

CARACTERISTICAS MOLECULARES DEL GEN SUPRESOR TUMORAL RB1

ALEJANDRA L. BOQUETE

Hospital Municipal de Oncología María Curie, Buenos Aires

Resumen El gen supresor tumoral RB1 se encuentra involucrado en la aparición de varias neoplasias, siendo la más conocida el retinoblastoma, en la cual generalmente se encuentra deletado. Es de particular interés el estudio de este gen debido a su relación con la regulación del ciclo celular y a que es el blanco molecular de muchas oncoproteínas virales, las cuales al unirse a su producto proteico inhiben su capacidad de frenar la progresión a través del ciclo celular. Por eso esta revisión trata de analizar sus características moleculares, a los fines de identificar sus mutaciones y efectuar el consejo genético a las familias con individuos afectados de retinoblastoma.

Palabras clave: RB1, retinoblastoma, gen supresor tumoral

Las células tumorales poseen daño genético, siendo este último de dos tipos: dominante, en el cual los blancos afectados son conocidos como protooncogenes y recesivo en el cual los blancos afectados son conocidos como genes supresores de tumores, genes supresores del crecimiento, oncogenes recesivos o antioncogenes. El daño dominante resulta en la ganancia de una función, mientras que las lesiones recesivas causan pérdida de una función¹.

En general, alteraciones genéticas tales como mutaciones puntuales y/o deleciones, resultan más frecuentemente en la pérdida de una función (antioncogenes), dichas alteraciones contribuyen a la oncogénesis por interferir en los mecanismos que restringen la multiplicación celular, mientras que mutaciones de protooncogenes que llevan a la ganancia de una función, producen señales positivas anormales que conducen a la proliferación celular indiscriminada².

En este trabajo, se analizará uno de los genes involucrados en la provisión de señales negativas para el comportamiento y proliferación celular,

estas señales pueden operar de distintas formas, regulando temporalmente la salida del ciclo celular, o bien promoviendo la diferenciación celular. Se hará referencia en particular al antioncogén «RB1», el cual se halla involucrado en varias neoplasias², entre ellas el retinoblastoma, osteosarcomas, sarcomas esporádicos y sarcomas derivados de retinoblastomas familiares, además de una gran fracción de carcinomas de pulmón a células pequeñas³, carcinomas de vejiga, mama², carcinoma de próstata, leucemias, carcinomas de cérvix^{4,5} y glioblastomas⁶.

Retinoblastoma

El retinoblastoma es un tumor maligno de la retina en desarrollo (retinoblastos), se manifiesta como una neoplasia intraocular cuya incidencia es de 1/12.000. Se presenta bajo dos formas, cerca del 40% de los casos «forma hereditaria»⁷, el tumor es bilateral, con múltiples focos en cada ojo; el retinoblastoma bilateral es frecuentemente diagnosticado en recién nacidos. En el resto de los casos «forma esporádica, no hereditaria» de esta patología, los tumores son unilaterales, con un solo foco tumoral, siendo de presentación más tardía que en el caso anterior, alrededor de los dos años de edad⁸⁻⁹.

Recibido: 12-VIII-1996

Aceptado: 24-I-1997

Dirección postal: Dra. Alejandra L. Boquete, Llavallol 1748, 1407 Buenos Aires Aires, Argentina

Las características de la forma hereditaria del retinoblastoma, implica que los individuos afectados heredan un alelo mutado (línea germinal), y posteriormente un evento somático en células de la retina, inactiva al otro alelo normal heredado del otro progenitor. La frecuencia del evento somático mutacional es relativamente alta, y esto conduce a una aparente herencia dominante. La forma esporádica del tumor involucra dos eventos mutacionales somáticos sucesivos, el segundo de los cuales debería ocurrir en la progenie derivada de la célula que recibió la primera mutación, esta combinación es rara, y los tumores aparecen en forma tardía y son generalmente únicos.

La idea de que las bases moleculares del retinoblastoma involucraban mutaciones recesivas, que producían la pérdida de la función fue impulsada por el hallazgo de casos de tumores múltiples, que poseían una delección constitucional en células somáticas de la banda 13q14,1, además de que en las formas esporádicas ocasionalmente se habrían encontrado también delecciones de la banda 13q14. El gen involucrado en esta patología es el antioncogén RB1, el cual mapea en la región 13q14, que se encuentra mutado (generalmente delecionado) en ambos alelos en estos tumores^{2, 9, 10}.

La proteína pRB1, codificada por el gen RB1, no solamente se expresa en retinoblastos, sino que además se encuentra en otros tejidos.

La confirmación de que esta patología está asociada con la delección del mencionado gen, fue demostrada por la ausencia de expresión de la proteína pRB1 en líneas celulares de retinoblastoma.

Muchos tipos de lesiones genéticas parecen estar involucradas en la inactivación del locus RB1, grandes delecciones ocurren en el 30% de los retinoblastomas, mientras que mutaciones que afectan el procesamiento del RNAm resultan en la delección de un exón, también se han hallado mutaciones puntuales, corrimiento del marco de lectura, formación de un nuevo codón stop⁵, así como pequeñas delecciones que produjeron alteraciones del promotor².

Todas estas mutaciones tienen en común la alteración o eliminación de dos regiones de la proteína RB, localizadas, entre los residuos aminoacídicos 393-572 y 646-772. Esas dos regiones parecen formar el sitio de unión para las

interacciones con una gran variedad de proteínas virales y celulares⁵.

Es probable que el locus RB posea un patrón tejido específico de expresión y de regulación del desarrollo, debido a que el único tumor que parece tener una frecuencia incrementada de incidencia en casos de retinoblastoma familiar es el osteosarcoma².

Mecanismos moleculares de pRB1

Fosforilación y relación con el ciclo celular

El gen de RB1 codifica para una fosfoproteína nuclear de 105-110 KDa, esta diversidad de pesos moleculares se observa en geles de SDS poliacrilamida⁵, (relacionado con el grado de fosforilación) además por medio de la técnica de Western Blot se han observado cinco bandas diferentes de 110 a 116 KDa⁸. En la literatura algunos autores la citan como p105RB² y otros como p110RB⁸⁻⁹.

Esta proteína ha sido hallada en distintos estados de fosforilación regulados por el ciclo celular, siendo máxima cerca del comienzo de la fase S, y mínima luego de la mitosis y posterior ingreso a G1². En G0 y G1 la proteína sin fosforilar bloquea la progresión hacia la fase S (punto de restricción), por estar unida al factor transcripcional E2F en su dominio de transactivación¹⁰, cuando pRB1 es fosforilada por medio de kinasas del ciclo celular, se libera al factor transcripcional permitiéndole así, activar la transcripción génica necesaria para la progresión a través del ciclo celular²⁻⁹. Esta fosforilación sería llevada a cabo en G1 tardío/S por una kinasa y luego defosforilada en M tardío por medio de una fosfatasa (proteínofosfatasa tipo 1)¹¹. Estos hallazgos sugieren que pRB1 podría actuar como un regulador del ciclo celular⁶.

La kinasa responsable de esta fosforilación es la cdc2 kinasa¹¹⁻¹³, debido a que se han hallado en pRB1, sitios consenso de fosforilación por p34-cdc2 en serinas (LRSPYK) y treoninas (QRTPRK), adyacentes a prolinas y dentro de un contexto de aminoácidos básicos²⁻⁵⁻¹¹⁻¹⁴.

En ausencia de pRB1 las células no son detenidas en G1 y ocurre la proliferación celular, en este estadio las células aún no son malignas.

Mayor confirmación de que la fosforilación de pRB1, constituye un evento crítico en la prolife-

ración celular, proviene de la demostración de que el estímulo de células T quiescentes (Go) conduce a la fosforilación de pRB1, mientras que la diferenciación de células hematopoyéticas está asociada a la hipofosforilación².

La interacción proteica mejor caracterizada es la de RB1 con el factor transcripcional E2F¹⁵.

Este ha sido caracterizado como una proteína de aproximadamente 60 KDa, que presenta un dominio de unión al DNA del tipo «Helix-Loop-Helix», localizado cerca del aminoterminal, adyacente a una región básica, que reconoce la siguiente secuencia consenso; 5'-TTTSSCGC-3'(donde S = C o G)¹⁶. Esta secuencia ha sido hallada en promotores de genes cuyos productos son necesarios para el ingreso a la fase S⁶; tales como la DNA polimerasa, ribonucleótido reductasa, C-Myc, timidilato sintasa, timidina kinasa, dihidrofolatoreductasa y C-Myb^{4, 6, 16, 17}. El dominio de transactivación de E2F está ubicado en el carboxilo terminal y se superpone con la región requerida para la unión a la proteína RB1.

El complejo RB/E2F se encuentra predominantemente en G1 y S, dicho complejo puede ser disociado por la presencia de oncoproteínas virales; E1A de adenovirus, Antígeno T large de SV40 y proteína E7 de papiloma virus^{6, 9, 18}.

Interacción de pRB1 con proteínas virales oncogénicas

El producto proteico E1A, oncoproteína de 243 aminoácidos⁵ del adenovirus compleja con pRB1, también el antígeno T large del oncovirus SV40, compuesto de 708 residuos aminoácídicos, una pRB1, dichas interacciones son esenciales para la transformación producida por SV40 y por adenovirus, en este último caso ocurre a través de los residuos aminoácídicos 121-139 sobre la proteína E1A⁵, que muestra conservación de secuencia con una región en las proteínas transformadas de SV40, poliovirus, virus BK y papiloma virus.

Notoriamente las proteínas E7 de los papiloma virus no oncogénicos también unen pRB1 con menos afinidad, que en el caso del HPV-16 y HPV-18 oncogénicos.

La unión de pRB1 al antígeno T Large de SV40 está regulada por fosforilación, sólo la forma hipofosforilada de pRB1, una antígeno T Large de SV40^{2, 5, 12, 14}.

Las tres oncoproteínas virales (antígeno T large de SV40, E7 de papiloma y E1A de adeno-

virus) poseen una secuencia «LXCXE» necesaria para interactuar con pRB1 (donde X representa cualquier aminoácido)^{6, 8, 12, 18, 19}.

Las proteínas transformantes de los virus DNA tumorales, pueden actuar al menos en parte, complejando e inactivando a la proteína hipofosforilada. Tales ideas han sido sustentadas por la observación de que el gen RB1 que sufrió mutaciones puntuales, habría codificado una proteína que no pudo ser fosforilada, dichas mutaciones si bien no destruyen los sitios potenciales de fosforilación, alteran el sitio de unión al antígeno T large de SV40, esta alteración puede deberse a cambios conformacionales, que hacen a la proteína resistente a la fosforilación¹⁸.

Ciertas oncoproteínas virales, tales como, E1A y Antígeno T large de SV40, pueden unirse a pRB1 no fosforilada desplazar de la unión a los factores transcripcionales, activando de esta forma la transcripción. Los sitios de unión a oncoproteínas pRB1 (aminoácidos 393-572 y 646-772) coinciden con las posiciones de las mutaciones naturales en el gen RB1, sugiriendo que esos dominios proteicos son importantes para el funcionamiento normal de pRB1⁹.

Modelos animales con deficiencias de la proteína RB y ratones transgénicos

Han sido creados ratones heterocigotas para un alelo nulo de RB (Rb-/+), éstos proveen un modelo animal de herencia de alelos RB inactivos. Los ratones que heredaron un alelo RB mutado no desarrollaron retinoblastoma, pero en su lugar aparecieron tumores de hipófisis, dichos tumores habían perdido el alelo no mutado restante de RB⁶⁻⁸.

Los embriones homocigotas Rb -/-, obtenidos mediante la cruce de dos ratones heterocigotas Rb +/-, morían a partir de los días 12 a 15 de gestación, por lo cual la completa inactivación de RB fue la responsable de la letalidad embrionaria, lo que sugiere que la función de RB es necesaria para el desarrollo normal^{4, 8, 20}. El análisis de los embriones antes del día 16 de gestación reveló defectos en el desarrollo neuronal y hematopoyético, con un aumento de la presencia de eritrocitos nucleados inmaduros en el hígado^{6, 8, 17}. Los ratones transgénicos que incorporaban múltiples copias del gen RB humano además de tener sus dos alelos normales de RB murino, mostraron una disminución estadísticamente sig-

nificativa del peso corporal y del tamaño¹⁷, demostrando que la sobreexpresión de RB causó retardo en el crecimiento a nivel de todo el organismo²⁰.

Rol de RB en la diferenciación celular

Se ha analizado la expresión de RB en varios tejidos embrionarios de ratón por medio la técnica de Northern Blot, observándose que RB comienza a expresarse el décimo día de gestación, los niveles más altos de expresión fueron hallados en cerebro e hígado. Fue detectada la expresión de la proteína RB durante los días 17 y 18 de gestación en fetos de ratón por inmunofluorescencia, hallándose niveles elevados de RB en hígado fetal, osteoblastos, músculo esquelético, neuronas y células gliales del sistema nervioso central.

La diferenciación muscular es inducida y mantenida principalmente por la proteína básica, «Helix-Loop-Helix»; Myo-D, que requiere la interacción con RB¹⁹, para llevar a cabo estas actividades, debido a que es esencial para arrestar a las células en ciclo celular e inducir la expresión de genes específicos durante la diferenciación miogénica⁶.

Estructura y función del GEN RB1

El gen se extiende 180 Kb y contiene 27 exones es transcrito en un RNAm de 4,7 Kb, el cual se expresa en todos los tejidos⁹. El gen RB está conservado entre los vertebrados, el humano presenta una homología con el ratón del 91% a nivel aminoacídico, dicha homología se extiende también a la región promotora⁶. El marco de lectura abierto codifica para 928 aminoácidos y a partir de allí se predijo un peso molecular de 106 KDa. El extremo 5', que está dirigido hacia el centrómero, carece de TATA box, pero contiene una secuencia rica en CpG no metilada (isla CpG), característica de los genes constitutivos (house keeping genes)^{8, 9}.

La longitud de los exones oscila desde 31 nucleótidos en el exón 24, hasta 1889 bases en el exón 27, este último contiene el codón stop y las señales de poliadenilación. El exón 1 contiene la primera metionina y secuencias 5' no traducidas correspondientes a la región promotora⁸.

Características del promotor del gen RB1

Existe evidencia de que la expresión de RB1 es regulada a nivel transcripcional, posiblemente por un feedback autoregulatorio. El promotor de RB1 contiene sitios potenciales de unión para cuatro factores de transcripción, con los cuales pRB1 puede interaccionar: E2F, ATF-2, SP1 y la proteína de unión RCE.

Se sabe que durante la embriogénesis de ratón la expresión de RB1 está diferencialmente regulada en diferentes sistemas de órganos y entre distintos tipos celulares dentro del mismo tejido. La secuenciación de la región 5' del gen, no revela la presencia de TATAbox. Se han encontrado familias con retinoblastoma con mutaciones en los sitios SP1 y ATF a -197 y -188 Pb, lo cual produjo la inactivación de la actividad promotora.

La transcripción por RNA polimerasa II en promotores que carecen de TATAbox se inicia cerca de los sitios SP1, en las regiones ricas en GC, que unen el factor ETF necesario para estabilizar el complejo de iniciación²¹.

Estructura de la proteína RB

Existen al menos 4 dominios descritos en la proteína RB; un dominio amino terminal, dominio A y dominio B, estos últimos dos constituyen el «A/B o bolsillo RB», y un dominio cerca del carboxilo terminal, el cual es requerido para la supresión del crecimiento. La región mejor caracterizada es el «Bolsillo RB», conteniendo desde el aminoácido 394 al 571 (dominio A) y desde el 649 al 773 (dominio B), en esta región se unen varias proteínas virales (ej. antígeno T large de SV40) y el factor transcripcional E2F²², estos dominios globulares que unen oncoproteínas virales han sido mapeados por mutagénesis de delección del carboxiterminal, dichas regiones son críticas para varias actividades de RB incluyendo la fosforilación durante la fase G1 del ciclo celular, la unión a factores transcripcionales y la supresión del crecimiento en cultivos celulares²³.

Los dominios A y B además presentan una gran similitud de secuencia con dos factores de transcripción generales, el TBP (TATA binding protein) y el TF IIB respectivamente. La habilidad

de RB para interaccionar con varios factores transcripcionales puede ser explicada en base a esta similitud estructural con TBP y TF IIB^{15, 19}.

Notablemente dentro del dominio B existe el subdominio TR, el cual se encuentra presente también en ciclinas y en el factor transcripcional II B, este subdominio define a una superfamilia de proteínas reguladoras nucleares. Sin embargo, la expresión del bolsillo RB no es suficiente para la supresión del crecimiento, se requiere una secuencia adicional del carboxiterminal, la región comprendida desde el aminoácido 803 al 841 que se une a la proteína E7 en la región conservada 3, y de esa manera al unirse la proteína E7 del papilomavirus, se bloquea la unión de E2F a RB1, independientemente de la presencia del bolsillo RB. Dicha región (E7 binding domain), también es capaz de unirse a la tirosina quinasa c-Abl a través de su región de unión a ATP, actuando como un inhibidor de su actividad tirosina quinasa²².

RB es una fosfoproteína nuclear que se une al DNA doble cadena de manera no específica, la actividad de unión al DNA es intrínseca de la región carboxiterminal compuesta de alrededor de 300 aminoácidos. Por medio del análisis de la secuencia de RB por computadora, se predice una estructura terciaria conteniendo varios dominios globulares y una cola hidrofílica. Aunque los dos dominios globulares N-terminales no poseen una actividad biológica conocida hasta ahora, se sabe que cuando la proteína RB intacta es corrida en un gel en condiciones no desnaturizantes migra bajo la forma de oligómeros, propiedad no compartida con p56^{RB} un derivado truncado a nivel del N-terminal²³.

Detección de alteraciones moleculares

Deleciones submicroscópicas y otras alteraciones estructurales groseras, pueden ser detectadas por Southern Blot, debido a que es muy infrecuente el hallazgo de patrones de bandas anormales, se hace necesario el análisis cuantitativo por medio de la densitometría de las señales autorradiográficas obtenidas. Por medio del Southern blot cualitativo y cuantitativo se pueden llegar a detectar mutaciones germinales en el 15% de los pacientes. Muchas mutaciones germinales son demasiado pequeñas para poder ser detectadas por esta metodología, por lo que

se hace necesario recurrir a otras técnicas; para deleciones como de 1pb puede realizarse PCR de cortos fragmentos génicos y posterior electroforesis en geles de poliacrilamida, pequeñas deleciones comprenden el 35% de las mutaciones germinales. Las mutaciones puntuales existen en aproximadamente el 50% de los pacientes con retinoblastoma hereditario y pueden ser analizadas por el ensayo de protección de RNasa, PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) y por secuenciación de los segmentos génicos amplificados⁹.

Discusión

La mayoría de los retinoblastomas ocurren debido a mutaciones de novo, de esta manera cada individuo afectado posee una sola de una gran variedad de mutaciones diferentes, que se producen independientemente. La mutación afecta solamente a un locus dentro del genoma, y puede ser tan pequeña como la sustitución de un pb, a pesar de que el locus afectado éste constituido por miles de pb. En pocos casos familiares, la segregación del gen causante de la enfermedad puede ser seguida indirectamente por medio de marcadores de ligamiento polimórficos.

La búsqueda de las mutaciones en RB1 no es simple debido a su gran tamaño (200 Kb), y a su compleja estructura (27 pequeños exones). Hasta ahora se asume que las mutaciones de novo se encuentran dispersas a lo largo de todo el gen, y que no existe una zona en especial del gen particularmente involucrada en dichas mutaciones. El diagnóstico presintomático de familiares de pacientes no es aún efectivo en la mayoría de los casos por no poder identificar la mutación causante de la patología^{7, 24, 25, 26, 27}.

Por este motivo, se debe realizar un gran número de análisis de DNA, para detectar la mutación ocurrida en cada individuo en particular, y la de sus familiares inmediatos. Una vez identificada la mutación en particular, es posible determinar el riesgo que poseen los familiares de los pacientes. Los resultados así obtenidos son valiosos para el consejo genético de las familias. Por lo tanto, es posible asegurarles a los miembros no afectados, que no portan el alelo mutado y que en consecuencia su progenie no presenta un riesgo elevado de presentar tumores hereditarios.

Estos análisis establecen varios puntos importantes para el consejo genético:

1) Si la mutación fue detectada en el DNA constitucional del paciente, se trata de una mutación de origen germinal, por lo tanto la futura progenie del paciente posee un 50% de probabilidad de heredar una sola copia del gen mutado que predispone al retinoblastoma u otros tumores relacionados.

2) Si la mutación fue detectada en el DNA del tumor, pero no en el DNA de linfocitos de sangre periférica (DNA constitucional), esto sugiere una forma no hereditaria de la enfermedad, lo que significa que se han producido dos eventos inactivantes del gen RB1 en los retinoblastos, esto generalmente conduce a retinoblastomas unilaterales. La mayoría de los retinoblastomas unilaterales (60-75%), no son hereditarios, mientras que el 25-40 restante sí lo son²⁸.

Summary

Molecular characteristics of RB1 tumor suppressor gene

RB1 tumor suppressor gene is implicated in the development of some malignancies, among which retinoblastoma is the most common; in this tumor RB1 gene is generally deleted. This gene is closely associated to the cell cycle regulation and it constitutes a molecular binding target of viral oncoproteins, which inhibits its protein product, thus interrupting cell cycle progression. This paper describes its molecular features, in order to identify its mutations.

Bibliografía

1. Bishop M. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991; 64: 235-48.
2. Marshall C. Tumor suppressor genes. *Cell* 1991; 64: 313-326.
3. Knudson A. All in the cancer family. *Nature Genetics*. 1993; 5: 103-4.
4. Helin K, Harlow E. The retinoblastoma protein as a transcriptional repressor. *Trends Cell Biol* 1993; 3: 43-6.
5. Levine AJ. The tumor suppressor genes. *Ann Rev Biochem* 1993; 62: 623-51.
6. Wiman K. The retinoblastoma gene in cell cycle control and cell differentiation. *Faseb J* 1993; 7: 841-5.
7. Yandell D, Campbell T, Dayton S, et al. Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: their application to genetic counseling. *N Engl J Med* 1989; 321: 1689-95.
8. Goodrich D, Lee W. Molecular characterization of the retinoblastoma susceptibility gene. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1155: 43-61.
9. Horsthemke B. Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 63: 1-3.
10. Hunter T. Oncogenes and the cell cycle. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 1-4.
11. DeCaprio JA, Furukawa Y, Aichebaum F, Griffin JD. The retinoblastoma-susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 1795-8.
12. Manfredi J, Prives C. The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198: 65-83.
13. Draetta G. Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. *TIBS* 1990; 15: 378-83.
14. Weinberg R. The retinoblastoma gene and cell growth control. *TIBS* 1990; 15: 199-202.
15. Hagemeyer C, Cook A, Kouzarides T. The retinoblastoma protein binds E2F residues required for activation in vivo and TBP binding in vitro. *N.A.R.* 1993; 21: 4998-5004.
16. Farnham P, Slansky J, Kollman R. The role of E2F in the mammalian cell cycle. *Biochim Biophys. Acta* 1993; 1155: 125-31.
17. Hollingsworth R, Hensley C, Lee W. Retinoblastoma protein and the cell cycle. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 55-62.
18. Morán E. DNA tumor virus transforming protein and the cell cycle. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 63-70.
19. Kouzarides T. Transcriptional regulation by the retinoblastoma protein. *Trends Cell Biol* 1993; 3: 211-3.
20. Shan B, Chang C, Jones D, Lee W. The transcription factor E2F-1 mediates the autoregulation of RB gene expression. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 299-309.
21. Montgomery Gill R, Hamel PA, Jiang Z, Zacksenhaus E, Gallie BL, Phillips RA. Characterization of the human RB1 promoter and of elements involved in transcriptional regulation. *Cell Growth Differentiation*; 1994; 5: 467-74.
22. Picksley S, Lane D. p53 and Rb: their cellular roles. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6: 853-8.
23. Riley D, Lee E, Lee W. The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10: 1-29.
24. Blanquet V, Gross M, Turleau C, Senamaud-Beauford C, Doz F, Besmond C. Three novel germline mutations in exons 8 and 18 of the retinoblastoma gene. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1185-6.
25. Blanquet V, Turleau C, Gross M, Goossens M, Besmond C. Identification of germline mutations in the RB1 gene by denaturant gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction direct sequencing. *Hum Mol Genet* 1993; 975-9.
26. Onadim Z, Hykin P, Hungerford J, Cowell J. Genetic counseling in retinoblastoma: importance of ocular fundus examination of first degree relatives and linkage analysis. *Br J Ophthalmol* 1991; 75: 147-50.
27. Yandell D, Thaddeus P. Detection of DNA Sequence polymorphisms by enzymatic amplification and direct genomic sequencing. *Am J Hum Genet* 1989; 45: 547-55.
28. Knudson A. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci* 1971; 68: 820-3.