

Спектр нарушений гена *RB1* при ретинобластоме у российских пациентов

Алексеева Е.А.^{1,2}, Козлова В.М.³, Бабенко О.В.¹, Ушакова Т.Л.³, Казубская Т.П.³,
Чеснокова Г.Г.¹, Танас А.С.¹, Залетаев Д.В.¹, Стрельников В.В.¹

¹ – ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1

² – ФГАОВ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский Университет)
119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

³ – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

Введение. Ретинобластома – злокачественная опухоль детского возраста, причиной которой является биаллельная инактивация гена *RB1*. Ранняя молекулярно-генетическая диагностика ретинобластомы необходима как для адекватного выбора алгоритма лечения пациента с такой опухолью, так и для медико-генетического консультирования семьи.

Цель: охарактеризовать частоту и спектр мутаций в гене *RB1* у российских больных с ретинобластомой.

Методы. Исследование проведено на материале ДНК лимфоцитов крови, полученном от 492 больных с ретинобластомой. Скрининг точковых мутаций, малых инсерций/делеций в гене *RB1* осуществляли методом полупроводникового высокопроизводительного параллельного секвенирования. Исключение протяженных делеций в гене *RB1* проводили методом MLPA.

Результаты. Исследовано 492 неродственных пациента с ретинобластомой, среди которых 38,2% (188/492) с билатеральной формой заболевания и 61,8% (304/492) – с унилатеральной. В группе больных с билатеральной формой ретинобластомы герминальная мутация обнаружена у 96,8% (182/188) пациентов, в группе больных с унилатеральной формой – у 16,4% (50/304). Суммарно в гене *RB1* в исследованной группе пациентов обнаружено 339 мутаций: 232 – герминальных и 107 – соматических. Выявлен практически полный спектр молекулярных изменений, включающий нонсенс-мутации – 37,5% (127/339), миссенс-мутации – 5,3% (18/339), мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания – 18,9% (64/339), мутации сайтов сплайсинга – 13,9% (47/339) и протяженные делеции – 24,5% (83/339).

Выводы. Применение глубокого высокопроизводительного параллельного секвенирования и метода MLPA позволяет эффективно выявлять молекулярно-генетические изменения в гене *RB1*. Типы мутаций, обнаруженные в исследованной группе, их частота и распределение совпадают с результатами исследователей из других стран.

Ключевые слова: ретинобластома, *RB1*, высокопроизводительное параллельное секвенирование ДНК, MLPA.

Для цитирования: Алексеева Е.А., Козлова В.М., Бабенко О.В., Ушакова Т.Л., Казубская Т.П., Чеснокова Г.Г., Танас А.С., Залетаев Д.В., Стрельников В.В. Спектр нарушений гена *RB1* при ретинобластоме у российских пациентов. *Медицинская генетика* 2021; 20(8): 11-20.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.08.11-20

Автор для корреспонденции: Стрельников Владимир Викторович; **e-mail:** vstrel@list.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ» на выполнение НИР в 2021 году.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила: 30.07.2021.

The spectrum of genetic changes in the RB1 gene in a group of Russian retinoblastoma patients

Alekseeva E.A.^{1,2}, Kozlova V.M.³, Babenko O.V.¹, Ushakova T.L.³, Kazubskaya T.P.³,
Chesnokova G.G.¹, Tanas A.S.¹, Zaletaev D.V.^{1,2}, Strelnikov V.V.¹

¹ – Research Centre for Medical Genetics
1 Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

² – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)
8 Trubetskaya st., Moscow, 119991, Russian Federation

³ – N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation
24 Kashirskoe highway, 115478, Moscow, Russian Federation

Background. Retinoblastoma is a childhood malignant tumor caused by biallelic inactivation of the *RB1* gene. Early molecular genetic diagnosis of retinoblastoma is necessary both for an adequate choice of an algorithm for treating a patient, and for competent medical genetic counseling of the family

Objective. To establish the frequency and spectrum of mutations in the *RB1* gene in the group of patients with retinoblastoma.

Methods. The study was carried out on the DNA of blood lymphocytes from 492 patients with retinoblastoma. Screening of point mutations, small insertions/deletions in the *RB1* gene was performed by semiconductor high-throughput parallel sequencing. Exclusion of gross deletions in the *RB1* gene was performed by MLPA.

Results. 492 unrelated patients with retinoblastoma were studied, including 38.2% (188/492) with bilateral form and 61.8% (304/492) with unilateral form. In the group of patients with bilateral retinoblastoma, germline mutation was found in 96.8% (182/188) patients, and in the group of unilateral patients, in 16.4% (50/304). In total, the *RB1* gene in the studied group of patients 339 mutations were found, 232 germline and 107 somatic. An almost complete spectrum of molecular changes was revealed, including nonsense mutations, 37.5% (127/339); missense mutations, 5.3% (18/339); frame shift mutations, 18.9% (64 / 339); splice site mutations, 13.9% (47/339); and large deletions, 24.5% (83/339).

Conclusion. The use of deep high-throughput parallel sequencing and the MLPA method allows efficient detection of molecular genetic changes in the *RB1* gene. The types of mutations found in the studied group, their frequency and distribution are the same as the results of researchers in other countries.

Keywords: retinoblastoma, *RB1*, mutation, large deletion, NGS, MLPA.

For citation: Alekseeva E.A., Kozlova V.M., Babenko O.V., Ushakova T.L., Kazubskaya T.P., Chesnokova G.G., Tanas A.S., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. The spectrum of genetic changes in the *RB1* gene in a group of Russian retinoblastoma patients. *Meditsinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(8): 11-20. (In Russ.).

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.08.11-20

Corresponding author: Vladimir V. Strelnikov; **e-mail:** vstrel@list.ru

Funding. The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Accepted: 30.07.2021.

Введение

Ретинобластома — наиболее частая опухоль сетчатки глаза, ассоциированная с биаллельной инактивацией гена-супрессора *RB1* [1]. Опухоль возникает с частотой 1:15000–20000 новорожденных и может носить наследственный или спорадический характер. Ретинобластома характеризуется высокой злокачественностью, без ранней диагностики и эффективного лечения опухоль способна приводить к потере зрения, глаза (глаз), а также к тяжелой метастатической болезни и смерти [2, 3].

Ретинобластома может поражать один (унилатеральная форма) или оба (билатеральная форма) глаза. Кроме того, выделяют трилатеральную форму заболевания, включающую билатеральную ретинобластому и опухоль эпифиза [4, 5]. В большинстве случаев опухоль диагностируется в возрасте до 5 лет, при этом билатеральная форма заболевания манифестирует достоверно в более раннем возрасте по сравнению с унилатеральной (15 месяцев и 27 месяцев, соответственно) [6, 7].

При наследственной ретинобластоме один из аллелей гена *RB1* мутирован во всех клетках организма (герминальная мутация), тогда как второй аллель гена инактивирован только в клетках сетчатки (соматическая мутация), которые дают начало опухоли [4]. Герминальная мутация в гене *RB1* может быть унаследована от одного из родителей (25%) или возникнуть в результате мутации *de novo* в процессе гаметогенеза (75%) [8]. Наследственная ретинобласто-

ма составляет 40% среди всех случаев заболевания и включает билатеральную (80%), унилатеральную (15%) и трилатеральную (5%) формы [1, 4, 5]. Носители герминальной мутации в гене *RB1* подвержены повышенному риску развития других первичных опухолей различной локализации как в детстве, так и во взрослом возрасте [9]. Такие опухоли (наиболее часто встречаются лейомиосаркома, остеосаркома и меланома), как правило, более агрессивны и плохо поддаются терапии, что подчеркивает важность выявления носителей герминальной мутации в гене [10].

Спорадическая ретинобластома возникает в результате двух соматических мутаций в клетках предшественниках сетчатки. Эта форма заболевания составляет 60% всех случаев ретинобластомы и проявляется как унилатеральная и монофокальная опухоль [1, 4, 11].

Ген-супрессор *RB1* картирован на хромосоме 13q14.1, занимает около 180 т.п.н. и состоит из 27 экзонных [4]. Ген кодирует ядерный фосфопротеин — белок Rb, который играет важную роль в процессах клеточной репликации [11].

Спектр генетических нарушений, описанных в гене *RB1* при ретинобластоме, включает хромосомные перестройки, протяженные экзонные делеции, гиперметилованные промоторной области, мутации небольшой длины и однонуклеотидные замены [1, 11]. Мутации распределены по всей кодирующей последовательности гена *RB1*, а также в области промото-

ра, сайтов сплайсинга и в глубоких интронных областях. Примерно 90% всех мутаций в гене *RB1*, включая протяженные делеции, нонсенс-мутации и короткие инсерции/делеции со сдвигом рамки считывания, приводят к полной потере функции белка и ассоциированы с развитием высокопенетрантной формы ретинобластомы. Напротив, миссенс-мутации, короткие инсерции/делеции без сдвига рамки считывания и изменения в промоторе гена связаны с низкой экспрессивностью и неполной пенетрантностью фенотипа заболевания [1, 12].

Таким образом, своевременное молекулярно-генетическое исследование изменений в гене *RB1* при ретинобластоме позволяет подтвердить или исключить наследственный характер заболевания, что необходимо для эффективного лечения и медико-генетического консультирования семей, а также позволяет расширить знания в области молекулярной генетики опухоли путем накопления данных о спектре и частоте различных изменений в гене.

Методы

Клинический материал

Исследование проведено на материале ДНК лимфоцитов крови, полученном от 492 неродственных больных с ретинобластомой, наблюдавшихся в ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина», среди которых 304 пациента с унилатеральной формой заболевания и 188 — с билатеральной. Среди обследованных пациентов 22 (4,5%) имели семейный анамнез заболевания (3 пациента с унилатеральной формой ретинобластомы, 19 — с билатеральной).

Молекулярный анализ гена *RB1* проводили в ДНК из фиксированных формалином тканей опухолей и ДНК из лимфоцитов периферической крови (73 пациента: 52 — с унилатеральной формой заболевания, 21 — билатеральной). Такой подход обусловлен необходимостью определения характера молекулярной патологии гена — является ли повреждение герминальным или носит только соматический характер. В связи с текущим органосохраняющим подходом в лечении ретинобластомы или вследствие других причин при отсутствии материала опухоли исследование проводили только на ДНК из лейкоцитов периферической крови (419 пациентов).

Скрининг однонуклеотидных замен и коротких инсерций/делеций

Поиск точковых мутаций, малых инсерций/делеций в гене *RB1* осуществляли методом высокопроизводительного параллельного секвенирования на при-

боре Ion Torrent PGM или Ion S5 (Life Technologies, США). Интерпретацию патогенности выявленных генетических вариантов проводили согласно отечественному руководству [13]. В качестве референсной последовательности транскрипта *RB1* использовали NM_000321. С целью верификации выявленных изменений применяли секвенирование по Сэнгеру, с предварительной амплификацией целевых фрагментов генов методом ПЦР.

Скрининг протяженных делеций

Поиск протяженных делеций в гене *RB1* проводили методом MLPA (MRC-Holland, Нидерланды).

Выделение ДНК, высокопроизводительное параллельное секвенирование гена *RB1*, секвенирование по Сэнгеру с целью верификации выявленных точковых мутаций, анализ протяженных делеций гена *RB1* проводили в соответствии с ранее разработанной авторами медицинской технологией комплексной ДНК-диагностики ретинобластомы [14].

При обнаружении молекулярного изменения в гене *RB1* у пробанда образцы ДНК родителей и сибсов также исследовали на наличие идентифицированной молекулярной патологии путем секвенирования по Сэнгеру или методом MLPA в зависимости от выявленного изменения (361 образец).

Результаты и обсуждение

Точковые замены и короткие делеции/инсерции в гене RB1

В результате скрининга точковых замен и коротких делеций/инсерций в гене *RB1* методом секвенирования нового поколения в группе из 492 больных с ретинобластомой выявлено 256 мутаций — 75,8% (194/256) герминальных и 24,2% (62/256) соматических.

Выявлен полный спектр молекулярных изменений, представленный нонсенс-мутациями (49,6% (127/256)), малыми делециями/инсерциями, приводящими к сдвигу рамки считывания (25,0% (64/256)), мутациями сайтов сплайсинга (18,4% (47/256)) и миссенс-мутациями (7,0% (18/256)) (рис. 1). Как видно из рис. 1, наиболее часто в исследованной группе пациентов с ретинобластомой встречались нонсенс-мутации, реже всех — миссенс-мутации. Выявленные типы мутаций, приводящие к инактивации гена *RB1*, и их частоты совпадают с результатами, опубликованными в исследованиях других авторов [6, 12, 15].

Выявленные в обследованной группе больных с ретинобластомой патогенные замены и короткие делеции/инсерции в *RB1* распределены по всему гену, включая как кодирующие, так и прилежащие интронные обла-

сти, за исключением 25-27 экзонов, а также промоторного региона (рис. 2). Кроме того, мутации практически не встречались в 5 и 24 экзонах (частота мутаций составила 0,4% в каждом). Согласно исследованиям разных групп авторов, мутации, приводящие к инактивации гена *RBI*, в экзонах 26, 27 практически не встречаются, а мутации экзонах в 5, 24, 25 и промоторном регионе встречаются с низкой частотой [6, 12, 15, 16].

Более половины, 55,9% (143/256), выявленных точковых замен и коротких делеций/инсерций располагались в области 12-23 экзонов, кодирующих А/В центральный «карманный» домен белка pRB, отвечающий за регуляцию транскрипции. Субдомен А (экзоны 12-18) включал 41,0% (105/256) мутаций, тогда как субдомен В – только 14,8% (38/256). Высокая доля мутаций в этом регионе также совпадает с ранее опубликованными данными [6, 12].

Среди всех точковых замен и малых делеций/инсерций, идентифицированных в гене *RBI*, 43,0% (110/256) составили рекуррентные мутации, то есть те, которые встречались в исследованной группе не менее, чем у двух неродственных пациентов (табл. 1).

Мутации в гене *RBI* распределены по всей его последовательности, однако существуют отдельные точки, в которых происходит накопление одинаковых мутаций – двенадцать нонсенс-мутаций (экзоны 4, 8, 10, 11, 14, 15, 17, 18 и 23), три мутации сайтов сплайсинга (6, 12 и 19 интроны) и две миссенс-мутации (экзоны 20 и 21) [17]. Большинство рекуррентных мутаций накапливается в одиннадцати аргининовых кодонах (мутация CGA>TGA) в экзонах 8, 10, 11, 14, 15, 17, 18 и 23 [6, 15, 17]. В исследованной группе пациентов с ретинобластомой изменения в 11 аргининовых кодонах составили 89,1% (98/110) от выявленных рекуррентных мутаций.

Ген *RBI* содержит в общей сложности четырнадцать CGA-аргининовых кодонов, расположенных в экзонах 1, 8, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 23 и 27 (в экзонах 8, 14, 17 и 27 располагается по два триплета CGA). Однако в CGA-кодонах в экзонах 1 и 27 мутации практически не обнаруживаются. Считается, что повышенная частота мутаций CGA-кодонов обусловлена статусом метилирования CpG-динуклеотидов, поскольку спонтанное дезаминирование 5'-метилцитозина приводит к его замене на тимин в последовательности ДНК. Отсутствие мутации в CGA-кодоне экзона 1 (кодон R7), последствием которой должен был бы быть короткий и неактивный белок, объясняется тем, что этот кодон является частью конститутивно неметилированного CpG-островка в промоторе гена *RBI*. Несмотря на то, что согласно вышеописанному объяснению, мутации в двух высоко метилированных CGA-кодонах в экзоне 27 (кодоны R908 и R910) должны происходить, они не будут обладать выраженным патогенным эффектом, в связи со своим концевым расположением [17]. Так, Mitter D. с соавт. описали вариант в кодоне R910 (g.177008_177009dup), который был ассоциирован с неполной пенетрантностью [18].

Остальные рекуррентные мутации (миссенс и мутации сайтов сплайсинга) не могут быть объяснены статусом метилирования и, скорее всего, связаны с окружающими нуклеотидными последовательностями, строение которых способствует ошибкам репликации в этих участках [17].

В исследованной группе пациентов с ретинобластомой среди выявленных герминальных точковых замен и коротких делеций/инсерций обнаружено 5,2% (10/194) низкопенетрантных мутаций, которые не приводили к развитию заболевания у части их носителей в семьях (табл. 2). Как видно из табл. 2, опи-

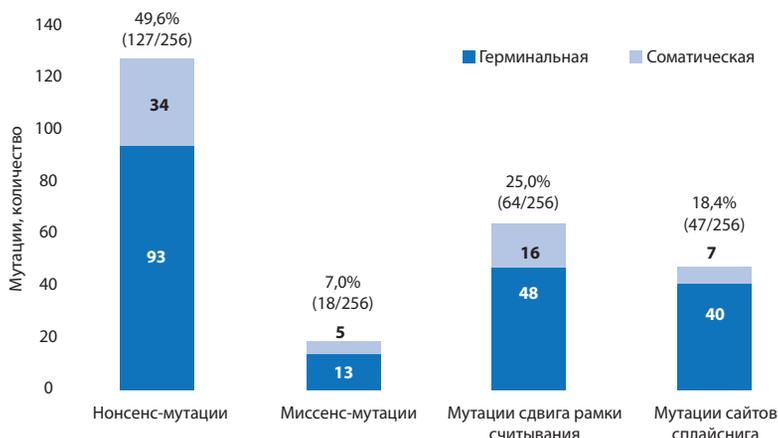


Рис. 1. Распределение мутаций, выявленных в гене *RBI* методом секвенирования нового поколения, по типам.

санные в настоящем исследовании низкопенетрантные мутации относились к миссенс-мутациям, мутациям сайтов сплайсинга, а также мутациям сдвига рамки считывания. Считается, что мутации сайтов

сплайсинга, миссенс-мутации и делеции/инсерции без сдвига рамки считывания не приводят к полной потере функции pRB, а лишь к уменьшению его нормального количества или частичной потере функции,

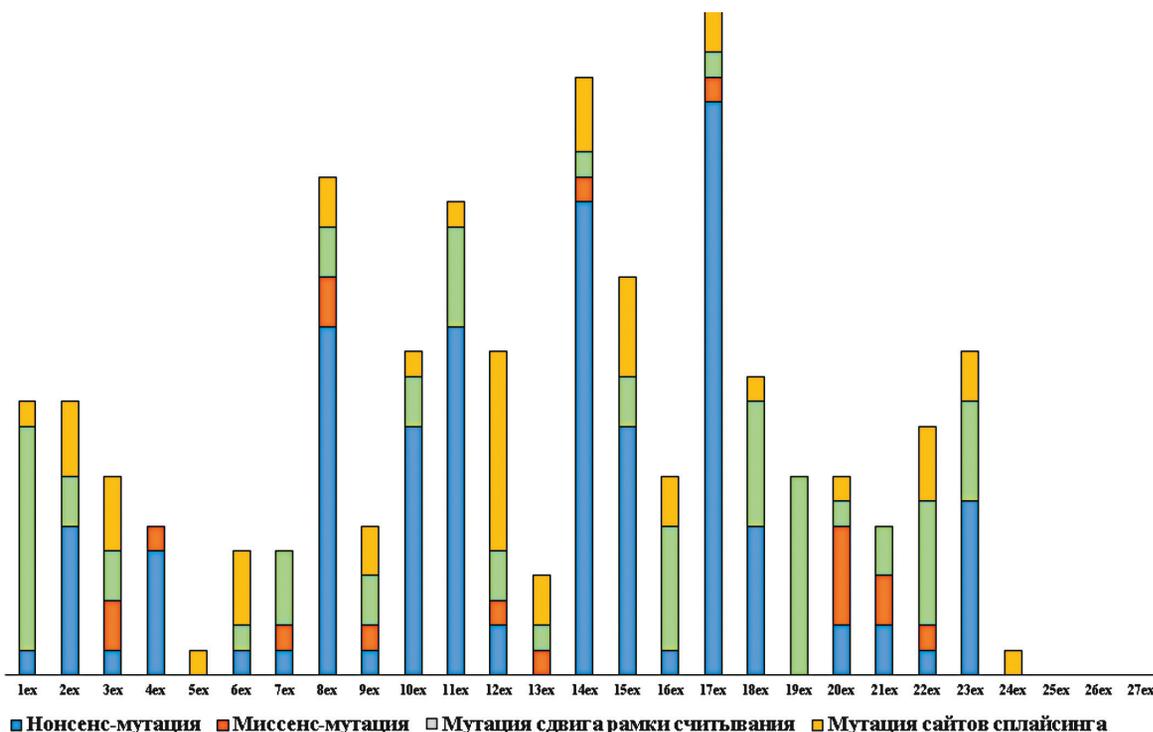


Рис. 2. Распределение по экзонам и спектр мутаций, обнаруженных в гене *RB1*, в исследованной группе пациентов.

Таблица 1

Рекуррентные мутации, выявленные в гене *RB1* в исследованной группе пациентов

Изменение, кДНК	Изменение, белок	Расположение	Частота
c.607+1G>A/C/T	—	6 интрон	1,6% (4/256)
c.751C>T	p.R251X	8 экзон	3,5% (9/256)
c.763C>T	p.R255X	8 экзон	2,0% (5/256)
c.958C>T	p.R320X	10 экзон	3,5% (9/256)
c.1072C>T	p.R358X	11 экзон	5,1% (13/256)
c.1215+1G>A/T	—	12 интрон	3,1% (8/256)
c.1333C>T	p.R445X	14 экзон	4,3% (11/256)
c.1363C>T	p.R455X	14 экзон	2,3% (6/256)
c.1399C>T	p.R467X	15 экзон	3,5% (9/256)
c.1654C>T	p.R552X	17 экзон	3,5% (9/256)
c.1666C>T	p.R556X	17 экзон	5,1% (13/256)
c.1735C>T	p.R579X	18 экзон	2,0% (5/256)
c.1981C>T	p.R661W	20 экзон	0,8% (2/256)
c.2359C>T	p.R787X	23 экзон	2,7% (7/256)

поэтому такие мутации могут приводить к развитию низкопенетрантной ретинобластомы в семьях [19]. Нами выявлено 2 мутации сдвига рамки считывания (с.45_76del; с.83del), расположенные в экзоне 1 и приводившие к развитию низкопенетрантной ретинобластомы в двух семьях. Вероятно, именно расположение в экзоне 1, устраняющее экспрессию более длинного слабо экспрессируемого транскрипта и сохраняющее экспрессию более короткого транскрипта, обеспечивает возможность таких мутаций проявляться как низкопенетрантные.

Среди выявленных низкопенетрантных мутаций, только три (с.607+1G>T, с.1981C>T, с.939G>A) описаны в литературе, как мутации, приводящие к развитию ретинобластомы с низкой пенетрантностью [6, 20, 21].

Среди выявленных методом секвенирования нового поколения мутаций 10,9% (28/256) определены в мозаичной форме, из них 64,3% (18/28) – нонсенс-мутации, 28,6% (8/28) – мутации сдвига рамки считывания, 7,1% (2/28) – мутации сайтов сплайсинга (табл. 3).

Протяженные делеции в гене RB1

Методом MLPA в группе 492 больных с ретинобластомой в гене RB1 выявлено 83 делеции различной протяженности, от частичных до делеций всего гена, из них 45,8% (38/83) – герминальные, 54,2% (45/83) – соматические (рис. 3). Среди выявленных

делеций 18,1% (15/83) были внутригенными, то есть включали от одного до нескольких экзонов в пределах гена RB1, 81,9% (68/83) – охватывали весь ген. Во всех случаях полной делеции гена RB1 также захватывались различной длины соседние прилежащие проксимальные и дистальные регионы (гены ENOX1, ITM2B и RCBTB2, DLEU1, PCDH8, соответственно).

Показано, что делеции генов, прилежащих к RB1, коррелируют с клиническими особенностями ретинобластомы [22, 23]. Так, делеция гена MED4, расположенного проксимальнее RB1, ассоциирована с более мягким фенотипом заболевания [24]. Ген MED4 играет ключевую роль в процессе клеточного выживания, поэтому его потеря совместно с RB1 может приводить к снижению пролиферации ретинобластов [25]. Предполагается, что ген PCDH8, расположенный дистальнее RB1, участвует в сигнальных путях и процессах клеточной адгезии в центральной нервной системе, тем самым его делеция совместно с RB1 приводит к задержке психомоторного развития у пациентов с ретинобластомой [24, 26]. Однако в работе Lan X. с соавт. описан пробанд с полной делецией гена RB1, охватывающей также гены ENOX1, MED4, ITM2B, RCBTB2 и DLEU1, с билатеральной формой ретинобластомы, что противоречит заключению о том, что MED4 может ингибировать пролиферацию ретинобластов [27]. Таким образом, требуется дальнейшее изучение генов,

Таблица 2

Мутации, приводящие к развитию ретинобластомы с низкой пенетрантностью

Тип мутации	Мутация
Миссенс-мутации	с.1573C>A; с.1364G>C; с.1981C>T;
Мутации сайтов сплайсинга	с.939G>A; с.1422-8delT; с.607+1G>T*; с.861G>C
Мутации сдвига рамки считывания	с.45_76del; с.83del

Примечание: * – мутация выявлена у двух пациентов.

Таблица 3

Мозаичные мутации, выявленные в исследованной группе больных с ретинобластомой

Тип мутации	Мутация (частоты аллелей)
Нонсенс-мутации	с.283A>T (A:79%, T:21%); с.1072C>T (C:76%, T:24%); с.1072C>T (C:83%, T:17%); с.1735C>T (C:79%, T:21%); с.751C>T (C:84%, T:16%); с.958C>T (C:80%, T:20%); с.1363C>T (C:74%, T:26%); с.1363C>T (C:20%, T:80%); с.2390T>A (T:85%, A:15%); с.234G>A (G:71%, A:29%); с.1399C>T (C:80%, T:20%); с.1072C>T (C:86%, T:14%); с.1333C>T (C:81%, T:19%); с.1399C>T (C:73%, T:27%); с.1072C>T (C:66%, T:34%); с.1666C>T (C:66%, T:34%); с.2359C>T (C:83%, T:17%); с.1333C>T (C:85%, T:15%)
Мутации сайтов сплайсинга	с.1215+1G>A (G:87%, A:13%); с.540-2A>G (A:61%, G:39%)
Мутации сдвига рамки считывания	с.295_296del (дт:90%, дел:10%); с.2326delC (дт:80%, дел:20%); с.1448_1449del (дт:78%, дел:12%); с.1421+1_1421+18del (дт:95%, дел:5%); с.1853del (дт:82%, дел:18%); 1935_1936del (дт:78%, дел:22%); с.2235_2239del (дт:85%, дел: 15%); ;с.2241dupG (дт:91%, инс:9%)

прилегающих к *RB1*, для корреляции их делеций с особенностями проявления ретинобластомы.

Спектр генетических изменений в гене *RB1* при билатеральной и унилатеральной формах ретинобластомы

В настоящем исследовании проведен анализ молекулярно-генетических изменений в гене *RB1* на материале ДНК лимфоцитов крови 492 неродственных пациентов с ретинобластомой, среди которых 38,2% (188/492) имели билатеральную форму заболевания и 61,8% (304/492) – унилатеральную.

В группе больных с билатеральной формой ретинобластомы мутация в ДНК лимфоцитов крови выявлена в 96,8% (182/188) случаев: 39,9% (75/188) случаев составили нонсенс-мутации, 24,5% (46/188) – мутации сдвига рамки считывания, 17,0 (32/188) – мутации сайтов сплайсинга, 12,8 (24/188) – протяженные делеции и 2,6% (5/188) – миссенс-мутации (рис. 4). У 4,7% (9/188) пациентов с билатеральной формой выявлена мутация в мозаичной форме, процент мутантного клона составлял от 10% до 39%.

Уровень выявления мутаций в гене *RB1* при билатеральной форме, составляющий 96,8%, соответствует данным, опубликованным в работах других групп исследователей [12, 15, 17, 27, 28, 29]. Одной из наи-

более вероятных причин невыявления мутаций может являться мозаицизм с очень низким содержанием мутантного клона (<5%), который можно обнаружить при секвенировании нового поколения только дополнительными биоинформатическими подходами [30]. Также выдвигаются гипотезы, что мутации в других генах могут приводить к развитию билатеральной ретинобластомы, однако подтверждения этому пока нет [15].

В группе больных с унилатеральной формой ретинобластомы мутация в ДНК лимфоцитов крови определена в 16,4% (50/304) случаев, что согласуется с результатами, опубликованными ранее [6, 12, 15]. 5,9% (18/304) случаев составили нонсенс-мутации, 4,6% (14/304) – протяженные делеции, 2,6% (8/304) – миссенс-мутации, 2,6% (8/304) – мутации сайтов сплайсинга, 0,7% (2/304) – мутации сдвига рамки считывания (рис. 4). Соматический мозаицизм при унилатеральной форме заболевания выявлен у 6,3% (19/304) пациентов. Дополнительно от 73 пациентов был доступен материал опухоли (28,8% (21/73) пациентов с билатеральной формой и 71,2% (52/73) – с унилатеральной). Спектр мутаций, выявленных в гене *RB1* в ДНК материала опухоли, включал: протяженные делеции – 42,1% (45/107), нонсенс-мутации – 31,8% (34/107), мутации сдвига рамки считывания – 14,9% (16/107), му-

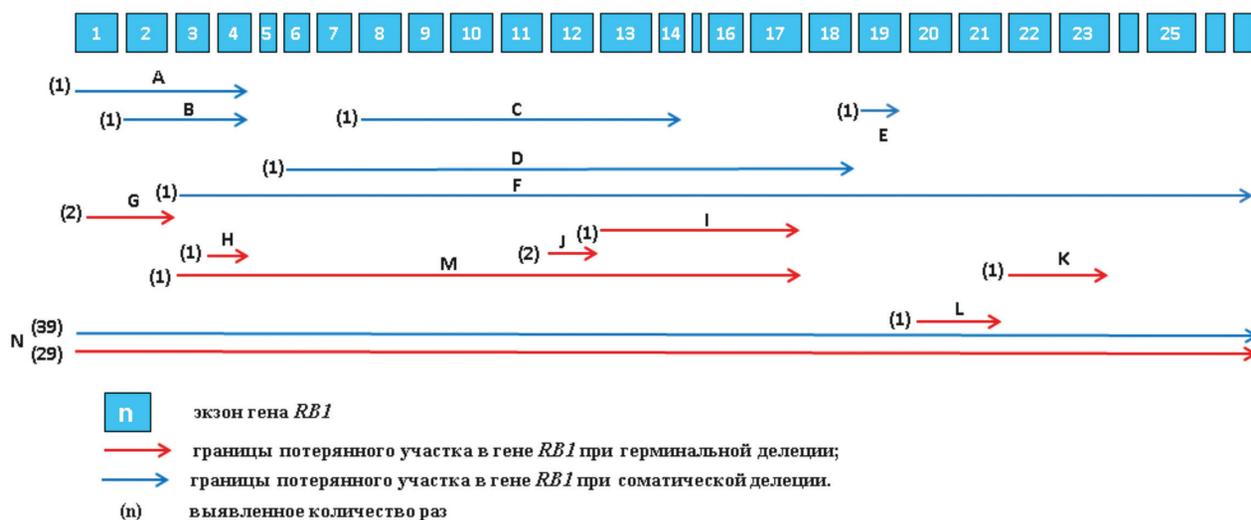


Рис. 3. Протяженные делеции гене *RB1*, выявленные в группе пациентов с ретинобластомой. А. 1/83 пациент с соматической делецией в гене *RB1* (экзоны 1-4); В. 1/83 пациент с соматической делецией в гене *RB1* (экзоны 2-4); С. 1/83 пациент с соматической делецией в гене *RB1* (экзоны 8-14); D. 1/83 пациент с соматической делецией в гене *RB1* (экзоны 6-18); E. 1/83 пациент с соматической делецией в гене *RB1* (экзон 19); F. 1/83 пациент с соматической делецией в гене *RB1* (экзоны 3-27); G. 2/83 пациента с герминальной делецией в гене *RB1* (экзон 1-интрон 2); H. 1/83 пациент с герминальной делецией в гене *RB1* (экзон 4); I. 1/83 пациент с герминальной делецией в гене *RB1* (экзоны 13-17); J. 2/83 пациента с герминальной делецией в гене *RB1* (экзон 12); K. 1/83 пациент с герминальной делецией в гене *RB1* (экзоны 22-23); L. 1/83 пациент с герминальной делецией в гене *RB1* (экзоны 20-21); M. 1/83 пациент с герминальной делецией в гене *RB1* (экзоны 3-17); N. 39/83 пациент с соматической делецией в гене *RB1* (экзоны 1-27); 29/83 пациент с герминальной делецией в гене *RB1* (экзоны 1-27).

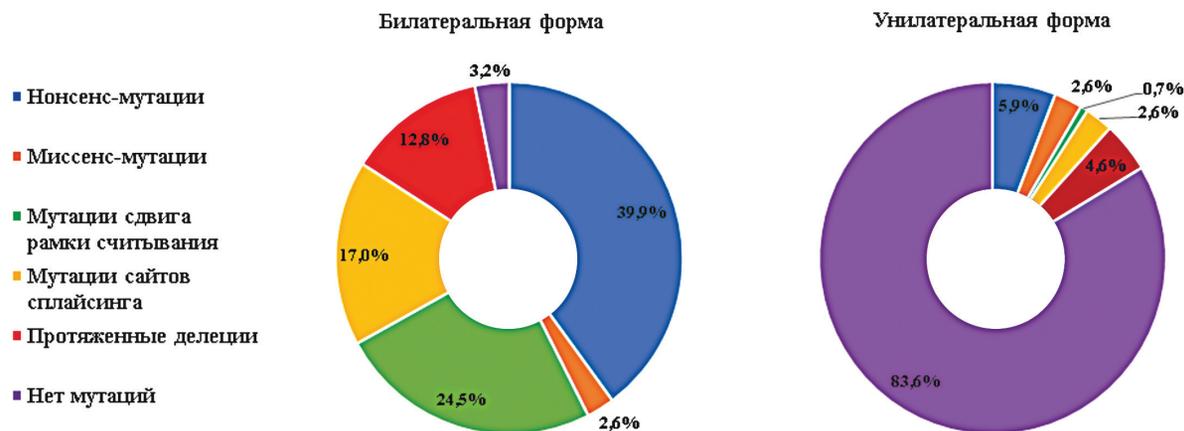


Рис. 4. Распределение и спектр мутаций в гене *RB1* при билатеральной и унилатеральной формах заболевания.

тации сайтов сплайсинга – 6,5% (7/107), миссенс-мутации – 4,7% (5/107).

При билатеральной форме заболевания мутации в обоих аллелях гена найдены в 61,9% (13/21) случаев, только одно мутационное событие – у 38,1% (8/21) пациентов. При унилатеральной форме ретинобластомы две мутации в гене *RB1* выявлены у 55,8% (29/52) пациентов, одна мутация – у 28,8% (15/52) и мутаций не было выявлено у 15,4% (8/52) пациентов.

Обнаружение лишь одного мутационного события в ДНК опухоли может быть связано с тем, что в нашем исследовании не изучалось метилирование промоторной области гена *RB1*, которое может являться одной из причин, приводящих к его инактивации [31]. Полное отсутствие мутаций в гене *RB1* в ткани опухоли в настоящее время объясняют вариантом ретинобластомы, который связан с соматической амплификацией гена *MYCN*. Пациенты с таким вариантом ретинобластомы (унилатеральная форма, *RB1* +/+ *MYCN* A), как правило, имеют более раннее начало заболевания, а опухоль характеризуется специфическими гистологическими особенностями и имеет меньше геномных изменений, характерных для классической ретинобластомы [32].

Во всех семейных случаях заболевания (22 семьи) выявлена герминальная патогенная мутация в гене *RB1* у пробанда и у одного (или нескольких) членов родословной.

Заключение

Таким образом, в настоящем исследовании описан полный спектр структурных изменений в гене *RB1* при ретинобластоме в группе российских пациентов. Нами показано, что применение комплексного под-

хода, включающего высокопроизводительное параллельное секвенирование и метод МЛРА, позволяет обнаружить изменения в гене *RB1* с высокой эффективностью. Типы мутаций, выявленные в исследованной группе, и их распределение существенно не отличаются от результатов других исследователей. Кроме того, требуются дальнейшие исследования тех случаев, когда не удастся выявить мутации в гене *RB1* современными подходами, что позволит расширить знания в этой области молекулярной генетики ретинобластомы.

Благодарности/Acknowledgements

Высокопроизводительное секвенирование ДНК выполнено на оборудовании Центра коллективного пользования (ЦКП) «Геном» ФГБНУ «МГНЦ».

We would like to thank the staff of the Shared Resource Centre «Genome» of FSBI RCMG for the help with sequencing.

Литература

1. Dimaras H., Corson T.W., Cobrinik D., White A., Zhao J., Munier F. et al. Retinoblastoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2015; 1: 15021. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.21>.
2. Kivela T. The epidemiological challenge of the most frequent eye cancer: retinoblastoma, an issue of birth and death. *Br J Ophthalmol*. 2009; 93; 1129-1131. <https://doi.org/10.1136/bjo.2008.150292>.
3. Li W.L., Buckley J., Sanchez-Lara P., Maglinte D.T., Viduetsky L., Vatarinova T.V. et al. A Rapid and Sensitive Next-Generation Sequencing Method to Detect *RB1* Mutations Improves Care for Retinoblastoma Patients and Their Families. *J Mol Diagn*. 2016; 18: 480-493. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.02.006>.
4. Soliman S.E., Racher H., Zhang C., MacDonald H., Gallie B. Genetics and Molecular Diagnostics in Retinoblastoma—An Update. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2017; 6 :197-207. <https://doi.org/10.22608/APO.201711>.
5. De Jong M.C., Kors W.A., de Graaf P., Castelijns J.A., Kivela T., Moll A.C. Trilateral retinoblastoma: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2014; 15: 1157-1167. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70336-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70336-5).

6. Tomar S., Sethi R., Sundar G., Quah T.C., Quah B.L., Lai P.S. Mutation spectrum of RB1 mutations in retinoblastoma cases from Singapore with implications management and counselling. *PLoS One*. 2017; 12: e0178776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178776>.
7. Lan X., Xu W., Tang W., Ye X., Song X., Lin L. et al. Spectrum of RB1 Germline Mutations and Clinical Features in Unrelated Chinese Patients With Retinoblastoma. *Front Genet*. 2020; 11: 142. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00142>.
8. McEvoy J.D. & Dyer A. Genetic and Epigenetic Discoveries in Human Retinoblastoma. *Crit Rev Oncog*. 2015; 20: 217-225. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.012>.
9. MacCarthy A., Bayne A.M., Brownbill P.A., Bunch K.J., Diggins N.L., Draper G.J. et al. Second and subsequent tumours among 1927 retinoblastoma patients diagnosed in Britain 1951–2004. *Br J Cancer*. 2013; 108: 2455–2463. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.228>.
10. Marees T., Moll A.C., Imhof S.M., de Boer M.R., Ringens P.J., van Leeuwen F.E. Risk of second malignancies in survivors of retinoblastoma: more than 40 years of follow-up. *J Nat Cancer Inst*. 2008; 100: 1771-1779. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn394>.
11. Mendoza P.R. & Grossniklaus H.E. The Biology of Retinoblastoma. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015; 134: 503-516. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.012>.
12. Price E.A., Price K., Kolkiewicz K., Hack S., Reddy M.A., Hungerford J.L. et al. Spectrum of RB1 mutations identified in 403 retinoblastoma patients. *J Med Genet*. 2013; 51: 208-214. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101821>.
13. Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А., Афанасьев А.А., Заклязьминская Е.В., Ребриков Д.В., Савостьянов К.В., Глотов А.С., Костарева А.А., Павлов А.Е., Голубенко М.В., Поляков А.В., Кушев С.И. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). Медицинская генетика. 2019;18(2):3-23
14. Алексеева Е.А., Бабенко О.В., Козлова В.М., Ушакова Т.Л., Саакян С.В., Танас А.С. и др. Результаты использования новой медицинской технологии комплексной ДНК-диагностики ретинобластомы. *Медицинская генетика* 2017; 16(10): 41-46.
15. Dommering C.J., Mol B.M., Moll A.C., Burton M., Cloos J., Dorsman J.C. et al. RB1 mutation spectrum in a comprehensive nationwide cohort of retinoblastoma patients. *J Med Genet*. 2014; Jun 51(6): 366-374. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102264>.
16. He M., An Y., Gao X., Qian X., Li G., Qian J. Screening of RB1 gene mutations in Chinese patients with retinoblastoma and preliminary exploration of genotype-phenotype correlations. *Mol Vis*. 2014; 20: 545-552. eCollection 2014.
17. Valverde J.R., Alonso J., Palacios I., Pestana A. RB1 gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in searchable database. *BMC Genet*. 2005; 53(6). <https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-53>.
18. Mitter D., Rushlow D., Nowak I., Ansperger-Rescher B., Gallie B.L., Lohmann D.R. Identification of a mutation in exon 27 of the RB1 gene associated with incomplete penetrance retinoblastoma. *Fam Cancer*. 2009; 8: 55-58. <https://doi.org/10.1007/s10689-008-9198-4>.
19. Harbour J.W. Molecular Basis of Low-Penetrance Retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 1699-1704. doi: 10.1001/archophth.119.11.1699.
20. Eloy P., Dehainault C., Sefta M., Aerts I., Doz F., Cassoux N. et al. A Parent-of-Origin Effect Impacts the Phenotype in Low Penetrance Retinoblastoma Families Segregating the c.1981C>T/p.Arg661Trp mutation of RB1. *PLoS Genet*. 2016 Feb; 12(2): e1005888. doi: 10.1371/journal.pgen.1005888.
21. Zhang K., Nowak I., Rushlow D., Gallie B.L., Lohmann D.R. Patterns of Missplicing Caused by RB1 Gene Mutations in Patients With Retinoblastoma and Association with Phenotypic Expression. *Hum Mutat*. 2008; 29(4): 475-484. <https://doi.org/10.1002/humu.20664>.
22. Albrecht P., Ansperger-Rescher B., Schuler A., Zeschnigk M., Gallie B., Lohmann D. R. Spectrum of gross deletions and insertions in the RB1 gene in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression. *Hum Mutat*. 2005; 26(5): 437–445. <https://doi.org/10.1002/humu.20234>.
23. Houdayer C., Gauthier-Villars M., Lauge A., Pages-Berhouet S., Dehainault C., Caux-Moncoutier V. et al. Comprehensive screening for constitutional RB1 mutations by DHPLC and QMPSF. *Hum Mutat*. 2004; 23 (2): 193–202. <https://doi.org/10.1002/humu.10303>.
24. Mitter D., Ullmann R., Muradyan A., Klein-Hitpass L., Kanber, D, Ounap, K, et al. Genotype-phenotype correlations in patients with retinoblastoma and interstitial 13q deletions. *Eur J Hum Genet*. 2011; 19 (9): 947–958. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.58>
25. Rimoin, A. W, Walker C. L, Chitale R. A, Hamza H. S, Vince, A, Gardovska, D. et al. Variation in clinical presentation of childhood group a streptococcalpharyngitis in four countries. *J Trop Pediatr*. 2008; 54 (5): 308–312. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmm122>.
26. Castera L., Dehainault C., Michaux D., Lumbroso-Le Rouic L., Aertsh I., Doz, F, et al. (2013). Fine mapping of whole RB1 gene deletions in retinoblastoma patients confirms PCDH8 as a candidate gene for psychomotor delay. *Eur. J.Hum. Genet*. 2013; 21(4): 460–464. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.186>
27. Lan X., Xu W., Tang X., Ye H., Song X., Lin L. et al. Spectrum of RB1 Germline Mutations and Clinical Features in Unrelated Chinese Patients With Retinoblastoma. *Front Genet*. 2020; 11: 142. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00142>.
28. Parma D., Ferrer M., Luce L., Giliberto F., Szijan I. RB1 gene mutations in Argentine retinoblastoma patients. Implications for genetic counseling. *PloS One*. 2017. 12 (12), e0189736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189736>.
29. Chen Z., Moran K., Richards-Yutz J., Toorens E., Gerhart D., Ganguly T. et al. Enhanced sensitivity for detection of low-level germline mosaic RB1 mutations in sporadic retinoblastoma cases using deep semi-conductor sequencing. *Hum Mutat*. 2014; 35: 384–91. <https://doi.org/10.1002/humu.22488>.
30. Алексеева Е.А., Карандашева К.О., Бпбенко О.В., Козлова В.М., Ушакова Т.Л., Казубская Т.П. и др. Соматический мозаицизм при спорадической ретинобластоме. *Медицинская генетика*. 2021; 20(4):9-18. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2021.04.9-18>.
31. McEvoy J., Dyer M.A. Genetic and Epigenetic Discoveries in Human Retinoblastoma. *Crit Rev Oncog*. 2015; 20(3-4): 217-225. <https://doi.org/10.1615/critrevoncog.2015013711>.
32. Rushlow D.E., Mol B.M., Kennett J.Y., Yee S., Pajovic S., The'riault B.L. et al. Characterisation of retinoblastomas without RB1 mutations: Genomic, gene expression, and clinical studies. *Lancet Oncol*. 2013; 14: 327–334. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70045-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70045-7).

References

1. Dimaras H., Corson T.W., Cobrinik D., White A., Zhao J., Munier F. et al. Retinoblastoma. *Nat Rev Dis Primers*. 2015; 1: 15021. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.21>.
2. Kivela T. The epidemiological challenge of the most frequent eye cancer: retinoblastoma, an issue of birth and death. *Br J Ophthalmol*. 2009; 93; 1129-1131. <https://doi.org/10.1136/bjo.2008.150292>.
3. Li W.L., Buckley J., Sanchez-Lara P., Maglinte D.T., Viduetsky L., Vatarinova T.V. et al. A Rapid and Sensitive Next-Generation Sequencing Method to Detect RB1 Mutations Improves Care for Retinoblastoma Patients and Their Families. *J Mol Diagn*. 2016; 18: 480-493. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.02.006>.
4. Soliman S.E., Racher H., Zhang C., MacDonald H., Gallie B. Genetics and Molecular Diagnostics in Retinoblastoma—An Update. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2017; 6 :197–207. <https://doi.org/10.22608/APO.201711>.
5. De Jong M.C., Kors W.A., de Graaf P., Castelijns J.A., Kivela T., Moll A.C. Trilateral retinoblastoma: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2014; 15: 1157-1167. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70336-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70336-5).
6. Tomar S., Sethi R., Sundar G., Quah T.C., Quah B.L., Lai P.S. Mutation spectrum of RB1 mutations in retinoblastoma cases from Sin-

- gapore with implications management and counselling. *PLoS One*. 2017; 12: e0178776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178776>.
7. Lan X., Xu W., Tang W., Ye X., Song X., Lin L. et al. Spectrum of *RB1* Germline Mutations and Clinical Features in Unrelated Chinese Patients With Retinoblastoma. *Front Genet*. 2020; 11: 142. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00142>.
 8. McEvoy J.D. & Dyer A. Genetic and Epigenetic Discoveries in Human Retinoblastoma. *Crit Rev Oncog*. 2015; 20: 217–225. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.012>.
 9. MacCarthy A., Bayne A.M., Brownbill P.A., Bunch K.J., Diggins N.L., Draper G.J. et al. Second and subsequent tumours among 1927 retinoblastoma patients diagnosed in Britain 1951–2004. *Br J Cancer*. 2013; 108: 2455–2463. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.228>.
 10. Marees T., Moll A.C., Imhof S.M., de Boer M.R., Ringens P.J., van Leeuwen F.E. Risk of second malignancies in survivors of retinoblastoma: more than 40 years of follow-up. *J Nat Cancer Inst*. 2008; 100: 1771–1779. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn394>.
 11. Mendoza P.R. & Grossniklaus H.E. The Biology of Retinoblastoma. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015; 134: 503–516. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2015.06.012>.
 12. Price E.A., Price K., Kolkiewicz K., Hack S., Reddy M.A., Hungerford J.L. et al. Spectrum of *RB1* mutations identified in 403 retinoblastoma patients. *J Med Genet*. 2013; 51: 208–214. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101821>.
 13. Ryzhkova O.P., Kardymon O.L., Prohorchuk E.B., Kononov F.A., Maslennikov A.B., Stepanov V.A., Afanasyev A.A., Zaklyazminskaya E.V., Rebrikov D.V., Savostianov K.V., Glotov A.S., Kostareva A.A., Pavlov A.E., Golubenko M.V., Polyakov A.V., Kutsev S.I. Rukovodstvo po interpretatsii dannyykh posledovatel'nosti DNK cheloveka, poluchennykh metodami massovogo parallel'nogo sekvenirovaniya (MPS) (redaktsiya 2018, versiya 2) [Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2)]. *Medit-sinskaya genetika [Medical genetics]*. 2019; 18(2): 3–24 (In Russ.) <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.02.3-24>.
 14. Alekseeva E.A., Babenko O.V., Kozlova V.M., Ushakova T.L., Saakyan S.V., Tanas A.S., Nemtsova M.V., Strelnikov V.V., Zaletayev D.V. Rezul'taty ispol'zovaniya novoy meditsinskoy tekhnologii kompleksnoy DNK-diagnostiki retinoblastomy [The results of the use of new medical technology for comprehensive DNA analysis in retinoblastoma]. *Medit-sinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2017; 16(10):41–46. (In Russ.)
 15. Dommering C.J., Mol B.M., Moll A.C., Burton M., Cloos J., Dorsman J.C. et al. *RB1* mutation spectrum in a comprehensive nationwide cohort of retinoblastoma patients. *J Med Genet*. 2014; Jun 51(6): 366–374. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102264>.
 16. He M., An Y., Gao X., Qian X., Li G., Qian J. Screening of *RB1* gene mutations in Chinese patients with retinoblastoma and preliminary exploration of genotype-phenotype correlations. *Mol Vis*. 2014; 20: 545–552. eCollection 2014.
 17. Valverde J.R., Alonso J., Palacios I., Pestana A. *RB1* gene mutation up-date, a meta-analysis based on 932 reported mutations available in searchable database. *BMC Genet*. 2005; 53(6). <https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-53>.
 18. Mitter D., Rushlow D., Nowak I., Ansperger-Rescher B., Gallie B.L., Lohmann D.R. Identification of a mutation in exon 27 of the *RB1* gene associated with incomplete penetrance retinoblastoma. *Fam Cancer*. 2009; 8: 55–58. <https://doi.org/10.1007/s10689-008-9198-4>.
 19. Harbour J.W. Molecular Basis of Low-Penetrance Retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 1699–1704. doi: 10.1001/archophth.119.11.1699.
 20. Eloy P., Dehainault C., Sefta M., Aerts I., Doz F., Cassoux N. et al. A Parent-of-Origin Effect Impacts the Phenotype in Low Penetrance Retinoblastoma Families Segregating the c.1981C>T/p.Arg661Trp mutation of *RB1*. *PLoS Genet*. 2016 Feb; 12(2): e1005888. doi: 10.1371/journal.pgen.1005888.
 21. Zhang K., Nowak I., Rushlow D., Gallie B.L., Lohmann D.R. Patterns of Missplicing Caused by *RB1* Gene Mutations in Patients With Retinoblastoma and Association with Phenotypic Expression. *Hum Mutat*. 2008; 29(4): 475–484. <https://doi.org/10.1002/humu.20664>.
 22. Albrecht P., Ansperger-Rescher B., Schuler A., Zeschnigk M., Gallie B., Lohmann D. R. Spectrum of gross deletions and insertions in the *RB1* gene in patients with retinoblastoma and association with phenotypic expression. *Hum Mutat*. 2005; 26(5): 437–445. <https://doi.org/10.1002/humu.20234>.
 23. Houdayer C., Gauthier-Villars M., Lauge A., Pages-Berhouet S., Dehainault C., Caux-Moncoustier V. et al. Comprehensive screening for constitutional *RB1* mutations by DHPLC and QMPSF. *Hum Mutat*. 2004; 23 (2): 193–202. <https://doi.org/10.1002/humu.10303>.
 24. Mitter D., Ullmann R., Muradyan A., Klein-Hitpass L., Kanber, D, Ounap, K, et al. Genotype-phenotype correlations in patients with retinoblastoma and interstitial 13q deletions. *Eur J Hum Genet*. 2011; 19 (9): 947–958. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.58>
 25. Rimoin, A. W, Walker C. L, Chitale R. A, Hamza H. S, Vince, A, Gardovska, D. et al. Variation in clinical presentation of childhood group a streptococcalpharyngitis in four countries. *J Trop Pediatr*. 2008; 54 (5): 308–312. <https://doi.org/10.1093/tropej/ fmm122>.
 26. Castera L., Dehainault C., Michaux D., Lumbroso-Le Rouic L., Aertsh I., Doz, F, et al. (2013). Fine mapping of whole *RB1* gene deletions in retinoblastoma patients confirms *PCDH8* as a candidate gene for psychomotor delay. *Eur. J Hum. Genet*. 2013; 21(4): 460–464. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.186>
 27. Lan X., Xu W., Tang X., Ye H., Song X., Lin L. et al. Spectrum of *RB1* Germline Mutations and Clinical Features in Unrelated Chinese Patients With Retinoblastoma. *Front Genet*. 2020; 11: 142. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00142>.
 28. Parma D., Ferrer M., Luce L., Gilliberto F., Szijan I. *RB1* gene mutations in Argentine retinoblastoma patients. Implications for genetic counseling. *PLoS One*. 2017. 12 (12), e0189736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189736>.
 29. Chen Z., Moran K., Richards-Yutz J., Toorens E., Gerhart D., Ganguly T. et al. Enhanced sensitivity for detection of low-level germline mosaic *RB1* mutations in sporadic retinoblastoma cases using deep semi-conductor sequencing. *Hum Mutat*. 2014; 35: 384–91. <https://doi.org/10.1002/humu.22488>.
 30. Alekseeva E.A., Karandasheva K.O., Babenko O.V., Kozlova V.M., Ushakova T.L., Kazubskaya T.P., Tanas A.S., Zaletaev D.V., Strelnikov V.V. Somaticheskij mozaisizm pri sporadicheskoj retinoblastome [Somatic mosaicism in sporadic retinoblastoma]. *Medit-sinskaya genetika [Medical Genetics]*. 2021;20(4):9–18. (In Russ.) <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2021.04.9-18>.
 31. McEvoy J., Dyer M.A. Genetic and Epigenetic Discoveries in Human Retinoblastoma. *Crit Rev Oncog*. 2015; 20(3–4): 217–225. <https://doi.org/10.1016/critrevoncog.2015013711>.
 32. Rushlow D.E., Mol B.M., Kennett J.Y., Yee S., Pajovic S., The 'riault B.L. et al. Characterisation of retinoblastomas without *RB1* mutations: Genomic, gene expression, and clinical studies. *Lancet Oncol*. 2013; 14: 327–334. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70045-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70045-7).