



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SIENA

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Specializzazione in Genetica Medica

Indirizzo Tecnico

**DIAGNOSI DI RETINOBLASTOMA
TRAMITE L'APPLICAZIONE DELLA TECNICA
NEXT - GENERATION SEQUENCING**

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa

Alessandra Renieri

Tesi di Specializzazione

Dott.ssa Mariarita Natale

Anno Accademico 2009-2010

INDICE

1. Introduzione 3

Il retinoblastoma 3

1.1 Descrizione e classificazione clinica 3

1.2 Genetica del retinoblastoma 7

1.3 Il gene *RB1* 11

1.4 La proteina *pRB* 13

1.5 La terapia 19

1.6 La diagnosi di retinoblastoma 21

- 1.6.1 Next-Generation Sequencing 21

2. Materiali e Metodi 22

2.1 Pazienti 22

2.2 Estrazione del DNA genomico 23

2.3 Determinazione spettrofotometrica della concentrazione del DNA 24

2.4 Reazione a catena della polimerasi (PCR) 24

2.5 Verifica del prodotto di PCR 26

2.6 Principio del pirosequenziamento 27

2.7 Next-Generation Sequencing (NGS) 29

- 2.7.1 Amplificazione degli esoni del gene *RB1* 29

- 2.7.2 Purificazione dei prodotti di PCR 30

- 2.7.3 *emPCR* 31

- 2.7.4 Arricchimento indiretto dei frammenti 32

- 2.7.5 Allestimento del vetrino 33

2.8 MLPA 37

3. Risultati	42
<hr/>	
<i>3.1 Diagnosi molecolare in pazienti con retinoblastoma</i>	42
<i>3.2 Analisi mutazionale in pazienti affetti da RB bilaterale</i>	43
- <i>3.2.1 Descrizione di un caso: #795</i>	44
<i>3.3 Analisi mutazionale nella paziente affetta da RB unilaterale familiare</i>	45
<i>3.4 Analisi mutazionale in pazienti affetti da RB unilaterale sporadico</i>	46
- <i>3.4.1 Caso #390b</i>	47
- <i>3.4.2 Caso # 39/2013</i>	47
4. Discussione	49
<hr/>	
Bibliografia	52

1. INTRODUZIONE

Il retinoblastoma

1.1 Descrizione e classificazione clinica

Il retinoblastoma (RB) è il tumore maligno intraoculare infantile più diffuso, si manifesta all'incirca in 1 ogni 15000-25000 nati vivi, con uguale frequenza in entrambi i sessi e in tutti i gruppi etnici. Il tumore si può sviluppare in un solo occhio (unilaterale) o in entrambi gli occhi (bilaterale) e può presentarsi con un focolaio singolo (unifocale) o con più focolai (multifocale), 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 (*Moll AC et al, 1997; Barbosa et al., 2013*). L'insorgenza più tardiva, dopo i 5 anni di età, è rara; nell'adulto in età compresa tra i 20 e i 70 anni sono stati descritti poco più di 20 casi di retinoblastoma, alcuni dei quali, probabilmente, conseguenza della trasformazione maligna di un retinoma (*Singh SK. et al., 2011*).

Il retinoma è considerato una lesione benigna della retina, non progressiva, solitamente asintomatica, che si presenta come una massa traslucida grigiastra sporgente nel vitreo (*Howard MA et al., 1989*). Inizialmente è stato considerato una regressione spontanea del retinoblastoma, in considerazione della somiglianza con le caratteristiche istologiche presentate dai retinoblastomi trattati con radioterapia e chemioterapia. In seguito, invece, è stata formulata l'ipotesi che tale lesione rappresenti un primo stadio nello sviluppo del retinoblastoma (*Singh AD et al., 2000; Sampieri K et al., 2008; Eagle RC Jr et al., 2009*). Esistono in letteratura, comunque, rari casi di retinomi che si sono trasformati in retinoblastoma (*Gallie BL et al., 1982; Balmer A et al., 1991; Eagle RC Jr, 1989*).

Il segno più comune di presentazione del retinoblastoma è un riflesso pupillare bianco (leucocoria) (Figura 1), dovuto alla localizzazione in sede papillo-maculare e/o alla sporgenza nel vitreo della massa tumorale. Il secondo segno è lo strabismo, che può accompagnare o, talvolta, precedere la leucocoria e si verifica quando il tumore occupa la zona maculare, con perdita della visione centrale. Altri segni atipici sono rappresentati da edema palpebrale, chemosi o congiuntivite.



Figura 1 Leucocoria in paziente con retinoblastoma

All'esame oftalmoscopico (Figura 2) il retinoblastoma può presentare principalmente due diverse modalità di sviluppo: una endofitica ed una esofitica. La prima, più comune, si dirige dalla superficie interna della retina verso la cavità vitrea; poiché i tumori endofitici crescono molto, le cellule tumorali sono sparse nel vitreo e crescono divise in minuscole masse sferoidali, che appaiono come palle di lanugine o di cotone (seeding vitreale). Nella forma esofitica, che si spinge dalla superficie esterna della retina verso la coroide, viene inizialmente a formarsi un sollevamento e poi il distacco della retina.

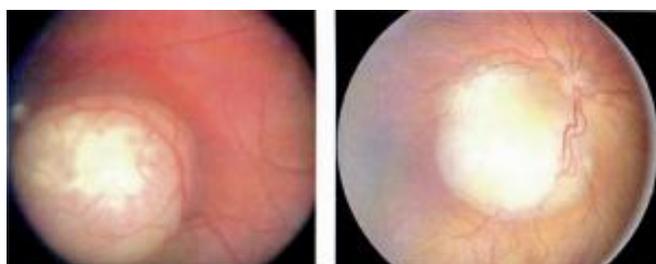


Figura 2. Esame oftalmoscopico di retinoblastoma

Infine è possibile distinguere un terzo tipo di tumore: il tipo infiltrante diffuso, molto più raro e di difficile approccio diagnostico, in cui non è riconoscibile una massa ben definita, ma un' infiltrazione retinica diffusa (retina grigia ed ispessita e spesso vitreo opaco), questa forma, a differenza delle altre due, solo sporadicamente presenta calcificazioni (*Mansour AM et al., 1989*).

All'esame istologico, nel retinoblastoma si evidenzia la presenza di aggregati cellulari di forma sferica, chiamati "rosette", in cui le cellule neoplastiche si dispongono con un

prolungamento cellulare rivolto verso l'interno, delimitando uno spazio centrale otticamente vuoto (Ts'o MO et al.,1969; Sevel D et al.,1974). La formazione delle rosette di Flexner-Wintersteiner è altamente indicativa di retinoblastoma, mentre le rosette di Homer-Wright sono presenti anche in altri tumori primitivi neuroectodermici (Rubinstein LG et al., 1982); in quest'ultimo tipo di strutture le cellule non sono distribuite intorno ad un lume, ma hanno processi citoplasmatici che formano un groviglio nel zona centrale delle rosette.

Sono state fatte diverse classificazioni per stadiare il tumore, ma la più seguita è quella di Reese ed Ellsworth, che si basa sulla valutazione oftalmoscopica dell'estensione tumorale (Tabella 1).

<p>GRUPPO I Molto favorevole: Tumore unico, diametro < 4dp, posto all'equatore del bulbo o dietro. Tumori multipli, diametro < 4 dp, posti all'equatore del bulbo o dietro.</p>
<p>GRUPPO II Favorevole: Tumore unico, diametro tra 4-10 dp, posto all'equatore del bulbo o dietro. Tumori multipli, diametro 4-10 dp, posti all'equatore del bulbo o dietro.</p>
<p>GRUPPO III Dubbia: Ogni tumore anteriore all'equatore. Tumore unico, diametro >10 dp, posto all'equatore del bulbo.</p>
<p>GRUPPO IV Sfavorevole : Tumori multipli, qualcuno di diametro > 10 dp. Ogni tumore che si estende anteriormente all'ora serrata.</p>
<p>GRUPPO V Molto sfavorevole: Tumori massivi invadenti che coinvolgono più della metà della retina. Disseminazione vitreale.</p>

Tabella 1: Classificazione prognostica di Reese-Ellsworth, 1963

(dp: diametro papillare che corrisponde a 1,5mm)

Poiché la classificazione di Reese-Ellsworth ha il limite di non tener conto del "seeding" vitreale e sottoretinico del tumore, è stata formulata una classificazione definita A,B,C,D,E (Tabella 2), molto usata perchè di grande valore prognostico (Linn Murphree , 2005).

Questa classificazione è composta da cinque gruppi diversi (A, B, C, D, E), disposti in ordine decrescente di prognosi favorevole, prendendo in considerazione la grandezza del tumore, la sua vicinanza alla macula e al nervo ottico, il livello di disseminazione, la presenza o meno di un distacco di retina e in ultimo le complicanze tardive.

<p>Gruppo A: tumori piccoli < 3 mm e a distanza di < 2 dp dal disco o dalla fovea e con “seeding” vitreale assente</p>
<p>Gruppo B: focolai senza “seeding” o solo con minimo “seeding” focale vitreale non DR a < 5 mm da base della neoplasia .</p>
<p>Gruppo C: fine diffuso “seeding” vitreale DR maggiore del gruppo B o totale DR Diametro tumorale > 15 mm</p>
<p>Gruppo D: massivo “seeding” vitreale o subretinico DR maggiore del gruppo B o totale DR Tumore che occupa oltre il 50% della superficie retinica</p>
<p>.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</p>

Tabella 2. Classificazione A, B, C, D, E

1.2 Genetica del retinoblastoma

Il retinoblastoma è causato da un' inattivazione biallelica (M1-M2) del gene oncosoppressore *RBI* localizzato nella regione q14.2 del cromosoma 13, lungo 190 kb e costituito da 27 esoni (Figura 3), (Sparkes RS et al., 1980; Friend SH et al., 1986). Nelle forme non ereditarie di retinoblastoma (60%) entrambi gli eventi inattivanti si verificano nei retinociti e portano solitamente a forme tumorali unilaterali, sporadiche (Vogel F, 1979). Tuttavia, circa il 15% dei casi con tumore unilaterale presenta una mutazione a livello germinale (Alonso J et al., 2001). Nelle forme ereditarie (40%), invece, una mutazione in un allele *RBI* nella linea germinale è associata ad una predisposizione a sviluppare il tumore ed è trasmesso come tratto autosomico dominante (Onadim Z et al., 1992). Nel caso delle forme sporadiche, invece, la mutazione viene acquisita come evento “de novo” durante la gametogenesi o la gestazione (Knudson J et al., 1971; Vogel F, 1979). L'inattivazione del secondo allele di *RBI* avviene a livello somatico, direttamente nelle cellule retiniche e solitamente si manifesta con tumori multipli e bilaterali.

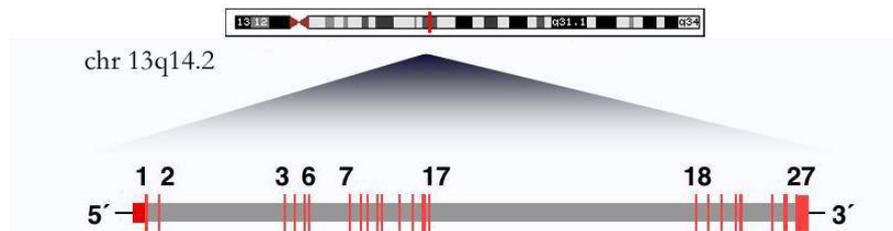


Figura 3. Struttura del gene *RB1*

Nel retinoblastoma spesso si ha una penetranza incompleta, infatti, tra gli individui con mutazione germinale nel gene *RBI* il 90% sviluppa il retinoblastoma, solitamente bilaterale e multifocale (Corson TW et al., 2007), mentre un 10% di individui non sviluppa il retinoblastoma nell'arco della vita.

Inoltre in alcuni casi si presenta un'espressività ridotta, infatti, individui con mutazione germinale del gene *RBI* possono presentare tumori unilaterali o lesioni retiniche benigne come i retinomi (Lohmann DR et al., 2004).

Knudson già nel 1971, confrontando l'età alla diagnosi dei casi bilaterali ed unilaterali formulò la teoria dei "two hits" per spiegare l'origine del retinoblastoma. Nel suo studio illustrò come l'insorgenza del tumore fosse collegata al succedersi di due eventi mutazionali, "two hits" (Figura 4).

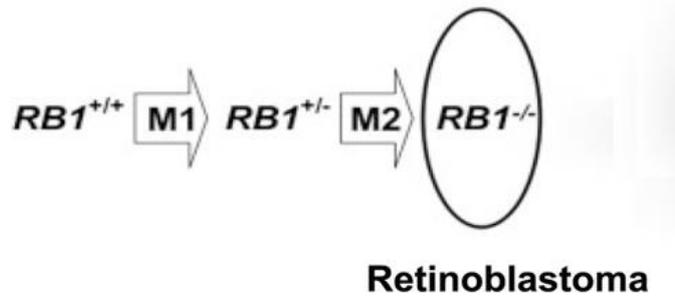


Figura 4. Teoria dei "two hits" di Knudson

Secondo questa teoria quindi l'esordio del retinoblastoma è più precoce nei casi ereditari per la presenza di una prima mutazione (M1) già a livello germinale, che richiede pertanto la necessità di acquisire una sola mutazione (M2) a livello delle cellule retiniche. Nelle forme non ereditarie, invece, l'esordio è più tardivo per la necessaria comparsa di entrambe le mutazioni (M1 e M2) a livello della singola cellula retinica.

In seguito, inoltre, venne formulata l'ipotesi che i due eventi mutazionali fossero associati all'inattivazione di entrambi gli alleli di un gene oncosoppressore, *RB1* (Comings DE, 1973). La perdita di eterozigotità, con perdita dell'allele normale e duplicazione dell'allele mutante, è evidente nel 60% dei retinoblastomi ereditari e non ereditari e si manifesta mediante non disgiunzione e duplicazione dell'intero cromosoma mutato o ricombinazione mitotica. Nelle persone con mutazioni germinali del gene *RB1*, l'allele normale consente alla proteina, pRB, di esplicare le sue funzioni, anche nelle stesse cellule retiniche. La perdita di eterozigotità, probabilmente pur avvenendo in tutti i tessuti, determina la perdita di funzione della proteina pRB con conseguente trasformazione neoplastica solo in specifici tessuti. Questa differenza tra

l'espressione ubiquitaria di *RB1* e la tumorigenicità tessuto-specifica potrebbe essere dovuta o alla compensazione da parte di altre proteine correlate a pRB (*Robanus Maandag, 1988*) o ad un'efficiente eliminazione di certi tipi di cellule *RB1*^{-/-} mediante apoptosi (*Jacks T et al., 1992; Clarke AR et al., 1992*).

Nel 1999 venne introdotto un modello per lo sviluppo del retinoblastoma, in cui si ipotizzava che i due eventi inattivanti del gene *RB1* fossero necessari, ma non sufficienti (Figura 5; *Bowles E et al., 2007; Sampieri K et al., 2008*) per l'espansione del tumore e che quindi fossero richiesti ulteriori eventi (M3- Mn) (*Gallie et al., 1999*).

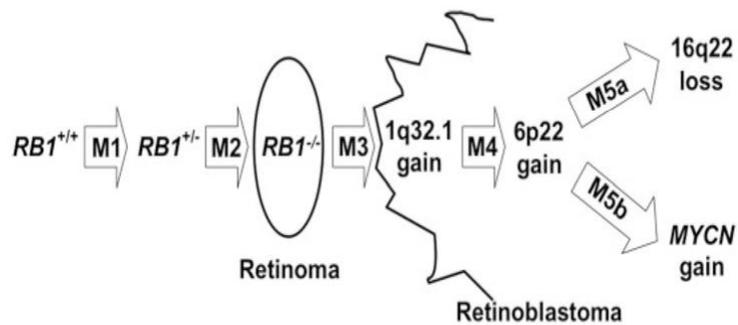


Figura 5. Evoluzione della teoria di Knudson

Questa ipotesi venne supportata dall'osservazione che il retinoblastoma solitamente mostra ulteriori alterazioni genetiche ricorrenti (*Corson TW et al., 2007*).

In particolare, studi effettuati con il cariotipo classico e in array-CGH hanno evidenziato riarrangiamenti genomici ricorrenti associati a RB, quali duplicazioni del 1q, 2p, 6p e 13q e delezioni del 16q (*Sampieri K et al., 2009*). Studi recenti dimostrano, infatti, una duplicazione del numero di copie di MYCN (2p24) nella trasformazione da retinoma a retinoblastoma, confermando l'ipotesi che il retinoma rappresenti uno step di transizione allo sviluppo del tumore (*Sampieri K et al., 2008*).

Ulteriori eventi associati all'insorgenza e alla progressione del tumore comprendono l'ipermetilazione (Figura 6) delle isole CpG del promotore, che determina il silenziamento trascrizionale dei geni oncosoppressori. L'ipermetilazione del promotore

è un fattore importante nella patogenesi di numerosi tumori umani (*Yates DR et al., 2007; Weisenberger DJ et al., 2006; Leong KJ et al., 2011*).

Nel retinoblastoma numerosi geni sono stati trovati ipermetilati, quali ad esempio CASP8, RBL2, NEUROG1, MGMT (*Choy KW et al., 2004; Tosi GM et al., 2005; Cohen Y et al., 2008*).

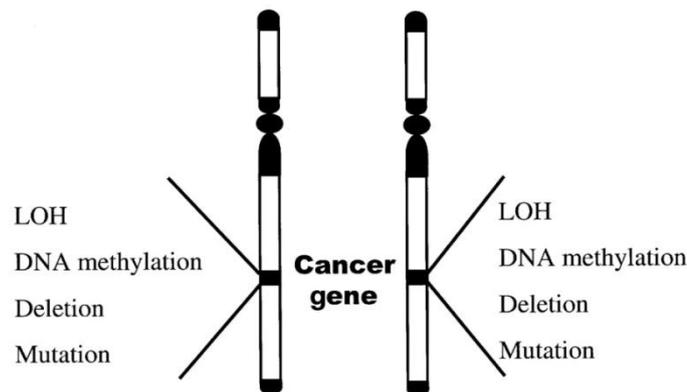


Figura 6. Eventi mutazionali associati a RB

Inoltre, mediante analisi in MLPA, sono stati condotti studi epigenetici e studi sulle variazioni del numero di copie (CNV). I dati ottenuti hanno evidenziato l'importanza delle modificazioni epigenetiche nel RB e identificato sette nuovi geni oncosoppressori coinvolti nella patogenesi del retinoblastoma (CD44, PAX5, GATA5, MSH6, TP53, VHL e GSTP1). Questi dati hanno una notevole importanza in quanto, data la potenziale reversibilità degli eventi epigenetici, si potrebbero aprire nuovi fronti nelle strategie terapeutiche del RB (*Livide et al., 2012; Zhang J et al., 2012*). Le CNV sono state trovate per lo più nelle forme unilaterali di RB, a dimostrazione del fatto che nelle forme ereditarie, molto probabilmente, ci sono ulteriori fattori e meccanismi coinvolti (*Sampieri K et al., 2009*).

1.3 Il gene *RB1*

Il gene *RB1* codifica per la proteina RB/p105, la cui funzionalità in numerosi tumori umani, può essere regolata sia direttamente, attraverso mutazioni, che indirettamente, tramite alterazioni nell'espressione e nella funzione di regolatori a monte (*Friends SH et al., 1986; Harbour JW et al. 1988; Horowitz JM et al., 1989; Weinberg RA et al., 1995*).

Le mutazioni in *RB1* sono distribuite lungo l'intero gene, incluso il promotore, gli esoni e le regioni introniche coinvolte nello splicing, e oltre il 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: nonsense o delezioni/inserzioni frameshift (*Valverde J et al., 2005*). Il sito del codone di stop prematuro nel gene *RB1* non sembra avere effetti sull'espressione fenotipica., nella maggior parte dei 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 associano solitamente a retinoblastoma bilaterale e solo occasionalmente sono state identificate in individui con retinoblastoma unilaterale o in famiglie con espressività variabile, in cui 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 (*Lohmann DR et al., 1997; Sippel KC et al., 1998*).

Ci sono inoltre mutazioni di splicing, missenso e mutazioni che cadono nella regione del promotore. Le prime, determinanti per la riduzione di mRNA prodotto, le mutazioni missenso, responsabili dell' inattivazione parziale di pRB e le mutazioni nella regione del promotore, causa di una bassa espressione di pRB, si riscontrano più frequentemente nelle forme familiari a penetranza incompleta o con fenotipo più lieve (casi unilaterali o retinomi). 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 *RB1*, sviluppano retinoblastoma bilaterale (*Richter S et al., 2003*). Il secondo evento mutazionale (M2) è rappresentato invece da ricombinazioni mitotiche (50%), non disgiunzioni (*Zhu X et al., 1992*), con o senza duplicazioni (circa

il 40%), delezioni, mutazioni puntiformi e inattivazioni del gene (10%). La seconda mutazione si realizza con una frequenza maggiore rispetto alla prima ed è più sensibile ai fattori ambientali, soprattutto quelli che determinano riarrangiamenti cromosomici, come le radiazioni ionizzanti (*Weinberg RA, 1991*).

1.4 La proteina pRB

La proteina pRB è una fosfoproteina nucleare di 110-kDa, ubiquitaria, costituita da 928 residui amminoacidici (Cordon-Cardo C et al., 1994), appartiene ad una famiglia di altre due proteine, RBL/p130 e RBL/p107, strutturalmente e funzionalmente simili a RB perché coinvolte nelle stesse pathways, ma con ruoli diversi in contesti specifici (Cobrinik D, 2005; Du W et al., 2006).

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. 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 E2F e altre proteine nucleari che contengono un sito LxCxE (Figura 7). Questo dominio è necessario per le funzioni biologiche, quali la regolazione della crescita e della differenziazione cellulare, la regolazione trascrizionale e l'interazione con altre proteine (Kouzarides T et al., 1995; Chow KN et al., 1996).

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. La regione N-terminale, ancora non ben caratterizzata strutturalmente, si ipotizza che possa promuovere uno stato conformazionale attivo di pRB ed avere anche altri ruoli, poiché lega diverse proteine (Durfee T et al., 1994; Choubey D et al., 1995).

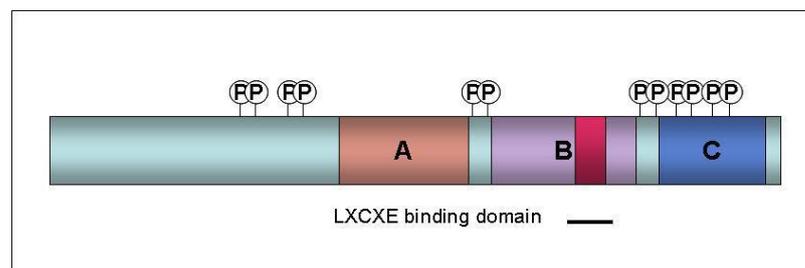


Figura 7. Struttura della proteina pRB

Il ruolo più noto delle proteine RB è la regolazione del ciclo cellulare, in particolare queste proteine possono inibire il passaggio dalla fase G1 ad S tramite la loro interazione con proteine della famiglia E2F, responsabili della regolazione della trascrizione (Figura 8) (Sun A et al., 2007).

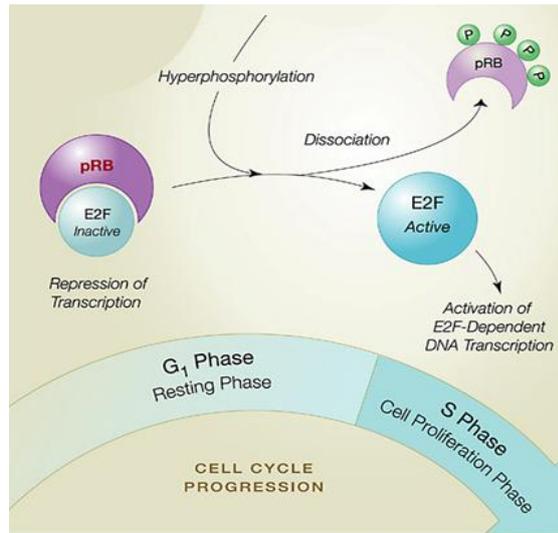


Figura 8. pRB e regolazione del ciclo cellulare

La funzione delle proteine RB è modulata dal loro stato di fosforilazione (Figura 9), mediato da complessi ciclina - chinasi ciclina-dipendenti (CDK) (Buchkovich K et al., 1989). L'azione consecutiva dei complessi ciclina-CDK, specifica per le diverse fasi del ciclo cellulare, determina la fosforilazione e di conseguenza l'inattivazione delle proteine RB. Le proteine RB infatti iperfosforilate non sono più in grado di legare a lungo le proteine E2F, il cui rilascio permette la progressione del ciclo cellulare (Figura 10).

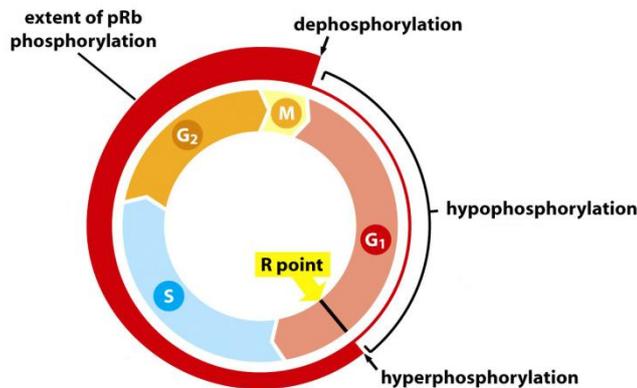


Figura 9. Stadi di fosforilazione di pRB

Le proteine RB, oltre a quella di regolatori del ciclo cellulare, hanno molte altre funzioni, quali la conservazione della stabilità cromosomica, l'induzione e il mantenimento della senescenza cellulare, la regolazione del processo apoptotico, la

differenziazione cellulare e l'angiogenesi (*Burkhardt DL et al., 2008; Gabellini C et al., 2006*). Le proteine RB possono agire inoltre da cofattori trascrizionali, inibendo o potenziando la funzione di molti fattori trascrizionali; infine controllano l'espressione di specifici geni target, funzionando da adattatori, in grado di reclutare enzimi per il rimodellamento della cromatina (*Fiorentino FP et al., 2013*).

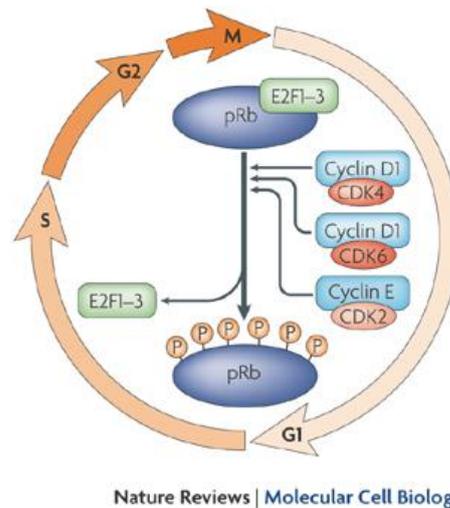


Figura 10. Interazione tra pRb e complessi ciclina.CDK

L'instabilità genomica (CIN) può verificarsi a livello cromosomico, determinando aneuploidie e anomalie cromosomiche strutturali, o a livello nucleotidico, interessando principalmente sequenze microsatellite. L'instabilità cromosomica ha importanti implicazioni nella cancerogenesi poiché può determinare l'incremento del numero di copie di oncogeni e la perdita della eterozigosità di oncosoppressori. Inoltre la CIN è associata a una prognosi negativa in quanto può facilitare la recidiva di un tumore e lo sviluppo di farmaco-resistenza (*Manning AL et al., 2012*). Studi recenti hanno dimostrato che difetti in pRB possono determinare CIN, portando così ad alterazioni nell'espressione genica e a trasformazioni tumorali.

E' stato ipotizzato un crosstalk tra le pathways di p53 e pRB per prevenire l'instabilità cromosomica, attraverso il coinvolgimento di altre molecole, quali p21, E2F e MAD2 (Figura 11, *Indovina P et al., 2012*).

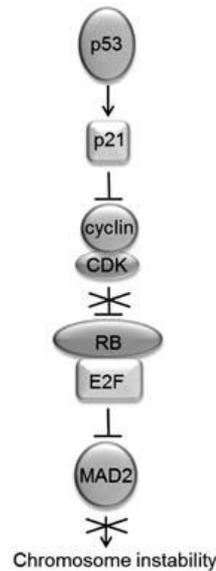


Figura 11. Instabilità cromosomica mediata da p53-pRB

La senescenza cellulare è una condizione irreversibile di arresto proliferativo, è stato dimostrato che questo processo, indotto da un lungo periodo di proliferazione cellulare, chiamato senescenza replicativa, è causato da un accorciamento dei telomeri. Quest'ultimi sono costituiti da sequenze di DNA ripetute e da proteine di legame specifiche, che rivestono le estremità dei cromosomi e prevengono la loro fusione durante i processi cellulari di riparazione al DNA. A causa del loro ruolo nel mantenimento dell'integrità e della stabilità genomica, i telomeri giocano un ruolo importante nell'inibizione della progressione tumorale; il processo della senescenza cellulare dunque, causato da telomeri accorciati, costituisce un meccanismo di difesa contro le trasformazioni maligne (*Artandi et al., 2000; Campisi et al., 2001*). La senescenza è controllata da molti oncosoppressori, tra cui i più importanti sono la proteina p53 e la proteina RB (*Indovina P et al., 2012*).

L'apoptosi e i geni che la regolano hanno un effetto rilevante sulla progressione tumorale, infatti alcune mutazioni oncogeniche inibiscono l'apoptosi, favorendo lo sviluppo tumorale, la progressione e la formazione di metastasi (*Lowe et al, 2000*). Sebbene RB/p105 sia generalmente considerata una proteina antiapoptotica, che media il ciclo cellulare e contemporaneamente interrompe il signalling intracellulare che porta all'apoptosi, dati recenti mostrano una probabile funzione pro-apoptotica della proteina in alcuni contesti, pertanto RB/p105 regola sia positivamente che negativamente l'apoptosi, in modo tipo cellulare-specifico (*Glozak MA et al., 2001*). In alcune linee infatti l'induzione dell'apoptosi è accompagnata da uno shift dalla forma inattiva iperfosforilata di pRB/p105 ad una forma attiva ipofosforilata.

Le proteine RB regolano inoltre anche il processo di differenziazione cellulare, interagendo funzionalmente, e a volte anche fisicamente, con fattori di trascrizione tessuto specifici e inibitori della differenziazione (*Shapek SX et al., 2006*).

L'angiogenesi, infine, è un processo chiave per la progressione e la metastatizzazione del tumore, è stato dimostrato che molti oncogeni e oncosoppressori sono coinvolti nel processo di angiogenesi, tra quest'ultimi RB sembra avere un ruolo determinante (*Gabellini C et al., 2006*). RB/p105 modula l'angiogenesi con un meccanismo E2F-dipendente.

Molte delle funzioni di pRB dipendono da una serie di modificazioni post traduzionali, nella regolazione del ciclo cellulare, infatti, è la fosforilazione ciclina-CDK dipendente a regolare l'interazione pRB/E2F. Il processo di fosforilazione determina modificazioni conformazionali e riduce l'affinità per i partners che normalmente interagiscono con pRB. La proteina RB, oltre che per le chinasi ciclina dipendenti, è un substrato anche per altri tipi di chinasi: p38 MAPK, altre treonin-serin chinasi e la tirosin chinasi c-Abl . Sebbene gli aspetti funzionali correlati a questi eventi di fosforilazione siano ancora oggetto di studio, sembra evidente, comunque, un alto livello di complessità riguardo alla regolazione della proteina pRB. Quest'ultima è, inoltre, in grado di reclutare proteine capaci di modificare la struttura della cromatina, quali le istonedeacetilasi e le metiltransferasi.

Oltre che alla fosforilazione, pRB è anche soggetta a metilazione, acetilazione, sumoilazione e ubiquitinilazione, tutte modificazioni in grado di creare ulteriori siti di binding, rendendo così ancor più complessa la regolazione della proteina stessa (*James I et al, 2013*). Studi funzionali effettuati su questi siti di modificazione post traduzionale

permetteranno di chiarire ulteriormente il ruolo della pRB nella fisiologia di cellule normali e cancerose.

1.5 La terapia

Il retinoblastoma è generalmente fatale se non trattato (*Abramson DH et al., 1982; Balmer A et al., 2008; Shields CL et al., 2010*). L'approccio terapeutico attuale, che include terapie locali e chemioterapie sistemiche, porta ad una sopravvivenza in quasi tutti i pazienti con patologia intraoculare. Quando il retinoblastoma sfugge al controllo locale, allora l'enucleazione è il trattamento standard che garantisce una sopravvivenza del 96% (*Abramson DH et al., 1981; Broaddus E et al., 2009; MacCarthy A et al., 2009*).

L'enucleazione è il trattamento anche nei casi di retinoblastoma intraoculare avanzato perché è in grado di controllare il processo metastatico nel 95% dei casi. Quando è possibile, poichè la rimozione chirurgica di un occhio è una condizione estremamente invalidante per il paziente, viene sempre preferito il trattamento conservativo, ma qualora esso fallisca, o vi sia una precisa indicazione, viene eseguita l'enucleazione (*Abramson DH et al., 2008*). La scelta del tipo di trattamento deve essere personalizzata e deve tener conto della localizzazione e dimensione del tumore, del numero di focolai, della unilateralità o bilateralità, dall'interessamento focale o diffuso del vitreo, dell'età del paziente, della familiarità e del rischio di seconda neoplasia maligna non oculare.

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. Negli anni sono state introdotte, inoltre, terapie che prevedono la somministrazione locale dei chemioterapici, quale la chemioterapia superelettiva intrarteriosa, che prevede l'infusione nell'arteria oftalmica di Melphalan in monoterapia o in associazione ad altri farmaci antitumorali (*Gobin YP et al., 2011; Venturi C et al., 2013*).

Circa il 45% dei pazienti trattati con una terapia conservativa dell'occhio necessitano comunque di trattamenti successivi per la presenza di una recidiva o l'insorgenza di un nuovo tumore oculare (*Messmer EP et al., 1990*). È, dunque, necessario un follow-up oftalmoscopico con controlli periodici, soprattutto nei primi anni che seguono il trattamento.

Il periodo di latenza tra la diagnosi di retinoblastoma e la comparsa di neoplasie maligne secondarie comunque è molto variabile, tra i 2 e i 48 anni. Si tratta, soprattutto, di osteosarcomi e melanomi, meno frequenti sono i tumori cerebrali, le leucemie e i

linfomi non-Hodgkin; infine, vi è un aumentato rischio a sviluppare carcinomi epiteliali, soprattutto a livello polmonare, mammario e della vescica (*Marees T et al., 2008*).

1.6 La diagnosi di retinoblastoma

In presenza di sospetto retinoblastoma, la diagnosi clinica è, solitamente, stabilita attraverso un esame oftalmologico completo. La diagnosi è confermata attraverso l'analisi istologica, che può essere estesa al nervo ottico per verificare la possibile invasione di questo tessuto da parte delle cellule tumorali.

L'analisi molecolare del gene *RBI*, per la ricerca di mutazioni puntiformi e di delezioni, viene solitamente eseguita sul DNA estratto da sangue periferico ed è indicata in tutti i pazienti affetti da retinoblastoma, poichè nel 15% dei casi unilaterali sporadici è presente una mutazione costitutiva del gene *RBI* (Alonso J et al., 2001). Attualmente è possibile individuare una mutazione germinale nella maggior parte dei casi con una predisposizione ereditaria al tumore.

1.6.1 Next-Generation Sequencing

L'introduzione della tecnica Next-Generation Sequencing (NGS) ha portato a cambiamenti importanti sia nel campo della ricerca che della diagnostica molecolare. La tecnologia NGS, infatti, ha permesso in breve tempo di identificare le cause genetiche di molte malattie mendeliane e i loci di suscettibilità di malattie multifattoriali (Raoul CM et al, 2012). L'applicazione di questa nuova tecnologia nei tumori ha permesso di decodificare il genoma delle cellule tumorali, fornendo una maggiore conoscenza delle basi molecolari delle trasformazioni tumorali. Anche nel retinoblastoma la metodica NGS è di fondamentale importanza per l'approccio diagnostico, permette infatti un'analisi rapida e accurata delle mutazioni; consente, inoltre, di definire il rischio di ricorrenza, identificare i familiari a rischio ed offrire un test prenatale, effettuabile su amniociti o villi coriali. Le indagini molecolari sono precedute e seguite dalla consulenza genetica, al fine di informare i pazienti riguardo alla modalità di trasmissione della patologia ed alle caratteristiche del test genetico.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Pazienti

Presso il laboratorio dell'U.O.C. di Genetica Medica di Siena sono giunti 29 pazienti con diagnosi di retinoblastoma. L'analisi molecolare è stata effettuata utilizzando la nuova tecnologia di sequenziamento, *Next Generation Sequencing*, partendo da un prelievo di sangue periferico. L'analisi con la tecnica NGS è stata eseguita su 29 pazienti, di cui 20 con forme unilaterali sporadiche, 1 unilaterale familiare e 8 bilaterali sporadiche. Tutti i pazienti si sono resi disponibili nell'eseguire questo tipo di studio previa compilazione di un consenso informato. Per ogni paziente l'analisi molecolare è stata effettuata anche mediante la tecnica MLPA su DNA genomico estratto a partire da un prelievo di sangue periferico. I dati relativi ai singoli pazienti trovati positivi in NGS sono riportati nella tabella 1.

paziente	clinica	età diagnosi (mesi)	sexo
#704	RB BS	1	M
#714	RB BS	4	M
#721	RB BS	1	M
#745	RB BS	8	M
#762	RB BS	3	F
#777	RB BS	1 giorno	F
#779	RB BS	3	M
#795	RB BS	3 giorni	F
#390	RB US	6	F
#39/2013	RB US	48	M
#124/2013	RB UF	24	F

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti RB. Clinica:US = unilaterale sporadico, UF = unilaterale familiare, BS = bilaterale sporadico.

2.2 Estrazione del DNA genomico

L'estrazione di DNA genomico è stata effettuata a partire da un prelievo di sangue periferico in EDTA. Per evitare che residui di sostanze organiche e sali restino nel campione, il tradizionale metodo di estrazione Fenolo-Cloroformio è stato sostituito con il Kit "QIAamp DNA Blood Maxi Kit" della QIAGEN. Le colonne utilizzate in questo kit hanno una membrana che trattiene il DNA mentre lascia passare tutte le altre sostanze organiche e i sali.

Il "QIAamp DNA Blood Maxi Kit" è composto da: colonne (QIAamp Spin Columns), tubi di raccolta (Collection tube) da 50 ml, Buffer AL, Buffer AW1, Buffer AW2, Buffer AE e QIAGEN protease (Proteinasi K). Da ogni colonna è possibile estrarre DNA partendo da 5 ml di sangue. Il protocollo di estrazione è il seguente:

- Aggiungere 5 ml di sangue, portato a temperatura ambiente, e 12 ml di buffer AL a 500 µl di QIAGEN protease (proteinasi K).
- Agitare le provette tramite vortex per 15" e successivamente incubare per 10' a 70°C.
- Aggiungere alla mix 10 ml di etanolo assoluto.
- Agitare le falcon ancora per 15" con il vortex e mettere in centrifuga per alcuni secondi. Trasferite il contenuto di ogni provetta nelle QIAamp Spin Column.
- Centrifugare le colonne a 3000 rpm per 3' e successivamente trasferirle sopra un nuovo tubo da 50 ml (fornito con il kit), scartando quello contenente il filtrato.
- Aggiungere ad ogni colonna 5 ml di Buffer AW1 e ricentrifugare a 5000 rpm per 1'.
- Trasferire ancora una volta la colonna su un tubo da 50 ml pulito scartando il precedente con il filtrato.
- Aggiungere alla colonna 5 ml di Buffer AW2 e centrifugare a 5000 rpm per 15'.
- Trasferire ogni colonna in una nuova provetta da 50 ml alla quale va aggiunto 1ml di Buffer AE.
- Lasciare i campioni a temperatura ambiente per 5' e centrifugare per 5' a 5000 rpm.
-

-
Dopo aver lasciato i campioni a temperatura ambiente per tutta la notte, si procede con la determinazione della concentrazione del DNA mediante metodo spettrofotometrico.

2.3 Determinazione spettrofotometrica della concentrazione del DNA.

Per la determinazione della concentrazione del DNA allo spettrofotometro GENEQUANTpro (Amersham Pharmacia Biotech), il DNA viene diluito 1/20 in acqua. La lettura della densità ottica (O.D.) viene effettuata a due lunghezze d'onda: 260 nm, per determinare la quantità di DNA, e 280 nm, per valutare la quantità di proteine. Il rapporto tra O.D. a 260 nm e O.D. a 280 nm è un indice della qualità del prodotto ottenuto con l'estrazione e deve assumere valori compresi tra 1.8 e 2.0.

2.4 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La PCR (reazione a catena della polimerasi) consente di moltiplicare molecole di DNA specifiche, permettendo di ottenere in vitro la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni, partendo da 1 µl di DNA genomico, tramite l'utilizzo di oligonucleotidi (*primers*) che fanno da innesco. Gli oligonucleotidi, complementari alla sequenza di basi da amplificare, vengono denominati *forward* (complementare alla sequenza 5'→3') e *revers* (complementare alla sequenza 3'→5'); servono da innesco per l'enzima Taq-polimerasi. I *primers* devono essere in grado di legarsi in modo specifico alla sequenza in esame, in modo da ottenere l'amplificazione del frammento di DNA di interesse.

I criteri seguiti per la scelta dei *primers* prevedono:

- assenza di sequenze palindrome all'interno dei *primers* stessi e scarsa complementarità al 3' al fine di evitare il formarsi di dimeri
- presenza di un numero sufficiente di basi tra il 3' del *primer* e la giunzione esone-introne per identificare mutazioni nei siti di splicing.

La reazione di PCR si esegue facendo una mix dei reagenti che permettono l'amplificazione della nostra sequenza:

- Buffer 1x
- MgCl₂ 1,5mM
- dNTPs 2mM
- primer Forward 0,5 pM/μl
- primer Reverse 0,5 pM/μl
- Taq 0,02 u/μl
- Acqua Qb 50 μl

La mix viene poi aliquotata in provette da 0.2 ml alle quali vengono aggiunti 1 μl di DNA, per un volume finale di 50 μl. Successivamente il campione viene sottoposto ad un protocollo di amplificazione costituito da tre fasi (Figura 1):

1. Denaturazione
2. *Annealing*
3. Allungamento

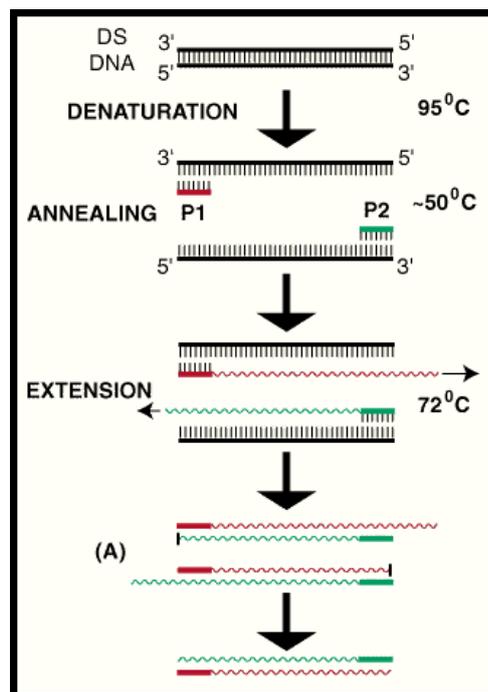


Figura 1. Le tre fasi della reazione di PCR.

Nella prima fase, la denaturazione, il frammento di DNA viene riscaldato a una temperatura di 90-95°C per 30"/1', allo scopo di indurre la separazione dei due filamenti complementari che lo compongono. Nella seconda fase, *annealing*, per 45" si raggiunge la temperatura specifica per far appaiare i *primers* al filamento

complementare. Questa temperatura dipende dalla composizione in basi dei *primers* stessi ed è calcolata con la seguente formula:

$$T_d = 4x (G+C) + 2x (A+T)$$

Nella terza fase, allungamento, la temperatura viene innalzata a 75 °C per 45" e la polimerasi copia il DNA, aggiungendo a ciascun filamento i nucleotidi complementari.

Ciclo completo di reazione:

1. Denaturazione iniziale a 95° per 5 minuti
2. Denaturazione ciclica a 95° per 30 secondi
3. *Annealing* per 30 secondi
4. Estensione a 72° per 30 secondi
5. Estensione finale a 72° per 5 minuti

I punti dal 2 al 4 sono ripetuti per 35 cicli. Alla fine della reazione otterremo circa un milione di copie del filamento iniziale di DNA, poiché la PCR ha un processo esponenziale.

2.5 Verifica del prodotto di PCR

Dopo la reazione di amplificazione è necessario eseguire una corsa elettroforetica del DNA in modo da osservare la qualità dell'amplificato in termini di intensità e specificità. L'elettroforesi è effettuata su un gel di agarosio preparato usando 50 ml di agarosio all'1,2% con etidio bromuro allo 0,006%. La corsa elettroforetica avviene in tampone TAE 1X (Tris acetato 40 mM, EDTA 250 mM) per circa 20' a 100V. Dopo la corsa il prodotto di PCR viene visualizzato con un trans-illuminatore a luce ultravioletta che rende fluorescente l'etidio bromuro che si è intercalato al DNA amplificato. Parallelamente al prodotto di amplificazione viene fatto correre un marker (DNA MolecularWeight Marker VI, 0.15–2,1 kbp) per valutare l'esatta dimensione dell'amplificato stesso.

2.6 Principio del pirosequenziamento

Il pirosequenziamento è una tecnica basata sul principio del "*sequencing by synthesis*" (Ronaghi et al., 1998; Ansorge, 2009). Questa metodica si basa sull'utilizzo di una serie di enzimi che producono luce in presenza di ATP, quando un nucleotide viene incorporato nel filamento ad opera della DNA polimerasi. Viene rilevata la luminescenza emessa dalla luciferasi in base alla quantità di pirofosfato inorganico rilasciato in seguito all'attacco di un nucleotide complementare al filamento polimerizzato (Ronaghi et al., 1998). La sequenza da analizzare deve essere amplificata tramite PCR e, in seguito, incubata come singola elica insieme ai seguenti enzimi:

- DNA polimerasi
- ATP solforilasi
- luciferasi
- luciferina
- apirasi
- adenosinsolfosfato.

Il metodo si divide in 5 passaggi principali:

1. il *primer* si ibrida allo stampo a singola elica;
2. i dNTPs sono aggiunti alla reazione, uno alla volta, in modo tale che la DNA polimerasi catalizzi l'aggiunta del nucleotide solo se esso trova il suo complementare sul DNA (*template*). Ogni attacco del dNTP è accompagnato dal rilascio di pirofosfato (PPi) in quantità equimolare a quella del nucleotide incorporato (Figura 2) (Ansorge, 2009);
3. in presenza di adenosina 5' fosfosolfato (APS), l'ATP solforilasi converte quantitativamente il PPi in ATP che a sua volta guida la reazione verso la luciferasi dove, in presenza di ATP, la luciferina si converte in ossiluciferina con conseguente produzione di luce di intensità proporzionale alla quantità di ATP presente. La luce prodotta è rilevata da un'apposita camera fotosensibile (CCD) e visualizzata sottoforma di pirogramma dal software di analisi "*GS Amplicon Variant Analyzer*" (AVA) (Figura 2), (Ansorge, 2009);
4. l'apirasi, degrada continuamente i dNTPs non incorporati e l'ATP in eccesso prodotto dalla solforilasi (Figura 2);

5. quando la degradazione è terminata, viene aggiunto un altro dNTP (ritornando alla fase 2). Man mano che il processo continua, il filamento di DNA complementare è sintetizzato e la sequenza nucleotidica è determinata dai picchi del pirogramma.

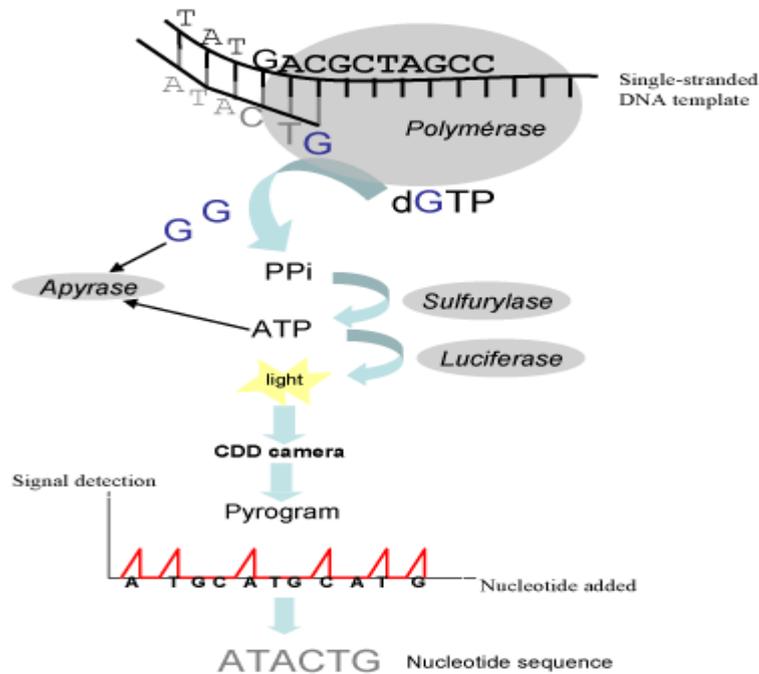


Figura 2. Principio del pirosequenziamento.

Il segnale luminoso prodotto dalla luciferina viene registrato e sarà proporzionale all'ATP prodotto e quindi al numero di nucleotidi inglobati; un picco d'intensità doppia corrisponde all'incorporazione, nello stesso ciclo, di due dNTPs identici. Viceversa, un segnale nullo indica che il dNTP di quel determinato ciclo di flusso non è stato incorporato. Si noti che non si può utilizzare l'ATP come dNTP da introdurre per la polimerizzazione, altrimenti non si riuscirebbe a capire se il segnale rilevato proviene da una corretta incorporazione del nucleotide o dall'attività intrinseca dell'ATP stesso. Si utilizza, in alternativa, l'adenosina-tio-trifosfato che è riconosciuta dalla DNA polimerasi come se fosse ATP, ma non dalla luciferasi (Ronaghi et al., 1998).

2.7 Next Generation Sequencing (NGS)

Il sequenziamento di nuova generazione (NGS), è una tecnologia di recente affermazione basata sul pirosequenziamento che ha rivoluzionato e introdotto nuove opportunità nella biomedicina (Ansorge 2009).

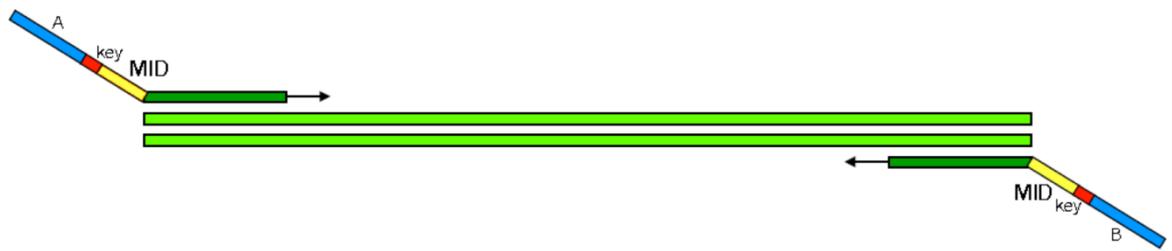
Questa nuova tecnologia permette di raggiungere una maggiore sensibilità e di ridurre drasticamente i tempi necessari per completare l'analisi di più pazienti contemporaneamente. Lo strumento in dotazione alla U.O.C. di Genetica Medica di Siena è il 454 GSJunior (Roche). Il processo è composto dalle seguenti fasi:

1. Amplificazione dei 27 esoni del gene *RB1*
2. Purificazione dei prodotti di amplificazione.
3. PCR in emulsione (*emPCR*).
4. Arricchimento indiretto dei frammenti.
5. Allestimento del vetrino.
6. Analisi dei dati.

2.7.1 Amplificazione degli esoni del gene *RB1*

Il DNA genomico viene amplificato tramite PCR con *primers* complementari alle sequenze analizzate a cui sono state aggiunte delle code di 35 basi nucleotidiche.

Tali code sono costituite da una sequenza universale di 21 basi (A per il *forward* e B per il *reverse*), da una chiave di lettura di 4 basi (*key*), utilizzata dallo strumento come controllo interno durante il sequenziamento, e da una sequenza di 10 basi identificativa per il paziente in analisi (MID) (Figura 3). Le sequenze dei *primers* utilizzati per amplificare il gene *RB1* sono elencati nella tabella 2.



Forward primer (primer A-key):



Reverse primer (primer B-key):



Figura 3. Primers utilizzati per il *Next Generation Sequencing*.

2.7.2 Purificazione dei prodotti di PCR

Terminata la reazione di PCR, i prodotti dell'amplificazione devono essere purificati da eventuali dimeri di *primers* e dai reagenti utilizzati nella reazione. La purificazione prevede l'aggiunta di biglie magnetiche, in grado di legare gli ampliconi nelle singole provette contenenti i vari esoni amplificati. Grazie all'utilizzo di piastre magnetiche, le biglie legate al frammento amplificato vengono attratte verso la parete della piastra permettendo l'eliminazione del supernatante, dove sono presenti i componenti da eliminare. Dopo aver legato gli ampliconi con le biglie magnetiche, si procede con due lavaggi con etanolo al 70% e, successivamente, con l'aggiunta di TE 1X che permette il distacco dei frammenti amplificati dalle biglie per scambio ionico.

Gli esoni purificati che si trovano in soluzione con TE 1X devono essere quantizzati al fluorimetro per determinarne la concentrazione, in modo tale da poter ottenere, per ogni amplicone, una concentrazione d'uso di 1×10^7 molecole, necessaria per non avere uno sbilanciamento di molecole. In questo modo è possibile preparare un *pool* di tutti gli ampliconi in quantità equimolare da utilizzare per la *emPCR*.

2.7.3 emPCR

La PCR in emulsione viene effettuata dopo aver unito il nostro pool di frammenti con particolari biglie, le *capture beads* che contengono le sequenze (*forward* o *reverse*) complementari alle sequenze universali presenti nell'amplificato.

L'*emPCR* si basa sullo stesso principio della PCR classica, con l'unica differenza che il DNA legato alla biglia si trova all'interno di una bolla, immerso in un'emulsione idrofobica/oleosa che viene ottenuta mescolando la mix di PCR con un olio minerale.

Grazie all'utilizzo di un apparecchio emulsionatore, si creano così delle micelle di pochi μl di mix di PCR in emulsione dove ogni micella contiene una biglia e si comporta da micro reattore, permettendo l'amplificazione del frammento (Figura 4)

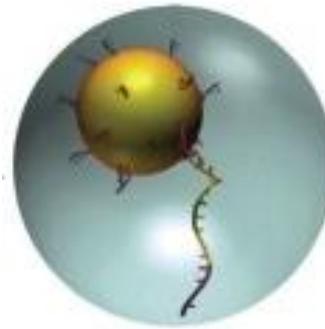


Figura 4. Rappresentazione della biglia (*capture beads*) con legato un frammento da amplificare

In questa fase è importante determinare la giusta quantità di molecole del *pool* di frammenti da utilizzare in rapporto alle quantità di biglie. Tale rapporto è calcolato con la seguente formula:

$$\mu\text{l di DNA per provetta} = \frac{\text{Molecole desiderate per biglia} \times 5 \text{ milioni di biglie}}{\text{Concentrazione del pool (in molecole/ } \mu\text{l)}}$$

Se si vengono a creare delle bolle di amplificazione contenenti biglie con frammenti sia *forward* che *reverse*, si viene a formare una bolla detta “*mixed*” che non verrà utilizzata ai fini del pirosequenziamento. Il protocollo di amplificazione è:

1. denaturazione a 94°C 4 minuti
2. denaturazione a 94°C per 30 secondi
3. annealing a 58°C per 4 minuti e 50 secondi
4. extension a 68° per 30 secondi
5. 10° ∞.

Gli step dal 2 al 4 vengono ripetuti per 50 cicli. Il tempo stimato per l’amplificazione è di 6 ore. Al termine dell’amplificazione ogni biglia risulta arricchita da tantissime copie identiche dello stesso frammento di DNA (Figura 5).

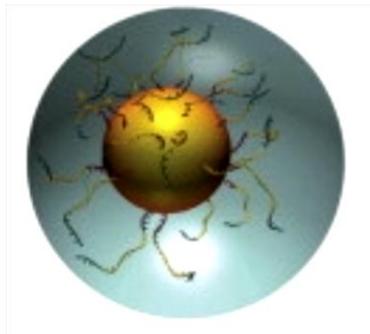


Figura 5. Rappresentazione della biglia (*capture beads*) con legate tante copie dello stesso frammento amplificate tramite *emPCR*.

2.7.4 Arricchimento indiretto dei frammenti

Dopo la PCR in emulsione vengono effettuati numerosi lavaggi con soluzioni fornite dal kit apposito, al fine di recuperare le biglie ricoperte (arricchite) di frammenti amplificati. Le biglie scariche vengono perciò eliminate.

2.7.5 Allestimento del vetrino

I frammenti amplificati vengono purificati e, successivamente, posizionati nel *PicoTiterPlate* per il sequenziamento. Il *PicoTiterPlate* è un vetrino costituito da milioni di piccole celle del diametro di 44 μm in ciascuna delle quali si dovrà depositare una sola biglia (Figura 6).

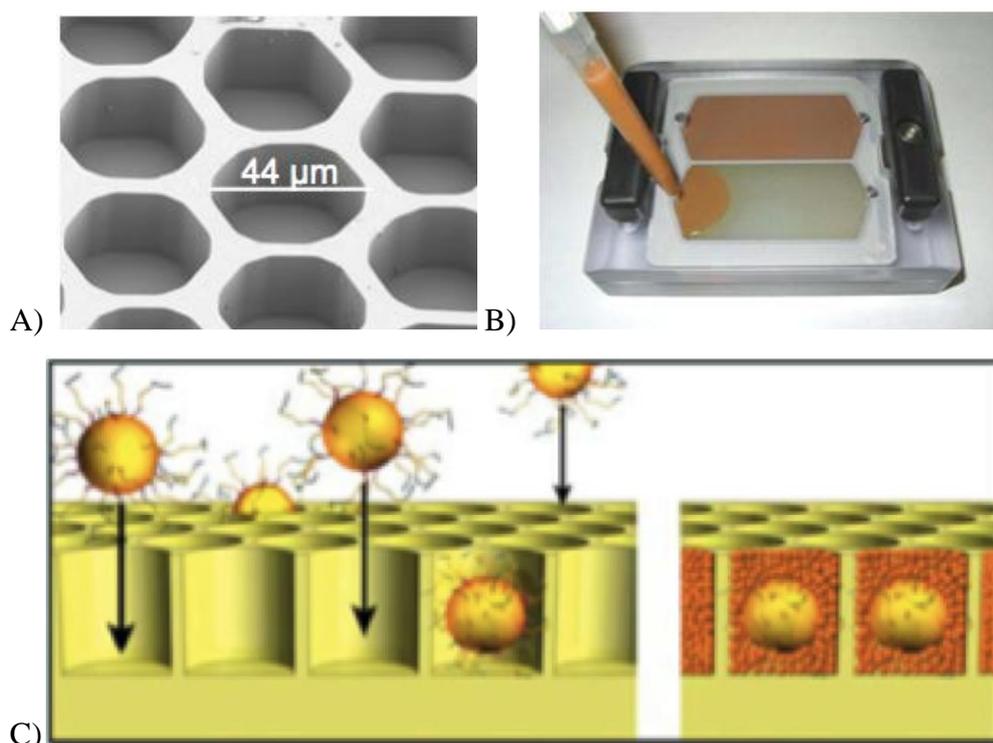


Figura 6. A) Celle presenti nel vetrino; B) Preparazione del vetrino; C) Ogni biglia deve inserirsi all'interno di una singola cella del vetrino.

Il vetrino viene preparato stratificando in successione i vari reagenti necessari al pirosequenziamento (Figura 7), che avverrà nello strumento 454 GS Junior (Roche) (Figura 8). I segnali di luminescenza generati verranno catturati da una CCD camera e analizzati mediante il software “*GS Amplicon Variant Analyzer*” (AVA). Lo strumento è in grado di effettuare 70.000-100.000 letture in 9 ore.

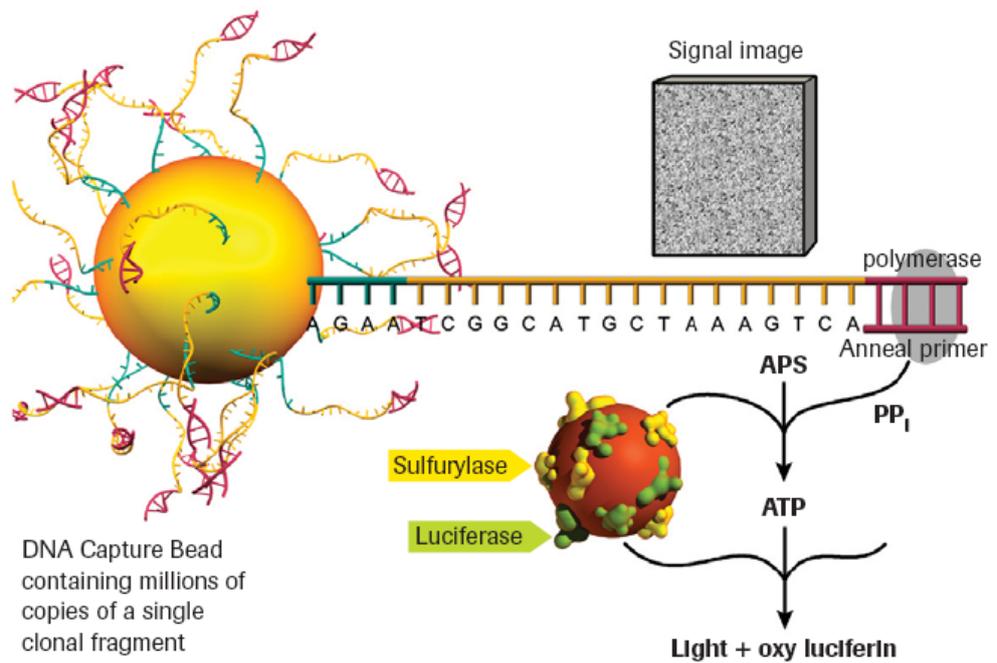


Figura 7. Meccanismo del pirosequenziamento nel *Next Generation Sequencing*.

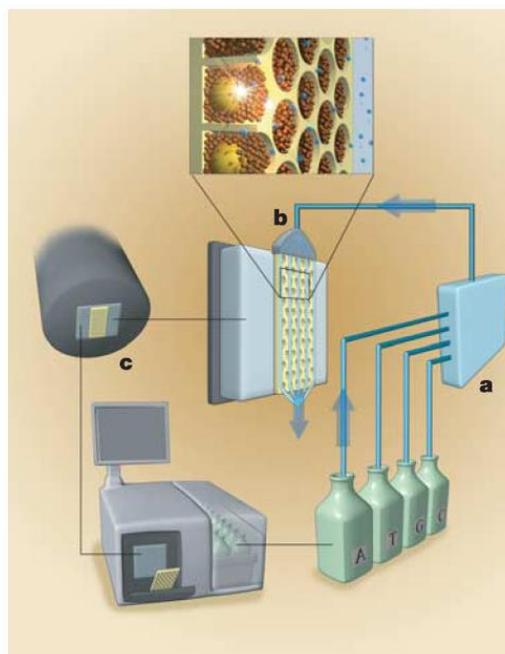


Figura 8. Rappresentazione schematica dello strumento 454 GS Junior (Roche) e del vetrino.

temperatura di annealing (°C)	primers	esone
56	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG -mid-TAGTGTTATGTGCAAACCTATTG 3'	2
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG -mid-TGGTAATGGAATTATTATTAGC 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG -mid-TAACATAGTATCCAGTGTGTG 3'	3
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG -mid-AACGGCTCCATGAGAGAATG 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG -mid-CTCCAAAGGATATAGTAGTG 3'	4
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG -mid-ATGAGCTAACATTAAGGGAC 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG -mid-TAGGTGGATCAGCTGGGTG 3'	5
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG -mid-CCTAACTATCAAGATGTTTGG 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG -mid-AATGGACTGCATTCTATTATGC 3'	6
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG -mid-AGCCAAGCAGAGAATGAGGG 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG -mid-CTACCTGCGATTTTCTCTC 3'	7
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG -mid-AGCCTAGAACCATGTTTGG 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG -mid-AAAGTAGTAGAATGTTACCAAG 3'	8
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG -mid-TGCTACTGCAAAGAGTTAGC 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG -mid-TGCATTGTTCAAGAGTCAAG 3'	9
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG -mid-AGTTAGACAATTATCCTCCC 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG -mid-ATGAAATCTGTGCCTCTGTGT 3'	10
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG -mid-GATATCTAAAGGTCACCTAAGC 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG -mid-GAGACAACAGAAGCATTATAC 3'	11
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG -mid-ACGTGAACAAATCTGAAACAC 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG -mid-TTATTGAGGGAATGTAGAGAC 3'	12
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG -mid-TACATGTTAGATAGGAGATTAG 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG -mid-GTTCAGTAGTTGTGGTTACC 3'	13
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG -mid-CAGGCAGCAGGGATATAGT 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG -mid-TTGATTTTCTAAAATAGCAGG 3'	14
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG -mid-ATGCCTTGACCTCCTGATC 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG -mid-ATTCAATGCTGACACAAATAAG 3'	15_16
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG -mid-CCGACCAAAGAAACACACCA 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG -mid-TTGCTGATAATAACTTCC 3'	17

	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-mid-TAAGAAACACCTCTCACTAAC 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-mid-TGCCACTGTCAATTGTGCC 3'	18
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-mid-TTCAAATCTATTCCCTACAG 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-mid-TGTACAACCTGAAGTGTATG 3'	19
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-mid-CTGAGACACAGAGATATTAAG 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-mid-AAAAGAGTGGTAGAAAAGAGG 3'	20
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-mid-AGTTAACAAGTAAGTAGGGAG 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-mid-TCAAAGTGTGCTCAGTATGG 3'	21
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-mid-GGTCAGACAGAATATATGATC 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-mid-TAATATGTGCTTCTTACCAGTC 3'	22
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-mid-GGAAACTTGTAAAGGGCTTCG 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-mid-TTGCAGTATGCTTCCACCA 3'	23
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-mid-CTTGGATCAAATAATCCCC 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-mid-GTCAGTGGTCTAGGGTAG 3'	24
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-mid-ATGAGGTGTTGAATAACTGC 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-mid-GACACACCTCAAATAACT 3'	25
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-mid-GCAGTGTGAGACTCTGG 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-mid-AAGTAAGTCATCGAAAGCATC 3'	26
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-mid-AACAAACCTGCCAACTGAAG 3'	
	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-mid-GTCAAATACTAGAATGAAGAC 3'	27
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-mid-AATGTGGCCATAAACAGAAC 3'	
64	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-mid-AGAGTCTTCCCTATCAGACC 3'	promotore
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-mid-AGGACGACGCGCGCGCAC 3'	
68	5' CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-mid-CGACGTGCGCGCGCGTC 3'	1
	5' CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-mid-CGGGACCCGGCCCCCTGG 3'	

Tabella 2. Sequenze dei *primers* utilizzati per l'amplificazione del gene *RBI* tramite la tecnologia NGS con corrispondente temperatura di *annealing*.

2.8 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). 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.

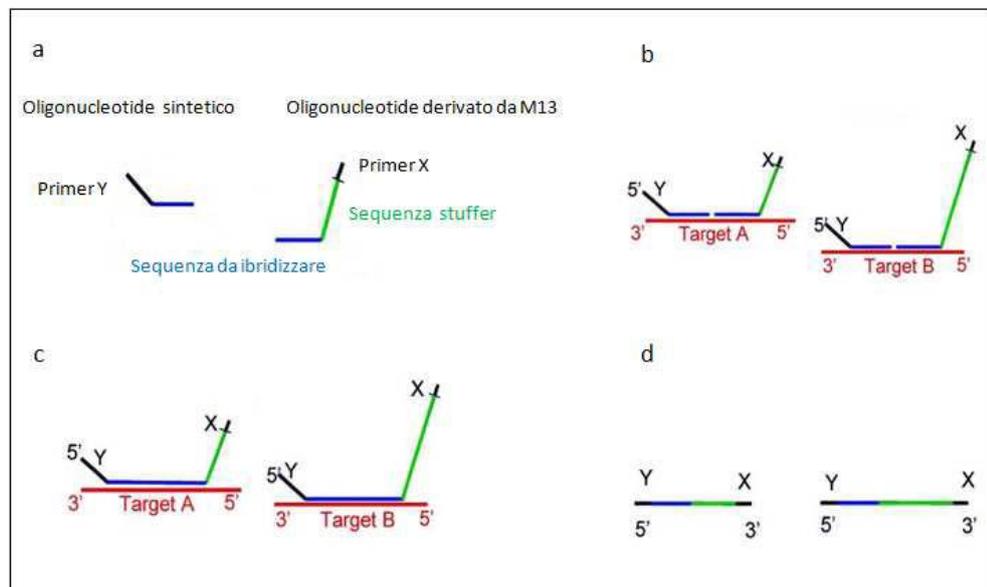


Figura 9. Principio della tecnica MLPA. a) Rappresentazione schematica di una sonda MLPA. Gli oligonucleotidi sintetici contengono la sequenza riconosciuta dal primer universale Y (in nero), mentre il frammento derivato da M13 contiene la sequenza specifica per il primer universale X (in nero) e la sequenza *stuffer* (in verde). La sequenza target è indicata in blu; b) Reazione di ibridazione. Il DNA genomico è denaturato ed entrambi gli oligonucleotidi di ogni sonda MLPA si ibridano sulla sequenza target; c) Reazione di ligazione. Solo le sonde perfettamente appaiate vengono legate da una ligasi termostabile; d) Reazione di PCR. Tutte le

sonde legate sono amplificate mediante 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 seguito a separazione mediante elettroforesi capillare.

Per l'analisi del gene *RB1* è stato utilizzato il kit SALSA MLPA probemix P047-C1 RB1 (Tabelle 3 e 4; *MRC Holland, Amsterdam*). Le sonde contenute in questo kit consentono di analizzare tutti i 27 esoni di *RB1*.

L'analisi MLPA si compone di tre fasi: denaturazione-ibridazione, ligazione e PCR (*Schouten JP et al., 2002*).

Fase 1: denaturazione e ibridazione

- Diluire il campione di DNA a 100 ng/μl e aggiungere TE fino ad un volume di 5 μl
- Denaturare il DNA per 5' a 98°C e raffreddare fino a 25°C
- Aggiungere 1,5 μl di Salsa Probe-mix e 1,5 μl di MLPA buffer
- Denaturare a 95°C per 1' e ibridare a 60°C per 16 h (overnight).

Fase 2: ligazione

- Portare la temperatura a 54°C
- Aggiungere 32 μl di ligasi mix (3 μl di Ligasi-65 buffer A, 3 μl di Ligasi-65 buffer B, 25 μl di acqua bidistillata e 1 μl di Ligasi-65)
- Incubare 15' a 54°C
- Incubare 5' a 98°C per inattivare la ligasi

Fase 3: PCR

- Aggiungere 4 μl di Salsa PCR Buffer 10X e 26 μl di acqua bidistillata a 10 μl di prodotto di legazione
- Caricare in macchina da PCR e portare a 60°C

- Aggiungere a ciascun campione 10 μ l di Polimerasi-mix (2 μ l di Salsa Enzyme Dilution Buffer, 5,5 μ l di acqua bidistillata e 0,5 μ l di Salsa Polymerase)

Programma di PCR:

- 30'' a 95°C	}	33 cicli
- 30'' a 60°C		
- 60'' a 72°C		
- 20' a 72°C		

Al termine della reazione di PRC, 0,75 μ l del prodotto di amplificazione sono addizionati a 0,75 μ l di acqua, 0,5 μ l di ROX e 12 μ l di formammide deionizzata. I campioni vengono poi incubati a 94°C per 2', raffreddati in ghiaccio ed infine caricati nel sequenziatore ABI-310 (Applied Biosystems) 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"(MRC Holland). Le alterazioni vengono considerate significative se il valori presentano una deviazione maggiore del 30% rispetto al controllo.

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	
		reference	RB1
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA		
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation		
100	X-fragment: Specific for the X chromosome		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome		
130	Reference probe 00797-L00463	5q31	
136 +Y	RB1 probe 15264-L17018		CpG85 ; Intron 2
142	Reference probe 08591-L09595	17p11	
148 ~	ITM2B probe 01777-L09070		ITM2B gene
154 +	RB1 probe 15266-L17021		CpG85 ; Intron 2
160	Reference probe 08037-L07818	5p15	
167	RB1 probe 15136-L17332		Exon 11
172	RB1 probe 15133-L17333		Exon 5
178	RB1 probe 01779-L17334		Exon 2
184	Reference probe 05760-L06666	10p11	
191	RB1 probe 15137-L16906		Exon 16
196	RB1 probe 01780-L17335		Exon 3
204	RB1 probe 01781-L17719		Exon 4
211 *	Reference probe 07019-L20663	14q11	
218	Reference probe 07530-L17721	22q11	
225	RB1 probe 01782-L17336		Exon 6
230	RB1 probe 01783-L01347		Exon 7
238	Reference probe 00517-L00097	2q13	
244 ~	RCBTB2 probe 15140-L16914		RCBTB2 gene
250	RB1 probe 01784-L17337		Exon 8
256	RB1 probe 15134-L16903		Exon 9
264	RB1 probe 07944-L17338		Exon 1
269	Reference probe 09045-L09299	3q29	
276	RB1 probe 15135-L17339		Exon 10
283 *	RB1 probe 17823-L13845		Exon 1
292	RB1 probe 01787-L17341		Exon 12
301	Reference probe 05716-L17802	4p11	
310	RB1 probe 01788-L17342		Exon 13
317	RB1 probe 01789-L17343		Exon 14
325	RB1 probe 02734-L17344		Exon 1
333	RB1 probe 01790-L10676		Exon 17
346 Y	RB1 probe 01791-L18988		Exon 18
355	RB1 probe 01792-L02056		Exon 19
364	RB1 probe 01793-L01356		Exon 20
373	Reference probe 08809-L08869	2p13	
382	RB1 probe 01794-L01357		Exon 21
391	RB1 probe 01795-L01358		Exon 22
400 ~	DLEU1 probe 00801-L00639		DLEU1 gene
409 *	Reference probe 08725-L08736	9q21	
418	RB1 probe 01796-L16908		Exon 23
427	RB1 probe 01797-L16909		Exon 24
436	Reference probe 02838-L02269	21q22	
445	RB1 probe 01798-L16911		Exon 25
454	RB1 probe 01799-L16912		Exon 26
462	RB1 probe 15139-L16913		Exon 27
472	RB1 probe 01800-L17345		Exon 27
483	Reference probe 14431-L16136	11p11	

Tabella 3. Sonde contenute nel kit SALSA MLPA P047-C1 RB1 probemix

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Exon	Ligation site NM_000321.2	Partial sequence (24 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
148 ↵	01777-L09070	ITM2B gene		GGAATAAAGTAC-ATCAAAGATGAT	47.2 kb
		<i>start codon</i>	<i>167-169 (ex 1)</i>		
325	02734-L17344	Exon 1	354 nt before exon 1; 520 nt before ATG start codon	AGAGTGGCGCTC-CCGCCGAGGGTG	0.3 kb
283 *	17823-L13845	Exon 1	157 nt before exon 1; 323 nt before ATG start codon	GAAGGCGCTGG-ACCCACGCCAGG	0.2 kb
264	07944-L17338	Exon 1	140-141; 26 nt before ATG start codon	CCTCCACAGCTC-GCTGGCTCCCGC	3.5 kb
178	01779-L17334	Exon 2	392-393	AGAGAGCTTGGT-TAACTTGGGAGA	11.7 kb
136 +¥	15264-L17018	Intron 2 (CpG85)	11.6 kb after exon 2	GGAAATGCCAA-GATTGCTTCCGC	0.6 kb
154 +	15266-L17021	Intron 2 (CpG85)	12.2 kb after exon 2	GGAGGTTTGCGA-AAGGCGAACTCT	23.0 kb
196	01780-L17335	Exon 3	487-488	TTTATTGCAGCA-GTTGACCTAGAT	2.5 kb
204	01781-L17719	Exon 4	615-616	TGCTATGTCAAG-ACTGTTGAAGAA	2.7 kb
172	15133-L17333	Exon 5	693-692 reverse	AACTGCTGGGTT-GTGTCAAATATA	1.3 kb
225	01782-L17336	Exon 6	82 nt after exon 6	ATTOCCCAATTT-TTATTGAGTAAT	11.0 kb
230	01783-L01347	Exon 7	819-820	TTCATTTCAAGT-AATGCTATGTGT	2.8 kb
250	01784-L17337	Exon 8	939-940	GCGAGGTCAGAA-CAGGAGTGCAAG	2.0 kb
256	15134-L16903	Exon 9	1083-1082 reverse	CATTAGATGTTA-CAAGTCCAAGAG	2.6 kb
276	15135-L17339	Exon 10	1138-1139	TACGAAGAAATT-TATCTTAAAAAT	1.0 kb
167	15136-L17332	Exon 11	1273-1272 reverse	GTGTGTGGAGGA-ATTACATTCACC	4.7 kb
292	01787-L17341	Exon 12	114 nt before exon 12	ATGTAGAGACAA-GTGGGAGGCAGT	3.7 kb
310	01788-L17342	Exon 13	1477-1476 reverse	ATTTGACACAAA-COCTGTCCACAA	2.3 kb
317	01789-L17343	Exon 14	268 nt before exon 14	GCTTTTGTGTTG-TCTTGGCGGCCA	0.9 kb
	No probe	Exon 15			
191	15137-L16906	Exon 16	1619-1620	TTTTTCATATGT-CTTTATTGGCGT	1.2 kb
333	01790-L10676	Exon 17	1809-1810	AGAAATGATAAA-ACATTTAGAAGC	71.7 kb
346 ¥	01791-L18988	Exon 18	1944-1943 reverse	GGAGAGGAAGAT-TAAGAGACAAG	3.2 kb
355	01792-L02056	Exon 19	2045-2046	ATTCTACTGCAA-ATGCAGAGACAC	3.5 kb
364	01793-L01356	Exon 20	2155-2156	CTCCGGCTAAAT-ACACTTTGTGAA	3.8 kb
382	01794-L01357	Exon 21	176 nt before exon 21	TTTTGTCTTTA-AACACACTTTGG	1.5 kb
391	01795-L01358	Exon 22	2467-2468	CTGAAAACAAAT-ATTTTGCAGTAT	0.1 kb
418	01796-L16908	Exon 23	2511-2512	CTTGTCAACAAAT-ACCTCACATTCC	7.9 kb
427	01797-L16909	Exon 24	265 nt before exon 24	GAAACTTGCCTT-TGCCCTCCCTAA	3.7 kb
445	01798-L16911	Exon 25	2747-2748	GTGTGCTCAAAA-GAAGTGTGAAG	0.6 kb
454	01799-L16912	Exon 26	2856-2857	AGAGTCCAAATT-TCAGCAGAAACT	2.6 kb
462	15139-L16913	Exon 27	2902-2903	ACACGAATGCAA-AAGCAGAAAATG	0.4 kb
472	01800-L17345	Exon 27	3274-3275	GAGTCTGATAA-CCAGGCCTGTC	34.9 kb
		<i>stop codon</i>	<i>2951-2953 (ex 27)</i>		
244 ↵	15140-L16914	RCBTB2 gene		GTGGCTGTTTGG-GGTTAGGTGACG	1589.4 kb
400 ↵	00801-L00639	DLEU1 gene		GAAGAACAGAAC-CTTCAGGAATTG	

Tabella 4. Sonde contenute nel kit SALSA MLPA P047-C1 RB1 probemix

3. RISULTATI

3.1 Diagnosi molecolare in pazienti con retinoblastoma

L'analisi molecolare è stata effettuata tramite la combinazione di due tecniche: Next-Generation Sequencing (NGS) per l'identificazione di mutazioni puntiformi e Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) per la caratterizzazione di riarrangiamenti più estesi del gene *RBI* (delezioni/duplicazioni che coinvolgono interamente o parzialmente il gene). L'analisi è stata effettuata su 29 pazienti affetti da RB con forme bilaterali sporadiche (BS, 8 casi), unilaterali sporadiche (US, 20 casi) e unilaterali familiari (UF, 1 caso). L'analisi tramite MLPA non ha evidenziato la presenza di delezioni/duplicazioni estese del gene. Tramite NGS, invece, sono state identificate mutazioni puntiformi in *RBI* in tutti i pazienti affetti da RB BS e nel paziente affetto da RB UF (Figura 1). Nei pazienti affetti da RB US l'analisi NGS ha evidenziato la presenza di due mutazioni puntiformi (10%) a mosaico (Figura 1).

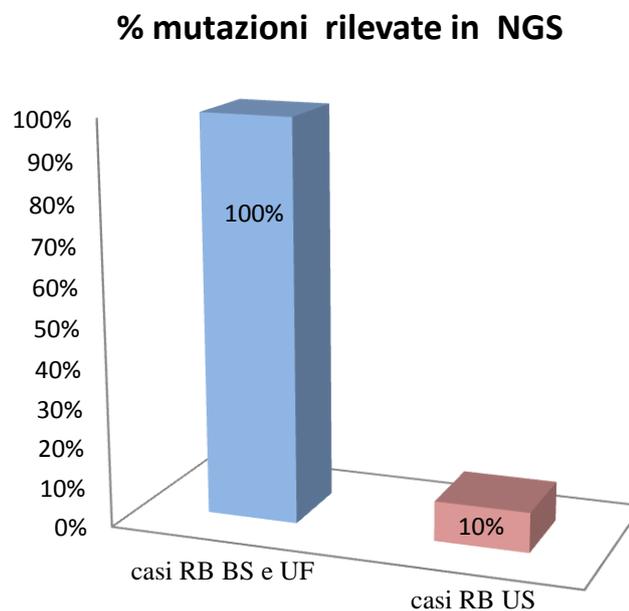


Figura 1. Detection rate in pazienti affetti da RB. Nei due casi RB US le mutazioni in *RBI* sono presenti in condizione di mosaico.

3.2 Analisi mutazionale in pazienti affetti da RB bilaterale

Sono stati esaminati 8 pazienti con diagnosi di retinoblastoma bilaterale sporadico. L'analisi NGS ha evidenziato mutazioni puntiformi di *RBI* in tutti i campioni analizzati. In particolare, sono state individuate quattro mutazioni nonsense (50%; casi #704, #745, #777, #779), tre mutazioni di splicing (37%; casi #714, #721, #762) ed una mutazione frame-shift (13%; caso #795) (tabella 1) (Figura 2).

Pazienti RB BS	Mutazione in <i>RBI</i>
#704	c.1666C>T (p.Arg566X)
#714	c.1498+5del
#721	c.1050-1G>C
#745	c.1363C>T (p.Arg455X)
#762	c.21221G>T
#777	c.1363C>T (p.R455X)
#779	c.2359C>T (p.R787X)
#795	c.1645insA (p.H549TfsX6)

Tabella 1. Risultati dell'analisi effettuata tramite NGS in pazienti affetti da RB bilaterale sporadico.

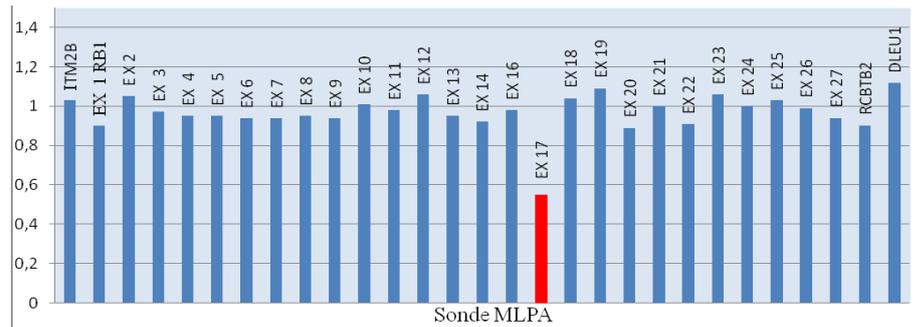


Figura 2. Tipi di mutazioni puntiformi rilevate in *RBI* tramite NGS in pazienti affetti da RB bilaterale sporadico.

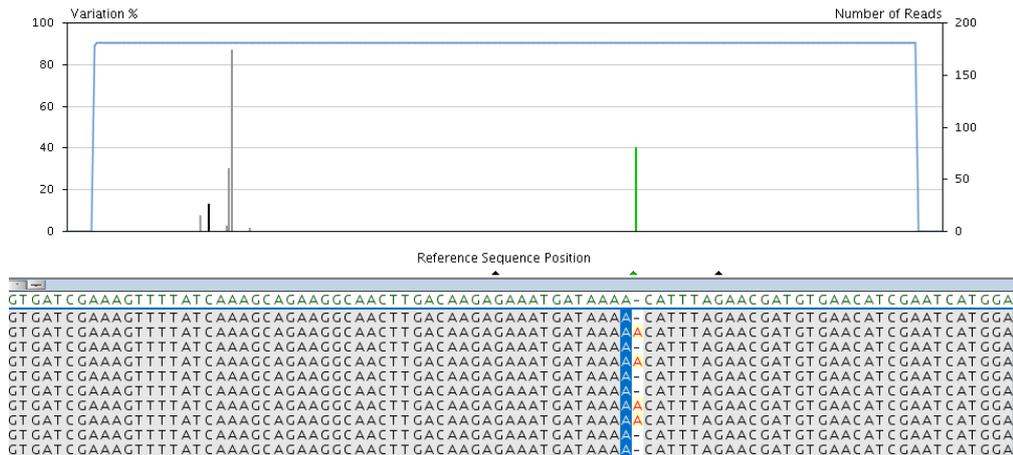
3.2.1 Descrizione di un caso: #795

La paziente alla nascita presentava parametri nella norma. A tre giorni di vita le viene diagnosticato un retinoblastoma bilaterale maculare allo stadio B, senza seeding vitreale o sottoretinico. Viene eseguita chemioterapia sistemica. Apparentemente non vi è familiarità per retinoblastoma; viene effettuata l'indagine molecolare.

Analisi molecolare: L'analisi *MLPA* ha evidenziato una possibile delezione monoesonica del gene *RBI* (esone 17) (Fig. 3A). Tuttavia l'analisi effettuata parallelamente tramite NGS ha identificato la presenza di una inserzione frameshift (c.1645insA; p.H549TfsX6) in eterozigosi proprio nel sito di legame di una delle sonde *MLPA* (Fig. 3B). Tale inserzione provoca il mancato legame della sonda *MLPA* e il falso risultato di delezione esonica.



A



B

Figura 3. Caso #795. A) L'istogramma riporta il dato MLPA ottenuto dalla normalizzazione tra i dati del paziente e di un controllo sano. Sull'asse delle y è riportato il rapporto di normalizzazione, mentre sull'asse delle x sono riportate le sonde MLPA per il gene *RBI* e i due geni fiancheggiati: *ITM2B* e *DLEU1*. Sono considerati normali i valori compresi tra 0,7 e 1,30. **B)** Rilevazione tramite NGS della variante in eterozigosi c.1645insA nell'esone 17 del gene *RBI*.

3.3 Analisi mutazionale nella paziente affetta da RB unilaterale familiare

Caso #124/2013.

Alla paziente (31 anni) viene diagnosticato all'età di 2 anni un retinoblastoma unilaterale, trattato con radioterapia. Il tumore è stato riscontrato in altri 11 componenti familiari del ramo paterno (Figura 4). L'analisi NGS nella probanda ha rilevato la presenza di una mutazione costitutiva di splicing in eterozigosi nell'introne 12 (c.1215+1G>A).

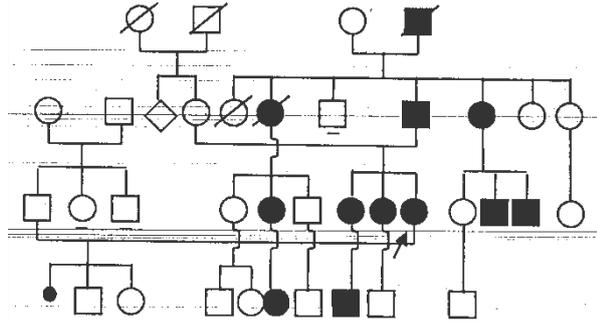


Figura 4. Albero genealogico del caso di RB unilaterale familiare.

3.4 Analisi mutazionale in pazienti affetti da RB unilaterale sporadico

Sono stati esaminati 21 pazienti con diagnosi di retinoblastoma unilaterale sporadico. L'indagine con NGS ha mostrato la presenza di mutazioni puntiformi a mosaico in due casi (caso #390b e #39/2013, tabella 2). Nel caso #390b è stata evidenziata una mutazione di splicing nell'esone 12 (c.1215+1G>A) in una percentuale di sequenze dell'8% (mosaico al 16%). Nel caso #39/2013 è stata identificata una mutazione nonsense nell'esone 18 (c.1735C>T, p.R579X) in una percentuale di sequenze del 24% (mosaico al 48%) (tabella 2).

Pazienti RB US	Mutazione in <i>RB1</i>	% di reads NGS con la mutazione
#390b	c.1215+1G>A	8% (MOSAICO 16%)
#39/2013	c.1735C>T; p.R579X	24% (MOSAICO 48%)

Tabella 2. Mutazioni in *RB1* a mosaico identificate tramite NGS nei due casi con RB unilaterale sporadico.

3.4.1 Caso #390b

Nella paziente (34 anni) viene effettuata diagnosi di retinoblastoma unilaterale a sei mesi di vita. Non viene rilevata familiarità né per retinoblastoma né per altri tipi di tumore.

Analisi molecolare: l'analisi NGS ha evidenziato una mutazione di splicing nell'esone 12 del gene *RBI* (c.1215+1G>A) nell'8% delle sequenze, indice di un mosaico al 16% (Figura 5). Tale mutazione non era stata identificata tramite sequenziamento tradizionale (Sanger).

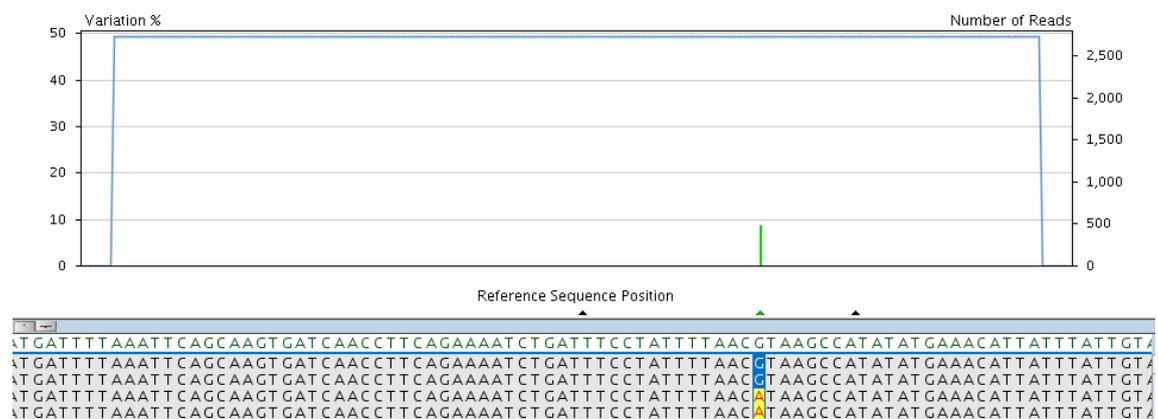


Figura 5. Analisi NGS del caso #390b. Rilevazione della variante esonica c.1215+1G>A a mosaico. Nel pannello superiore l'istogramma in verde rappresenta la percentuale di reads in cui è stata trovata la base Adenina al posto della Guanina (8%). Nel pannello inferiore viene visualizzato l'allineamento delle reads di entrambi i filamenti e in giallo viene evidenziata la base mutata rispetto alla base normale.

3.4.2 Caso #39/2013

Nel paziente all'età di quattro anni, in seguito alla comparsa di leucocoria, viene diagnosticato un retinoblastoma unilaterale. Non viene rilevata familiarità per RB.

Analisi molecolare: l'analisi NGS ha evidenziato una mutazione nonsense nell'esone 18 (p.R579X) del gene *RBI* nel 24% delle sequenze, indice di una condizione di mosaico

al 48% (Figura 6). Utilizzando il metodo di sequenziamento Sanger tale mutazione sarebbe stata interpretata come variante presente in eterozigosi nel 100% delle cellule.

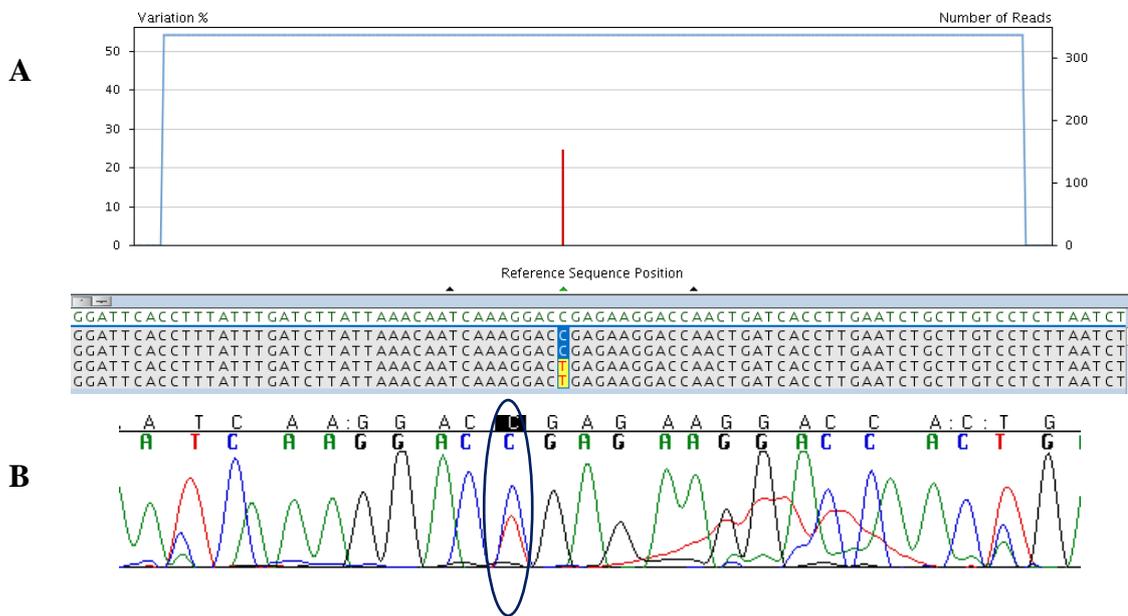


Figura 6. Analisi molecolare del caso #39/2013. A) Rilevazione tramite NGS della variante esonica c.1735C>T in condizione di mosaico al 48%. **B)** Il cromatogramma Sanger dell'esone 18 mostra la presenza della stessa variante che però sarebbe stata interpretata come variante in eterozigosi.

4. DISCUSSIONE

Il retinoblastoma è il tumore maligno intraoculare più comune in età pediatrica ed insorge solitamente nei primi cinque anni di vita, con un'età media alla diagnosi di 12 mesi per le forme bilaterali e 24 mesi per le forme unilaterali (*Moll AC et al., 1997*). 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 (*Knudson AG, 1971*). In realtà, è stato dimostrato che esiste una frazione del 15% di casi di RB unilaterale sporadico con mutazione costitutiva nel gene *RBI*, con importanti conseguenze sul piano della consulenza genetica (*Alonso J et al., 2001*)

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 alla trasformazione tumorale maligna. 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 a retinoblastoma (*Sampieri K et al., 2008*). 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, di splicing e a carico del promotore), ma anche da altri eventi secondari.

Negli ultimi anni l'avvento della tecnologia Next-Generation Sequencing (NGS) ha aperto importanti prospettive nella diagnostica molecolare, rappresentando un potente mezzo per l'analisi simultanea di un gran numero di regioni codificanti (*Artuso R et al., 2012*). Questa metodica, applicata anche alla diagnosi di RB, consente di ridurre notevolmente i tempi di analisi, poiché permette di analizzare la regione del promotore e tutti i 27 esoni del gene in un solo step. Questo ha portato la U.O. di Genetica Medica di Siena a ridurre significativamente i tempi di attesa per i pazienti: da 6 mesi tramite sequenziamento tradizionale a 5 giorni tramite NGS. Inoltre la tecnica NGS, analizzando la singola molecola di DNA, consente di evidenziare la presenza di

mosaicismi a basso grado che erano sempre stati al di sotto del potere di risoluzione delle tecniche di sequenziamento tradizionale (*Pagnamenta AT et al, 2012*).

Tramite l'utilizzo della piattaforma 454 GS Junior System (Roche), abbiamo impiegato la tecnica NGS per analizzare una casistica di 29 pazienti affetti da retinoblastoma (8 casi bilaterali sporadici, un caso unilaterale familiare e 20 casi unilaterali sporadici). Nelle forme bilaterali/familiari, dove ci aspettavamo l'identificazione della mutazione costitutiva in *RBI*, la tecnica NGS ci ha permesso di ottenere un 100% di detection rate. In accordo con i dati di letteratura, le mutazioni identificate (4 nonsense, 4 di splicing ed una inserzione frameshift) portano ad una interruzione prematura della proteina pRB (*Valverde J et al, 2005*).

La tecnica NGS è stata combinata con la metodica MLPA, per poter identificare anche l'eventuale presenza di riarrangiamenti estesi del gene *RBI*, riportati in una piccola percentuale di pazienti (10%) (*Richter S et al, 2003*). Tale tecnica in un caso ha evidenziato una possibile delezione monoesonica (esone 17). Tuttavia, l'analisi parallela tramite NGS ha identificato un'inserzione frameshift nell'esone 17 (c.1645insA), in corrispondenza del sito di legame di una delle sonde MLPA. Questo risultato sottolinea l'importanza di affiancare le due tecniche in casi di sospetta delezione/duplicazione monoesonica in quanto la presenza di una mutazione puntiforme nei siti di legame delle sonde MLPA può suggerire la falsa presenza di una delezione estesa.

Nei casi con RB unilaterale sporadico, la tecnica NGS ha evidenziato due casi di mosaicismismo (mutazione in *RBI* post-zigotica). Le mutazioni, una di splicing (c.1215+1G>A) e l'altra nonsense (p.R579X), sono state riscontrate rispettivamente nell'8% (mosaico al 16%) e 24% (mosaico al 48%) delle sequenze. La presenza di mutazioni a mosaico nel gene *RBI* in pazienti affetti da retinoblastoma era già stata riportata precedentemente (*Rushlow D et al, 2008*). Tali mutazioni erano state identificate tramite tecnica di PCR allele-specifica (AS-PCR). Già l'introduzione di tale tecnica aveva aumentato la detection rate di mutazioni in *RBI*, ma l'analisi AS-PCR si limitava ad 11 hot spot del gene, mentre la tecnica NGS consente di effettuare un'analisi mutazionale completa. In accordo, lo studio precedente riportava una frequenza di mutazioni a mosaico nel 3.8% dei casi con RB unilaterale sporadico, mentre nella nostra casistica tale percentuale aumenta al 10% (2/20 casi). Il metodo di sequenziamento Sanger non era in grado di evidenziare la presenza della mutazione a più basso grado di mosaico (c.1215+1G>A), mentre era in grado di rilevare la mutazione p.R579X (Fig.

6B). Tuttavia tale mutazione sarebbe stata interpretata come variante in eterozigosi nel 100% delle cellule, con importanti ricadute nella definizione del rischio di ricorrenza.

In conclusione, la tecnica NGS rappresenta uno strumento prezioso per la diagnosi molecolare, in quanto garantisce rapidità ed un alto livello di sensibilità. Questo consente di migliorare la gestione del paziente in quanto diminuisce drasticamente i tempi di attesa e permette di attivare azioni preventive mirate precocemente rispetto alle metodiche classiche. La maggior sensibilità della tecnica permette inoltre di identificare le condizioni di mosaicismo somatico a basso grado, con importanti ricadute in consulenza genetica. La rapida caratterizzazione di mutazioni in *RBI* in ampie casistiche consentirà, infine, di effettuare correlazioni genotipo-fenotipo sempre più attendibili, con una migliore definizione della prognosi.

BIBLIOGRAFIA

Abramson DH, Dunkel IJ, Brodie SE et al. A phase I/II study of direct intraarterial (ophthalmic artery) chemotherapy with melphalan for intraocular retinoblastoma initial results. *Ophthalmology* 2008; 115: 1398–1404.

Abramson DH, Jereb , Ellsworth RM. External beam radiation for retinoblastoma. *Bull NY Acad Med.* 1981; 57: 787–803.

Alonso J, Garcia-Miguel P, Abelairas J et al. Spectrum of germline RB1 mutations in Spanish retinoblastoma patients: Phenotypic and molecular epidemiological implications. *Hum Mutat.* 2001;17(5)412-22.

Ansorge WJ. Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol.* 2009; 4:195-203.

Artandi SE, DePinho. A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 39-46.

Artuso R, Fallerini C, Dosa L, Scionti F et al. Advances in Alport syndrome diagnosis using next-generation sequencing. *EJHG*, 2012; 20(1):50-57.

Balmer A, Munier F, Gailloud C. Retinoma. Case studies. *Ophthalmic Paediatr Genet.* 1991;12(3):131-7.

Balmer A, Munier F, Zografos L. New strategies in pediatric ophthalmic oncology. *Rev Med Suisse.* 2008; 4: 139–143.

Barbosa RH, Aguiar F C, Silva MFL, et al. Screening of RB1 alterations in Brazilian patients with Retinoblastoma and relatives with Retinoma: phenotypic and genotypic associations. *Invest Ophthalmol Vis Science* 2013; 54:3184 -3194.

Beltran H, Yelensky R, Frampton GM et al. Targeted Next-generation Sequencing of advanced prostate cancer identifies potential therapeutic targets and disease heterogeneity. *Europ Urol*. 2013; 920-926.

Bowles E, Corson TW, Bayani J, Squire JA, Wong N, Lai PB et al. Profiling genomic copy number changes in retinoblastoma beyond loss of RB1. *Genes Chromosome Cancer*. 2007; 46:118-29.

Bramson DH, Marks R, Ellsworth RM, Tretter P, Kitchin FD. The management of unilateral retinoblastoma without primary enucleation. *Arch Ophthalmol*. 1982; 100: 1249–1252.

Broadus E, Topham A, Singh AD. Survival with retinoblastoma in the USA: 1975–2004. *Br J Ophthalmol*. 2009; 93: 24–27.

Buchkovich K, Duffy LA, Harlow E. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 1989; 58:1097–1105.

Burkhart DL, Sage J.. Cellular mechanisms of tumor suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:671–682.

Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* 2001; 527-531.

Choubey D, Lengyel P. Binding of an interferon-inducible protein (p202) to the retinoblastoma protein. *J Biol Chem*. 1995;270:6134-40.

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.

Choy KW, Pang CP, Fan DS et al. Microsatellite instability and MLH1 promoter methylation in human retinoblastoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45:3404-3409.

Clarke AR et al. Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nat.* 1992; 359:328-30.

Cobrinik D. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* 2005; 24:2796–2809.

Cohen Y, Merhavi-Shoham E et al. Hypermethylation of CpG island loci of multiple tumor suppressor genes in retinoblastoma. *Exp Eye Res.* 2008; 86:201-206.

Comings DE. A general theory of carcinogenesis. *Proct Natl Acad Sci U S A.* 1973; 70(12):3324-8.

Cordon-Cardo C, Richon VM. Expression of the retinoblastoma protein is regulated in normal human tissues. *Am J Pathol.* 1994; 144(3):500-10.

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.

Du W, Pogoriler J. Retinoblastoma family genes. *Oncogene* 2006; 25:5190–5200.

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.

Eagle RC Jr, Shields JA, Donoso L, Milner RS. Malignant transformation of spontaneously regressed retinoblastoma, retinoma/retinocytoma variant. *Ophthalmol.* 1989;96(9):1389-95.

Eagle RC Jr. High-risk features and tumor differentiation in retinoblastoma: a retrospective histopathologic study. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(8):1203-9.

Fiorentino FP, Marchesi I, Giordano A. On the role of Retinoblastoma family proteins in the establishment and maintenance of the epigenetic landscape. *J Cell Physiol* 2013; 228(2):276-84.

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

Gabellini C, Del Bufalo D, Zupi G. Involvement of RB gene family in tumor angiogenesis. *Oncogene* 2006; 25:5326–5332.

Gallie BL, Campbell C, Devlin H et al. Developmental basis of retinal-specific induction of cancer by Rb mutation. *Cancer Res.* 1999; 59:1731-1735.

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.

Glozak MA, Rogers MB. Retinoic acid and bone morphogenic protein 4-induced apoptosis in P 19 embryonal carcinoma cells requires p27. *Exp Cell Res* 2001; 268:28-38.

Gobin YP, Dunkel IJ, Marr BP et al. Intra-arterial chemotherapy for the management of retinoblastoma: four year experience. *Arch Ophthalmol.* 2011;129: 732–737.

Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD, Kaye FJ. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 1988; 241:353–357.

Horowitz JM, Yandell DW, Park SH, Canning S, Whyte P, Buchkovich K, Harlow E, Weinberg RA, Dryja TP. Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science* 1989; 243:937–940.

Howard MA, Dryja TP, Walton DS, et al. Identification and significance of multinucleate tumor cells in retinoblastoma. *Arch Ophthalmol.* 1989; 107:1025-30.

Indovina P, Marcelli E, Casini N et al. Emerging roles of RB family: new defense mechanisms against tumor progression. *J Cell Physiol.* 2012; 228: 525-535.

Jacks T et al. Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nat.* 1992; 359:295-300.

James I, MacDonald, Dick FA. Posttranslational modifications of the retinoblastoma tumor suppressor protein as determinants of function. *Genes and Cancer.* 2013, 3:619-633.

Ji Na Y, Cho Y, Kim JH. AnsNGS: An annotation system to sequence-variations of Next Generation Sequencing data for disease-related phenotypes. *Healthc Inform Res.* 2013; 19:50-55.

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: a statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-828.

Kouzarides T. Transcriptional control by the retinoblastoma protein. *Semin Cancer Biol.* 1995;6:91-8.

Leong KJ, Wei W, Tannahill LA et al. Methylation profiling of rectal cancer identifies novel markers of early-stage disease. *Br J Surg.* 2011; 98:724-734.

Linn Murphree A. Intraocular retinoblastoma: the case for a new group classification. *Ophthalmol Clin North Am.* 2005; 18:41–53.

Livide G, Epistolato MC, Amenduni M et al. Epigenetic and copy number variation analysis in retinoblastoma by MS-MLPA. *Pathol Oncol Res.* 2012; 18:703-712.

Lohmann DR et al. Constitutional RB1-gene mutations in patients with isolated unilateral retinoblastoma. *Am J Hum Genet.* 1997; 61:282-94.

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.

- Lowe SW, Lin AVV Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 2000; 21:485-495.
- 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.
- Manning AL, Dyson NJ. RB: mitotic implication of a tumor suppressor. *Nat Rev Cancer*. 2012; 2:220-226.
- Mansour AM, Greenwald MJ, O'Grady R. Diffuse infiltrating retinoblastoma. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1989; 26(3):152-4.
- Marees T, Moll AC, Imhof SM, de Boer MR, et al. Risk of Second Malignancies in Survivors of Retinoblastoma: More Than 40 Years of Follow-up. *Natl Cancer Inst*. 2008; 100:1771–9.
- Messmer EP, Sauerwein W, Heinrich T, Höpping W, Klueter-Reckmann D, et al. 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.
- 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.
- Onadim Z, Hogg A, Baird PN, Cowell JK. 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 USA*. 1992; 89:6177-6181.
- Pagnamenta AT, Lise S, Harrison V et al. Exome sequencing can detect pathogenic mosaic mutations present at low allele frequencies. *J Hum Genet*. 2012; 57(1):70-2.
- Raoul CM, Hennekam, Biesecker LG. Next-Generation Sequencing demands Next-Generation Phenotyping. *Human Mutat*. 2012; 33:884-886.

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.

Robanus-Maandag E et al. P107 is a suppressor of retinoblastoma development in pRb-deficient mice. *Genes Dev.* 1988; 12:1599-609.

Ronaghi M, Uhlen M et al. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 1998; 281(5375):363 - 365.

Rubinstein LJ. Tumors of the central nervous system. *Atlas of Tumor Pathology*, 2nd Series, Fascicle 6. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1982; 15-20.

Sampieri K, Amenduni M, Papa FT et al. Array comparative genomic hybridization in retinoma and retinoblastoma tissues. *Cancer Sci.* 2009; 100:465-471.

Sampieri K, Mencarelli MA, Epistolato MC et al. Genomic differences between retinoma and retinoblastoma. *Acta Oncol* 2008; 47: 1483–92.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002; 30(12):57.

Sevel D, Röhm GF, Sealy R. Clinical significance of the fleurette in retinoblastoma. *Br J Ophthalmol.* 1974; 58:687-93.

Shields CL, Shields JA. Retinoblastoma management: advances in enucleation, intravenous chemoreduction, and intra-arterial chemo-therapy. *Curr Opin Ophthalmol.* 2010;21: 203–212.

Singh AD, Santos CM, Shields CL, Shields JA, Eagle RC Jr. Observations on 17 patients with retinocytoma. *Arch Ophthalmol.* 2000;118(2):199-205.

Singh SK, Das D, Bhattacharjee H, Biswas J, Kuri G et al. A rare case of adult onset retinoblastoma. *Oman J Ophthalmol*. 2011;4(1):25–27.

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.

Skapek SX, Pan YR, Lee EY. Regulation of cell lineage specification by the retinoblastoma tumor suppressor. *Oncogene* 2006; 25:5268–5276.

Sparkes RS et al. Regional assignment of genes for human esterase D and retinoblastoma to chromosome band 13q14. *Sci*. 1980; 208:1042-44.

Sun A, Bagella L, Tutton S, Romano G, Giordano A. From G0 to S phase: A view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway. *J Cell Biochem* 2007; 102:1400–1404.

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; 24:5827-5836.

Ts'o MO, Fine BS, Zimmerman LE. The Flexner-Wintersteiner rosettes in retinoblastoma. *Arch Pathol* 1969; 88:664-71.

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.

Venturi C, Bracco S, Cerase A, Cioni S, Galluzzi P, Gennari P et al. Superselective ophthalmic artery infusion of melphalan for intraocular retinoblastoma: preliminary results from 140 treatments. *Act Ophthalmol*. 2013; 91:335-342.

Vogel F. Genetics of retinoblastoma. *Hum Genet*. 1979; 52(1)1-54.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* . 1995; 81:323–330.

Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science*. 1991; 254(5035):1138-46.

Weisenberger DJ, Siegmund KD et al. CpG islands methylator phenotype underlies sporadic micro satellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet*. 2006; 38:787-793.

Yates DR, Rehman I, Abbod MF et al. Promoter hypermethylation identifies progression risk in bladder cancer. *Clin Cancer Res* .2007; 13: 2046-2053.

Zhang J, Benavente CA, McEvoy J et al. A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses. *Nature*. 2012; 481(7381): 329–334.

Zhang K, Nowak I, Rushlow D et al. Patterns of missplicing caused by RB1 gene mutations in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression. *Human Mutat*; 2008 29(4): 475-484.

Zhu X et al. Mechanism of loss of heterozygosity in retinoblastoma. *Cytogenet Cell Genet*. 1992;59:248-52.

Ringrazio la Prof.ssa Alessandra Renieri per avermi permesso di raggiungere questo traguardo, tutto il gruppo di lavoro della Genetica Medica per la disponibilità e l'accoglienza ricevuta durante il periodo di tirocinio e infine un ringraziamento speciale a Francesca Ariani e Sara Amitrano per la loro preziosa collaborazione durante la stesura della tesi.