna non oculare. Quando possibile, viene preferito il trattamento conservativo, ma qualora esso fallisca o qualora vi sia una precisa indicazione viene eseguita l'enucleazione, che previene la comparsa di metastasi nel 95% dei casi⁴². Fino al 45% dei pazienti, trattati con una terapia conservativa dell'occhio, necessitano di trattamenti successivi per la presenza di una recidiva o l'insorgenza di un nuovo tumore oculare⁴⁷. È, dunque, necessario un follow-up oftalmoscopico con controlli oftalmologici periodici, soprattutto nei primi anni che seguono il trattamento.

I trattamenti conservativi includono la fotocoagulazione, la criocoagulazione, la termoterapia transpupillare (TTT), la termochemioterapia (TCT), la brachiterapia con placche radioattive, la radioterapia esterna e la chemioterapia sistemica. Inoltre, negli anni sono state introdotte terapie che prevedono la somministrazione locale dei chemioterapici, quali l'iniezione sottocongiuntivale di carboplatino^{48, 49} e, più recentemente, la chemioterapia superselettiva intrarteriosa, che prevede l'infusione nell'arteria oftalmica di Melphalan in monoterapia o in associazione ad altri farmaci antitumorali⁵⁰⁻⁵³.

La fotocoagulazione con argon laser è indicata nei tumori di dimensioni ≤ 8 mm e quelli della media periferia e del polo posteriore, confinati alla retina, come terapia di prima scelta o dopo chemioriduzione. La percentuale di guarigione può raggiungere il 92%⁴². Le complicanze includono le recidive, i distacchi retinici, le occlusioni vascolari retiniche e la fibrosi preretinica.

La criocoagulazione^{54, 55} viene impiegata nei tumori anteriori all'equatore, vicino all'ora serrata (fino a 3-4 mm di diametro e 2 mm di spessore, endofitici, privi di grossi vasi neoformati), in quelli di piccole dimensioni comparsi dopo radioterapia o sfuggiti a precedenti osservazioni ed, infine, in quelli in stadio III, IV e V di Reese, in

associazione alla monochemioterapia per aumentare la concentrazione di chemioterapico nella cavità vitrea. Presenta il 70% o più di successo⁵⁶. La complicanza più frequente è l'edema congiuntivale e palpebrale, ma può determinare anche rotture e distacchi retinici, distacchi coroidali ed uveiti.

La TTT⁵⁷, eseguita con laser a diodi, è impiegata nei tumori in sede maculare di dimensioni ≤ 3 mm, preceduta da chemioriduzione. Come complicanze può dare atrofia iridea localizzata, opacità periferiche della lente e trazioni retiniche fino a transitorio distacco retinico sieroso localizzato.

La TCT si effettua con laser a diodi dopo somministrazione endovenosa di carboplatino ed è riservata a tumori di piccole dimensioni (<4 mm).

La brachiterapia con placche radioattive⁵⁸ allo I¹²⁵ (raggi γ) e RU¹⁰⁶ (raggi β) è utilizzata, come trattamento di prima scelta, nei tumori con diametro <15 mm e spessore <9 mm, non trattabili con fotocoagulazione, crioterapia e TCT, distanti almeno 3 mm dal nervo ottico e/o dalla macula; come trattamento di seconda scelta è usata nei focolai residui dopo radioterapia esterna, nelle recidive dopo terapia focale o radioterapia esterna, nei focolai con modesto "seeding" vitreale. La localizzazione ideale è quella equatoriale. Con essa si ottiene una percentuale di guarigione che può raggiungere il 90%⁵⁹. Le complicanze più frequenti sono la corioretinopatia da radiazioni, le opacità del cristallino e la neuropatia ottica.

La radioterapia esterna è utile nei tumori bilaterali, di grandi dimensioni, adiacenti al nervo ottico, o papillo-maculari, nei quali la chemioterapia combinata con la terapia focale ha fallito; è, inoltre, indicata in caso di "seeding" vitreale diffuso e recidive che non rispondono a nessuno degli altri trattamenti conservativi. Infine, viene impiegata dopo l'enucleazione, nei casi di infiltrazione del nervo ottico, fino al margine di sezione chirurgica dello stesso, di infiltrazione della sclera e di recidive orbitarie, in associazione a chemioterapia. La percentuale di guarigione può raggiungere il 90%. Essa dovrebbe essere evitata nei pazienti di età inferiore ai 12 mesi. Le complicanze immediate comprendono la congiuntivite e la cheratite attinica, e l'iposecrezione lacrimale, mentre quelle tardive includono la neuropatia ottica, la corioretinopatia e la cataratta radio-indotta; inoltre, comporta un aumentato rischio di neoplasie maligne secondarie.

La chemioterapia sistemica è indicata nelle forme intraoculari (unilaterali e bilaterali), anche multifocali, per ridurre il volume dei focolai retinici prima della

terapia focale e ottimizzarne l'efficacia e per trattare focolai in sede papillo-maculare; è, inoltre impiegata come terapia adiuvante per il retinoblastoma metastatico e per ridurre il rischio di metastasi locoregionali o a distanza nei pazienti enucleati e con fattori istoprognostici sfavorevoli. Nella monochemioterapia, utilizzata soprattutto per la TCT, viene generalmente impiegato il carboplatino (da 2 a 4 cicli). Solitamente, però, vengono utilizzati chemioterapici in associazione (carboplatino ed etoposide; ifosfamide, vincristina e doxorubicina; ifosfamide, carboplatino ed etoposide). La percentuale di successo varia dal 50% al 90%⁶⁰ ed aumenta se la chemioterapia viene abbinata ad una terapia locale di consolidamento^{61, 62}. Può dare, come complicanze, soppressione del midollo osseo, nefropatia, sordità e leucemia.

L'iniezione sottocongiuntivale di carboplatino, impiegata in monoterapia ha mostrato scarsa efficacia nel controllo a lungo termine dei tumori in fase avanzata⁴⁸, mentre si è dimostrata più efficace quando usata in associazione ad altre terapie conservative, nell'aumentare il controllo sia dei tumori in fase avanzata che di quelli ad uno stadio precoce, in particolare quando abbinata alla laserterapia⁴⁹. Le complicanze comprendono alterazioni della motilità oculare, necrosi ed atrofia del nervo ottico e cellulite periorbitaria⁶³⁻⁶⁵.

La chemioterapia intrarteriosa superselettiva, mediante infusione di Melphalan attraverso l'arteria oftalmica, consente di ottenere alte concentrazioni del farmaco a livello dell'occhio e quindi del tumore, evitando la tossicità legata alla somministrazione sistemica⁵⁰⁻⁵³. Gli studi effettuati hanno dimostrato che in seguito a tale terapia la funzione retinica può essere mantenuta e persino recuperata⁶⁶. Inoltre, gli studi fino ad oggi condotti sull'applicazione della chemioterapia intrarteriosa superselettiva indicano una buona efficacia nel controllo a breve termine dei tumori in fase avanzata (stadi Va e Vb di Reese), con migliori risultati in quelli in remissione parziale o con ripresa di malattia dopo altre terapie conservative⁵³, mentre mancano ancora studi sull'efficacia a lungo termine. Ci sono infine studi preliminari promettenti riguardo all'impiego simultaneo del Melphalan e di altri chemioterapici (Topotecan, Carboplatino) nel trattamento iniziale di tumori in stadi più precoci (stadi II, III e IV)^{52, 53}. Gli effetti avversi riportati sono generalmente locali e reversibili, comprendendo disfunzioni palpebrali, iperemia ed edema palpebrale, perdita delle ciglia, strabismo, alopecia e "rash" frontale.

L'enucleazione (Figura 4) è indicata nei tumori unilaterali, con interessamento massivo della retina (>50%) e distacco retinico totale senza possibilità di residuo visivo, o con “seeding” vitreale o sottoretinico massivo, in quelli con interessamento della camera anteriore, in quelli con bulbo in ftisi o con glaucoma secondario e in quelli che mostrano persistenza di malattia dopo ogni trattamento conservativo. È necessario sezionare almeno 10 mm del nervo ottico, per valutare l'estensione del tumore⁶⁷ e lasciare il globo intatto, per evitare l'insorgenza di una recidiva orbitale. La percentuale di guarigione è del 95%. Le complicazioni sono rare e includono le emorragie e le infezioni postoperatorie. Sul bulbo enucleato viene eseguito l'esame istopatologico ed il riscontro di invasione del nervo ottico oltre la lamina cribrosa, interessamento diffuso e a tutto spessore della coroide, invasione delle arterie penetranti ed invasione della sclera rappresentano fattori istoprognostici sfavorevoli.



Figura 4. Sezione longitudinale di un occhio con retinoblastoma.

Il volume dell'occhio viene sostituito da un impianto, che può essere di due tipi: integrato, ossia colonizzato dai capillari dell'orbita, diventando così parte integrante della cavità anoftalmica (la vascolarizzazione si completa dopo circa 6 mesi ed è documentata dalla MRI con contrasto paramagnetico), oppure non integrato. Gli impianti più usati in età pediatrica sono l'idrossiapatite rivestita di vicryl (tipo integrato) e il silicone (tipo non integrato). Essi hanno un effetto cosmetico e di stimolo per la crescita della cavità anoftalmica. Nella cavità orbitaria viene inserita una protesi, inizialmente provvisoria, cambiata periodicamente, compatibilmente con la crescita del bambino (ogni 4-6 mesi circa) e, successivamente, sostituita con quella definitiva.

2.7 GENE *RBI* E PROTEINA *pRB*

Il gene *RBI*, localizzato nella regione 13q14.2, ha una lunghezza di 190 kb ed è costituito da 27 esoni (Figura 5a). Al 5' del gene si trova una regione CpG che normalmente non è metilata. La regione del promotore presenta siti di legame per i fattori di trascrizione ATF, SP1 ed E2F⁶⁸, ma non contiene elementi TATA o CAAT. Il gene è trascritto in un mRNA di 4.7 kb, per il quale non ci sono evidenze di splicing alternativo⁶⁹. L'open reading frame, che inizia nell'esone 1 e termina nell'esone 27, si estende per 2,7 kb ed è seguito da una regione non tradotta di 2 kb⁷⁰. Il confronto tra il gene *RBI* nell'uomo e quello nel topo mostra un'omologia dell'80% nelle prime 235 bp a monte della metionina iniziale, un'omologia dell'89% nella sequenza codificante e un'omologia del 77% nella regione 3' non tradotta. Le rispettive proteine nell'uomo e nel topo mostrano un'identità del 91% suggerendo che la funzione di questa proteina è altamente conservata.

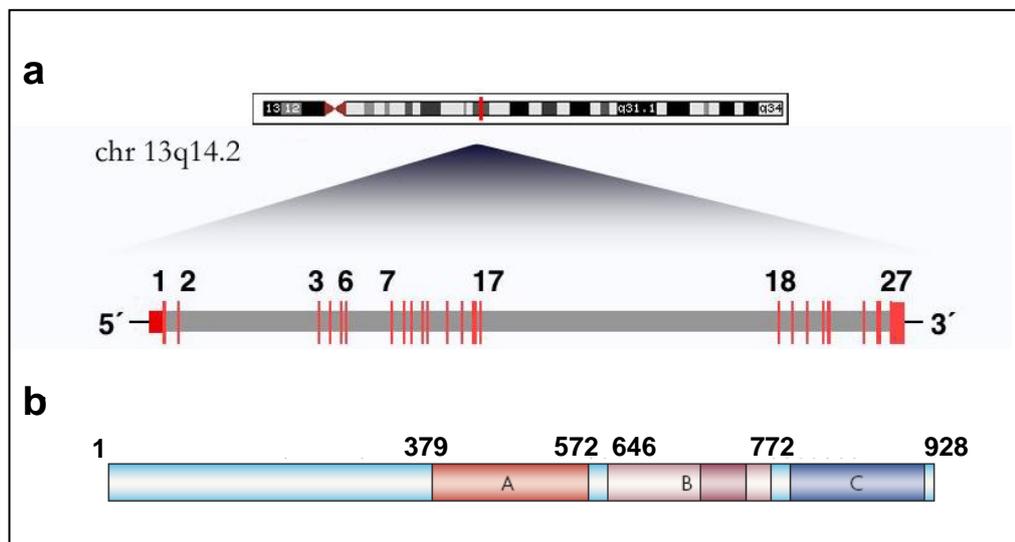


Figura 5. a) Localizzazione e struttura del gene *RBI*. b) Struttura della proteina *pRB*.

Il gene *RBI* codifica per la proteina pRB, che è una fosfoproteina nucleare di 110-kDa, ubiquitaria⁷¹, costituita da 928 residui aminoacidici e che fa parte di una piccola famiglia di proteine, che include p107 e p130/pRB2. Queste tre proteine condividono omologia di sequenza e intervengono nella regolazione del ciclo cellulare. La proteina pRB rappresenta il prototipo dei soppressori tumorali (in quanto è il primo ad essere stato isolato e clonato) ed il suo “pathway” è alterato nella maggior parte dei tumori umani, in quanto gioca un ruolo fondamentale nel regolare il ciclo cellulare, la differenziazione e l’apoptosi⁶⁸.

La proteina pRB è suddivisa in quattro regioni, la regione N-terminale, i domini A e B separati da una regione spaziatrice, e la regione C-terminale (Figura 5b). Le regioni A/B sono conservate all’interno della famiglia e, a seconda dello stato di fosforilazione di residui multipli di serina e treonina in altre regioni della proteina, il dominio A/B può legarsi a E2Fs, HDACs e altre proteine nucleari che contengono un sito LxCxE. Questo dominio è necessario per le funzioni biologiche, quali la regolazione della crescita e della differenziazione cellulare, e le attività biochimiche, comprendenti la regolazione trascrizionale e l’interazione con le proteine virali e cellulari⁷² ed entrambe le regioni A/B sono indispensabili per creare un sito funzionale⁷³. La regione C-terminale è meno caratterizzata ma è anch’essa fondamentale affinché la proteina svolga la funzione di repressore della crescita cellulare. Tale regione contiene un segnale di localizzazione nucleare (NLS) e un sito che lega le cicline ([R/K]xL), che sono importanti per la fosforilazione di pRB⁷⁴⁻⁷⁶. Il dominio C-terminale ha un’attività intrinseca non specifica di legare il DNA e lega le oncoproteine c-abl e MDM2⁷⁷. Anche la regione N-terminale non è ben caratterizzata strutturalmente ma viene ipotizzato che possa promuovere uno stato conformazionale attivo di pRB ed avere anche altri ruoli, dal momento che lega diverse proteine⁷⁸⁻⁸⁰.

La proteina pRB può essere presente in una forma non fosforilata (attiva) ed in una forma fosforilata (inattiva). Nella forma attiva agisce da repressore trascrizionale, perché in grado di legare la famiglia di fattori della trascrizione E2F⁸¹⁻⁸⁴. Nella forma inattiva invece guida il rilascio dei fattori trascrizionali e l’espressione dei geni necessari per la progressione del ciclo cellulare⁸⁵. La fosforilazione da parte delle proteine chinasi ciclina-dipendenti (cdk) regola il legame tra pRB ed E2F⁸³. In particolare la fosforilazione di pRB da parte di cdk3-ciclina C induce l’uscita dalla fase G₀. Successivamente la fosforilazione di pRB, nella fase tardiva G₁, ad opera dei

complessi cdk4/6-ciclina D e cdk2-ciclina E, permette il rilascio dei fattori E2F e la progressione lungo il ciclo cellulare. La fosforilazione di pRB continua durante le fasi S e G₂ ad opera dei complessi cdk2-ciclina A e cdk2-ciclina B. La proteina pRB è riattivata durante la fase tardiva della mitosi per defosforilazione da parte della PP1 fosfatasi (Figura 6).

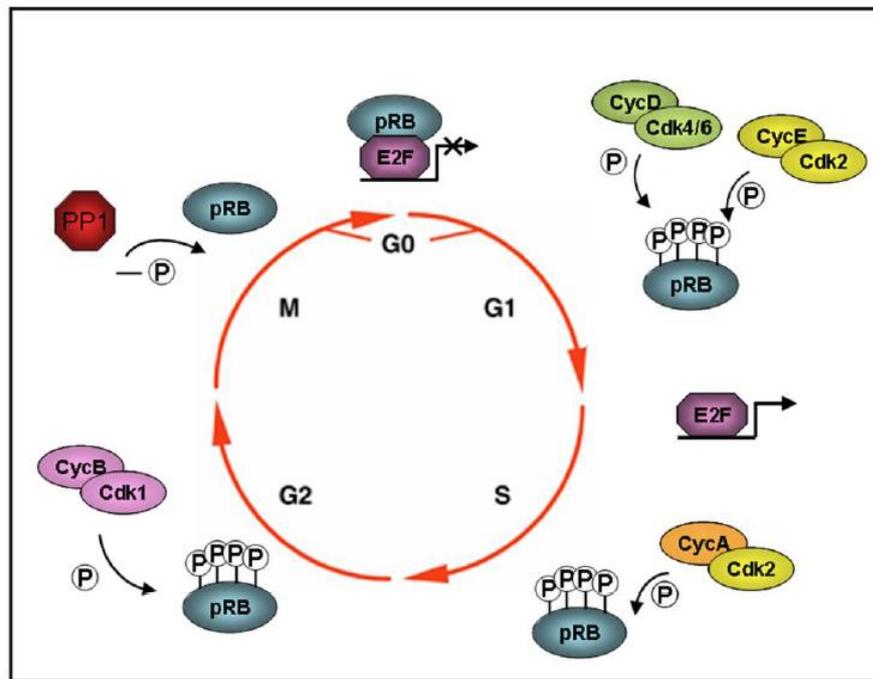


Figura 6. pRB regola il ciclo cellulare, la progressione, la differenziazione e l'apoptosi.

Oltre al suo ruolo fondamentale nel controllo del ciclo cellulare, pRB è coinvolta anche nel controllo della differenziazione durante l'embriogenesi e nei tessuti adulti, nella regolazione dell'apoptosi, nel mantenimento dell'arresto permanente del ciclo cellulare e nella salvaguardia dell'instabilità cromosomica^{68, 86, 87}.

2.8 SPETTRO DELLE MUTAZIONI NEL GENE *RBI*

Le mutazioni in *RBI* sono sparse lungo tutto il gene, incluso il promotore, gli esoni e le regioni introniche coinvolte nello splicing, e più del 50% sono mutazioni private.

Il primo evento mutazionale (M1), che predispone allo sviluppo del tumore, è dovuto nella maggior parte dei casi a mutazioni troncanti: mutazioni nonsense o delezioni/inserzioni frameshift, localizzate negli esoni 1-25 del gene⁸⁸. Il sito del codone di stop prematuro nel gene *RBI* non sembra avere effetti sull'espressione fenotipica., nella maggior parte di questi casi infatti la prematura interruzione della traduzione porta al fenomeno dell'RNA nonsense-mediated decay (NMD), per cui i prodotti alterati vengono degradati e la proteina pRB non è rilevabile. Questo tipo di mutazioni pertanto si associa solitamente a retinoblastoma bilaterale e solo occasionalmente sono state identificate in individui con retinoblastoma unilaterale o in famiglie con espressività variabile^{89,90}, nei quali tuttavia è stato spesso evidenziato un mosaicismo somatico. Tale condizione si riscontra rispettivamente nel 10% e nel 3,7%, delle forme familiari e delle forme unilaterali sporadiche^{89,90}.

Seguono in ordine di frequenza le mutazioni di splicing, le missenso, le mutazioni che cadono nella regione del promotore⁸⁸. Le mutazioni di splicing possono essere localizzate sia nelle sequenze introniche che in quelle esoniche, con prevalente interessamento delle sequenze introniche fiancheggianti gli esoni 6, 12, 16, 17, 19 e 24⁸⁸. Le mutazioni missenso più frequenti interessano i domini A/B, che sono fondamentali per le interazioni molecolari della proteina. Esistono, inoltre, 17 “hot spots”: 12 mutazioni nonsense, 3 mutazioni di splicing e 2 missenso⁸⁸. La maggior parte di queste mutazioni ricorrenti consiste in transizioni C>T in 11 triplette CGA, codificanti per un'arginina, localizzate negli esoni 8, 10, 11, 14, 15, 17, 18 e 23. Questa alta instabilità delle triplette CGA è dovuta alla metilazione dei dinucleotidi CpG e alla spontanea deaminazione della 5 Metil-Citosina a Timidina⁹¹. Le mutazioni di splicing, causanti una riduzione della normale quantità di mRNA prodotto, le mutazioni missenso, causanti inattivazione parziale di pRB e le mutazioni nella regione del promotore, determinanti una bassa espressione di pRB, si riscontrano più frequentemente nelle forme familiari a penetranza incompleta o con fenotipo più lieve (maggiore frequenza di casi unilaterali o di retinomi).

Infine, le grandi delezioni totali o parziali del gene si riscontrano in circa il 5-15% degli affetti⁹². Studi di correlazione genotipo-fenotipo hanno mostrato che solitamente gli individui con grandi delezioni del gene sviluppano un fenotipo più lieve, rispetto agli individui che presentano altri tipi di mutazione con perdita totale della funzione della proteina. In particolare, le persone che presentano delezioni totali del gene, submicroscopiche o di grandi dimensioni, manifestano spesso retinoblastoma unilaterale, mentre quasi tutti gli individui con grandi delezioni ma un solo punto di rottura all'interno del gene *RBI*, sviluppano retinoblastoma bilaterale⁹³.

Il secondo evento mutazionale (M2) è rappresentato da ricombinazioni mitotiche (50%)¹⁶, non disgiunzioni, con o senza duplicazioni (circa il 40%), delezioni microscopiche e submicroscopiche, mutazioni puntiformi e inattivazioni del gene (10%). La seconda mutazione si realizza con una frequenza maggiore rispetto alla prima⁹⁴ ed è più sensibile ai fattori ambientali, soprattutto quelli che determinano riarrangiamenti cromosomici, come le radiazioni ionizzanti.

2.9 SINDROME DA MICRODELEZIONE 13q14

La sindrome da delezione 13q14 è una patologia rara, causata da una delezione interstiziale, che coinvolge il gene *RBI* e il genoma circostante ed è caratterizzata dall'associazione di retinoblastoma, anomalie di sviluppo e un peculiare fenotipo facciale.

La sindrome “13q” è stata riconosciuta come un'entità fin dal 1969⁹⁵, sebbene inizialmente sia stato difficile definire specifici criteri diagnostici, a causa dell'ampia variabilità delle manifestazioni cliniche nei pazienti con delezione 13q. Con il successivo avvento delle tecniche di bandeggio cromosomico, si è tentato di correlare le caratteristiche cliniche, con la perdita di specifici segmenti del cromosoma 13^{96, 97}. Nei primi anni '90 Brown, sulla base dei dati clinici e citogenetici, ha proposto una classificazione dei pazienti con delezione 13q, individuando tre categorie: 1) delezioni prossimali a 13q32 associate a deficit intellettuale lieve-moderato, ritardo di crescita, caratteristiche facciali peculiari e, quando coinvolta la regione q14.2, a retinoblastoma; 2) delezioni coinvolgenti la banda 13q32 associate a grave deficit intellettuale e una o più malformazioni maggiori a carico di vari organi; 3) delezioni distali, coinvolgenti le bande q33q34 associate a grave deficit intellettuale, in assenza di malformazioni maggiori^{98, 99}.

Il primo autore, a suggerire uno specifico fenotipo facciale associato alla delezione 13q14, è stato Motegi, nel 1983, che ha descritto tre pazienti con delezione del cromosoma 13, coinvolgente la banda q14, che presentavano retinoblastoma e alcune caratteristiche facciali simili, comprendenti sopracciglia prominenti, ampio ponte nasale, punta del naso arrotondata, filtro lungo, bocca larga e labbro superiore sottile¹⁰⁰.

Nel 1999, Baud descrivendo una coorte di 22 pazienti, tutti affetti da retinoblastoma ha definito le caratteristiche facciali peculiari della sindrome, (Figura 7) comprendenti fronte alta e ampia, lobi spessi ed anteversi, naso corto, filtro prominente e labbro inferiore spesso ed everso¹⁰¹. Questo fenotipo era associato a grave deficit intellettuale con ritardo o assenza del linguaggio e/o compromissione motoria all'età di 2 anni, nella maggior parte dei pazienti ed era correlato alla localizzazione ed estensione della delezione¹⁰¹. Egli ha notato che il coinvolgimento neurologico era assente quando la delezione era limitata alla banda 13q14 e che invece il ritardo di sviluppo psicomotorio era più grave nei pazienti con delezioni, che si estendevano da 13q14 a

q21, rispetto a quello presente nei pazienti con delezioni, che si estendevano da 13q14 alle bande più prossimali¹⁰¹.



Figura 7. Pazienti con delezione 13q14 e peculiare fenotipo facciale: fronte alta e ampia, lobi spessi ed anteversi, naso corto, filtro prominente e labbro inferiore spesso ed everso. Ripresa e modificata da Baud et al,1999.

Nel 2001, Bojinova ha esteso ulteriormente la descrizione del fenotipo facciale, associato alla delezione 13q14, riportando 13 nuovi pazienti caucasici, con anomalie craniche (brachicefalia, micro/macrocefalia, plagiocefalia, dolicocefalia), bozze frontali, sopracciglia prominenti, fessure palpebrali rivolte in alto e in fuori, pieghe epicantali, ponte nasale ampio e depresso, punta del naso arrotondata, filtro lungo, profondo e ben disegnato, labbro superiore fino, labbro inferiore spesso ed everso, micro/retrognazia, guance ampie e orecchie e lobi grandi e ripiegati¹⁰².

L'introduzione dell'analisi di array-CGH ha permesso di caratterizzare a livello molecolare i pazienti con delezione 13q14.2, consentendo di definire l'estensione e i punti di rottura delle delezioni¹⁰³⁻¹⁰⁵. Con l'impiego di tale metodica, Caselli nel 2007

ha tentato di definire una regione critica per il deficit intellettivo, mettendo a confronto le delezioni di due pazienti che presentavano retinoblastoma, caratteristiche facciali peculiari e deficit intellettivo, con quella di un paziente affetto solo da retinoblastoma¹⁰³. Da tale confronto sono state per la prima volta individuate due regioni critiche, una centromerica ed una telomerica e sono stati indicati come possibili geni candidati per il deficit intellettivo, i geni *NUFIP*, *HTR2A*, *PCDH8* e *PCDH17*, localizzati all'interno di tali regioni¹⁰³. Grazie all'impiego dell'analisi di array-CGH è stato inoltre possibile effettuare studi di correlazione genotipo-fenotipo^{104, 105}. In un recente lavoro, Mitter ha analizzato 64 pazienti con delezioni interstiziali 13q, coinvolgenti il gene *RBI*, mettendo a confronto le caratteristiche di pazienti con piccole (punti di rottura in 13q14; dimensioni <6Mb), medie (punti di rottura in 13q12.3q21.2; dimensioni 6-20 Mb) e grandi (punti di rottura in 13q12q31.2; dimensioni >20Mb) delezioni¹⁰⁵. In particolare è emerso che i pazienti con delezioni di piccole dimensioni presentano macrocefalia, alta statura, obesità, ritardo motorio e del linguaggio e non mostrano caratteristiche facciali peculiari¹⁰⁵, in contrasto con quanto precedentemente riportato¹⁰⁰⁻¹⁰². I pazienti con delezioni di dimensioni medie presentano ritardo psicomotorio di grado lieve-moderato, microcefalia, bassa statura e caratteristiche facciali peculiari, quali fronte alta, occhi infossati, naso corto, e labbro superiore sottile¹⁰⁵. Infine, i pazienti con delezioni di grandi dimensioni presentano ritardo psicomotorio di grado variabile, ipotonia, microcefalia, bassa statura, stipsi, difficoltà di alimentazione e caratteristiche facciali peculiari, quali fronte alta, naso corto, filtro lungo, labbro superiore sottile e angoli della bocca rivolti verso il basso¹⁰⁵. È stato inoltre riscontrato un fenotipo più lieve di retinoblastoma (retinoblastoma unilaterale) nei pazienti con delezioni superiori ad 1 Mb, contenenti il gene *MED4*, il quale codifica per un complesso proteico che interagisce con il recettore della vitamina D¹⁰⁵. Non sono stati invece trovati punti di rottura ricorrenti, nè correlazione tra le caratteristiche cliniche e l'origine parentale della delezione¹⁰⁵.

3. MATERIALI E METODI

L'U.O.C. Genetica Medica di Siena effettua come prestazione del sistema sanitario nazionale l'analisi molecolare per il retinoblastoma.

Lo screening per la ricerca di mutazioni puntiformi del gene *RBI*, viene effettuato mediante DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography). Quando viene evidenziato un profilo anomalo al DHPLC, si procede al sequenziamento automatico dello specifico amplicone.

La ricerca di delezioni nel gene *RBI*, viene effettuata attraverso MLPA (Multiple Ligation Probe Assay) mediante l'impiego del kit commerciale P047-B1 (MRC Holland, Amsterdam). Le sonde contenute in questo kit consentono di analizzare 23 dei 27 esoni che compongono il gene *RBI*; viene escluso l'esone 15. Tale kit contiene inoltre sonde per altri tre geni localizzati in prossimità di *RBI*, *ITMB2* (48 kb a monte), *CHC1L* (72 kb a valle) e *DLEU1* (distante 1,6 Mb). Con tale kit è pertanto possibile rilevare sia riarrangiamenti intra-genici che riarrangiamenti più grandi, almeno fino a 1,8 Mb, coinvolgenti anche i geni fiancheggiati il gene *RBI*. In quest'ultimo caso, a tale tecnica è stata affiancata a scopo di ricerca l'analisi di array-CGH, per una migliore definizione dell'estensione e dei punti di rottura del riarrangiamento identificato mediante MLPA.

Tutte queste indagini vengono effettuate sul DNA del paziente, estratto da prelievo di sangue periferico (10 ml in EDTA), tramite il kit QIAamp DNA Blood (Qiagen, Hilden, Germany).

3.1 ANALISI DI MUTAZIONI PUNTIFORMI

3.11 PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnica che consente di amplificare specifici frammenti di DNA, dei quali si conoscono le sequenze alle due estremità. Questa reazione avviene grazie alla capacità del DNA polimerasi di sintetizzare un filamento di DNA complementare ad una sequenza che utilizza come stampo. Per innescare la sintesi ha bisogno di oligonucleotidi, i primers, che si appaiano al filamento stampo in corrispondenza delle estremità del frammento e funzionano da innesco della reazione.

Si utilizza, quindi, un mix contenente i primers, dei nucleotidi (dNTPS), i campioni di DNA ad una concentrazione di 100 ng/μl, la Taq polimerasi ed i reagenti specifici per la reazione di PCR. Tale reazione prevede una denaturazione iniziale, seguita da 35 cicli costituiti da denaturazione (per aprire bene le due eliche di DNA), appaiamento (o annealing, alla temperatura specifica, che dipende dalla composizione in basi dei primers, per far appaiare i primers al filamento stampo) ed estensione (in cui la Taq-polimerasi si lega al primer ed inizia a sintetizzare il nuovo filamento). Dopo i 35 cicli, viene effettuata un'estensione finale e al termine della reazione otteniamo circa un milione di copie del filamento iniziale di DNA.

3.12 DHPLC

La DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) è una tecnica di separazione ad elevata efficienza e sensibilità, che consente di caratterizzare differenti molecole in base a specifiche caratteristiche chimico-fisiche e steriche. La DHPLC impiega il meccanismo della ripartizione in fase inversa ad accoppiamento ionico¹⁰⁶.

Il sistema cromatografico è composto da due fasi: una fase solida o stazionaria, costituita da materiale di riempimento della colonna, e una fase liquida o mobile, costituita dal solvente che scorre attraverso la colonna. La fase stazionaria è costituita da microsfere di polistirene-divinilbenzene ed elettricamente neutra ed idrofobia, per cui i frammenti di DNA, contenenti ioni fosfato carichi negativamente, possono legarsi alla matrice della colonna solo con l'ausilio di una molecola ponte, il TEAA (TriEtilAmmonio Acetato). Il TEAA è una molecola carica positivamente con doppia funzionalità lipofila ed idrofila, infatti mentre la parte apolare della molecola interagisce con la fase stazionaria, la parte polare interagisce con il DNA. Il ruolo del TEAA è quello di circondare la molecola di DNA da analizzare e di farla interagire con la fase stazionaria. Il TEAA è aggiunto in basse quantità (0,1 M) nel tampone, in modo da essere costantemente disponibile.

Il principio su cui si basa la DHPLC è la differente interazione che le molecole da separare mostrano nei confronti del materiale cromatografico, sotto la modulazione chimica e meccanica dei tamponi. Il risultato è che il tempo di ritenzione in colonna dei frammenti, varia in funzione della qualità e quantità delle interazioni che essi stabiliscono con la fase stazionaria. Le molecole caratterizzate da un minor numero di interazioni vengono eluite più velocemente e viceversa. Quando un frammento di DNA è sottoposto ad analisi mediante DHPLC si possono verificare due situazioni:

- nel caso in cui il frammento in esame non presenti mutazioni puntiformi, dopo un ciclo di denaturazione e successiva rinaturazione, si formeranno molecole di omoduplex, cioè molecole costituite da due filamenti perfettamente appaiati tra loro, in grado di instaurare un numero elevato di interazioni con la colonna, risultando quindi stabilmente legati ad essa. La presenza di molecole omoduplex risulterà in un unico picco di eluizione.
- nel caso vi sia una mutazione puntiforme, dopo denaturazione e successiva rinaturazione, si formeranno oltre alle molecole di omoduplex, molecole di eteroduplex, costituite da due filamenti di DNA non perfettamente appaiati tra loro per la presenza di

una “bolla” di mis-appaiamento nel punto della mutazione (Figura 8). La presenza di questa bolla rende meno stabile la molecola all’interno della colonna in quanto diminuisce il numero di interazioni tra il frammento e la fase stazionaria, quindi il tempo di eluizione sarà inferiore rispetto alle molecole di omoduplex. Di conseguenza se un frammento presenta una mutazione saranno visibili un picco alterato o più picchi aggiuntivi corrispondenti alle molecole di eteroduplex (Figura 8).

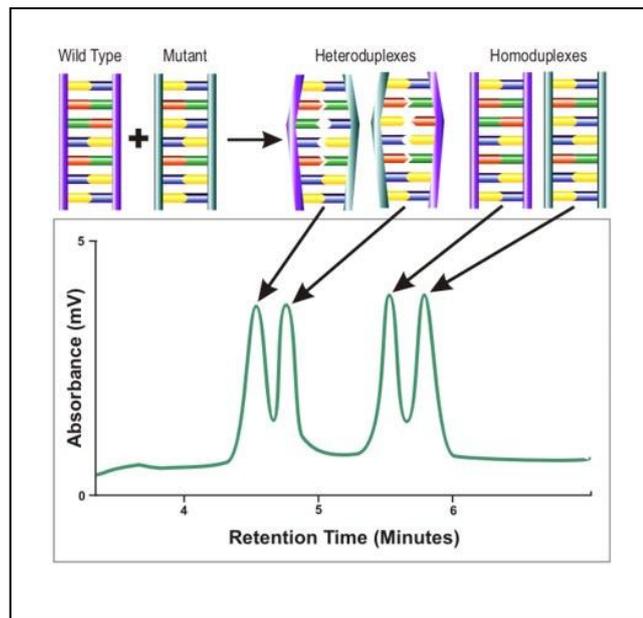


Figura 8. Nel cromatogramma sono visibili i quattro picchi corrispondenti alle molecole di eteroduplex e di omoduplex che si formano, dopo denaturazione e successiva rinaturazione del DNA, in presenza di una mutazione in eterozigosi.

Per l’analisi al DHPLC, il prodotto di PCR viene quindi denaturato a 95°C, rinaturato a 65°C per 10’ e raffreddato a 4°C, per favorire la formazione di eventuali eteroduplex. Le provette contenenti i prodotti di PCR possono essere poste direttamente nell’autocampionatore del sistema, che provvede a prelevare, in condizioni standard, 5 µl di amplificato (circa 20-50 ng di DNA) ed iniettarlo nel sistema per l’analisi.

Per ogni frammento è necessario calcolare la temperatura di melting (temperatura di “50% di denaturazione”), che verrà poi utilizzata per l’esame dei campioni. La temperatura di melting dipende da una serie di caratteristiche, tra cui la lunghezza del frammento e la sua composizione in paia di basi, e viene calcolata da un apposito

software (WaveMaker Software), che visualizza i domini contenuti nella sequenza e propone le temperature di analisi. Una volta scelta la temperatura di lavoro per ogni amplicone, si procede ad analizzare i campioni dello screening.

Per monitorare le separazioni ottenute in colonna si utilizza uno spettrofotometro corredato di microcella a flusso, dove l'eluato passa in continuazione e ne viene effettuata la lettura all'ultravioletto a 260 nm. Il segnale di assorbanza viene tradotto in intensità (mV). Il rilevatore a luce ultravioletta permette di evidenziare una mutazione con un limite del 5% di molecole mutate all'interno del campione analizzato. Il tempo di risoluzione dei picchi deve essere compreso, affinché ci sia risoluzione ottimale dei frammenti, tra 3 e 6 minuti. Il risultato viene registrato dal PC e riportato sotto forma grafica nel cromatogramma.

3.13 SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO

I campioni con profili di eluizione alterati sono analizzati mediante sequenziamento automatico (Abi Prism 310, Applied) in modo da caratterizzare la mutazione.

La metodica del sequenziamento si basa sull'utilizzo, nella reazione di amplificazione, di una miscela di deossinucleotidi e di dideossinucleotidi trifosfato marcati con quattro fluorocromi distinti (ddNTP*). I ddNTP* sono privi del gruppo -OH in posizione 3'. Questa sostituzione fa sì che la DNA polimerasi, che richiede tale gruppo -OH per aggiungere il successivo nucleotide al filamento in crescita, non possa proseguire la sintesi del filamento.

La tecnica prevede l'allestimento di una miscela di reazione contenente il prodotto di PCR purificato, utilizzando un kit di purificazione (Jet QUICK – Genomed), un primer specifico, deossinucleotidi, dideossinucleotidi marcati con quattro diversi fluorocromi e una DNA polimerasi termoresistente, che permette la sintesi del nuovo filamento. Alla fine della reazione si otterranno una serie di frammenti di DNA di lunghezza diversa, terminanti tutti con un diverso dideossinucleotide marcato con uno specifico fluorocromo.

In seguito le sequenze vengono precipitate, in modo da ottenere la separazione completa dei frammenti di DNA, risospese in acqua e caricate all'interno del sequenziatore ABI-310 (Applied), dove i campioni, separati elettroforeticamente, vengono letti da un laser che riconosce il dideossinucleotide marcato. Si ottiene così un cromatogramma nel quale ogni nucleotide è rappresentato da un picco di uno specifico colore: rosso per la Timina, verde per l'Adenina, blu per la Citosina, nero per la Guanina.

Le mutazioni si osservano confrontando una sequenza di un frammento wild-type con quella del campione in esame. Le mutazioni in omozigosi si evidenziano con un picco nella sequenza del campione di un colore differente rispetto a quello del picco corrispondente nella sequenza di controllo. Le mutazioni in eterozigosi, invece, si visualizzano con la presenza di due picchi di colore diverso sovrapposti.

3.2 ANALISI DI GRANDI RIARRANGIAMENTI

3.2.1 MLPA

La metodica MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) permette di rilevare i cambiamenti del numero di copie presenti nel DNA in esame. Il principio su cui si basa tale tecnica è l'amplificazione simultanea di sonde ibridizzate su regioni target. Ciascuna sonda MLPA è costituita da un oligonucleotide sintetico e un oligonucleotide derivato da DNA fagico M13.

L'oligonucleotide sintetico contiene una sequenza universale all'estremo 5' e una regione complementare alla sequenza target all'estremo 3' (Figura 9).

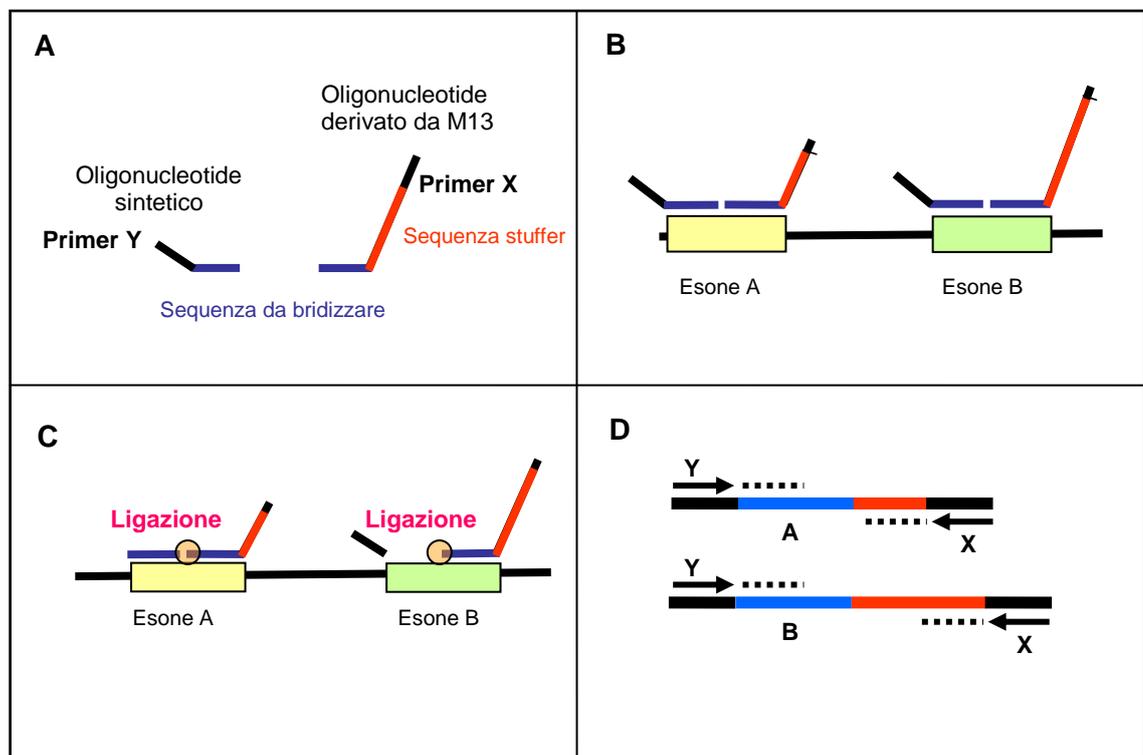


Figura 9. a) Rappresentazione schematica di una sonda MLPA. Gli oligonucleotidi sintetici contengono la sequenza riconosciuta dal primer universale Y (in nero), mentre il frammento derivato da M13 contiene la sequenza specifica per il primer universale X (in nero) e la sequenza stuffer (in rosso). La sequenza target è indicata di blu; b) Ibridazione della sonda MLPA con il DNA. Il DNA genomico è denaturato e le due parti di ogni sonda MLPA sono ibridizzate sulla sequenza di riferimento; c) Reazione di legazione. Solo le sonde perfettamente appaiate vengono legate da una ligasi termostabile; d) Reazione di PCR. Tutte le sonde legate sono amplificate tramite PCR utilizzando un'unica coppia di primers (X e Y). Il prodotto di amplificazione di ciascuna sonda ha una lunghezza caratteristica, per cui ciascun frammento è riconoscibile in base alla misura di separazione.

L'altro oligonucleotide contiene una regione complementare alla sequenza target all'estremo 5', una sequenza sintetica detta "stuffer" di lunghezza variabile e una sequenza universale all'estremo 3' (Figura 9). In seguito all'ibridazione, i due oligonucleotidi vengono uniti dall'enzima ligasi. Dal momento che le sonde contengono estremità 3' e 5' universali possono essere amplificati contemporaneamente con una sola coppia di primers e in un'unica reazione di PCR. La sequenza stuffer fornisce una diversa lunghezza a ciascuna sonda (Figura 9).

L'analisi MLPA si compone di tre fasi: denaturazione-ibridazione, ligazione e PCR¹⁰⁷. Al termine di queste fasi, i campioni vengono caricati nel sequenziatore ABI-310 (Applied Biosystem) per la separazione dei frammenti e l'analisi tramite software Genescan. I dati vengono poi copiati su un File Excel (Microsoft) dove i risultati finali vengono calcolati tramite software "Coffalyser" (MCR Holland). Le alterazioni vengono considerate significative se i valori presentano una deviazione maggiore del 30% rispetto al controllo.

3.2 ARRAY COMPARATIVE GENOME HYBRIDIZATION

La Tecnica Comparative Genomic Hybridization (CGH, ibridazione genomica comparativa) è stata introdotta nel 1992 da Kallioniemi¹⁰⁸. Il principio della tecnica si basa su una ibridazione in situ modificata che sfrutta la competizione tra due campioni di DNA genomico (test e controllo), ibridati contemporaneamente in quantità equimolari su un vetrino su cui sono fissati cromosomi normali in metafase (CGH convenzionale) o sull'array su cui si trovano immobilizzate le sequenze omologhe di DNA (array-CGH). La tecnica di CGH convenzionale è una tecnica di rilevazione che consente di analizzare l'intero genoma del soggetto che si vuole esaminare, grazie ad un unico esperimento in grado di identificare anomalie del corredo genetico, quali riarrangiamenti sbilanciati, ovvero delezioni e duplicazioni genomiche. La tecnica di array-CGH, è stata sviluppata sostituendo i cromosomi delle metafasi di riferimento con una matrice su cui sono disposti (spottati) cloni BAC (cromosomi artificiali batterici), PAC (cromosomi artificiali di fago P1), o sequenze di oligonucleotidi, corrispondenti a loci specifici di ogni singolo cromosoma, fino a comprendere l'intero genoma umano. L'utilizzo di tali cloni, infatti, permette l'immediata correlazione tra l'eventuale alterazione sospettata in un paziente e una precisa posizione del riarrangiamento nel genoma, grazie alla scomparsa di un segnale corrispondente al clone contenente la sequenza deleta, o viceversa all'aumento di segnale dovuto ad una duplicazione della sequenza. La risoluzione genomica dell'array-CGH dipende dalla lunghezza dei cloni utilizzati e dalla distanza tra un clone e l'altro. Pertanto, l'utilizzo di tali cloni permette di superare il limite principale della CGH convenzionale che è la risoluzione.

Nell'array-CGH, si possono utilizzare diverse piattaforme, che si differenziano sostanzialmente per la grandezza delle sequenze genomiche disposte sull'array e per la copertura del genoma. I principi di base dell'array-CGH assomigliano a quelli dell'ibridazione genomica comparativa tradizionale. I campioni di DNA test e di controllo sono differentemente marcati, con fluorocromi verdi (Cy3) e rossi (Cy5), successivamente coprecipitati in presenza di Cot-1 DNA per bloccare le sequenze ripetitive e co-ibridizzati sull'array (Figura 10).

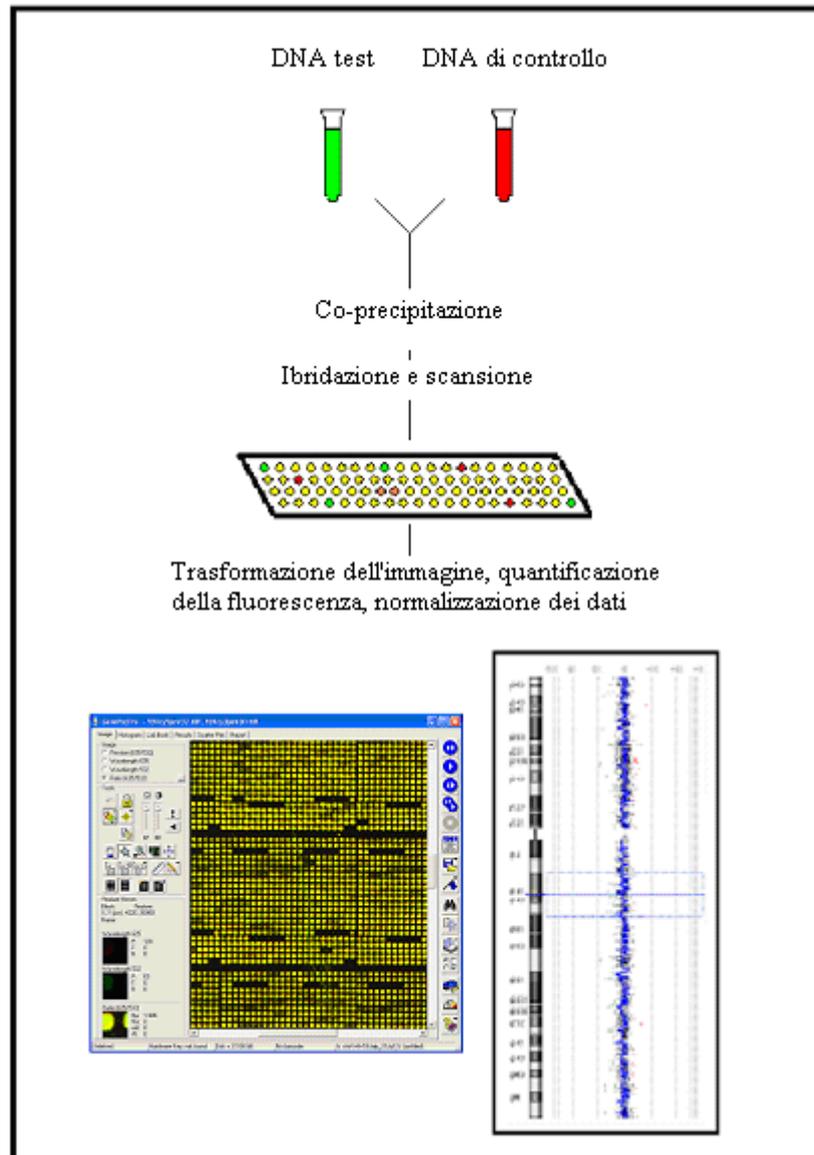


Figura 10. Rappresentazione schematica di un esperimento *array*-CGH. I DNA test e di controllo sono diversamente marcati, coprecipitati e ibridizzati su un *array*. Dopo le procedure di lavaggio, i vetrini sono analizzati attraverso uno scanner e viene determinata l'intensità di fluorescenza di ogni sonda. Dopo la trasformazione dell'immagine e la normalizzazione dei dati, i rapporti in \log_2 delle sonde sono tracciati come funzione della posizione cromosomica. Le sonde con un valore uguale a zero rappresentano un uguale rapporto dell'intensità della fluorescenza tra il test e il controllo. Ogni punto rappresenta una singola sonda individuata sull'*array*. In questa rappresentazione, la perdita del numero di copie sposta il rapporto a sinistra, mentre l'aumento sposta il rapporto a destra.

Si tratta di una competizione comparativa in cui si leggerà in proporzione più DNA da testare in ogni locus se maggiore sarà il numero di copie presenti in quel locus rispetto al numero di copie presenti nel DNA genomico di controllo. Viceversa se ne leggerà meno se minore sarà il numero di copie presenti in quel locus rispetto al numero di copie presenti nel DNA genomico di controllo. La fluorescenza è rilevata mediante uno scanner a laser, grazie al quale si acquisisce un'immagine per entrambi i fluorocromi. In seguito, le immagini sono quantificate con metodo digitale mediante software specifici, che quantificano l'intensità di fluorescenza emessa per ogni sonda (Figura 10), calcolando quanto il rapporto tra i segnali emessi dal campione e dal DNA di riferimento devia dai valori attesi. Dato che le misurazioni possono essere riferite direttamente alle posizioni sul genoma, è possibile definire con precisione, i punti di rottura (breakpoints) dei riarrangiamenti eventualmente presenti. La risoluzione dell'esperimento dipende dalla risoluzione dell'array. La sovrapposizione dei due segnali corrispondenti ai due fluorocromi, nel caso di un soggetto normale produce un valore di intensità di fluorescenza uguale ad 1, poiché il rapporto tra i due fluorocromi $2/2$ è pari ad 1. La rappresentazione grafica fornita dal software trasforma questo valore in logaritmo. Quindi i cloni in cui è avvenuta una normale ibridazione tra DNA di controllo e DNA test si trovano lungo la linea grafica dello 0. L'elaborazione finale del programma produce uno schema in cui è possibile vedere la distribuzione dei segnali di fluorescenza dei cloni nell'intorno del valore "zero" ad indicare un uguale dosaggio della regione del DNA test e del DNA di controllo. Cloni che si discostano da questa linea di "zero" verso +0.58, dove il rapporto tra i due fluorocromi è di $3/2$, sono indicativi di una regione duplicata e cloni che si discostano verso -0.80, dove il rapporto tra i due fluorocromi è $1/2$, sono indicativi di una delezione. Si considerano possibili delezioni o duplicazioni quando si discostano dal valore di "zero" almeno tre sonde.

*4. CONSULENZA GENETICA NEL
RETINOBLASTOMA: ESPERIENZA
CLINICA PERSONALE*

La Genetica Medica di Siena rappresenta il centro di riferimento in Italia per il retinoblastoma, per il quale, a partire dal 2001, vengono effettuate sia la consulenza genetica che l'analisi molecolare. Durante il periodo di specializzazione ho partecipato a circa 60 consulenze per retinoblastoma, rivolte prevalentemente a bambini, sia italiani che stranieri, ed in minoranza, ad adulti inviati da uno specialista di riferimento o dietro richiesta personale, sia in epoca preconcezionale che prenatale. La maggior parte delle consulenze hanno riguardato casi sporadici e solo una piccola quota forme familiari di retinoblastoma, con interessamento sia unilaterale che bilaterale. La maggior parte di questi casi sono stati riferiti alla nostra attenzione dalla U.O.C. Oftalmologia e dalla U.O.C. Pediatria del Policlinico Universitario di Siena. In particolare dal 2010 partecipo attivamente a incontri settimanali del gruppo oncologico multidisciplinare (GOM) dedicato al retinoblastoma, che coinvolge diverse figure professionali, quali oculista, pediatra oncologo, neuroradiologo, radiologo interventista e anatomo-patologo. Nell'ambito di questi incontri viene discusso l'iter diagnostico, la strategia terapeutica da adottare ed il decorso clinico dei pazienti giunti presso l'AOU Siena. Di seguito riassumerò il processo della consulenza per retinoblastoma e descriverò alcuni casi da me valutati.

Oltre ai pazienti seguiti all'interno della AOUS, giungono alla nostra attenzione anche pazienti esterni, che vengono riferiti dagli specialisti di riferimento. Nel caso di pazienti adulti molto spesso la richiesta è personale, collocandosi in epoca preconcezionale o prenatale.

La consulenza genetica non coinvolge solo il probando, ma anche gli altri familiari. Uno dei setting tipici è quello in cui il consulente genetista si trova davanti un bambino affetto da retinoblastoma accompagnato dai genitori, spesso in apparente stato di buona salute. Uno dei punti cruciali della consulenza è la raccolta della storia familiare, sotto forma di albero genealogico, che deve prendere in considerazione almeno tre generazioni. Durante la raccolta anamnestica deve essere posta particolare attenzione non solo alla presenza di eventuali altri familiari affetti da retinoblastoma, ma anche alla presenza di eventuali familiari con storia positiva per altri tipi di neoplasie, quali osteosarcomi, tumori dei tessuti molli, melanomi, che talvolta, nell'ambito di forme ereditarie ad espressività variabile, possono rappresentare l'unica manifestazione associata alla presenza di una mutazione germinale nel gene *RBI*. Inoltre, nel caso di forme apparentemente sporadiche, è importante capire se i genitori del probando hanno

mai eseguito una valutazione oculistica con esame del fondo oculare, per la ricerca di eventuali lesioni asintomatiche, quali il retinoma, che possano far sospettare una forma ereditaria di retinoblastoma e quindi la segregazione nella famiglia di una mutazione germinale nel gene *RBI*.

Un altro punto fondamentale della consulenza genetica è la raccolta della storia personale del probando con la valutazione della documentazione clinica e l'effettuazione di un accurato esame obiettivo. È molto importante valutare la lateralità e la focalità del tumore, in quanto bilateralità e multifocalità fanno propendere per forme tumorali ereditarie, dovute alla presenza di una mutazione costitutiva nel gene *RBI*. E' necessario inoltre prestare particolare attenzione all'età del probando, poiché soprattutto in presenza di bambini molto piccoli, vi è un elevato rischio che una forma unilaterale al momento della diagnosi, successivamente si bilateralizzi. Infine, un'attenta valutazione dello sviluppo psicomotorio e un accurato esame obiettivo del probando, consente di rilevare la presenza di eventuali caratteristiche fisiche e facciali peculiari, che possono far spostare il sospetto da una forma isolata ad un quadro sindromico. Nei casi in cui viene sospettata una forma sindromica, solitamente vengono effettuate fotografie del probando, come documentazione dei segni fisici e facciali rilevati, previa acquisizione di un consenso informato scritto. È molto importante discriminare tra forme isolate e sindromiche, in quanto in quest'ultimo caso può essere presente un ritardo nell'acquisizione delle tappe dello sviluppo psicomotorio. A seconda che venga ipotizzata una forma isolata o sindromica di retinoblastoma il consulente genetista indirizza l'indagine genetica verso la ricerca di mutazioni puntiformi o delezioni intrageniche nel gene *RBI* o verso la ricerca di una microdelezione genomica, coinvolgente il gene *RBI* ed i geni fiancheggianti.

In seguito all'acquisizione delle informazioni cliniche, il consulente genetista fornisce informazioni riguardo agli aspetti genetici, ovvero la modalità di trasmissione e il rischio di ricorrenza della patologia nella prole. In particolare, ai genitori dei bambini affetti o, nel caso di individui adulti, al probando stesso, talvolta in presenza anche del partner e/o familiari, viene spiegato che circa il 60% dei casi di retinoblastoma è sporadico, mentre il restante 40% è rappresentato da casi familiari con trasmissione autosomica dominante, dovuti alla presenza di un'alterazione costitutiva nel gene *RBI*. Viene inoltre sottolineato che coloro che presentano un'alterazione del gene *RBI* a livello costitutivo hanno una probabilità di circa il 50% di trasmetterla ai propri figli, in

particolare, il rischio di ricorrenza del retinoblastoma nella prole è di circa il 45%, considerando che la penetranza della malattia è di circa il 90%. In base alla storia familiare e personale viene inoltre riferita la probabilità a priori che nell'affetto sia presente una mutazione costitutiva, elevata nei casi familiari, bilaterali o multifocali, bassa invece nei casi unilaterali unifocali. Vengono inoltre sottolineati i possibili bias, legati sia all'età del probando al momento della diagnosi, nel caso di bambini molto piccoli, sia al fatto che spesso, quando il tumore viene diagnosticato, è già in fase avanzata e pertanto non è nota la mono o multifocalità.

Viene inoltre spiegato il tipo di indagine genetica che verrà avviata, sottolineando che essa richiede tempi di attesa lunghi, non inferiori ai sei mesi, e che presenta dei limiti legati al fatto che la sensibilità delle tecniche impiegate non raggiunge il 100%. Pertanto, nel caso in cui l'analisi identifichi una mutazione costitutiva patogenetica viene confermata la presenza di una predisposizione ereditaria allo sviluppo del tumore con rischio di ricorrenza nella prole; invece, nel caso in cui l'analisi risulti normale, viene spiegato che esiste la possibilità di un falso negativo, ovvero uno di quei casi in cui la mutazione costitutiva è presente, ma le tecniche a nostra disposizione non sono in grado di rilevarla. Tale possibilità è elevata nei casi familiari, bilaterali o multifocali risultati normali all'analisi molecolare, mentre è più bassa nei casi unilaterali unifocali.

Nel caso in cui venga identificata una mutazione costitutiva nel probando, viene inoltre spiegato che soprattutto in presenza di bambini molto piccoli, sono necessari controlli oculistici a frequenza ravvicinata per la possibile comparsa di nuovi focolai. Sebbene venga fatto presente che gli individui con mutazione costitutiva nel gene *RBI* presentano un rischio aumentato di sviluppare altri tumori, quali osteosarcomi, sarcomi dei tessuti molli, melanomi e carcinomi epiteliali, viene spiegato che non c'è una sorveglianza specifica per prevenire o diagnosticare precocemente la comparsa di tali neoplasie.

Se la mutazione viene identificata in un bambino, viene solitamente consigliata una consulenza genetica preconcezionale in età fertile. Nel caso in cui venga identificata in persone adulte viene spiegata la possibilità di eseguire una diagnosi prenatale invasiva, mediante prelievo di villi coriali o liquido amniotico, eseguiti rispettivamente nel primo e nel secondo trimestre di gestazione, al fine di ricercare l'eventuale presenza nel feto, della mutazione identificata. Vengono pertanto discusse tutte le implicazioni di una diagnosi prenatale invasiva, sottolineandone i benefici ed i rischi. In particolare,

viene spiegato che esiste un rischio di aborto in seguito all'esame di circa l'1% aborto e che qualora venga riscontrata nel feto la mutazione, non esistono terapie specifiche, ma solo la possibilità di eseguire un'interruzione di gravidanza. Viene tuttavia sottolineato che ad essere ereditata è la predisposizione allo sviluppo del tumore e che, sebbene la penetranza della patologia sia elevata, in circa il 10% dei casi essa non si manifesta o determina la comparsa di lesioni minime. Inoltre, viene sottolineato che grazie ad un controllo del fondo oculare periodico a partire dalla nascita è spesso possibile diagnosticare i tumori in una fase molto precoce ed intervenire con terapie conservative.

L'identificazione di una mutazione costitutiva nel probando consente di estendere l'analisi anche ad altri familiari, in particolare i genitori del probando, anche nei casi apparentemente sporadici, in modo tale da identificare eventuali altri soggetti a rischio e stabilire il corretto rischio di ricorrenza. La ricerca di una mutazione nota viene eseguita in tempi rapidi e fornisce una risposta sicura, poiché viene semplicemente valutata la presenza o assenza di una mutazione in un determinato familiare. Nei genitori in cui non viene identificata la mutazione, viene spiegato che essa è verosimilmente insorta "de novo" nel gamete di uno dei due ed in tal caso per questi ultimi il rischio di ricorrenza di malattia in eventuali ulteriori figli è paragonabile a quello della popolazione generale. Viene tuttavia fatto presente che esiste la possibilità, seppur rara, di mosaicismo germinale, ovvero la presenza di più ovociti o spermatozoi con la mutazione, e pertanto non è possibile escludere un minimo rischio di ricorrenza nei genitori di un affetto, risultati normali all'analisi molecolare. Viene pertanto segnalato che, qualora lo richiedano, è possibile eseguire una diagnosi prenatale in caso di future gravidanze.

In tutti i probandi in cui non viene identificata una mutazione costitutiva, è raccomandata una sorveglianza oculistica con frequenza da concordare con lo specialista di riferimento. In questi casi è inoltre opportuna una valutazione del fondo oculare nei genitori, al fine di identificare la presenza di eventuali segni minimi di malattia, e in eventuali altri figli al momento della nascita.

Al termine della consulenza viene eseguito un prelievo ematico al probando e ai genitori, qualora presenti, previa acquisizione del consenso informato scritto. Viene infine spiegato che ad indagine conclusa, viene fornita loro una relazione scritta, contenente le informazioni cliniche del probando e dei familiari, le informazioni relative all'indagine eseguita e all'esito, e le considerazioni connesse al risultato dell'indagine, il

cui referto viene allegato. Si informa inoltre che una copia della risposta verrà spedita anche allo specialista inviante.

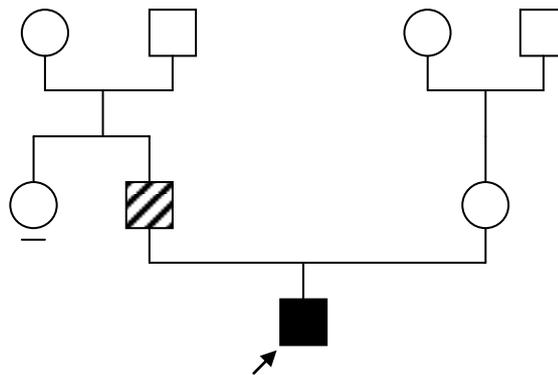
4.1 Caso 1 (consulenza n. 2311)

QUADRO CLINICO ED ANAMNESI FAMILIARE

Probando, di 22 mesi, giunto in consulenza insieme ai genitori durante il ricovero in Clinica Pediatrica. Gravidanza normodecorsa con parto spontaneo a termine. Sviluppo psicomotorio nella norma. All'età di 8 mesi, diagnosi di retinoblastoma bilaterale, trattato con chemioterapia sistemica e consolidamento locale. All'esame obiettivo non sono state evidenziate caratteristiche facciali e fisiche peculiari.

Padre, 38 anni, con pregresso intervento per osteosarcoma della coscia destra, diagnosticato all'età di 14 anni. Fondo oculare riferito nella norma.

L'albero genealogico mostra le seguenti caratteristiche:



ESAMI RICHIESTI ED ESITO

Eseguito prelievo ematico al probando e ai genitori. Sul DNA estratto è stata effettuata l'analisi molecolare del gene *RBI* responsabile, se mutato, del retinoblastoma. L'indagine ha evidenziato la presenza di una mutazione puntiforme patogenetica (g.156713C>T nell'esone 20), in eterozigosi, sia nel probando che nel padre.

La mutazione identificata è stata successivamente ricercata anche nel DNA dei nonni paterni del probando. L'analisi ha evidenziato la presenza della mutazione del gene *RBI* nella nonna paterna. Infine, la mutazione identificata è stata ricercata nel DNA della zia paterna, risultando assente in quest'ultima.

INDICAZIONI FORNITE

Nel caso del probando, data la bilateralità del tumore, era elevata la probabilità a priori di identificare una mutazione a livello costitutivo. Tale ipotesi è stata confermata dall'esito dell'analisi molecolare che ha individuato la presenza di una mutazione in eterozigosi. La mutazione identificata è stata ricercata anche nel DNA dei genitori, risultando presente nel padre. È stato pertanto spiegato che tale risultato può essere legato sia alla bassa penetranza della malattia che si apprezza in alcune famiglie sia alla sua variabile espressività. In tal caso la malattia si sarebbe espressa nel padre del probando come osteosarcoma, mutazioni del gene *RBI* sono state infatti riportate in casi di osteosarcoma primario isolato. È stata pertanto suggerita l'esecuzione di un esame accurato del fundus oculi, volto alla ricerca di eventuali retinomi nel padre del probando.

Dato il risultato dell'analisi molecolare è stato fatto presente che sia il probando che il padre hanno una probabilità di circa il 50% di trasmettere alla prole la mutazione del gene *RBI*, in particolare, il rischio di ricorrenza della malattia è di circa il 45% (penetranza della malattia di circa il 90%). È stata pertanto raccomandata l'effettuazione di un consulenza genetica preconcezionale nel probando in epoca fertile. È stato inoltre segnalato che l'identificazione della mutazione del gene *RBI*, rende possibile, in caso di gravidanza e qualora richiesto, la diagnosi prenatale previo prelievo di villi coriali o amniocentesi.

Al fine di verificare se l'alterazione identificata fosse insorta "de novo" nel padre del probando o fosse stata ereditata da uno dei nonni paterni, è stato richiesto a questi ultimi di effettuare un esame accurato del fundus oculi ed un prelievo ematico per la ricerca della specifica mutazione. L'analisi ha riscontrato la presenza della mutazione nella nonna paterna, ma l'analisi del fundus oculi è risultata nella norma. È stato pertanto spiegato che presumibilmente la signora rientra in quella minima percentuale di soggetti che pur presentando la mutazione del gene *RBI* non sviluppano il retinoblastoma.

Infine, in considerazione del rischio a priori del 50% per la zia paterna, di aver ereditato la mutazione, l'analisi è stata estesa anche a quest'ultima. Dato l'esito normale dell'indagine è stato fatto presente che la zia paterna non è a rischio di trasmettere la malattia all'eventuale prole.

4.2 Caso 2 (consulenza n. 1044)

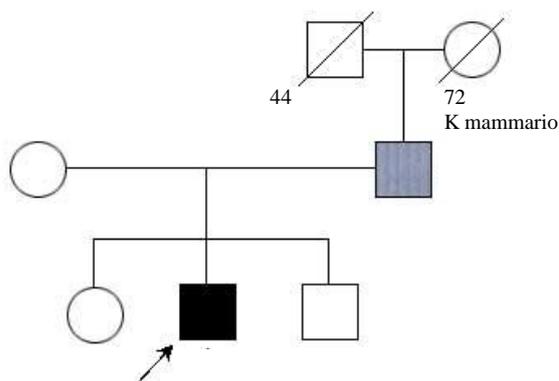
QUADRO CLINICO ED ANAMNESI FAMILIARE

Probando, di 3 anni e 10 mesi, giunto in consulenza insieme ai genitori durante il ricovero in Oculistica. Gravidanza normodecorsa con parto spontaneo a termine. Sviluppo psicomotorio nella norma. All'età di 4 mesi, diagnosi di retinoblastoma bilaterale, trattato con enucleazione dell'occhio destro e successiva chemioterapia, laserterapia, radioterapia ed infine enucleazione anche dell'occhio sinistro. All'esame obiettivo non sono state evidenziate caratteristiche facciali e fisiche peculiari.

Padre, di 40 anni, con riscontro di retinoma in occhio sinistro all'età di 37 anni, in seguito alla diagnosi di retinoblastoma nel figlio.

Sorella maggiore e fratello minore, rispettivamente di 9 e 2 anni, in apparente stato di buona salute.

L'albero genealogico mostra le seguenti caratteristiche:



ESAMI RICHIESTI ED ESITO

Eseguito prelievo ematico al probando e ai genitori. Sul DNA estratto è stata effettuata l'analisi molecolare del gene *RBI* responsabile, se mutato, del retinoblastoma. L'indagine ha evidenziato la presenza di una mutazione puntiforme patogenetica (c.2106+2 T>C nel sito di splicing al 5' dell'introne 20), in eterozigosi, sia nel probando che nel padre.

La mutazione identificata è stata successivamente ricercata anche nel DNA dei fratelli del probando, risultando assente in entrambi.

INDICAZIONI FORNITE

Nel caso del probando, data la bilateralità del tumore, era elevata la probabilità a priori di identificare una mutazione a livello costitutivo. Tale ipotesi è stata confermata dall'esito dell'analisi molecolare che ha individuato la presenza di una mutazione in eterozigosi. La mutazione identificata è stata ricercata anche nel DNA dei genitori, risultando presente nel padre, il quale presenta un retinoma, il quale è stato spiegato che può essere riconducibile sia alla bassa penetranza della malattia che si apprezza in alcune famiglie sia alla sua variabile espressività.

Dato il risultato dell'analisi molecolare è stato fatto presente che sia il probando che il padre hanno una probabilità di circa il 50% di trasmettere alla prole la mutazione del gene *RBI*, in particolare, il rischio di ricorrenza della malattia è di circa il 45% (penetranza della malattia di circa il 90%). È stata pertanto raccomandata l'effettuazione di un consulenza genetica preconcezionale nel probando in epoca fertile. È stato inoltre segnalato che l'identificazione della mutazione del gene *RBI*, rende possibile, in caso di gravidanza e qualora richiesto, la diagnosi prenatale previo prelievo di villi coriali o amniocentesi.

Infine, in considerazione del rischio a priori del 50% anche per gli fratelli del probando, di aver ereditato la mutazione, l'analisi è stata estesa anche a quest'ultimi. Dato l'esito normale dell'indagine in entrambi è stato fatto presente che quest'ultimi non sono a rischio di sviluppare la malattia, né di trasmetterla all'eventuale prole.

4.3 Caso 3 (consulenza n. 1043)

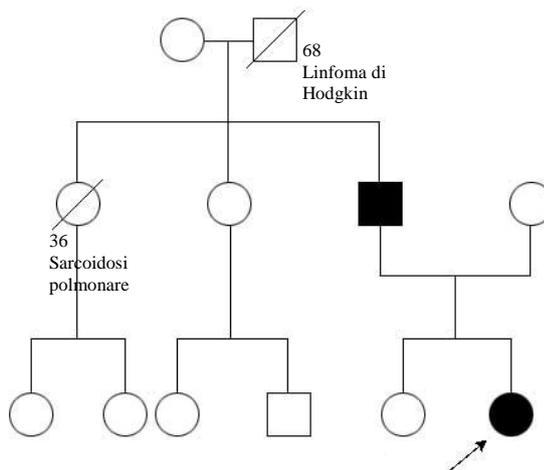
QUADRO CLINICO ED ANAMNESI FAMILIARE

Probanda, di 2 anni e 5 mesi, giunta in consulenza insieme ai genitori durante il ricovero in Oculistica. Gravidanza normodecorsa con parto spontaneo a termine. Sviluppo psicomotorio nella norma. All'età di 14 mesi, diagnosi di retinoblastoma unilaterale in occhio sinistro, trattato con chemioterapia sistemica e laserterapia. All'esame obiettivo non sono state evidenziate caratteristiche facciali e fisiche peculiari.

Padre, di 46 anni, sottoposto ad enucleazione dell'occhio sinistro all'età di 15 mesi, per causa non meglio specificata (sospetto retinoblastoma).

Sorella maggiore, di 7 anni, in apparente stato di buona salute. Ripetute valutazioni del fondo oculare riferite nella norma.

L'albero genealogico mostra le seguenti caratteristiche:



ESAMI RICHIESTI ED ESITO

Eseguito prelievo ematico alla probanda e ai genitori. Sul DNA estratto è stata effettuata l'analisi molecolare del gene *RBI* responsabile, se mutato, del retinoblastoma. L'indagine ha evidenziato la presenza di una mutazione puntiforme patogenetica (c.58delC nell'esone 1), in eterozigosi, sia nella probanda che nel padre.

La mutazione identificata è stata successivamente ricercata anche nel DNA della sorella della probanda, risultando anch'essa portatrice della mutazione.

INDICAZIONI FORNITE

Nel caso della probanda, nonostante la unilateralità del tumore, nel sospetto di una forma familiare di retinoblastoma, era elevata la probabilità a priori di identificare una mutazione a livello costitutivo. Tale ipotesi è stata confermata dall'esito dell'analisi molecolare che ha individuato la presenza di una mutazione in eterozigosi. La mutazione identificata è stata ricercata anche nel DNA dei genitori, risultando presente nel padre. È stato pertanto spiegato che in quest'ultimo la causa di enucleazione dell'occhio sinistro era stata effettivamente la presenza di retinoblastoma.

Dato il risultato dell'analisi molecolare è stato fatto presente che sia la probanda che il padre hanno una probabilità di circa il 50% di trasmettere alla prole la mutazione del gene *RBI*, in particolare, il rischio di ricorrenza della malattia è di circa il 45% (penetranza della malattia di circa il 90%). È stata pertanto raccomandata l'effettuazione di un consulenza genetica preconcezionale nella probanda in epoca fertile. È stato inoltre segnalato che l'identificazione della mutazione del gene *RBI*, rende possibile, in caso di gravidanza e qualora richiesto, la diagnosi prenatale previo prelievo di villi coriali o amniocentesi.

Infine, in considerazione del rischio a priori del 50% anche per la sorella della probanda, di aver ereditato la mutazione, l'analisi è stata estesa anche a quest'ultima. Poiché l'indagine ha evidenziato anche in lei la presenza della mutazione, è stato spiegato che tale evento rappresenta un caso di penetranza (presenza della mutazione, ma assenza di retinoblastoma). Sebbene l'insorgenza del retinoblastoma è rara dopo i 7 anni di vita, è stata raccomandata l'effettuazione periodica dell'esame del fondo oculare alla sorella della probanda. È stato infine spiegato che anche quest'ultima ha un rischio di circa il 50% di trasmettere la mutazione all'eventuale prole e pertanto raccomandata l'effettuazione di un consulenza genetica preconcezionale in epoca fertile.

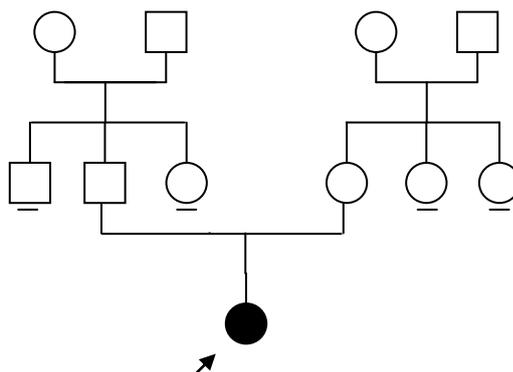
4.4 Caso 4 (consulenza n. 4593)

QUADRO CLINICO ED ANAMNESI FAMILIARE

Probanda, di 2 anni e 1 mese, giunta in consulenza insieme ai genitori durante il ricovero in Oculistica. Gravidanza normodecorsa con parto spontaneo a termine. Sviluppo psicomotorio nella norma. All'età di 2 anni, diagnosi di retinoblastoma unilaterale multifocale, trattato con due cicli di chemioterapia intrarteriosa con Melphalan. All'esame obiettivo sono state evidenziate le seguenti caratteristiche: peso 18,500 kg (>97°cnt), altezza: 87 cm (50°-75°cnt), COF 49 cm (75°cnt), naso corto con narici anteverse, bocca conformata ad "M" con angoli rivolti in basso e lieve peluria.

Genitori in apparente stato di buona salute. Non eseguita valutazione del fondo oculare in entrambi.

L'albero genealogico mostra le seguenti caratteristiche:



ESAMI RICHIESTI ED ESITO

Eseguito prelievo ematico alla probanda e ai genitori. Sul DNA estratto è stata effettuata l'analisi molecolare del gene *RBI* (ricerca di mutazioni puntiformi e delezioni) responsabile, se mutato, del retinoblastoma. L'indagine eseguita nella probanda non ha evidenziato alterazioni.

INDICAZIONI FORNITE

Nel caso della probanda, la multifocalità del retinoblastoma rendeva plausibile l'ipotesi della presenza di una mutazione costituzionale. L'analisi molecolare effettuata tuttavia non ha permesso di identificare alcuna mutazione a livello costituzionale. È stato tuttavia fatto presente che, dal momento che una percentuale minima di mutazioni a carico del gene *RBI* può non essere evidenziata con le tecniche ad oggi impiegate, e tenendo conto della multifocalità del retinoblastoma, la presenza di una mutazione costituzionale non può essere esclusa.

Nel caso di mutazione costitutiva nel gene *RBI*, è stato spiegato che il rischio di ricorrenza della malattia nell'eventuale prole della probanda, può essere valutato di poco inferiore al 50% ad ogni gravidanza, indipendentemente dal sesso del nascituro. È stato pertanto raccomandato l'effettuazione di una consulenza genetica preconcezionale in epoca fertile.

Nel caso di mutazione costitutiva nella probanda, è stato fatto presente che con elevata probabilità è insorta de novo al momento del concepimento, e quindi è assente nel DNA dei genitori. In tal caso il rischio di ricorrenza per quest'ultimi risulterebbe trascurabile. È stata tuttavia consigliata una valutazione oculistica mirata in entrambi i genitori, facendo presente che anche nel caso di assenza di segni di malattia, poichè la penetranza è incompleta, non può essere del tutto escluso un possibile rischio di ricorrenza che si attesta, secondo dati empirici, intorno all'1-2%. Pertanto, nel caso di successive gravidanze è stata consigliata una valutazione oculistica precoce alla nascita.

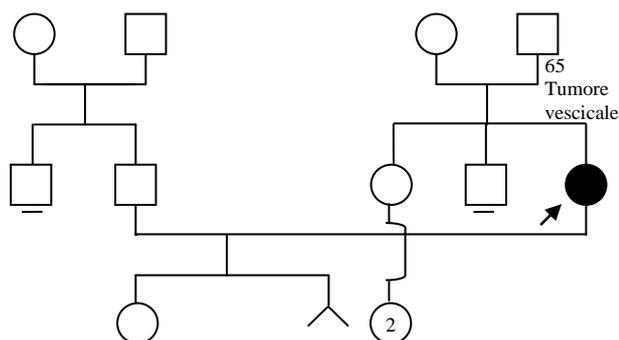
4.5 Caso 5 (consulenza n. 4090)

QUADRO CLINICO ED ANAMNESI FAMILIARE

Probanda, di 31 anni, giunta in consulenza prenatale, insieme al marito e alla figlia, su indicazione dell'oculista. All'età di 2 mesi, diagnosi di retinoblastoma bilaterale, trattato con enucleazione dell'occhio destro e successiva radioterapia, chemioterapia sistemica e fotocoagulazione dell'occhio sinistro. Riferito cariotipo femminile normale. Al momento della consulenza la signora era alla 21⁺¹ settimana di gestazione, con ecografie durante la gravidanza risultate nella norma.

Figlia, 2 anni e 7 mesi, sottoposta, fin dalla nascita, ad esame del fondo oculare, sempre risultato nella norma.

L'albero genealogico mostra le seguenti caratteristiche:



ESAMI RICHIESTI ED ESITO

Eseguito prelievo ematico alla probanda e alla figlia. Sul DNA estratto è stata effettuata l'analisi molecolare del gene *RBI* responsabile, se mutato, del retinoblastoma. Tale indagine ha evidenziato la presenza di una mutazione puntiforme patogenetica (g.150037C>T nell'esone 18) in eterozigosi nella probanda, risultata assente nel DNA della figlia.

INDICAZIONI FORNITE

Nel caso della probanda, data la bilateralità del tumore, era elevata la probabilità a priori di identificare una mutazione a livello costitutivo. Tale ipotesi è stata confermata dall'analisi molecolare.

È stato spiegato che i soggetti che, come la signora, presentano una mutazione a livello costitutivo hanno una probabilità di circa il 50% di trasmetterla ai propri figli, in particolare, il rischio di ricorrenza della malattia nella prole è di circa il 45% (penetranza della malattia di circa il 90%).

In considerazione del rischio a priori, la mutazione identificata nel DNA della signora è stata ricercata anche nel DNA della figlia. Tale indagine è risultata negativa, indicando che la bambina non ha ereditato l'alterazione del gene *RBI* presente nella madre e non è a rischio di sviluppare la patologia né di trasmetterla all'eventuale prole.

Inoltre, è stato spiegato che l'identificazione della mutazione del gene *RBI*, rende possibile, in caso di gravidanza e qualora richiesto, la diagnosi prenatale previo prelievo di villi coriali o liquido amniotico. Tuttavia, è stato fatto presente che, nel caso della signora, data l'età gestazionale avanzata, e dato che non era ancora nota la mutazione nel gene *RBI*, non è stato possibile offrire la diagnosi prenatale nella gravidanza in corso. È stata pertanto segnalata la possibilità di eseguire l'analisi al momento della nascita, al fine di programmare il corretto follow up oculistico.

4.6 Caso 6 (consulenza n. 5041)

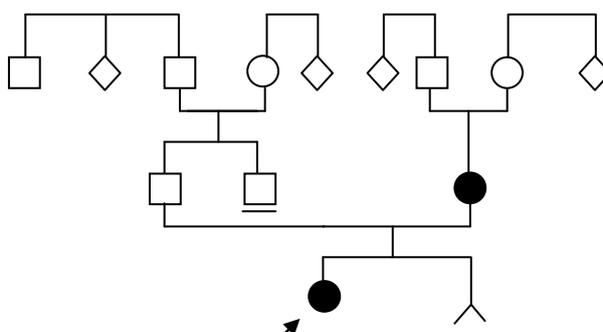
QUADRO CLINICO ED ANAMNESI FAMILIARE

Probanda, di 10 mesi, giunta in consulenza insieme ai genitori, durante un ricovero in Clinica Pediatrica. Parto spontaneo eutocico a termine. Pochi giorni dopo la nascita, diagnosi di retinoblastoma bilaterale, trattato con chemioterapia sistemica, fotocoagulazione e successivamente con chemioterapia intrarteriosa con Melphalan. All'esame obiettivo sono state evidenziate le seguenti caratteristiche: peso 8,3 Kg (25° cnt), lunghezza 70 cm (25° cnt), circonferenza cranica 43 cm (25° cnt), orecchie anteverse, clinodattilia del 2° e 4° dito dei piedi.

Madre, di 30 anni, con diagnosi di retinoblastoma bilaterale, trattato con enucleazione di entrambi gli occhi all'età di 5 mesi, e di osteosarcoma all'età di 26 anni. Giunta in consulenza alla 15⁺⁴ settimana di gestazione. Analisi molecolare del gene *RBI* tramite sequenziamento, effettuata presso altro centro, riferita negativa.

Padre, di 39 anni, con progressi interventi per fibroma benigno ossificante localizzato alla base cranica, diagnosticato all'età di 6 anni, con lesione secondaria dei nervi ottici.

L'albero genealogico mostra le seguenti caratteristiche:



ESAMI RICHIESTI ED ESITO

Eseguito prelievo ematico della probanda e della madre. Sul DNA estratto è stata effettuata l'analisi molecolare del promotore del gene *RBI* e la ricerca di delezioni tramite tecnica di MLPA. Tale indagine ha evidenziato nella probanda e nella madre la presenza di una delezione intragenica (delezione dall'esone 1 al 14) in eterozigosi.

Successivamente su un'aliquota di DNA estratto da liquido amniotico della gravidanza in corso della signora è stata effettuata ricerca della specifica mutazione, tramite tecnica di PCR quantitativa. L'indagine ha riscontrato nel DNA fetale la presenza della mutazione in condizione di eterozigosi. Sul DNA fetale è stata inoltre effettuata analisi di QF-PCR, al fine di evidenziare eventuali anomalie a carico dei cromosomi 13, 18, 21, X e Y. Tale analisi è risultata normale.

INDICAZIONI FORNITE

Data la familiarità del tumore era elevata la probabilità a priori di identificare una mutazione a livello costitutivo. Tale ipotesi è stata confermata dall'esito dell'analisi effettuata. È stato spiegato che i soggetti che, come la probanda e la madre, presentano una mutazione a livello costitutivo, hanno una probabilità di circa il 50% di trasmetterla ai propri figli, in particolare, il rischio di ricorrenza della malattia nella prole è di circa il 45% (penetranza della malattia di circa il 90%). È stato pertanto raccomandata alla probanda una consulenza preconcezionale in età fertile.

Inoltre, poiché l'identificazione della mutazione rende possibile la diagnosi prenatale invasiva, è stata discussa con la madre della probanda la possibilità di eseguire un prelievo di liquido amniotico, in considerazione dell'età gestazionale. È stato tuttavia fatto presente che l'analisi del gene *RBI* sul DNA fetale, tramite tecnica MLPA o Array-CGH, è tecnicamente complessa e pertanto vi può essere la possibilità di referto non conclusivo. È stato inoltre segnalato che in caso di prelievo di liquido amniotico ematico, è necessario effettuare una coltura di amniociti, pertanto i tempi di attesa per la risposta si allungano oltre i 20 giorni. Infine, è stata spiegata la possibilità, qualora richiesto, di effettuare l'analisi di QF-PCR, che consente di avere una risposta in 48-72 ore relativamente alle principali aneuploidie fetali a carico dei cromosomi 13, 18, 21, X e Y. Poiché la signora ha deciso di sottoporsi ad amniocentesi, è stato possibile eseguire l'analisi sul DNA fetale, che ha evidenziato la presenza della mutazione nel feto. Alla signora è stato spiegato che il tipo di mutazione riscontrata nel feto presenta una penetranza del 99% e pertanto è stato possibile predire che il feto avrebbe sviluppato la malattia con una probabilità del 99%. Dopo lungo colloquio, la signora si è dimostrata orientata a non proseguire la gravidanza ed ha pertanto richiesto informazioni sull'iter previsto dalla normativa vigente.

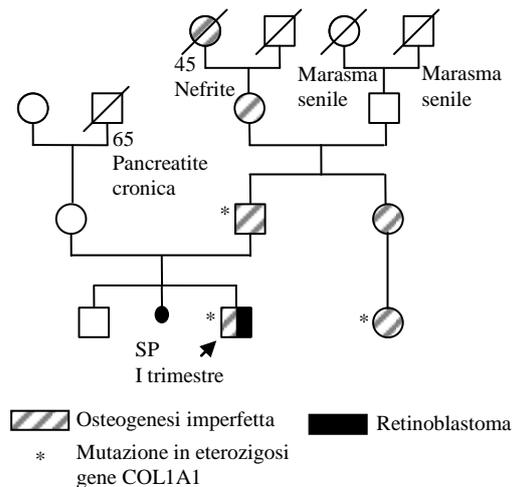
4.7 Caso 7 (consulenza n. 6224)

QUADRO CLINICO ED ANAMNESI FAMILIARE

Probando, di 10 mesi, giunto in consulenza insieme ai genitori, durante il ricovero in Clinica Pediatrica. Durante la gravidanza eseguita, mediante prelievo di villi coriali, diagnosi prenatale per osteogenesi imperfetta, con riscontro della mutazione patogenetica del gene *COL1A1*, precedentemente identificata nel padre. Parto a termine con taglio cesareo programmato. All'età di 10 mesi, diagnosi di retinoblastoma bilaterale, trattato con chemioterapia sistemica. All'esame obiettivo sono state evidenziati ritardo di crescita staturo-ponderale (lunghezza 67 cm, <5°cnt; peso 7730 g, <3°cnt), COF 46 cm (25°-50°cnt), fontanella anteriore ampia, sclere lievemente blu e accenno a coste svasate alla base.

Padre, di 47 anni, con diagnosi clinica e molecolare di osteogenesi imperfetta.

L'albero genealogico mostra le seguenti caratteristiche:



ESAMI RICHIESTI ED ESITO

Eseguito un prelievo ematico al probando e ad entrambi i genitori. Sul DNA estratto è stata effettuata l'analisi molecolare del gene *RBI* responsabile, se mutato, del retinoblastoma. L'analisi ha evidenziato nel probando la presenza di una mutazione puntiforme patogenetica (c.958C>T), in condizione di eterozigosi, assente nel DNA dei genitori.

INDICAZIONI FORNITE

Nel caso del probando, data la bilateralità del tumore, era elevata la probabilità a priori di identificare un'alterazione a livello costitutivo. Tale ipotesi è stata confermata dall'analisi molecolare. La mutazione identificata nel DNA del probando è stata ricercata anche nel DNA dei genitori. Tale indagine è risultata negativa, rendendo pertanto verosimile che la mutazione sia insorta "de novo" nel figlio al momento del concepimento. È stato fatto presente che in tal caso il rischio di ricorrenza di malattia in altri eventuali figli dei coniugi è paragonabile a quello della popolazione generale. Tuttavia, data la possibilità di mosaicismo germinale (presenza di più ovociti o spermatozoi con la mutazione in genitori sani), non è possibile escludere un minimo rischio di ricorrenza. È stato sottolineato che l'identificazione dell'alterazione del gene *RBI*, rende possibile, in caso di gravidanza e qualora richiesto, la diagnosi prenatale previo prelievo di villi coriali o liquido amniotico.

È stato spiegato che i soggetti che, come il probando, presentano un'alterazione del gene *RBI* a livello costitutivo hanno una probabilità di circa il 50% di trasmetterla ai propri figli, in particolare, il rischio di ricorrenza del retinoblastoma nella prole è di circa il 45% (penetranza della malattia di circa il 90%).

È stato inoltre ribadito che l'osteogenesi imperfetta, patologia che segrega nella famiglia del probando, è caratterizzata da aumentata fragilità scheletrica, ridotta massa ossea e suscettibilità alle fratture ossee, e presenta un'ampia variabilità clinica inter e intrafamiliare. Pertanto è stata raccomandata l'effettuazione di fisioterapia precoce, valutazioni ortopediche periodiche, valutazione uditiva a partire dall'età di 3 anni con frequenza biennale e valutazione odontoiatrica dopo la comparsa della dentizione permanente. È stato inoltre ribadito che l'osteogenesi imperfetta si trasmette con modalità autosomica dominante, pertanto i soggetti affetti, come il probando ed il padre, hanno una probabilità a priori del 50% di trasmettere la mutazione ai propri figli.

È stata infine consigliata l'effettuazione di una consulenza genetica preconcezionale in età fertile.

4.8 Caso 8 (consulenza n. 2691)

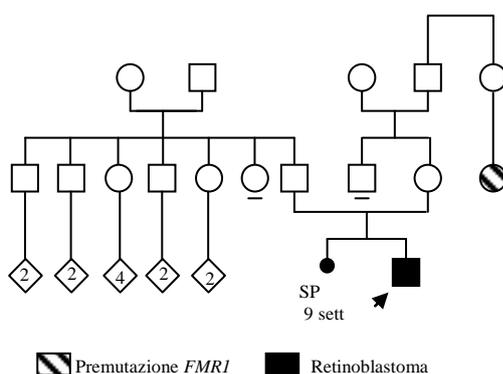
QUADRO CLINICO E ANAMNESI FAMILIARE

Probando, di 16 mesi, giunto in consulenza insieme ai genitori, durante un ricovero in Clinica Pediatrica. Gravidanza decorsa con minacce d'aborto dal 3° mese e parto alla 37° settimana di gestazione. Riferita acquisizione della stazione seduta a 8 mesi, della lallazione a 8 mesi e della deambulazione autonoma dopo i 16 mesi. All'età di 14 mesi, diagnosi di retinoblastoma unilaterale, trattato con cicli di chemioterapia sistemica e crioterapia. Riscontro, presso altro centro di delezione del cromosoma 13, comprendente il gene *RBI*. RMN encefalo risultata normale. All'esame obiettivo sono state riscontrate le seguenti caratteristiche: peso 10,370 Kg (25°-50° cnt), lunghezza 77 cm (10°-25° cnt), COF 49 cm (75°-90° cnt), fronte ampia, bozze frontali, rime palpebrali allungate con eversione del terzo distale della palpebra inferiore, ponte nasale depresso, filtro appiattito, lobi delle orecchie lievemente anteversi.

Genitori, entrambi di 31 anni, in apparente stato di buona salute.

Una cugina di primo grado della madre (II-10) presenta una premutazione nel gene *FMRI* (un allele lungo 32 CGG ed uno lungo 130 CGG), identificata presso altro centro, in seguito alla comparsa di insufficienza ovarica prematura (POF).

L'albero genealogico mostra le seguenti caratteristiche:



ESAMI RICHIESTI ED ESITO

Eseguito prelievo ematico al probando e ai genitori. Al fine di definire l'estensione della delezione identificata sul DNA estratto è stata effettuata analisi di array-CGH. Tale analisi ha rilevato che la delezione del cromosoma 13, include le regioni q13.3 e q21.33 ed ha un'estensione di 34.6 Mb.

La presenza della delezione individuata nel probando è stata inoltre ricercata nel DNA dei genitori con tecnica di MLPA. Tale indagine ha evidenziato che la delezione è assente nel DNA dei genitori. Su un'aliquota di DNA della madre del probando è stata effettuata l'analisi del gene *FMRI*. Tale indagine ha evidenziato un normale range di ripetute.

Su una un'aliquota di DNA estratto da amniociti di una gravidanza successiva della madre del probando è stata ricercata la specifica delezione tramite analisi di array-CGH. Tale indagine è risultata normale.

INDICAZIONI FORNITE

L'insieme delle caratteristiche cliniche e l'esito dell'indagine effettuata indicano che il probando è affetto da sindrome da delezione interstiziale del braccio lungo del cromosoma 13 (q14). Ai genitori è stato spiegato che tale sindrome si caratterizza per la presenza di un fenotipo complesso costituito dall'associazione di retinoblastoma, ritardo motorio e caratteristiche facciali e fisiche peculiari. In particolare è frequente il riscontro di una fronte ampia e alta e di lobi auricolari anteversti, come nel probando.

Le analisi molecolari effettuate hanno dimostrato che la delezione individuata nel probando non è presente nel DNA dei genitori. Pertanto è stato spiegato che è probabile che tale delezione sia insorta *de novo* nel gamete di uno dei genitori. E' stato fatto presente che in presenza di delezioni *de novo* il rischio di ricorrenza della malattia in eventuali future gravidanze della coppia e nei familiari risulta essere nullo.

Alla madre del probando è stato spiegato che l'identificazione dell'alterazione patogenetica rende possibile la diagnosi prenatale in caso di ulteriori gravidanze, mediante prelievo di villi coriali o di liquido amniotico. Pertanto, ad una successiva gravidanza la signora ha effettuato l'amniocentesi e sul DNA fetale estratto da amniociti, mediante analisi di array-CGH, è stata esclusa la presenza della delezione.

Infine, dato il riscontro in una cugina della signora di una premutazione del gene *FMRI* è stato ritenuto opportuno effettuare l'analisi del gene sul DNA della signora. L'analisi effettuata ha escluso la presenza di un'amplicazione del gene. Pertanto alla signora è stato spiegato che non è a rischio di sviluppare POF, né di generare figli maschi affetti da sindrome dell'X-fragile, condizione associata a mutazioni piene del gene *FMRI*.

4.9 Caso 9 (consulenza n. 3070)

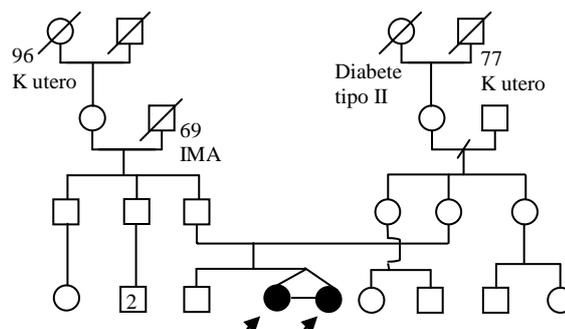
QUADRO CLINICO E ANAMNESI FAMILIARE

Probanda, di 6 mesi, giunta in consulenza durante il ricovero in Clinica Pediatrica, insieme ai genitori, alla sorella gemella e al fratello maggiore. Parto mediante taglio cesareo programmato alla 37^a settimana di gravidanza gemellare bicoriale biamniotica normodecorsa. Parametri auxologici alla nascita: peso 2040 gr (<-1DS), lunghezza 42 cm (<-2DS), circonferenza cranica 31,5 cm (10°-25°cnt) e indice di Apgar 10 e 10, al 1' e al 5'. A 6 mesi di vita, non ancora acquisito il controllo del capo. A 5 mesi comparsa di episodio convulsivo e successiva diagnosi di retinoblastoma monolaterale bifocale a carico dell'occhio sinistro. Riscontro di "lieve dilatazione del sistema ventricolare sovratentoriale in relazione ad agenesia parziale del corpo calloso" alla RMN encefalo e "difetto interatriale di 3 mm con shunt sinistro>destro e lieve dilatazione delle camere destre" all'ecocardiografia. All'esame obiettivo sono state riscontrate le seguenti caratteristiche: peso 5160 g (<5° cnt), lunghezza 62 cm (25° cnt), COF 39,8 cm (3°-10° cnt), brachicefalia asimmetrica, fronte ampia e spaziosa, filtro ben disegnato, labbro superiore sottile, clinodattilia del 3°, 4° e 5° dito dei piedi con 3° dito che va a posizionarsi sotto il 2° e cutis marmorata.

Gemella con i seguenti parametri auxologici alla nascita: peso 1950 (<-1DS) e lunghezza 42 cm (<-2DS). All'esame obiettivo sono state riscontrate le seguenti caratteristiche: brachicefalia, fronte ampia e spaziosa, filtro ben disegnato, labbro superiore sottile, anomalie delle dita dei piedi simili alla gemella e cutis marmorata. Successivamente alla consulenza riferita insorgenza di retinoblastoma.

Genitori e fratello maggiore in apparente stato di buona salute, con esame del fondo oculare riferito normale, ad eccezione di riscontro di un nevo oculare nel padre.

L'albero genealogico della famiglia mostra le seguenti caratteristiche:



ESAMI RICHIESTI ED ESITO

Eseguito prelievo ematico alle gemelle, al fratello maggiore e ai genitori. Sul DNA estratto delle gemelle è stata eseguita la ricerca di eventuali delezioni del gene *RBI*, responsabili di retinoblastoma. L'analisi effettuata tramite MLPA ha evidenziato la presenza di una delezione in 13q14, coinvolgente il gene *RBI*, in entrambe. Successivamente è stata effettuata l'analisi tramite array-CGH che ha confermato la presenza della delezione 13q14 ed ha definito l'estensione della stessa che è di circa 34 Mb. L'analisi del DNA dei genitori e del fratello è risultata nella norma. Il test di zigosità eseguito nelle due bambine ha indicato che sono gemelle monozigoti.

INDICAZIONI FORNITE

L'insieme delle caratteristiche cliniche delle gemelle e dell'esito delle indagini genetiche eseguite hanno permesso di porre diagnosi di sindrome da delezione 13q14 in entrambe. Ai genitori è stato spiegato che tale sindrome è caratterizzata da retinoblastoma, ritardo variabile dell'acquisizione delle tappe psicomotorie e caratteristiche facciali e fisiche peculiari, alle quali talvolta possono associarsi anomalie congenite a carico di altri organi.

Le analisi molecolari effettuate dimostrano che la delezione individuata nelle gemelle non è presente nel DNA dei genitori. Tale dato ha fatto ipotizzare che le due gemelle, benché nate da gravidanza bicoriale biamniotica, fossero monozigoti, poiché risulta poco probabile che lo stesso evento mutazionale possa essere insorto indipendentemente in due diversi gameti o che sia presente mosaicismo germinale in uno dei due genitori. Tale ipotesi è stata confermata dal test di zigosità, che ha mostrato un patrimonio identico nelle gemelle.

Ai genitori è stato spiegato che in caso di mutazione de novo il rischio di ricorrenza per eventuali future gravidanze è trascurabile. È stato fatto presente che l'identificazione delle alterazioni patogenetiche rende possibile, qualora richiesto, l'effettuazione di una diagnosi prenatale invasiva, tramite prelievo di villi coriali o di liquido amniotico.

L'analisi effettuata ha infine consentito di escludere la presenza della delezione nel fratello maggiore, che pertanto non è a rischio di sviluppare la malattia, né di trasmetterla alla eventuale prole.

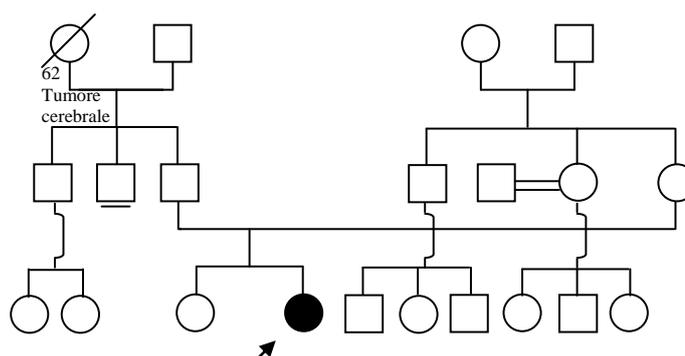
4.10 Caso 10 (consulenza n. 2833)

QUADRO CLINICO E ANAMNESI FAMILIARE

Probanda, di 4 anni, giunta in consulenza insieme ai genitori e alla sorella maggiore, durante un ricovero in Clinica Pediatrica. Parto spontaneo espletato alla 30^a settimana di gestazione per rottura prematura delle membrane. Parametri auxologici alla nascita: peso 1500 g (50°-75° cnt) e lunghezza 46 cm (>90° cnt); non noto il valore della circonferenza cranica. Riferita acquisizione delle tappe dello sviluppo psicomotorio nei tempi fisiologici: prime parole all'età di un anno e acquisizione della deambulazione autonoma tra i 12 e i 18 mesi. All'età di 5 mesi diagnosi di retinoblastoma unilaterale, trattato inizialmente con cicli di chemioterapia e laserterapia ed infine con enucleazione dell'occhio interessato. Riferita presenza di un angioma capillare frontale alla RMN encefalo. A tre anni e mezzo, episodio di insufficienza renale acuta in corso di sindrome emolitica uremica, trattata con sedute di emodiafiltrazione ed emotrasfusione di emazie concentrate. All'esame obiettivo sono state riscontrati peso 17 Kg (50°-75° cnt), altezza 101 cm (25°-50° cnt) e COF 49,5 cm (25°-50° cnt); non evidenziate caratteristiche facciali e fisiche peculiari.

Genitori e sorella maggiore in apparente stato di buona salute, con esame del fondo oculare riferito nella norma.

L'albero genealogico mostra le seguenti caratteristiche:



ESAMI RICHIESTI ED ESITO

Eseguito prelievo ematico alla probanda, alla sorella maggiore e ai entrambi i genitori. Sul DNA estratto della probanda è stata eseguita, mediante tecnica di MLPA,

la ricerca di eventuali delezioni del gene *RBI*, responsabile del retinoblastoma. Tale analisi ha mostrato una delezione totale del gene *RBI* e di alcuni geni fiancheggianti. Successivamente, al fine di definire l'estensione della delezione identificata nella probanda, sul DNA estratto è stata effettuata analisi di array-CGH. Tale analisi ha rilevato che la delezione del cromosoma 13, include le regioni q14.11 e q14.13 ed ha un'estensione di 7,8 Mb. La presenza della delezione individuata è stata inoltre ricercata nel DNA dei genitori e della sorella. Tale indagine ha mostrato che la delezione è assente nel DNA dei genitori e della sorella.

INDICAZIONI FORNITE

Il risultato dell'indagine sopra riportato indica che la probanda presenta una delezione interstiziale del cromosoma 13 coinvolgente il gene *RBI*. Ai genitori è stato spiegato che delezioni di tale regione sono responsabili della "sindrome da delezione interstiziale del braccio lungo del cromosoma 13 (q14)" che si caratterizza per la presenza di un fenotipo complesso, costituito dall'associazione di retinoblastoma, ritardo psicomotorio di grado variabile e caratteristiche facciali e fisiche peculiari. L'esame obiettivo effettuato in sede di consulenza genetica non ha evidenziato nella probanda la presenza di elementi facciali suggestivi di tale sindrome, quali fronte alta e bombata, lobi delle orecchie anteversti, filtro profondo. Inoltre lo sviluppo psicomotorio è risultato apparentemente adeguato all'età. Tuttavia, al fine di escludere un possibile deficit cognitivo di grado lieve è stata consigliata una valutazione mirata.

Le analisi molecolari effettuate hanno dimostrato che la delezione individuata nella probanda non è presente nel DNA dei genitori. È stato spiegato che è probabile che tale delezione sia insorta *de novo* nel gamete di uno dei genitori. In presenza di delezioni *de novo* il rischio di ricorrenza della malattia in eventuali future gravidanze della coppia e nei familiari risulta essere trascurabile. Infine, è stato fatto presente che l'identificazione delle alterazione patogenetica rende possibile, qualora richiesto, l'effettuazione di una diagnosi prenatale invasiva, tramite prelievo di villi coriali o di liquido amniotico.

L'analisi effettuata ha infine consentito di escludere la presenza della delezione anche nella sorella maggiore della probanda, che pertanto non è a rischio di sviluppare la malattia, né di trasmetterla alla eventuale prole.

5. ATTIVITA' DI RICERCA

Diversi studi hanno dimostrato che l'inattivazione di entrambi gli alleli del gene *RBI* è un prerequisito per lo sviluppo del retinoblastoma, ma a tali eventi seguono altre alterazioni genomiche che guidano il processo di trasformazione maligna, in un modello multi-step, che prevede l'attivazione di alcuni oncogeni e l'inattivazione di alcuni oncosoppressori¹⁰⁹. In particolare, i primi studi eseguiti su tessuto tumorale di retinoblastoma mediante CGH convenzionale o PCR quantitativa multipla hanno mostrato la presenza di duplicazioni/amplificazioni ricorrenti a livello di alcune regioni genomiche (1q32, 2p24 e 6p22) e delezioni di altre regioni (16q22)¹¹⁰⁻¹¹⁶, la cui caratterizzazione ha portato all'identificazione di alcuni oncogeni e oncosoppressori candidati: *MDM4* e *KIF14* in 1q32, *MYCN* e *DDX1* in 2p24, *E2F3* e *DEK* in 6p22, *CDH11* e *RBL2* in 16q22²⁶. Nel modello proposto, l'inattivazione di entrambi gli alleli del gene *RBI* (M1 e M2), non era sufficiente a determinare l'inizio del processo tumorale; sulla base della frequenza riscontrata di alcuni riarrangiamenti sono pertanto stati proposti altri eventi chiave, quali duplicazioni 1q32 e 6p22 (M3 e M4), delezione 16q22 e duplicazione/amplificazione 2p24 (M5)¹¹⁶.

Pochi studi invece sono stati condotti per chiarire la relazione a livello molecolare tra retinoma e retinoblastoma, principalmente per la difficoltà di reperire tessuto di retinoma, dal momento che gli individui in cui è presente tale lesione solitamente non necessitano di enucleazione ed inoltre tessuti misti di retinoma/retinoblastoma raramente vengono riscontrati negli occhi enucleati. Tali studi si sono incentrati sulla valutazione dell'espressione di una proteina, p75^{NTR}, recettore delle neurotrofine ad azione pro-apoptotica¹¹⁷, nella retina, nel retinoma e nel retinoblastoma, mettendo in evidenza come l'espressione di tale proteina sia conservata nei primi due tessuti e persa nel retinoblastoma e facendo ipotizzare che la perdita di p75^{NTR} possa accompagnare la trasformazione maligna del tessuto retinico¹¹⁸. Tuttavia, in tali studi non sono state evidenziate alterazioni nel numero di copie di tale gene, suggerendo che la perdita di p75^{NTR} possa essere correlata con mutazioni puntiformi del gene o con eventi epigenetici¹¹⁶. In uno studio successivo è stato inoltre messo in evidenza come nei retinomi vi sia assenza di markers proliferativi (colorazione Ki67), bassi livelli di instabilità genomica ed elevata espressione di proteine associate alla senescenza, a fronte di una ridotta espressione di p16INK4a e p130 ed aumento delle alterazioni genomiche nei retinoblastomi adiacenti, indicando una progressione dal retinoma¹¹⁹. Da parte del nostro gruppo di lavoro è stata impiegata la qPCR per ricercare variazioni nel numero di

copie di quattro geni candidati, coinvolti nella patogenesi del retinoblastoma, indagando tessuto di retinoblastoma, retinoma e retina normale³².

Diversi studi hanno inoltre dimostrato che un meccanismo importante nella patogenesi di diversi tipi di tumore, anche pediatrici, è l'ipermetilazione del promotore, che determina il silenziamento trascrizionale di geni oncosoppressori¹²⁰⁻¹²⁵. Alcuni di questi studi, impiegando tecniche di PCR quantitativa o metilazione specifica, hanno dimostrato un'ipermetilazione di alcuni geni (*MGMT*, *RASSF1A*, *CASP8*, *MLH1*, *RBL2*, *NEUROG1*, *DAP-kinase*, *RUNX3* e *CACNA1G*) nel retinoblastoma¹²⁵⁻¹³¹.

Nell'ambito dell'attività di ricerca sul retinoblastoma da parte del gruppo di lavoro della U.O.C. Genetica Medica di Siena, ho partecipato alla produzione di tre lavori scientifici (Appendice 1, 2, 3), contribuendo alla corretta classificazione clinica dei pazienti, alla discussione critica e alla scrittura. Tali lavori hanno riguardato l'identificazione di eventi chiave nella iniziazione e progressione tumorale, sia in termini di riarrangiamenti genomici (Appendice 1), che di variazioni del numero di copie e di modificazioni epigenetiche di alcuni geni oncosoppressori (Appendice 2) ed infine il ruolo di alcuni geni come modificatori del fenotipo (Appendice 3). In particolare, mediante analisi di array-CGH è stato indagato l'intero genoma, su tessuti di retinoblastoma e retinoma, al fine di individuare regioni critiche e nuovi geni candidati, importanti per l'iniziazione e la progressione tumorale (Appendice 1). Per la prima volta, è stata inoltre impiegata l'analisi di MS-MLPA (Methylation-Specific Multiplex Ligation Probe Amplification), per investigare gli eventi epigenetici e le variazioni del numero di copie in alcuni geni oncosoppressori, confrontando il tessuto tumorale con la retina normale (Appendice 2). Infine, data la scarsità di dati in letteratura riguardanti eventuali geni modificatori del fenotipo nel retinoblastoma, è stato per la prima volta condotto uno studio caso-controllo nel quale sono stati analizzati due polimorfismi p53 Arg72Pro e MDM2 309, in considerazione del ruolo di tali geni in molte funzioni cellulari, quali il controllo del ciclo cellulare, della stabilità genomica e dell'apoptosi, e della loro frequente deregolazione nella carcinogenesi (Appendice 3).

L'effettuazione di tali studi è stata possibile grazie alla disponibilità di un grande numero di campioni, derivanti da pazienti affetti da retinoblastoma. Sin dal 1998, nella U.O.C. Genetica Medica di Siena è infatti attiva una banca di linee cellulari e di DNA derivanti da pazienti affetti da retinoblastoma. In considerazione dell'importanza di tale strumento per la comunità scientifica, più recentemente è stato creato un database online,

disponibile su richiesta per tutti coloro che svolgono attività di ricerca nell'ambito del retinoblastoma. Tale database è disponibile alla seguente pagina web: <http://www.biobank.unisi.it>. Il database è organizzato su due livelli, uno accessibile liberamente da tutti i ricercatori ed un altro, accessibile solo ai gestori del sito tramite l'uso di una password protetta. Il database è stato creato in modo tale che nella pagina principale del sito compaiono un elenco di caratteristiche, che individuano ogni campione e mediante le quali è possibile ricercare specifici campioni di interesse, sia selezionando una sola caratteristica (ad es. tipo di mutazione), sia combinando tra loro due o più caratteristiche (ad es. fenotipo e tipo di mutazione) (Figura 11).

| RECORD FOUND: 33 | | back to search page | | | | | | | |
|------------------|---------------|---------------------|----------------------|---------------|-------------------|----------|-----------------|-----------------------------|-----------|
| Code | Internal Code | Phenotype | RB Germline Mutation | Mutation Type | Nucleotide Change | AAChange | Additional Info | Biological Sample Available | Reference |
| 212 | 4, IV-2 | RB Bilateral | Yes | Splicing | 2105del4 | | | DNA 4 | |
| 215 | 6, III-2 | RB Bilateral | Yes | Frameshift | 58delC | P20fs | | DNA 6 | |
| 217 | 7, IV-2 | RB Bilateral | Yes | Splicing | 2106+2T>C | | | DNA 7 | |
| 220 | 10, III-2 | RB Bilateral | Yes | Nonsense | 1666C>T | R556X | | DNA 10 | |
| 221 | 11, II-1 | RB Bilateral | Yes | Nonsense | 283A>T | K95X | | DNA 11 | |
| 223 | 13, II-3 | RB Bilateral | Yes | Frameshift | 396-397 ins T | F 132fs | | DNA 13 | |
| 224 | 14, II-1 | RB Bilateral | Yes | Frameshift | 241delG | V 81fs | | DNA 14 | |
| 228 | 17, IV-2 | RB Bilateral | Yes | Splicing | 1215+1G>a | | | DNA 17 | |

Figura 11. Ricerca di specifici campioni di retinoblastoma nel database.

6. *DISCUSSIONE*

Il retinoblastoma è il tumore maligno intraoculare più comune in età pediatrica ed insorge solitamente nei primi cinque anni vita, con un'età media alla diagnosi di 12 mesi per le forme bilaterali e 24 mesi per le forme unilaterali. Tale differenza è spiegata dal fatto che nelle forme bilaterali è già presente una mutazione costitutiva nel gene *RBI* e l'insorgenza del tumore è legata alla perdita di eterozigotità a livello somatico, mentre nelle forme unilaterali solitamente si susseguono due eventi somatici a carico della cellula retinica, pertanto l'esordio del tumore è più tardivo. In realtà, ad oggi è noto che mutazioni a carico del gene *RBI*, rappresentano solo il prerequisito per l'insorgenza del tumore e che ad esse fanno seguito altri eventi, che contribuiscono sia all'insorgenza che alla progressione tumorale. In particolare, dagli studi condotti finora è stato proposto un modello multi-step, che prevede la progressiva acquisizione di riarrangiamenti a carico di specifiche regioni genomiche, variazioni nel numero di copie di alcuni oncogeni e oncosoppressori e modificazioni epigenetiche, che conducono al passaggio da retina normale al retinoblastoma. Pertanto, la penetranza incompleta e l'espressività variabile, che si riscontrano in alcuni soggetti con mutazioni a carico del gene *RBI*, verosimilmente non dipendono soltanto dal tipo di mutazione presente (mutazioni di stop e frameshift vs mutazioni missenso, di splicing e a carico del promotore), ma anche da altri eventi secondari.

La diagnosi del retinoblastoma è posta su base clinica, solitamente in seguito al riscontro di leucocoria, ovvero il riflesso bianco pupillare, che di norma viene rilevato dai genitori del bambino. In assenza di una storia familiare positiva il tumore non viene infatti identificato fino a quando non dà manifestazione di sé, mentre al contrario quando la patologia è già nota in famiglia, è possibile attuare dei controlli oculistici mirati fin dalla nascita, qualora non sia stata eseguita la diagnosi molecolare. La presenza del tumore viene confermata all'esame oftalmoscopico eseguito in narcosi che solitamente evidenzia una massa biancastra e di dimensioni variabili. A tale esame si affiancano l'ecografia oculare e la RMN delle orbite e dell'encefalo, che consentono una corretta stadiazione del tumore e permettono di rilevare eventuali lesioni associate, quali ad esempio la presenza di un pinealoblastoma. La presenza di tale tumore, che nei soggetti con interessamento oculare bilaterale configura il cosiddetto "retinoblastoma trilaterale" influisce negativamente sulla prognosi di tali pazienti.

Una diagnosi precoce, spesso rende possibile l'effettuazione di terapie conservative, che consentono di preservare il bulbo oculare e talvolta di conservare una

parziale capacità visiva. Negli ultimi anni, in centri molto specializzati, come quello di Siena, sono state introdotte nuove terapie, quali la chemioterapia superselettiva intrarteriosa con infusione nell'arteria oftalmica di Melphalan in monoterapia o in associazione ad altri chemioterapici. Tale modalità di somministrazione dei farmaci presenta, a differenza della chemioterapia sistemica, effetti che, nella maggior parte dei casi, sono locali e reversibili. Studi preliminari inoltre indicano un buon controllo del tumore a breve termine, sebbene manchino ancora degli studi che dimostrino l'efficacia nel controllo a lungo termine.

La tempestività della diagnosi, la possibilità di accesso alle cure mediche e le caratteristiche del tumore, in termini di dimensioni, localizzazione e diffusione locale e a distanza, influenzano in prima battuta la sopravvivenza dei pazienti, che è elevata nei paesi sviluppati. Nella valutazione della sopravvivenza complessiva, va tuttavia tenuto presente, soprattutto nei soggetti sottoposti a radioterapia o con forme ereditarie di retinoblastoma, il rischio di seconde neoplasie maligne extraoculari. Tali tumori presentano un periodo di latenza estremamente variabile, sebbene la loro comparsa sia più comune nell'adolescenza e nell'età adulta. In particolare, uno studio recente ha indicato un rischio cumulativo, di seconde neoplasie maligne, quali osteosarcomi, sarcomi dei tessuti molli, melanomi e carcinomi epiteliali, di circa il 28%, a distanza di 40 anni dalla diagnosi. Sebbene, tali neoplasie incidano negativamente sulla prognosi dei pazienti, non esiste una sorveglianza clinica specifica per prevenirne l'insorgenza.

La consulenza genetica nell'ambito del retinoblastoma, così come di altre patologie ereditarie, si configura come un processo comunicativo, finalizzato a far comprendere ai pazienti affetti e ai loro familiari, le informazioni relative alle caratteristiche della malattia, alle modalità di trasmissione, al rischio di ricorrenza e alle possibili terapie, incluse le opzioni riproduttive, che sono pertinenti alla loro condizione. Caratteristiche fondamentali della consulenza genetica sono quella di non essere rivolta solo al probando, ma all'intera famiglia, e quella di non essere direttiva, ovvero di non dover in alcun modo influenzare le decisioni del probando e dei familiari.

Per eseguire una corretta consulenza genetica è molto importante effettuare una dettagliata raccolta della storia familiare, con la costruzione dell'albero genealogico, comprensivo di almeno tre generazioni. In particolare, è necessario prestare attenzione non solo ad un'eventuale familiarità per retinoblastoma, ma anche per altri tipi di tumore, che talvolta possono rappresentare l'unica manifestazione legata alla presenza di

una mutazione costitutiva nel gene *RBI*, nell'ambito di forme familiari ad espressività variabile e con penetranza incompleta, come nel caso 1. Inoltre, è molto importante accertarsi che i genitori, di un caso apparentemente sporadico, abbiano eseguito un accurato esame del fondo oculare, poichè in alcuni casi può essere svelata la presenza di un retinoma, come nel caso 2. Il riscontro di tale lesione, ormai considerata un precursore del retinoblastoma, è importante perché, sebbene solitamente sia asintomatica, deve essere tenuta sotto controllo per il rischio, seppur basso, di trasformazione maligna. Infine, una buona raccolta dell'anamnesi familiare è fondamentale per rilevare quei casi, benchè rari, in cui segregano, in modo del tutto indipendente, due (o più) patologie ereditarie, come nel caso 7.

Durante la raccolta dell'anamnesi personale del probando, con la valutazione della documentazione clinica, deve essere posta particolare attenzione alla valutazione dello sviluppo psicomotorio. Alla raccolta anamnestica, deve seguire un accurato esame obiettivo del probando, possibilmente con l'effettuazione di fotografie, previa acquisizione di un consenso informato scritto. Questo passaggio è particolarmente importante poiché consente di discriminare tra forme isolate di retinoblastoma e forme sindromiche. In queste ultime, infatti, causate da grandi delezioni genomiche coinvolgenti il gene *RBI* ed il genoma circostante, spesso è possibile riscontrare un ritardo di grado variabile nell'acquisizione delle tappe dello sviluppo psicomotorio e la presenza di caratteristiche fisiche e facciali peculiari, come nei casi 8 e 9; in alcuni di questi casi possono inoltre essere evidenziate anche altre anomalie congenite, come nel caso 9. L'osservazione della assenza di ritardo psicomotorio e delle suddette caratteristiche fisiche e facciali in alcuni pazienti con delezione interstiziale del braccio lungo del cromosoma 13, coinvolgente la regione 13q14.2, come nel caso 10, ha fatto ipotizzare il ruolo di specifici geni nello sviluppo di tale fenotipo. Partendo dal confronto di un numero esiguo di pazienti, data la rarità della condizione, il gruppo di lavoro della UOC Genetica Medica di Siena, ha cercato di individuare una regione critica minima per il ritardo psicomotorio, individuando dei possibili geni candidatati. In tale studio, in cui è stata impiegata per la prima volta l'analisi di array-CGH, è stato infatti possibile definire l'estensione ed i punti di rottura delle delezioni identificate nei singoli pazienti e di confrontarle tra loro. Più recentemente, un altro gruppo ha analizzato una casistica più ampia di pazienti, proponendo una correlazione genotipo-fenotipo in base alle dimensioni della delezione. Nell'ottica di una diagnosi quanto più precoce possibile, va

sottolineato come l'individuazione di specifiche caratteristiche fisiche e facciali possa essere un elemento importante per indirizzare la diagnosi, anche prima della comparsa del retinoblastoma, e per attuare nei soggetti a rischio, un follow up oculistico mirato.

Un momento cruciale nella consulenza genetica è la spiegazione della modalità di trasmissione della condizione ed del rischio di ricorrenza nella prole sia per il probando che per gli altri familiari. Viene spiegato che esistono forme non ereditarie di retinoblastoma, più frequenti, e forme ereditarie, dovute alla presenza di un'alterazione costitutiva nel gene *RBI*. Viene inoltre sottolineato che questi ultimi hanno una probabilità di circa il 50% di trasmettere la mutazione ai propri figli, in particolare, il rischio di ricorrenza del retinoblastoma nella prole è di circa il 45%, considerando che la penetranza della malattia è di circa il 90%. È importante sottolineare come la mutazione costitutiva del gene *RBI*, in assenza di una chiara familiarità, solo in pochi viene ereditata da un genitore, mentre nella maggior parte dei casi origina "de novo" nel gamete di uno dei genitori. Questo è un punto molto delicato della consulenza, che nella maggior parte dei casi vede come interlocutori i genitori del bambino affetto. Si deve infatti tener conto del senso di smarrimento e dolore che essi provano di fronte alla notizia di una condizione genetica, e quindi imm modificabile, e potenzialmente trasmissibile, e del successivo senso di colpa quando viene prospettata l'ipotesi di una possibile trasmissione della condizione da parte di uno dei due genitori. Pertanto, è molto importante che tali informazioni vengono riferite dal consulente genetista, che ha avuto un training specifico, in un contesto temporale e spaziale ricercato ed adeguato alla comunicazione di tali informazioni.

Infine, in occasione della consulenza genetica viene valutato per ogni paziente quale è il test genetico più appropriato da eseguire e vengono discussi con il probando ed eventuali familiari i benefici ed i limiti derivanti del test. In particolare, viene spiegato che presso la UOC di Genetica Medica di Siena, per diagnostica, viene eseguita l'analisi per la ricerca di mutazioni puntiformi, tramite DHPLC e sequenziamento, e per la ricerca di delezioni intrageniche, tramite MLPA. L'impiego di tali metodiche consente di identificare la maggior parte dei pazienti con una mutazione costitutiva del gene *RBI*, sebbene la sensibilità non raggiunga il 100%. È importante sottolineare come, al fine di stabilire il corretto rischio di ricorrenza, l'analisi molecolare debba essere condotta in tutti i pazienti, in quanto anche nel 15% dei retinoblastomi unilaterali unifocali sporadici viene identificata una mutazione costitutiva nel gene *RBI*. Il momento ottimale per

l'effettuazione dell'analisi molecolare è l'epoca preconcezionale, al momento della pianificazione di una gravidanza, in considerazione dei tempi di risposta lunghi. L'identificazione della mutazione consente infatti di offrire, qualora richiesto, la possibilità di effettuare una diagnosi prenatale invasiva, tramite prelievo di villi coriali o liquido amniotico, rispettivamente nel primo e nel secondo trimestre di gravidanza, consentendo alla donna di decidere più consapevolmente se continuare o interrompere la gravidanza. Nel caso in cui venga identificata nel feto una mutazione e la donna decida di proseguire la gravidanza, viene consigliato un monitoraggio oculistico fin dalla nascita, al fine di consentire una diagnosi quanto più precoce possibile. Viceversa, qualora il feto non abbia ereditato la mutazione, non essendo a rischio di sviluppare la patologia, non necessita dei serrati controlli oculistici, che invece verrebbero eseguiti in assenza del dato molecolare. Purtroppo, ancora oggi, a causa di una scarsa o non adeguata informazione ricevuta dai pazienti riguardo ai possibili rischi di ricorrenza, si arriva ad eseguire la diagnosi molecolare nel soggetto affetto in epoca prenatale. Spesso la donna è ad un'età gestazionale avanzata, come nel caso 6, e talvolta i tempi di risposta dell'indagine non sono compatibili con i tempi della diagnosi prenatale, come nel caso 5. La gestione di tali consulenze diventa pertanto molto difficile, in considerazione del carico emotivo supplementare presente durante la gravidanza.

L'identificazione della mutazione nel probando consente infine di estendere l'analisi anche agli altri familiari e pertanto di identificare, in tempi rapidi, coloro che sono a rischio di sviluppare la patologia e di trasmetterla alla prole. È infatti noto che alcuni individui, a causa della penetranza incompleta della condizione, possono non manifestare nell'arco della vita la malattia, e pertanto, in assenza dell'analisi molecolare, non vengono identificati, con il rischio di trasmettere la condizione alla prole, che invece può presentare una penetranza completa, come nei casi 1 e 3. I soggetti che mostrano penetranza incompleta, soprattutto in giovane età, vanno monitorizzati per il rischio, benché basso, di insorgenza del retinoblastoma anche in età adulta.

Nei casi in cui l'analisi molecolare non consente di identificare una mutazione costitutiva nel gene *RBI*, nonostante il rischio a priori sia elevato, come nel caso 4, è opportuno sottolineare la necessità di un attento monitoraggio oculistico, soprattutto nei primi anni di vita per il rischio di comparsa di nuovi focolai e far presente il rischio di trasmissione all'eventuale prole. Inoltre, in tali casi, soprattutto quelli apparentemente

sporadici, è opportuna un'accurata valutazione del fondo oculare nei genitori, qualora non effettuata.

La sensibilità delle analisi eseguite potrà in futuro essere incrementata, grazie all'impiego di nuove tecniche diagnostiche, quali il Next Generation Sequencing (NGS), già in uso presso la UOC Genetica Medica di Siena ed attualmente impiegata nella diagnosi di altre patologie ereditarie, che presentano eterogeneità genetica, quali la sindrome di Alport, o nelle quali l'analisi risulta particolarmente lunga a causa delle grandi dimensioni del gene, quali la sindrome di Cohen. Tale metodica consente di accorciare notevolmente i tempi di risposta, anche grazie al fatto che permette di analizzare più pazienti contemporaneamente. Recentemente, è stato inoltre avviato un progetto di ricerca, presso la UOC Genetica Medica di Siena, per un eventuale impiego di tale metodica nella diagnosi prenatale non invasiva su DNA fetale libero ottenuto da plasma materno (NIPD). Studi preliminari hanno infatti indicato la possibilità di impiegare con successo lo studio del DNA libero fetale nel plasma materno nella determinazione del sesso fetale, del genotipo RhD nei feti di madri RhD negative e nella diagnosi di alcune aneuploidie cromosomiche. L'eventuale effettuazione della NIPD mediante la tecnica di NGS ha pertanto delle grandi potenzialità e può aprire il campo anche alla diagnosi prenatale non invasiva di malattie monogeniche, quali il retinoblastoma. Infine, allo scopo di estendere l'indagine preliminare effettuata sul ruolo dei polimorfismi p53 Arg72Pro e MDM2 309 come modificatori del fenotipo, la NGS potrebbe essere impiegata anche nello studio di ulteriori polimorfismi in geni coinvolti nel pathway di *RBI* o in oncogeni e oncosoppressori, il cui ruolo è stato dimostrato importante in altri tumori. Il riscontro di eventuali geni modificatori e quindi dell'associazione di determinati polimorfismi a fenotipi più lievi o più gravi, può infatti avere delle ripercussioni rilevanti in ambito terapeutico.

Fino ad oggi, si è pensato che tutte le forme di retinoblastoma richiedano come primo step l'inattivazione biallelica del gene *RBI*. Tuttavia, recenti studi, condotti da Gallie et al su un'ampia casistica di retinoblastomi, hanno dimostrato in circa l'1% dei casi l'assenza di mutazioni nel gene *RBI* e la presenza nel tessuto tumorale di un'amplificazione del gene *MYCN* oltre le 40 copie. In tali tumori, tutti unilaterali, sono state osservate caratteristiche istologiche peculiari, un'età alla diagnosi precoce (<6 mesi), una minore instabilità genomica, una rapida crescita ed una maggiore aggressività del tumore, ma una buona risposta alla terapia.

Sulla base di tali osservazioni, recentemente, è stato avviato, da parte del nostro gruppo, un progetto di ricerca volto allo studio del tessuto tumorale di pazienti, che hanno avuto una diagnosi precoce di retinblastoma e trattamento di enucleazione, nei quali l'analisi molecolare non ha identificato mutazioni a carico del gene *RBI*. La conferma di tali osservazioni, potrebbe infatti avere delle ricadute importanti sia in termini terapeutici per la possibilità di sviluppare nuove terapie biologiche, sia in termini di valutazione del rischio di ricorrenza, in quanto in tali pazienti risulterebbe paragonabile a quello della popolazione generale.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Artuso R, Mencarelli MA, Polli R, Sartori S, Ariani F, Pollazzon M, Marozza A, Cilio MR, Specchio N, Vigevano F, Vecchi M, Boniver C, Dalla Bernardina B, Parmeggiani A, Buoni S, Hayek G, Mari F, Renieri A, Murgia A. Early-onset seizure variant of Rett syndrome: definition of the clinical diagnostic criteria. *Brain Dev.* 2010 Jan;32(1):17-24.
2. Pollazzon M, Grosso S, Papa FT, Katzaki E, Marozza A, Mencarelli MA, Uliana V, Balestri P, Mari F, Renieri A. A 9.3 Mb microdeletion of 3q27.3q29 associated with psychomotor and growth delay, tricuspid valve dysplasia and bifid thumb. *Eur J Med Genet.* 2009 Mar-Jun;52(2-3):131-3.
3. Uliana V, Grosso S, Cioni M, Ariani F, Papa FT, Tamburello S, Rossi E, Katzaki E, Mucciolo M, Marozza A, Pollazzon M, Mencarelli MA, Mari F, Balestri P, Renieri A. 3.2 Mb microdeletion in chromosome 7 bands q22.2-q22.3 associated with overgrowth and delayed bone age. *Eur J Med Genet.* 2010 May-Jun;53(3):168-70.
4. Pollazzon M, Suominen T, Penttilä S, Malandrini A, Carluccio MA, Mondelli M, Marozza A, Federico A, Renieri A, Hackman P, Dotti MT, Udd B. The first Italian family with tibial muscular dystrophy caused by a novel titin mutation. *J Neurol.* 2010 Apr;257(4):575-9.
5. Moll AC, Kuik DJ, Bouter LM, Den Otter W, Bezemer PD, Koten JW, Imhof SM, Kuyt BP, Tan KE. Incidence and survival of retinoblastoma in The Netherlands: a register based study 1862-1995. *Br J Ophthalmol.* 1997;81:559-62.
6. Seregard S, Lundell G, Svedberg H, Kivela T. Incidence of retinoblastoma from 1958 to 1998 in Northern Europe: advantages of birth cohort analysis. *Ophthalmol.* 2004;111:1228-32.
7. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(4):820-23.
8. Albert DM. Historic Review of Retinoblastoma. *Ophthalmol.* 1987;94:654-62.9. Vogel F. Genetics and mutation rate of retinoblastoma (gliomae retinae), with general remarks on methods of determining mutation rate in humans. *Z Mensch Vererb Konstitutionsl.* 1954; 32:308-36.
10. Comings DE. A general theory of carcinogenesis. *Proct Natl Acad Sci U S A.* 1973;70(12):3324-8.

11. Sparkes RS et al. Regional assignment of genes for human esterase D and retinoblastoma to chromosome band 13q14. *Sci*. 1980;208:1042-44.
12. Connolly MJ et al. Familial, EsD-linked, retinoblastoma with reduced penetrance and variable expressivity. *Hum Genet*. 1983;65:122-4.
13. Yunis JJ & Ramsay N. Retinoblastoma and subband deletion of chromosome 13. *Am J Dis Child*. 1978;132:161-3.
14. Godbout R, Dryja TP, Squire J, Gallie BL & Phillips RA. Somatic inactivation of genes on chromosome 13 is a common event in retinoblastoma. *Nat*. 1983; 304:451-453.
15. Cavenee WK et al. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanism in retinoblastoma. *Nat*. 1983; 305:779-84.
16. Zhu X et al. Mechanism of loss of heterozygosity in retinoblastoma. *Cytogenet Cell Genet*. 1992;59:248-52.
17. Friend SH, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nat*. 1986;323:643-6.
18. Dunn JM, Phillips RA, Becker AJ & Gallie BL. Identification of germline and somatic mutations affecting the retinoblastoma gene. *Sci*. 1988;241:1797-800.
19. Robanus-Maandag E et al. P107 is a suppressor of retinoblastoma development in pRb-deficient mice. *Genes Dev*. 1988;12:1599-609.
20. Jacks T et al. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nat*. 1992;359:295-300.
21. Lee EY et al. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nat*. 1992;359:288-94.
22. Clarke AR et al. Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nat*. 1992;359:328-30.
23. Knudsen ES, Sexton CR & Mayhew CN. Role of the retinoblastoma tumor suppressor in the maintenance of genome integrity. *Curr Mol Med*. 2006;(6):749-57.
24. Vogel F. Genetics of retinoblastoma. *Hum Genet*. 1979;52(1)1-54.
25. Alonso J, Garcia-Miguel P, Abelairas J, Mendiola M, Sarret E, Vendrell MT, Navajas A, Pestana A. Spectrum of germline RB1 mutations in Spanish retinoblastoma patients: Phenotypic and molecular epidemiological implications. *Hum Mutat*. 2001;17(5)412-22.

26. Corson TW, Gallie BL. One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma. *Genes Chr Cancer*. 2007;46:617–34.
27. Lohmann DR, Gallie BL. Retinoblastoma: revisiting the model prototype of inherited cancer. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2004;129(1):23-8.
28. Gallie BL, Ellsworth RM, Abramson DH, Phillips RA. Retinoma: spontaneous regression of retinoblastoma or benign manifestation of the mutation? *Br J Cancer*. 1982;45(4):513-21.
29. Balmer A, Munier F, Gailloud C. Retinoma. Case studies. *Ophthalmic Paediatr Genet*. 1991;12(3):131-7.
30. Eagle RC Jr, Shields JA, Donoso L, Milner RS. Malignant transformation of spontaneously regressed retinoblastoma, retinoma/retinocytoma variant. *Ophthalmol*. 1989;96(9):1389-95.
31. Singh AD, Santos CM, Shields CL, Shields JA, Eagle RC Jr. Observations on 17 patients with retinocytoma. *Arch Ophthalmol*. 2000;118(2):199-205.
32. Sampieri K, Mencarelli MA, Epistolato MC *et al*. Genomic differences between retinoma and retinoblastoma. *Acta Oncol* 2008; 47: 1483–92.
33. Eagle RC Jr. High-risk features and tumor differentiation in retinoblastoma: a retrospective histopathologic study. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(8):1203-9.
34. Plotsky D, Quinn G, Eagle RJr, Shields J, Granowetter L. Congenital retinoblastoma: a case report. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1987;24(3):120-3.
35. Odashiro AN, Rusa Pereira P, Pessoa de Souza Filho J, Cruess SR, Burnier MN. Retinoblastoma in an adult: case report and literature review. *Can J Ophthalmol*. 2005;40:188-191.
36. Singh SK, Das D, Bhattacharjee H, Biswas J, Kuri G, Bhattacharjee K, Deka H, Deka AC. A rare case of adult onset retinoblastoma. *Oman J Ophthalmol*. 2011 Jan-Apr;4(1):25–27.
37. Kato MV, Ishizaki K, Shimizu T, Toguchida J, Kaneko A, Sasaki MS. Delayed development of retinoblastoma associated with loss of a maternal allele on chromosome 13. *Int J Cancer*. 1995;64(1):3-8.
38. De Potter P, Shields CL, Shields JA. Clinical variations of trilateral retinoblastoma: a report of 13 cases. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1994; 31:26–31.

39. Hawkins MM, Draper GJ, Kingston JE. Incidence of second primary tumours among childhood cancer survivors. *Br J Cancer*. 1987;56(3):339-47.
40. Tucker MA, D'Angio GJ, Boice JD Jr, Strong LC, Li FP, Stovall M, Stone BJ, Green DM, Lombardi F, Newton W, et al. Bone sarcomas linked to radiotherapy and chemotherapy in children. *N Engl J Med*. 1987;317(10):588-93.
41. Marees T, Moll AC, Imhof SM, de Boer MR, Ringens PJ, van Leeuwen FE. J Risk of Second Malignancies in Survivors of Retinoblastoma: More Than 40 Years of Follow-up. *Natl Cancer Inst*. 2008;100:1771-9.
42. Abramson DH & Scheffler AC. Update on retinoblastoma. *Retina*. 2004;24:828-848.
43. Broaddus E, Topham A & Singh AD. Survival with retinoblastoma in the USA:1975- 2004. *Br J Ophthalmol*. 2009;93:24-27.
44. MacCarthy A, Birch JM, Draper GJ et al. Retinoblastoma: treatment and survival in Great Britain 1963 to 2002. *Br J Ophthalmol*. 2009;93:38-39.
45. Mansour AM, Greenwald MJ, O'Grady R. Diffuse infiltrating retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1989;26(3):152-4.
46. Girard B, Le Hoang P, D'Hermies F, Quere MA, Roussellie F. Diffuse infiltrating retinoblastoma. *J Fr Ophtalmol*. 1989;12(5):369-81.
47. Messmer EP, Sauerwein W, Heinrich T, Höpping W, Klueter-Reckmann D, Bornfeld N, Sack H, Förster M, Havers W. New and recurrent tumor foci following local treatment as well as external beam radiation in eyes of patients with hereditary retinoblastoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1990;228(5):426-31.
48. Abramson DH, Frank CM, Dunkel IJ. A phase I/II study of subconjunctival carboplatin for intraocular retinoblastoma. *Ophthalmol*. 1999;106:1947-1950.
49. Leng T, Cebulla CM, Scheffler AC, Murray TG. Focal periocular carboplatin chemotherapy avoids systemic chemotherapy for unilateral, progressive retinoblastoma. *Retina*. 2010;30:S66-68.
50. Abramson DH, Dunkel IJ, Brodie SE, Kim JW & Gobin YP. A phase I/II study of direct intraarterial (ophthalmic artery) chemotherapy with melphalan for intraocular retinoblastoma initial results. *Ophthalmol*. 2008;115:1398-1404, 1404 e1.

51. Abramson DH, Dunkel IJ, Brodie SE, Marr B & Gobin YP: Superselective ophthalmic artery chemotherapy as primary treatment for retinoblastoma (chemosurgery). *Ophthalmol.* 2010a;117:1623–1629.
52. Gobin YP, Dunkel IJ, Marr BP, Brodie SE & Abramson DH. Intra-arterial chemotherapy for the management of retinoblastoma: four year experience. *Arch Ophthalmol.* 2011;129: 732–737.
53. Venturi C, Bracco S, Cerase A, Cioni S, Galluzzi P, Gennari P, Vallone IM, Tinturini R, Vittori C, De Francesco S, Caini M, D'Ambrosio A, Toti P, Renieri A, Hadjistilianou T. Superselective ophthalmic artery infusion of melphalan for intraocular retinoblastoma: preliminary results from 140 treatments. *Act Ophthalmol.* 2012.
54. Lincoff H, McLean J, Long R. The cryosurgical treatment of intraocular tumors. *Am J Ophthalmol.* 1967;63(3):389-99.
55. Rubin ML. Treatment of retinoblastoma with cryopexy. *Bibl Ophthalmol.* 1968;75:359-61.
56. Abramson DH. Retinoblastoma: diagnosis and management. *CA Cancer J Clin.* 1982;32(3):130-40.
57. Abramson DH, Scheffler AC. Transpupillary thermotherapy as initial treatment for small intraocular retinoblastoma: technique and predictors of success. *Ophthalmol.* 2004;111(5):984-91.
58. Stallard HB. Glioma retinae treated by radon seeds. *Br Med J.* 1936;2(3958):962-986.1.
59. Shields JA, Shields CL, De Potter P, Hernandez JC, Brady LW. Plaque radiotherapy for residual or recurrent retinoblastoma in 91 cases. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 1994;31(4):242-5.
60. Murphree AL, Villablanca JG, Deegan WF 3rd, Sato JK, Malogolowkin M, Fisher A, Parker R, Reed E, Gomer CJ. Chemotherapy plus local treatment in the management of intraocular retinoblastoma. *Arch Ophthalmol.* 1996;114(11):1348-56.
61. Shields CL, Mashayekhi A, Au AK, et al. The International Classification of Retinoblastoma predicts chemoreduction success. *Ophthalmol.* 2006;113:2276–2280.

62. Scheffler AC, Cicciarelli N, Feuer W, Toledano S, Murray TG. Macular retinoblastoma: evaluation of tumor control, local complications, and visual outcomes for eyes treated with chemotherapy and repetitive foveal laser ablation. *Ophthalmol.* 2007;114:162–169.
63. Mulvihill A, Budning A, Jay V, et al. Ocular motility changes after subtenon carboplatin chemotherapy for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol.* 2003;121:1120–1124.
64. Schmack I, Hubbard GB, Kang SJ, Aaberg TM Jr, Grossniklaus HE. Ischemic necrosis and atrophy of the optic nerve after periocular carboplatin injection for intraocular retinoblastoma. *Am J Ophthalmol.* 2006;142:310–315.
65. Kiratli H, Kocabeyoglu S, Bilgic S. Severe pseudo-preseptal cellulitis following sub-Tenon's carboplatin injection for intraocular retinoblastoma. *J AAPOS.* 2007;11:404–405.
66. Brodie SE, Pierre Gobin Y, Dunkel IJ, Kim JW & Abramson DH. Persistence of retinal function after selective ophthalmic artery chemotherapy infusion for retinoblastoma. *Doc Ophthalmol.* 2009;119: 13–22.
67. Ellsworth RM. Orbital retinoblastoma. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1974;72:79-88.
68. Burkhardt DL, Sage J. Cellular mechanism of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(9):671-82.
69. Lee WH et al. The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature.* 1987;329:642-5.
70. Lee WH et al. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Sci.* 1987;235:1394-9.
71. Cordon-Cardo C, Richon VM. Expression of the retinoblastoma protein is regulated in normal human tissues. *Am J Pathol.* 1994;144(3):500-10.
72. Kouzarides T. Transcriptional control by the retinoblastoma protein. *Semin Cancer Biol.* 1995;6:91-8.
73. Chow KN & Dean DC. Domains A&B in the Rb pocket interact to form a transcriptional repressor motif. *Mol Cell Biol.* 1996;16:4862-8.
74. Qian Y, Luckey C, Horton L, Esser M & Templeton DJ. Biological function of the retinoblastoma protein requires distinct domains for hyperphosphorylation and transcription factor binding. *Mol Cell Biol.* 1992;12:5363-72.

75. Zacksenhouse E, Bremner R, Phillips RA & Gallie BL. A bipartite nuclear localization signal in the retinoblastoma gene product and its importance for biological activity. *Mol Cell Biol.* 1993;13:4588-99.
76. Adamns PD et al. Identification of a cyclin-CDK2 recognition motif present in substrates and p21-like cyclin-dependent kinase inhibitors. *Mol Cell Biol.* 1996;16:6623-33.
77. Whitaker LL, Su H, Baskaran R, Knudsen ES & Wang JY. Growth suppression by an E2F-binding-defective retinoblastoma protein (RB): contribution from the RB C pocket. *Mol Cell Biol.* 1998;18:4032-42.
78. Durfee T, Mancini MA, Jones D, Elledge SJ & Lee WH. The amino-terminal region of the retinoblastoma gene product binds a novel nuclear matrix protein that colocalizes to centers for RNA processing. *J Cell Biol.* 1994;127:609-22.
79. Sterner JM, Dew-Knight S, Musahl C, Kornbluth S & Horowitz JM. Negative regulation of DNA replication by the retinoblastoma protein is mediated by its association with MCM7. *Mol Cell Biol.* 1998;18:2748-57.
80. Choubey D & Lengyel P. Binding of an interferon-inducible protein (p202) to the retinoblastoma protein. *J Biol Chem.* 1995;270:6134-40.
81. Nevins JR. Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families. *Cell Growth Differ.* 1998;9(8):585-93.
82. Nevins JR. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet.* 2001;10(7):699-703.
83. Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 2000; 14(19):2393-409.
84. Blais A, Dynlacht BD. Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. *Curr Opin Genet Dev.* 2004;14(5):527-32.
85. Mittnacht S. Control of pRB phosphorylation. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8(1):21-7.
86. Zheng L & Lee WH. The retinoblastoma gene: a prototypic and multifunctional tumor suppressor. *Exp Cell Res.* 2001;264:2-18.
87. Dannenberg JH & Riele HP. The retinoblastoma gene family in cell cycle regulation and suppression of tumorigenesis. *Results Probl Cell Differ.* 2006;42:183-225.

88. Valverde J, Alonso J, Palacios I, Pestana A. RB1 gene mutation up-date, a meta analysis based on 932 reported mutations available in a searchable database. *BMC Genetics*. 2005, 6:53.
89. Lohmann DR et al. Constitutional RB1-gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am J Hum Genet*. 1997;61:282-94.
90. Sippel KC et al. Frequency of somatic and germ-line mosaicism in retinoblastoma: implications for genetic counselling. *Am J Hum Genet*. 1998;62:610-9.
91. Cooper DN, Krawczak M. Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Hum Genet*. 1989;83(2):181-8.
92. Richter S et al. Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma. *Am J Hum Genet*. 2003;72:253-69.
93. Albrecht P et al. Spectrum of gross deletions and insertions in the RB1 gene in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression. *Hum Mutat*. 2005;26:437-45.
94. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science*. 1991;254(5035):1138-46.
95. Allderdice PW, Davis JG, Miller OJ, Klinger HP, Warburton D, Miller DA, Allen FH, Abrams CAL, McGilvray E. The 13q – Deletion Syndrome. *Am J Hum Genet*. 1969;499-512.
96. Lewandowski RC Jr, Yunis JJ. New chromosomal syndromes. *Am J Dis Child*. 1975;129(4):515-29.
97. Yunis E, Zuñiga R, Ramírez E. Retinoblastoma, gross internal malformations, and deletion 13q14 leads to q31. *Hum Genet*. 1981;56(3):283-6.
98. Brown S, Gersen S, Anyane-Yeboah K, Warburton D. Preliminary Definition of a “Critical Region” of Chromosome 13 in q32: Report of 14 Cases With 13q Deletions and Review of the Literature. *Am J Med Genet*. 1993;45:52-59.
99. Brown S, Russo J, Chitayat D, Warburton D. The 13q⁻ Syndrome: The molecular definition of a Critical Deletion Region in Band 13q32. *Am J Hum Genet*. 1995;57:859-866.
100. Motegi T, Kaga M, Yanagawa Y, Kadowaki H, Watanabe K, Inoue A, Komatsu M, Minoda N. A Recognizable Pattern of the Midface of Retinoblastoma Patients with Interstitial Deletion of 13q. *Hum Genet*. 1983;64: 160-162.

101. Baud O, Cormier-Daire V, Lyonnet S, Desjardins L, Turleau C, Doz F. Dysmorphic phenotype and neurological impairment in 22 retinoblastoma patients with constitutional cytogenetic 13q deletion. *Clin Genet.* 1999;55:478-482.
102. Bojinova RJ, Schorderet DF, Addor MC, Gaide AC, Thonney F, Pescia G, Nenadov-Beck M, Balmer A, Munier FL. Further delineation of the facial 13q14 deletion syndrome in 13 retinoblastoma patients. *Ophthalm Genet.* – 2001, Vol. 22. No. 1, pp. 11-18.
103. Caselli R, Speciale C, Pescucci C, Uliana V, Sampietri K, Bruttini M, Longo I, De Francesco S, Pramparo T, Zuffardi O, Frezzotti R, Acquaviva A, Hadjistilianou T, Renieri A, Mari F. *J Hum Genet.* 2007;52:535-42.
104. Tosca L, Brisset S, Petit FM, Metay C, Latour S, Lautier B, Lebas A, Druart L, Picone O, Mas AE, Prévot S, Tardieu M, Goossens M, Tachdjian G. Genotype-phenotype correlation in 13q13.3eq21.3 deletion. *Eur J Med Genet.* 2011;54:489-94.
105. Mitter D, Reinhard U, Muradyan A, Klein-Hitpa L, Kanber D, Ounap K, Kaulish M, Lohmann D. Genotype-phenotype correlations in patients with retinoblastoma and interstitial 13q deletions. *Eur J Hum Genet.* 2011;19:947-58.
106. Spiegelman JI, Mindrinos MN, Oefner PJ. High-accuracy DAN sequence variation screening by DHPLC. *Biotechniques* 2000;29:1084-90, 1092.
107. Schouten JA, Ladame S, Mason SJ, Cooper MA, Balasubramanian S. G-quadruplex specific peptide-hemicyanine ligands by partial combinatorial selection. *J Am Chem Soc.* 2003;125:5594-5.
108. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 1992;258:818-21.
109. Gallie BL, Campbell C, Devlin H, Duckett A, Squire JA. Developmental basis of retinal-specific induction of cancer by RB mutation. *Cancer Res.* 1999; 59:1731s–5s.
110. Mairal A, Pinglier E, Gilbert E *et al.* Detection of chromosome imbalances in retinoblastoma by parallel karyotype and CGH analyses. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;28:370–9.

111. Chen D, Gallie BL, Squire JA. Minimal regions of chromosomal imbalance in retinoblastoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001;129:57–63.
112. Herzog S, Lohmann DR, Buiting K *et al.* Marked differences in unilateral isolated retinoblastomas from young and older children studied by comparative genomic hybridization. *Hum Genet.* 2001;108:98–104.
113. Lillington DM, Kingston JE, Coen PG *et al.* Comparative genomic hybridization of 49 primary retinoblastoma tumors identifies chromosomal regions associated with histopathology, progression, and patient outcome. *Genes Chr Cancer.* 2003;36:121–8.
114. van der Wal JE, Hermsen MA, Gille HJ *et al.* Comparative genomic hybridisation divides retinoblastomas into a high and a low level chromosomal instability group. *J Clin Pathol.* 2003;56:26–30.
115. Zielinski B, Gratiyas S, Toedt G *et al.* Detection of chromosomal imbalances in retinoblastoma by matrix-based comparative genomic hybridization. *Genes Chr Cancer.* 2005;43:294–301.
116. Bowles E, Corson TW, Bayani J *et al.* Profiling genomic copy number changes in retinoblastoma beyond loss of RB1. *Genes Chr Cancer.* 2007;46:118–29.
117. Frade JM, Barde YA. Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinalcord. *Development.* 1999;126:683-90.
118. Dimaras H, Coburn B, Pajovic S, Gallie BL. Loss of p75 neurotrophin receptor expression accompanies malignant progression to human and murine retinoblastoma. *Mol Carcinog.* 2006;45:333-43.
119. Dimaras H, Khetan V, Halliday W, Orlic M, Prigoda NL, Piovesan B, et al. Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma; increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. *Hum Mol Genet* 2008;17:1363-72.
120. Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D *et al.* Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:9700–04.
121. Yates DR, Rehman I, Abbod MF, Meuth M, Cross SS, Linkens DA, Hamdy FC *et al.* Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13:2046–53.

122. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006;38:787–93.
123. Leong KJ, Wei W, Tannahill LA, Caldwell GM, Jones CE, Morton DG, Matthews GM et al. Methylation profiling of rectal cancer identifies novel markers of early-stage disease. *Br J Surg.* 2011;98:724–34.
124. Harada K, Toyooka S, Maitra A, Maruyama R, Toyooka KO, Timmons CF, Tomlinson GE et al. Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines. *Oncogene.* 2002;21:4345–9.
125. Choy KW, Pang CP, To KF, Yu CB, Ng JS, Lam DS. Impaired expression and promoter hypermethylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in retinoblastoma tissues. *Invest Ophthalmol. Vis Sci.* 2002;43:1344–9.
126. Choy KW, Pang CP, Fan DS, Lee TC, Wang JH, Abramson DH, Lo KW et al. Microsatellite instability and MLH1 promoter methylation in human retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:3404–9.
127. Choy KW, Lee TC, Cheung KF, Fan DS, Lo KW, Beaverson KL, Abramson DH et al. Clinical implications of promoter hypermethylation in RASSF1A and MGMT in retinoblastoma. *Neoplasia.* 2005;7:200–6.
128. Tosi GM, Trimarchi C, Macaluso M, La Sala D, Ciccodicola A, Lazzi S, Massaro-Giordano M et al. Genetic and epigenetic alterations of RB2/p130 tumor suppressor gene in human sporadic retinoblastoma: implications for pathogenesis and therapeutic approach. *Oncogene.* 2005;24:5827–36.
129. Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N, Maitra A, Reddy JL, Matta H, Miyajima K et al. Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res.* 2002;62:5897–901.
130. Cohen Y, Merhavi-Shoham E, Avraham RB, Frenkel S, Pe'er J, Goldenberg-Cohen N. Hypermethylation of CpG island loci of multiple tumor suppressor genes in retinoblastoma. *Exp Eye Res.* 2008;86:201–6.

APPENDICE 1

Array comparative genomic hybridization in retinoma and retinoblastoma tissues

Katia Sampieri,¹ Mariangela Amenduni,¹ Filomena Tiziana Papa,¹ Eleni Katzaki,¹ Maria Antonietta Mencarelli,¹ Annabella Marozza,¹ Maria Carmela Epistolato,² Paolo Toti,² Stefano Lazzi,² Mirella Bruttini,¹ Roberta De Filippis,¹ Sonia De Francesco,³ Ilaria Longo,¹ Ilaria Meloni,¹ Francesca Mari,¹ Antonio Acquaviva,⁴ Theodora Hadjistilianou,³ Alessandra Renieri^{1,5} and Francesca Ariani¹

¹Medical Genetics, Department of Molecular Biology, University of Siena, Policlinico Le Scotte, viale Bracci 2, 53100 Siena, Italy, ²Department of Human Pathology and Oncology, University of Siena, Policlinico Le Scotte, viale Bracci 2, 53100, Siena, Italy, ³Retinoblastoma Referral Center, Department of Ophthalmology, University of Siena, Policlinico Le Scotte, viale Bracci 2, 53100, Siena, Italy, ⁴Department of Pediatrics, Obstetrics and Reproductive Medicine, Italian retinoblastoma registry, University of Siena, Policlinico Le Scotte, viale Bracci 2, 53100, Siena, Italy

(Received September 4, 2008/Revised November 17, 2008/Accepted November 19, 2008/Online publication January 31, 2009)

In retinoblastoma, two *RB1* mutations are necessary for tumor development. Recurrent genomic rearrangements may represent subsequent events required for retinoblastoma progression. Array-comparative genomic hybridization was carried out in 18 eye samples, 10 from bilateral and eight from unilateral retinoblastoma patients. Two unilateral cases also showed areas of retinoma. The most frequent imbalance in retinoblastomas was 6p gain (40%), followed by gains at 1q12-q25.3, 2p24.3-p24.2, 9q22.2, and 9q33.1 and losses at 11q24.3, 13q13.2-q22.3, and 16q12.1-q21. Bilateral cases showed a lower number of imbalances than unilateral cases ($P = 0.002$). Unilateral cases were divided into low-level (≤ 4) and high-level (≥ 7) chromosomal instability groups. The first group presented with younger age at diagnosis (mean 511 days) compared with the second group (mean 1606 days). In one retinoma case ophthalmoscopically diagnosed as a benign lesion no rearrangements were detected, whereas the adjacent retinoblastoma displayed seven aberrations. The other retinoma case identified by retrospective histopathological examination shared three rearrangements with the adjacent retinoblastoma. Two other gene-free rearrangements were retinoma specific. One rearrangement, *dup5p*, was retinoblastoma specific and included the *SKP2* gene. Genomic profiling indicated that the first retinoma was a pretumoral lesion, whereas the other represents a subclone of cells bearing 'benign' rearrangements overwhelmed by another subclone presenting aberrations with higher 'oncogenic' potential. In summary, the present study shows that bilateral and unilateral retinoblastoma have different chromosomal instability that correlates with the age of tumor onset in unilateral cases. This is the first report of genomic profiling in retinoma tissue, shedding light on the different nature of lesions named 'retinoma'. (*Cancer Sci* 2009; 100: 465–471)

Retinoblastoma (RB, OMIM#180200) is the most common primary intraocular malignancy in children, initiated by the inactivation of both alleles of the *RB1* tumor-suppressor gene.^(1,2) Approximately 40% of RB patients carry a predisposing germline mutation transmitted as an autosomal-dominant trait. In these patients, inactivation of the second *RB1* allele occurs in the retinal cells and generally results in multiple and often bilateral tumors. In the remaining 60% of children, both mutational events occur in the same retinal cell leading to unilateral sporadic RB.⁽³⁾

Retinoma (RN), a benign retinal lesion, is considered to be the precursor of RB.^(4,5) Unlike RB, which is typically opaque white, RN appears as a translucent gray retinal mass, frequently associated with calcification and retinal pigment epithelial hyperplasia.⁽⁶⁾ The histopathology of RN includes foci of photoreceptor differentiation (fleurettes), momomorphic round nuclei, abundant fibrillar eosinophilic stroma, and absence of mitotic activity.⁽⁷⁾ Recently, it has been demonstrated that the two mutational events inactivating the *RB1* gene are already present in RN.⁽⁴⁾ Using quantitative

polymerase chain reaction (PCR) and fluorescence *in situ* hybridization on specific candidate genes, it has also been shown that RN display low-level copy number changes involving higher levels of amplification in adjacent RB.^(4,5) A study by Dimaras *et al.* in RN importantly clarified that the two hits in *RB1* (M1–M2) do not inevitably cause a malignant phenotype but only genomic instability.⁽⁴⁾ At some point this instability can lead to further genomic rearrangements (M3–Mn) that result in tumor progression.^(4,8)

Cytogenetic and conventional or microarray comparative genomic hybridization (CGH) studies have detected recurrent genomic alterations in RB: gain of 1q, 2p, 6p, and 13q and loss of 16q.⁽⁹⁾ These data strongly suggest that these changes may represent M3–Mn events driving tumor progression in RB. In this scenario, RN represents a very interesting tissue to study the timing of genomic instability in RB development. However, molecular studies in this lesion are limited by sample availability as patients with only RN are not treated, and the coexistence of RN and RB in enucleated eyes is not frequently observed.^(4,5)

Array-based CGH technology, designed for detecting segmental genomic alterations at high resolution, have enabled the profiling of human cancer genomes, defining regions and genes involved in cancer development and progression.^(10–12) To date, genomic rearrangements in RB tissues have been principally investigated by cytogenetic and conventional CGH and only one array-CGH study has been published.^(13–18) To our knowledge, genome-wide studies in RN tissues have never been carried out.

Here, we used a high-resolution array-CGH technique to analyze genomic rearrangements in 18 RB eye samples, 10 from bilateral and eight from unilateral patients. In two unilateral cases, we also investigated genomic imbalances in two areas of RN adjacent to RB.⁽⁵⁾ In one case (#16), clinically diagnosed RN was observed to progress to RB, whereas in the other case (#15) RN was identified by retrospective histopathological examination.⁽⁵⁾

Materials and Methods

Tissue sample collection. We collected 18 formalin-fixed paraffin-embedded eye samples from enucleated RB patients archived in the Department of Human Pathology and Oncology of the University of Siena. After surgery, enucleated eyes were immersion-fixed in buffered formalin for 48 h. After fixation, sampling, paraffin embedding, and cutting were carried out according to the usual pathological methods. The group of samples included 10 bilateral cases (one familial and nine sporadic) and eight sporadic unilateral cases. For each patient we have the corresponding DNA sample

⁵To whom correspondence should be addressed. E-mail: renieri@unisi.it

extracted from blood stored in the Italian Retinoblastoma Biobank (<http://www.biobank.unisi.it>). Samples 1–18 of the present study correspond to RB Biobank samples 15, 58, 143, 185, 190, 225, 134, 133, 234, 263, 79, 268, 242, 296, 297, 206, 253, and 279. A germline mutation in *RBI* was identified in 8 of 10 patients with bilateral tumors. No mutations were detected in the eight unilateral cases. Mutational screening was carried out by a combination of both DHPLC and MLPA analysis. Two unilateral cases presented areas of RN adjacent to RB.⁽⁵⁾

Laser-capture microdissection and DNA extraction from tissue samples. Normal retina, RN, and RB tissues were identified in hematoxylin–eosin-stained sections. Sections 5 μ m thick were deparaffinized, rehydrated, and stained with Mayer hematoxylin and yellow eosin, then dehydrated with xylene. Slides were observed through an inverse microscope. Cells of the three different tissues were isolated by laser-capture microdissection (Arcturus PixCell II; MWG-Biotech). Selected cells adhered to the film on the bottom of the cap and were immediately transferred into a standard microcentrifuge tube containing digestion buffer and 20 μ g/mL proteinase K (Qiagen). DNA was extracted using QIAmp DNA Micro Kit according to the manufacturer's protocol. The Hoechst dye-binding assay was used on a DyNA Quant 200 Fluorometer (GE Healthcare) to determine the appropriate DNA concentration.

Whole-genome amplification. Whole-genome amplification was carried out using the GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA) kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. Briefly, after DNA extraction from microdissected tissue cells, 100 ng of template DNA was incubated at 95°C for 4 min in 1 \times fragmentation buffer, and the sample was cooled on ice. The sample was further incubated with the Library Preparation Buffer and Library Stabilization Solution at 95°C for 2 min and then cooled on ice. One microliter of Library Preparation Enzyme was added and the mix incubated at 16°C for 20 min, 24°C for 20 min, 37°C for 20 min, and 75°C for 5 min. The resulting sample was amplified using WGA polymerase, after initial denaturation at 95°C for 3 min, then 14 cycles at 94°C for 15 s and 65°C for 5 min. Amplification products were purified using the GenElute PCR Clean-up kit (Sigma-Aldrich) according to the instructions of the suppliers. The appropriate DNA concentration was determined using a DyNA Quant 200 Fluorometer. Amplified DNA fragments from normal retina, RN, and RB samples varied in length from 200 to 500 bp.

Array-CGH. Array-CGH analysis was carried out using commercially available oligonucleotide microarrays containing approximately 99 000 60-mer probes with an estimated average resolution of approximately 25 kb (Human Genome CGH Microarray 105 A Kit; Agilent Technologies). DNA labeling was carried out using the Agilent Genomic DNA Labeling Kit Plus according to the Agilent protocol (Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis 2.0v). Genomic DNA (3.5 μ g) was mixed with 5 μ L of 2.5 \times random primer solution (Agilent Technologies) and nuclease-free water to a total volume of 31 μ L. The mix was denatured at 95°C for 3 min and then incubated in ice and water for 5 min. The following were added to each sample: 10 μ L of 5 \times buffer, 5 μ L of 10 \times dNTP nucleotide mix, 1 μ L of Klenow fragment (Agilent Technologies), and 3 μ L of Cy5-dNTP (RB and RN samples) or 3 μ L of Cy3-dNTP (normal retina samples). The samples were incubated at 37°C for 3 h. Labeled samples were subsequently purified using a CyScribe GFX Purification Kit (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's protocol. Test and control DNA was pooled and mixed with 25 μ g Human CotI DNA (Invitrogen), 26 μ L blocking buffer (Agilent Technologies), and 130 μ L hybridization buffer (Agilent Technologies). Before hybridization to the array, the mix was denatured at 95°C for 5 min then pre-associated at 37°C for 1 h. Probes were applied to the slide using an Agilent microarray hybridization station. Hybridization was carried out for 40 h at 65°C in a rotating oven (0.040 \times g). The array was disassembled and washed with

wash buffers supplied with the Agilent 105 A kit. The slides were dried and scanned using an Agilent G2565BA DNA microarray scanner.

Image and data analysis. Image analysis was carried out using CGH Analytics Software v. 3.4.40 (Agilent Technologies) with default settings. The software automatically determines the fluorescence intensities of the spots for both fluorochromes, performing background subtraction and data normalization, and compiles the data into a spreadsheet that links the fluorescent signal of every oligonucleotide on the array to the oligonucleotide name, its position on the array, and its position in the genome. The linear order of the oligonucleotides is reconstituted in the ratio plots consistent with an ideogram. The ratio plot is arbitrarily assigned such that gains and losses in DNA copy number at a particular locus are observed as a deviation of the ratio plot from a modal value of 1.0. DNA sequence information refers to the public University of California, Santa Cruz (UCSC) database (Human Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu>, May 2004 assembly).

Real-time quantitative PCR analysis. Real-time quantitative PCR was carried out to confirm array-CGH data. For recurrent rearrangements, we used probes already reported in a previous manuscript by Sampieri *et al.* (2008) and new custom-made TaqMan probes (Applied Biosystems) designed for the *RBI* and *RBL2* genes (Supplementary Table 1). By using custom-made assays, we also confirmed the RN and RB (*SKP2*-specific probe) private imbalances found in case #15 (Table 4) (Supplementary Table 1). PCR reactions and data analysis were carried out as previously described.⁽⁵⁾

Statistical analysis. We used the Mann–Whitney *U*-test to compare means of continuous variables between the two groups. *P*-values ≤ 0.05 were considered significant.

Results

Array-CGH analysis in RB samples. Using array-CGH, we investigated genomic rearrangements in 18 eye tissues, 10 from bilateral and eight from unilateral RB patients. Array-CGH analysis identified genomic rearrangements in 12 of 18 tumor samples (~67%).

In total, we found 64 genomic aberrations, mostly gains (47 gains vs 17 losses) (Table 1). The number of rearrangements was significantly different (Mann–Whitney *U*-test, *P* = 0.002) between the two groups of patients: bilateral cases showed a lower number of imbalances (mean 1; range 0–4) compared with unilateral cases (mean 7; range 2–24) (Table 1).

Recurrent imbalances involved chromosomes 1, 2, 6, 9, 11, 13, and 16 (Fig. 1) (Table 2). In 7 of 18 (40%) samples the entire p arm of chromosome 6 was duplicated (Table 2). The other cases bearing overlapping rearrangements defined minimal common regions of gain (MRG) or loss (MRL): dup(1)(q12; q25.3) (4/18 samples; 22%), dup(2)(p24.3; p24.2) (4/18 samples; 22%), dup(9)(q22.2) (3/18 samples; 17%), dup(9)(q33.1) (2/18 samples; 11%), del(11)(q24.3) (2/18 samples; 11%), del(13)(q13.2-q22.3) (2/18 samples; 11%), and del(16)(q12.1-q21) (2/18 samples; 11%) (Fig. 1) (Table 2). Recurrent regions of gain or loss have been confirmed by real-time quantitative PCR (Supplementary Table 1).

These regions have been studied for gene content to identify candidates involved in RB progression. We first searched for known oncogenes and tumor suppressors (Table 2). Based on annotated gene function, we selected additional candidates (Table 2). Priority was given to genes participating in the pRB pathway and to genes playing a role in the mechanisms of cell proliferation, differentiation, apoptosis, or senescence (Table 2).

Correlating molecular and clinical data, we found that in unilateral cases the number of rearrangements is associated with age at diagnosis (Table 3). The group with low-level chromosomal instability (≤ 4 chromosomal aberrations) presented with a younger age at diagnosis (mean 511 days; range 90–958 days), whereas the group with high-level chromosomal instability (≥ 7 chromosomal aberrations) were older at diagnosis (mean 1606 days; range 1326–1828 days) (Table 3).

Table 1. Chromosomal aberrations detected by array-comparative genomic hybridization in 18 retinoblastomas

| Case no. | Phenotype | No. aberrations | aCGH gains | aCGH losses |
|----------|-----------|-----------------|------------------------|----------------------------|
| 1 | B | 0 | / | / |
| 2 | B | 0 | / | / |
| 3 | B | 0 | / | / |
| 4 | B | 0 | / | / |
| 5 | B | 0 | / | / |
| 6 | B | 0 | / | / |
| 7 | B | 1 | 2 p24.3-p24.2{2.15 Mb} | |
| 8 | B | 2 | 6p25.3-p11.1{58.7 Mb} | 5q34{13.83 Mb} |
| 9 | B | 2 | 2p24.3{3.75 Mb} | |
| | | | 6p25.3-p11.1{58.7 Mb} | |
| 10 | B | 4 | | 2q32.1{0.43 Mb} |
| | | | | 4q28.3{0.40 Mb} |
| | | | | 7q31.1{0.70 Mb} |
| | | | | 8q21.3{0.35 Mb} |
| 11 | U | 2 | 6p25.3-p11.1{58.7 Mb} | 13q12.11-13q31.2{69.77 Mb} |
| 12 | U | 2 | 2p25.3-p22.3{34.85 Mb} | |
| | | | 6p25.3-p11.1{58.7 Mb} | |
| 13 | U | 4 | 1q12-q25.3{38.17 Mb} | 13q13.2-q22.3{44.90 Mb} |
| | | | 3q26.1-q29{32.80 Mb} | |
| | | | 9q12-q34.3{50.30 Mb} | |
| 14 | U | 4 | 1p35.3-q44{217.70 Mb} | 9p24.3-p23{12.59 Mb} |
| | | | 6p25.3-p11.1{58.7 Mb} | |
| | | | 7q34-q36.3{21.30 Mb} | |
| 15 | U | 4 | 5p15.33-p12{46.14 Mb} | |
| | | | 5q13.2{0.70 Mb} | |
| | | | 6p25.3-p11.1{58.7 Mb} | |
| | | | 8p23.1{0.60 Mb} | |
| 16 | U | 7 | 1q21.1-q44{104.50 Mb} | 1p32.1-p12{58.4 Mb} |
| | | | 2p25.3-p22.3{35.55 Mb} | 4p16.3-p14{37.6 Mb} |
| | | | | 11q22.3-q25{28.0 Mb} |
| | | | | 12p13.33-p13.1{14.2 Mb} |
| | | | | 16q12.1-q21{7.1 Mb} |
| 17 | U | 8 | 1q12-q44{104.50 Mb} | 7p13{0.66 Mb} |
| | | | 6p25.3-p11.1{58.7 Mb} | 14q11.2-q21.1{23.25 Mb} |
| | | | 9q22.2{0.23 Mb} | |
| | | | 20q13.33{0.24 Mb} | 15q23{0.30 Mb} |
| | | | | 16q11.2-q24.3{43.66 Mb} |
| 18 | U | 24 | 5q33.1{0.35 Mb} | 1p21.3{0.30 Mb} |
| | | | 7p15.2{0.23 Mb} | 2q11.2{0.28 Mb} |
| | | | 8q24.23{0.28 Mb} | 2q31.33{0.13 Mb} |
| | | | 9q22.2{0.58 Mb} | 2q37.3{0.13 Mb} |
| | | | 9q33.1{0.31 Mb} | 3q25.1{0.31 Mb} |
| | | | 10q23.1{0.15 Mb} | 4q26{0.39 Mb} |
| | | | 11q23.3{0.63 Mb} | 10p12.33{0.11 Mb} |
| | | | 12q24.32{0.16 Mb} | 11q24.3{0.58 Mb} |
| | | | 13q12.12{0.22 Mb} | 20p11.21{0.43 Mb} |
| | | | 13q13.3{0.31 Mb} | |
| | | | 14q22.3{0.49 Mb} | |
| | | | 17q25.3{0.28 Mb} | |
| | | | 18q21.1{1.98 Mb} | |
| | | | 18q22.3-q23{1.59 Mb} | |
| | | | 20q13.12{0.20 Mb} | |

B, bilateral cases; U, unilateral cases. The size of rearrangement is given in curly brackets.

Array-CGH analysis in RN samples. Two cases affected by unilateral RB (#15 and #16) showed areas of RN adjacent to the tumor. The RN of case #16 was clinically diagnosed as a benign lesion that underwent malignant transformation after 11 months, whereas the RN of case #15 was identified by retrospective histopathological examination. Detailed clinical and histopathological data of the two lesions have already been described in Sampieri *et al.*⁽⁵⁾

Array-CGH analysis did not detect any genomic rearrangement in the RN of patient #16. In contrast, five genomic rearrangements

were identified in the RN of case #15 (Table 4). Among them, three were also in the adjacent RB (dup5q13.2, dup6p, dup8p23.1), whereas the remaining two (dup1q32.2 and dup13q31.2) were detected exclusively in the RN (Table 4). For the common rearrangement on 6p, array-CGH log ratio values indicated that the level of gain was progressively increased from RN (log ratio ~0.5) to RB (log ratio ~1.0) (Table 4). One rearrangement, dup5p, was present only in the RB (Table 4). RN- and RB-specific rearrangements have been confirmed by real-time quantitative PCR.

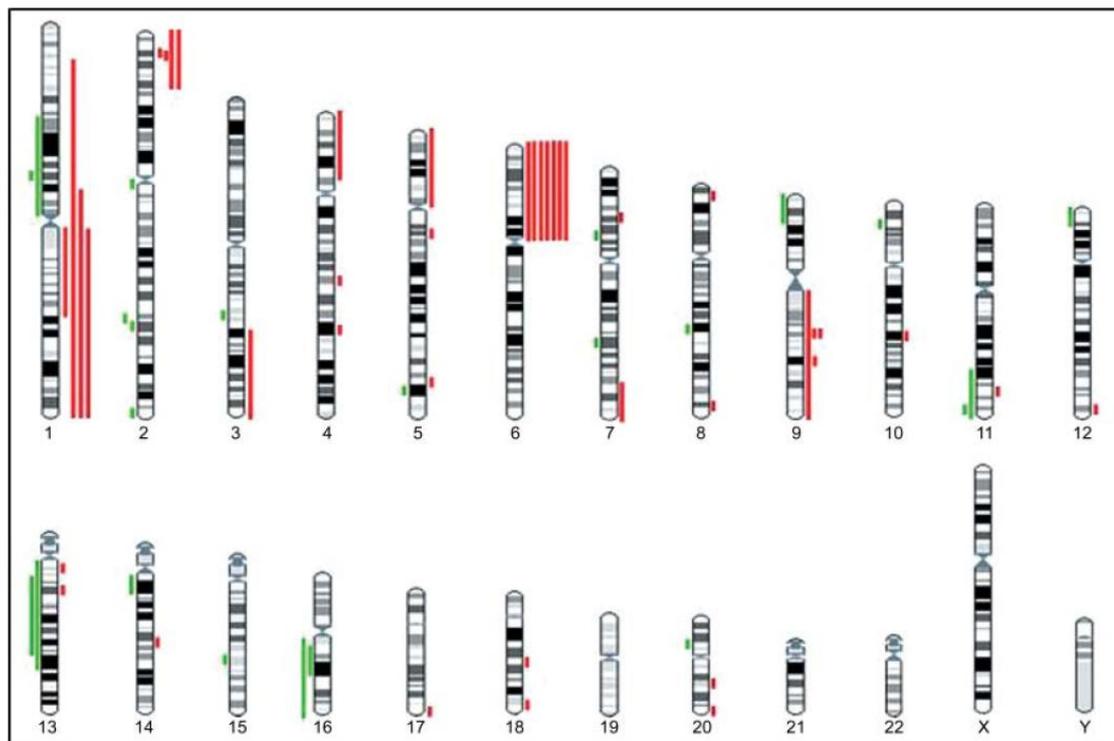


Fig. 1. Overview of rearranged chromosomal regions in 18 retinoblastomas as detected by array-comparative genomic hybridization. Lines on the left of each chromosome represent losses and lines on the right represent gains.

Table 2. Recurrent genomic imbalances identified by array-comparative genomic hybridization analysis

| Chromosomal imbalances | Breakpoints | Frequency (%) | No. genes | Oncogenes and tumor suppressors | Other candidate genes |
|--|----------------------------|---------------|-----------|---------------------------------|-------------------------|
| Dup(6)(p25.3; p11.1){58.7 Mb} | 108 083 58 827 841 | 40 (7/18) | 461 | <i>IRF4, DEK, PIM1</i> | <i>E2F3, CCND3</i> |
| Dup(1)(q12; q25.3){38.17 Mb} [†] | 141 465 960 179 620 513 | 22 (4/18) | 497 | / | <i>MCL1, SHC1, MUC1</i> |
| Dup(2)(p24.3; p24.2){2.15 Mb} [†] | 15 120 360 17 242 742 | 22 (4/18) | 4 | <i>MYCN</i> | <i>DDX1</i> |
| Dup(9)(q22.2){0.23 Mb} [†] | 90 484 233 90 687 380 | 17 (3/18) | 2 | / | / |
| Dup(9)(q33.1){0.31 Mb} | 116 974 701 117 251 019 | 11 (2/18) | 1 | / | / |
| Del(11)(q24.3){0.58 Mb} [†] | 127 676 090 128 202 918 | 11 (2/18) | 2 | / | <i>ETS1</i> |
| Del(13)(q13.2; q22.3){44.90 Mb} [†] | 33 623 259 78 516 556 | 11 (2/18) | 123 | <i>RB1, ARLTS1</i> | / |
| Del(16)(q12.1; q21){7.02 Mb} [†] | 50 674 625 57 636 204 | 11 (2/18) | 67 | / | <i>CYLD, RBL2</i> |

[†]Minimal overlapping regions.

These regions have been studied for gene content in order to identify candidates involved in the RN–RB transition. We searched for known oncogenes and tumor suppressors, for genes related to the pRB pathway, and for genes involved in proliferation, differentiation, apoptosis, or senescence (Table 4).

Discussion

The loss of *RB1* function, by means of two mutational events (M1 and M2), is considered to be the first rate-limiting step in RB development.^(1,4) Several studies have suggested that genomic

Table 3. Correlation between the number of genomic rearrangements and age at diagnosis in unilateral cases

| Case no. | No. rearrangements | Chromosomal instability group | Age at diagnosis (days) |
|----------|--------------------|-------------------------------|-------------------------|
| 11 | 2 | ≤4 | 90 |
| 12 | 2 | ≤4 | 743 |
| 13 | 4 | ≤4 | 285 |
| 14 | 4 | ≤4 | 480 |
| 15 | 4 | ≤4 | 958 |
| 16 | 7 | ≥7 | 1326 |
| 17 | 8 | ≥7 | 1663 |
| 18 | 24 | ≥7 | 1828 |

imbalances (M3–Mn) involving specific oncogenes and tumor suppressors are required for malignant transformation of RB.⁽⁹⁾ In order to characterize such genomic changes, we used high-resolution array-CGH to investigate a series of 18 tumor samples (10 bilateral and eight unilateral) and two RN samples from enucleated RB patients.⁽⁵⁾ To our knowledge this is the first genome-wide study in RN tissue.

In RB samples, we detected a total of 64 rearrangements: 47 gains and 17 losses (Table 1). Interestingly, bilateral cases showed a lower number of imbalances (mean 1) compared to unilateral cases (mean 7), with statistical significance ($P = 0.002$) (Table 1). We compared our data with results obtained in the only other array-CGH study carried out previously on RB tissues.⁽¹⁸⁾ We found that, even if the resolution level was quite different (25 vs 500 kb), the results were in agreement and the number of rearrangements in unilateral cases was significantly higher than in bilateral cases.⁽¹⁸⁾ These results suggest that, beyond the inactivation of both *RB1* alleles, different molecular mechanisms may be involved in tumor progression of hereditary RB. Apart from chromosomal instability, other genetic alterations can drive cancer progression, including subtle DNA sequence changes such as microsatellite instability, chromosomal translocations, and single-gene amplifications or deletions. All of these changes have been described in RB but systematic correlations with clinical data have never been carried out.^(5,19–22)

In accordance with previous data, we found recurrent imbalances on chromosomes 1, 2, 6, 13, and 16 (Table 2).⁽⁹⁾ Three previously undescribed recurrent rearrangements were identified, two on chromosome 9 and one on chromosome 11 (Table 2).

Gains of 6p showed the highest frequency (40%), confirming that it represents the most common change observed in RB.⁽⁹⁾

The rearrangement contains 461 genes, including the three known oncogenes *IRF4*, *DEK*, and *PIM1* (Table 2). We further selected two members of the pRB pathway that have an essential role in G1–S cell-cycle transition: the pRB-regulated transcription factor *E2F3* and cyclin *CCND3*, involved in pRB phosphorylation (Table 2).^(23,24) Previous studies reporting more focused gains at 6p22 led to deep investigation of the genes within this region.⁽¹⁴⁾ By QM-PCR and microarray expression analysis on RB tissues, it has been demonstrated that *DEK* and *E2F3* are the most commonly gained genes and that they show overexpression.^(25,26) Furthermore, *DEK* and *E2F3* are overexpressed in Tag-RB murine tumors.⁽⁹⁾ These results indicate that both *DEK* and *E2F3* represent strong candidates for RB progression and that a combination of genes on 6p, instead of a single one, probably contributes to RB progression.

The MRG on chromosome 1 (dup1q12-q25.3) contains 497 genes (Table 2). We selected *MUC1* as its overexpression, as found in human carcinomas and certain hematological malignancies, induces transformation and resistance to apoptosis (Table 2).^(27,28) Other interesting candidates are *MCL1*, encoding a potent multi-domain antiapoptotic protein of the BCL2 family, and *SHC1*, a key intracellular signaling molecule that participates in the transforming activity of oncogenic tyrosine kinases (Table 2).^(29,30) By array-CGH, Zielinski *et al.* also found recurrent 1q imbalances narrowing one MRG at 1q22 and indicated *SHC1* as a candidate.⁽¹⁸⁾ Two previously identified strong candidates on 1q, *KIF14* and *MDM4*, were not included within the identified MRG. Using a gene-specific quantitative PCR approach, both genes have been found to be gained in RB.⁽⁵⁾ In addition, their overexpression is well documented in RB tissues.^(31,32) *KIF14* and *MDM4* may therefore play an important role in RB progression, regardless of 1q status.

The MRG defined on chromosome 2 contains only four genes, including the known oncogenes *MYCN* and *DDX1*, a gene that encodes a DEAD box protein probably involved in pre-mRNA 3'-end processing that has been shown to possess oncogenic properties (Table 2).⁽³³⁾ Importantly, *MYCN* and *DDX1* have been found to be coamplified and overexpressed in RB and neuroblastoma cell lines and tumors.⁽³⁴⁾

The two small MRG detected on chromosome 9, dup(9)(q22.2) and dup(9)(q33.1), contain two genes and one gene, respectively (Table 2). None are reported as oncogenes or tumor suppressors and no obvious candidates have emerged.

Only two genes lie in the MRL defined on chromosome 11 (Table 2). The transcription factor *ETS1* is involved in control of cellular proliferation, cell senescence and death, and tumorigenesis.⁽³⁵⁾ Its expression is correlated with more malignant carcinomas and is a negative prognostic indicator.⁽³⁶⁾

Table 4. Genomic rearrangements identified in the retinoma (RN) and retinoblastoma (RB) of case #15

| Chromosomal imbalances | Breakpoints | RN | RB | No. genes | Oncogenes and tumor suppressors | Other candidate genes |
|-------------------------------|----------------------------|----------------|----------------|-----------|---------------------------------|-----------------------|
| Dup(1)(q32.2){0.28 Mb} | 205 507 621 205 754 022 | + | – | 0 | / | / |
| Dup(5)(p15.33; p12){46.14 Mb} | 110 640 46 008 694 | – | + | 121 | / | <i>SKP2</i> |
| Dup(5)(q13.2){0.70 Mb} | 69 741 318 70 422 297 | + | + | 7 | / | <i>BIRC1</i> |
| Dup(6)(p25.3; 11.1){58.7 Mb} | 126 650 58 721 961 | + [†] | + [†] | 461 | <i>IRF4, DEK, PIM1</i> | <i>E2F3, CCND3</i> |
| Dup(8)(p23.1){0.60 Mb} | 7 261 418 7 789 937 | + | + | 7 | / | / |
| Dup(13)(q31.2){0.38 Mb} | 87 587 852 87 622 748 | + | – | 0 | / | / |

Position of oligonucleotides and genes refers to the UCSC (University of California, Santa Cruz) Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>), on Human, May 2004 assembly). [†]Log ratio values: ~0,5 in RN; ~1,0 in RB.

The MRL on chromosome 13 contains 123 genes (Table 2). Apart from *RBI*, this region bears the newly characterized tumor-suppressor gene *ARLTS1*.⁽³⁷⁾ It encodes a pro-apoptotic protein of the Ras superfamily involved in the pathogenesis of various types of tumors: two SNP have been found to influence familial cancer risk for B-CLL and *BRCA1*- and *BRCA2*-negative breast cancers, whereas DNA hypermethylation and genomic deletions have been identified as mechanisms of *ARLTS1* downregulation in CLL, lung cancers, and ovarian tumors.⁽³⁸⁻⁴¹⁾

The MRL on chromosome 16 contains the *RBL2* gene, encoding RB family member p130 (Table 2). *RBL2* loss has been confirmed by real-time quantitative PCR. *RBL2* expression is reduced in RB tissues and is one of the genes that can be ablated along with *Rb1* to cause retinal tumor formation in mice.⁽⁴²⁻⁴⁴⁾ This region also includes the familial cylindromatosis tumor-suppressor gene *CYLD*, whose loss inhibits the apoptotic pathway by activating nuclear factor- κ B (Table 2).⁽⁴⁵⁾

Correlating array-CGH results with age at diagnosis, we observed that, among unilateral cases, a higher number of chromosomal aberrations is associated with an older age (Table 3). These results are in accordance with a previous CGH study reporting that unilateral RB from children with an older age showed significantly more genetic abnormalities than RB from children with a younger age.⁽¹⁵⁾ This could be due to the fact that a high level of genomic instability may lead to suppression of tumor growth, resulting in delayed disease onset.⁽⁴⁶⁾ It is also possible that an intrinsically slow growth rate of the tumor allows the accumulation of a higher number of chromosomal aberrations.

Sample #18, with the oldest age at diagnosis, had the highest number of genomic aberrations (24), all of which were small in size (0.11–1.98 Mb) (Tables 1,3). Interestingly, dup18q21.1 contains Sma- and Mad-related protein 2 (*SMAD2*), encoding a protein with sequence similarity to the *Mad2* gene product in *Drosophila*, a key component of the spindle checkpoint.^(47,48) It has been demonstrated that hyperactivation of *Mad2* by *E2F1* leads to chromosomal instability and aneuploidy in cells in which the Rb pathway is disrupted.⁽⁴⁹⁾

Array-CGH analysis of the RN tissues revealed strikingly different results in the two cases. RN from sample #16 did not present with any rearrangements, whereas seven alterations were detected in the adjacent RB (Table 1). Interestingly, one of the rearrangements (del11q12.1-q21) contains the *RBL2* gene. In a recent paper, Dimaras *et al.* found that p130 is highly expressed in RN but not in RB, suggesting that it represents a key factor differentiating the two lesions.⁽⁴⁾ The authors also hypothesized that RB can emerge from stable RN by failure of senescence and that p130 may represent the effector of such a mechanism.^(45,50)

In case #15, the RN showed five genomic rearrangements compared to normal retina, three of which were common to RB (Table 4). Concerning the common imbalance on 6p, the level of gain was higher in RB than RN, reinforcing the importance of candidate genes such as *DEK* and *E2F3* in malignant progression. The imbalance found in both tissues on 5q includes *BIRC1*, an interesting candidate gene for early retina–RN transition as it encodes a protein known to act as an inhibitor of apoptosis, directly suppressing caspases (Table 4).⁽⁵¹⁾ Two rearrangements were found exclusively in RN and they do not contain any known genes (Table 4). Chromosomal gain on 5p, present only in RB, includes *SKP2* (p45), an oncogenic protein found to be overexpressed in cancer (Table 4).⁽⁵²⁾ It displays an S-phase-promoting function and is implicated in the ubiquitin-mediated proteolysis of the Cdk inhibitor p27.⁽⁵³⁻⁵⁵⁾ It has been demonstrated that cell-cycle arrest through the inhibition of cdk2 activity by p27 is critical for pRB-induced senescence.⁽⁵⁶⁾ Bypass of senescence could be therefore involved in malignant transformation of RB through the pRB–SKP2–p27 pathway.

The different genomic profiles obtained in the two lesions identified as RN, sharing the same histopathological appearance,

indicate that they do indeed represent different entities. Case #16, which was clinically diagnosed as RN and was observed to progress to RB after 11 months, was a pretumoral lesion that had not yet acquired chromosomal aberrations. In a previous study, we showed by real-time quantitative PCR that RN displays gene-specific low-level gains, with higher levels in adjacent RB.⁽⁵⁾ These results suggest that increased genomic instability, including chromosomal aberrations and progressive gene amplification, accompanies the RN–RB transition.

In contrast, the other case of RN (case #15), without clinically detectable RN that was identified by retrospective histopathological examination, represents a further step in RB progression. It appears as a subclone of cells bearing ‘benign’ rearrangements that has been overwhelmed by another subclone presenting aberrations with selective growth advantage, leading to outgrowth of the tumor. These data underline that only specific sets of chromosomal rearrangements can lead a tumor-cell precursor to overcome the selection barrier and generate a fully malignant phenotype.

In conclusion, array-CGH analysis carried out on 18 RB revealed a different chromosomal instability level between bilateral and unilateral cases. Among the unilateral group, a bimodal distribution of chromosomal changes was observed, which correlated with age of diagnosis. Already characterized recurrent genomic aberrations have been confirmed and three new ones have been detected, indicating candidate genes for RB progression. Finally, the present study represents the first report of genomic profiling in RN tissues and provides the basis for investigation of the role of chromosomal instability in the RN–RB transition.

Acknowledgments

This work was supported by a FIRB grant (RBIP00PMF2) to A.R., University of Siena grant PAR2006 to M.B., and a grant on retinoblastoma from Istituto Toscano Tumori to A.R.

Abbreviations

| | |
|--------|--|
| ARLTS1 | ADP-Ribosylation factor-Like Tumor Suppressor 1 |
| BCL2 | B-cell CLL/Lymphoma 2 |
| B-CLL | B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia |
| BIRC1 | Baculoviral IAP Repeat-Containing protein 1 |
| BRCA | Breast Cancer |
| CCND3 | Cyclin D3 |
| Cdk | Cyclin-dependent kinases |
| CLL | Chronic Lymphocytic Leukemia |
| CYLD | Cylindromatosis |
| DDX1 | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) Box polypeptide 1 |
| DEK | DEK oncogene |
| DHPLC | Denaturing High Performance Liquid Chromatography |
| E2F3 | E2F transcription factor 3 |
| ETS1 | V-ETS erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian) |
| FIRB | Fondo Investimenti Ricerca di Base |
| IRF4 | Interferon Regulatory Factor 4 |
| KIF14 | Kinesin Family member 14 |
| MCL1 | Myeloid Cell Leukemia 1 |
| MDM4 | Mouse Double Minute 4 homolog |
| MLPA | Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification |
| MUC1 | MUCIN 1 |
| MYCN | V-MYC avian myelocytomatosis viral-related oncogene, Neuroblastoma-derived |
| PIM1 | PIM 1 oncogene |
| pRB | Retinoblastoma protein |
| QM | Quantitative Multiplex |
| RB1 | Retinoblastoma |
| RBL | retinoblastoma-like |
| RBL2 | retinoblastoma-like 2 |
| SHC1 | Src (homology 2 domain containing) transforming protein |
| SKP2 | S-phase Kinase-associated Protein 2 |
| SNP | Single Nucleotide Polymorphism |
| WGA | Whole Genome Amplification |

References

- Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; **68**: 820–3.
- Abramson DH, Scheffler AC. Update on retinoblastoma. *Retina* 2004; **24**: 828–48.
- Vogel F. Genetics of retinoblastoma. *Hum Genet* 1979; **52**: 1–54.
- Dimaras H, Khetan V, Halliday W *et al*. Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 1363–72.
- Sampieri K, Mencarelli MA, Epistolato MC *et al*. Genomic differences between retinoma and retinoblastoma. *Acta Oncol* 2008; **47**: 1483–92.
- Gallie BL, Ellsworth RM, Abramson DH, Phillips RA. Retinoma: spontaneous regression of retinoblastoma or benign manifestation of the mutation? *Br J Cancer* 1982; **45**: 513–21.
- Margo C, Hidayat A, Kopelman J, Zimmerman LE. Retinocytoma: A benign variant of retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 1983; **101**: 1519–31.
- 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**: 1731s–5s.
- Corson TW, Gallie BL. One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; **46**: 617–34.
- Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S *et al*. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; **20**: 399–407.
- Pinkel D, Segraves R, Sudar D *et al*. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; **20**: 207–11.
- Davies JJ, Wilson IM, Lam WL. Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. *Chromosome Res* 2005; **13**: 237–48.
- Mairal A, Pinglier E, Gilbert E *et al*. Detection of chromosome imbalances in retinoblastoma by parallel karyotype and CGH analyses. *Genes Chromosomes Cancer* 2000; **28**: 370–9.
- Chen D, Gallie BL, Squire JA. Minimal regions of chromosomal imbalance in retinoblastoma detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2001; **129**: 57–63.
- Herzog S, Lohmann DR, Buiting K *et al*. Marked differences in unilateral isolated retinoblastomas from young and older children studied by comparative genomic hybridization. *Hum Genet* 2001; **108**: 98–104.
- Lillington DM, Kingston JE, Coen PG *et al*. Comparative genomic hybridization of 49 primary retinoblastoma tumors identifies chromosomal regions associated with histopathology, progression, and patient outcome. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; **36**: 121–8.
- van der Wal JE, Hermens MA, Gille HJ *et al*. Comparative genomic hybridisation divides retinoblastomas into a high and a low level chromosomal instability group. *J Clin Pathol* 2003; **56**: 26–30.
- Zielinski B, Gratiis S, Toedt G *et al*. Detection of chromosomal imbalances in retinoblastoma by matrix-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; **43**: 294–301.
- Choy KW, Pang CP, Fan DS *et al*. Microsatellite instability and MLH1 promoter methylation in human retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45**: 3404–9.
- Dries D, Baca K, Truss L, Dobin S. Interstitial deletion of 13q and a 13; X chromosome translocation results in partial trisomy 13 and bilateral retinoblastoma. *Ophthalmic Genet* 2003; **24**: 175–80.
- Howard RO. Multiple changes in oncogenes and tumor suppressor genes in human retinoblastoma. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1996; **94**: 299–312.
- Bowles E, Corson TW, Bayani J *et al*. Profiling genomic copy number changes in retinoblastoma beyond loss of RB1. *Genes Chromosomes Cancer* 2007; **46**: 118–29.
- Wu L, Timmers C, Maiti B *et al*. The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* 2001; **414**: 457–62.
- Shu F, Lv S, Qin Y *et al*. Functional characterization of human PFTK1 as a cyclin-dependent kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 9248–53.
- Grasemann C, Gratiis S, Stephan H *et al*. Gains and overexpression identify DEK and E2F3 as targets of chromosome 6p gains in retinoblastoma. *Oncogene* 2005; **24**: 6441–9.
- Orlic M, Spencer CE, Wang L, Gallie BL. Expression analysis of 6p22 genomic gain in retinoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2006; **45**: 72–82.
- Agata N, Ahmad R, Kawano T, Raina D, Kharbanda S., Kufe D. MUC1 oncoprotein blocks death receptor-mediated apoptosis by inhibiting recruitment of caspase-8. *Cancer Res* 2008; **68**: 6136–44.
- Raina D, Ahmad R, Kumar S *et al*. MUC1 oncoprotein blocks nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *EMBO J* 2006; **25**: 3774–83.
- Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, Gores GJ. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 2007; **26**: 6133–40.
- McGlade J, Cheng A, Pelicci G, Pelicci PG, Pawson T. Shc proteins are phosphorylated and regulated by the v-Src and v-Fps protein-tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 8869–73.
- Corson TW, Huang A, Tsao MS, Gallie BL. KIF14 is a candidate oncogene in the 1q minimal region of genomic gain in multiple cancers. *Oncogene* 2005; **24**: 4741–53.
- Laurie NA, Donovan SL, Shih CS *et al*. Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature* 2006; **444**: 61–6.
- Scott D, Eldsen J, Pearson A, Lunec J. Genes co-amplified with MYCN in neuroblastoma: silent passengers or co-determinants of phenotype? *Cancer Lett* 2003; **197**: 81–6.
- Godbout R, Packer M, Bie W. Overexpression of a DEAD box protein (DDX1) in neuroblastoma and retinoblastoma cell lines. *J Biol Chem* 1998; **273**: 21 161–8.
- Hsu T, Trojanowska M, Watson DK. Ets proteins in biological control and cancer. *J Cell Biochem* 2004; **91**: 896–903.
- Oikawa T, Yamada T. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* 2003; **303**: 11–34.
- Yendamuri S, Trapasso F, Calin GA. ARLTS1 – a novel tumor suppressor gene. *Cancer Lett* 2008; **264**: 11–20.
- Calin GA, Trapasso F, Shimizu M *et al*. Familial cancer associated with a polymorphism in ARLTS1. *N Engl J Med* 2005; **352**: 1667–76.
- Frank B, Meyer P, Boettger MB *et al*. ARLTS1 variants and melanoma risk. *Int J Cancer* 2006; **119**: 1736–7.
- Petrocca F, Iliopoulos D, Qin HR *et al*. Alterations of the tumor suppressor gene ARLTS1 in ovarian cancer. *Cancer Res* 2006; **66**: 10 287–91.
- Yendamuri S, Trapasso F, Ferracin M *et al*. Tumor suppressor functions of ARLTS1 in lung cancers. *Cancer Res* 2007; **67**: 7738–45.
- Bellan C, De Falco G, Tosi GM *et al*. Missing expression of pRb2/p130 in human retinoblastomas is associated with reduced apoptosis and lesser differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; **43**: 3602–8.
- Tosi GM, Trimarchi C, Macaluso M *et al*. Genetic and epigenetic alterations of RB2/p130 tumor suppressor gene in human sporadic retinoblastoma: implications for pathogenesis and therapeutic approach. *Oncogene* 2005; **24**: 5827–36.
- MacPherson D, Sage J, Kim T, Ho D, McLaughlin ME, Jacks T. Cell type-specific effects of Rb deletion in the murine retina. *Genes Dev* 2004; **18**: 1681–94.
- Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, Bernards R. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF- κ B. *Nature* 2003; **424**: 797–801.
- Weaver BA, Cleveland DW. Aneuploidy: instigator and inhibitor of tumorigenesis. *Cancer Res* 2007; **67**: 10 103–5.
- Riggins GJ, Thiagalingam S, Rozenblum E *et al*. Mad-related genes in the human. *Nat Genet* 1996; **13**: 347–9.
- Chan GK, Liu ST, Yen TJ. Kinetochores structure and function. *Trends Cell Biol* 2005; **15**: 589–98.
- van Deursen JM. Rb loss causes cancer by driving mitosis mad. *Cancer Cell* 2007; **11**: 1–3.
- Kapic A, Helmbold H, Reimer R, Klotzsche O, Deppert W, Bohn W. Cooperation between p53 and p130 (Rb2) in induction of cellular senescence. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 324–34.
- LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; **17**: 3247–59.
- Gstaiger M, Jordan R, Lim M *et al*. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 5043–8.
- Sutterluty H, Chatelain E, Marti A *et al*. p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nat Cell Biol* 1999; **1**: 207–14.
- Tsvetkov LM, Yeh KH, Lee SJ, Sun H, Zhang H. p27 (Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF (Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr Biol* 1999; **9**: 661–4.
- Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1999; **1**: 193–9.
- Alexander K, Hinds PW. Requirement for p27 (KIP1) in retinoblastoma protein-mediated senescence. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 3616–31.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table 1. Primers and probe sequences for real-time quantitative polymerase chain reaction

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

APPENDICE 2

Epigenetic and Copy Number Variation Analysis in Retinoblastoma by MS-MLPA

Gabriella Livide · Maria Carmela Epistolato ·
Mariangela Amenduni · Vittoria Disciglio ·
Annabella Marozza · Maria Antonietta Mencarelli ·
Paolo Toti · Stefano Lazzi · Theodora Hadjistilianou ·
Sonia De Francesco · Alfonso D'Ambrosio ·
Alessandra Renieri · Francesca Ariani

Received: 6 October 2011 / Accepted: 3 January 2012
© Arányi Lajos Foundation 2012

Abstract Retinoblastoma is the most common primary intra-ocular malignancy in children. Two step inactivation of *RB1* (M1-M2) represents the key event in the pathogenesis of retinoblastoma but additional genetic and epigenetic events (M3-Mn) are required for tumor development. In the present study, we employed Methylation Specific Multiplex Ligation Probe Assay to investigate methylation status and copy number changes of 25 and 39 oncosuppressor genes, respectively.

G. Livide · M. C. Epistolato · M. Amenduni · V. Disciglio ·
A. Marozza · M. A. Mencarelli · A. Renieri · F. Ariani
Medical Genetics, Department of Biotechnology,
University of Siena,
Siena, Italy

M. A. Mencarelli · A. Renieri
Medical Genetics, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese,
Siena, Italy

P. Toti · S. Lazzi
Department of Human Pathology and Oncology,
Section of Pathology, University of Siena,
Siena, Italy

T. Hadjistilianou · S. De Francesco
Ophthalmological Science and Neuroscience,
Azienda Ospedaliera Universitaria Senese,
Siena, Italy

A. D'Ambrosio
Pediatrics Department, University of Siena,
Siena, Italy

A. Renieri (✉)
Medical Genetics Unit, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese,
University of Siena,
viale Bracci 2,
53100 Siena, Italy
e-mail: renieri@unisi.it

This technique was applied to analyse 12 retinoblastomas (5 bilateral and 7 unilateral) and results were compared to corresponding normal retina. We identified hypermethylation in seven new genes: *MSH6* (50%), *CD44* (42%), *PAX5* (42%), *GATA5* (25%), *TP53* (8%), *VHL* (8%) and *GSTP1* (8%) and we confirmed the previously reported hypermethylation of *MGMT* (58%), *RB1* (17%) and *CDKN2* (8%). These genes belong to key pathways including DNA repair, pRB and p53 signalling, transcriptional regulation, protein degradation, cell-cell interaction, cellular adhesion and migration. In the same group of retinoblastomas, a total of 29 copy number changes (19 duplications and 10 deletions) have been identified. Interestingly, we found deletions of the following oncosuppressor genes that might contribute to drive retinoblastoma tumorigenesis: *TP53*, *CDH13*, *GATA5*, *CHFR*, *TP73* and *IGSF4*. The present data highlight the importance of epigenetic changes in retinoblastoma and indicate seven hypermethylated oncosuppressors never associated before to retinoblastoma pathogenesis. This study also confirms the presence of copy number variations in retinoblastoma, especially in unilateral cases (mean 3 ± 1.3) where these changes were found more frequently respect to bilateral cases (mean 1.4 ± 1.1).

Keywords Retinoblastoma · MS-MLPA · Epigenetics · Copy number changes

Introduction

Retinoblastoma (RB, OMIM#180200) is a childhood malignant tumor of the developing retina with an incidence of one case in 14,000–22,000 live births [1]. Recent findings provide support for a cone precursor origin of RB [2]. It is caused by

biallelic inactivation (M1-M2) of the *RB1* tumor suppressor gene within chromosome bands 13q14.2 [3, 4]. In non-hereditary RB (60%), both inactivating events occur in the retinal cell leading to unilateral sporadic tumors [5]. In the hereditary forms (40%), germline mutation of one *RB1* allele is associated to RB predisposition and is transmitted as an autosomal-dominant trait with 90% penetrance [5, 6]. Inactivation of the second allele occurs in the retinal cells and generally results in multiple and often bilateral tumors.

In 1999, Gallie *et al.* introduced a model for retinoblastoma development in which it was assumed that the two-step inactivation of *RB1* is necessary but not sufficient for the exponential expansion of RB and that further events (M3-Mn) are required [7]. This hypothesis was supported by the observation that RB tumors generally show additional recurrent genetic alterations [8]. In particular, studies performed by standard karyotype, CGH and array-CGH identified RB recurrent genomic rearrangements including gain of 1q, 2p, 6p and 13q, and loss of 16q [8, 9]. Additional events associated with tumor onset and progression comprehend promoter hypermethylation of CpG islands that results in transcriptional silencing of tumor suppressor genes. Promoter hypermethylation has been demonstrated to be an important mechanism in the pathogenesis of various human cancers including ovarian cancer, renal carcinoma, bladder cancer, colorectal cancer and pediatric tumors [10–15]. Using bisulfite sequencing, methylation-specific PCR and quantitative PCR assays the following genes have been found hypermethylated in RB: *MGMT*, *RASSF1A*,

CASP8, *MLH1*, *RBL2*, *NEUROG1*, *DAP-kinase*, *RUNX3* and *CACNA1G* [15–21].

In this study, for the first time, we employed Methylation-Specific Multiplex Ligation Probe Amplification (MS-MLPA) technique to investigate RB epigenetic and copy number changes of 25 and 39 onco-suppressor genes, respectively. In particular, we analysed RB eye tissues from 12 patients, 5 bilateral and 7 unilateral, and we compared results with the corresponding normal retina.

Material and Methods

Tissue Sample Collection

We collected 12 formalin-fixed paraffin-embedded eye samples from enucleated RB patients archived in the Department of Human Pathology and Oncology of the University of Siena. After surgery, enucleated eyes were immersion-fixed in buffered formalin for 48 h. After fixation, sampling, paraffin embedding, and cutting were carried out according to the usual pathological methods. The group of samples included 5 bilateral cases and 7 unilateral cases. For each patient, the corresponding DNA sample extracted from blood was available in the Italian Retinoblastoma Biobank (<http://www.biobank.unisi.it>). A germline mutation in *RB1* was identified in all bilateral tumors (p.R455X in RB#263, p.R467X in RB#190, p.V144fsX155 in RB#185, p.R787X in RB#225 and p.687fsX690 in RB#167) (Table 1). No germline mutations

Table 1 Clinical and pathologic features of RB patients. For laterality: U = unilateral, B = bilateral; A/D: Alive/dead; for histology: Und = undifferentiated, Dif = differentiated; for foci: Uni: unifocal; Multi: multifocal; for therapy: JET = Carboplatinum in combination with Etoposide

| Case number | Laterality | <i>RB1</i> germline mutation | Age at diagnosis (months) | A/D | TNM Classification | Histology | Foci | Vitreous Seeding | Relapses | Metastasis | Therapy |
|-------------|------------|------------------------------|---------------------------|-----|--------------------|-----------|-------|------------------|----------|-------------|---|
| RB#263 | B | p.Arg455X | 4 | A | pT2a | Und | Multi | No | No | No | JET post-enucleation (6 cycles) |
| RB#190 | B | p.Arg467X | 20 | A | pT3a | Dif | Multi | No | No | No | JET post-enucleation (6 cycles) |
| RB#185 | B | p.Val144fsX155 | 10 | A | pT2 | Dif | Multi | No | No | No | JET post-enucleation (6 cycles) |
| RB#225 | B | p.Arg787X | 1 | A | pT1 | Dif | Multi | No | No | No | Focal therapy post-enucleation |
| RB#167 | B | p.Pro687fsX690 | 13 | A | pT1 | Dif | Multi | No | No | No | JET and focal therapy post-enucleation (4 cycles) |
| RB#253 | U | – | 48 | A | pT2a | Und | Uni | Yes | No | No | No therapy |
| RB#313 | U | – | 6 | D | pT2a | Dif | Uni | No | No | Yes (brain) | JET post-enucleation (10 cycles) |
| RB#206 | U | – | 44 | A | pT2b | Dif | Uni | No | Yes | No | JET and focal therapy pre-enucleation (10 cycles) |
| RB#76 | U | – | 30 | A | pT3a | Dif | Uni | No | No | No | No therapy |
| RB#268 | U | – | 23 | A | pT2a | Und | Multi | No | No | No | No therapy |
| RB#297 | U | – | 20 | A | pT2a | Dif | Multi | No | No | No | No therapy |
| RB#79 | U | – | 5 | A | pT3a | Dif | Uni | No | No | No | No therapy |

were detected in unilateral cases. Mutational screening was carried out by DHPLC and sequencing analysis (point mutations) and by MLPA (large rearrangements).

Laser-Capture Microdissection and DNA Extraction

Normal retina and RB tissues were identified in hematoxylin–eosin-stained sections. Sections 5 µm thick were deparaffinized, rehydrated, and stained with Mayer hematoxylin and yellow eosin, then dehydrated with xylene. Slides were observed through an inverse microscope. Cells of the two different tissues were isolated by laser-capture microdissection (Arcturus PixCell II; MWG-Biotech). Selected cells were immediately transferred into a standard microcentrifuge tube containing digestion buffer and 20 µg/mL proteinase K (Qiagen). DNA was extracted using QIAmp DNA Micro Kit according to the manufacturer's protocol. The Hoechst dye-binding assay was used on a DyNA Quant 200 Fluorometer (GE Healthcare) to determine the appropriate DNA concentration.

MS-MLPA Assay

To perform methylation specific (MS) multiplex ligation probe amplification analysis (MLPA; MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands) we used the ME002 Tumor Suppressor-2 kit (<http://www.mlpa.com>). Using this kit a total of 25 tumor suppressor genes can be analysed for aberrant promoter methylation and 39 genes for copy number changes. Experimental procedures were carried out according to manufacturer's instructions. Briefly, a total of 100 ng of DNA was diluted with TE buffer and denatured in a thermocycler. SALSA MLPA buffer and MS-MLPA probes were added and hybridized to their specific targets for 16 h at 60°C. After hybridization, samples were split equally into two vials, each containing the same amount of DNA. Ligase-65 mix (Ligase 65 buffer, Ligase 65 enzyme and water) was added to the first vial, and Ligase-Digestion Mix (Ligase 65 buffer, Ligase 65 enzyme, *HhaI* enzyme and water) to the second vial. Samples were incubated at 49°C for 30 min. The ligase enzyme was inactivated by heating at 98°C for 5 min. PCR was performed as described by the manufacturer (MRC-Holland). Subsequently PCR reaction fragments were separated and visualized on an automated sequencer (ABI PRISM 310, Applied Biosystems). Normal retina was used as control.

MS-MLPA Data Analysis

Promoter methylation and copy number changes were analysed using Coffalyser software (MRC-Holland). Methylation values were obtained by a first step of normalization to compensate for differences in PCR efficiency of the individual samples: the fraction of each peak is calculated by dividing the

peak area of each probe amplification product by the combined value of the control probes within the sample. This “relative peak value” of the digested sample is divided by the “relative peak value” of the corresponding undigested sample, generating the “methylation ratio”. Aberrant methylation was scored when the calculated methylation ratio was >25%. Any methylation percentage below this level was considered as background. As previously reported, ratios were interpreted as: mild hypermethylation (25%–50%), moderate hypermethylation (50%–75%) and extensive hypermethylation (>75%) (Table 2) [22]. Copy number analysis was performed using MLPA results from undigested samples. The “relative peak value” was divided by the “mean probe fraction” of this fragment within the included reference DNAs, generating the “copy number ratio”. Results obtained from an experiment performed on DNA isolated from 20 normal retina samples gave threshold values to determine aberrant copy number.

Statistical Analysis

Mann-Whitney U-test was used to compare promoter hypermethylation and copy number changes between unilateral and bilateral samples. Chi square analysis in contingency tables was conducted to estimate the relationship between *MGMT* and *MSH6* hypermethylation and tumor phenotype. P-values ≤0.05 were considered significant.

Results

Detection of Promoter Hypermethylation

By using MS-MLPA probe set ME002 (MRC Holland) we analyzed epigenetic changes in 12 RB FFPE tissue samples (7 unilateral and 5 bilateral) and we compared results to those obtained in corresponding normal retina samples (Fig. 1). Patients' characteristics are summarised in Table 1. A total of 25 known oncosuppressor genes were analysed for aberrant methylation (Table 2). MS-MLPA analysis was executed in duplicate for all samples producing reproducible ratios (data not shown). A total of 34 hypermethylation events were identified (Table 2). Only three tumor samples (3/12; 25%) did not exhibit gene hypermethylation (RB#79, RB#225 and RB#167) (Table 2). Seven tumors (7/12; 58%) had three or more hypermethylated genes (Table 2).

Promoter hypermethylation in more than one sample was detected for the following genes: *MGMT* (7/12; 58%); *MSH6* (6/12; 50%); *CD44* (5/12; 42%); *PAX5A* (5/12; 42%); *GATA5* (3/12; 25%); and *RBI* (2/12; 17%) (Fig. 1) (Table 2). Hypermethylation in only one sample was detected in *TP53*, *IGSF4*, *VHL*, *GSTP1*, *CDKN2A* (Table 2).

Table 2 Aberrant methylation and copy number changes in 12 RB cases, 5 bilateral (B) and 7 unilateral (U). Met indicates methylation. Gains >1.3 and losses <0.7

| GENE | Chr. region | RB 263 B | RB 190 B | RB 185 B | RB 225 B | RB 167 B | RB 253 U | RB 313 U | RB 206 U | RB 76 U | RB 268 U | RB 297 U | RB 79 U |
|----------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <i>TP73</i> | 1p36 | | | | | | | | Loss (0.6) | | | | |
| <i>MSH6</i> | 2p16 | | | | | | Met (41%) | Met (68%) | Met (100%) | Met (42%) | Met (33%) | | |
| <i>VHL</i> | 3p25.3 | | | | | | | | Met (60%) | | | | |
| <i>APC</i> | 5q22 | | | | | | Gain (2.3) | Gain (1.4) | | Gain (3.3) | Gain (1.9) | Gain (3.2) | Gain (1.8) |
| <i>TNXB</i> | 6p21.3 | | | | | | | | | | Gain (1.6) | | |
| <i>ESR</i> | 6q25.1 | | | | | | | | | | Gain (1.4) | | |
| <i>PARK2</i> | 6q26 | | | | | | | | | | Met (47%) | Met (33%) | |
| <i>PAX5</i> | 9p13 | | Met (51%) | | | | | Met (100%) | Met (35%) | Met (68%) | Met (50%) | Met (58%) | |
| <i>CDKN2</i> | 9p21 | | | | | | | | | | Gain (4.9) | | |
| <i>PTCH</i> | 9q22.3 | | | | | | | | | | Met (54%) | Met (58%) | |
| <i>MGMT</i> | 10q26 | Met (46%) | Met (42%) | Met (35%) | | | Met (42%) | Met (78%) | Met (38%) | Met (68%) | Met (50%) | Met (58%) | |
| <i>CD44</i> | 1p13 | | Met (100%) | Met (100%) | | | | | | | | | |
| <i>PAX6</i> | 1p13 | Gain (1.7) | | | Gain (2.5) | | | | | | | | |
| <i>WT1</i> | 1p13 | | Gain (1.7) | | | | | | Gain (1.7) | Gain (1.8) | | | |
| <i>GSTP1</i> | 1q13 | | | | | | | | Met (36%) | | | | |
| <i>IGSF4</i> | 1q23 | Met (33%) | | | | | | | Loss (0.6) | | | | |
| <i>CHFR</i> | 12q24.33 | | | | | Gain (1.4) | | Loss (0.5) | Loss (0.5) | | | | Loss (0.6) |
| <i>BRC42</i> | 13q12.3 | | | | | | | | | | | | Loss (0.5) |
| <i>RB1 (a)</i> | 13q14.2 | | | | | | | Met (30%) | Loss (0.5) | Loss (0.5) | Met (100%) | | Loss (0.5) |
| <i>RB1 (b)</i> | 13q14.2 | | | | | | | Met (26%) | Loss (0.5) | Loss (0.5) | Met (100%) | | Loss (0.5) |
| <i>MLH3</i> | 14q24.3 | | Gain (1.4) | | | | | Gain (1.3) | Gain (1.7) | | | | |
| <i>PYCARD</i> | 16p12 | Gain (1.4) | | | | | | | | | | | |
| <i>CDH13</i> | 16q24.2 | | | | | | Loss (0.5) | | | | | | |
| <i>TP53</i> | 17p13.1 | Met (32%) | | | | | Loss (0.4) | | | | | | |
| <i>GAT45</i> | 20q13.33 | | Loss (0.6) | | | | Met (67%) | Met (38%) | Met (70%) | | | | |

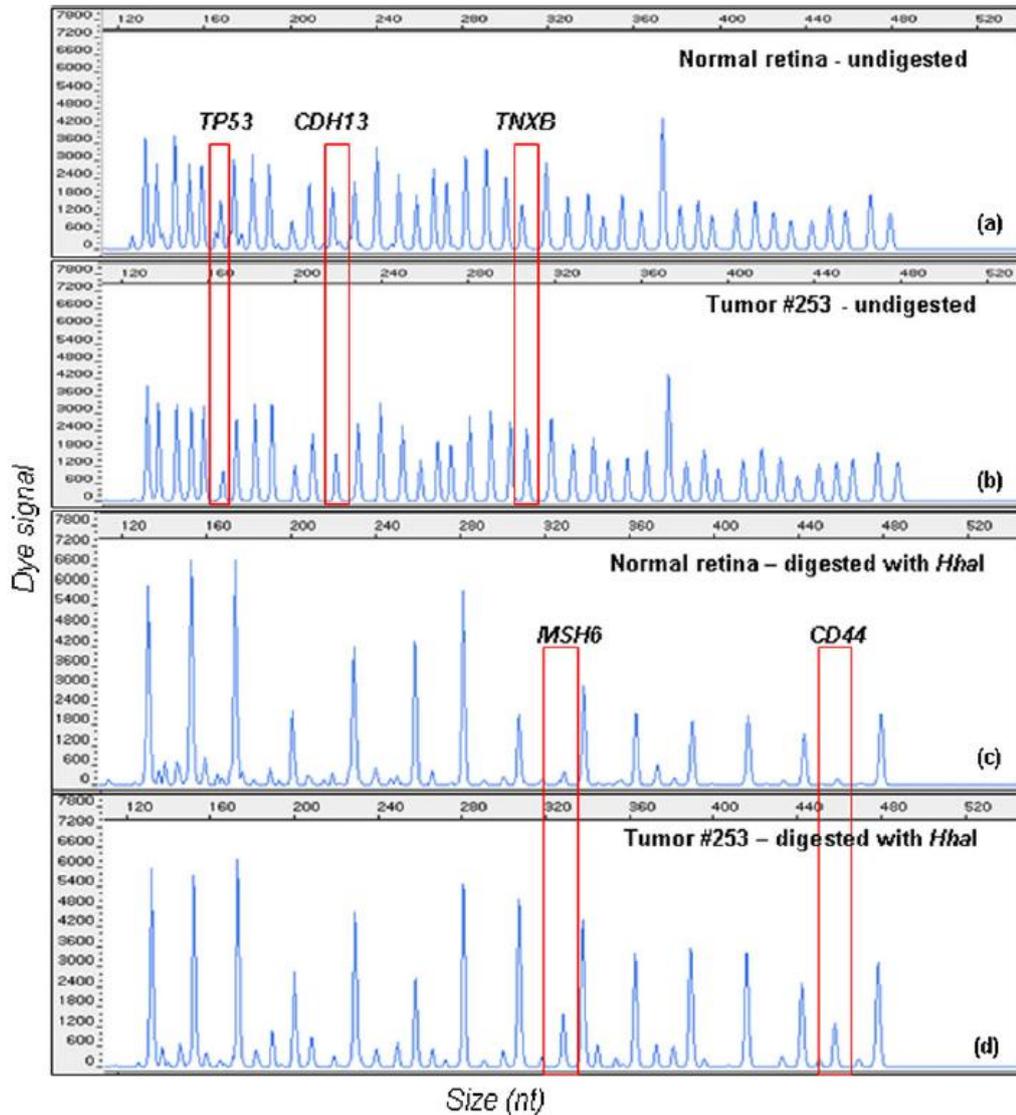


Fig. 1 Detection of copy number variations and aberrant methylation in tumor #253 respect to corresponding retina. MS-MLPA analysis without *HhaI* enzyme treatment in normal retina a and tumor b. Note *TP53* and *CDH13* losses (copy number ratio: 0.41 and 0.54, respectively)

and *TNXB* gain (copy number ratio: 1.9) (red box). MS-MLPA analysis with *HhaI* enzyme treatment in normal retina c and tumor d. Note aberrant methylation of *MSH6* (methylation ratio: 41%) and *CD44* (methylation ratio: 42%) (red box)

Concerning RB phenotype, promoter hypermethylation of at least one gene was detected in six out of seven (86%) unilateral samples and in three out of five (60%) bilateral samples (Table 2). Average number of hypermethylation events was 3.6 (\pm 2.9) in unilateral samples and 1.8 (\pm 1.6) in bilateral cases ($p=0.39$). Hypermethylation of *MGMT* was found at approximately the same frequency in unilateral and bilateral samples ($p=0.62$) (Table 2). *MSH6* hypermethylation

was more frequent in unilateral cases (5/7; 71%) (Table 2) ($p=0.08$).

Detection of Copy Number Variations

By MS-MLPA, a total of 39 genes were analysed for copy number gains/losses. On the basis of an experiment performed on DNA isolated from 20 normal retina samples thresholds to

detect gains and losses were set at 1.3 and 0.7, respectively. Overall, copy number variations were detected in all samples analysed, except for a bilateral sample (RB#185) (Table 2). In total, we found 29 copy number changes (Table 2). Concerning the phenotype, variations were found more frequently in unilateral (mean 3 ± 1.3) respect to bilateral (mean 1.4 ± 1.1) tumors ($p=0.053$). In particular, we found 19 gains (66%) and 10 losses (34%). On average, we detected 1.7 gains (± 0.8) in unilateral samples and 1.2 (± 0.8) gains in bilateral samples. Losses were identified less often with average number being 1.3 (± 1.1) and 0.2 (± 0.4) in unilateral and bilateral samples, respectively.

The most frequently affected MLPA probe was one targeting the *TNXB* gene, found duplicated in 5 unilateral samples (42%) (Table 2). Other frequent gains involved *MLH3* (3/12; 25%), *WT1* (3/12; 25%), and *PAX6* (2/12; 17%) (Table 2). Deletions detected in two samples involved *RBI* and *CHFR* (Table 2). Eleven genes showed copy number variations in only one sample: *TP53*, *CDH13*, *PYCARD*, *GATA5*, *APC*, *TP73*, *IGSF4*, *PARK2*, *PTCH*, *ESR* and *BRCA2* (Table 2).

Discussion

The advancement acquired in knowledge of gene expression regulation by epigenetic changes is improving our learning of tumor onset and development [23–25]. In 1999, Jones and Laird proposed the “expanded two hit model” to include epigenetic gene silencing as an inactivating mechanism of tumorigenesis [26]. Concerning retinoblastoma, methylation of *RBI* promoter has been reported to account for 8–13% of somatic mutations [8, 27]. In addition, the following genes have been reported as aberrantly methylated in RB: *MGMT*, *RASSF1A*, *CASP8*, *MLH1*, *NEUROG1*, *DAP-kinase*, *RUNX3* and *CACNA1G* [15–18, 20, 21]. In the present study, for the first time, we employed Methylation Specific-MLPA technique to investigate methylation profile of 25 tumor suppressor genes in 12 RB eye tissues (7 unilateral and 5 bilateral). MS-MLPA has been the method of choice since it has been demonstrated that this technique can be applied successfully to DNA derived from paraffin-embedded tissues [28]. We identified aberrant methylation in the promoter of the following 10 genes: *MGMT* (7/12; 58%), *MSH6* (6/12; 50%), *CD44* (5/12; 42%), *PAX5* (5/12; 42%), *GATA5* (3/12; 25%), *RBI* (2/12; 17%), *CDKN2* (1/12; 8%), *TP53* (1/12; 8%), *VHL* (1/12; 8%) and *GSTP1* (1/12; 8%).

The most frequent aberrant methylation was found in *MGMT* (methylation range: 35–68%) (Table 2). This is in accordance with previous studies by Choy et al, even if we reported a higher percentage (58% vs 15–35%) [16, 18]. Furthermore, in the present study, *MGMT* hypermethylation showed approximately the same frequency in bilateral (3/5; 60%) and unilateral (4/7; 57%) cases, while Choy et al. reported

a higher frequency in bilateral cases [16]. Our findings are therefore in contrast with the Choy et al. hypothesis of *MGMT* hypomethylation being associated with an inherited disease genotype [16]. *MGMT* encodes the DNA repair enzyme Methylguanine-DNA Methyltransferase that removes alkylating lesions at O6 of guanine to protect against mutagenesis and malignant transformation [29]. Its evolutionary conservation suggests a fundamental role in cell physiology and genome maintenance [30]. Animal studies showed association between *MGMT* level of activity and tumorigenesis [31, 32]. While *MGMT* deletions/mutations are rarely observed, *MGMT* hypermethylation has been found in many types of cancer including breast and prostate cancer, lymphomas, gliomas, lung carcinomas, colorectal tumors and epithelial ovarian cancer [33–37]. *MGMT* epigenetic silencing leads to a mutator pathway in human cancer, because the O6-methylguanine adducts produce C:G to A:T transitions in other genes such as *K-ras* and *TP53* [38–41]. However, *MGMT* epigenetic silencing has been also described as a “predictive friend” since there is a strong and positive correlation between *MGMT* hypermethylation and increased tumor sensitivity to alkylating agents such as platinum compounds that are commonly used for RB treatment [42, 43]. On the contrary, patient RB#206 showed two relapses after JET (10 cycles) and focal therapy (Table 1). Moreover, patient RB#313 showed brain metastasis and died at 4 years and 5 months after 10 cycles of JET therapy. Unfortunately, we could not collect metastasis biopsy and MS-MLPA analysis could not be performed.

For the first time, our results indicate *MSH6* aberrant methylation (methylation range: 33–100%) in RB samples (6/12; 50%), mainly among unilateral cases (5 unilateral and 1 bilateral) ($p=0.08$) (Table 2). *MSH6* is an important factor of safeguarding genetic stability during replication [44, 45]. It is part of the mismatch repair (MMR) system that corrects errors of DNA polymerases that escape their 3'>5' exonucleolytic proofreading activity. It has also been implicated in the cellular DNA damage response, activating cell cycle checkpoint and apoptosis, and thus, alterations in this system can have wide-ranging biological consequences [46, 47]. MMR-defective cell lines are more resistant to cell death induced by several DNA-damaging agents [48]. Genetic alterations of the *MSH6* gene have been found in many cancer types such as colorectal and endometrial cancer [49–53]. Interestingly, we found that most *MSH6* promoter methylated cases (5/6; 83%) were also methylated in the *MGMT* gene (Table 2). This might be due to a positive selection for cellular clones bearing the two inactivation events, accelerating the pathway driving to cancer development. Since mutations in MMR genes are usually associated with a microsatellite instability (MSI) phenotype, this might also be the case in RB. Previous studies found MSI in a subset of RB samples, but this phenotype was not significantly associated with promoter hypermethylation

of another MMR gene, namely *MLH1* [17, 54]. This point would require further investigation in RB samples.

MS-MLPA also detected epigenetic changes in a transcriptional factor, *PAX5*, whose hypermethylation was never reported before in RB (Table 2). In particular, *PAX5* promoter hypermethylation (methylation range: 33–100%) was found in five RB samples (5/12; 42%), 4 unilateral and 1 bilateral. Previous reports have demonstrated *PAX5* involvement in human acute B-cell leukemia and lymphoma [55, 56], but other studies have highlighted the importance of *PAX5* also in solid cancer such as breast and lung tumors and hepatocellular carcinoma [57]. *PAX5* is frequently inactivated by hypermethylation in tumors and acts as functional tumor suppressor through direct regulation of the p53 signalling pathway [57]. Notably, an association between *PAX5* and the underphosphorylated form of pRB has been shown by Sato et al. [58]. It is therefore possible to hypothesize that *PAX5* hypermethylation might represent an inactivating event of pRB signalling that contribute to RB tumorigenesis.

The *CD44* gene was hypermethylated (methylation range: 42–100%) in a significant fraction of RB samples (5/12; 42%), 3 bilateral and 2 unilateral. *CD44* encodes a cell-surface glycoprotein that may be associated with metastases and therefore may be useful in the early detection of metastatic potential in surgical biopsy samples and early detection of recurrence in tumors [59, 60]. Among *CD44* hypermethylated samples, RB#313 displayed brain metastases (Table 1).

Three unilateral samples showed hypermethylation of *GATA5* (methylation range: 28–70%), a gene encoding a zinc finger transcriptional regulator that has been demonstrated to be inactivated in many cancer types such as lung, esophageal, pancreatic, colorectal and gastric cancer (Table 2) [61–65]. Hypermethylation in the promoter regions of *TP53*, *VHL* and *CDKN2* was found in only one RB sample (Table 2). *TP53* inactivating mutations have never been found in RB primary tumors and this is the first study reporting a mild *TP53* epigenetic inactivation in RB [66]. Epigenetic inactivation of *VHL*, a suppressor gene responsible for both hereditary and sporadic cancer forms, has been never reported in RB and might have important consequences in senescence induction in a pRb-dependent manner [67]. Hypermethylation of *GSTP1*, encoding one of the enzymes of the glutathione S-transferases superfamily, might result in DNA damage and mutations as already hypothesized in prostatic carcinogenesis [68]. Aberrant promoter methylation of *CDKN2* (also known as *p16INK4A*), a key cell cycle regulator of the pRB pathway, has been already reported in RB patients by Indovina et al. [69].

Furthermore, we found a total of 29 copy number variations, mainly gains (19 duplications and 10 deletions) (Table 2). Interestingly, copy number changes occurred more frequently in unilateral cases respect to bilateral cases even if the small sample size did not allow to reach statistical significance ($p=$

0.053). This is in accordance with previous data that showed a higher chromosomal instability in unilateral cases, suggesting that other molecular mechanisms could be implicated in hereditary RB [8, 70].

Our data showed a gain of *TNXB* in five unilateral cases (Table 2). In contrast with these results, it has been reported that *TNXB* deficiency promoted tumor invasion and metastasis in mice [71] and that *TNXB* downregulation was present in NF1-associated tumors [72]. However, in previous study, using array-CGH, we demonstrated that this duplication involves the entire p arm of chromosome 6, a frequent rearrangement characterising RB [70]. This rearrangement included the three known oncogenes *IRF4*, *DEK* and *PIMI1* and the two members of the pRB pathway *E2F3* and *CCND3*, whose overexpression could be rather one of the driving events of RB development [70].

Deletions involve the following tumor suppressor genes: *TP53*, *CDH13*, *GATA5*, *CHFR*, *TP73*, *IGSF4* and *BRC A2*. In total, *TP53* has been found inactivated in two out of twelve RB samples (17%), indicating that *TP53* direct inactivation is not a frequent event in RB and supporting the notion that subsequent amplification and increased expression of *MDMX* likely suppress the p53 response in RB [73]. Differently, inactivation of *GATA5* appeared to be a frequent event (3 methylated and one deleted sample) (Table 2). *CDH13* is an interesting candidate gene within 16q loss, a frequent rearrangement in RB [74]. Its downregulation has been associated with diffuse vitreous seeding [75] and with poorer prognosis in various cancers [76]. Actually, patient RB#253 is the only one that showed vitreous seeding (Table 1). *CHFR* copy number changes (2 losses and 1 gain) might alter its function of mitotic checkpoint control and chromosomal stability maintenance [77, 78]. Notably, Chkraborty et al. by microarray analysis demonstrated *CHFR* downregulation in RB tissues [79]. *TP73* has been found to be transcriptionally silenced in some lymphoblastic leukemias and lymphomas due to hypermethylation [80, 81]. *IGSF4* expression has been found downregulated in non-small-cell lung cancer, hepatocellular carcinoma and pancreatic cancer cell lines [82]. *BRC A2*, involved in DNA-damage response, has been found differently expressed in RB tissues [83].

In conclusion, MS-MPLA technique allowed us to perform a study of epigenetic events and copy number variations in RB tissues. Our data highlighted the importance of epigenetic changes in RB and identified seven oncosuppressor genes never associated before with the pathogenesis of RB: *MSH6*, *CD44*, *PAX5*, *GATA5*, *TP53*, *VHL* and *GSTP1*. Since epigenetic mechanisms are potentially reversible these findings could provide new hints for the design of therapeutic strategies in RB. Copy number variations have been found in almost all samples but the genes involved often belong to larger genomic rearrangements so that it is difficult to identify factors actually driving RB tumorigenesis. Finally, in

accordance with our previous study, copy number changes have been identified more frequently in unilateral cases, suggesting that other mechanisms could be involved in hereditary RB [9].

Acknowledgments We thank retinoblastoma patients and their families.

References

- MacCarthy A, Draper GJ, Steliarova-Foucher E, Kingston JE (2006) Retinoblastoma incidence and survival in European children (1978–1997) Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur J Cancer* 42:2092–2102
- Xu XL, Fang Y, Lee TC, Forrest D, Gregory-Evans C, Almeida D, Liu A et al (2009) Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling. *Cell* 137:1018–1031
- Knudson AG Jr (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:820–823
- 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
- Vogel F (1979) Genetics of retinoblastoma. *Hum Genet* 52:1–54
- Onadim Z, Hogg A, Baird PN, Cowell JK (1992) Oncogenic point mutations in exon 20 of the RB1 gene in families showing incomplete penetrance and mild expression of the retinoblastoma phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6177–6181
- Gallie BL, Campbell C, Devlin H, Duckett A, Squire JA (1999) Developmental basis of retinal-specific induction of cancer by RB mutation. *Cancer Res* 59:1731s–1735s
- Corson TW, Gallie BL (2007) One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 46:617–634
- Sampieri K, Amenduni M, Papa FT, Katzaki E, Mencarelli MA, Marozza A, Epistolato MC et al (2009) Array comparative genomic hybridization in retinoma and retinoblastoma tissues. *Cancer Sci* 100:465–471
- Pieretti M, Cavalieri C, Conway PS, Gallion HH, Powell DE, Turker MS (1995) Genetic alterations distinguish different types of ovarian tumors. *Int J Cancer* 64:434–440
- Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D et al (1994) Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9700–9704
- Yates DR, Rehman I, Abbod MF, Meuth M, Cross SS, Linkens DA, Hamdy FC et al (2007) Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin Cancer Res* 13:2046–2053
- Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH et al (2006) CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 38:787–793
- Leong KJ, Wei W, Tannahill LA, Caldwell GM, Jones CE, Morton DG, Mathews GM et al (2011) Methylation profiling of rectal cancer identifies novel markers of early-stage disease. *Br J Surg* 98:724–734
- Harada K, Toyooka S, Maitra A, Maruyama R, Toyooka KO, Timmons CF, Tomlinson GE et al (2002) Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines. *Oncogene* 21:4345–4349
- Choy KW, Pang CP, To KF, Yu CB, Ng JS, Lam DS (2002) Impaired expression and promoter hypermethylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in retinoblastoma tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:1344–1349
- Choy KW, Pang CP, Fan DS, Lee TC, Wang JH, Abramson DH, Lo KW et al (2004) Microsatellite instability and MLH1 promoter methylation in human retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:3404–3409
- Choy KW, Lee TC, Cheung KF, Fan DS, Lo KW, Beaverson KL, Abramson DH et al (2005) Clinical implications of promoter hypermethylation in RASSF1A and MGMT in retinoblastoma. *Neoplasia* 7:200–206
- Tosi GM, Trimarchi C, Macaluso M, La Sala D, Ciccociocola A, Lazzi S, Massaro-Giordano M et al (2005) Genetic and epigenetic alterations of RB2/p130 tumor suppressor gene in human sporadic retinoblastoma: implications for pathogenesis and therapeutic approach. *Oncogene* 24:5827–5836
- Harada K, Toyooka S, Shivapurkar N, Maitra A, Reddy JL, Matta H, Miyajima K et al (2002) Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. *Cancer Res* 62:5897–5901
- Cohen Y, Merhavi-Shoham E, Avraham RB, Frenkel S, Pe'er J, Goldenberg-Cohen N (2008) Hypermethylation of CpG island loci of multiple tumor suppressor genes in retinoblastoma. *Exp Eye Res* 86:201–206
- Jeuken JW, Cornelissen SJ, Vriezen M, Dekkers MM, Errami A, Sijben A, Boots-Sprenger SH et al (2007) MS-MLPA: an attractive alternative laboratory assay for robust, reliable, and semiquantitative detection of MGMT promoter hypermethylation in gliomas. *Lab Invest* 87:1055–1065
- Laird PW (1997) Oncogenic mechanisms mediated by DNA methylation. *Mol Med Today* 3:223–229
- Esteller M (2007) Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 16 Spec No 1:R50–9
- Gerson SL (2004) MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 4:296–307
- Jones PA, Laird PW (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21:163–167
- Richter S, Vandezande K, Chen N, Zhang K, Sutherland J, Anderson J, Han L et al (2003) Sensitive and efficient detection of RB1 gene mutations enhances care for families with retinoblastoma. *Am J Hum Genet* 72:253–269
- Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP et al (2005) Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 33:e128
- Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC (1995) Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 51:167–223
- Bignami M, O'Driscoll M, Aquilina G, Karran P (2000) Unmasking a killer: DNA O(6)-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. *Mutat Res* 462:71–82
- Dumenco LL, Allay E, Norton K, Gerson SL (1993) The prevention of thymic lymphomas in transgenic mice by human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Science* 259:219–222
- Becker K, Dosch J, Gregel CM, Martin BA, Kaina B (1996) Targeted expression of human O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in transgenic mice protects against tumor initiation in two-stage skin carcinogenesis. *Cancer Res* 56:3244–3249
- Esteller M, Herman JG (2004) Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene* 23:1–8
- Toyooka S, Toyooka KO, Maruyama R, Virmani AK, Girard L, Miyajima K, Harada K et al (2001) DNA methylation profiles of lung tumors. *Mol Cancer Ther* 1:61–67

35. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Fariñas AJ, Minna JD et al (2002) Aberrant promoter methylation profile of prostate cancers and its relationship to clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 8:514–519
36. Skorpen F, Krokan HE (1995) The methylation status of the gene for O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human Mer+ and Mer- cells. *Carcinogenesis* 16:1857–1863
37. Wang L, Zhu D, Zhang C, Mao X, Wang G, Mitra S, Li BF et al (1997) Mutations of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in esophageal cancer tissues from Northern China. *Int J Cancer* 71:719–723
38. Horsfall MJ, Gordon AJ, Burns PA, Zielenska M, van der Vliet GM, Glickman BW (1990) Mutational specificity of alkylating agents and the influence of DNA repair. *Environ Mol Mutagen* 15:107–122
39. Esteller M, Rises RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, Peinado MA, Baylin SB et al (2001) Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 61:4689–4692
40. Nakamura M, Watanabe T, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H (2001) Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C → A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* 22:1715–1719
41. Wolf P, Hu YC, Doffek K, Sidransky D, Ahrendt SA (2001) O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase promoter hypermethylation shifts the p53 mutational spectrum in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 61:8113–8117
42. Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP et al (2000) Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 60:2368–2371
43. Esteller M, Herman JG (2002) Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 196:1–7
44. Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL (2006) DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev* 106:302–323
45. Jiricny J (2006) The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:335–346
46. Jun SH, Kim TG, Ban C (2006) DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. *Febs J* 273:1609–1619
47. Stojic L, Brun R, Jiricny J (2004) Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)* 3:1091–1101
48. Hong Z, Jiang J, Hashiguchi K, Hoshi M, Lan L, Yasui A (2008) Recruitment of mismatch repair proteins to the site of DNA damage in human cells. *J Cell Sci* 121:3146–3154
49. Wu Y, Berends MJ, Mensink RG, Kempinga C, Sijmons RH, van Der Zee AG, Hollema H et al (1999) Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with MSH6 germline mutations. *Am J Hum Genet* 65:1291–1298
50. Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H, van der Klift H, Moller P, Stormorken A, Meijers-Heijboer H et al (1999) Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nat Genet* 23:142–144
51. Huang J, Kuismanen SA, Liu T, Chadwick RB, Johnson CK, Stevens MW, Richards SK et al (2001) MSH6 and MSH3 are rarely involved in genetic predisposition to nonpolytopic colon cancer. *Cancer Res* 61:1619–1623
52. Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Mensink RG, van der Sluis T, Hordijk-Hos JM, de Vries EG et al (2002) Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 70:26–37
53. Goodfellow PJ, Buttin BM, Herzog TJ, Rader JS, Gibb RK, Swisher E, Look K et al (2003) Prevalence of defective DNA mismatch repair and MSH6 mutation in an unselected series of endometrial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5908–5913
54. van der Wal JE, Hermesen MA, Gille HJ, Schouten-Van Meeteren NY, Moll AC, Imhof SM, Meijer GA et al (2003) Comparative genomic hybridisation divides retinoblastomas into a high and a low level chromosomal instability group. *J Clin Pathol* 56:26–30
55. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K et al (2007) Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 446:758–764
56. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, Busslinger M (2007) Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol* 8:463–470
57. Liu W, Li X, Chu ES, Go MY, Xu L, Zhao G, Li L et al (2011) Paired box gene 5 is a novel tumor suppressor in hepatocellular carcinoma through interaction with p53 signaling pathway. *Hepatology* 53:843–853
58. Sato H, Wang D, Kudo A (2001) Dissociation of Pax-5 from KI and KII sites during kappa-chain gene rearrangement correlates with its association with the underphosphorylated form of retinoblastoma. *J Immunol* 166:6704–6710
59. Matsumura Y, Tarin D (1992) Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 340:1053–1058
60. Mayer B, Jauch KW, Gunther U, Figdor CG, Schildberg FW, Funke I, Johnson JP (1993) De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* 342:1019–1022
61. Akiyama Y, Watkins N, Suzuki H, Jair KW, van Engeland M, Esteller M, Sakai H et al (2003) GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer. *Mol Cell Biol* 23:8429–8439
62. Guo M, Akiyama Y, House MG, Hooker CM, Heath E, Gabrielson E, Yang SC et al (2004) Hypermethylation of the GATA genes in lung cancer. *Clin Cancer Res* 10:7917–7924
63. Guo M, House MG, Akiyama Y, Qi Y, Capagna D, Harmon J, Baylin SB et al (2006) Hypermethylation of the GATA gene family in esophageal cancer. *Int J Cancer* 119:2078–2083
64. Hellebrekers DM, Lentjes MH, van den Bosch SM, Melotte V, Wouters KA, Daenen KL, Smits KM et al (2009) GATA4 and GATA5 are potential tumor suppressors and biomarkers in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 15:3990–3997
65. Wen XZ, Akiyama Y, Pan KF, Liu ZJ, Lu ZM, Zhou J, Gu LK et al (2010) Methylation of GATA-4 and GATA-5 and development of sporadic gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 16:1201–1208
66. Kato MV, Shimizu T, Ishizaki K, Kaneko A, Yandell DW, Toguchida J, Sasaki MS (1996) Loss of heterozygosity on chromosome 17 and mutation of the p53 gene in retinoblastoma. *Cancer Lett* 106:75–82
67. Young AP, Schlisio S, Minamishima YA, Zhang Q, Li L, Grisanzio C, Signoretti S et al (2008) VHL loss activates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat Cell Biol* 10:361–369
68. Lee WH, Morton RA, Epstein JI, Brooks JD, Campbell PA, Bova GS, Hsieh WS et al (1994) Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:11733–11737
69. Indovina P, Acquaviva A, De Falco G, Rizzo V, Onnis A, Luzzi A, Giorgi F et al (2009) Downregulation and aberrant promoter methylation of p16INK4A: a possible novel heritable susceptibility marker to retinoblastoma. *J Cell Physiol* 223:143–150
70. Sampieri K, Mencarelli MA, Epistolato MC, Toti P, Lazzi S, Bruttini M, De Francesco S et al (2008) Genomic differences between retinoma and retinoblastoma. *Acta Oncol* 47:1483–1492
71. Matsumoto K, Takayama N, Ohnishi J, Ohnishi E, Shirayoshi Y, Nakatsuji N, Ariga H (2001) Tumour invasion and metastasis are promoted in mice deficient in tenascin-X. *Genes Cells* 6:1101–1111

72. Levy P, Ripoché H, Laurendeau I, Lazar V, Ortonne N, Parfait B, Leroy K et al (2007) Microarray-based identification of tenascin C and tenascin XB, genes possibly involved in tumorigenesis associated with neurofibromatosis type 1. *Clin Cancer Res* 13:398–407
73. Laurie NA, Donovan SL, Shih CS, Zhang J, Mills N, Fuller C, Teunisse A et al (2006) Inactivation of the p53 pathway in retinoblastoma. *Nature* 444:61–66
74. Gustmann S, Klein-Hitpass L, Stephan H, Weber S, Bornfeld N, Kaulisch M, Lohmann DR et al (2011) Loss at chromosome arm 16q in retinoblastoma: confirmation of the association with diffuse vitreous seeding and refinement of the recurrently deleted region. *Genes Chromosomes Cancer* 50:327–337
75. Gratiás S, Rieder H, Ullmann R, Klein-Hitpass L, Schneider S, Boloni R, Kappler M et al (2007) Allelic loss in a minimal region on chromosome 16q24 is associated with vitreous seeding of retinoblastoma. *Cancer Res* 67:408–416
76. Sato M, Mori Y, Sakurada A, Fujimura S, Horii A (1998) The H-cadherin (CDH13) gene is inactivated in human lung cancer. *Hum Genet* 103:96–101
77. Scolnick DM, Halazonetis TD (2000) Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature* 406:430–435
78. Yu X, Minter-Dykhouse K, Malureanu L, Zhao WM, Zhang D, Merkle CJ, Ward IM et al (2005) Chfr is required for tumor suppression and Aurora A regulation. *Nat Genet* 37:401–406
79. Chakraborty S, Khare S, Dorairaj SK, Prabhakaran VC, Prakast DR, Kumar A (2007) Identification of genes associated with tumorigenesis of retinoblastoma by microarray analysis. *Genomics* 90:344–353
80. Com PG, Kuerbitz SJ, van Noesel MM, Esteller M, Comitello N, Baylin SB, Herman JG (1999) Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma is associated with 5' CpG island methylation. *Cancer Res* 59:3352–3356
81. Kawano S, Miller CW, Gombart AF, Bartram CR, Matsuo Y, Asou H, Sakashita A et al (1999) Loss of p73 gene expression in leukemias/lymphomas due to hypermethylation. *Blood* 94:1113–1120
82. Kuramochi M, Fukuhara H, Nobukuni T, Kanbe T, Maruyama T, Ghosh HP, Pletcher M et al (2001) TSLC1 is a tumor-suppressor gene in human non-small-cell lung cancer. *Nat Genet* 27:427–430
83. Ganguly A, Shields CL (2010) Differential gene expression profile of retinoblastoma compared to normal retina. *Mol Vis* 16:1292–1303

APPENDICE 3

SHORT COMMUNICATION

p53 Arg72Pro and MDM2 309 SNPs in hereditary retinoblastoma

Maria Carmela Epistolato¹, Vittoria Disciglio¹, Gabriella Livide¹, Paola Berchiolla², Maria Antonietta Mencarelli¹, Annabella Marozza¹, Mariangela Amenduni¹, Theodora Hadjistilianou³, Sonia De Francesco³, Antonio Acquaviva⁴, Paolo Toti⁵, Francesco Cetta⁶, Francesca Ariani¹, Mario De Marchi⁷, Alessandra Renieri¹ and Daniela Giachino⁷

The tumor suppressor p53 and its negative regulator MDM2 have crucial roles in a variety of cellular functions such as the control of the cell cycle, senescence, genome stability and apoptosis, and are frequently deregulated in carcinogenesis. Previous studies have highlighted the contribution of the common functional polymorphisms p53 p.Arg72Pro and MDM2 309SNP to the risk of both common cancers and Li–Fraumeni syndrome. Their possible role in retinoblastoma has recently been addressed by Castéra *et al*, who however only studied the MDM2 309SNP. Here, for the first time, we analyzed both single nucleotide polymorphisms (SNPs) in a case–control study of 111 Italian hereditary retinoblastoma patients. We found a significant association of the p53 Pro/Pro genotype with the disease (odds ratio=3.58, $P=0.002$). The MDM2 309SNP showed a weak negative association of allele G that deserves further investigation. These findings further support the hypothesis that genetic variability of the p53 pathway contributes to the individual susceptibility to retinoblastoma, as shown for Li–Fraumeni syndrome and a variety of non-hereditary cancers.

Journal of Human Genetics (2011) 56, 685–686; doi:10.1038/jhg.2011.82; published online 4 August 2011

Keywords: hereditary retinoblastoma; MDM2; p53; single nucleotide polymorphisms

Retinoblastoma (RB, OMIM#180200), the most common primary intraocular malignancy in children, affecting 1:14 000–1:22 000 live births, is caused by biallelic inactivation of *RBI*.¹ In about 40% of patients a germline mutation inactivates one allele and a somatic one the second allele (hereditary RB), whereas in non-hereditary RB, both alleles are inactivated somatically. Although most children with hereditary RB show multiple bilateral tumors, a significant proportion of carriers remain unaffected or only develop unilateral tumors, or benign retinomas.² Penetrance and expressivity of hereditary RB may depend on the type of inherited mutation, and can vary even within families and among patients with identical mutations.^{3–5} This indicates a role of modifiers that may affect genome stability to favor the occurrence of somatic mutations, and/or the apoptotic pathway to induce loss or maintenance of the mutated retinoblasts.

The p53 pathway, the master control system of these processes, is controlled by a feedback autoregulatory loop in which p53 transcriptionally activates MDM2, that in turn functions as a negative regulator by promoting the proteolytic degradation of p53. Interestingly, this circuit can also target pRB to degradation and in physiological condition controls the cell cycle and apoptosis of the retinal cone precursors, from which the RB cell lineage originates.⁶ In RB, p53 is

not usually mutated nor is MDM2 amplified. Rather, the expression of MDM2 is highly induced and represses p53,⁶ thus leaving ample space for constitutional polymorphism of p53 and/or MDM2 to affect the fate of the RB lineage.

The 72Pro allele of p53 single nucleotide polymorphisms (SNP) (p.Arg72Pro, rs1042522:G>C) features a reduced proapoptotic activity compared with the 72Arg allele, and together with its more efficient induction of the MDM2 gene and other p53 targets eventually results in attenuation of the p53 pathway.⁷

The G allele of MDM2 309SNP (c.14+309T>G, rs2279744:T>G), adjacent to p53-responsive elements of the inducible intronic P2 promoter, activates MDM2 transcription⁸ and results in overdegradation of p53.⁹ Several studies have highlighted the risk-modifying effect of these polymorphisms in common cancers and the rare Li–Fraumeni syndrome caused by germinal *TP53* mutations.^{10–12} The possible role of the MDM2 309SNP in RB has only recently been addressed through a family-based approach.¹³

For the first time we here investigated both SNPs. We took advantage of a sample of 111 RB patients with known germinal *RBI* mutation (50% M, 93 bilateral cases, median age at diagnosis 22.75 months (interquartile range, 10.29–37.79)) from the Italian DataBase

¹Medical Genetics, Department of Biotechnology, University of Siena, Siena, Italy; ²Department of Public Health and Microbiology, University of Torino, Torino, Italy; ³Department of Ophthalmological Science and Neuroscience, Siena General Hospital, Siena, Italy; ⁴Pediatrics Department, University of Siena, Siena, Italy; ⁵Department of Human Pathology and Oncology, University of Siena, Siena, Italy; ⁶Department of Surgery, University of Siena, Siena, Italy and ⁷Medical Genetics Unit, Department of Clinical and Biological Sciences, University of Torino, Torino, Italy

Correspondence: Dr D Giachino, Medical Genetics Unit, Department of Clinical and Biological Sciences, University of Torino, Regione Gonzole 10, Orbassano, Torino 10043, Italy. E-mail: daniela.giachino@unito.it

Received 29 April 2011; revised 9 June 2011; accepted 22 June 2011; published online 4 August 2011

Table 1 Risk of hereditary retinoblastoma associated with TP53 R72P and MDM2 SNP309 polymorphisms

| Genotypes | Patients | | | Controls | | | OR | 95% CI | P-value |
|-------------|----------|----|------|----------|----|------|------|-------------|---------|
| | N | % | Exp. | N | % | Exp. | | | |
| (a) | | | | | | | | | |
| <i>TP53</i> | | | | | | | | | |
| Arg/Arg | 55 | 50 | 51.3 | 184 | 60 | 185 | Ref | | |
| Arg/Pro | 41 | 37 | 48.3 | 109 | 35 | 106 | 1.26 | 0.79; 2.01 | |
| Pro/Pro | 15 | 14 | 5.4 | 14 | 5 | 15 | 3.58 | 1.63; 7.88 | 0.002 |
| p HW | | | 0.12 | | | 0.96 | | | |
| <i>MDM2</i> | | | | | | | | | |
| GG | 13 | 12 | 12.7 | 42 | 14 | 50 | 0.63 | 0.31; 1.28 | |
| GT | 49 | 44 | 49.7 | 165 | 54 | 148 | 0.61 | 0.38; 0.97 | 0.05 |
| TT | 49 | 44 | 48.4 | 100 | 32 | 108 | Ref | | |
| p HW | | | 1 | | | 0.5 | | | |
| (b) | | | | | | | | | |
| Arg/Arg—GG | 5 | 5 | | 24 | 8 | | 0.43 | 0.14; 1.11 | |
| Arg/Arg—GT | 16 | 14 | | 95 | 10 | | 0.33 | 0.17; 0.63 | 0.002 |
| Arg/Arg—TT | 34 | 31 | | 65 | 21 | | Ref | | |
| Arg/Pro—GG | 6 | 5 | | 15 | 5 | | 0.80 | 0.27; 2.1 | |
| Arg/Pro—GT | 25 | 23 | | 61 | 20 | | 0.79 | 0.42; 1.46 | |
| Arg/Pro—TT | 10 | 9 | | 33 | 11 | | 0.60 | 0.26; 1.3 | |
| Pro/Pro—GG | 2 | 2 | | 3 | 1 | | 1.36 | 0.22; 7.32 | |
| Pro/Pro—GT | 8 | 7 | | 9 | 3 | | 1.70 | 0.61; 4.71 | |
| Pro/Pro—TT | 5 | 5 | | 2 | 1 | | 4.18 | 0.95; 24.23 | |

Abbreviations: CI, confidence interval; Exp., expected; OR, odds ratio; p HW, p-value for Hardy-Weinberg equilibrium; SNP, single nucleotide polymorphism.

of Retinoblastoma, referred to the Medical Genetics Unit of Siena since 2003 for germline *RB1* mutations testing. Written consent was obtained from all subjects or their legal tutors. Controls were 307 unrelated Italian individuals.

The two SNPs were genotyped on blood DNA using Pyrosequencing, according to standard protocols. PCR and sequencing primers were designed using the PSQ Assay Design Software version 1.0.6 (Biotage AB, Uppsala, Sweden, now Qiagen), and are available on request. Pyrograms were analyzed using the PSQ96MA 2.0.2 software (idem). The association of each SNP and of the combined genotypes were analyzed in a case-control design using logistic regression with Firth's bias reduction procedure to assess their effect on the disease risk.

Allele frequencies of the p53 SNP were Arg 0.68 and Pro 0.32 among RB patients versus 0.78 and 0.22 in controls, those of the *MDM2* 309SNP T 0.66 and G 0.34 versus 0.59 and 0.41. The genotype frequencies of patients and controls were in Hardy-Weinberg equilibrium for both polymorphisms. The Pro/Pro genotype was significantly disease-associated compared with the Arg/Arg (Table 1a); the heterozygous Arg/Pro was also increased but not significantly. The *MDM2* 309SNP showed a weak negative association of the G allele; the GT genotype was significant within the Arg/Arg subgroup (Table 1b).

For the first time we show that the association of the Pro/Pro genotype, well known in other cancers, also holds true in hereditary RB. p53 Has a central role as tumor suppressor but is not mutated in RB.¹⁴⁻¹⁶ It has been suggested that RB precursor are intrinsically apoptosis-resistant cells.¹⁷ However, there is evidence in mice and humans that the p53 pathway has a central role in regulating the progression of RB cells from quiescent retinoma to overt disease.^{2,18}

Two features of the p53 72Pro allele can be hypothesized to contribute to this outcome, that is, its increased transcriptional activity on target genes and the weaker interaction with the MDM2 protein, the first by enhancing MDM2 hyperexpression, and the second by downregulating the mitochondrial control of the apoptotic pathway.⁷

On the other hand, our finding of a weak negative association of the *MDM2* G allele is in contrast with reports of its preferential transmission to RB patients,¹³ modifier role in Li-Fraumeni syndrome^{9,19} and association with common cancers.²⁰ Nevertheless, our findings seem plausible, considering that the association only holds in p53-mutated cancers.²⁰ If confirmed in other independent studies, the pattern we report here of positive association of p53 Pro/Pro and negative association of *MDM2* GG would depict a new scenario with different functional and therapeutic implications.

- Knudson, A. G. Hereditary predisposition to cancer. *Ann. NY Acad. Sci.* **833**, 58-67 (1997).
- Dimaras, H., Khetan, V., Halliday, W., Orlic, M., Prigoda, N. L., Piovesan, B. et al. Loss of RB1 induces non-proliferative retinoma: increasing genomic instability correlates with progression to retinoblastoma. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 1363-1372 (2008).
- Klutzb, M., Brockmann, D. & Lohmann, D. R. A parent-of-origin effect in two families with retinoblastoma is associated with a distinct splice mutation in the RB1 gene. *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 174-179 (2002).
- Lohmann, D. R. & Gallie, B. L. Retinoblastoma: revisiting the model prototype of inherited cancer. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* **129C**, 23-28 (2004).
- Sampieri, K., Hadjistilianou, T., Mari, F., Speciale, C., Mencarelli, M. A., Cetta, F. et al. Mutational screening of the RB1 gene in Italian patients with retinoblastoma reveals 11 novel mutations. *J. Hum. Genet.* **51**, 209-216 (2006).
- Xu, X. L., Fang, Y., Lee, T. C., Forrest, D., Gregory-Evans, C., Almeida, D. et al. Retinoblastoma has properties of a cone precursor tumor and depends upon cone-specific MDM2 signaling. *Cell* **137**, 1018-1031 (2009).
- Dumont, P., Leu, J. I., Della Pietra, A. C. III, George, D. L. & Murphy, M. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat. Genet.* **33**, 357-365 (2003).
- Iwakuma, T. & Lozano, G. MDM2, an introduction. *Mol. Cancer Res.* **1**, 993-1000 (2003).
- Bond, G. L., Hu, W. & Levine, A. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* **119**, 591-602 (2004).
- Fang, S., Krahe, R., Lozano, G., Han, Y., Chen, W., Post, S. M. et al. Effects of MDM2, MDM4 and TP53 codon 72 polymorphisms on cancer risk in a cohort study of carriers of TP53 germline mutations. *PLoS One* **5**, e10813 (2010).
- Wu, C. C., Krahe, R., Lozano, G., Zhang, B., Wilson, C. D., Jo, E. J. et al. Joint effects of germ-line TP53 mutation, MDM2 SNP309, and gender on cancer risk in family studies of Li-Fraumeni syndrome. *Hum. Genet.* **129**, 663-673 (2011).
- Francisco, G., Menezes, P. R., Eluf-Neto, J. & Chammas, R. Arg72Pro TP53 polymorphism and cancer susceptibility: a comprehensive meta-analysis of 302 case-control studies. *Int. J. Cancer* **129**, 920-930 (2011).
- Castéra, L., Sabbagh, A., Dehainault, C., Michaux, D., Mansuet-Lupo, A., Patillon, B. et al. MDM2 as a modifier gene in retinoblastoma. *J. Natl Cancer Inst.* **102**, 1805-1808 (2010).
- Kato, M. V., Shimizu, T., Ishizaki, K., Kaneko, A., Yandell, D. W., Toguchida, J. et al. Loss of heterozygosity on chromosome 17 and mutation of the p53 gene in retinoblastoma. *Cancer Lett.* **106**, 75-82 (1996).
- Gallie, B. L., Campbell, C., Devlin, H., Duckett, A. & Squire, J. A. Developmental basis of retinal-specific induction of cancer by RB mutation. *Cancer Res.* **59**, 1731s-1735s (1999).
- Sampieri, K., Amenduni, M., Papa, F. T., Katzaki, E., Mencarelli, M. A., Marozza, A. et al. Array comparative genomic hybridization in retinoma and retinoblastoma tissues. *Cancer Sci.* **100**, 465-471 (2009).
- Chen, D., Livne-bar, I., Vanderluit, J. L., Slack, R. S., Agochiya, M. & Bremner, R. Cell-specific effects of RB or RB/p107 loss on retinal development implicate an intrinsically death-resistant cell-of-origin in retinoblastoma. *Cancer Cell* **5**, 539-551 (2004).
- Nork, T. M., Poulsen, G. L., Millecchia, L. L., Jantz, R. G. & Nickells, R. W. p53 regulates apoptosis in human retinoblastoma. *Arch. Ophthalmol.* **115**, 213-219 (1997).
- Bougeard, G., Baert-Desurmont, S., Tournier, I., Vasseur, S., Martin, C., Brugieres, L. et al. Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *J. Med. Genet.* **43**, 531-533 (2006).
- Hu, Z., Jin, G., Wang, L., Chen, F., Wang, X. & Shen, H. MDM2 promoter polymorphism SNP309 contributes to tumor susceptibility: evidence from 21 case-control studies. *Cancer Epidemiol. Biomarker. Prev.* **16**, 2717-2723 (2007).

Ringrazio la Prof.ssa Alessandra Renieri, che mi ha consentito di approcciare al mondo della Genetica e di raggiungere questo traguardo.

Ringrazio la Dott.ssa Francesca Mari, che mi ha fatto da tutor durante la specializzazione.

Ringrazio tutte le colleghe che si sono susseguite nel tempo, con le quali ho trascorso gran parte delle mie giornate.

Ringrazio tutte le persone che in questi anni hanno allietato le mie giornate e con le quali ho condiviso momenti di spensieratezza.

Ringrazio i miei genitori che, anche a distanza, mi sono sempre stati vicini e sui quali so di poter contare in ogni momento.

Ringrazio “Sirina” che, con le sue prelibatezze, si è presa cura di me.

Ringrazio mia sorella e i miei fantastici nipoti, per me fonte di grande gioia e ispirazione.

Infine, dato che *gli ultimi saranno i primi*....ringrazio Michele, per il suo buon umore, la sua allegria, i suoi saggi consigli, la sua comprensione ed il suo sostegno...