

**Università degli Studi di Roma “Sapienza”**



**Dottorato di Ricerca in Genetica Medica – XXIV Ciclo**

*Direttore Prof.ssa Paola Grammatico*

**Tesi Sperimentale**

**“BASI BIOLOGICHE DELLE CARDIOPATIE CONGENITE”**

Dottoranda

*Dottr.ssa Federica Consoli*

Relatore

*Prof. Antonio Pizzuti*

Co-Relatore

*Dott. Alessandro De Luca*

Anno Accademico 2010-2011

## Indice

INTRODUZIONE GENERALE .....	5
LE CARDIOPATIE CONGENITE (CC).....	5
Lo sviluppo del cuore .....	5
Embriologia Dello Sviluppo Cardiaco .....	6
Meccanismi genetici dello sviluppo cardiaco.....	11
Fattori di trascrizione nella cardiogenesi .....	13
Genetica delle Cardiopatie Congenite .....	21
Applicazione delle Genetica Molecolare allo Studio delle Cardiopatie Congenite .....	21
Basi genetiche delle cardiopatie congenite .....	22
OBIETTIVI DELLA TESI.....	29
PARTE 1 .....	30
BASI GENETICHE DELLE CARDIOPATIE CONGENITE ISOLATE.....	30
1-Studio delle basi genetiche della Trasposizione delle Grandi arterie .....	30
Introduzione .....	30
Asimmetria Sinistro-Destra .....	35
Obiettivi.....	37
Pazienti e Metodi.....	38
Lavoro Sperimentale .....	39
Risultati e Discussione.....	45
2-Ruolo della connessina 43 nel difetto cardiaco Criss-Cross.....	50
Introduzione .....	50
Obiettivo.....	52

Reclutamento dei pazienti e valutazione clinica .....	53
Analisi mutazionale .....	54
Risultati e discussione .....	55
3-Studio del mosaicismo somatico nelle cardiopatie congenite isolate (CC) .....	56
Introduzione .....	56
Obiettivi.....	61
Pazienti e Metodi.....	62
Risultati e discussione .....	65
4-Ampliamento dello spettro delle CC associate alla delezione /duplicazione 1q21.1 .....	68
Introduzione .....	68
Pazienti e Metodi.....	71
Analisi clinica della famiglia.....	71
Analisi genetica .....	72
Pazienti con Stenosi della valvola polmonare isolata.....	72
Test Genetico.....	73
Risultati.....	74
Analisi genetica della famiglia .....	74
Analisi genetica nella casistica di PVS isolate.....	75
Discussione .....	77
PARTE 2 .....	79
LE CARDIOPATIE CONGENITE NELLA SINDROME DI NOONAN E SINDROMI CORRELATE .....	79
Introduzione .....	79
Il pathway di RAS/MAPK .....	80
Correlazioni genotipo-fenotipo delle RASopatie.....	83
Il pathway di RAS nei tumori .....	86
Il gene casitas B-lineage Lymphoma (CBL; MIM 165360) .....	86

Pazienti e Metodi.....	89
Risultati e discussione .....	91
Analisi fenotipica dei pazienti mutati in CBL.....	95
Analisi funzionale delle mutazioni.....	98
Discussione.....	100
DISCUSSIONE GENERALE.....	102
PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE ORIGINATE DA QUESTA TESI .....	106
BIBLIOGRAFIA.....	108

## **INTRODUZIONE GENERALE**

### **LE CARDIOPATIE CONGENITE (CC)**

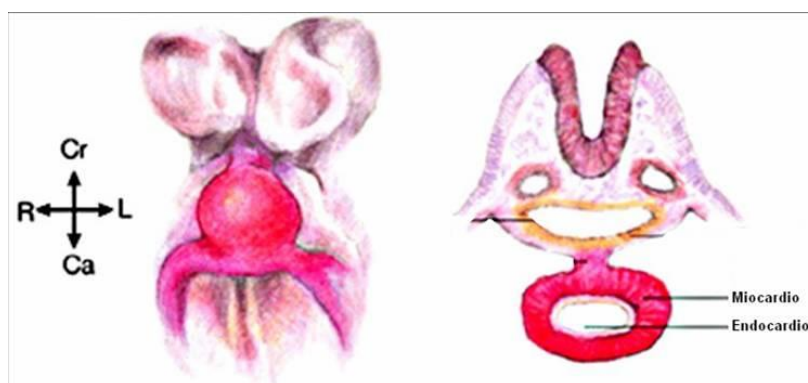
Le cardiopatie congenite (CC) sono difetti strutturali e/o funzionali del cuore. Il termine CC comprende le malformazioni cardiache, le cardiomiopatie e le aritmie cardiache. Le malformazioni cardiache, con una prevalenza alla nascita di circa 4-6 per 1000 nati vivi (Hoffman e Kaplan, 2002; Moller et al., 1993), sono una causa frequente di mortalità neonatale ed infantile. Le CC possono essere classificate sulla base della lesione anatomo-patologica o al meccanismo attraverso il quale originano durante lo sviluppo embrionale. È possibile quindi distinguere i seguenti tipi di CC: i difetti del setto o del canale atrioventricolare (CAV), atriale (DIA) e ventricolare (DIV); i difetti troncoconali (TC); le lesioni ostruttive del cuore destro; le lesioni ostruttive del cuore sinistro, eterotassie e i difetti delle vene polmonari. La classificazione patogenetica delle CC introdotta da Clark (Clark et al., 1996) raggruppa invece questi difetti in base ai possibili meccanismi morfogenetici: anomalie da difetto di migrazione ectomesenchimale, come le malformazioni troncoconali e i difetti dell'arco aortico; le anomalie da difetto dell'emodinamica intracardiaca, come i difetti settali e le malformazioni ostruttive del cuore destro e sinistro; le anomalie da morte cellulare, come i difetti settali e le anomalie valvolari; le anomalie della matrice extracellulare, come il CAV; le anomalie della crescita direzionata, come il ritorno venoso polmonare anomalo e il cor triatriatum; le anomalie della loop e del situs, come le sindromi eterotassiche con isomerismo atriale e le discordanze atrioventricolari. I recenti progressi nel campo della genetica delle CC stanno consentendo di riclassificare su base molecolare una parte di queste patologie, che dimostrano un elevato grado di eterogeneità genetica (fenotipi simili che originano da mutazioni in loci diversi). Allo stesso tempo, sta emergendo che fenotipi considerati nosologicamente distinti sono dovuti a mutazioni dello stesso gene (mutazioni alleliche associate a quadri clinici diversi).

#### ***Lo sviluppo del cuore***

L'elevata suscettibilità dell'uomo a sviluppare anomalie cardiache è in parte riconducibile alla complessità dello sviluppo embrionale cardiaco. Infatti, la cardiogenesi è il risultato di numerosi eventi molecolari e morfogenetici non ancora del tutto noti, che coinvolgono molti segnali molecolari sia cardiaco-specifici, sia segnali provenienti da tessuti embrionali extra-cardiaci adiacenti.

### **Embriologia Dello Sviluppo Cardiaco**

Nei vertebrati, il cuore è uno dei primi organi a svilupparsi (Sadler, 2002). Il sistema cardiovascolare appare a metà della terza settimana, quando la sola diffusione del sangue (o circolazione semplice) non è più in grado di soddisfare il fabbisogno nutritivo dell'embrione. Il cuore origina dal mesoderma antero-laterale, subito dopo la gastrulazione, a partire un'area cardiogenica formata da cellule progenitrici cardiache situate nella cavità pericardica. In seguito al ripiegamento cefalo-caudale dell'embrione, le cellule progenitrici migrano lungo la linea ventrale mediana e si fondono formando un tubo lineare: il tubo primitivo cardiaco. (Fig. 1).



*Figura 1. Rappresentazione schematica del tubo cardiaco. A: Tubo cardiaco secondo l'asse cranio-caudale dell'embrione; B: Sezione longitudinale del tubo cardiaco secondo l'asse cranio-caudale.*

Questa struttura è costituita da uno strato endoteliale interno, l'endocardio, ed uno strato muscolare esterno, il miocardio, a sua volta circondato dall'epicardio, da cui origineranno le arterie coronarie. Il tubo primitivo cardiaco sporge dalla cavità pericardica e durante lo sviluppo continua ad allungarsi assumendo una forma a spirale destrorsa, grazie a un movimento rotazionale comunemente noto come "looping". Durante questo processo, la porzione cefalica del tubo (o porzione troncoconale) si piega verso destra in direzione ventrale, mentre la porzione caudale (atriale) si sposta verso sinistra in direzione dorso-craniale. Questa rotazione dà origine all'ansa cardiaca. In questo stadio, lungo l'asse cranio-caudale cardiaco, si possono distinguere diverse regioni, che daranno origine a diverse strutture: il troncocono, che formerà il tratto d'efflusso dei ventricoli; il bulbo cardiaco, da cui avrà origine il ventricolo

destro; il ventricolo primitivo, che si differenzierà nel ventricolo sinistro; ed infine un atrio primitivo comune che si dividerà in due camere, atrio destro e sinistro (Fig. 2).

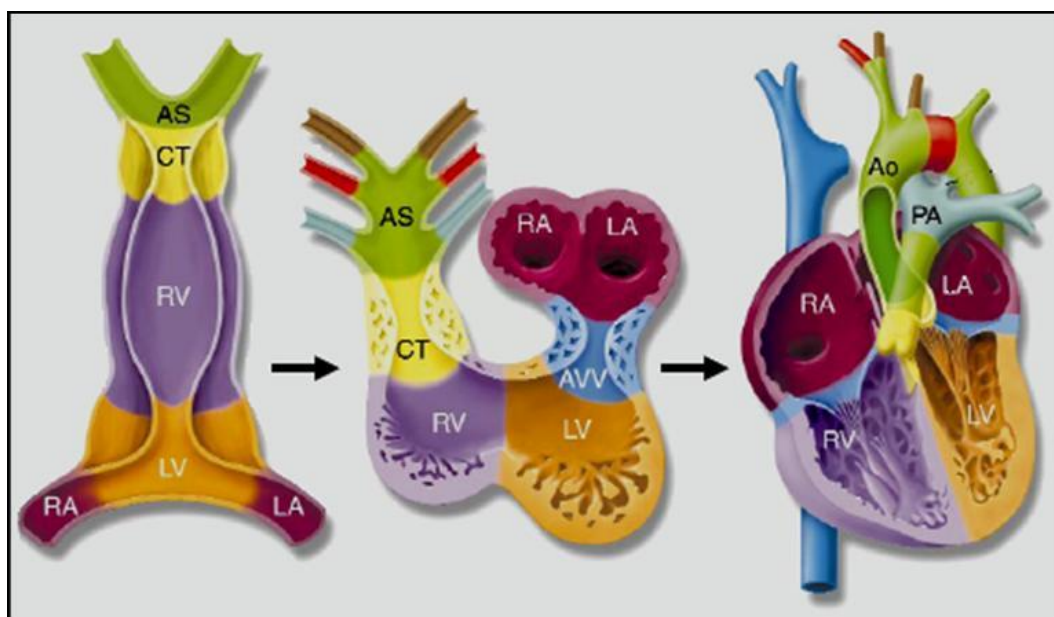
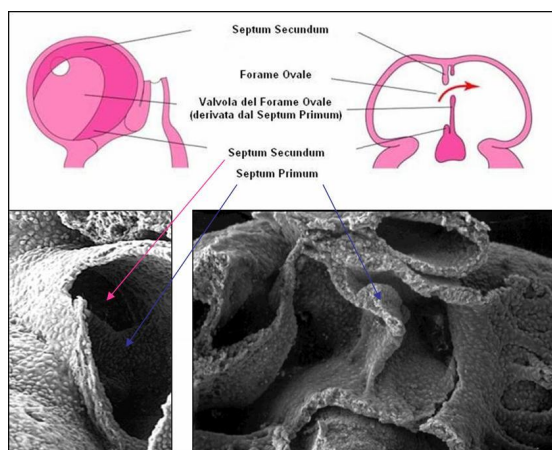


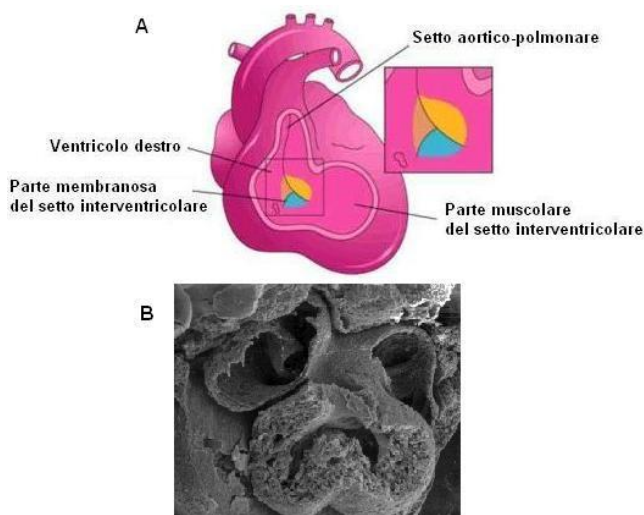
Figura 2. Rappresentazione schematica della rotazione del tubo cardiaco primitivo per dare origine alle quattro camere. AS: sacco aortico; TC: troncocono; RV: ventricolo destro; LV: Ventricolo sinistro; RA: atrio destro; LA: atrio sinistro; AVV: valvola atrioventricolare.

All'esterno della cavità pericardica, l'atrio comune primitivo prosegue nel seno venoso, che riceve il sangue venoso dai corni del seno destro e sinistro. Dal corno destro originano la vena cava inferiore e superiore, mentre dal corno sinistro il seno coronario, canale comune di drenaggio delle vene coronarie. Nei punti in cui le vene confluiscono nel cuore si formano le valvole venose. In seguito alla formazione delle camere e all'allineamento con i vasi maggiori, il tubo primitivo cardiaco dà origine ad un cuore a quattro camere mediante la formazione dei setti interatriale, interventricolare e atrioventricolare. Le strutture settali cardiache originano dai cuscinetti endocardici, che si sviluppano mediante proliferazione cellulare e deposizione di matrice extracellulare da parte delle cellule mesenchimali delle pareti delle regioni atrioventricolari e troncoconali. In seguito alla fusione di questi tessuti, si vengono a formare i setti interatriale e interventricolare, i setti atrioventricolari e i setti del troncocono. La separazione dei due atri, destro e sinistro, dipende dallo sviluppo e dal riassorbimento di un setto primitivo (*septum primum*) che è seguito dallo sviluppo, alla sua destra, del *septum secundum*, contenente il forame ovale, necessario per il passaggio del sangue fetale dall'atrio destro a quello sinistro, eludendo il circolo polmonare non ancora funzionante (Fig. 3).

La formazione del setto interatriale si conclude solo alla nascita: la circolazione polmonare determina infatti un aumento della pressione sanguigna nell'atrio sinistro, che contribuisce a comprimere la valvola del forame ovale contro il *septum secundum*, obliterando il forame stesso e separando definitivamente l'atrio destro da quello sinistro. Il setto interventricolare deriva dal setto muscolare interventricolare, che si forma mediante la fusione delle pareti medialì dei ventricoli primitivi in seguito all'ispessimento del miocardio e alla formazione di diverticoli e trabecole al loro interno (Fig. 4).



*Figura 3. Raffigurazione schematica del septum primum e del septum secundum*



*Figura 4. Rappresentazione schematica del setto interventricolare (A) e corrispondente immagine al microscopio elettronico a scansione (B).*

Inizialmente rimane una piccola apertura tra il setto e i cuscinetti endocardici fusi, nota come forame interventricolare, che successivamente viene chiusa con la fusione del tessuto del cuscinetto endocardio atrioventricolare inferiore, lungo l'apice del setto muscolare



interventricolare, alle adiacenti porzioni del setto del cono. In seguito alla chiusura del forame interventricolare, questa diventa la parte membranosa del setto. Contemporaneamente, si viene a formare il setto del canale atrioventricolare, attraverso la fusione dei cuscinetti endocardici atrioventricolari superiore ed inferiore, separando il canale in due orifizi atrioventricolari, destro e sinistro (Fig. 5). Dopo la fusione dei cuscinetti endocardici, ciascun orifizio viene circondato da tessuto mesenchimale, dal quale si formano le valvole atrioventricolari. Alla fine di questo processo, le valvole sono costituite da lembi di tessuto connettivo denso, rivestito da endocardio, e collegate alle trabecole della parete ventricolare mediante le corde tendinee. Nel canale atrioventricolare sinistro si costituiscono due lembi valvolari, la valvola bicuspide o mitrale; mentre in quello destro si definiscono tre lembi, la valvola tricuspide. A livello del troncocono si formano due setti: il setto aorto-polmonare ed il setto del cono. Il primo, che divide il tronco comune in due canali, aortico (aorta ventrale) e polmonare (arteria polmonare), ha un andamento spiraliforme, ed origina dalla proliferazione e fusione delle cellule mesenchimali delle creste (rigonfiamenti del tronco o cuscinetti), che derivano dalle pareti (superiore destra ed inferiore sinistra) del tronco (Fig. 6).

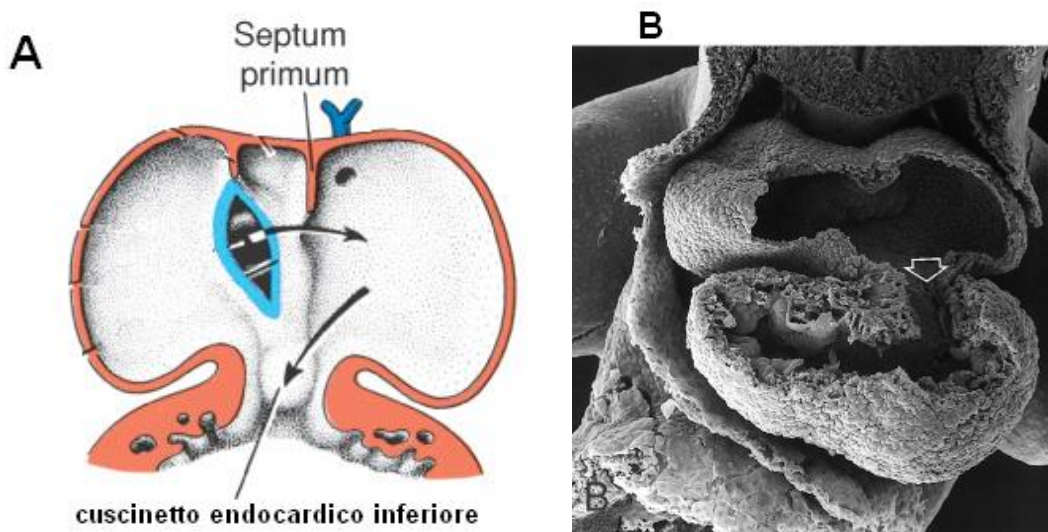
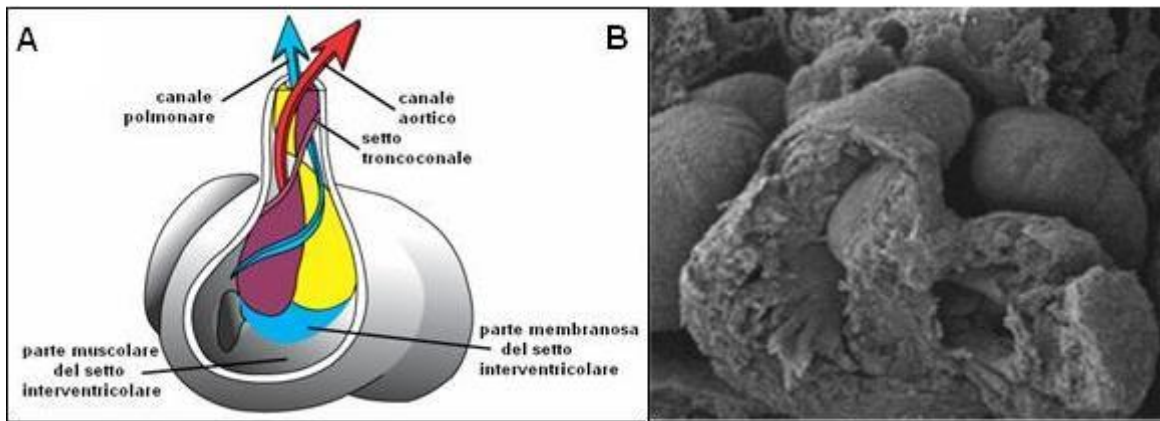


Figura 5. Rappresentazione schematica del canale atrioventricolare (A) e corrispondente immagine al microscopio elettronico a scansione (B).



*Figura 6. Rappresentazione schematica del setto troncoconale (A) e corrispondente immagine al microscopio elettronico a scansione (B).*

Il setto del cono separa invece il cono cardiaco in una porzione anterolaterale e in una porzione posterolaterale, che corrispondono rispettivamente ai coni d'efflusso del ventricolo destro e del ventricolo sinistro. Quando la divisione del tronco è quasi completa, a partire dai cuscinetti endocardici del tronco iniziano a formarsi le valvole semilunari polmonari, che hanno la funzione di ostacolare il reflusso del sangue che fuoriesce dal ventricolo destro. Nello stesso modo si forma la valvola aortica, che impedisce al sangue di refluire nel ventricolo sinistro.

Contemporaneamente alla settazione del tratto d'efflusso, inizia la formazione del sistema di conduzione primitivo, costituito dal nodo del seno, dal nodo atrioventricolare e dalle vie di conduzione ventricolari (fascio di His) (fig. 7). Il sistema di conduzione primitivo si forma per lo più a partire dalle cellule del canale atrioventricolare. La formazione del sistema di conduzione, mediante specificazione delle suddette cellule, avviene in uno stadio precoce, durante il processo di modellamento del tubo cardiaco stesso, ed è guidato da un meccanismo di segnalazione paracrina diretto alle cellule miocardiche.

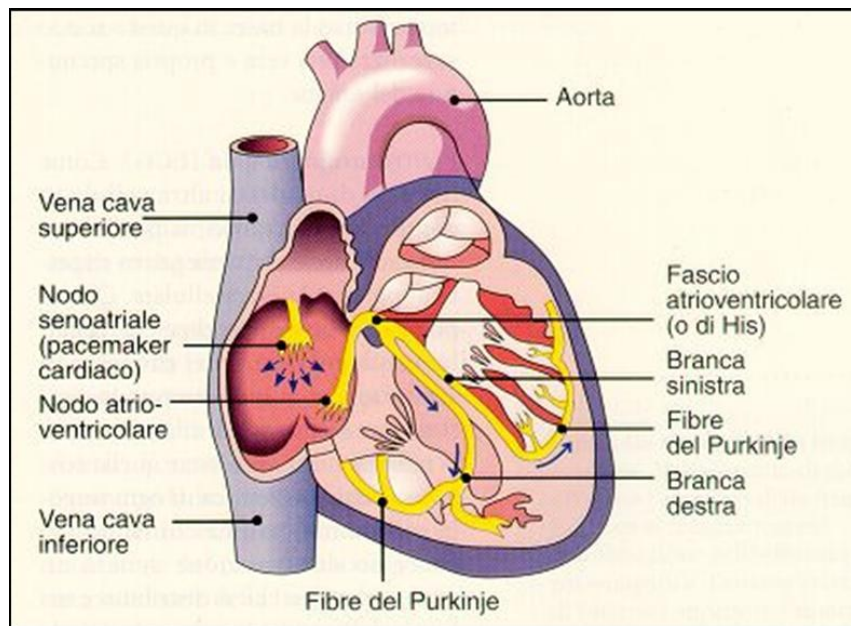


Figura 7. Rappresentazione schematica del sistema di conduzione cardiaco

### **Meccanismi genetici dello sviluppo cardiaco**

Lo sviluppo del cuore comprende numerosi eventi molecolari e morfogenetici, che non sono completamente noti, anche a causa della loro complessità molecolare. Sono numerosi i fattori di trascrizione che regolano l'induzione della cardiogenesi, il differenziamento cardiaco e la specificazione delle differenti strutture all'interno del cuore in formazione. Il cuore si sviluppa seguendo un'organizzazione modulare, in cui ogni segmento si sviluppa in modo indipendente grazie ad uno specifico pattern di espressione genica, che implica la combinazione e l'interazione di diversi fattori di trascrizione. Ciò può spiegare perché generalmente le CC colpiscano solo determinati segmenti del cuore.

L'induzione del differenziamento cardiaco è progressivo e strettamente dipendente dai processi di formazione e strutturazione (*"patterning"*) dell'embrione stesso e dai movimenti della gastrulazione (Harvey, 2002). Infatti, i tessuti embrionali adiacenti al mesoderma, dai quali origina il cuore, forniscono i segnali molecolari responsabili dell'induzione della cardiogenesi, dell'espressione di geni cardiaco-specifici e di segnali stimolanti la migrazione e la proliferazione cellulare (Fig. 8).

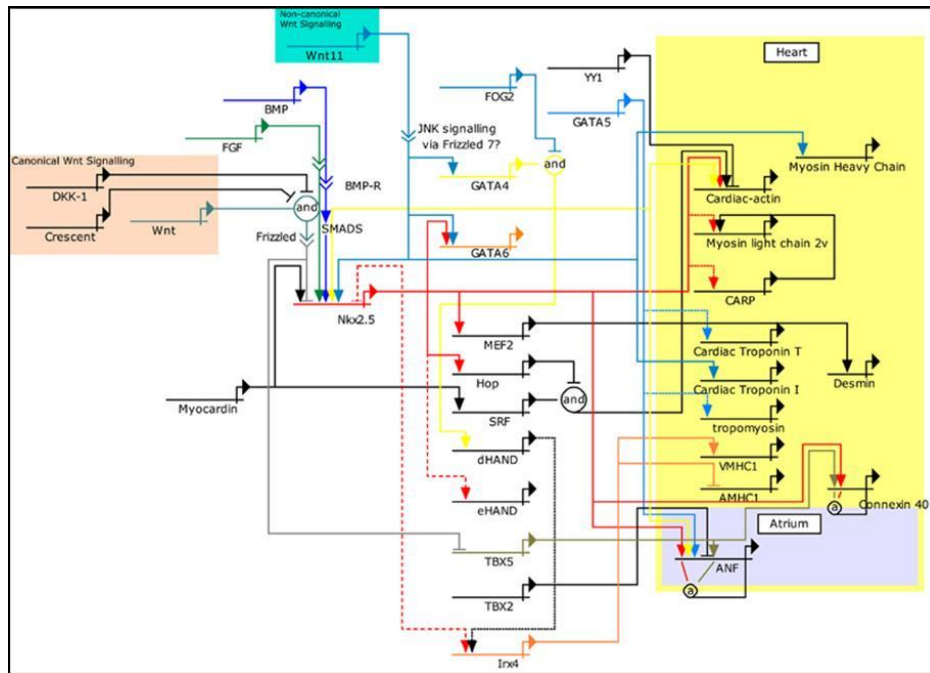


Figura 8. Pathways embrionali coinvolti nello sviluppo del cuore.

I segnali molecolari sono soprattutto le proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs), i membri della famiglia dei fattori di crescita dei fibroblasti (FGFs) e le proteine della famiglia Wnt. L'equilibrio tra le cascate di segnale scatenati da questi fattori delimita la regione competente per il differenziamento cardiaco (Bruneau, 2003). In particolare, la proteina BMP2 e il fattore FGF8, secreti dall'endoderma faringeo adiacente al mesoderma cardiaco, agiscono sui progenitori delle cellule cardiache: BMP2 induce l'espressione del gene *NKX2.5*, che codifica per un fattore di trascrizione specifico per il differenziamento cardiaco e necessario alla morfogenesi del cuore; FGF8 promuove invece la proliferazione e la migrazione delle cellule progenitrici che risiedono nell'area cardiogenica.

Il cuore origina da due popolazioni cellulari distinte che ad uno stato presomitico risiedono nel mesoderma splanchnico della placca laterale dell'embrione. Queste due popolazioni cellulari sono note come campi cardiogenici primitivo e secondario, meglio noti come "*primary*" (PHF) e "*secondary (o anterior) heart fields*" (AHF) (Fig. 9). Il PHF è costituito dall'area cardiogenica che formerà il tubo cardiaco primitivo. L'AHF, situato più anteriormente, intorno al sacco aortico, fornisce le cellule miocardiche al tratto di efflusso (TE) del troncocono e al miocardio del ventricolo destro. L'AHF e le cellule della cresta neurale (CN) sono coinvolte nella settazione e nella rotazione del troncocono. L'AHF e le CNC hanno origini embriologiche differenti e danno origine a componenti distinte del TE: il setto aorto-polmonare e la parete miocardica.

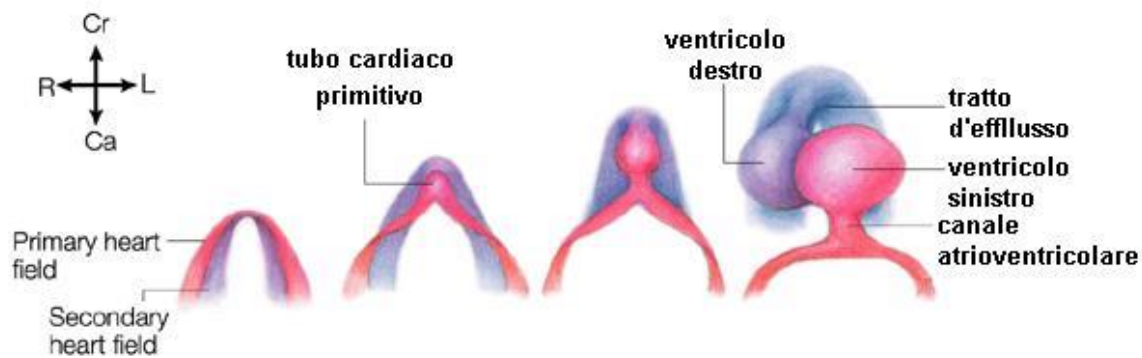


Figura 9. Localizzazione del primary e del secondary heart field.

### **Fattori di trascrizione nella cardiogenesi**

Numerosi geni responsabili di patologie umane codificano per fattori di trascrizione o molecole segnale. I fattori di trascrizione sono proteine che contengono un dominio di legame per il DNA e fungono da regolatori fondamentali del controllo dell'espressione genica. Le molecole segnale sono proteine che consentono alle cellule di rispondere all'ambiente che li circonda, e pertanto sono coinvolti nella regolazione di numerose funzioni biologiche cruciali. I fattori di trascrizione e le molecole segnale le cui mutazioni determinano CHD sono di solito altamente conservate tra le specie. Pertanto i fattori di trascrizione sono adattabili anche allo studio di sistemi modello per poter chiarire il meccanismo patogenetico ad essi associati. Tra i fattori di trascrizione coinvolti nella morfogenesi cardiaca, le proteine NKX2.5 e GATA4 rivestono sicuramente un ruolo predominante. Questi geni sono candidati ideali per numerose CHD, proprio perché responsabili dell'induzione, della morfogenesi e del differenziamento cardiaco.

#### NKX2.5

La proteina NKX2.5 è un membro della famiglia dei fattori di trascrizione homeobox della classe NK-2, caratterizzata dalla presenza della sequenza NK (PPPARRI AVPVLVRDGKPC) altamente conservata tra le specie (Evans, 1999). Recenti studi hanno dimostrato che questi fattori di trascrizione sono espressi a livello cardiaco sia negli invertebrati che nei vertebrati, suggerendo un ruolo chiave nella differenziazione cardiaca (Ranganayakulu et al., 1998). In *Drosophila Melanogaster*, il fattore appartenente a questa classe, codificato dal gene *tinman*, è fondamentale per la formazione dei vasi dorsali (il cuore primitivo) e per la specificazione del mesoderma. L'espressione di *tinman* è sufficiente ad attivare i geni bersaglio nel mesoderma dorsale, necessari per un corretto sviluppo cardiaco (Evans, 1999).

Nei vertebrati, sono noti numerosi fattori di trascrizione appartenenti alla famiglia NK-2, dei quali solo alcuni (Nkx2.3, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9) sono espressi a livello cardiaco (Fig. 10). Il fattore NKX2.5 è codificato dal gene *Nkx2.5*, anche chiamato *Csx*, che è stato identificato e clonato sulla base della sua omologia di sequenza con il gene *tinman* di *Drosophila*. Il gene *NKX2.5* umano è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 5, nella banda 5q34; è lungo 3.081 kb. Consiste di 2 esoni, intervallati da un introne, e l'mRNA è lungo 975 bp. Nkx2.5 è l'unico membro della famiglia ad essere espresso a livello delle cellule progenitrici cardiache in tutte le specie studiate, suggerendo un suo ruolo fondamentale nello sviluppo cardiaco (Ranganayakulu et al., 1998; Evans, 1999).

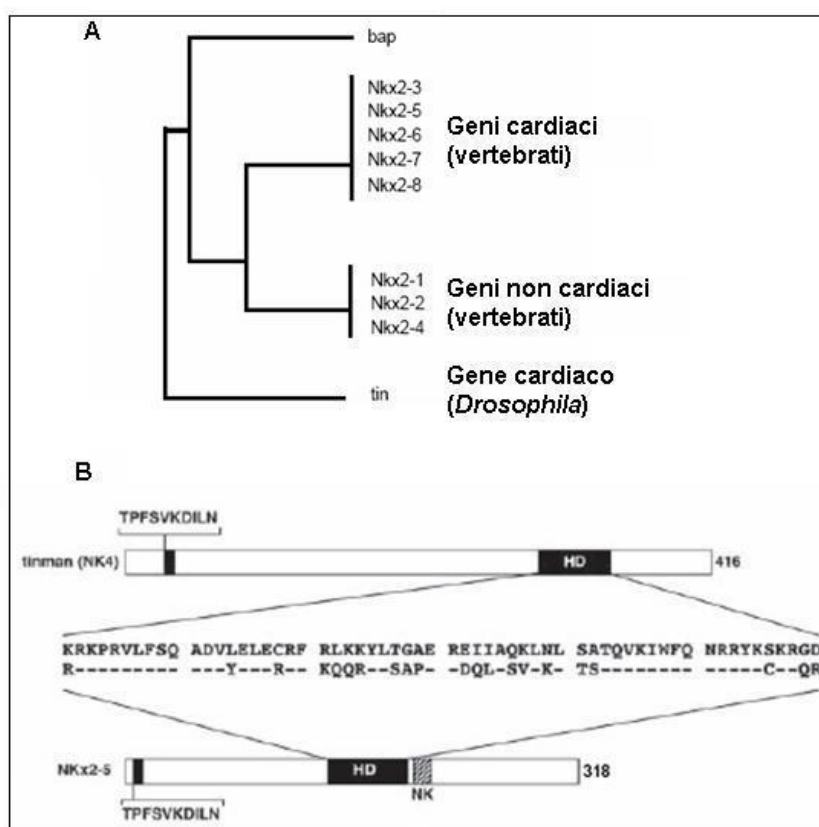


Figura 10. La famiglia dei fattori di trascrizione homeobox della classe NK-2A: albero filogenetico delle proteine NK ; B: omologia di struttura tra *tinman* e *NKX2.5*.

Infatti, è espresso fin dai primi stadi della cardiogenesi nel PHF, nell'AHF, nelle cellule precursori dei ventricoli e degli atri, e nelle cellule mesenchimali che contribuiscono alla settogenesi atriale (Harvey, 2002) (fig. 11). Questo gene codifica per un fattore di trascrizione omeotico di 324 amminoacidi che presenta quattro domini altamente conservati: un breve

dominio N-terminale chiamato tin (TN), l'omeodominio (*homeodomain*, HD) di 160 aminoacidi, il domino conservato NK e un peptide C-terminale con sequenza GIRAW (fig. 12).

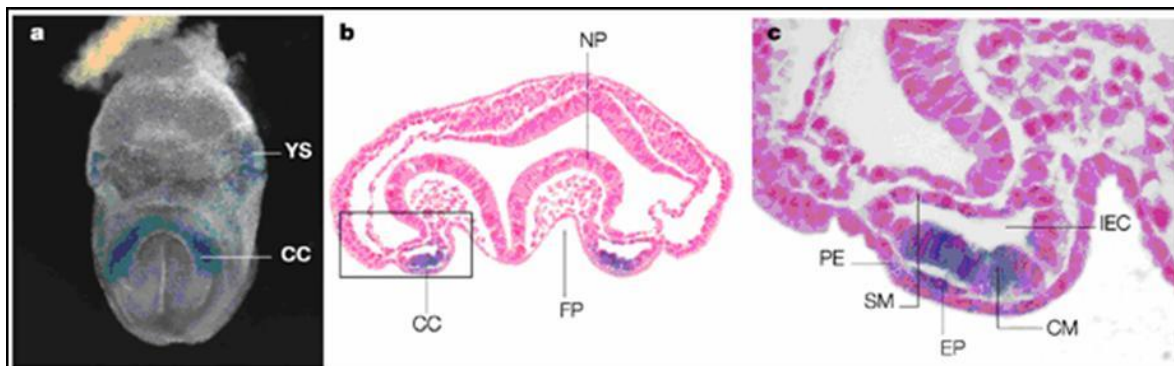


Figura 11. Espressione del gene *Nkx2.5* nell'AHF. L'espressione del gene *Nkx2.5* è visualizzata mediante il gene reporter *LacZ*, su embrione murino (A) e su sezione della porzione caudale dell'embrione (B); ingrandimento dell'area cardiogenica dove si può osservare l'espressione di *Nkx2.5* nelle cellule precursori endocardiche, tra il mesoderma cardiaco (CM) e l'endoderma.

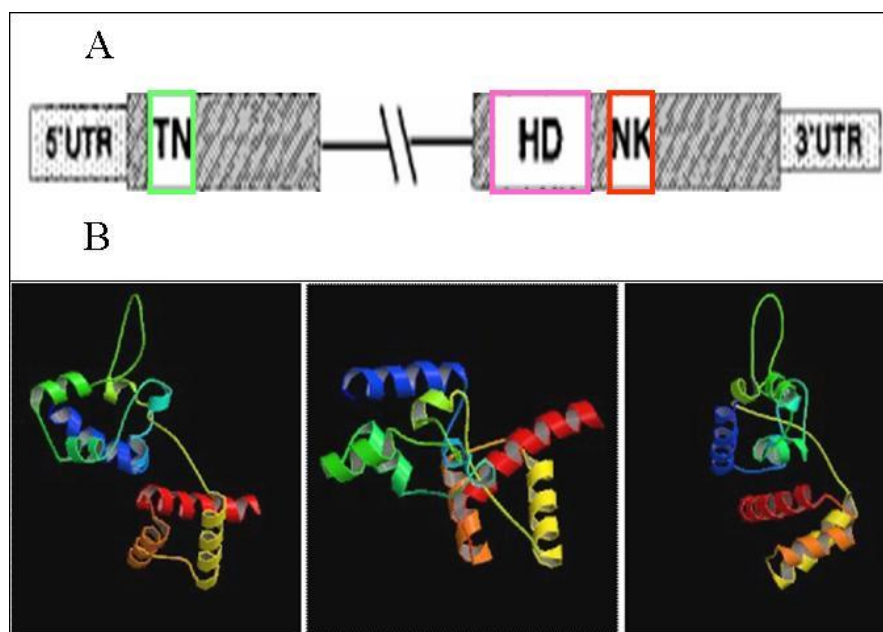


Figura 12. Rappresentazione schematica del gene *NKX2.5* e dei domini funzionali A: schema rappresentante la struttura genica di *NKX2.5* con la localizzazione dei 4 domini proteici funzionali. B: struttura tridimensionale della proteina *NKX2.5* TN: dominio tin; HD:omeodominio; NK:dominio conservato NK2-box); B: struttura tridimensionale della proteina *NKX2.5*.

La proteina NKX2.5 localizza nel nucleo cellulare dove, mediante l'HD, si lega a sequenze specifiche del DNA (sequenza 5'-TNAAGTG-3') a livello dei promotori dei geni target essenziali per l'attività cardiogenica. L'HD è costituito da tre  $\alpha$ -eliche, la terza delle quali è responsabile del legame al solco maggiore del DNA (Evans, 1999) (Fig. 13).

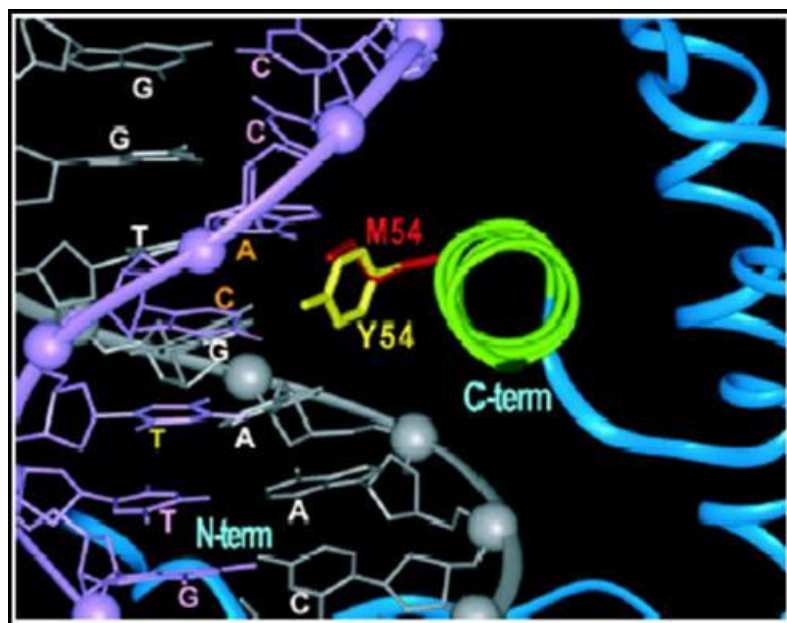


Figura 13. Interazione tra l'omeodominio di NKX2.5 e il solco maggiore dell'elica del DNA

Per svolgere la sua funzione di attivatore trascrizionale, NKX2.5 si può legare al DNA sia come monomero che come omodimero (Kasahara et al., 2000). Inoltre, sempre mediante l'HD, può interagire con fattori di trascrizione, quali GATA4 e TBX5, formando eterodimeri, che attivano la trascrizione di geni cardiaco-specifici in maniera sinergica (Kasahara et al., 2000). Il suo ruolo nell'induzione della cardiogenesi è confermato anche da numerosi studi *in vivo*. Gli embrioni murini privi di entrambe le copie del gene *Nkx2.5* mostrano un tubo cardiaco primitivo normale, ma la morfogenesi cardiaca si arresta in seguito a mancato looping e maturazione delle camere cardiache, con conseguente letalità embrionale (Fig. 14). Risulta anche diminuita l'espressione di numerosi geni specifici ed essenziali per lo sviluppo cardiaco, come *MEF2C*, *HAND1* e *ANF* (Fig. 15), a conferma che questi fattori sono direttamente o indirettamente regolati da NKX2.5 (Tanaka et al., 1999). NKX2.5 svolge la sua funzione di attivatore trascrizionale sia attivando direttamente la trascrizione del gene target, come nel caso di *MEF2C*, sia agendo in sinergia con altre proteine (Reecy et al., 1999). Infatti NKX2.5 interagisce con altri fattori di trascrizione cardiogenici, come SRF, GATA4 e TBX5, formando un complesso



trascrizionale, che attiva l'espressione di numerosi geni cardio-specifici, e regolando positivamente il programma di sviluppo cardiaco (Durocher et al., 1997; Harvey, 1996).

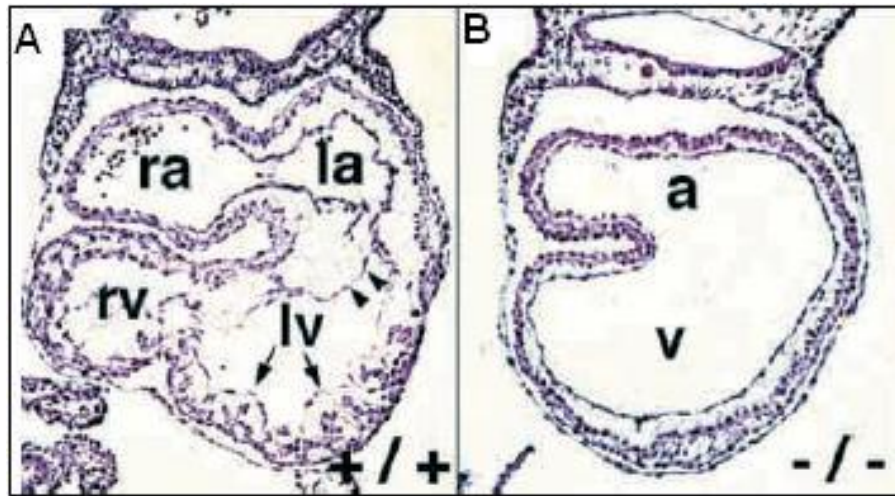


Figura 14. Sviluppo cardiaco nel topo  $Nkx2.5^{-/-}$  A: sviluppo cardiaco corretto nel topo selvatico, con presenza di due atri e due ventricoli. B: anomalia dello sviluppo cardiaco nel topo KO con mancata formazione dei cuscinetti endocardici (teste di freccia) ed anomalie della trabecolatura miocardica (freccie)

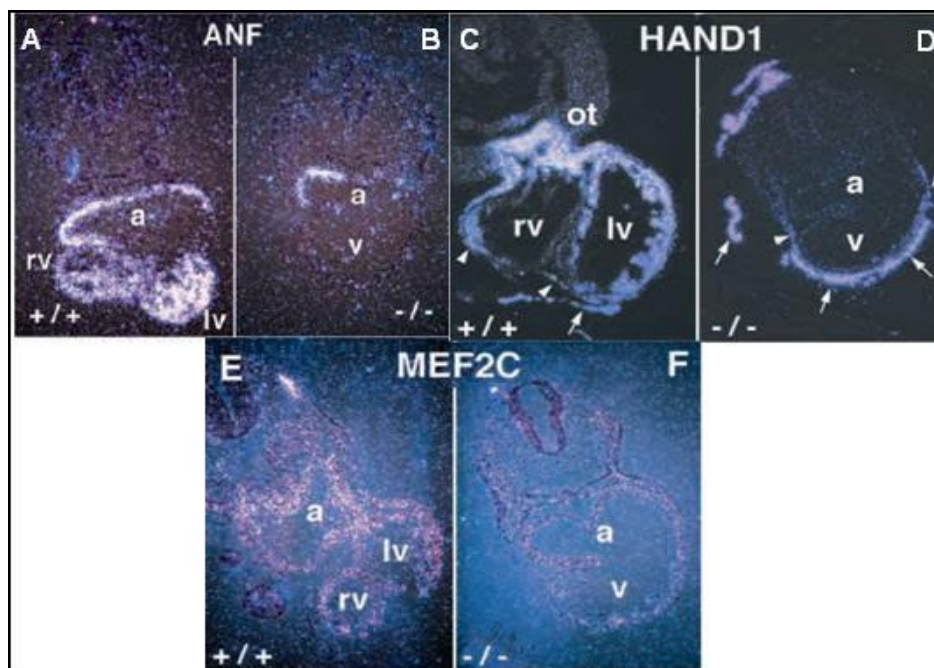


Figura 15. Espressione di fattori cardiogenici nel topo  $Nkx2.5^{-/-}$  Ibridazione in situ attraverso un cRNA antisense del ANF (A,B), HAND1(C,D), MEF2C (E, F) per embrioni selvatici (+/+) e knockout per  $Nkx2.5$ . (-/-).

## GATA4

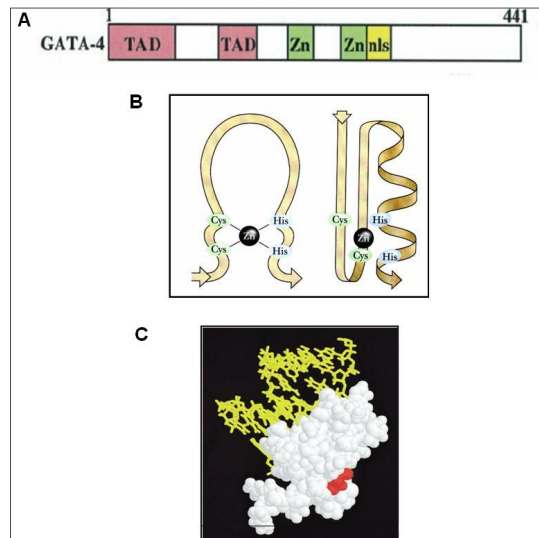
La proteina tinman viene coespressa in *Drosophila* con un altro fattore cardiogenico, chiamato pannier, con il quale interagisce per attivare sinergicamente l'espressione dei geni cardiaci e indurre lo sviluppo delle cellule cardiache (Gajewski et al., 1999). Gata4, l'omologo murino di pannier, agisce come fattore cardiogenico in modo simile a pannier, mostrando una funzione conservata durante l'evoluzione con pannier nello sviluppo del cuore (Gajewski et al., 1999). Durante la formazione e la rotazione del tubo cardiaco, Gata4 è espresso nell'endocardio, nel miocardio e nelle strutture embrionali che contengono il mesoderma precardiaco, quali il setto trasverso e l'epitelio celomatico intraembrionale. L'espressione di Gata4 nel miocardio continua durante tutta la gestazione e dopo la nascita, a supporto del ruolo di questo fattore nella regolazione della differenziazione cardiaca (Fig. 16) (Charron e Nemer, 1999).



Figura 16. Espressione tissutale della proteina Gata4. Sezione sagittale cardiaca del topo WT, che mostra l'espressione di Gata4 a livello del miocardio e dell'endocardio del cuore in formazione.

GATA4 è un membro della famiglia di fattori di trascrizione GATA con domini a dita di zinco (Fig. 17B), ed è costituita da 442 amminoacidi. Presenta 4 domini proteici: un dominio di transattivazione (TAD), due domini zinc finger [uno N-terminale (NZf) e uno C-terminale (CZf)],

e un dominio per la localizzazione nucleare (NSL) (Fig.17A). I domini zinc finger sono responsabili del legame con il DNA, sul quale riconoscono una sequenza consenso (A/T)GATA(A/G), nota come motivo GATA (fig. 17C) (Orkin et al., 1992). GATA4 funziona infatti come attivatore trascrizionale nel cuore dei vertebrati. Il fattore GATA4 è codificato dal gene *GATA4*, che nell'uomo è localizzato sul braccio corto del cromosoma 8, nella regione 8p22-p23. Il gene *GATA4* è lungo 51.104 kb, è costituito da 6 esoni e 5 introni, e il suo mRNA è lungo 1329 bp.



*Figura 17. Struttura del gene e della proteina GATA4 A: Struttura della proteina GATA4, in cui sono evidenziati i 4 domini funzionali. B: raffigurazione generale dei domini zinc finger. C: struttura tridimensionale della proteina GATA4*

Oltre a GATA4 e NKX2.5, numerosi altri fattori di trascrizione rivestono un ruolo chiave nella morfogenesi cardiaca. Infatti, NKX2.5 e GATA4 possono formare complessi trascrizionali, cooperando sia tra di loro che con altri fattori come MEF2C, SRF e TBX5 (Bruneau, 2002) (Fig. 18), per attivare l'espressione dei geni cardiaci come *ANF* e l' $\alpha$ -actina cardiaca (Fig. 15). Una corretta associazione tra questi ed ulteriori elementi cardiogenici è alla base di un corretto sviluppo cardiaco, e mutazioni in geni codificanti per questi fattori possono spiegare le anomalie strutturali che ne derivano.

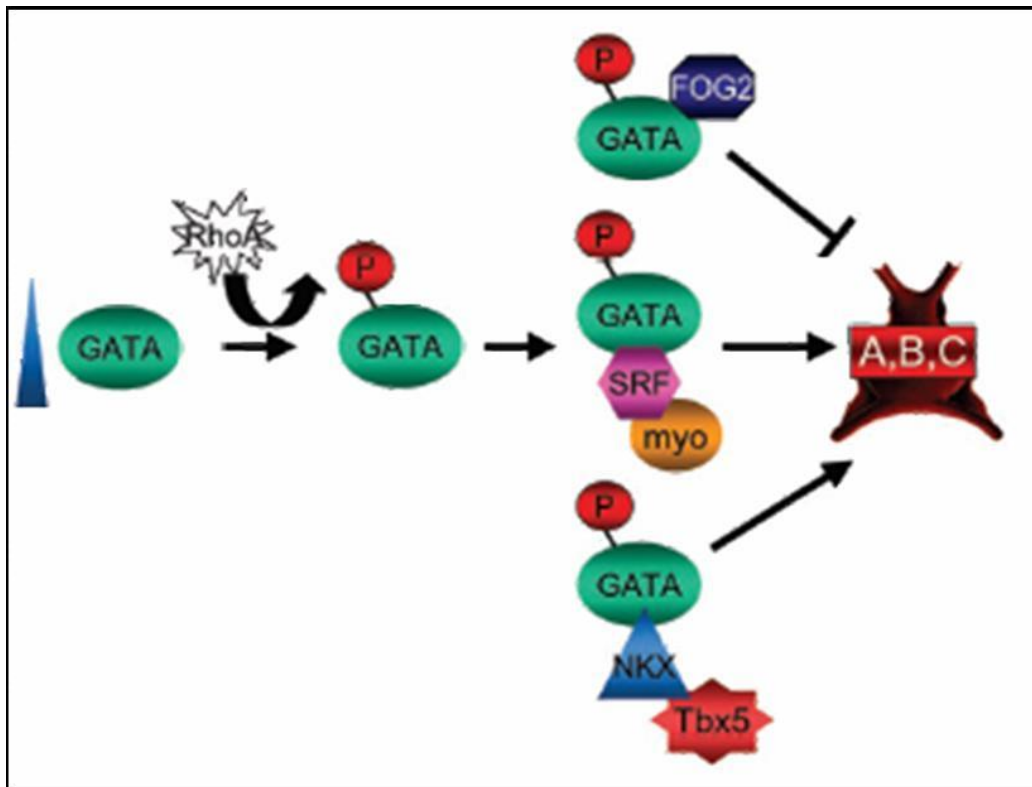


Figura 18. Interazione tra i membri della famiglia GATA, i fattori di trascrizione NKX2.5 e SRF, per attivare l'espressione di geni cardiaci (ABC) durante lo sviluppo embrionale.

## ***Genetica delle Cardiopatie Congenite***

### ***Applicazione delle Genetica Molecolare allo Studio delle Cardiopatie Congenite***

Fino a qualche anno fa gli approcci che venivano applicati allo studio delle CC erano due.

Il primo è lo studio di loci cromosomici identificati mediante analisi citogenetica o di linkage. Il secondo approccio utilizza analisi di mutazione diretta su geni candidati selezionati sulla base della loro funzione biologica.

L'analisi di linkage parte dall'identificazione di un individuo affetto (il probando) e dallo studio dell'aggregazione familiare della malattia. L'analisi di marcatori genetici polimorfici identifica la cosegregazione di una malattia con uno specifico genotipo. Questo approccio necessita però di una accurata valutazione clinica del fenotipo nei componenti della famiglia che prendono parte allo studio. Una applicazione di successo di questa tecnica riduce la lista dei possibili geni candidati a piccoli intervalli genomici (i cosiddetti "loci-malattia"), contenenti da poche decine a centinaia di geni. Il clonaggio posizionale dei geni-malattia utilizza le informazioni fornite dalle mappe fisiche per creare un "inventario" dei geni localizzati nell'intervallo identificato. La priorità di analisi viene invece determinata dal ruolo di questi geni nei vari processi biologici, ed in particolare nella cardiogenesi. Quest'approccio è stato utile per identificare la correlazione tra alcuni geni come *NKX2.5*, *TBX5* e *ZIC3* e alcune CC (Schott et al., 1998; Li et al., 1997; Basson et al., 1997; Gebbia et al., 1997).

Anche l'analisi citogenetica ha permesso di identificare loci associati a CC. Per esempio, lo studio dei punti di rottura cromosomici di traslocazioni ha permesso di identificare geni-malattia, come il gene *PROSIT240*, responsabile della trasposizione delle grandi arterie (Muncke et al., 2003).

L'alternativa a questo approccio è l'uso dei geni candidati, che si basa sulle informazioni relative al ruolo biologico dello specifico gene piuttosto che sulle informazioni sulla sua posizione di mappa. Ad oggi, sono disponibili banche dati che forniscono informazioni in merito al ruolo biologico di numerosi geni coinvolti nello sviluppo cardiaco e nelle varie CC. L'analisi di mutazione delle regioni codificanti e delle regioni introniche fiancheggianti questi geni viene successivamente effettuato mediante analisi mutazionale diretta, per esempio utilizzando DHPLC o sequenziamento diretto, e consente di identificare mutazioni patogenetiche. Mediante questo approccio sono state identificate le mutazioni del gene *CFC1* nella trasposizione delle grandi arterie (TGA) (Goldmuntz et al. 2002).

Ad oggi le tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS) come il sequenziamento dell'intero esoma o il target resequencing in cui sarà possibile analizzare più geni contemporaneamente saranno i migliori approcci per l'identificazione di nuovi geni malattia specialmente in pazienti sporadici in cui manca un pedigree informativo, la diagnosi clinica non è certa o in caso di eterogeneità genetica. Mediante questo approccio è stato recentemente identificato un nuovo gene candidato per la patogenesi della Sindrome Eterotassica. Gli autori dopo una prima analisi con SNP's array per identificare le regioni cromosomiche con perdita di eterozigotità hanno effettuato un target resequencing delle regioni candidate, confermando la presenza di una mutazione in omozigosi nel gene *SHROOM 3*, coinvolto nell'organogenesi. (Tarag et al., 2011). Ma anche grazie alle tecniche come il CGH array o i Chip Affimetrix che permettono l'analisi "Genome wide" è stato possibile identificare la presenza di CNV's potenzialmente patogenetiche in pazienti con CC che contengono geni coinvolti nello sviluppo cardiaco (Goldmuntz et al., 2011). Recentemente mediante l'analisi genome-wide di 114 pazienti con tetralogia di Fallot e dei loro genitori sono stati identificati 11 microriarrangiamenti genomici de novo assenti in oltre 2200 soggetti di controllo. Questo dato dimostra che circa il 10% delle tetralogie di Fallot isolata sporadiche risultano da un microriarrangiamento genomico de novo. In alcuni casi questi riarrangiamenti sono ricorrenti come la delezione 1q21, identificata nell'1% dei pazienti e precedentemente associata a ritardo mentale e disturbi mentali. In alcuni casi, i riarrangiamenti coinvolgevano geni precedentemente coinvolti nelle cardiopatie congenite, come la connessina 40, *RAF1*, *TBX1*, *NOTCH1* e *JAG1* (Greenway, 2009).

Indipendentemente dall'approccio genetico utilizzato, l'identificazione dei geni e delle mutazioni responsabili di CC è uno strumento fondamentale per studiare i modelli animali. In particolare, lo studio di modelli di topo, pollo o zebrafish è largamente utilizzato per capire la patogenesi delle CC umane. Manipolazioni geniche e farmacologiche di questi modelli permettono anche analisi molecolari meccanicistiche che non sono altrimenti possibili nell'uomo, caratterizzando il corretto sviluppo cardiaco e chiarendo i meccanismi patogenetici associati alle CC.

### ***Basi genetiche delle cardiopatie congenite***

Si è dibattuto a lungo sul ruolo dei fattori ambientali nella patogenesi delle CC. L'esposizione degli embrioni a fattori teratogeni, come l'acido retinoico, a fattori infettivi, come la rosolia, a alcune malattie materne, come il diabete, o alla carenza di acido folico, ha un chiaro effetto

patogenetico, ma, nel complesso, la componente ambientale riveste un ruolo minore. Infatti, la prevalenza relativamente costante delle CC nelle popolazioni nel tempo e in regioni differenti del globo indica che i fattori ambientali non sono una causa prevalente nella patogenesi delle CC.

Le prime evidenze dell'impatto della genetica sull'eziologia delle CC erano state fornite dalle osservazioni epidemiologiche, che hanno mostrato che circa 1/3 dei bambini con CC presenta anche malformazioni extracardiache (Ferencz et al., 1993).

Gli studi sulla ricorrenza nelle famiglie delle CC hanno alimentato per decenni l'ipotesi patogenetica multifattoriale. Tuttavia, le CC non sono esclusivamente difetti multifattoriali, dato che possono presentare anche una trasmissione monogenica. Sebbene ancora non si conosca il reale impatto della genetica nella patogenesi delle CC, i recenti successi della biologia molecolare stanno evidenziando che i geni mendeliani incidono oltre il 2%. Ciò è in parte dovuto ai successi della cardiocirurgia, che hanno consentito a molti pazienti con CC di raggiungere l'età adulta e di riprodursi. Inoltre, la prevalenza delle CC nella popolazione generale e la complessità dello sviluppo cardiaco si rispecchiano nell'elevata frequenza di questi difetti in associazione con sindromi citogenetiche e mendeliane.

#### *Le cardiopatie congenite come fenotipi complessi*

Il modello multifattoriale per le CC isolate, suggerito dal loro rischio relativamente basso di ricorrenza nelle famiglie, è stato introdotto da Nora e implicava la presenza di numerosi loci, con o senza l'interazione dell'ambiente (Nora, 1968; Ferencz et al., 1989; Correa-Villasenor et al., 1991; Nora e Nora, 1988). Il miglior esempio è sicuramente quello della pervietà del dotto arterioso. È infatti ben noto che questo difetto può essere causato da fattori ambientali, come la rosolia o da un parto prematuro, e Zetterqvist ha dimostrato che questa patologia è conforme al modello a soglia delle patologie poligeniche (Fig. 19) (Zetterqvist, 1977). Peraltro, il dotto arterioso pervio è l'eccezione piuttosto che la regola, e i dati di ricorrenza e dei rischi riproduttivi forniti da studi successivi hanno contestato il modello poligenico o multifattoriale (Whittermore et al., 1994, Emanuel et al., 1983).

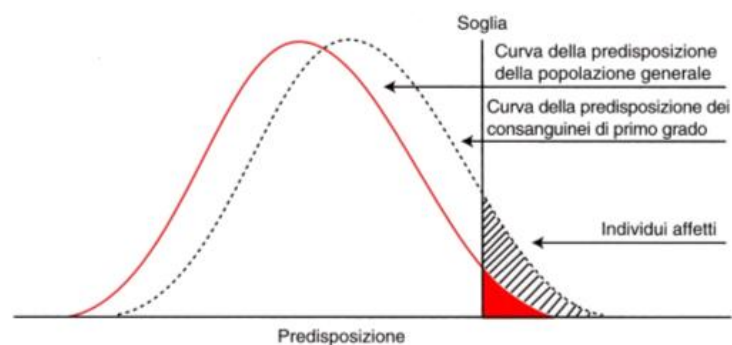


Figura 19. Modello a soglia delle malattie genetiche

Burn e collaboratori hanno effettuato uno studio su adulti affetti da CC e delle loro famiglie per identificare i rischi di ricorrenza per le varie CC (Burn et al., 1998). I risultati di questo studio indicano un rischio di occorrenza generale delle CC nei figli degli affetti del 4.1%, superiore a quelli di ricorrenza nei fratelli, che era del 2.1%. Le donne trasmettono con maggiore frequenza rispetto ai maschi. I rischi di occorrenza relativi alle singole cardiopatie indicano che non tutte le CC hanno una base poligenica. Infatti, le simulazioni al computer indicano per la tetralogia di Fallot (ToF) l'azione di pochi geni (circa 3-4) che agiscono in maniera moltiplicativa, mentre per il CAV è stato delineato come più probabile il modello monogenico ad effetto additivo, con eterogeneità genetica (Burn et al., 1998).

#### Cardiopatie congenite associate ad anomalie cromosomiche

Le anomalie citogenetiche sono responsabili di circa il 10% di tutte le CC. È ben nota l'associazione tra le CC e alcune aneuploidie cromosomiche, come con la sindrome di Down (trisomia 21), la sindrome di Patau (trisomia 13), la sindrome di Edwards (trisomia 18) e la sindrome di Turner (45, X) (Schinzel, 2001). La disponibilità di nuove tecniche citogenetiche ha permesso di studiare e definire la reale prevalenza di sindromi da microdelezione cromosomica associate a CC, come la sindrome di Williams (del7q11.23), la sindrome da delezione 22q11.2 associata alla sindrome Di George/Velocardiofaciale o la sindrome da microdelezione e micro duplicazione 1q21.1 associata frequentemente alle cardiopatie congenite (Brunetti Pierri et al., 2008; Mefford et al., 2008; Christiansen et al., 2004). L'analisi molecolare dei geni localizzati all'interno delle regioni delete ha permesso di identificare alcuni geni responsabili delle stesse sindromi o delle CC isolate ad esso associate, come il gene *JAG1*, le cui mutazioni determinano sia la sindrome di Alagille (SA), comunemente associata alla del20p11-2, sia la ToF isolata (Oda



et al., 1997; Li et al., 1997; Eldadah et al., 2001, Guida et al., 2010). L'analisi dei geni della regione 22q11 non ha invece identificato geni responsabili di cardiopatie TC isolate (Chieffo et al., 1997; Conti et al., 2003). Altre anomalie citogenetiche comunemente associate a CC sono la delezione distale del braccio lungo del cromosoma 11 (associato a cuore sinistro ipoplasico) e la delezione del braccio corto del cromosoma 8 (associato con il CAV). Con le nuove tecniche CGH array si stanno identificando numerose nuove sindromi associate a microrriarrangiamenti cromosomici: dup 22q11.1, del 9q34, del 17p11.2, del 16p11.2 (Wentzel et al., 2008., Sheward et al., 2007; Andrieux et al., 2007; Ghebranius et al., 2007; Hernando et al., 2002)

### Le cardiopatie congenite come tratti monogenici

#### Le cardiopatie isolate

Sebbene le CC isolate siano prevalentemente difetti sporadici, numerose famiglie presentano la trasmissione mendeliana di una CC isolata. Questi difetti monogenici possono presentare vari tipi di trasmissione, a seconda del gene coinvolto:

- trasmissione legata all'X, come nel caso dei difetti di rotazione cardiaca, associati a mutazioni del gene *ZIC3* (Gebbia et al., 1997);
- trasmissione autosomica dominante, come nel caso del difetto interatriale, associato a mutazioni del gene *GATA4* (Garg et al., 2003);
- trasmissione autosomica recessiva, come nel caso del tronco arterioso comune (TA), associato a mutazioni in omozigosi del gene *NKX2.6* (Heathcote et al., 2005).

La trasmissione autosomica dominante è senza dubbio quella più comune, ed in questi casi le CC presentano penetranza incompleta ed espressività variabile. Un esempio illustrativo riguarda un paziente affetto da ToF descritto da Pitt (Pitt,1962). Infatti, 11 dei suoi 262 discendenti erano affetti da una CC, e 3 da ToF.

Utilizzando l'analisi di linkage, l'approccio dei geni candidati e i modelli animali, la biologia molecolare ha definito i geni responsabili di numerose CC isolate. La maggior parte di questi geni codifica per fattori di trascrizione cardiogenici (Fig. 20). Tra i geni le cui mutazioni causano difetti dei setti, alcuni sono responsabili sia di forme familiari (gene *NKX2.5*, *GATA4*, *MYH6*) che di casi sporadici (*CRELD1*, *NKX2.5*, *GATA4*) (Schott et al., 1998; Garg et al., 2003; Heathcote et al., 2005; Robinson et al., 2003; McElhinney et al., 2003; Nemer et al., 2006). Studi recenti hanno identificato una delezione della regione distale 1q21.1 in 3 pazienti su 505 pazienti con

CC isolata (Christiansen et al., 2004). Grazie alle tecniche di citogenetica molecolare è stato possibile identificare una elevata frequenza di delezioni e duplicazioni cromosomiche e copy number variation (CNV) in due casistiche indipendenti di pazienti con CC non associate a quadri sindromici (Endorgan et al., 2008; Greenway et al., 2009).

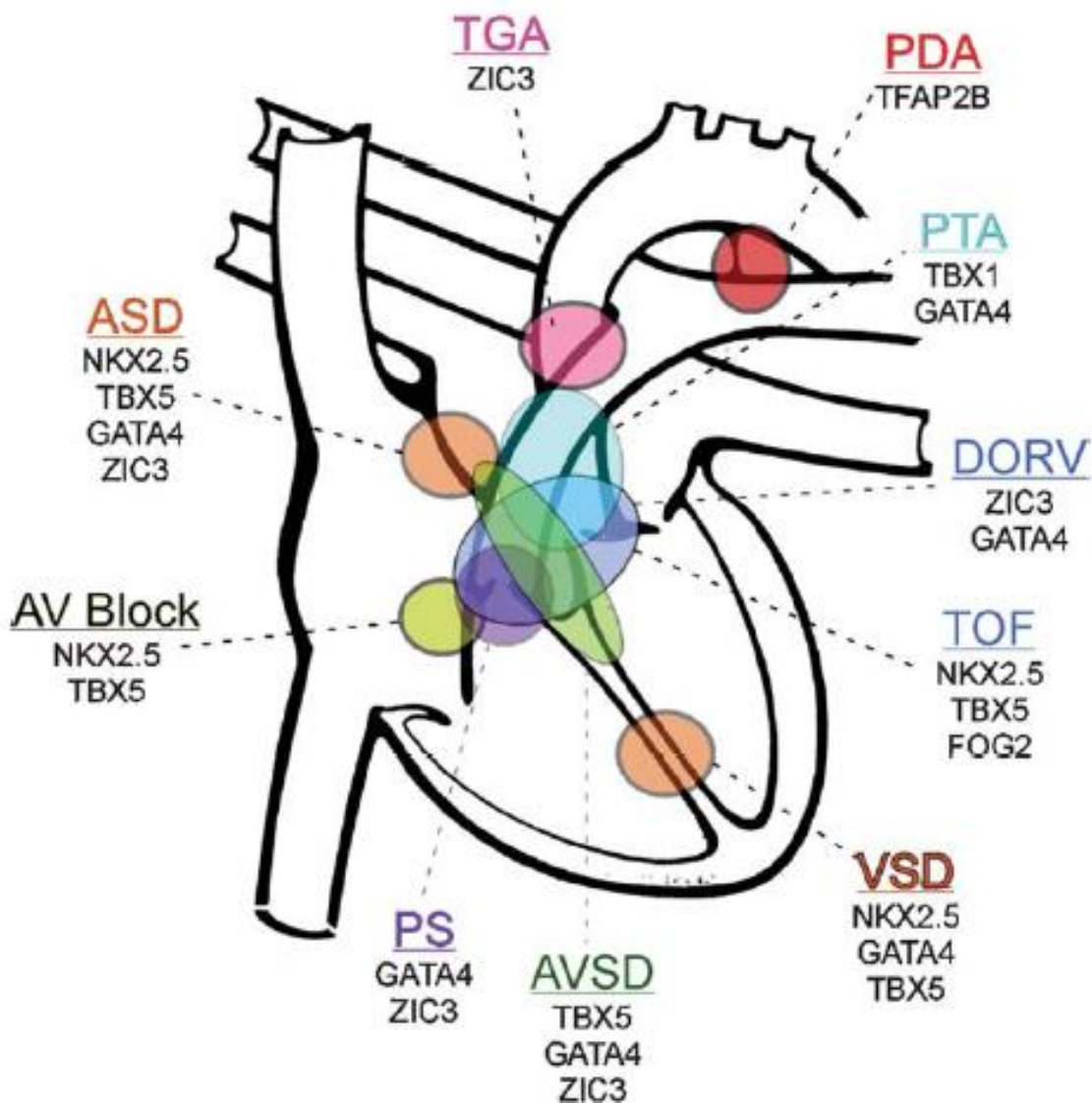


Figura 20. Fattori di trascrizione cardiogenici e cardiopatie congenite associate. TGA: trasposizione delle grandi arterie; PDA: dotto arterioso pervio; DORV: ventricolo destro a doppia uscita; TOF: tetralogia di Fallot; VSD: difetto interventricolare; AVSD: difetto del setto atrioventricolare; PS: stenosi polmonare; AV: atrioventricolare; ASD: difetto del setto interatriale

Alcuni sottotipi anatomici di ToF possono presentarsi come condizioni isolate correlate a mutazioni geniche, come per esempio quelle del gene *JAG1*, responsabile oltre che della SA anche di alcuni casi familiari e sporadici di ToF isolato (Eldadah et al., 2001; Guida et al., 2011).

Mutazioni del gene *NKX2.5* e *NKX2.6* sono responsabili anche di circa il 5% delle forme isolate di ToF sporadici e familiari e ad alcuni rari casi di TA (McElhinney et al., 2003). Inoltre, mutazioni del gene *NOTCH1* sono state identificate in famiglie segreganti anomalie delle valvole aortiche, come valvola aortica bicuspidale (Garg et al., 2005). Sono numerosi i geni associati a eterotassia o *situs ambiguus*, nella quale gli organi toraco-addominali sono distribuiti a caso, con conseguente destrocardia e/o cardiopatie complesse. Questi geni, come *ZIC3*, *CFC1*, *LEFTYB*, *ACVR2B*, *PROSIT240*, *NODAL*, *FOXH1* codificano per proteine coinvolte nei segnali molecolari che regolano l'assimetria sinistro-destra del corpo e la rotazione destrorsa del tubo cardiaco (Gebbia et al., 1997; Goldmuntz et al., 2002; Kosaki et al., 1999A; Kosaki et al., 1999B; Muncke et al., 2003, Mohapatra et al., 2010, Roessler et al., 2009).

### Le cardiopatie sindromiche

Burn ha elencato oltre 370 sindromi malformative con CC (Burn, 2006). Tra le più comuni sindromi mendeliane caratterizzate da CC ricordiamo:

- La SA, o displasia arterioepatica è una sindrome autosomica dominante, che, in assenza di del20p11-2, è dovuta a mutazioni dei geni *JAG1* e *NOTCH2* (Oda et al., 1997; Li et al., 1997; McDaniel et al., 2006). La SA è caratterizzata da ittero neonatale, aplasia dei dotti biliari intraepatici, dismorfismi facciali, malformazioni extracardiache, anomalie scheletriche, difetti oculari e CC, come atresia polmonare, arterie aorto-polmonari collaterali multiple, arco aortico normale e agenesia vena superiore destra.
- La sindrome di Holt-Oram è una condizione autosomica dominante dovuta a mutazioni del gene *TBX5*, caratterizzata da anomalie scheletriche, in particolare degli arti superiori e radiali, e CC, come difetti dei setti, ToF, CAV, e difetti di conduzione atrioventricolare (Basson et al., 1997; Li et al., 1997).
- La sindrome di Ellis-Van Creveld, una rara condizione autosomica recessiva causata da mutazioni dei geni *EVC1* e *EVC2*, è caratterizzata da bassa statura a insorgenza prenatale, arti corti, polidattilia postassiale con ipoplasia delle falangi terminali, e CC, tra cui DIA di tipo *ostium primum* e CAV con atrio comune (Ruiz-Perez et al., 1997; Ruiz-Perez et al., 2003).
- La sindrome di Noonan (SN) e le sindrome correlate, condizioni autosomiche dominanti associate a mutazioni dei geni codificanti per proteine della cascata di trasduzione del segnale mediata da RAS (Tartaglia et al., 2001; Digilio et al., 2002; Rodriguez-Viciano et

al., 2006; Aoki et al., 2005; Schubbert et al., 2006; Carta et al., 2006; Niihori et al., 2006)  
Il gene *PTPN11* codifica una proteina di questa cascata ed è responsabile di una delle sindromi più comuni associate a CC, la SN, caratterizzata da stenosi valvolare polmonare (SVP) e difetti dei setti (Tartaglia et al. 2001). La cascata del segnale di RAS-MAPK coinvolge altri geni come *HRAS*, *KRAS*, *BRAF*, *MEK1* e *MEK2*, le cui mutazioni causano la sindrome di Costello e la sindrome Cardiofaciocardica, caratterizzate da CC quali cardiomiopatia ipertrofica (CMI), SVP e difetti dei setti (Rodriguez-Viciano et al., 2006; Aoki et al., 2005; Schubbert et al., 2006; Carta et al., 2006; Niihori et al., 2006).

- La Sindrome eterotassica, condizione caratterizzata da un malposizionamento degli organi toraco addominali. La causa dei difetti di lateralizzazione può essere genetica e sono stati proposti tre tipi di trasmissione: autosomica recessiva (la più frequente), autosomica dominante (rara) e legata all' X (molto rara con poche famiglie riportate). Nei pazienti affetti da eterotassia, sono state individuate mutazioni in diversi geni (*LEFTY A*, *ACVR2B*, *NODAL*, *CFC1*, *INVERSINA*).

## **OBIETTIVI DELLA TESI**

Gli studi eseguiti dal gruppo di lavoro sulle cardiopatie congenite dell'istituto CSS-Mendel hanno fornito un importante contributo alla comprensione delle basi genetiche di alcune cardiopatie congenite isolate e della Sindrome di Noonan e patologie correlate. Grazie al reclutamento di un'ampia casistica selezionata tra i pazienti affetti afferenti al Dipartimento di Cardiologia Pediatrica dell'Università di Roma "La Sapienza", all'ambulatorio di Genetica Medica dell'Ospedale Bambino Gesù di Roma ed al Servizio di Consulenza Genetica dell'Istituto Mendel, a partire da novembre 2002 fino ad oggi e grazie alla collaborazione multicentrica è stato possibile identificare loci e geni nuovi, eseguire ampi screening sui geni noti e la ricerca di nuovi geni-malattia associati alle CC isolate e sindromiche

I risultati di questa tesi di dottorato verranno presentati in due capitoli separati, uno relativo alle CC isolate e uno a quelle sindromiche.

Nel dettaglio gli obiettivi perseguiti in questo progetto di tesi sono stati i seguenti

### **Cardiopatie Congenite isolate:**

Identificare nuovi geni di suscettibilità per le cardiopatie congenite isolate attraverso un approccio per geni e loci candidati. In particolare, si è focalizzata l'attenzione sui seguenti sottoprogetti:

1-Valutare il contributo dei geni della lateralizzazione nella patogenesi della trasposizione delle grandi arterie (TGA).

2-Studiare il ruolo della connessina 43 nel difetto cardiaco criss-cross, una rara cardiopatia congenita in cui il "verso" delle grandi arterie è invertito.

3-Verificare il contributo delle mutazioni somatiche nei fattori di trascrizione cardiogenici *NKX2.5* e *GATA 4* nelle cardiopatie congenite sporadiche con particolare riferimento ai difetti della settazione.

4-Analizzare lo spettro fenotipico delle CC associate con microriarrangiamento 1q21.1 \*

\* (questo paragrafo include anche lo studio dei microriarrangiamenti 1q21.1 in quadri sindromici familiari associati a stenosi della valvola polmonare)

### **Cardiopatie congenite associate a quadri sindromici:**

1-Valutare il contributo del gene *CBL* nella Sindrome di Noonan.

## PARTE 1

### BASI GENETICHE DELLE CARDIOPATIE CONGENITE ISOLATE

#### 1-Studio delle basi genetiche della Trasposizione delle Grandi arterie

##### *Introduzione*

La **trasposizione delle grandi arterie (TGA)** una delle più frequenti, delle più gravi e delle più misteriose cardiopatie congenite. E' frequente perché è al quarto posto come prevalenza tra le CC congenite maggiori ( 3,54/10 000 nati vivi in Europa) (Pexieder et al., 1995), rappresenta il 5% di tutte le CC e il 34% delle malformazioni troncoconali in situs solitus (Ferencz et al., 1993). E' una grave cardiopatia: se non trattata è la più frequente causa di morte cardiovascolare nel neonato (Samanek et al., 2000), la sua eziologia e morfogenesi sono ancora largamente sconosciute. Dal punto di vista della diagnosi e del trattamento medico e chirurgico enormi progressi si sono realizzati in questi ultimi anni ( 5-10) e la sopravvivenza di questi pazienti è attualmente molto incoraggiante (Kirklin et al., 1992). La forma più comune è la D-TGA caratterizzata dalla concordanza atrioventricolare e dalla arterie che nascono dai ventricoli: l'aorta è connessa al ventricolo destro, mentre l'arteria polmonare è connessa al ventricolo sinistro.(Fig. 21).

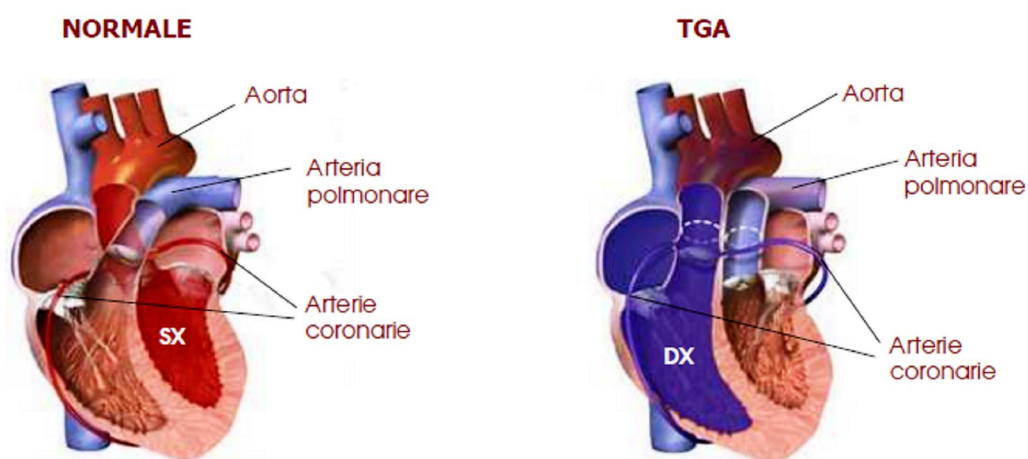


Figura 21. Trasposizione delle grandi arterie

Due principali ipotesi continuano ad affrontarsi nel tentativo di spiegare i meccanismi embriologici che portano alla TGA:

**1) anomala rotazione e assorbimento infundibolare:** secondo questa teoria compiutamente espressa da Goor e Edwards (Goor and Edwards; 1973) e che ha dei presupposti in lavori scientifici del XIX secolo (Rokitansky et al., 1975), la TGA sarebbe dovuta ad un riassorbimento preferenziale del cono sottopolmonare con un'assenza di riassorbimento del cono sottoaortico e quindi con una mancanza della normale rotazione dell'aorta (oraria vista dall'alto) verso il ventricolo sinistro. Secondo questa ipotesi, quindi la TGA rappresenterebbe l'estremo di uno spettro di destra posizione aortica "rappresentato dalle varie forme di ventricolo destro a doppia uscita fino ad arrivare alla tetralogia di Fallot e al difetto interventricolare da mal allineamento (Anderson et al., 1974)

**2) anomala spiralizzazione del setto aortico-polmonare:** questa teoria presentata nei classici lavori di de la Cruz et al., (de la Cruz et al., 1956; de la Cruz 1981), sostiene che a livello infundibolare non vi è rotazione né nell'embriologia normale né in quella patologica e che la TGA è dovuta ad uno sviluppo del setto aortico-polmonare rettilineo invece che spirale, che porta il quarto arco aortico (la futura aorta) in contatto con il cono anteriore che è sul ventricolo destro.

Entrambe queste teorie presentano alcuni punti a loro favore e altri contrari. La "teoria infundibolare" sembra più adatta a spiegare i casi con difetto interventricolare e con un certo grado di cavalcamento polmonare simili morfologicamente ai casi di ventricolo destro a doppia uscita, ma meno adatta a spiegare la TGA con setto interventricolare intatto. La "teoria extracardiaca" d'altra parte, non spiega la grande variabilità della morfologia infundibolare in questa cardiopatia (Van Praagh et al., 1971; Quero-Jiménez et al., 1974; Thiene et al., 1976)

Un argomento significativo per gli studi eziologici ed epidemiologici della TGA è la presenza di questa cardiopatia in seguito all'assunzione materna di teratogeni ed in particolare dei pesticidi (Loffredo et al., 2001). Sono sporadiche le segnalazioni di casi di TGA, in occasione di assunzione materna di antiepilettici (Weber et al., 1977), di ormoni (Redline et al., 1981) o di altri farmaci (Abramovici et al., 1981). Più consistente è invece la prevalenza di TGA nei figli di madre diabetica (Rowland et al., 1973; Ferencz et al., 1990). e in seguito ad infezione materna (influenza o ad assunzione di ibuprofene o radiazioni ionizzanti (Ferencz et al., 1997) e in altri casi di fecondazione *in vitro* (Marino et al., 1989). Una ridotta prevalenza di cardiopatie

congenite inclusa la TGA, è riportata dopo l'assunzione periconcezionale di acido folico, che può rappresentare un fattore protettivo verso le malformazioni congenite (Shaw et al., 1995).

La TGA è inoltre molto difficile da riprodurre sperimentalmente con teratogeni nei modelli animali. Dopo iniziali tentativi con irradiazione e con il tripan blu, il metodo più affidabile è attualmente quello della somministrazione dei topi di acido retinoico durante la gravidanza

(Pexieder et al., 1995). È interessante notare che, dopo questo trattamento accanto a casi con TGA e d-loop ventricolare (trasposizione semplice), si sviluppano anche casi con TGA e l-loop ventricolare (trasposizione corretta delle grandi arterie TCGA), che non è una cardiopatia tronco-conale, ma è collocata patogenicamente tra le anomalie del situs. In un altro esperimento, la somministrazione di acido retinoico ai giorni embrionari 9-15 causa nei topi il fenotipo di eterotassia (Yasui et al., 1998). Un differente timing nella somministrazione del teratogeno o nel rilevamento delle malformazioni potrebbe spiegare la differenza nel fenotipo cardiaco ottenuto, ma comunque il meccanismo patogenetico sembra essere lo stesso e si propone una parentela per queste differenti cardiopatie. Recentemente il gruppo di Amati ha osservato che la somministrazione di un antagonista dell'acido retinoico causa nei topi difetti cardiaci (81%) con una prevalenza del 61% per la d-TGA, causato dalla down-regolazione del gene *Hif1α* (Amati et al., 2010).

La TGA è raramente associata alle sindromi genetiche più comuni, come la sindrome di Turner, Noonan, Williams, Marfan, e assente nella sindrome di Down (Marino, 1996). Interessanti le sporadiche associazioni con la trisomia 8 e 18, le sindromi VACTER e CHARGE (Ferencz et al.; 1995,1997), la sclerosi tuberosa (Jiang et al., 2000) la delezione del braccio lungo del cromosoma 11 (Jacobsen et al., 1973) e del braccio corto del cromosoma 18 (Digilio et al., 2000). Anche le anomalie extracardiache sono rare nei pazienti con TGA e sono in prevalenza anomalie renali e in secondo piano anomalie cerebrali (Ferencz et al., 1995). Un discorso a parte merita l'associazione di TGA con la sindrome di DiGeorge/velocardiofacciale e delezione del braccio lungo del cromosoma 22 (del22q11). Sebbene la TGA sia presente nelle serie cliniche e patologiche di DiGeorge (Ferencz et al., 1997; Van Mierop et al., 1986), sebbene possa risultare dopo esperimenti su embrioni di pollo di ablazione delle creste neurali (Kirby et al., 1985) e sia riportata nei pazienti con del22q11 (Melchionda et al., 1995; Manner et al., 1998; Marble et al., 1998., Marino et al., 2001), la TGA non rappresenta certo una cardiopatia caratteristica di questa sindrome come lo sono la Tetralogia di Fallot (8%), il tronco arterioso (30%) e l'interruzione dell'arco aortico tipo B (85%) (Marino et al., 2001). (Fig. 22)



**del (22q11.2) EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY  
HEART DEFECTS IN 545 PATIENTS**

Normal	110 (20%)
Other clinically nonsignificant	26 (5%)
Tetralogy of Fallot	95 (17%)
Ventricular septal defect	75 (14%)
Interrupted aortic arch	74 (14%)
Pulmonary atresia/ventricular septal defect	55 (10%)
Truncus arteriosus	51 (9%)
Pulmonary valve stenosis	13 (2%)
Atrial septal defect	8 (1%)
Atrio ventricular septal defect	5 (<1%)
<b>Transposition of great arteries</b>	<b>4 (&lt;1%)</b>
Complex heart disoaso	3 (<1%)
Other significant abnormalities	26 (5%)

Figura 22. Tabella riassuntiva delle CC presenti in pazienti con del22q11.2

L'associazione tra TGA e del22q11 è quindi patogenicamente possibile, ma deve essere considerata rara e sporadica (Melchionda et al., 1995; Manner et al., 1998; Marble et al., 1998., Marino et al., 2001). Circa l'1% dei pazienti con TGA è portatore di del22q11.

Differente e più solido sembra essere il legame tra la TGA e la **sindrome etrotassica** o **situs ambiguus** (1:10 000-20 000 nati), nella quale gli organi toraco addominali sono distribuiti a caso (Fig.23). La dextrocardia, la discordanza cardio-viscerale e le cardiopatie complesse che ne conseguono possono associarsi con altri difetti, come le anomalie spleniche (asplenia, polisplenia), la mal posizione epatica, la malrotazione intestinale, e le anomalie della lobatura dei polmoni. Nei difetti completi di lateralizzazione (isomerismi) la TGA è molto frequente in associazione con il canale atrioventricolare completo, in particolare nei casi di asplenia (isomerismo destro) (Marino et al., 2000).

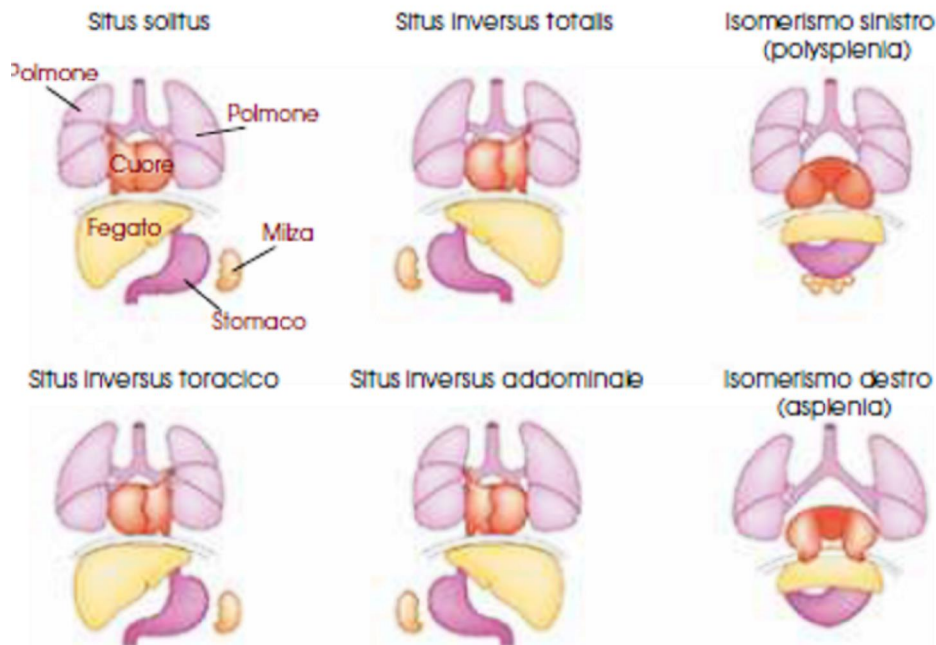


Figura 23. Alcuni esempi di malposizioni degli organi toraco addominali

Sono numerosi i geni associati a eterotassia come *ZIC3* (Gebbia et al., 1997; Ware et al, 2004; Ma et al 2011), *CRIP1* (Bamford et al., 2000), *LEFTY1* (Kosaki et al., 1999), *ACVR2B* (Kosaki et al., 1999; Ma et al., 2001), sono stati riportati inoltre singoli pazienti che presentavano mutazioni nei geni *NKX2.5* (Watanabe et al., 2002) e *CRELD1* (Robinson et al., 2003). E' stata inoltre identificata una mutazione in un paziente con dextrocardia nel gene *GATA4* (Hirayama-Yamada, 2005). Tutti questi geni codificano per proteine che appartengono o che sono coinvolte nel pathway di *NODAL* i cui segnali molecolari regolano l'asimmetria sinistro-destra del corpo e la rotazione destrorsa del tubo cardiaco. Originariamente la TGA era considerata una CC a basso rischio di ricorrenza nelle famiglie. In realtà ampliando numericamente le casistiche studiate si è rilevato che i casi familiari non sono poi tanto rari. Il rischio di ricorrenza per CC corrisponde all'1,8% (Digilio et al., 2001). In alcuni nuclei familiari con ricorrenza di CC la TGA è causata probabilmente da un singolo gene mutato o comunque è ad eziologia oligogenica. Spesso la cardiopatia è concordante. In alcune famiglie è stata documentata la ricorrenza di TGA semplice e TGA congenitamente corretta (Digilio et al., 2001). Quest'ultima non è una cardiopatia tronco-conale, ma è collocata patogenicamente tra le anomalie del situs. Di conseguenza la presenza contemporanea delle due cardiopatie nello stesso nucleo familiare costituisce una prima evidenza di collegamento tra TGA semplice e anomalie della lateralità. Inoltre a conferma di questa teoria nei topi nei quali erano stati sperimentalmente

ablato i geni SMAD2 e NODAL, implicati nei processi di lateralizzazione si sono evidenziati in più del 50 % dei casi esemplari con TGA associati ad isomerismo destro del polmone (Nomura et al., 1998).

Il primo gene ad essere associato ai difetti di lateralità è stato *ZIC3*, identificato mediante analisi di linkage da Gebbia in una famiglia in cui segregava situs ambiguus (Gebbia et al., 1997). Nello stesso lavoro gli autori hanno identificato una mutazione nel gene *NODAL* cominciando a far pensare che il pathway di Nodal fosse implicato nei difetti di lateralità. Mutazioni in *ZIC3* sono state identificate anche in casi affetti da TGA trasposizione delle grandi arterie senza altre anomalie di situs (Mégarbane et al., 2000). Altri geni dello stesso pathway rilevati mutati in soggetti con TGA non sindromica, come *CFC1* (Goldmutz et al., 2002) e *NODAL* (Mohapatra et al 2010) sono stati originariamente descritti come geni correlati a difetti della lateralità e sindromi etrotassiche (Gebbia et al., 1997; Bamford et al., 2000). Recentemente anche *GDF1* (Karkera et al., 2007) e *FOXH1* (Rossler et al., 2009) sono stati associati con la TGA isolata ed altre cardiopatie congenite. Anche il gene *PROSIT240*, è stato riscontrato mutato in pazienti con TGA (Muncke et al., 2003), confermando la grande eterogeneità genetica di questa cardiopatia.

### ***Asimmetria Sinistro-Destra***

Il primo segnale dell'asimmetria sinistro-destra si manifesta dopo 23 giorni dopo il concepimento con la formazione di un'ansa destrorsa nel tubo cardiaco primitivo. La definizione dei meccanismi molecolari che regolano questo processo è stata ottenuta in parte, dallo studio di modelli animali. Molte fasi critiche coinvolgono recettori chinasi serina/treonina, che legano proteine secrete dal transforming growth factor B (TGF-B) (Massaguè et al., 2000). Il nodo di Hensen controlla l'espressione asimmetrica dei geni attraverso il mesoderma del piatto laterale (LPM), dal quale origina successivamente la maggior parte dei visceri. Nel nodo di Hensen del pollo, il gene *Sonic Hedgehog (Shh)* è espresso a sinistra e induce l'espressione periodale di *Nodal*, un membro della famiglia dei TGF-B. In presenza di un corecettore che appartiene alla famiglia delle EGF-CFC, Nodal è in grado di legarsi ai recettori di tipo I e II presenti sulla superficie cellulare, attivando il complesso *Smad* che trasloca nel nucleo per regolare il fattore di trascrizione *Foxh1*. *Lefty 1* è espresso a livello della superficie sinistra per impedire che il segnale venga trasmesso anche nella parte destra

del mesoderma inibendo l'attivazione di Nodal mediante l'interazione con EGF-CFC (Roessler et al., 2009) (Fig.24)

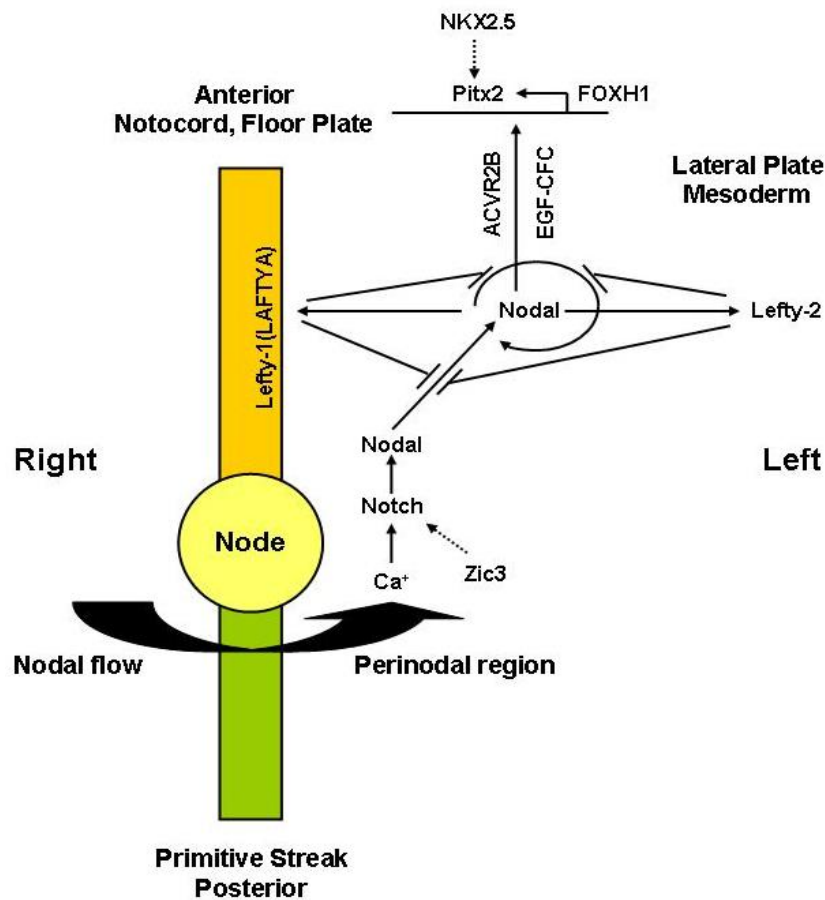


Figura 24. Geni noti per il loro ruolo nell'asimmetria sinistro-destra nel topo

Il trasferimento periferico all'LPM di questa informazione è mediato dal gene Caronte (Car), che è antagonista di una sottoclasse di membri dei TGF-B noti come proteine morfogeniche dell'osso (BMP). Car annulla l'effetto di soppressione su Nodal e Lefty-2 mediato dai BMP, e può anche inibire Nodal. L'espressione di Nodal, a sinistra, induce l'espressione di Pitx2 nel LPM, che persiste durante lo sviluppo asimmetrico degli organi nella porzione sinistra del tubo cardiaco, nell'intestino e nei polmoni, trasmettendo l'informazione sinistro-destra dal nodo ai visceri. Sul lato destro un segnale inibisce l'espressione di Shh, mentre il fattore di crescita dei fibroblasti di tipo 8 (Fgf-8) è iperespresso in prossimità del nodo dove inibisce l'espressione di Car. Di conseguenza, una via metabolica mediata da BMP reprime a destra l'espressione di Nodal e inibisce l'espressione del fattore di trascrizione SnR (snail related) (Kathiriya, Srivastava, 2000).

## **Obiettivi**

Dal momento che nell'uomo alcuni geni sono stati associati alle eterotassie, e tra questi o tra i loro "partners" molecolari, alcuni anche a forme isolate di TGA e altre CC, abbiamo voluto valutare il contributo di questi geni alla TGA. In particolare, l'analisi è stata effettuata su 10 geni, alcuni dei quali coinvolti nelle eterotassie (*ZIC3*, *ACVR2B*, *LEFTYA*, *CFC1*, *NODAL*), altri nella TGA (*FOXH1* e *GDF1*), e altri associati a altri difetti di lateralità tra cui la destrocardia (*NKX2.5*, *GATA4*, *CRELD1*). Lo studio è stato condotto su una casistica di 7 probandi familiari affetti da TGA.

## Pazienti e Metodi

### Reclutamento dei pazienti e valutazione clinica

Abbiamo selezionato una casistica di 7 pazienti con TGA completa e storia familiare di CC concordante o discordante (Fig.25) (Digilio et al., 2001). In tutti i soggetti la diagnosi cardiaca è stata confermata da una o più delle seguenti metodiche: ecocardiogramma, cateterizzazione cardiaca, intervento chirurgico, e/o autopsia. Tutti gli individui avevano situs solitus atriale, levocardia, d-loop del ventricolo e connessioni atrioventricolari concordanti. Pazienti con un singolo ventricolo o con caratteristiche tipiche dell'eterotassia sono stati esclusi dallo studio. La storia familiare dei pazienti viene riferita tramite intervista con i genitori dei probandi.

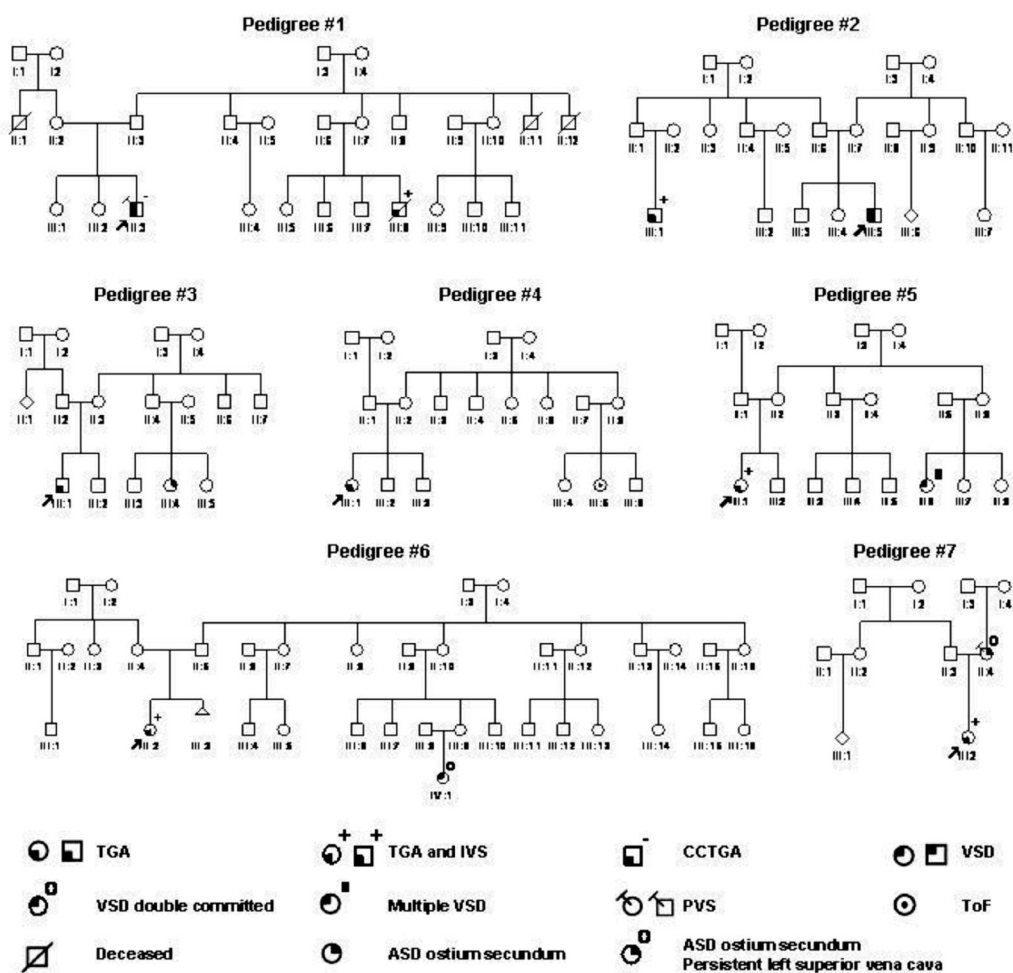


Figura 25. Pedigree delle famiglie analizzate

## **Lavoro Sperimentale**

### Prelievo ematico

Il consenso informato è stato sottoscritto da ogni soggetto incluso nello studio, o da entrambi i genitori, se il probando era minorenni al momento del prelievo. Sono stati prelevati circa 8 ml di sangue venoso in EDTA per ciascun paziente, sia sporadici che familiari. Nei casi familiari è stata eseguita l'analisi molecolare solo ad un probando e, solo dopo l'identificazione di una mutazione, è stata estesa a tutti i soggetti prelevati della famiglia.

### Estrazione del DNA

Una aliquota di 800 microlitri ( $\mu$ l) è stata prelevata per la microestrazione, effettuata mediante due successivi lavaggi con un ugual volume (800  $\mu$ l) di una soluzione di emolisi NP40 (Nonidet 0.1% e 0.9%) seguiti ciascuno da centrifugazione a 15000 rpm per 5 minuti. Il pellet di globuli bianchi così ottenuto è stato risospeso in un ugual volume di soluzione "Lisi Villo" (UREA 8M, TrisHCl pH 7.2 10mM, NaCl 0,3M, EDTA pH 8 10 mM, SDS 2%, H<sub>2</sub>O) che lisa i globuli bianchi ottenendo la fuoriuscita del DNA nucleare mediante dissociazione dei fosfolipidi di membrana e idrolisi delle proteine citoplasmatiche. Il campione è stato lasciato in agitazione per circa 45 minuti. Quando il pellet era risospeso, è stato aggiunto un uguale volume della soluzione PHEMIX (Fenolo 750mM, CIA, TrisHCl pH8 0,2M, Idrossichinolina 2 gr/L) per separare il DNA dalle proteine. Il campione è stato centrifugato a 15000 rpm per 5 minuti. Si è ottenuta così la separazione di tre fasi:

- una fase acquosa contenente il DNA
- una fase organica costituita principalmente dalle proteine
- una fase opaca costituita dalla soluzione PHEMIX.

La fase acquosa è stata recuperata e il passaggio è stato ripetuto. La fase acquosa recuperata è stata lavata con la soluzione CIA ( Alcool Isoamilico 4,2%, cloroformio1%) per eliminare i residui di fenolo. Mediante una centrifugazione a 15000 rpm per 5 minuti è stata recuperata di nuovo la fase acquosa, contenente il DNA. Il DNA è stato precipitato in un volume di etanolo assoluto freddo e purificato dai sali mediante un lavaggio con etanolo al 70%. L' etanolo è stato fatto evaporare e il pellet così ottenuto è stato risospeso in acqua bidistillata sterile. E' stata

effettuata la valutazione quantitativa e qualitativa del DNA estratto, per verificare l'efficienza di separazione dalle proteine e l'eventuale degradazione. È stata eseguita un'analisi spettrofotometrica misurando l'assorbanza del campione a 260 nm e a 280nm, e facendo il rapporto tra le due densità ottiche lette. È stata utilizzata la seguente formula di conversione per ottenere i microgrammi di DNA estratti:

$$\mu\text{g}/\mu\text{L} = A(OD) \times FD \times 50$$

dove OD è la densità ottica, FD è il fattore di diluizione, A è l'assorbanza misurata in termini di densità ottica. Inoltre, è stato misurato il rapporto OD260/OD280 che per un DNA "puro" da proteine deve essere di circa 1.8. La valutazione qualitativa è stata eseguita mediante visualizzazione al transilluminatore (programma GelDoc) del gel d'agarosio allo 0.8% con etidio bromuro (EtBr) dopo corsa elettroforetica, confrontando il DNA estratto con un marcatore di riferimento.

### Amplificazione Genica

#### Acquisizione delle sequenze genomiche

Le sequenze genomiche e dei cDNA dei geni selezionati sono stati acquisiti da banche genetiche on-line, in particolare dal sito dell'Università di Santa Cruz-California (UCSC Genome Bioinformatics- <http://genome.ucsc.edu> ) e dal sito NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Particolare attenzione è stata posta alla ricerca di isoforme specificamente espresse a livello cardiaco ed embrionale.

#### Preparazione dei primers per PCR

I primers sono stati disegnati in maniera da ottenere amplificati di lunghezza media di 300 paia di basi, idonei per l'analisi di mutazioni attraverso DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) e per l'analisi di sequenza. Le sequenze codificanti sono state identificate sulla base della sequenza genomica dei geni analizzati (*ZIC3*, *ACVR2B*, *LEFTYA*, *CFC1*, *NODAL*, *FOXH1* e *GDF1*, *NKX2.5*, *GATA4*, *CRELD1* ). Le coppie di primers sono state disegnate attraverso il database 'Primer 3' (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>). I frammenti così ottenuti comprendevano, oltre alla sequenza codificante, circa 50 paia di basi di sequenza intronica fiancheggiante.



### Reazione a Catena della Polimerasi (PCR)

Sono state messe a punto le condizioni di PCR dei singoli frammenti da analizzare mediante Mix di reazione con diverse combinazioni di MgCl<sub>2</sub> e DMSO, testando un DNA di controllo in un range di temperatura, scelto attorno al valore teorico calcolato sulla composizione di basi di ogni primer, secondo la formula:

$$T^{\circ} \text{ th.} = [(C+G) \times 3 + (A+T) \times 2] - 5$$

In seguito è stata effettuata una singola reazione di PCR per amplificare ogni singolo frammento di DNA di interesse. Per ogni campione da amplificare sono stati utilizzati: circa 100 ng di DNA genomico, 1 pmol/μl di ciascun primer specifico per la sequenza target da amplificare, 0.175 mM di deossinucleotidi-trifosfato (dNTPs), MgCl<sub>2</sub> e dimetilsolfossido (DMSO) in quantità adeguate (come da messa a punto), 0.025 unità/μl di enzima DNA Polimerasi con il suo specifico tampone di reazione (buffer) alla concentrazione finale 1X. Sono stati utilizzati due diversi enzimi ad attività polimerasica, con i relativi buffer di reazione. È stata utilizzata la GoTaq Promega Polymerase (Promega, Madison, WI) se l'amplicone doveva essere analizzato mediante DHPLC. È stata utilizzata la Taq Promega Polymerase (Promega, Madison, WI) quando il prodotto di PCR doveva essere sequenziamento. Le reazioni di PCR sono state condotte con il termociclatore Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA). L'amplificazione mediante PCR è stata avviata attivando l'enzima a 94°C per 5' (Taq Promega) o a 96°C per 4' (Go Taq Promega). Le tre fasi successive sono state: una denaturazione per 30'' a 94°C, un annealing a temperatura specifica per ciascuna coppia di primers per 30'' e una estensione a 72°C per circa 30'' (in funzione della lunghezza specifica di ogni frammento). Le tre fasi sono state ripetute 30 volte, e si sono concluse con una fase di estensione finale a 72°C per 7'.

### Analisi elettroforetica

La valutazione qualitativa è stata eseguita mediante visualizzazione al transilluminatore (programma GelDoc) del gel d'agarosio allo 0.8% con etidio bromuro (EtBr) dopo corsa elettroforetica, confrontando il DNA estratto con un marcatore di riferimento. Per confermare la presenza dell'amplicato di interesse, i prodotti della reazione sono stati caricati con una soluzione d'orange e glicerolo su un gel d'agarosio alla concentrazione di 1.8% con l'intercalante EtBr e sono stati separati mediante corsa elettroforetica. E' stato quindi possibile

determinare la lunghezza di ogni frammento, mediante il confronto con le bande di riferimento del marcatore, caricato insieme agli altri campioni da analizzare.

### Analisi mutazionale

#### Analisi DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)

La DHPLC è una tecnica che sfrutta i principi della cromatografia liquida per separare molecole di DNA eteroduplici e omoduplici in condizioni di parziale denaturazione. Infatti in presenza di una variante in eterozigosi, si vengono a formare sia molecole di DNA omoduplici (WT-WT e variante-variante) che eteroduplici (WT-variante) (fig.23).

L'analisi DHPLC è stata effettuata utilizzando uno strumento, WAVE DNA fragment analysis system (Transgenomic, Crewe, UK), dotato di una colonna DNASep (Transgenomic, Crewe, UK). I prodotti di PCR sono stati separati mediante un gradiente lineare di acetonitrile al 5% con un flusso di 1,5ml/min. Per l'analisi DHPLC sono stati utilizzati i tamponi reperibili in commercio: WAVE Optimized™ Buffer A (0,1M di trietilammonioacetato), Buffer B (0,1M di trietilammonioacetato + 25% acetonitrile), Buffer D (75% di acetonitrile), e Syringe Solution (8% acetonitrile). Le condizioni ideali di Buffer e temperatura sono state determinate mediante la versione 4.1.40 del programma WaveMaker (Transgenomic, Crewe, UK) che fornisce una previsione del profilo di denaturazione di ciascun frammento. Il programma identifica come temperatura ottimale di analisi la temperatura alla quale il 70-80% di DNA è a doppia elica ed il restante 20-30% si trova in uno stato denaturato. Nei casi in cui il programma identificava più domini di denaturazione nello stesso frammento, è stata effettuata una analisi a più temperature. Prima di estendere l'analisi all'intera casistica dei pazienti è stato necessario testare i metodi su diversi DNA di controllo. In seguito è stata effettuata l'analisi dei pazienti e per verificare ulteriormente l'affidabilità dei metodi sono stati aggiunti controlli positivi e negativi. Gli elettroferogrammi sono stati analizzati mediante il software Navigator.

### Analisi di sequenza

#### Purificazione del prodotto di PCR

Il prodotto di PCR è stato purificato per eliminare i nucleotidi non incorporati nella reazione, i sali, i primers, e i dimeri di primers per evitare eventuali interferenze nella successiva reazione di sequenza. Per la purificazione del prodotto di PCR sono state utilizzate le colonnine "Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices" (MILLIPORE) che utilizzano un filtro a membrana ad

esclusione molecolare. La reazione di PCR è stata portata ad un volume massimo di 500  $\mu$ l con acqua bidistillata. L'intero volume è stato trasferito sul filtro fornito dal Kit commerciale e centrifugato per 15 minuti a 4000 rpm. Il prodotto di PCR purificato è stato eluito dal filtro con circa 20  $\mu$ l di acqua bidistillata centrifugando 4 minuti a 4000 rpm. Il prodotto di PCR così purificato è stato controllato e quantizzato con una corsa elettroforetica su gel d'agarosio all'1,8%. Alternativamente è stato utilizzato il kit commerciale "Montage PCR $\mu$ 96 Plate" (MILLIPORE) contenente piastre da 96 pozzetti, che permette la purificazione di 96 campioni in una sola volta. Il principio di purificazione del prodotto di PCR è lo stesso delle colonnine singole: le piastre contengono alla base una membrana ad esclusione molecolare che trattiene l'amplificato separandolo dagli altri componenti della reazione. Ogni reazione di PCR è stata portata ad un volume massimo di 100 $\mu$ l con acqua bidistillata, trasferito nel pozzetto a imbuto della piastra e lasciato eluire su una pompa a vuoto che aspirando l'acqua elimina contemporaneamente i sali, i nucleotidi liberi, i primers e i dimeri. Il prodotto di PCR è stato recuperato dalla membrana con l'aggiunta di circa 20  $\mu$ l di acqua bidistillata e la risospensione mediante l'uso di un agitatore orizzontale per circa 10 minuti.

#### PCR di Sequenza

La reazione di sequenza è stata eseguita con il kit commerciale BigDye Terminator (Applied Biosistem) e Dye Primer Cycle Sequencing (Perkin Elmer, Foster City, CA) che fornisce i substrati per effettuare una reazione di sequenza con il metodo Sanger. Sono state preparate due reazioni separate, una per ciascun primer (forward e reverse). Per ogni reazione sono stati utilizzati 100 ng dell'amplificato di PCR purificato, 15 pmol/ $\mu$ l di primer, 1  $\mu$ l di mix di sequenza BigDye e 1  $\mu$ l di buffer di sequenza. La reazione è stata eseguita con un termociclatore Gene Amp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Applied Biosystems, Foster City, CA) in tre fasi successive: una denaturazione a 96°C per 10'', un annealing a temperatura specifica per 5'', una estensione a 60°C per 4 minuti. Le tre fasi sono state ripetute 30 volte e si sono concluse con una fase finale di 5' a 4°C.

#### Purificazione della reazione di sequenza

La reazione di sequenza è stata purificata per eliminare i primers e i nucleotidi liberi fluorescenti non incorporati nella reazione che altrimenti interferirebbero con la lettura al sequenziatore automatico. La purificazione è stata eseguita mediante singole colonnine "DyeEx 2.0 Spin Kit" (QIAGEN), che utilizzano il principio della cromatografia per gel-filtrazione

separando le molecole in base al peso molecolare. La purificazione avviene mediante una centrifugazione (3 minuti a 4000 rpm), nella quale il gel trattiene i componenti della reazione di sequenza lasciando eluire soltanto i frammenti di DNA generati dalla reazione. Alternativamente, è stato utilizzato il kit commerciale “Montage PCR $\mu$ 96 Plate” (MILLIPORE) oppure il kit “Millipore MultiScreen® Assay System 96-Well Filtration Plate” (MILLIPORE) contenente piastre da 96 pozzetti. Il principio di purificazione è lo stesso della cromatografia per gel-filtrazione ad esclusione molecolare. Le piastre sono state riempite con la resina “SephadexG-50 Superfine” (Amersham Biosciences, AB, Pharmacia Biotech) che è stata poi idratata con acqua bidistillata e lasciata a polimerizzare per 3 ore a temperatura ambiente o per 16-24 ore a +4°C. A polimerizzazione avvenuta si è proceduto con i passaggi di purificazione. Sono state eseguite due centrifugazioni a 1500 rpm per 10 minuti per compattare la resina. Ogni reazione di sequenza è stata portata ad un volume di 20  $\mu$ l con acqua bidistillata, è stata poi trasferita nel pozzetto della piastra e eluita mediante una centrifugazione a 1500 rpm per 5-6 minuti.

#### Analisi Bioinformatica

Per ogni variante identificata vengono effettuati studi in silico per determinare la patogenicità. L'allineamento della proteina e dei suoi ortologhi è stata generata mediante l'uso del programma ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)). La predizione della possibile patogenicità delle varianti missenso è stata ottenuta mediante il software PolyPhen ([www.genetics.bwh.harvard.edu/pph/](http://www.genetics.bwh.harvard.edu/pph/)).

## Risultati e Discussione

Lo screening dei geni *ACVR2B*, *LEFTYA*, *GDF1*, *CRELD1* e *GATA4* non ha identificato alcuna mutazione. L'analisi mutazionale del gene *NODAL* ha identificato in un probando la variante IVS2-1G>C. L'analisi *in silico* di questa variante con il programma SSF prevede che la IVS2-1G>C riduca l'attività del sito di splicing 3' dell'introne 2 del gene *NODAL* (selvatico = 93.46, mutante = 64.51, variazione (%) = -30.97). Dal momento che questa variante non è stata identificata in un campione di più di 300 individui di controllo di origine Caucasica, è molto probabile che rappresenti una mutazione patogenetica. È stato interessante rilevare la presenza nello stesso paziente di due ulteriori cambi aminoacidici, questa volta nel gene *CFC1* (61C>A; Asn21His e 140G>A; Arg47Gln) (Fig.26), che all'analisi *in silico* con il programma Polyphen risultavano rispettivamente dannosa (Arg47Gln) e benigna (Asn21His). Come per la mutazione precedente, anche queste due varianti segregavano dai genitori sani, il che indica chiaramente la penetranza incompleta di queste mutazioni. Entrambe le mutazioni di *CFC1* segregavano *in cis* dall'allele paterno e sono state identificate in 2 di 300 controlli sani.

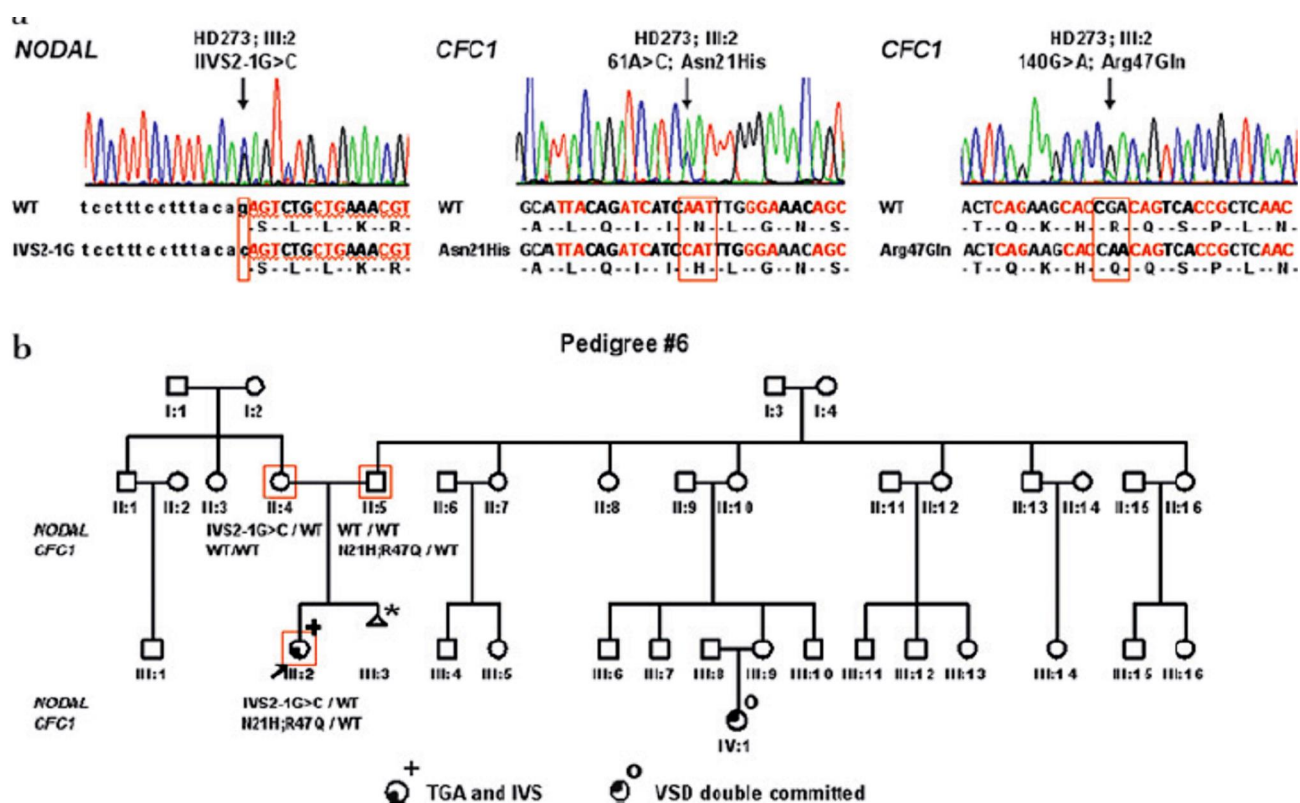


Figura 26. a) Elettrofrenogrammi delle mutazioni identificate in *NODAL*, e *CFC1*.; b) Pedigree della famiglia in cui segregano le varianti di *NODAL* e *CFC1*.

Ulteriori mutazioni sono state identificate in una seconda famiglia. Una prima mutazione e' stata identificata nel gene *FOXH1* (61C>T; Pro21Ser) in un paziente con TGA, mutato anche nel gene *ZIC3* (49G>T; Gly17Cys). Le varianti di entrambi i geni sono state ereditate dalla mamma non affetta, indicando anche in questo caso un difetto di penetranza. Per entrambe, il programma polyphen suggerisce che si tratta di mutazioni probabilmente patogenetiche. Tutte e due sono risultate assenti allo screening di 300 soggetti di controllo. Delle due, la mutazione in *ZIC3* e' stata identificata in un secondo paziente della famiglia affetto da difetti interventricolari multipli, riportati in passato e attualmente non piu' presenti. Sorprendentemente, nello stesso paziente abbiamo identificato una seconda mutazione in un residuo aminoacidico estremamente conservato del dominio homeobox della gene *NKX2.5* (448G>A Val150Ile) (27a), che codifica per un fattore di trascrizione cardiogenico implicato nei difetti della settazione associati a difetti della conduzione e piu' raramente in altre CC. La segregazione familiare di queste varianti e' riportata in Fig. 27b.

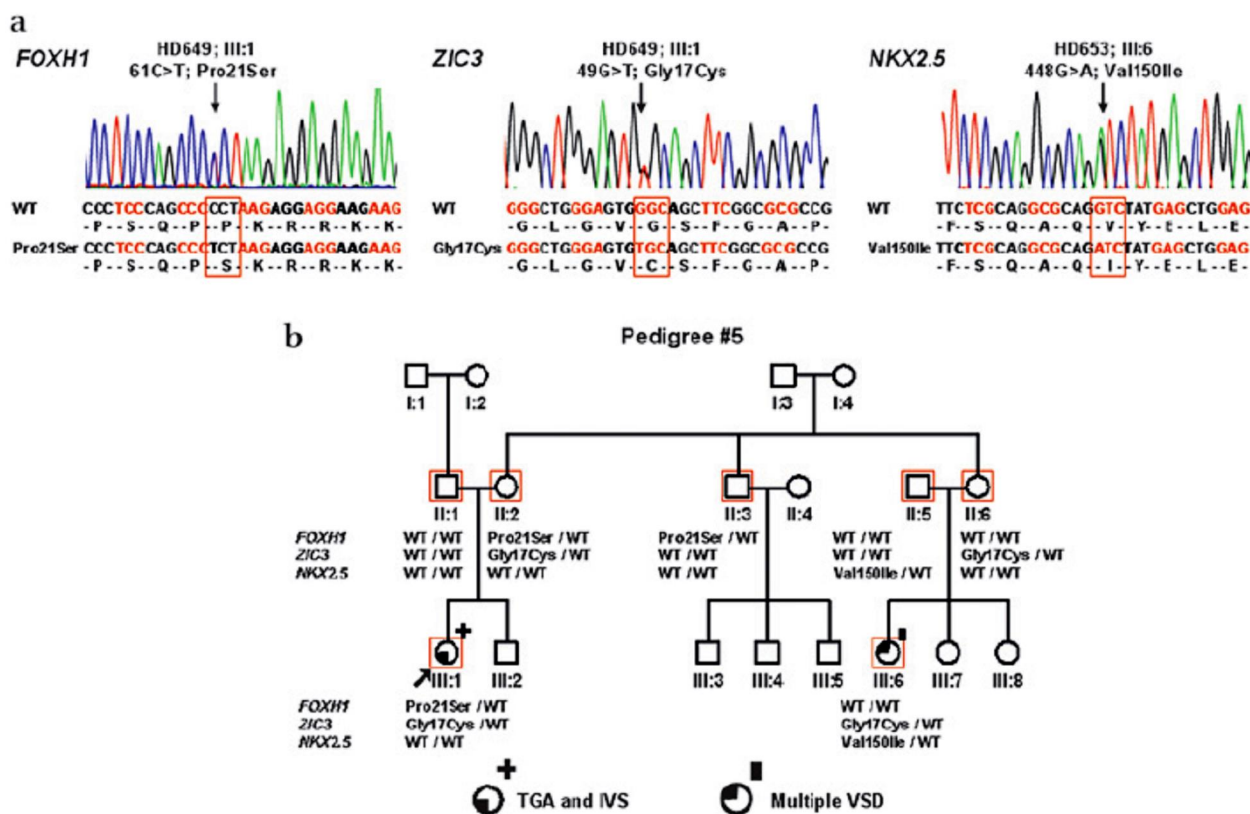


Figura 27. a) Elettrofrenogrammi delle mutazioni identificate in *FOXH1*, *ZIC3* e *NKX2.5*, *NODAL*, *CFC1*; b) Pedigree della famiglia in cui segregano le mutazioni

Il nostro paziente non presentava difetto della conduzione cardiaca. Poiché è disponibile un modello cristallizzato del dominio homeobox di questa proteina il Dr. Bellacchio (presso l'Istituto CSS-Mendel) ha dimostrato che il residuo Val150, sostituito dalla mutazione con una isoleucina, interagisce nella proteina selvatica con gli altri residui a lui prossimi tramite interazioni van der Waals, contribuendo a stabilizzare la struttura di questo importante dominio nella porzione in cui interagisce con il DNA (Fig.28)

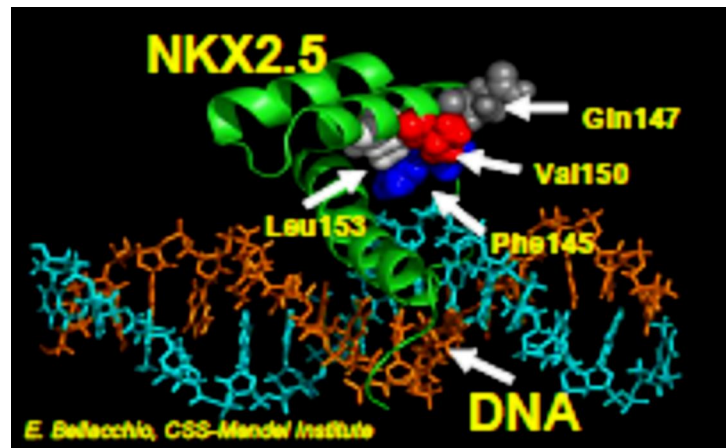


Figura 28. Analisi di modeling dell'interazione tra la proteina NKX2.5 e la doppia elica del DNA.

È importante sottolineare che questa mutazione del gene NKX2.5 non è stata identificata nello screening di oltre 300 cromosomi di controllo e come per la maggior parte delle varianti aminoacidiche identificate in questo studio alterava aminoacidi conservati quantomeno nei vertebrati (Fig.29)

Homo	MTWR-----HHVRLLEFTVSLALQIINLGN	SYQREKHNGG	REEVTKVATQK	RQSP	50
Mus	MRANSPTQGISLKMHQARPLFLVTVALQLI	GLGYSYQSE	-GDGAR-EVSNILSPVI	PGTT	58
Xenopus	-----MQLLRFLAILVFS	AKYFIKHCKGESC	VGLYCNDTGLS-LAI	KSNT	44
Danio	-----MTSQLFGFLMFAVIL	COAVSLESG	-CEGSECVKVGVSGKPK	QYAE	44
a		▲		▲	
		Asn21His		Arg47Gln	
Homo	-----MGPCSGSRLGPP	EAESP-----SQ	PKRRKKRYLRHDKPP	TYL	39
Mus	AQGYLP-----CMGPRDNSQLRP	PEAESI-----SKT	PKRRKKRYLRHDKPP	TYL	70
Xenopus	GGTWS	PDRGSMHGLSPGTQEGSCTQ	AEGTKDS-LGGDETL	SRKSKKKNYHRYAKPP	SYL 116
Danio	GGRLDK-----STGMAQDSCY	RAKATNQGPWELQDGN	SSGGKKKKNYQRYPKPP	SYL	103
b			▲		
			Pro21Ser		
Homo	MTMLLDGGPQFPGLGVG	SFGAPRH	HEMPNREPAGMGLNPF	GDSTHAAAAAAAAAA	FKLSP 60
Mus	MTMLLDGGPQFPGLGVG	SFGAPRH	HEMPNREPAGMGLNPF	GDSTHAAAAAAAAAA	FKLSP 60
Xenopus	MTMLLDGGPQFP	TLGVGGFGTARH	HEMSNRD-AGMGLNPF	TEPSH-----AA	FKLSP 52
Danio	MTMLLDSAPQFP	PSLGVGGFGT	PRHELGNRD-PGLGLSP	FADSSH-----S	AAFKISP 52
c		▲			
		Gly17Cys			
Homo	KELCALQKAVELEKTEADNAERPR	ARRRRR	KPRVLF	SQAQVYELER	RFKQORYLSAPERDQ 170
Mus	KELCALQKAVELDKAETDGAERPR	ARRRRR	KPRVLF	SQAQVYELER	RFKQORYLSAPERDQ 169
Xenopus	KDICPLQKTLEHDKREAEDPERPR	QRKRRR	KPRVLF	SQAQVYELER	RFKQORYLSAPERDH 157
Danio	KDIGFCQEDPGED-LKLDDAERPK	RKRRR	KPRVLF	SQAQVYELER	RFKQORYLSAPERDH 173
d			▲		
			Val150Ile		

Figura 29. Analisi di conservazione degli amminoacidi tra le specie

Questi risultati dimostrano che circa un quarto delle famiglie con TGA presenta mutazioni nei geni della lateralita' e pertanto e' ascrivibile allo stesso gruppo di malattie delle sindromi eterotassiche. I nostri dati sono inoltre a supporto di un modello oligogenico in questa CC, con mutazioni diverse presenti contemporaneamente nello stesso individuo che contribuiscono a determinarne il fenotipo clinico. E' stato inoltre interessante dimostrare che difetti in geni coinvolti nel pathway di *NODAL*, che determinano la spiralizzazione destrorsa delle conchiglie, si associano anche ad anomalie nella spiralizzazione cardiaca, a supporto di una relazione tra i due meccanismi morfogenetici.

I risultati di questo studio, inseriti nel contesto dei dati precedenti sui modelli murini, sull'associazione tra eterotassie e TGA e sull'identificazione precedente di famiglie in cui la TGA completa (considerata una cardiopatia troncoconale) e la TGA congenitamente corretta (appartenente al gruppo dei difetti della rotazione cardiaca) erano contemporaneamente presenti indicano che alcune TGA, forse per la maggior parte familiari, sarebbero ascrivibili allo stesso gruppo di patologie di cui fanno parte le eterotassie, che e' come dire che in alcuni casi la TGA potrebbe essere considerata una "forma frusta" di eterotassia. Ancora piu' importante della classificazione nosologica risulta l'identificazione di mutazioni in questo gruppo di geni (definiti geni della lateralizzazione) in piu' di un quarto delle forme familiari di TGA, un dato che



una volta confermato potrebbe dare supporto a test genetici mirati per questo tipo di cardiopatie. L'aver identificato diverse mutazioni di geni appartenenti allo stesso pathway nello stesso paziente lascia inoltre presupporre un modello digenico, oligogenico o quantomeno complesso per queste patologie e apre uno spiraglio per la ricerca di geni responsabili nelle forme sporadiche. Inoltre l'identificazione di mutazioni del pathway di NODAL in una CC associata ad una sindrome da malposizione degli organi, permette di intravedere correlazioni interessanti tra il meccanismo di spiralizzazione cardiaca e altri eventi morfogenetici lungo la scala evolutiva come la spiralizzazione delle conchiglie dei molluschi, un processo anch'esso sottoposto al controllo degli stessi geni.

## **2-Ruolo della connessina 43 nel difetto cardiaco Criss-Cross**

### ***Introduzione***

Il cuore a Criss Cross è una rara cardiopatia congenita con una prevalenza di appena 8:1000 000 nati. Caratterizzata da una anormale rotazione della massa ventricolare attorno al suo asse maggiore che comporta una relazione anomala tra le camere ventricolari e le strutture atriali (Van Praagh et al 1977). Ci può essere sia una concordanza sia una discordanza ventricolo-arteriosa (Van Praagh et al 1977; Anderson et al., 1974; Marino et al., 1982).

Non sono note le basi genetiche del difetto o altri eventuali meccanismi implicati in questa anomalia dello sviluppo. Spesso si ritrova associato ad altre gravi cardiopatie congenite. Caratteristiche comuni sono l'ipoplasia della valvola tricuspide e del ventricolo destro e la stenosi polmonare. L'allineamento ventricolo-arterioso è solitamente anomalo con la presenza di TGA e ventricolo destro a doppia uscita.

La connessina 43 è una proteina abbondantemente espressa durante lo sviluppo cardiaco presente già a livello dell'embrione nello stadio di 8 cellule (Van Kempen et al., 1991). Topi ablati sperimentalmente di entrambe le copie del gene sviluppano malformazioni cardiache prevalentemente a livello della connessione tra il ventricolo destro e il tratto d'efflusso (Reaume et al., 1995; Kirchhoff et al., 2000). Tuttavia, la prima anomalia che si riscontra durante lo sviluppo cardiaco è un ritardo della rotazione del tubo cardiaco e il progressivo sviluppo dei cuscinetti intertrabecolari a livello della giunzione del ventricolo destro con il tratto d'efflusso (Ya et al., 1998). Nello sviluppo cardiaco di topi normali, il tratto ascendente del tubo cardiaco si posiziona in maniera destrorsa (D-loop) dopo 9 giorni dalla fecondazione, mentre nei topi in cui sono state ablate sperimentalmente entrambe le copie del gene il tubo cardiaco si mantiene simmetricamente in una posizione centrale (A-loop). La configurazione A-loop solitamente si trasforma in D-loop dopo circa 11 giorni dalla fecondazione. Tuttavia se la configurazione A-loop persiste il cuore si svilupperà in maniera anomala con le parti più distali del cuore ruotate di 90° risultando in una configurazione simile a quella che si trova in un cuore Criss Cross negli esseri umani. (Marino et al., 1986).

Il gene *GJA1* appartiene alla famiglia dei geni codificanti per le connessine; di questi almeno 5 sono espresse nel tessuto cardiaco in cui la *CX43* è il tipo maggiormente presente. La proteina

codificata è una componente delle giunzioni gap, che assicurano la diffusione del segnale attraverso canali intercellulari.

**Obiettivo**

Obiettivo del presente sottoprogetto è stata l'analisi del ruolo della proteina CX43 su una casistica di pazienti affetti da anomalia Criss-Cross.

### **Reclutamento dei pazienti e valutazione clinica**

Abbiamo selezionato una casistica di 7 pazienti con Cuore a Criss Cross. In tutti i soggetti la diagnosi cardiaca è stata confermata da ecocardiografia bidimensionale, ecoangiografia (Marino et al., 1986). Le caratteristiche anatomiche dei pazienti sono riportate in Tab. 1. Il consenso informato è stato sottoscritto da ogni soggetto incluso nello studio, o da entrambi i genitori, se il probando era minorenne al momento del prelievo. Sono stati prelevati circa 8 ml di sangue venoso in EDTA per ciascun paziente.

Table 1. Anatomic features of patients with criss-cross heart		
Patients	Segmental alignment following Van Praagh et al. [1]	Additional cardiac defects
MIX17	(S,L,S), levocardia	Mitral valve hypoplasia, VSD, PS
MIX28	(S,D,D), levocardia	VSD, TGA, PS
MIX74	(S,D,D), levocardia	VSD, TGA
CR1	(S,D,S), levocardia	VSD
MIX16	(S,D,L), dextrocardia	VSD, TGA, PA
CR2	(S,D,L), dextrocardia	VSD, TGA, PS
MIX10	(S,D,L), dextrocardia	VSD, TGA, PS

VSD=ventricular septal defect; TGA=transposition of the great arteries;

PS=pulmonary stenosis; PA=pulmonary atresia

*Tabella 1. Caratteristiche anatomiche dei pazienti analizzati*

### ***Analisi mutazionale***

L'analisi di mutazioni è stata eseguita mediante sequenziamento diretto dei 2 esoni codificanti e delle giunzioni esone-inttome nei pazienti Criss-Cross. La PCR ottenuta è stata purificata con colonnine Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices" (MILLIPORE) ed entrambi i filamenti sono stati sequenziali utilizzando la chimica del Big Dye Terminator v 3.1 (Applied Biosystem). I prodotti di sequenza sono stati purificati utilizzando le colonnine DyeEx 2.0 Spin Kit, Qiagen. 2 microlitri di ogni purificato di sequenza sono stati miscelati con 20 microlitri di formammide, denaturati per 5 minuti a 95° e risolti mediante elettroforesi capillare sul sequenziatore automatico ABI prism 3130 Genetic Analyses ( Applied Biosystem). La lettura degli elettrofenogrammi è stata effettuata utilizzando i programmi dedicati SeqAnalysis (Applied Biosystem) e SeqMan (DNA Star) confrontando la sequenza ottenuta con la sequenza di riferimento presente nel database dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## ***Risultati e discussione***

L'analisi di sequenza del gene *CX43* non ha identificato nessuna mutazione patogenetica nella casistica presa in esame. Questo risultato indica che le mutazioni del gene *Cx43* non sono causa della cardiopatia criss-cross nell'uomo o quantomeno non ne sono una causa importante. I modelli animali con ablazione di specifici geni (Knockout) hanno permesso di identificare proteine chiave coinvolte nello sviluppo cardiaco ( Bruneau et al., 2001; Lyons et al., 1995).

L'assenza di mutazioni nel gene *CX43* potrebbe essere spiegata dal fatto che non sempre funzionalmente i modelli murini sono totalmente sovrapponibili all'uomo. In particolare le connessine sono geni molto conservati sia a livello di sequenza nucleotidica e proteica che di posizione cromosomica tra uomo e topo ma presentano delle differenze a livello di pattern di trascrizione, alcune di esse sono presenti solo nel topo altre solo nell'uomo (Sohl et al., 2004) . Inoltre gli ortologi delle connessine non sono necessariamente espresse nei stessi tessuti o tipi cellulari (Sohl et al., 2004). Un ulteriore possibile causa per cui il nostro studio non ha permesso di identificare mutazioni nella *CX43* nei pazienti analizzati potrebbe essere la loro letalità nell'uomo, si è visto infatti che topi Knockout per entrambe le copie del gene muoiono appena dopo la nascita. Nell'uomo mutazioni del gene *GJA1* sono responsabili della displasia oculo-dento-digitale (DODD) che viene trasmessa come carattere autosomico dominante a elevata penetranza ed espressione variabile (Paznekas et al., 2003). Mutazioni del della *CX43* sono riportate anche in pazienti con sindattilia di tipo III (Richardson et al., 2004) e in un fenotipo recessivo che presenta caratteristiche della Sindrome Hallermann–Streiff e ODD (Pizzuti et al., 2004). E' stato descritto inoltre un caso con mutazioni nel gene *GJA1* e difetti della lateralità associati a cardiopatie complesse. (Britz-Cunningham et al., 1995), quest'ultima associazione deve essere ancora confermata da altri studi (Debrus et al., 1997; Casey et al., 1995; Gebbia et al., 1996; Splitt et al., 1995). Un ipotesi intrigante ci porta a pensare che il Cuore Cross si potrebbe originare in seguito a difetti nella regolazione dei primi stadi del processo dello sviluppo embrionale in cui deve stabilirsi l'asimmetria sinistro-destra. Questo dato viene supportato dal fatto che la maggior parte dei nostri pazienti presenta TGA. Tutti questi geni che regolano l'asimmetria sinistro-destra del corpo e la rotazione destrorsa del tubo cardiaco insieme ai fattori di trascrizione cardiogenici che regolano i primi stadi dello sviluppo cardiaco potrebbero essere geni candidati al fine di una migliore comprensione della patogenesi della cardiopatia Criss-Cross.

### **3-Studio del mosaicismo somatico nelle cardiopatie congenite isolate (CC)**

#### ***Introduzione***

Le mutazioni identificate nei geni noti sono per lo più mutazioni private e si associano prevalentemente a un fenotipo cardiaco a segregazione familiare. Le CC sono però più spesso eventi sporadici all'interno delle famiglie. La maggior parte di questi geni codifica per fattori di trascrizione cardiogenici. Questi ultimi fanno parte di un network regolatorio che controlla la cardiogenesi dagli insetti all'uomo, come dimostrano i modelli murini. In genere, questi fattori esplicano la loro attività attraverso la formazione di complessi trascrizionali multiproteici, nei quali interagiscono in maniera sinergica. Studi biochimici hanno dimostrato ad esempio che i fattori di trascrizione *NKX2.5*, *GATA4* e *TBX5* possono interagire tra di loro, con *FOG2*, e con una moltitudine di altri fattori trascrizionali (Bruneau, 2002) (vedere introduzione generale). Nell'uomo, sono state identificate diverse mutazioni in questi geni.

Le prime mutazioni del gene *NKX2.5* sono state descritte nel 1998 da Schott e collaboratori in quattro estese famiglie segreganti difetti interatriali (DIA), difetti interventricolari (DIV), tetralogia di Fallot (TOF), stenosi della valvola aortica, ipertrofia ventricolare e atresia della valvola polmonare (Schott et al., 1998). Tutti i pazienti presentavano anomalie della conduzione cardiaca atrioventricolare, come blocco di conduzione atrioventricolare (BAV) di primo, secondo o terzo grado. Questa anomalia funzionale era presente anche in un individuo privo di anomalie cardiache strutturali. Nel complesso, tutti i soggetti affetti presentavano BAV, nell'84% dei casi associato a DIA ostium secundum. L'analisi degli alberi genealogici indicava una trasmissione autosomica dominante, a penetranza completa ed espressività variabile. L'analisi di sequenza del gene *NKX2.5* in queste famiglie ha identificato tre mutazioni in eterozigosi, una delle quali interessava un aminoacido altamente conservato nell'HD proteico, mentre le altre due causavano l'inserimento di un codone di stop prematuro con conseguente produzione di una proteina tronca. È stato ipotizzato che queste mutazioni alterassero sequenze specifiche di legame al DNA, e che l'aploinsufficienza di *NKX2.5* potesse essere la causa dei difetti congeniti (Schott et al., 1998). In seguito, gruppi indipendenti hanno confermato che mutazioni di questo gene sono responsabili di varie CC, ed in particolare di DIA associato a difetti di conduzione, DIV ed in alcuni pazienti anche di anomalie troncoconali (Benson et al., 1999; Goldmuntz et al., 2001; McElhinney et al., 2003; Elliot et al., 2003; Hosoda et al., 1999; Guitierrez-Roelens et al., 2002). Ad oggi sono riportate 40 mutazioni nell'HD del



fattore di trascrizione *NKX2.5*; non vi è una correlazione genotipo-fenotipo (Reamon-Buettner, 2010) e spesso le stesse mutazioni in individui diversi a volte appartenente alla stessa famiglia possono dar luogo a diverse CC, come risultato di un'interazione con i fattori ambientali o con la presenza di mutazioni in altri geni coinvolti nello sviluppo cardiaco ( De Luca et al; 2010).

Mentre per quanto riguarda il gene *GATA4* nel 2003 un gruppo di ricercatori statunitensi ha studiato due estese famiglie con numerosi soggetti affetti da DIAos e conduzione cardiaca normale (Garg et al., 2003). In una delle due famiglie, alcuni degli affetti presentavano anche altre CC, come DIV, SVP e CAV. L'analisi dell'albero genealogico indicava una trasmissione autosomica dominante a penetranza apparentemente completa. L'analisi di linkage ha permesso di individuare una regione localizzata sul braccio corto del cromosoma 8 condivisa da tutti gli affetti, in cui era stato precedentemente mappato il gene *GATA4*. L'analisi di mutazione del gene ha individuato la presenza di due mutazioni in eterozigosi in tutti gli affetti ed in nessun soggetto sano, a conferma della penetranza completa del difetto genico. In seguito, sono state descritte altre famiglie, in cui segregava una forma geneticamente sovrapponibile di DIA, con o senza SVP e conduzione normale (Sarkozy et al., 2005, Hirayama-Yamada). La segregazione delle mutazioni del gene *GATA4* in soggetti affetti da difetti di settazione cardiaca (Garg et al., 2003) ha fornito le prime evidenze che anche le mutazioni di questo gene siano causa di difetti del setto interatriale non sindromico. Questa evidenza è avvalorata anche dalla presenza di difetti di settazione cardiaca nei pazienti con sindrome 8p-, dove mappa il gene *GATA4* (Pehlivan et al., 1999). Mutazioni nel gene *GATA4* sono state identificate con una frequenza del 1-4% in pazienti sporadici con difetti della settazione e difetti troncoconali (Tomita-Mitchell et al., 2007; Zhang et al., 2008 ; Rajagopal et al., 2007 ; Nemer et al., 2006). Le mutazioni nel gene *GATA4* sono associate a difetti della settazione cardiaca, soprattutto interatriale. Al contrario di *NKX2.5*, il gene *GATA4* non sembra coinvolto nello sviluppo del sistema di conduzione, in quanto mutazioni in questo gene non sono state associate a BAV. Mutazioni del gene *TBX5*, un fattore di trascrizione che interagisce con *NKX2.5* e *GATA4* e che se mutato causa la sindrome di Holt-Oram, sono state recentemente correlate a CC non associate a sindrome di Holt-Oram. Recentemente, è stata anche identificata una famiglia con una forma di DIA autosomica dominante associata ad una mutazione nel gene *MYH6*, un target trascrizionale di *TBX5*.

Il mosaicismo somatico (MS) è quella condizione in cui una mutazione occorre dopo la fecondazione dell'ovulo da parte dello spermatozoo, e risulta pertanto presente solo in una

porzione delle cellule o dei tessuti del futuro individuo. Questo meccanismo, ben noto nei tumori, e' stato dimostrato anche in numerose malattie genetiche.

Il MS e' stato ipotizzato anche nelle CC, dove potrebbe essere responsabile di un certo numero di casi sporadici. In accordo con questa ipotesi, gli screening genetici effettuati fino ad oggi su DNA estratto da sangue periferico (costituzionale) hanno identificato un numero limitato di mutazioni, per la maggior parte in casi familiari. Se le mutazioni fossero localizzate nel tessuto cardiaco, che raramente viene studiato poiche' difficile da reperire, o nelle regioni intrinche, finora trascurate dagli studi genetici, lo screening effettuato su DNA estratto da linfociti del sangue periferico risulterebbe negativo. Bisogna inoltre considerare che la maggior parte dei geni che controllano lo sviluppo cardiaco e' coinvolta anche nello sviluppo di altri organi. Mentre una mutazione germinale potrebbe essere letale a livello embrionale, o causare altre anomalie oltre alla cardiopatia, una mutazione in mosaico, circoscritta al tessuto cardiaco, potrebbe causare la cardiopatia isolata, e lasciare inalterato lo sviluppo degli altri organi.

L'analisi genetiche sui soggetti affetti da sindromi autoimmuni linfoproliferative hanno mostrato che le genotipizzazioni del DNA estratto dal sangue periferico non sempre riescono ad evidenziare tutte le alterazioni genetiche responsabili della malattia (Holzelova et al., 2004). Questo studio ha anche dimostrato che le mutazioni somatiche possono causare anche patologie non tumorali e che è di fondamentale importanza analizzare le cellule e i tessuti interessati dallo specifico difetto. Le mutazioni somatiche possono insorgere in linee cellulari distinte durante i vari di sviluppo embrionale o nella vita adulta, e le loro implicazioni patologiche dipendono dal momento in cui compaiono. Le mutazioni somatiche che insorgono durante i primi stadi dello sviluppo embrionale possono interessare la struttura, la funzione e la sopravvivenza dei tessuti che prendono origine dalla linea cellulare colpita dalla mutazione.

Per verificare l'eventuale ruolo delle mutazioni somatiche nella patogenesi delle CC, Reamon-Buettner e Borlak hanno analizzati i geni codificanti per alcuni fattori di trascrizione cardiogenici in una casistica di cuori malformati fissati in formalina (la "serie di cuori malformati di Leipzig") affetti prevalentemente da difetti dei setti (16 DIA, 29 DIV, e 23 CAV). Sorprendentemente, le analisi di sequenza hanno rivelato la presenza di numerose mutazioni dei geni *NKX2.5*, *GATA4*, *TBX5* e *HEY2* nei tessuti patologici (Tab.2), e la completa assenza di mutazioni a livello dei tessuti normali degli stessi pazienti (Reamon-Buettner et al., 2004A; Reamon-Buettner e Borlak, 2004B; Reamon-Buettner e Borlak, 2004C; Reamon-Buettner e Borlak, 2005; Reamon-Buettner e Borlak, 2006A ; Reamon-Buettner e Borlak, 2006B).

Gene	Casistica analizzata	Mutazioni somatiche
NKX2.5	68 tra DIA, DIV e CAV	35 mutazioni, alcune specifiche del DIV e del CAV
HEY2	52 tra DIV e CAV	3 mutazioni non sinonime in 2 CAV
TBX5	68 tra DIA, DIV e CAV	9 mutazioni in DIA e CAV, no nei DIV
HAND1	31 CSI	Mutazione A126fs in 24 ventricoli ipoplasici
GATA4	68 tra DIA, DIV e CAV	23 mutazioni

*Tabella 2. Mutazioni somatiche identificate nei fattori di trascrizione cardiogenici da Reamon-Buettner e Borlak*

Ancora più sorprendente era la presenza di mutazioni multiple e di aplotipi diversi nello stesso tessuto. Questi risultati hanno suggerito agli autori che queste mutazioni fossero somatiche. Il meccanismo attraverso il quale originano queste mutazioni, singole o multiple, non è del tutto chiaro. La presenza di mutazioni multiple e di specifici aplotipi potrebbe essere spiegata dalla presenza di una popolazione mista di cardiomiociti con genotipi diversi, dalla presenza di riarrangiamenti cromosomici de novo o da duplicazioni geniche. Tuttavia, la frequenza e l'occorrenza delle mutazioni multiple suggerisce un meccanismo nuovo di mutazione genica, come la conversione genica a partire da uno pseudogene.

L'utilizzo di materiale genetico conservato in formalina va considerato con cautela, anche se gli autori ritengono che le mutazioni identificate non sono dovuti ad artefatti da conservazione. Le mutazioni sono state riconfermate due volte, con tecniche molecolari diverse, analizzando anche tessuti differenti. Inoltre, le mutazioni sono state identificate solo in alcuni geni, mentre altri, come i geni *MEF2C*, *CFC1* o *BRCC2* sono risultati negativi (Reumen-Buettner e Borlak, 2006B).

In seguito a questi primi dati, Gollob e collaboratori hanno identificato mutazioni somatiche del gene *GJA5*, codificante per la connessina 40, in soggetti affetti da fibrillazione atriale. Anche in questo studio, le mutazioni sono state identificate solo a livello del tessuto patologico (atriale), ed erano assenti sia in altre porzioni cardiache che a livello periferico. L'unico soggetto che presentava una mutazione costituzionale aveva ereditato la mutazione dalla madre affetta (Gollob et al., 2006). A differenza dei lavori effettuati da Reumen-Buettner e collaboratori, questo studio non ha analizzato tessuti conservati, e quindi erano esclusi eventuali artefatti da archiviazione o da formalina.

Recentemente Draus e collaboratori hanno escluso la presenza di mutazioni somatiche nel gene *NKX2.5* in una casistica di 28 cuori malformati congelati affetti prevalentemente da difetti dei setti interatriali (DIA), interventricolari (DIV) e atrioventricolari (CAV) (Drauset al., 2009). Questi dati confermano il sospetto che le mutazioni identificate da Reumen-Buettner e collaboratori fossero il risultato della lunga conservazione in formalina dei tessuti cardiaci.

Nel complesso, questi primi dati suggerivano che le mutazioni somatiche potevano rappresentare una causa rilevante di CC sporadiche. Questi dati non sono stati ancora dimostrati in altri lavori ma necessitano ovviamente di ulteriori conferme, che, data la difficoltà di accesso ai tessuti cardiaci patologici, non sono di facile effettuazione.

### ***Obiettivi***

L'obiettivo di questo studio è di verificare il ruolo patogenetico delle mutazioni somatiche dei fattori di trascrizione cardiogenici *NKX2.5* e *GATA4* in una casistica di cuori malformati congelati.

## ***Pazienti e Metodi***

### *Reclutamento dei pazienti e valutazione clinica*

I 62 pazienti sporadici affetti da CC oggetto dello studio (Tab. 3) sono stati selezionati tra i pazienti operati per correzione chirurgica affetti afferenti all' Ospedale San Ignacio di Bogotà ed all'Ospedale Monaldi di Napoli a partire da Marzo 2008 a Dicembre 2009. In tutti i soggetti la diagnosi cardiaca è stata confermata da una o più delle seguenti metodiche: ecocardiogramma, cateterizzazione cardiaca, intervento chirurgico, e/o autopsia. Lo studio fenotipico e clinico generale del paziente ha compreso una valutazione auxologica e dei dismorfismi facciali, una valutazione di malformazioni/caratteristiche cliniche extracardiache, mediante indagini di tipo non invasivo, come l'ecografia addominale per evidenziare eventuali malformazioni renali od epatiche, e di tipo invasivo se necessario, quali radiografie. Particolare attenzione è stata posta alla diagnosi di eventuali associazioni sindromiche, nei quali rientrano le specifiche cardiopatie in esame, quali la sindrome di Down, la SN, la sindrome da delezione 8p23 e la sindrome da delezione 22q11. In particolare, allo scopo di escludere la presenza di una sindrome da del22q11, nei pazienti con cardiopatie TC è stato analizzato il velo-faringe, per verificare la presenza di difetti anatomici e/o funzionali, è stata indagata la presenza di ipocalcemia neonatale e di ipoparatiroidismo o la suscettibilità alle infezioni. Inoltre, è stata valutata anche la morfologia del timo, e la presenza di eventuali difetti nelle varie aree di sviluppo cognitivo e del linguaggio. Sono stati esclusi dal lavoro sperimentale i pazienti con aneuploidie cromosomiche (trisomia 21, 13 e 18), microdelezioni cromosomiche o con un fenotipico sindromico.

Tutti i pazienti sono sporadici. Di ogni paziente è stata effettuata una biopsia di circa 0.15-1.5 g di tessuto cardiaco localizzato in prossimità del difetto cardiaco (1-3 mm ) e del corrispondente tessuto cardiaco non-afetto. I tessuti cardiaci prelevati sono stati immediatamente congelati a -80°. E' stato effettuato prima della trasfusione un prelievo di sangue venoso in EDTA. Il consenso informato è stato sottoscritto da ogni soggetto incluso nello studio, o da entrambi i genitori, se il probando era minorenne al momento del prelievo.

Il DNA è stato estratto secondo il metodo fenolo-cloroformio già descritto nel capitolo precedente.

<b>Difetto cardiaco</b>	<b>n° pazienti</b>
<b>Difetti della settazione</b>	<b>35</b>
Difetti interatriali (DIA)	11
-Ostium primum	4
-Ostium secundum	7
Difetti interventricolari (DIV)	<b>18</b>
-Perimembranoso	9
-Muscolare	7
-Sopracristali	2
Difetti del setto atrioventricolare (DSAV)	<b>6</b>
-Canale atrioventricolare completo (CAV)	3
-Canale atrioventricolare parziale (CAV)	3
<b>Lesioni ostruttive del cuore sinistro</b>	<b>19</b>
- Coartazione dell'aorta (CoA)	14
- Insufficienza mitrale (IM)	1
- Stenosi aortica (SA)	2
- Membrana subaortica (MS)	1
- Valvola aortica bicuspidale (VAB)	1
<b>Difetti troncoconali</b>	<b>5</b>
- Tetralogia di Fallot (TF)	4
- Truncus arteriosus (TA)	1
<b>Altre CC isolate</b>	<b>3</b>
- Trasposizione delle grandi arterie (TGA)	1
- TGA congenitamente corretta (TGACC)	1
- Ritorno venoso anomalo totale (RVAT)	1

*Tabella 3. Caratteristiche anatomiche dei pazienti analizzati*

### Analisi Mutazionale

L'intera regione codificante e le giunzioni esone-introne dei geni *NKX2.5* e *GATA4* è stata amplificata mediante PCR e la ricerca di mutazioni è stata eseguita mediante metodica DHPLC (Transgenomic, Omaha, NE). L'esone 1.1 di *NKX2.5* è stato sequenziato a causa della presenza della presenza del polimorfismo 63A>G; Glu21Glu, (refseq: rs2277923) molto frequente nella popolazione generale. Le coppie di primers sono state disegnate attraverso il database 'Primer 3' (v 0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) basandosi sulle sequenze codificanti identificate sulla base della sequenza genomica disponibile in Genebank [*NKX2.5* (NM\_004387.3), *GATA4* (NM\_002052.3)] . I primers sono stati disegnati in maniera da ottenere amplificati di lunghezza media di 300 paia di basi, idonei per l'analisi di mutazioni attraverso DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) e per l'analisi di sequenza. I frammenti che mostravano un profilo DHPLC etero duplice vengono riamplicati mediante PCR a partire dal DNA di partenza. L'analisi di mutazioni è stata eseguita mediante sequenziamento diretto dei 2 esoni codificanti e delle giunzioni esone-inttome nei pazienti Criss-Cross. La PCR ottenuta è stata purificata con colonnine Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices" (MILLIPORE) ed entrambi i filamenti sono stati sequenziati utilizzando la chimica del Big Dye Terminator v 3.1 ( Applied Biosystem). I prodotti di sequenza sono stati purificati utilizzando le colonnine DyeEx 2.0 Spin Kit, Qiagen. 2 microlitri di ogni purificato di sequenza sono stati miscelati con 20 microlitri di formammide, denaturati per 5 minuti a 95° e risolti mediante elettroforesi capillare sul sequenziatore automatico ABI prism 3130 Genetic Analyses ( Applied Biosystem). La lettura degli elettrofenogrammi è stata effettuata utilizzando i programmi dedicati SeqAnalysis (Applied Biosystem) e SeqMan (DNA Star) confrontando la sequenza ottenuta con la sequenza di riferimento presente nel database dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

### Analisi Bioinformatica

Per ogni variante identificata vengono effettuati studi in silico per determinare la patogenicità. L'allineamento della proteina e dei suoi ortologhi è stata generata mediante l'uso del programma ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)). La predizione della possibile patogenicità delle varianti missenso è stata ottenuta mediante il software PolyPhen ([www.genetics.bwh.harvard.edu/pph/](http://www.genetics.bwh.harvard.edu/pph/)).



## Risultati e discussione

Tutte le regioni codificanti e le giunzioni esone-introne di 62 pazienti sporadici con CC prevalentemente costituite da difetti dei setti, sono state analizzate mediante DHPLC e sequenziamento diretto. Per escludere che le varianti identificate fossero confinate al solo tessuto cardiaco affetto sono stati analizzati anche il tessuto cardiaco sano e il sangue dello stesso paziente. L'analisi mutazione del gene *NKX2.5* ha identificato una sostituzione amminoacidica nota non-sinonima (c.73C>T; p.Arg25Cys), e due varianti comuni, una silente (63A>G; Glu21Glu), e una nel 3' UTR del gene (c\*61G>T, refSNP: rs703752). L'analisi mutazionale del gene *GATA4* ha identificato 8 varianti nucleotidiche in 9 pazienti, tra cui 3 sostituzioni non sinonime, una delle quali non ancora descritte in letteratura (c.470C>G; p157Cys) (Fig. 30), una variante silente (c.43C>T; p. Ala181Ala) e un cambio nucleotidico nella sequenza 5'UTR (c. -193G>C).

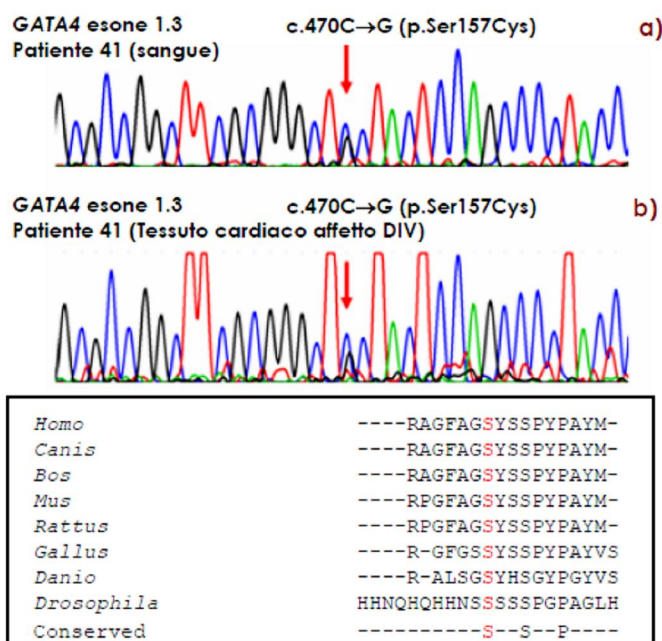


Figura 30. Elettrofrenogramma e analisi di conservazione della Ser157 di *GATA4*

Nella tabella 4 sono riportate tutte le varianti identificate e i fenotipi anatomici cardiaci associati. Tutte le varianti identificate nel tessuto cardiaco affetto sono presenti anche nel tessuto cardiaco, questo dimostra che si trattava di varianti costituzionali. Non è stata identificata quindi nessuna mutazione somatica nella casistica analizzata. E' stato possibile

escludere la presenza della variante c.IVS2+23C >T identificata in un paziente italiano in 200 controlli sani della popolazione caucasica . Purtroppo non è stato possibile escludere le altre varianti nella popolazione essendo state identificate nella pazienti di origine colombiana.

Gene	Cambio nucleotidico	Cambio amminoacidico	Fenotipo cardiaco (numero di pazienti)
NKX2.5	c.63A>G	p.Glu21Glu	DIV (11), DIA (4), CoA (8), TF (2), SA (2), TGA (1), MS (1), CAV (1), RVAT (1), VAB (1), SP (1), e TA (1)
	c.73C>T	p.Arg25Cys	CoA (2)
	c.*61G>T	-	DIV (4), DIA (5), CoA (7), CAV (3), IM (1)
GATA4	c.-193G>C	-	CoA (1)
	c.543C>T	p.Ala181Ala	TGA (1)
	c.470C>G	p.Ser157Cys	DIV (1)
	c.IVS2+23C>T	-	DIV (1)
	c.IVS3-14T>C	-	DIV (1)
	c.1129A>G	p.Ser377Gly	DIV (1), CoA (1)
	c.1138G>A	p.Val380Met	CAV (1)
c.IVS5-20G>A	-	DIV (1)	

*Tabella 4. Varianti nucleotidiche identificate nello studio e fenotipo cardiaco associato*

Ad oggi, ci sono pochi studi che hanno analizzato il mosaicismo somatico nelle CC. I lavori di riferimento sono quelli del gruppo del Prof. Borlak sulla collezione di cuori Leipzig in Germania. Questi lavori descrivono lo screening di mutazione dei principali fattori di trascrizione cardiogenici su tessuti ottenuti da cuori fissati in formalina, e riportano l'identificazione di mutazioni somatiche nei geni *NKX2.5*, *GATA4*, *HAND1*, *HEY1* ((Reamon-Buettner et al., 2004A; Reamon-Buettner e Borlak, 2004B; Reamon-Buettner e Borlak, 2004C; Reamon-Buettner e Borlak, 2005; Reamon-Buettner e Borlak, 2006A ; Reamon-Buettner e Borlak, 2006B).

Questi risultati, non sono stati replicati ne' dal gruppo di Draus analizzando il gene *NKX2.5* su una casistica di DNA estratto da 28 cuori malformati congelati di pazienti affetti da difetti dei setti (13 DIA, 5 DIV, 10 CAV ) (Draus et al., 2009) né dal nostro gruppo analizzando i fattori di trascrizione *NKX2.5* e *GATA4* su una casistica a 62 tessuti cardiaci congelati. Probabilmente i dati negativi relativi al nostro studio potrebbero essere spiegati dal numero ristretto di casi analizzati. Dobbiamo inoltre considerare che le mutazioni in questi geni hanno una prevalenza molto bassa (D.B. McElhinney et al., 2003; A. De Luca et al., 2010; M.K. Schluterman et al., 2007). Anche se l'assenza di mutazioni somatiche nella nostra casistica è in disaccordo con i dati pubblicati da Reamon-Buettner e Borlak in cui si identificano mutazioni *NKX2.5* in più del 95% dei tessuti cardiaci di pazienti affetti da difetti dei setti conservati in formalina (66 cuori malformati su 68 hanno una variante nucleotidica) (S.M. Reamon-Buettner et al., 2004; S.M.

Reamon-Buettner et al; 2004). Considerando quindi le 2 casistiche indipendenti, del nostro gruppo e del gruppo di Draus in totale è stata esclusa la presenza di mutazioni somatiche in una casistica di 63 tessuti cardiaci congelati con difetti dei setti (24 CAV, 23 DIV e 16 DIA), sovrapponibile alla casistica di Reamon-Buettner e Borlak analizzata di 68 tessuti cardiaci conservati in formalina (16 DIA, 29 DIV, e 23 CAV). L'utilizzo di materiale genetico conservato in formalina va considerato con cautela, anche se gli autori ritengono che le mutazioni identificate non sono dovute ad artefatti da conservazione. Per rafforzare quest'ultima ipotesi nel lavoro di Draus hanno dimostrato che lo spettro delle mutazioni somatiche identificate nel lavoro di Reamon-Buettner e Borlak era notevolmente differente dallo spettro di mutazioni germinali in *NKX2.5*, mutazioni mitocondriali e somatiche nei tumori riportato nei database (Draus et al., 2009). Considerando questi dati troppo diversi da quelli precedenti abbiamo pensato che la tecnica utilizzata nel nostro studio non fosse sufficientemente sensibile per rilevare le mutazioni somatiche, ma la DHPLC è una tecnica sicuramente più robusta per l'identificazione di mutazioni somatiche in confronto al sequenziamento diretto utilizzato da Reamon-Buettner e Borlak. Inoltre anche se non abbiamo identificato mutazioni somatiche nella nostra casistica abbiamo identificato una variante nucleotidica nota, 2 polimorfismi nel gene *NKX2.5*, 6 varianti nucleotidiche e 2 polimorfismi nel gene *GATA4*, confermando quindi la sensibilità del nostro test nell'identificazione di varianti nucleotidiche.

In conclusione il nostro studio ha permesso l'identificazione di mutazioni costituzionali nei geni *NKX2.5* e *GATA4* nella nostra casistica di pazienti sporadici affetti da CC, ma escludono che le mutazioni somatiche negli stessi geni svolgano un ruolo importante nella patogenesi delle CC esaminate. Sicuramente essendo le mutazioni nei fattori cardiogenici così poco frequenti in pazienti con CC e considerando complessità dello sviluppo cardiaco molto probabilmente la maggior parte delle CC hanno una eziologia di tipo multifattoriale.

#### 4-Ampliamento dello spettro delle CC associate alla delezione /duplicazione 1q21.1

##### Introduzione

La microdelezione (del1q21.1) e la reciproca microduplicazione (dup1q21.1) della regione distale 1q21.1, (Fig.31), sono caratterizzate clinicamente da ritardo psicomotorio, disturbi psichiatrici, dismorfismi facciali e difetti congeniti. (Mefford et al.,2008; Brunett-Pierri et al., 2008; Mefford e Eichler, 2009). Caratteristiche tipiche dei pazienti con del1q21.1 includono ritardo dello sviluppo, microcefalia, dimorfismi facciali, cataratta e cardiopatie congenite. Pazienti con la dup1q21.1 mostrano ritardo mentale, autismo, macrocefalia, e dimorfismi facciali. La loro espressione fenotipica è variabile e sono noti casi di penetranza incompleta. Differenti tipi anatomici di cardiopatie congenite (CC) sono stati associati con la del1q21.1 (Mefford et al., 2008), comprese le anomalie ostruttive del cuore sinistro, e i difetti troncoconali e del setto (Christiansen et al., 2004; Mefford et al., 2008; Brunetti-Pierri et., 2008; Brunet et al., 2009). Sia le delezioni che le duplicazioni 1q21.1 sono state identificate in pazienti con CC apparentemente non sindromiche (Christiansen et al., 2004; Endorgan et al., 2008; Greenway et al., 2009). Questi riarrangiamenti sono distinti dalla regione coinvolta nella sindrome trombocitopenica con assenza di radio (TAR), (Fig.31) (Klopocki et al.,2007).

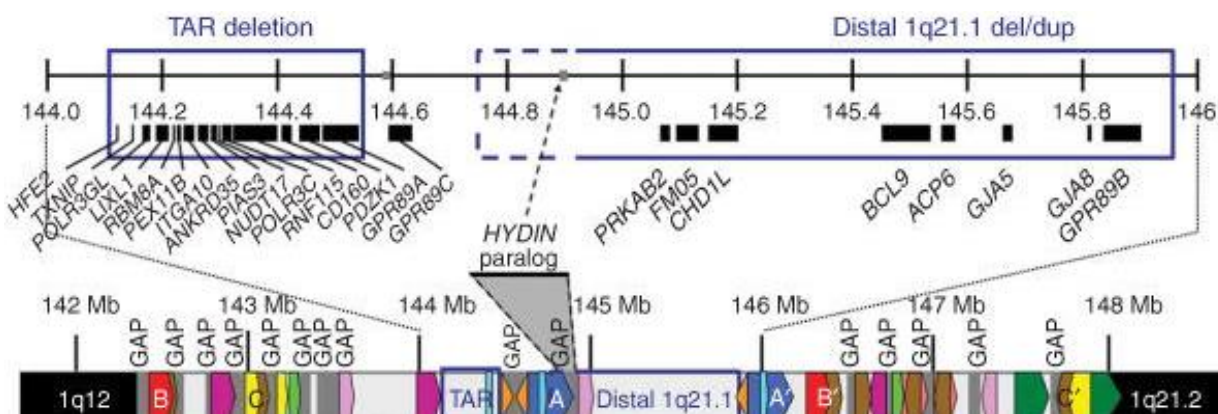


Figura 31. Rappresentazione schematica della struttura del cromosoma 1q21.1 ( UCSC Genome Browser hg18, marzo 2006)

Le CC rappresentano una delle caratteristiche cliniche principali della sindrome da del1q21.1 (Christiansen et al., 2004; Mefford et al., 2008; 2008; Brunet et al., 2009) dove sono descritte in circa il 30% dei casi (Mefford et al (2008); occasionalmente sono presenti anche in pazienti con

dup1q21.1 (Greenway et al. 2009). La del1q21.1 e la dup 1q21.1 sono state associate ad un ampio spettro di CC (Tab. 5).

Congenital heart defect	Number (patients)		References
	del 1q21.1	dup 1q 21.1	
<b>Left-sided lesions</b>			
* Aortic coarctation (1 with membranous subaortic stenosis)	3		Christiansen et al., 2004 Mefford et al., 2008 Brunet et al., 2009
* Bicuspid aortic valve (1 with aortic insufficiency and dilation of ascending aorta)	2		Mefford et al., 2008 Brunetti-Pierri et al., 2008
<b>Right-sided lesions</b>			
* Pulmonary valve stenosis	1	1	Present patient 3 Present DV35
<b>Septal defects / ductus</b>			
* Patent ductus arteriosus	2		Mefford et al., 2008
* ASDos, pulmonary valve stenosis, multiple muscular VSDs	1		Present patient 1
* ASDos, patent ductus arteriosus	1		Erdogan et al., 2008
<b>Outflow/Conotruncal defects</b>			
* Tetralogy of Fallot	1	4	Greenway et al., 2009 Redon et al., 2006
* Truncus arteriosus, multiple muscular VSDs	1	1	Mefford et al., 2008
* Interrupted aortic arch type B + muscular subaortic stenosis	1		Christiansen et al., 2004
* Interrupted aortic arch, aorto-pulmonary window	1		Christiansen et al., 2004
* Transposition of the great arteries, perimembranous VSD, ASDos	1		Mefford et al., 2008
<b>Other</b>			
* Absent pulmonary valve, perimembranous VSD, dysplastic tricuspid valve, persistent LSVC, wide ascending aorta, cardiomyopathy		1	Verhagen et al., 2011 Velinov et al., 2010
* Anomalous origin of the right coronary artery	1		Brunetti-Pierri et al., 2008
* Complex congenital heart defect /type unspecified)		1	Brunetti-Pierri et al., 2008

Abbreviations: del 1q21.1 = deletion 1q21.1; dup 1q 21.1 = duplication 1q21.1; ASD = atrial septal defect; VSD = ventricular septal defect; LSVC = left superior vena cava.]

Tabella 5. CC descritte in pazienti con del1q21.1 e dup1q21.1

La prevalenza riportata di questo riarrangiamento nelle CC possono essere influenzati dal tipo di casistica analizzata nei lavori precedenti. Per esempio, Brunetti-Pierri e collaboratori (2008) studiando per il microriarrangiamento una casistica di pazienti con problemi neurologici identificano 21 pazienti con del 1q21.1 di cui uno con CC (4,8%). Altri autori riportano inoltre una serie di pazienti con dup1q21.1 affetti da autismo e ritardo mentale.

Il primo studio focalizzato su 505 pazienti con differenti CC ha identificato la del1q21.1 in 3 pazienti con una frequenza quindi dello 0,6% (Christiansen et al., 2004). Non vi è ancora una correlazione genotipo fenotipo ben definita, in questo lavoro infatti gli autori riportano l'associazione della del 1q21.1 con difetti dell' arco aortico. Quindi molto probabilmente lo spettro di CC associate a del/dup 1q21.1 è influenzato dai criteri con cui i pazienti vengono selezionati per lo studio, quest'ultimi infatti sono stati arruolati da diversi centri con il sospetto clinico per la diagnosi di sindrome di Williams, sindrome Di George o velocardiofacciale. E' stata riportata anche l'associazione della dup1q21.1 con Tetralogia di Fallot (Redon et al. 2006; Greenway et al., 2009) anche se Greenway e collaboratori (2009) hanno focalizzato il loro

studio proprio su questa CC. Recentemente una duplicazione nella regione 1q21.1 è stata identificata in eterozigosi in un feto con assenza della valvola polmonare, difetto del setto ventricolare perimembranoso, valvola tricuspide displastica, vena cava superiore persistente, ispessimento dell'aorta e cardiomiopatia (Verhagen et al., 2011). In una serie di 105 pazienti Endorgan e collaboratori (2008) identificano la del1q21.1 in un paziente con difetti del setto atriale e patent ductus arterioso, nello stesso lavoro non vengono riportati pazienti con la duplicazione della stessa regione cromosomica che potrebbe suggerire una maggiore associazione delle CC con la perdita dei geni che mappano in questa regione. Nella regione 1q21.1 infatti mappano geni molto importanti lo sviluppo del cervello e del cuore (Christiansen et al., 2004; Brunetti-Pierro et al., 2008). I geni che codificano per la proteina chinasi AMP attivata (*AMPK*) e per la connessina 40. Mutazioni nel gene *AMPK* sono state identificate in un sottogruppo di pazienti affetti da cardiomiopatia ipertrofica familiare (Oliveira et al., 2003). Si è visto che modelli murini con aploinsufficienza della *CX40* sviluppano difetti del setto ventricolare, tetralogia di fallot, anomalie dell'arco aortico. (Gu et al., 2003). Inoltre mutazioni in questo gene sono state identificate in pazienti con fibrillazione atriale cronica e anomalie della valvola mitrale (de Wit et al., 2000).

In questo lavoro riportiamo lo studio clinico e la caratterizzazione molecolare di una famiglia in cui segrega una del1q21.1 in 3 membri, due dei quali affetti da stenosi della valvola polmonare, e i risultati di uno studio molecolare per la ricerca di del1q21.1 e dup1q21.1 in un gruppo di pazienti con SVP non sindromica.

## ***Pazienti e Metodi***

### ***Analisi clinica della famiglia***

La probanda (III:1) è nata a termine di una gravidanza decorsa regolarmente da genitori non consanguinei. Presentava alla nascita un peso di 3300 g, una lunghezza di 52 cm e una circonferenza cranica di 34 cm. L'indice apgar era 8 e 9 a 1' e 5' alla nascita.

Nei primi giorni di vita aveva difficoltà di alimentazione e di crescita. L'ecocardiografia color doppler ha evidenziato CC (Difetto interatriale tipo "ostium secundum", con stenosi polmonare valvolare (SVP) e difetti interventricolari muscolari multipli) operata chirurgicamente a 5 anni. La bambina presenta ritardo psicomotorio: posizione seduta a 12 mesi, deambulazione autonoma a 20 mesi, ritardo del linguaggio. A 3 anni si hanno le prime crisi epilettiche che vengono confermate da EEG. La risonanza magnetica cerebrale effettuata all'età di 4 anni ha evidenziato la presenza di ipoplasia del corpo calloso, e ispessimento del ventricolo laterale medio.

Oggi il probando all'età di 8 anni e 9 mesi ha un peso di 26,5 Kg (25° centile), un'altezza di 126,8 e una circonferenza cranica di 53 cm (3°-10° centile). L'esame clinico evidenzia la presenza di sinofria, prominenza dei bulbi oculari, ptosi palpebrale, sopracciglia allungate, rime palpebrali rivolte verso il basso, bocca larga con labbra carnose, denti piccoli, macchie caffè-latte, scoliosi dorso lombare, valgismo degli arti inferiori. Il paziente ha un deficit intellettivo moderato (IQ=48) calcolato con la scala di Wechsler. Sono presenti inoltre iperattività e deficit di attenzione. A livello scheletrico si apprezzava scoliosi dorso ventrale senza malformazioni strutturali vertebrali.

La madre del probando (II:2) ha riferito di aver avuto ritardo dell'acquisizione del linguaggio e difficoltà di apprendimento nell'infanzia. All'esame clinico non sono osservati dimorfismi facciali. L'ecocardiografia non ha rilevato CC.

Lo zio del probando (II:3) era affetto da Stenosi della valvola polmonare sporadica (SVP) (Fig.32).

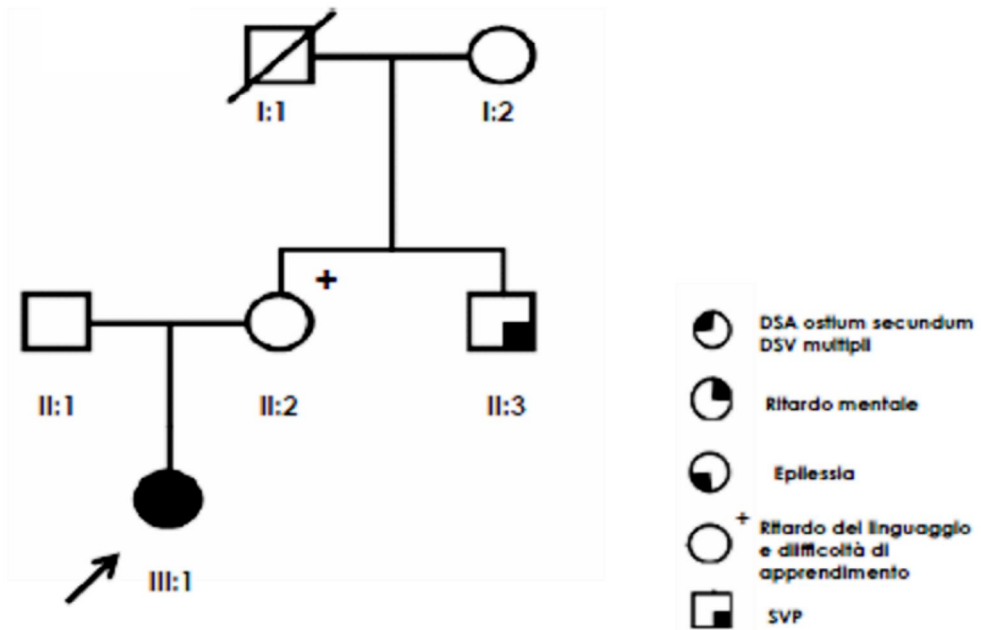


Figura 32. Pedigree della famiglia con *del1q21.1*

### **Analisi genetica**

E' stata eseguita sul probando e sui genitori l'analisi citogenetica standard ad una risoluzione di 550 bande . L'analisi CGH nel probando è stata effettuata utilizzando un Oligonucleotide array (44K; Agilent Technologies, Waldbronn, Germania), con risoluzione di 250 Kb.

Il DNA genomico estratto da un prelievo di sangue venoso con un kit commerciale (Macherey-Nagel, Duren, Germany) è stato ibridato con un DNA reference (Promega, Madison, WI). L'immagine dell'array si ottiene utilizzando il Software Feature extraction (v.9.5.1) e i profili cromosomici si ottengono tramite l'uso dell'algoritmo ADM-2 contenuto nel Software Analytix DNA (v4.0) (Agilent Technologies).

### **Pazienti con Stenosi della valvola polmonare isolata**

Sono stati selezionati 15 pazienti con PVS (9 maschi e 6 femmine) per lo studio. Il consenso informato è stato sottoscritto da ogni soggetto incluso nello studio, o da entrambi i genitori, se il probando era minorenne al momento del prelievo. Il DNA è stato estratto secondo il metodo fenolo-cloroformio.

In tutti i soggetti la diagnosi cardiaca è stata confermata da una o più delle seguenti metodiche: ecocardiogramma, cateterizzazione cardiaca, intervento chirurgico, e/o autopsia.



Lo studio fenotipico e clinico generale del paziente ha compreso una valutazione auxologica e dei dismorfismi facciali, una valutazione di malformazioni/caratteristiche cliniche extracardiache, mediante indagini di tipo non invasivo, come l'ecografia addominale per evidenziare eventuali malformazioni renali od epatiche, e di tipo invasivo se necessario, quali radiografie.

### ***Test Genetico***

Lo screening per l' identificazione del microriarrangiamento 1q21. 1 sulla casistica di pazienti con SVP sporadici è stato effettuato con metodica MLPA (SALSA MLPA Kit 297-B1 Microdeletion Syndromes-2), contenente 6 sonde nella regione distale 1q21.1( 12944-L14099 [FMO5 ], 12945-L14100 [BCL9], 12946-L14101 [GJA5] , 12948-L14103 [GJA8], 12949-L14104 [PRKAB2], e 13163-L14105 [ACP6]). I prodotti MLPA sono stati corsi su sequenziatore ABI Prism 3130xl (Applied Biosystem, Foster City, CA). I risultati del MLPA sono stati collezionati con il programma Gene Mapper (Applied Biosystem) e analizzati con il programma Coffalyzer (MRC-Holland). In ogni esperimento MLPA vengono analizzati insieme ai campioni anche 4 controlli sani, un controllo di delezione e un controllo di duplicazione per la regione 1q21.1. Sulla base dei risultati dei gruppi di controllo, i casi che mostravano un valore dell'area dei picchi delle sonde tra 0.7 e 1.3 venivano considerati avere 2 copie. I campioni che mostravano una riduzione o l'incremento della'area dei picchi delle sonde <0.7 o > 1.3 erano considerati rispettivamente deleti o duplicati.

L'analisi mutazionale del gene GJA5 nei 15 è stata eseguita mediante sequenziamento diretto di entrambi i filamenti utilizzando la chimica del Big Dye Terminator v 3.1 (Applied Biosystem) e risolti mediante elettroforesi capillare sul sequenziatore automatico ABI prism 3130xl Genetic Analyses (Applied Biosystem). La lettura degli elettrofenogrammi è stata effettuata utilizzando i programmi dedicati SeqAnalysis (Applied Biosystem) e SeqMan (DNA Star) confrontando la sequenza ottenuta con la sequenza di riferimento presente nel database dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## Risultati

### Analisi genetica della famiglia

L'analisi citogenetica classica effettuata sul probando e su entrambi i genitori è risultata negativa. L'indagine CGH array ha evidenziato una delezione di 1,2 Mb nella regione da 145,031,367 bp a 146,201,635 bp (hg 18) (Fig.33). La delezione è stata confermata mediante analisi FISH con il clone specifico RP11-35E8 (32 K library-BACPAC Resources Center; (<http://bacpac.chori.org/>) e saggio MLPA. L'analisi MLPA ha mostrato una riduzione nel probando dell'area dei picchi delle sonde 12944-L14099, 12945-L14100, 12946-L14101, 12948-L14103, 12949-L14104, e 13163-L14105 con valori inferiori a <math><0.7</math> (Fig. 34). La stessa del1q21.1 è stata identificata mediante CGH array anche nella madre del probando (II:2) e nello zio (II:3).

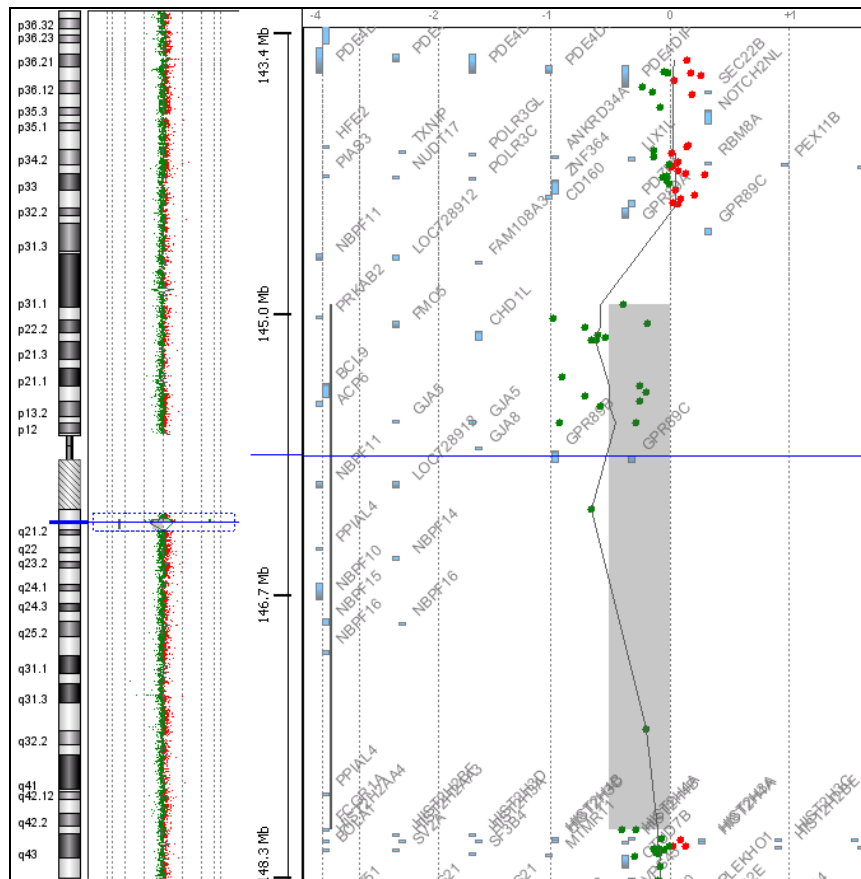


Figura 33. Analisi CGH array nel probando con del1q21.1

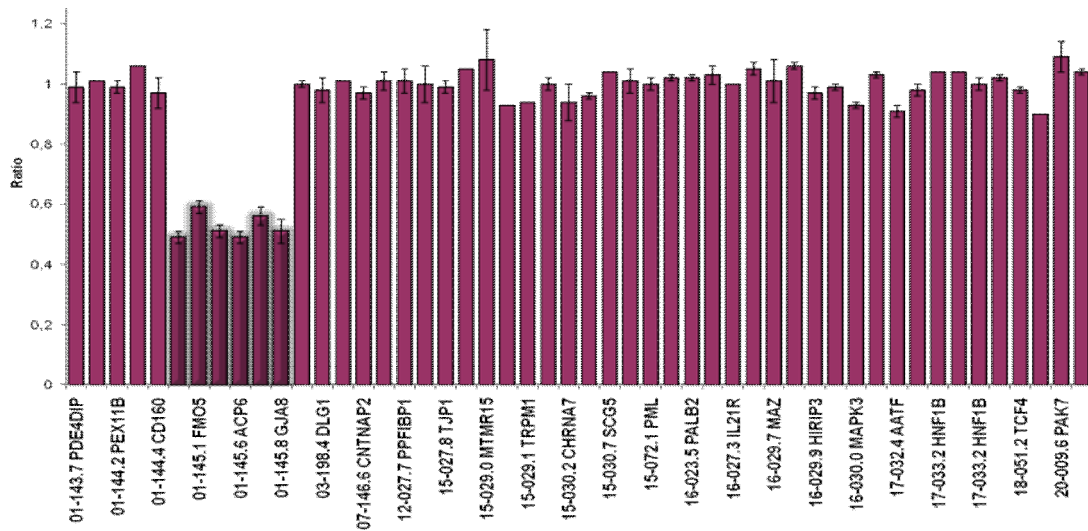


Figura 34. Analisi MLPA del probando con del1q21.1

**Analisi genetica nella casistica di PVS isolate**

L'analisi MLPA ha identificato una duplicazione in un paziente sporadico con SVP (DV35). L'area dei picchi delle sonde 12944-L14099, 12945-L14100, 12946-L14101, 12948-L14103, 12949-L14104, e 13163-L14105 mostra valori >0.7 (Fig.35). L'analisi CGH array ha confermato la presenza di una duplicazione di circa 1,1 Mb nella regione 1q21.1. (Fig. 36)

Il sequenziamento diretto della sequenza codificante del gene GJA5 non ha identificato alcuna mutazioni in pazienti con SVP isolata.

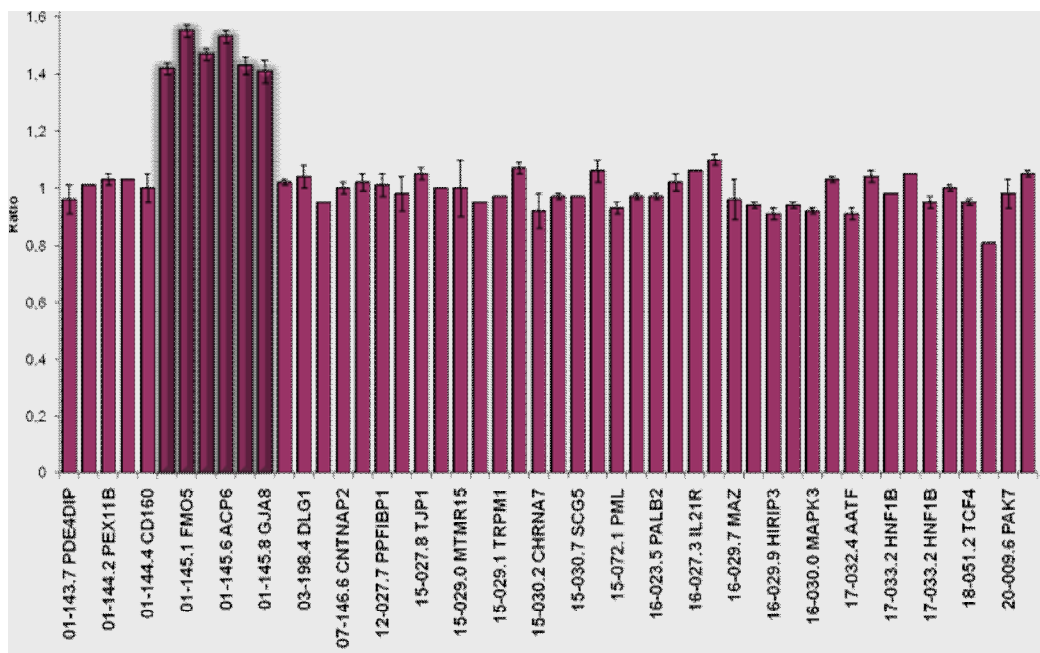


Figura 35. Analisi MLPA del paziente DV35 con dup1q21.1

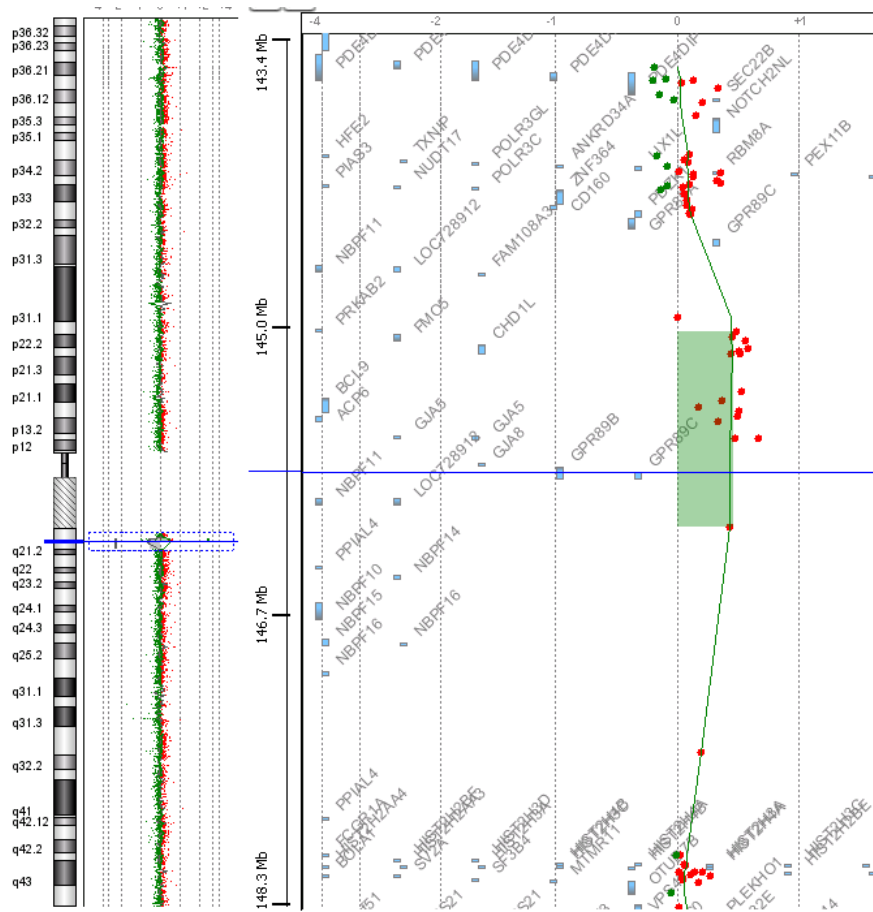


Figura 36. Analisi CGH array del paziente DV35 con dup1q21.1

## **Discussione**

Il nostro studio espande lo spettro di CC associate a del/dup 1q21.1 aggiungendo a quelle già riportate in letteratura la SVP. La SVP può essere associata ad altre CC, ma spesso si presenta in maniera isolata. Circa il 10% dei pazienti presenta anomalie extracardiache, soprattutto sotto forma di sindrome malformativa, come quelle dovute a infezione prenatale da rosolia, citomegalovirus o sindromi genetiche come la sindrome di Ehlers-Danlos, la sindrome Goldenhar, la sindrome di Costello ed altre (Burn, 2006). La SVP è sicuramente la cardiopatia classicamente associata alla SN ed alla SL. In questi pazienti la SVP è caratterizzata da una displasia valvolare, che è meno comune nella forma di SVP isolata. Inoltre, la SVP con displasia valvolare nell'ambito della SN e SL è comunemente associata a malformazioni extracardiache ed è correlata a mutazioni missenso nel gene *PTPN11* (Chen et al., 2000; Tartaglia et al., 2001; Digilio et al., 2002; Tartaglia et al., 2002).

Nella famiglia che abbiamo studiato mostra la SVP associata alla del1q21.1, si manifesta sia in forma sindromica nella probanda che in forma isolata nello zio della probanda. La ricorrenza familiare della del1q21.1 era del 50% dei casi familiari in cui anche i genitori vengono analizzati. (Mefford et al., 2008). E' noto che la loro espressione fenotipica è variabile e sono noti casi di penetranza incompleta.

Molto probabilmente la componente genetica e fenomeni epigenetici come l'imprinting, la diversa espressione o regolazione dei geni nelle regioni critiche o la presenza di varianti recessive nell'allele wild type possono spiegare queste differenze fenotipiche interindividuali. La ricorrenza di CC nella famiglia analizzata suggerisce inoltre che alcuni modificatori per le malformazioni cardiache possano agire in questo locus.

La variabilità clinica della sindrome da dal 1q21.1 rendono difficile la definizione di criteri clinici per le indicazioni al test. Le anomalie facciali sono infatti moderate e non specifiche. Brunet e collaboratori (2009) riportano la presenza della del1q21.1 associata a microduplicazione contigua in un paziente con sindrome velocardiofaciale, suggerendo quindi il test per la ricerca di del1q21.1 in pazienti con le caratteristiche cliniche della (VCFS) negativi per la delezione del 22q11.2. Tuttavia non condividiamo pienamente queste indicazioni al test considerando le caratteristiche fenotipiche identificate nei pazienti con del 1q21.1 sono troppo poco correlate alla sindrome VCFS. Altri autori hanno suggerito di inserire nello screening di questo microriarrangiamento pazienti con con ritardo dello sviluppo, autismo, schizofrenia (Mefford et al., 2008). In generale possiamo suggerire il test a pazienti con

anomalie ostruttive del cuore sinistro, e i difetti troncoconali e del setto associate a deficit cognitivo o/e microcefalia o/e macrocefalia o/e lievi dimorfismi. Riguardo i pazienti non sindromici con CC, anche con SVP, lo screening della regione 1q21.1 può essere raccomandata in soggetti con storia familiare di ritardo mentale con microcefalia e/o dimorfismi facciali e/o CC.

## PARTE 2

### LE CARDIOPATIE CONGENITE NELLA SINDROME DI NOONAN E SINDROMI CORRELATE

#### *Introduzione*

La **Sindrome di Noonan** (SN, OMIM 163950) è il nome eponimo per definire il disordine descritto per la prima volta dalla cardiologa pediatrica Jacqueline Noonan più di 40 anni fa (Noonan and Ehmke, 1963) basandosi per la descrizione di questa nuova sindrome sull'osservazione di 9 soggetti con un fenotipo simile alla sindrome di Turner (ST), che considerò affetti da una nuova sindrome. Tutti i pazienti presentavano stenosi della valvola polmonare (SVP), dismorfismi facciali caratteristici: ipertelorismo, ptosi, orecchie a basso impianto, collo corto e anomalie del torace. Parecchi maschi presentano criptorchidismo. La prevalenza della NS è stimata tra 1/1000-2500 nati vivi. (Nora et Fraser, 1981). La SN è una sindrome genetica ad eredità autosomica dominante in cui un numero molto elevato di casi è dovuto a mutazioni *de novo*. La SN è geneticamente eterogenea e al momento sono noti 9 geni causativi che sono responsabili del 75 % (*PTPN11, SOS1, KRAS, NRAS, RAF1, BRAF, SHOC2, MEK1, e CBL*) di questa condizione o di sindromi correlate, incluse la sindrome di LEOPARD (SL; OMIM 151100), NS con loose anagen hair (SN/LAH, OMIM 607721) e la recente sindrome associata a mutazioni del gene CBL di cui è oggetto questa tesi.

Mutazioni identificate in un sottogruppo di geni che codificano tutti per proteine che appartengono allo stesso pathway (*HRAS, KRAS, NF1, BRAF, SPRED1, MEK1, e MEK2*) sono stati associati a sindromi correlate alla SN (Sindrome di Costello, sindrome cardio-facio-cutanea, NF1 che include sia la sindrome NF1/Noonan e la sindrome di Legius). Sulla base dei meccanismi patogenetici comuni e sovrapposizioni cliniche, queste condizioni geneticamente determinate vengono raggruppate in un gruppo di patologie definite **sindromi neurocardiofaciocutanee** o **RAS-opatie** (M. Bentires-Alj et al., 2006; W.E. Tidyman and K.A. Rauen; 2009).

### ***Il pathway di RAS/MAPK***

Queste condizioni vengono considerate una famiglia di sindromi in quanto presentano notevoli sovrapposizioni fenotipiche, a loro volta riconducibili al fatto che i diversi geni coinvolti codificano per proteine che partecipano alla medesima rete (pathway) di segnali, nota come rete RAS/MAPK, sistema essenziale per il mantenimento della omeostasi cellulare (Mitin et al., 2005; Wennerberg et al; 2005) . Le proteine *RAS*, presenti in 3 isoforme, *HRAS*, *NRAS*, *KRAS a/b* (a seconda del tipo di splicing), sono delle GTPasi monometriche di membrana e funzionano come dei veri e propri interruttori molecolari nella regolazione della proliferazione, differenziamento e morte cellulare programmata delle cellule. Il legame di fattori di crescita, citochine, o di altri ligandi, con gli specifici recettori presenti sulla membrana plasmatica attiva le proteine adattatrici *SHC*, *GRB-2* e *SHP-2* (prodotto del gene *PTPN11*) che, a loro volta, attivano i GEF (Guanine nucleotide Exchange Factors), famiglia di proteine di cui fa parte anche *SOS-1*. Queste proteine, una volta attivate, operano il distacco del GDP legato alla proteina *RAS* (complesso inattivo), favorendone il legame con il GTP. Il complesso attivo *RAS-GTP*, attiva a valle, *RAF*, una serin-treonin chinasi, anch'essa presente in 3 isoforme (*A-RAF*, *B-RAF*, *RAF-1* o *C-RAF*). Una volta attivato, *RAF* fosforila il residuo serinico a livello del dominio catalitico di *MEK1* e/o *MEK2* (Mitogen-activated protein Kinase/Erk Kinase), note anche come *MAP2K 1* e *2* (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase). *ERK*, nella sua forma attiva, entra nel nucleo cellulare, dove può fosforilare ed attivare, direttamente o indirettamente, numerosi fattori di trascrizione. Il pathway RAS/MAPK deve essere a sua volta finemente regolato, per esempio mediante la conversione di GTP-RAS in GDP-RAS, a opera di GAP (GTPase Activating Protein), neuro fibrina (*NF*) e *SPRED1*. (Fig. 37)

In generale, le mutazioni responsabili delle diverse sindromi sono mutazioni attivanti, che mantengono eccessivamente elevato il flusso di segnale che corre lungo il pathway RAS-MAPK. L'insieme di tutte le mutazioni note rende conto di tre quarti dei casi di sindromi di NCFC. Cio' significa che esistono verosimilmente altri geni , ancora non noti, le cui mutazioni provocano una o più di queste sindromi. In questa tesi tratteremo le sindromi di Noonan, LEOPARD, CFC, e Costello, ossia quelle che mostrano fra loro la maggiore somiglianza e quindi pongono maggiori problemi di diagnosi differenziale.



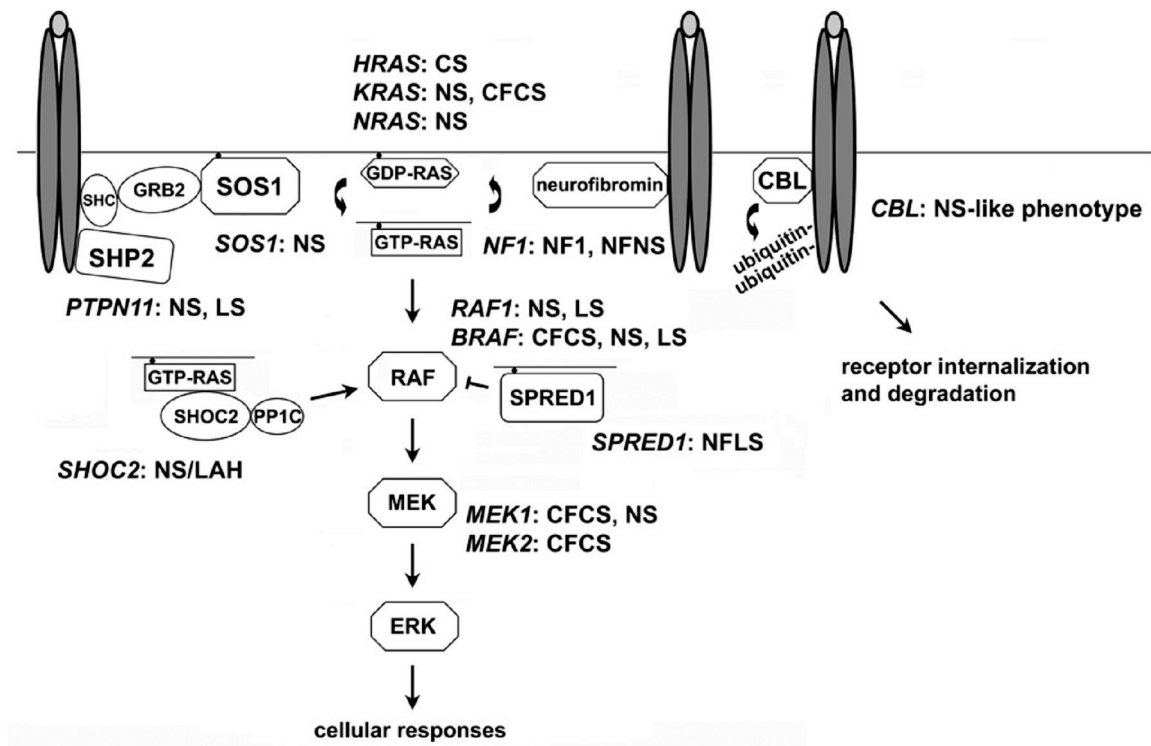


Figura 37. Geni coinvolti nel pathway di RAS

### Caratteristiche fenotipiche comuni nelle RASopatie

Le caratteristiche fenotipiche tipiche della SN sono il prototipo di un pattern di anomalie fisiche e dello sviluppo che avvengono in seguito alla deregolazione del segnale RAS-MAPK. Questo pattern può essere riconosciuto in tutte le RAS-opatie, anche se le caratteristiche fenotipiche di ogni individuo sono variabili tra le diverse entità. La presenza di CC, bassa statura, e caratteristiche cranio facciali distintive sono tipiche del fenotipo della SN o associato alle RASopatie (Zenker et al., 2009). Le CC tipiche della SN includono la Stenosi della valvola spesso associata a displasia valvolare, cardiomiopatia ipertrofica (CMI), e difetti dei setti atrioventricolari (CAV) (Digilio et al., 2009). L'altezza è variabile tra le diverse entità, benché la lunghezza dei neonati affetti sia solitamente normale, la successiva crescita è rallentata (Otten and Noordam, 2009). La facies è tipica, ed è spesso il primo indicatore della diagnosi. E' caratterizzata da macrocefalia assoluta. Le anomalie cranio-facciali sono riportate in (Fig 38) (Zenker, in press). Altre manifestazioni fisiche ricorrenti sono il pectus excavatum (Fig 39) (Zenker, in press), il criptorchidismo nella maggior parte dei maschi, alterazioni cutanee consistenti in ipercheratosi follicolare e macchie caffè e latte. Sono comuni inoltre anomalie oculari, ritardo nelle tappe dello sviluppo, ipotonia. Lo sviluppo psicomotorio è variabile tra le

differenti RASopatie (Zenker, 2009). Una breve sintesi del fenotipo associato alla SN viene riportata in tabella 6.



*Figura 38. Sono presenti nella SN(a-c) e nelle altre RASopatie (d-f) una serie di somiglianze fenotipiche*



*Figura 39. Deformazione del torace tipico della Sindrome di Noonan*

Entity	Mutated gene(s) <sup>a</sup>	Distinctive features
Noonan syndrome	<b>PTPN11</b> , <b>SOS1</b> , <b>RAF1</b> , <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>MEK1</i> , <i>BRAF</i> , <i>CBL</i>	Minor cognitive deficits Easy bruising Hair phenotype Dark skin pigmentation Semilunar valve dysplasias Growth hormone deficiency Increased risk of JMML
Noonan syndrome-like disorder with loose anagen hair	<b>SHOC2</b>	Variable Noonan syndrome-like features
Noonan syndrome-like disorder with JMML	<b>CBL</b>	Multiple lentigines Hypertrophic cardiomyopathy Sensorineural deafness
NSML/LEOPARD syndrome	<b>PTPN11</b> (specific mutations), <i>RAF1</i> , <i>BRAF</i>	Mental retardation (mild to severe) Hyperkeratotic skin changes Curly/wooly hair
CFC syndrome	<b>BRAF</b> , <b>MEK1</b> , <b>MEK2</b> , <i>KRAS</i> , <i>SOS1</i>	Mental retardation (mild to moderate) Sparse/curly hair Deep palmar/plantar creases Soft, redundant skin Ulnar deviation at the wrists Severe feeding difficulties Atrial tachycardia
Costello syndrome	<b>HRAS</b>	<i>Café-au-lait</i> spots, freckling Neurofibroma Variable Noonan syndrome-like features
Neurofibromatosis NF1-Noonan syndrome	<b>NF1</b>	<i>Café-au-lait</i> spots, freckling No tumors typical of NF1
Legius syndrome	<b>SPRED1</b>	Variable Noonan syndrome-like features

CFC, cardio-facio-cutaneous; JMML, juvenile myelomonocytic leukemia; NF1, neurofibromatosis type 1; NSML, Noonan syndrome with multiple lentigines.

<sup>a</sup> More frequently mutated genes printed in bold and rarely mutated genes (<5%) in normal letters.

Tabella 6. Tabella di correlazione Genotipo-Fenotipo di pazienti con SN e correlate

### Correlazioni genotipo-fenotipo delle RASopatie

La ricerca dei geni responsabili della NS è iniziata 10 anni fa e ha rilevato una grande eterogeneità genetica (Tartaglia et al., 2010; Tidyman et al., 2009; Zenker et al., 2009). Le diverse condizioni cliniche delle varie sindromi sono causate da mutazioni in geni specifici.

#### Sindrome di Noonan (OMIM 163950)

Circa il 50-80% dei pazienti presentano CC, il 50-70% bassa statura, e un terzo mostrano deficit cognitivi. Il QI medio nella popolazione con SN è pari a 80-90 (Allanson, 2007; Allanson, 2008; Romano et al., 2010; van der Burgt., 2007).

Il gene **PTPN11** è stato il primo gene ad essere stato identificato (Tartaglia et al., 2001) ed è mutato in circa il 40-50 % dei casi. La SVP è la CC più frequente nei pazienti con mutazioni di PTPN11 mentre è meno frequente la CMI (Tartaglia et al., 2002; Zenker et al., 2004).

Il gene **SOS1** è responsabile del 10-15% dei casi (Roberts et al., 2007; Tartaglia et al., 2007). Pazienti con mutazioni in SOS1 presentano uno spettro di CC simile a PTPN11, ma presentano una statura normale. La presenza di anomalie ectodermiche è strettamente correlata con mutazioni di SOS1, tanto che questi pazienti presentano problemi di diagnosi differenziale con la sindrome CFC (Lepri et al., 2011).

Il gene **RAF1** è responsabile di circa il 5-8% dei. Mutazioni di RAF1 sono strettamente correlate con la cardiomiopatia ipertrofica (Pandit et al., 2007; Razzaque et al., 2007) , presenti nel 95% dei casi.

Infine i casi non frequenti di ritardo mentale tendono a correlarsi con mutazioni di **KRAS** (2-3%) (Schubbert et al., 2006)

Mutazioni nei geni **B-RAF** e **MEK1** Sono state associate raramente alla SN (Dentici et al., 2009; Nava et al., 2007), probabilmente con un fenotipo più lieve (Dentici et al., 2009; Koudova et al., 2009).

#### Sindrome Leopard ( SL; OMIM 151100)

**LEOPARD** è un acronimo che elenca le manifestazioni principali della sindrome e cioè Lentiggini, anomalie Elettrocardiografiche, ipetelorismo Oculare, stenosi della valvola Polmonare, Anomalie dei genitali, Ritardo di crescita, sordità neurosensoriale (deafness) (Gorlin et al., 1971). Fatto salve la lentiginosi e la sordità, la sindrome è molto simile alla sindrome di Noonan di cui si può considerare una variante clinica, anche se pazienti con la sindrome di Noonan hanno più frequentemente CMI (80%) che SVP (10-40%) e sordità neurosensoriale (deafness) (15-25%). (Sarkozy et al., 2008). La SL è geneticamente distinta dalla SN. Nella maggior parte dei casi la mutazione è a carico di **PTPN11** con due mutazioni maggiormente ricorrenti e cioè Y279C e T468M. E' interessante notare che entrambe le mutazioni provocano una perdita di funzione della proteina SH2, contrariamente a quanto accade per la maggior parte delle mutazioni missenso nella SN. (Edouard et al., 2010; Oishi et al., 2009; Steward et al., 2010) Mutazioni in RAF1 e BRAF vengono identificate raramente in pazienti con SL.

#### Sindrome Noonan like con con Loose anagen hair (OMIM 607721)

Proposta dalla Mazzanti e collaboratori come sindrome distinta è caratterizzata da capelli radi in fase anagen (Mazzanti et al., 2003). I capelli si rompono facilmente sono radi e sottili, la crescita è lenta. E' inoltre caratterizzata da iperpigmentazione della pelle e uno spettro di CC tipico, displasia della valvola semilunare, e difetti dei setti sono maggiormente frequenti rispetto alla SVP e CMI. La crescita in questi pazienti è rallentata a causa del deficit dell'ormone della crescita, vi è una maggiore presenza di problemi cognitivi e comportamentali, presentano caratteristiche cranio facciali tipiche.

La sindrome Noonan like con con Loose anagen hair è geneticamente omogenea e distinta. Una singola mutazione ricorrente nel gene **SHOC2**, p.S2G è responsabile di tutti i casi con questo fenotipo (Cordeddu et al., 2010).

#### Sindrome di Costello (OMIM 218040)

L'eterogeneità genetica della sindrome di Costello è molto più limitata a quella delle sindromi di Noonan e CFC. L'unico gene coinvolto è **H-RAS** (Gripp and Lin, 2009). Vi consenso unanime ormai fra gli studiosi sul fatto che la diagnosi di sindrome di Costello vada riservata ai casi che abbiano una mutazione di HRAS. L'80% dei casi con presentano la stessa mutazione in **H-RAS** (p. G12S) (Gripp and Lin., 2009; Aoki et al., 2005). Pazienti con Costello presentano fin dall'inizio un ritardo di accrescimento e difficoltà di alimentazione. Il fenotipo facciale assomiglia notevolmente al fenotipo Noonan/CFC, con macrocefalia relativa, costrizione bitemporale, andamento obliquo verso il basso e l'esterno delle rime palpebrali, capelli ricci. I lineamenti appaiono spesso "grossolani", con labbra ispessite. La cute è ridondante con tendenza a sviluppare ipercheratosi e papillomi. Anche lo sviluppo psicomotorio è sempre ritardato. (Axelrad et al., 2009). Un difetto congenito del cuore è riportato in almeno tre quarti dei casi di Sindrome di Costello, le più frequenti sono CMI, tachicardia e SVP. Una manifestazione distintiva della Sindrome di Costello è una marcata propensione a sviluppare tumori (15-25%) fra cui rabdomiosarcomi, neuroblastomi e carcinomi (Lin et al., 2011).

#### Sindrome Cardiofaciocutanea (CFC, OMIM 115150)

La Sindrome CFC può essere distinta dalla SN per la gravità del ritardo psicomotorio e la presenza di anomalie ectodermiche presenti nel 100% dei casi. (Roberts et al., 2007; Rauen, 2011). Nevi pigmentati e ipercheratosi follicolare a carico della faccia e degli arti si osservano nel 75% dei casi, angiomi, ed eczemi nel 45% , ittiosi, e macchie caffelatte nel 30%. (Roberts et al., 2006). In circa metà dei casi studiati è stata riportata la comparsa di crisi epilettiche (Yoon et al., 2007). Anche la sindrome CFC è geneticamente eterogenea. Sono state identificate mutazioni nei geni **BRAF** (50-60%), **MEK1** (5-10%), **MEK2** (5-10%), e **K-RAS** (3-5%) (Niihori et al., 2006; Rodriguez-Viciano et al., 2006). Correlazioni genotipo-fenotipo di questi pazienti sono state proposte ma devono ancora essere motivate. (Rauen, 2011)

### ***Il pathway di RAS nei tumori***

Mutazioni attivanti di *RAS* ricorrono nel 30% dei tumori. Mutazioni di *K-RAS* sono state identificate in tumori del pancreas, del colon-retto, dell'endometrio, tratto biliare, intestino e della cervice. Mutazioni di *K-RAS* e *N-RAS* possono causare leucemie isolate. Mutazioni di *N-RAS* e *H-RAS* sono predominanti nel melanoma e tumore della vescica (Downward, 2003; Bos, 1989). La maggior parte delle mutazioni somatiche identificate nei tumori sono responsabili di un cambio amminoacodico in posizione 12, 13 e 61 della proteina.

Oltre alle mutazioni somatiche dei geni *RAS* anche le mutazioni somatiche di *PTPN11* possono causare leucemie isolate. Mutazioni somatiche del gene *PTPN11* sono state identificate in circa il 34% dei pazienti con leucemia mielo-monocitica giovanile, nel 10% dei pazienti con sindromi mielodisplastiche, nel 6% dei pazienti con leucemia linfoblastica acuta e nel 4% di quelli con leucemia mieloblastica (Tartaglia et al., 2003). Le mutazioni sono diverse rispetto a quelle presenti nei pazienti portatori di mutazioni costituzionali e la prevalenza delle mutazioni è significativamente più elevata nei pazienti pediatrici (Tartaglia et al., 2006). Nei pazienti con SN affetti da leucemia mielo-monocitica giovanile, la mutazione T73I è molto più comune rispetto a quanto si osserva nelle pazienti SN senza leucemia (rispettivamente 75% e 4%)

Mutazioni di *B-RAF* sono responsabili del 42% di tumori delle cellule mieloidi, possono essere presenti anche nei tumori della tiroide (30-50%), del colon retto (5-20%) e del tumore delle ovaie (30%) (Davies et al., 2002; Garnett et al., 2004). La mutazione V600E di *B-RAF* è responsabile del 90% delle mutazioni (Davies et al., 2002; Garnett et al., 2004) (Wellbrock et al., 2004; Garnett et al., 2004).

### ***Il gene casitas B-lineage Lymphoma (CBL; MIM 165360)***

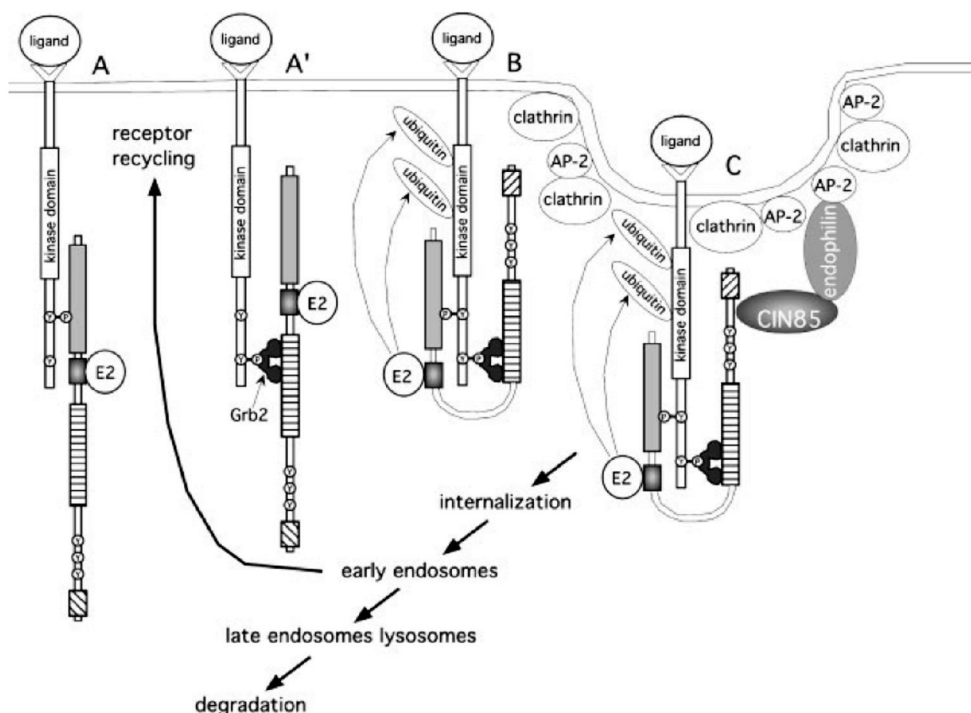
Questo gene codifica per una proteina appartenente alla piccola famiglia delle E3 ligasi che regolano il processo di ubiquitinazione e regolando negativamente il segnale intracellulare a valle dei recettori tirosin-chinasici e contemporaneamente contribuendo al traffico cellulare attraverso la sua funzione di adattatore cellulare (Dikic, 2007). Il gene *CBL* è caratterizzato da un dominio di legame con il recettore tirosin chinasi nella porzione N-terminale della proteina coinvolto nell'interazione proteina-proteina ed è connesso mediante un linker ad un dominio ZINC FINGER che media la sua attività E3 nel processo di ubiquitinazione. Infine la porzione C-terminale della proteina presenta una regione molto ricca in proline contenente siti di fosforilazione del recettore SH2 e SH3 seguiti da un dominio di legame all'ubiquitina UBA

che si sovrappone ad un dominio Leucina Zipper e alla dimerizzazione della proteina (Swaminathan et al., 2006) (Fig.40).



Figura 40. Struttura del gene CBL

La sua funzione principale è quella di regolare il processo di ubiquitazione e degradazione dei recettori tirosin chinasi attivati. Dopo il legame con il suo ligando EGF il recettore tirosin chinasi omodimerizza e si autofosforila reclutando la proteina ubiquitina ligasi CBL e l'enzima E2 che favorisce il legame con l'ubiquitina. Il legame di CBL al recettore può avvenire sia attraverso interazione diretta tra il dominio di legame al recettore di CBL e il recettore tirosinico fosforilato o è facilitato dalla molecola adattatore GRB2, che con il suo dominio SH2 lega il recettore fosforilato e con la regione SH3 interagisce con la regione ricca in prolina di CBL, permettendo il legame della ligasi al recettore. Questo è seguito dalla fosforilazione della tirosina di CBL che si attiva come ligasi e media la reazione di ubiquitinazione del recettore. Il recettore ubiquitinato viene internalizzato nelle vescicole di clatrina che si fondono con le vescicole interne formando endosomi da dove i recettori ubiquitinati passano ai lisosomi e infine degradati. Mentre i recettori non ubiquitinati vengono ugualmente internalizzati ma successivamente riciclati sulla membrana plasmatica (Schmidt et al., 2005) (Fig.41).



*Figura 41. Processo di ubiquitinazione e degradazione dei recettori tirosin chinasi mediati dal gene CBL*

Mutazioni somatiche spesso in omozigosi sono state recentemente identificate con prevalenza variabile nei tumori della linea mieloide, e nelle leucemie mielomonocitiche giovanili (JMML), comuni nella SN e nelle altre RASopatie (Caligiuri, 2007; Sargin et al., 2007; Loh et al., 2009; Makishima et al., 2009; Muramatsu et al., 2010; Reindl et al., 2009; Sanada et al., 2009; Grand et al., 2009; Sugimoto et al., 2009; ). Spesso sono delezioni di pochi nucleotidi in frame o mutazioni missenso che colpiscono prevalentemente il dominio RING finger e la porzione linker. Si tratta di mutazioni dominanti negative che agiscono impedendo il legame della proteina CBL con i recettori tirosin chinasi attivati, che a loro volta non verranno ubiquitinati e degradati. Proprio per il link tra il ruolo di *CBL* nel pathway di *RAS*, la sua espressione ubiquitaria, e la sua funzione di regolatore negativo sul segnale cellulare di recettori tirosin chinasi compreso il recettore per il fattore di crescita epidermico [EGFR (MIM 131550)] , che ha un ruolo importante nei processi di sviluppo e per il ruolo di *CBL* nella leucochemogenesi in particolare nelle JMML, abbiamo ipotizzato che questo gene potesse essere implicato anche nella patogenesi della SN e delle sindromi correlate.



## ***Pazienti e Metodi***

### *Diagnosi di SN e Sindrome Noonan -like*

La diagnosi di SN è stata posta su base clinica, in presenza delle caratteristiche cardinali: bassa statura, dimorfismi facciali caratteristici, collo corto o largo, CC, displasia dei vasi linfatici, anomalie del torace con apparente posizione bassa dei capezzoli, criptorchidismo, ritardo psicomotorio e delle tappe dello sviluppo di grado variabile e anomalie della coagulazione.

### *Analisi Molecolare*

Lo studio è stato effettuato mediante analisi mutazionale di una coorte di 365 soggetti affetti da SN o con segni suggestivi della sindrome, negativi per la presenza di mutazioni nei geni precedentemente associati alla SN e alle altre RASopatie (*PTPN11, KRAS, SOS1, RAF1, BRAF, HRAS, MEK1, MEK2, SHOC2, NRAS*). Il DNA genomico è stato ottenuto usando un kit di estrazione commerciale, *Maxwell 16 Blood DNA Purification Kit* (Promega), che consente la purificazione dell'acido nucleico in automatico utilizzando la lisi cellulare ed il legame dell'acido nucleico con particelle di silice magnetizzata come principio basilare di separazione. Con questo kit a partire da 400µl di sangue è stato possibile ottenere circa 300 µl di DNA ad una concentrazione di circa 40 ng/µl. È stata analizzata tutta la sequenza codificante e giunzioni esone-introne del gene *CBL* (NM\_005188.2). I primers sono stati disegnati in maniera da ottenere amplificati di lunghezza media di 300 paia di basi, idonei per l'analisi di mutazioni attraverso DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) e per l'analisi di sequenza. I frammenti che mostravano un profilo DHPLC etero duplice vengono riamplicati mediante PCR a partire dal DNA di partenza. I frammenti etero duplici sono stati sequenziati utilizzando la chimica del Big Dye Terminator v 3.1 (Applied Biosystem). I primers e le condizioni di amplificazione sono elencati in tabella 7. I prodotti di sequenza sono stati purificati utilizzando le colonnine DyeEx 2.0 Spin Kit, Qiagen. 2 microlitri di ogni purificato di sequenza sono stati miscelati con 20 microlitri di formammide, denaturati per 5 minuti a 95° e risolti mediante elettroforesi capillare sul sequenziatore automatico ABI prism 3130 Genetic Analyses (Applied Biosystem). La lettura degli elettrofenogrammi è stata effettuata utilizzando i programmi dedicati SeqAnalysis (Applied Biosystem) e SeqMan (DNA Star) confrontando la sequenza ottenuta con la sequenza di riferimento presente nel database dell'NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Exon	Primer Sequence (5'→3')		Ann. Temp. (°C)	Product Length (bp)
	Forward	Reverse		
1	TTCACGCCCTGCTTCTCTCC	TTCTCCGTCCTCGTTCC	62 <sup>a</sup>	355
2	CAATGGGGTTATGGATCTGC	CTATGTGTTACCCATTCAGGC	57	461
3	CTTGTATGGTGAATTTGGTGC	ATTACTTTTCTCAGAGTTCCC	55	334
4	TTGATTATGGCGATGCCTGG	TTTCTCTTCACCGAAGTAGC	56	281
5	CTCTGAGTTGGTTGTACATCTGAC	CAGAACCTTGGCTATTGCGAAAC	60	290
6	TTGCCTTCCACCGTAATACC	TCCAGACTCTAACAGATGG	57	236
7	ATGGAGAAACTCCCAGATTCC	AGCTTGTGTCCAGTGATATGG	58	221
8	GTATAGGAAACAAGTCTTAC	TCCAAGGTTATTACATAGCTG	54	270
9	AGCCTTTACTGATACAAGGG	TAGAAGACAACTCACAATGG	54	404
10	TTAGGAGAGTTGAAAGATGCC	TGTGGAAGCAGGGTGAAAGC	60	286
11	GCTTCTGCTCTTGGAAGTGC	ACAGACATGAGCCACTGTGC	65 <sup>a</sup>	566
12	AATAAGAGCAGAGGCTCAGC	AATCATTCTACATGGTGCAG	54	289
13	GGTGACATGTATTTTGCTCTG	GGTGAAGGGTGTCAATTACC	56	300
14	CATACACCTATAAATTGCCAC	GATCAAGCTATCTCAATTGCC	56	322
15	TCTGTTTACATGGTGTGTTGGC	AAACATACAGGCCACACTGC	60	395
16	ACATGTACCCAGTTTACAGG	TAACTCCCAACTCACTGGTC	56	452

*Tabella 7: Primer utilizzati per analisi Pcr del gene CBL*

## Risultati e discussione

L'analisi mutazionale del gene *CBL*, condotta mediante d-HPLC e successivo sequenziamento automatico dei picchi eteroduplici ha identificato 4 diverse varianti missenso a livello germinale in 4 pazienti con caratteristiche cliniche sovrapponibili alla SN e un fenotipo variabile. Tre diverse mutazioni missenso [Gln367Pro (1100A>C), Lys382Glu (1144A>G), e Asp390Tyr (1168G>T)] sono state identificate in 3 pazienti apparentemente sporadici. L'analisi del DNA dei genitori ha dimostrato l'origine *de novo* del cambio Asp390Tyr. L'identificazione della stessa variante in altri tessuti (bulbo del capello e mucosa buccale) del paziente ha escluso che questo cambio aminoacidico rappresenti un evento somatico confinato alle sole cellule emopoietiche. L'analisi del DNA dei genitori del paziente portatore del cambio Lys382Glu ha identificato la stessa variante nel padre, apparentemente non affetto. La rivalutazione clinica di questo individuo ha permesso di evidenziare la presenza di alcuni segni minori della SN, che conferma il contributo di questa variante alla patologia e indica che questa variante si esprime con un fenotipo variabile. Una quarta mutazione [Arg420Gln (c.1259G>A)] del gene *CBL* è stata identificata in un secondo caso familiare (Fig. 41). Tutte le mutazioni missenso sono state escluse in oltre 300 individui di controllo non affetti provenienti dalla popolazione Italiana e di origine Caucasica.

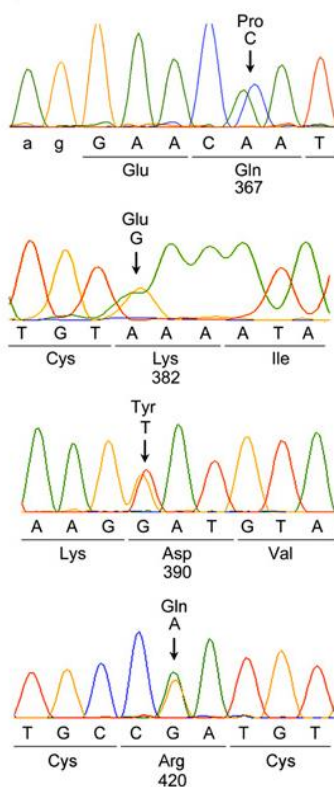


Figura 42. Elettrofrenogrammi delle mutazioni identificate in *CBL*

Tutte e quattro le mutazioni identificate alterano amino acidi altamente conservati tra le specie (Fig. 43) . I cambi sono localizzati nel dominio RING finger e nella porzione linker che lo connette al dominio TKB N-terminale della proteina, già nota come regione hot-spot di mutazioni nelle leucemie. (Fig. 44) (Caligiuri et al., 2007; Sargin et al., 2007; Loh et al., 2009; Muramatsu et al., 2010, Reindl et al., 2009; Sanada et al., 2009; Grandet al., 2009)

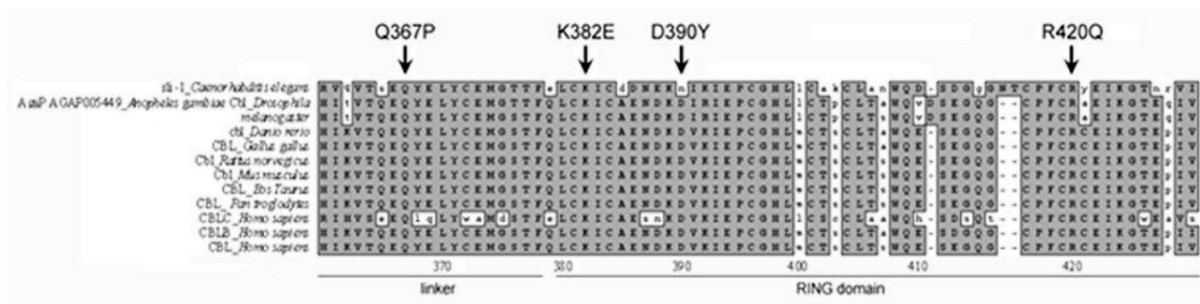


Figura 43. Analisi di conservazione tra le specie

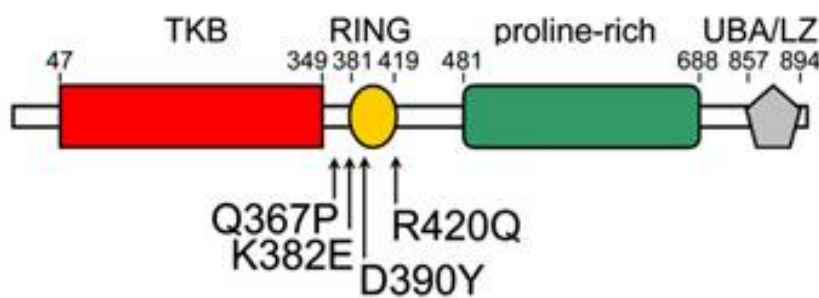


Figura 44. Domini della proteina in cui sono localizzate le mutazioni di CBL identificate nel nostro studio

In accordo con la struttura cristallografica dei domini TKB-LINKER-RING di CBL complessati all'enzima ubiquitina coniugante E2L3 (UBE2L3 [MIM603721]) (Zheng et al., 2000), la Lys382 e l'Arg420 sono posizionate sulla superficie RING coinvolta nel legame con UBE2L3. Questi residui sono adiacenti alla regione costituita da 4 residui di cisteina coinvolti nella stabilizzazione della struttura del dominio legando due ioni zinco tetraedrici coordinati. La Lys382 è adiacente ai residui coinvolti nel legame con UBE2L3, e l'Arg420 partecipa direttamente in questo network di legame. Mutazioni missenso che colpiscono l'Arg420, compresa l'Arg420Gln o i residui fiancheggianti la Lys382 (Leu380, Cys381, Ile383 e la Cys384) sono state identificate nella leucemia mielomonocitica cronica (CMML) e nella leucemia mieloide acuta (AML) (Sargin et al., 2007; Loh et al., 2009; Reindl et al., 2009; Grand et al.,

2009). D'altra parte, l' Asp390 è adiacente al residuo (Lys389) contribuendo all'interazione intramolecolare dei domini RING e linker con il TKB, che è critica per la funzione di CBL (Zheng et al., 2000; Kassenbrock et al., 2004), una mutazione missenso di questo residuo è stata identificata nei tumori della linea mieloide (Bacher et al., 2010). Allo stesso modo la Gln367 è localizzata in una regione del linker che include i residui che contribuiscono all'interazione con il dominio TKB e l'enzima UBE2L3 (Zheng et al., 2000). Mutazioni in questo residuo sono state identificate nelle CMML (Gln367Pro, Gln367Lys) (Fig.45) (Sanada et al. 2009).

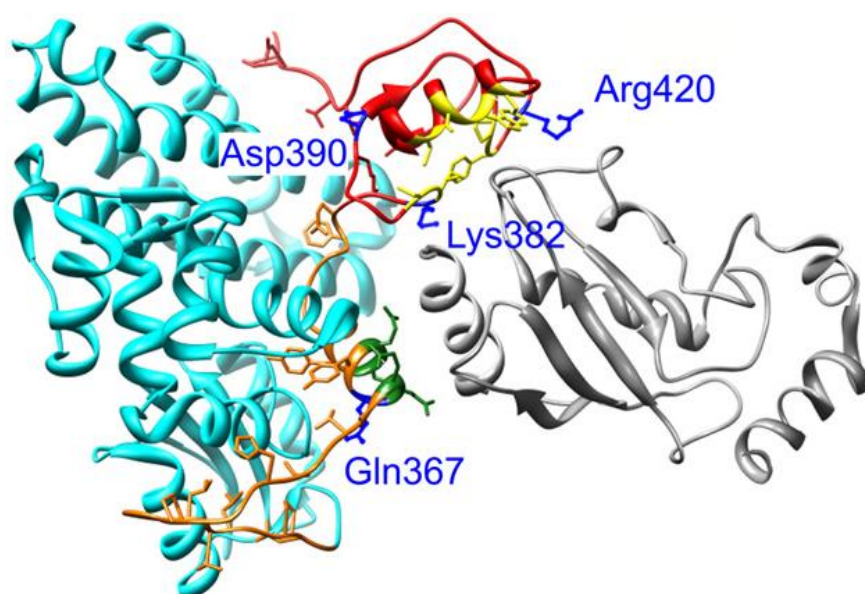


Figura 45. Analisi di modeling della proteina CBL

In un secondo screening di 96 pazienti negativi per l'analisi del gene *PTPN11* sono state identificate ulteriori (varianti nucleotidiche). I seguenti dati devono ancora essere pubblicati e sono in corso analisi di correlazione genotipo-fenotipo e analisi funzionali delle varianti identificate. L'analisi mutazionale ha identificato 6 diverse varianti in eterozigosi. La mutazione c.705T>A (p.Tyr235X) è stata identificata in una forma familiare di SN. Ad oggi non è stato possibile recuperare gli altri membri affetti della famiglia (n=3) per studiare la variabilità intrafamiliare del fenotipo associato a questa mutazione. È in corso presso l'Istituto Superiore di Sanità (Dott. Marco Tartaglia) lo studio funzionale della proteina tronca codificata da questa mutazione. La seconda variante identificata è una sostituzione missenso c.2687T>C (p.Val896Ala) a segregazione paterna. Il padre della paziente presenta una cardiomiopatia

ipertrofica con setto interventricolare, tipica della SN. E' in corso la revisione dei dati clinici di questo paziente. La terza variante codifica per una duplicazione di una istidina al codone 42 del gene CBL (c.124\_126dupCAC [p.His42dup]) e segrega da un genitore apparentemente non affetto. Alla luce dei nuovi dati molecolari e dal momento che alcune delle caratteristiche cliniche della SN (dismorfismi facciali) possono essere meno evidenti nei soggetti adulti, i genitori del paziente sono stati ricontattati per un riesame delle loro caratteristiche cliniche. L'analisi mutazionale ha inoltre identificato 2 varianti introniche (1227+4C>T e IVS7-1G>T). Per confermare un eventuale effetto di queste varianti sullo splicing, sono state espresse entrambe in un vettore "minigene". L'analisi minigene ha dimostrato che la variante IVS7-1G>T provoca uno splicing aberrante dovuto allo "skipping" dell'esone 8 del gene CBL, mentre la variante c.1227+4C>T non causa alcuna alterazione "in vitro" dello splicing. Sono in corso studi di RT-PCR per valutare eventuali effetti di tipo quantitativo sull'RNA messaggero del gene CBL da parte della variante c.1227+4C>T. Infine, l'analisi mutazionale ha identificato una mutazione nota, la Tyr371His (c.1111T>C), precedentemente identificata a livello germinale in pazienti sindromici (SN) e a livello somatico in pazienti con leucemia mielomonocitica giovanile (JMML). E' in corso la raccolta del DNA dei genitori del paziente e di alcuni tessuti (urina, mucosa buccale, bulbi piliferi) per verificare se la mutazione e' presente a livello somatico o germinale. In parallelo, e' in corso la revisione dei dati clinici di tutti i pazienti con mutazione in CBL genopizzati nel nostro laboratorio per identificare eventuali correlazioni genotipo-fenotipo.

### ***Analisi fenotipica dei pazienti mutati in CBL***

I 6 pazienti in cui è stata identificata una mutazione nel gene CBL sono stati descritti fenotipicamente in maniera piuttosto approfondita per stabilire correlazioni di tipo genotipo-fenotipo. (Fig.46)



*Figura 46. Foto dei pazienti con mutazioni in CBL*

Il paziente (NMC-NS076, eterozigote per la mutazione **Gln367Pro (1100A>C)**) è giunto alla nostra attenzione per problemi di ritardo dello sviluppo e CC. I suoi genitori non consanguinei sembravano apparentemente sani, e non presentavano segni distintivi della SN. L'esame clinico a 9 anni mostra la presenza di faccia triangolare con ipertelorismo, ptosi delle rime palpebrali, orecchie a impianto basso. La sua altezza era normale, I capezzoli molto distanziati e il pectus excavatum. Presentava macchie caffè e latte ma non erano presenti altre anomalie ectodermiche. La valutazione cardiologica ha rivelato la presenza dell' atrio sinistro ispessito e aritmie ventricolari cianotiche transienti, caratteristica non comune nella SN. La risonanza magnetica neurologica non ha evidenziato anomalie strutturali. Queste caratteristiche erano suggestive della SN, ma non soddisfano tutti i criteri per la diagnosi definitiva.

La paziente eterozigote (ISS-S1N51) per la variante *de novo* **Asp390Tyr (c.1168G > T)** è giunta in consulenza all'età di 3 anni. Mostrava dimorfismi facciali (bozze frontali, orecchie a impianto basso, ponte nasale largo e ptosi moderata del lato sinistro) e un moderato ritardo dello sviluppo. Presentava ipotonia generalizzata nel periodo neonatale e dell'infanzia e, gravi problemi di alimentazione. La bambina aveva ritardo psicomotorio: deambulazione autonoma a 21 mesi, ritardo del linguaggio. Il suo sistema cardiovascolare era normale. La bambina a 5 anni manifestava ancora ritardo nell'acquisizione del linguaggio. Erano presenti anomalie ectodermiche moderate; aveva capelli sottili e radi, capezzoli ben distanziati, e pectus excavatum anteriore medio. La sua altezza era nel decimo percentile. Presentava lassità articolare al gomito, spalle e dita. All'età di 15 anni i dimorfismi facciali apparivano meno evidenti, la crescita e il QI erano nella normalità ma continuava ad avere ipotonia e iperlassità articolare.

La variante **c.1144A>G** (BO5149) è stata identificata in un paziente di sesso femminile di 18 anni che aveva tutte le caratteristiche tipiche della SN: bassa statura (< 3° centile), dimorfismi facciali caratteristici (ipertelorismo, ptosi, rime palpebrali rivolte verso il basso orecchie retro ruotate e a basso impianto), collo corto con un marcato pterigium colli, attaccatura dei capelli bassa. Presentava valvola aortica bicuspidata con stenosi che ha richiesto un intervento chirurgico. Altre caratteristiche erano lo strabismo, anomalie del torace, cubito valgo, iperlassità articolare, ipoacusia trasmissiva, e agenesia renale unilaterale. Il padre all'età di 46 anni portatore della stessa mutazione eterozigote, non presentava caratteristiche dimorfiche significanti, l'altezza era normale, e non mostra anomalie cardiovascolari e scheletriche. Tuttavia aveva un collo ampio, bassa attaccatura dei capelli, malformazione di Chiari di tipo I, caratteristica ricorrente nella NS e nelle sindromi correlate, complicata da idrocefalo tri-ventricolare e siringomielia cervicale con conseguente debolezza e iperreflessia delle gambe, i deficit sensoriali del tronco e degli arti inferiori destro e nistagmo, che ha richiesto craniectomia decompressiva suboccipitale e laminectomia cervicale.

All'età di 6 mesi la paziente con la mutazione **c.1259G > A** ereditata dal padre presenta dimorfismi facciali (epicanto, ponte nasale piatto, orecchie a impianto basso e angioma). Il collo era corto con pelle ridondante, capelli sottili, le unghie dei piedi displastiche, la pelle scura e macchie caffè e latte, striature sulle gambe e ipotonia muscolare.



La crescita è nel range di normalità. L'ecocardiografia ha rivelato una lieve insufficienza della valvola mitrale. All'età di 8 anni caratteristiche facciali sono tipiche e segni come gli occhi celesti, labbro inferiore estroflesso e le orecchie dismorfiche. I suoi capelli erano sottili, displastici, e crescevano lentamente, con le sopracciglia sparse. Presentava collo corto, il petto era ampio, con ampia spaziatura dei capezzoli. La sua pelle è scura e secca, aveva lesioni eczematose sul viso, cheratosi, striature pilaris e macchie caffè e latte sulle gambe. I giunti erano ipermobili, e la voce era rauca. Lo sviluppo cognitivo era leggermente ritardato. La risonanza magnetica cervicale ha rilevato la presenza di un corpo calloso anomalo con allargamento della parte anteriore e ipoplasia della regione posteriore. Suo padre portatore della stessa mutazione missenso mostrava fronte alta, sopracciglia sparse, rime palpebrali rivolte verso il basso, labbra ispessite, collo corto, petto ampio, pectus excavatum, la pelle secca e scura con lesioni iperpigmentate nella regione sacrale. E' stato operato per criptorchidismo bilaterale all'età di 8 anni. Le tappe dello sviluppo sono state acquisite normalmente, anche se si è riportato un ritardo di apprendimento. Nessuno dei soggetti eterozigoti per una mutazione nel gene CBL Presenta anomalie ematologiche.

### Analisi funzionale delle mutazioni

Per comprendere il ruolo funzionale delle mutazioni identificate sull'attività ubiquitina ligasi di CBL e sul pathway di RAS abbiamo espresso transitoriamente i mutanti taggati HA Asp390 e Arg420 in cellule COS1 e abbiamo valutato i livelli di ubiquitinazione di EGFR e la propagazione del segnale attraverso la cascata delle MAPK e P13K-AKT (Fig. 47).

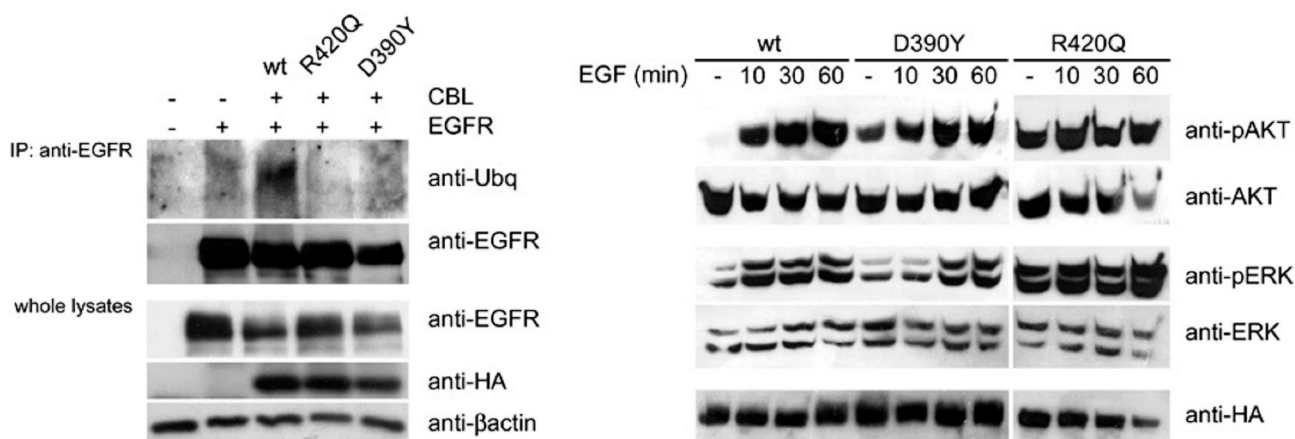


Figura 47. Studi funzionali degli effetti delle mutazioni Asp390Tyr e Arg420Gln sulla proteina CBL. (Sinistra) Ubiquitinazione EGFR della proteina selvatica e mutante espresse nelle cellule COS1 dopo stimolazione EGF. L' Ubiquitinazione dell' EGFR è stata determinata in base all'EGFR immunoprecipitata. Sono mostrate nella figura l'EGFR immunoprecipitato, l'espressione esogena di CBL (anti HA) e della proteina EGFR e della  $\beta$  -actina nei lisati cellulari. I blot sono rappresentativi di 3 esperimenti. (Destra) Saggio di fosforilazione di AKT e ERK in cellule COS-1 che esprimono la proteina mutante e la proteina selvatica. Lo stato di fosforilazione è stato valutato in tempi diversi in condizione basale e dopo stimolazione EGF. Sono mostrati i livelli di espressione di AKT, ERK e CBL.

Queste mutazioni sono state selezionate come rappresentanti delle 2 classi di mutazioni che interessano i residui localizzati nell'interfaccia tra il TKB e il dominio RING-fingers (Gln367Pro, e Asp390Tyr) o rivolti verso l'enzima E2 coniugante l'ubiquitina (Lys382Glu and Arg420Gln). Da questi esperimenti si è visto che le mutazioni germinali del gene CBL alterano il processo di ubiquitinazione del recettore in risposta alla stimolazione con EGF (47a). Questi risultati sono in linea con i precedenti studi focalizzati sulle mutazioni in CBL nelle leucemie confermando quindi che le mutazioni di CBL alterano la funzione ubiquitina ligasi del gene CBL, interferendo con la degradazione del recettore sulla superficie cellulare ad opera di CBL, agendo in maniera dominante-negativo sulla proteina wild type (Sargin et al., 2007; Grand et al., 2009).

L'espressione transiente dei mutanti aumentano la fosforilazione basale di AKT a causa dell'inefficiente down regolazione ad opera di CBL dei recettori sulla superficie cellulare. Le cellule che esprimono il mutante Arg420Gln mostrano fosforilazione costitutiva di ERK (47b). I nostri risultati dimostrano che le mutazioni germinali del gene CBL alterano il signaling intracellulare attraverso la via di trasduzione RAS/MAPK, a causa di un alterata ubiquitinazione del recettore.

## ***Discussione***

La SN e condizioni correlate sono causate da mutazioni in geni che codificano per proteine appartenenti al pathway di *RAS* (*KRAS*, *HRAS*, *NRAS*), proteine regolatrici (*PTPN11*, *SOS1*, *NF1*, *SPREAD*, *SHOC2*) o trasduttori a valle (*RAF1*, *BRAF*, *MAP2K1* e *MAP2K1*). In questo lavoro noi riportiamo che mutazioni germinali che cadono nella porzione linker o nel dominio RING finger del gene *CBL*, regolatore negativo dei recettori tirosin chinasi attivati possono essere responsabili di una condizione clinica sovrapponibile alla Sindrome di Noonan. Sulla base di queste considerazioni, mutazioni che coinvolgono l'attività ubiquitina ligasi di *CBL* dovrebbero iperattivare la cascata del segnale in seguito ad un'inefficiente degradazione del recettore, come è stato visto nel nostro studio e da pubblicazioni recenti. (Sargin et al., 2007, Sanada et al., 2009). Mutazioni di *CBL* che colpiscono il dominio RING-finger e la porzione linker del gene contribuiscono alla patogenesi della leucemia mieloide e ai disordini mieloproliferativi, comprese le JMML. Nelle JMML, le mutazioni identificate sono spesso missenso, il residuo Tyr371 è mutato nella maggior parte dei casi (Loh et al., 2009; Muramatsu et al., 2010).

Sono state identificate mutazioni nei disordini mieloproliferativi anche negli altri geni del pathway di *RAS* come *PTPN11*, *KRAS*, *NRAS*, *NF1*, a supporto del ruolo funzionale del gene *CBL* in queste condizioni. Nelle JMML e negli altri tumori della linea mieloide, le mutazioni di *CBL* ricorrono in omozigosi in seguito a isodisomia acquisita confermando il fatto che le mutazioni di *CBL* nella leucemogenesi sono da attribuire alla perdita totale o comunque alla presenza di una maggiore percentuale dell'allele mutante rispetto al wild type. (Loh et al., 2009; Sanada et al., 2009; Grande et al., 2009). Nei 6 pazienti portatori delle mutazioni germinali in *CBL* non sono state identificate anomalie della linea ematopoietica, questo non esclude la possibilità che mutazioni di *CBL* in eterozigosi potrebbero predisporre allo sviluppo di tumori di questo tipo. Uno scenario simile è stato osservato nella Neurofibromatosi di tipo I in cui è necessaria la presenza di una seconda mutazione o di una delezione dell'allele wild type del gene *NF1* affinché vi sia la manifestazione di questi disordini.

Per comprendere meglio lo spettro fenotipo associato alle mutazioni nel gene *CBL* è necessario ampliare la coorte di pazienti studiati, questi dati infatti suggeriscono che mutazioni in *CBL* sono associate ad un fenotipo variabile in parte sovrapponibile alla SN. Mutazioni in questo gene ricorrono in circa 1% di pazienti con caratteristiche sovrapponibili alla SN, e in particolare in pazienti NS con JMML negativi per i geni *PTPN11*, *NF1*, e nei geni *RAS*. Inoltre questi dati

confermano che la deregolazione funzionale di *CBL* è responsabile della perturbazione di un ampio spettro di processi cellulari coinvolti nello sviluppo.

Dati molecolari, di interazione proteica e funzionale sono a supporto del fatto che i disordini associati alle mutazioni di *CBL* perturbino il traffico intracellulare agendo sul metabolismo del recettore. Sicuramente saranno necessari altri lavori per delineare lo spettro fenotipico associato con le mutazioni germinali di *CBL* per comprendere le conseguenze funzionali nel signaling intracellulare e nello sviluppo .

## DISCUSSIONE GENERALE

Le cardiopatie congenite (CC) sono malformazioni molto comuni nell'uomo. Sono da pochi anni però cominciano ad essere comprese le basi genetiche di questi difetti, grazie agli studi epidemiologici, alle osservazioni cliniche e ai recenti progressi nel campo della biologia molecolare che stanno contribuendo alla comprensione dell'eziologia di un numero sempre crescente di cardiopatie. Storicamente le prime prove di evidenza del forte impatto della genetica nell'eziologia delle CC sono costituite dalle osservazioni epidemiologiche, che hanno mostrato che circa 1/3 dei bambini con CC presenta anche malformazioni extracardiache nell'ambito di sindromi genetiche (Ferencz et al., 1993). La classificazione patogenetica delle CC introdotta da Clark (1986) si è dimostrata particolarmente utile per il raggruppamento delle malformazioni in base a possibili meccanismi morfogenetici cardiache. Alcuni tipi anatomici, però sono diagnosticati più frequentemente nell'ambito di sindromi genetiche, così come la stenosi polmonare con lembi valvolari displastici tipica nella sindrome di Noonan, mentre altri tipi di CC sono prevalentemente non sindromici. L'identificazione di associazioni specifiche tra CC e sindromi cromosomiche e monogeniche ha consentito di porre le prime basi per l'identificazione dei difetti genetici implicati nelle malformazioni cardiache. A questo proposito si deve sottolineare che un importante ruolo ha avuto anche lo studio del fenotipo morfologico di CC associato ad anomalie genetiche specifiche (Marino, Digilio, 2000). Il miglioramento delle tecniche di biologia molecolare ha consentito di individuare alcuni geni-malattia e di cominciare a far luce sui meccanismi patogenetici. Un'ulteriore osservazione riguarda i meccanismi patogenetici; infatti geni diversi coinvolti nello stesso meccanismo patogenetico possono essere alla base di un difetto cardiaco identico. Per quanto riguarda le CC non sindromiche il numero di geni attualmente conosciuto è limitato. In questo lavoro si descrive e analizza le acquisizioni riguardanti l'identificazione di alcune delle cause genetiche delle CC, sindromiche e non sindromiche, ottenute nel corso del dottorato di ricerca.

In questo contesto, l'attività di ricerca si è concentrata inizialmente sullo studio delle basi genetiche dei difetti di lateralizzazione, e sulle analogie tra queste patologie e la trasposizione delle grandi arterie. In questo studio, effettuato su un'ampia serie di casi familiari, si è dimostrato che almeno una parte di trasposizioni delle grandi arterie, nosologicamente ancora inquadrate nell'ambito delle cardiopatie troncoconali da gran parte degli autori, condivide le stesse basi genetiche delle eterotassie e rappresenta pertanto una forma "frustra" di difetti della lateralizzazione.

In uno studio parallelo, partendo da alcune evidenze sul modello animale, si è inoltre dimostrato che la connessina 43, la principale connessina cardiaca, non causa il difetto cardiaco criss-cross, una rara cardiopatia congenita in cui il “verso” delle grandi arterie è invertito.

Dal momento che gran parte delle CC isolate si trova in forma sporadica e che alcuni studi effettuati sul tessuto cardiaco incluso in paraffina di pazienti con difetti della settazione cardiaca hanno identificato un numero elevato di mutazioni nei fattori di trascrizione cardiaci GATA4 e NKX2.5, abbiamo raccolto le biopsie cardiache congelate di una serie di pazienti con difetti della settazione cardiaca. Tale studio non ha identificato alcuna mutazione patogenetica nelle biopsie congelate e ha permesso pertanto di risolvere una importante controversia tra sostenitori e oppositori della presenza di mutazioni somatiche nel cuore di pazienti con CC, dimostrando sia che il contributo di queste mutazioni alle CC è trascurabile e che le mutazioni somatiche identificate fino ad oggi nel tessuto cardiaco fissato in formalina, che avevano creato grandi aspettative in parte della comunità scientifica, in realtà potrebbero essere degli artefatti dovuti al trattamento con il fissativo. Recentemente, ha avuto grande risalto l'identificazione mediante studi microarray “whole genome” di sbilanciamenti cromosomici de novo nel 10% circa dei pazienti sporadici con tetralogia di Fallot isolata, dal momento che tali sbilanciamenti erano stati in precedenza solo sporadicamente associati alle cardiopatie congenite isolate. Abbiamo quindi, sulla base dei risultati microarray, selezionato la regione cromosomica 1q21, associata ad un quadro sindromico di disturbi psichiatrici e dell'apprendimento, dismorfismi e altre malformazioni congenite, e studiato i riarrangiamenti di tale regione in una serie di pazienti con cardiopatie congenite isolate. Questo studio ha identificato una nuova associazione tra la stenosi della valvola polmonare e le delezioni e duplicazioni 1q21.

La Sindrome di Noonan (SN, OMIM 163950) è una malattia dello sviluppo a trasmissione autosomica dominante, geneticamente eterogenea, con una prevalenza stimata alla nascita di 1/1000-1/2500. È una sindrome caratterizzata da bassa statura, dismorfismi facciali, pterigio, malformazioni scheletriche e da un ampio spettro di cardiopatie congenite. Altre anomalie relativamente frequenti includono criptorchidismo, ritardo mentale medio o lieve, difetti ematologici e possibilità di sviluppare una serie di emopatie maligne. La SN è causata da mutazioni germinali missenso nei geni *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1* e *KRAS* in circa il 75% dei casi. Si tratta di geni che codificano per proteine che partecipano al controllo della via di trasduzione

del segnale mediata dalle proteine RAS. Le mutazioni osservate conferiscono un guadagno di funzione ai prodotti proteici, promuovendo complessivamente l'iperattivazione della via. L'identificazione di mutazioni in altri geni codificanti per trasduttori del segnale coinvolti nella stessa via in un gruppo di malattie dello sviluppo clinicamente correlate alla SN, quali *HRAS* nella sindrome di Costello (CS, OMIM 218040), *KRAS*, *BRAF*, *MEK1* e *MEK2* nella sindrome Cardio-Facio-Cutanea (CFC, OMIM 115150) ed *NF1* nella sindrome Neurofibromatosi-Noonan (NFNS, OMIM 601321), conferma che il meccanismo patogenetico sottostante la SN sia da ascrivere ad una alterata modulazione della via RAS/MAPK.

Nell'ambito delle CC sindromiche, abbiamo partecipato allo studio che ha portato all'identificazione di un nuovo gene malattia nella sindrome di Noonan, il gene Casitas B-lineage Lymphoma (*CBL*). In particolare, abbiamo identificato diverse mutazioni responsabili e dimostrato che i pazienti con alterazioni genetiche in questo gene presentano un fenotipo variabile con caratteristiche cliniche simili o parzialmente sovrapponibili alla SN. L'identificazione di chiare correlazioni genotipo-fenotipo nelle RASopatie trova alcune importanti applicazioni. Prima di tutto permette di orientare l'analisi molecolare nei pazienti con Sindrome di Noonan o altre patologie correlate verso l'uno l'altro gene-malattia. Questo è di grande aiuto, consente di definire indici prognostici e indirizza verso una più mirata presa in carica dei pazienti che, sulla base dello specifico gene mutato, saranno inseriti in programmi di follow-up mirati. Infine, importanti sono le ricadute sulla consulenza genetica e soprattutto la possibilità di offrire una diagnosi prenatale precoce.

Ci sarà ancora molto da lavorare prima di riuscire a capire i meccanismi patofisiologici alla base di questi difetti. Comunque le conoscenze riguardanti le cause genetiche delle CC aumenteranno sempre più velocemente in futuro anche grazie alle nuove tecniche di sequenziamento di seconda generazione (NGS).

In conclusione, il lavoro prodotto in questa tesi ha contribuito significativamente a migliorare le conoscenze sui meccanismi molecolari di alcune delle CC isolate e della Sindrome di Noonan e condizioni correlate. Gli approcci utilizzati fino ad oggi per identificare nuovi geni malattia nelle CC sono stati l'analisi di linkage (prima con microsatelliti e recentemente mediante l'impiego di SNP array) in grandi famiglie, purtroppo non applicabile alla maggior parte dei pazienti che sono sporadici, e l'analisi mutazionale seguendo un approccio per geni candidati selezionati per la loro funzione biologica. Tuttavia sia per le CC isolate che associate a quadri sindromici è evidente che nuovi geni responsabili sono ancora da identificare e questo rende



indispensabile l'utilizzo di tecnologie di nuova generazione che rendano possibile lo studio delle forme sporadiche di CC, come l'utilizzo di tecnologie genome-wide per l'identificazione di varianti di suscettibilità a bassa penetranza (studi caso-controllo), e il sequenziamento di seconda generazione per l'identificazione di varianti rare. Quest'ultimo è sicuramente il miglior candidato per l'identificazione di nuovi geni malattia, come già descritto in letteratura per molte malattie in cui manca un pedigree informativo, la diagnosi clinica non è certa, o in caso di eterogeneità genetica. Inoltre per cercare di rendere la diagnosi molecolare più rapida ed economicamente competitiva, considerando l'ampia eterogeneità genetica delle RASopatie e l'ampiezza dei geni, sarà molto utile ricorrere al target resequencing, in cui sarà possibile analizzare più geni simultaneamente. Ci sono alcuni laboratori che offrono per le patologie geneticamente eterogenee l'analisi di pannelli di geni come quello per la sindrome del QT lungo che comprende l'analisi di 12 geni o la cardiomiopatia ipertrofica (HCM) (<http://genedx.com>)

In un futuro forse molto vicino, mediante l'impiego di nuove tecnologie, sarà possibile l'identificazione di nuovi geni malattia e la caratterizzazione molecolare rapida di una percentuale più ampia di quella attuale di pazienti con CC, che sicuramente contribuiranno a spiegare la complessità fenotipica di queste patologie.

## PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE ORIGINATE DA QUESTA TESI

- Digilio MC, Bernardini L, **Consoli F**, Lepri FR, Giuffrida MG, Baban A, Ferese R, Novelli A, Marino B, De Luca A, Dallapiccola B. Expanding the Spectrum of Congenital Heart Defects in Recurrent Reciprocal 1q21.1 Deletion and Duplication Syndromes With Non-syndromic Pulmonary Valve Stenosis. *American Journal of Medical Genetics: Part A*. (Submitted)
- Salazar M, **Consoli F**, Villegas V, Caicedo V, Maddaloni V, Daniele P, Caianiello G, Pachón S, Nuñez F, Limongelli G, Pacileo G, Marino B, Bernal JE, De Luca A, Dallapiccola B. Search of somatic GATA4 and NKX2.5 gene mutations in sporadic septal heart defects. *J Med Genet*. 2011; 54:306-9
- De Luca A, Sarkozy A, Ferese R, **Consoli F**, Lepri F, Dentici ML, Vergara P, De Zorzi A, Versacci P, Digilio MC, Marino B, Dallapiccola B. New mutations in ZFPM2/FOG2 gene in tetralogy of Fallot and double outlet right ventricle. *Clin Genet*. 2011; 80:184-90.
- Martinelli S, De Luca A, Stellacci E, Rossi C, Checquolo S, Lepri F, Caputo V, Silvano M, Buscherini F, **Consoli F**, Ferrara G, Digilio MC, Cavaliere ML, van Hagen JM, Zampino G, van der Burgt I, Ferrero GB, Mazzanti L, Screpanti I, Yntema HG, Nillesen WM, Savarirayan R, Zenker M, Dallapiccola B, Gelb BD, Tartaglia M. Heterozygous germline mutations in the CBL tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. *Am J Hum Genet*. 2010; 87:250-7
- De Luca A, Sarkozy A, **Consoli F**, Ferese R, Guida V, Dentici ML, Mingarelli R, Bellacchio E, Tuo G, Limongelli G, Digilio MC, Marino B, Dallapiccola B. Familial transposition of the great arteries caused by multiple mutations in laterality genes. *Heart*. 2010; 96:673-7.

- De Luca A, Sarkozy A, **Consoli F**, De Zorzi A, Mingarelli R, Digilio MC, Marino B, Dallapiccola B. Exclusion of Cx43 gene mutation as a major cause of criss-cross heart anomaly in man. *Int J Cardiol.* 2010; 144:300-2.

## BIBLIOGRAFIA

- Abramovici A**, Abramovici I, Kalman G, Liban E. Teratogenic effect of chlorimipramine in a young human embryo. *Teratology* 1981; 24:42A.
- Allanson JE**, Hall JG, Hughes HE, et al. Noonan syndrome: the changing phenotype. *Am J Med Genet* 1985; 21:507–514.
- Allanson JE**. Noonan syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007; 145:274–279.
- Allanson JE**. Noonan syndrome. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [internet]. Seattle: University of Washington; 2008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1124/> [Accessed 18 April 2011]. 15
- Amati F**, Diano L, Campagnolo L, Vecchione L, Cipollone D, Bueno S, Prosperini G, Desideri A, Siracusa G, Chillemi G, Marino B, Novelli G. Hif1 $\alpha$  down-regulation is associated with transposition of great arteries in mice treated with a retinoic acid antagonist. *BMC Genomics*. 2010 Sep 16;11:497.
- Anderson RH**, Shinebourne EA, Gerlis LM. Criss-cross atrioventricular relationships producing paradoxical atrioventricular concordance or discordance. Their significance to nomenclature of congenital heart disease. *Circulation* 1974;50:176–80.
- Anderson RH**, Wilkinson JL, Arnold R, Becker AE, Lubkiewicz K. Morphogenesis of bulboventricular malformations. II. Observations on malformed hearts. *Br Heart J*. 1974;36:948-70
- Andrieux J**, Villenet C, Quief S et al. Genotype phenotype correlation of 30 patients with Smith-Magenis syndrome (SMS) using comparative genome hybridisation array: cleft palate in SMS is associated with larger deletions. *J Med Genet* 2007; 44: 537–540.
- Aoki Y**, Niihori T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Tanaka Y, Filocamo M, Kato K, Suzuki Y, Kure S, Matsubara Y. Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet*. 2005;37:1038-40.
- Axelrad ME**, Schwartz DD, Fehlis JE, et al. Longitudinal course of cognitive, adaptive, and behavioral characteristics in Costello syndrome. *Am J Med Genet A* 2009; 149A:2666–2672.
- Bamford RN**, Roessler E, Burdine RD, et al. Loss-of-function mutations in the EGFCFC gene CFC1 are associated with human left-right laterality defects. *Nat Genet* 2000;26:365-9.

**Basson CT**, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, Grayzel D, Kroumpouzou E, Traill TA, Leblanc-Straceski J, Renault B, Kucherlapati R, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet.* 1997;15:30-5.

**Benson DW**, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs S, Smalls O, Johnson MC, Watson MS, Seidman JG, Seidman CE, Plowden J, Kugler JD. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest.* 1999;104:1567-73.

**Britz-Cunningham SH**, Shah MM, Zuppan CW, Fletcher WH. Mutations of the Connexin43 gap-junction gene in patients with heart malformations and defects of laterality. *N Engl J Med* 1995;332:1323-9.

**Bruneau BG**, Nemer G, Schmitt JP, et al. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell* 2001;106:709-21.

**Bruneau BG**. The developing heart and congenital heart defects: a make or break situation. *Clin Genet.* 2003; 63:252-61.

**Bruneau BG**. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ Res.* 2002; 90:509-19.

**Brunet A**, Armengol L, Heine D, Rosell J, García-Aragones M, Gabau E, Estivill X, Guitart M. BAC array CGH in patients with Velocardiofacial syndrome-like features reveals genomic aberrations on chromosome region 1q21.1. *BMC Medical Genetics* 2009; 10:144.

**Brunetti-Pierri N**, Berg JS, Scaglia F, Belmont J, Bacino CA, Sahoo T, Lalani SR, Graham B, Lee B, Shinawi M, Shen J, Kang S-H L, Pursley A, Lotze T, Kennedy G, Lansky-Shafer S, Weaver C, Roeder ER, Grebe TA, Arnold GL, Hutchison T, Reimschisel T, Amato S, Geraghty MT, Innis JW, Obersztyrn E, Nowakowska B, Rosengren SS, Bader PI, Grange DK, Naqvi S, Garnica AD, Bernes SM, Fong C-T, Summers A, Walters WD, Lupski JR, Stankiewicz P, Cheung AW, Patel A. Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat Genet* 2008; 40:1466-1471.

**Burn J**, Brennan P, Little J, Holloway S, Coffey R, Somerville J, Dennis NR, Allan L, Arnold R, Deanfield JE, Godman M, Houston A, Keeton B, Oakley C, Scott O, Silove E, Wilkinson J, Pembrey M, Hunter AS. Recurrence risks in offspring of adults with major heart defects: results from first cohort of British collaborative study. *Lancet*. 1998;351:311-6.

**Burn J**. Congenital Heart Disease. In Rimoin DL, O'Connor JM, Pyeritz RE and Emery AEH (eds) Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics. 2006. Churchill Livingstone.

**Caligiuri**, M.A., Briesewitz, R., Yu, J., Wang, L., Wei, M., Arnoczky, K.J., Marburger, T.B., Wen, J., Perrotti, D., Bloomfield, C.D., and Whitman, S.P. Novel c-CBL and CBL-b ubiquitin ligase mutations in human acute myeloid leukemia. *Blood* 2007; 110:1022–1024.

**Carta C**, Pantaleoni F, Bocchinfuso G, Stella L, Vasta I, Sarkozy A, Digilio C, Palleschi A, Pizzuti A, Grammatico P, Zampino G, Dallapiccola B, Gelb BD, Tartaglia M. Germline missense mutations affecting KRAS Isoform B are associated with a severe Noonan syndrome phenotype. *Am J Hum Genet*. 2006;79:129-35.

**Casey B**, Ballabio A. Connexin43 mutations in sporadic and familial defects of laterality. *N Engl J Med* 1995;333:941 author reply 941–942.

**Charron F**, Nemer M. GATA transcription factors and cardiac development. *Semin Cell Dev Biol*. 1999;10:85-91

**Chen B**, Bronson RT, Klamann LD, Hampton TG, Wang JF, Green PJ, Magnuson T, Douglas PS, Morgan JP, Neel BG. Mice mutant for Egfr and Shp2 have defective cardiac semilunar valvulogenesis. *Nat Genet*. 2000;24:296-9

**Chieffo C**, Garvey N, Gong W, Roe B, Zhang G, Silver L, Emanuel BS, Budarf ML. Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse Tbx1 gene. *Genomics*. 1997;43:267-77.

**Christiansen J**, Dyck JD, Elyas BG, Liley M, Bamforth JS, Hicks M, Sprysak KA, Tomaszewski R, Haase SM, Vicen-Wyhyony LM, Somerville MJ. Chromosome 1q21.1 contiguous gene deletion is associated with congenital heart disease. *Circ Res* 2004; 94:1429-1435.

**Clark EB**. Pathogenetic mechanisms of congenital cardiovascular malformations revisited. *Semin Perinatol*. 1996;20:465-72.

**Coats AJ**. Ethical authorship and publishing. *Int J Cardiol* 2009;131: 149–50.

**Conti E**, Grifone N, Sarkozy A, Tandoi C, Marino B, Digilio MC, Mingarelli R, Pizzuti A, Dallapiccola B. DiGeorge subtypes of nonsyndromic conotruncal defects: evidence against a major role of TBX1 gene. *Eur J Hum Genet* 2003; 11: 349-51.

**Cordeddu V**, Di Schiavi E, Pennacchio LA, et al. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet* 2009;41:1022–1026.

**Correa-Villasenor A**, McCarter R, Downing J, Ferencz C. White-black differences in cardiovascular malformations in infancy and socioeconomic factors. The Baltimore-Washington Infant Study Group. *Am J Epidemiol.* 1991;134:393-402.

**Davies**, H. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417:949–954

**de la Cruz MV**, Arteaga M, Espino-Vela J, Quero-Jiménez M, Anderson RH, Díaz GF. Complete transposition of the great arteries: types and morphogenesis of ventriculoarterial discordance. *Am Heart J.* 1981 Aug;102:271-81

**DE LA CRUZ MV**, DA ROCHA JP. An ontogenetic theory for the explanation of congenital malformations involving the truncus and conus. *Am Heart J.* 1956 ;51:782-805.

**De Luca A**, Sarkozy A, Consoli F, Ferese R, Guida V, Dentici ML, Mingarelli R, Bellacchio E, Tuo G, Limongelli G, Digilio MC, Marino B, Dallapiccola B. Familial transposition of the great arteries caused by multiple mutations in laterality genes. *Heart.* 2010 ;96:673-7

**De Luca A**, Sarkozy A, Ferese R, Consoli F, Lepri F, Dentici ML, Vergara P, De Zorzi A, Versacci P, Digilio MC, Marino B, Dallapiccola B. New mutations in ZFPM2/FOG2 gene in tetralogy of Fallot and double outlet right ventricle. *Clin Genet.* 2011; 80:184-190

**de Wit C**, Roos F, Bolz SS, Kirchhoff S, Kruger O, Willecke K, Pohl UI. Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice. *Circ Res* 2003; 93:201-206.

**Debrus S**, Tuffery S, Matsuoka R, et al. Lack of evidence for connexin 43 gene mutations in human autosomal recessive lateralization defects. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1423–31.

**Dentici ML**, Sarkozy A, Pantaleoni F, et al. Spectrum of MEK1 and MEK2 gene mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome and genotype-phenotype correlations. *Eur J Hum Genet* 2009; 17:733–740.

**Digilio C**, Marino B, Sarkozy A, et al. The heart in RAS-MAPK pathway disorders. In: Zenker M, editor. Noonan syndrome and related disorders: a matter of deregulated RAS signaling. Monographs in human genetics 2009; 17. Basel:109–118.

**Digilio MC**, Conti E, Sarkozy A, Mingarelli R, Dottorini T, Marino B, Pizzuti A, Dallapiccola B. Grouping of multiple-lentiginos/LEOPARD and Noonan syndromes on the PTPN11 gene. Am J Hum Genet. 2002;71:389-94.

**Digilio MC**, Marino B, Giannotti A, Di Donato R, Dallapiccola B. Heterotaxy with left atrial isomerism in a patient with deletion 18p. Am J Med Genet. 2000;94:198-200

**Digilio MC**, Marino B, Sarkozy A, Versacci P, Dallapiccola B. 2009. The heart in Ras-MAPK pathway disorders. In: Zenker M, editor. Noonan Syndrome and Related Disorders. MonogrHum Genet. Basel: Karger, 109-118.

**Dikic,I.**, and Schmidt, M.H. Malfunctions within the Cbl interactome uncouple receptor tyrosine kinases from destructive transport. Eur. J. Cell Biol. 2007; 86:505–512.

**Draus JM Jr**, Hauck MA, Goetsch M, Austin EH 3rd, Tomita-Mitchell A, Mitchell ME. Investigation of somatic NKX2-5 mutations in congenital heart disease. J Med Genet. 2009;46:115-22

**Durocher D**, Charron F, Warren R, Schwartz RJ, Nemer M. The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. EMBO J. 1997;16:5687-96

**Edouard T**, Combier JP, Nedelec A, et al. Functional effects of PTPN11 (SHP2) mutations causing LEOPARD syndrome on epidermal growth factor-induced phosphoinositide 3-kinase/AKT/glycogen synthase kinase 3 $\beta$  signaling. Mol Cell Biol 2010; 30:2498–2507.

**Eldadah ZA**, Hamosh A, Biery NJ, Montgomery RA, Duke M, Elkins R, Dietz HC. Familial Tetralogy of Fallot caused by mutation in the jagged1 gene. Hum Mol Genet. 2001;10:163-9.

**Elliott DA**, Kirk EP, Yeoh T, Chandar S, McKenzie F, Taylor P, Grossfeld P, Fatkin D, Jones O, Hayes P, Feneley M, Harvey RP. Cardiac homeobox gene NKX2-5 mutations and congenital heart disease: associations with atrial septal defect and hypoplastic left heart syndrome. J Am Coll Cardiol. 2003;41:2072-6.

**Emanuel R**, Somerville J, Inns A, Withers R. Evidence of congenital heart disease in the offspring of parents with atrioventricular defects. Br Heart J. 1983;49:144-7.



**Emmanouilides GE**, editors. Heart disease in infants, children and adolescents. Baltimore: Williams and Wilkins; 1977

**Erdogan F**, Larsen LA, Zhang L, Tümer Z, Tommerup N, Chen W, Jacobsen JR, Schubert M, Jurkatis J, Tzschach A, Ropers H-H, Ullman R. High frequency of submicroscopic genomic aberrations detected by tiling path array comparative genomic hybridisation in patients with isolated congenital heart disease. *J Med Genet* 2008; 45:704-709.

**Evans SM**. Vertebrate tinman homologues and cardiac differentiation. *Semin Cell Dev Biol*. 1999;10:73-83.

**Ferencz C**, Brenner JI, Loffredo C, Kappetein AP, Willson PD. Transposition of great arteries: etiologic distinctions of outflow tract defects in a case-control study of risk factors. In: Clark EB, Markwald RR, Takao A, eds. Developmental mechanism of heart disease. Armonk, NY: Futura Publishing, 1995: 639-53

**Ferencz C**, Loffredo CA, Correa-Villasenor A, Wilson PD. Genetic and environmental risk factors of major cardiovascular malformations. The Baltimore-Washington Infant Study 1981-1989. Armonk, NY: Futura Publishing, 1997.

**Ferencz C**, Rubin JD, Loffredo CA, Magee CA. Epidemiology of congenital heart disease. Mount Kisco, NY: Futura Publishing Co. 1993

**Ferencz C**, Rubin JD, McCarter R-J, Brenner J-I, Neill C-A, Perry L-W, Hepner S-I, Downing J-W. Congenital heart disease: prevalence at livebirth. The Baltimore-Washington infant study. *Am J Epidemiol* 1985; 121:31-36.

**Ferencz C**, Rubin JD, McCarter RJ, Clark EB. Maternal diabetes and cardiovascular malformations: predominance of double outlet right ventricle and truncus arteriosus. *Teratology*. 1990;41:319-26.

**Gajewski K**, Fossett N, Molkentin JD, Schulz RA. The zinc finger proteins Pannier and GATA4 function as cardiogenic factors in *Drosophila*. *Development*. 1999;126:5679-88.

**Garg V**, Kathiriyai IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, Rothrock CR, Eapen RS, Hirayama-Yamada K, Joo K, Matsuoka R, Cohen JC, Srivastava D. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature*. 2003;424:443-7.

**Garg V**, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*. 2005;437:270-4.

**Garnett, M. J. & Marais, R.** Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004; 6: 313–319

**Gebbia M,** Ferrero GB, Pilia G, Bassi MT, Aylsworth A, Penman-Splitt M, Bird LM, Bamforth JS, Burn J, Schlessinger D, Nelson DL, Casey B. X-linked situs abnormalities result from mutations in ZIC3. *Nat Genet.* 1997;17:305-8.

**Gebbia M,** Towbin JA, Casey B. Failure to detect connexin43 mutations in 38 cases of sporadic and familial heterotaxy. *Circulation* 1996;94:1909–12.

**Ghebranious N,** Giampietro PF, Wesbrook FP et al. A novel microdeletion at 16p11.2 harbors candidate genes for aortic valve development, seizure disorder, and mild mental retardation. *Am J Med Genet A* 2007: 143A: 1462–1471.

**Goldmuntz E,** Bamford R, Karkera JD, dela Cruz J, Roessler E, Muenke M. CFC1 mutations in patients with transposition of the great arteries and double-outlet right ventricle. *Am J Hum Genet.* 2002;70:776-80.

**Goldmuntz E,** Bamford R, Karkera JD, dela Cruz J, Roessler E, Muenke M. CFC1 mutations in patients with transposition of the great arteries and double-outlet right ventricle. *Am J Hum Genet.* 2002;70:776-80.

**Goldmuntz E,** Bamford R, Karkera JD, et al. CFC1 mutations in patients with transposition of the great arteries and double-outlet right ventricle. *Am J Hum Genet* 2002;70:776-80.

**Goldmuntz E,** Geiger E, Benson DW. NKX2.5 mutations in patients with tetralogy of fallot. *Circulation.* 2001;104:2565-8.

**Goldmuntz E,** Paluru P, Glessner J, Hakonarson H, Biegel JA, White PS, Gai X, Shaikh TH. Microdeletions and microduplications in patients with congenital heart disease and multiple congenital anomalies. *Congenit Heart Dis.* 2011;6:592-602.

**Gollob MH,** Jones DL, Krahn AD, Danis L, Gong XQ, Shao Q, Liu X, Veinot JP, Tang AS, Stewart AF, Tesson F, Klein GJ, Yee R, Skanes AC, Guiraudon GM, Ebihara L, Bai D. Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2006 Jun 22;354(25):2677-88.

**Goor DA,** Edwards JE. The spectrum of transposition of the great arteries: with specific reference to developmental anatomy of the conus. *Circulation.* 1973 ;48:406-15.

**Gorlin RJ,** Anderson RC, Moller JH. The Leopard (multiple lentiginos) syndrome revisited. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1971; 7:110–115.

**Grand**, F.H., Hidalgo-Curtis, C.E., Ernst, T., Zoi, K., Zoi, C., McGuire, C., Kreil, S., Jones, A., Score, J., Metzgeroth, G., et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009; 113: 6182–6192.

**Grand**, F.H., Hidalgo-Curtis, C.E., Ernst, T., Zoi, K., Zoi, C., McGuire, C., Kreil, S., Jones, A., Score, J., Metzgeroth, G., et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009; 113:6182–6192.

**Greenway SC**, Pereira AC, Lin JC, DePalma SR, Israel SJ, Mesquita SM, Ergul E, Conta JH, Korn JM, McCarroll SA, Gorham JM, Gabriel S, Altshuler DM, Quintanilla-Dieck MdL, Artunduaga PL, Eavey RD, Plenge RM, Shadick NA, Weinblatt ME, De Jager PL, Hafler DA, Breitbart RE, Seidman JG, Seidman CE. De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. *Nat Genet* 2009; 41:931-935.

**Gripp KW**, Lin AE. Costello syndrome. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews [internet]. Seattle: University of Washington; 2009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1507/>.

**Gu H**, Smith FC, Taffet SM, Delmar M. High incidence of cardiac malformations in connexin-40 deficient mice. *Circ Res* 2003; 93:201-206.

**Guida V**, Chiappe F, Ferese R, Usala G, Maestrale G, Iannascoli C, Bellacchio E, Mingarelli R, Digilio MC, Marino B, Uda M, De Luca A, Dallapiccola B. Novel and recurrent JAG1 mutations in patients with tetralogy of Fallot. *Clin Genet*. 2011; 80:591-4

**Gutierrez-Roelens I**, Sluysmans T, Gewillig M, Devriendt K, Vikkula M. Progressive AV-block and anomalous venous return among cardiac anomalies associated with two novel missense mutations in the CSX/NKX2-5 gene. *Hum Mutat*. 2002;20:75-6.

**Harvey RP**. NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev Biol*. 1996;178:203-16.

**Harvey RP**. Patterning the vertebrate heart. *Nat Rev Genet*. 2002; 3:544-56

**Heathcote K**, Braybrook C, Abushaban L, Guy M, Khetyar ME, Patton MA, Carter ND, Scambler PJ, Syrris P. Common arterial trunk associated with a homeodomain mutation of NKX2.6. *Hum Mol Genet*. 2005;14:585-93.

**Hernando C**, Plaja A, Rigola MA et al. Comparative genomic hybridisation shows a partial de novo deletion 16p11.2 in a neonate with multiple congenital malformations. *J Med Genet* 2002; 39: E24.

**Hirayama-Yamada K**, Kamisago M, Akimoto K et al. Phenotypes with GATA4 or NKX2.5 mutations in familial atrial septal defect. *Am J Med Genet A* 2005; 135: 47–52.

**Hoffman JI**, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39):1890-900.

**Holzelova E**, Vonarbourg C, Stolzenberg MC, Arkwright PD, Selz F, Prieur AM, Blanche S, Bartunkova J, Vilmer E, Fischer A, Le Deist F, Rieux-Laucat F. Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N Engl J Med.* 2004;351:1409-18.

**Hosoda T**, Komuro I, Shiojima I, Hiroi Y, Harada M, Murakawa Y, Hirata Y, Yazaki Y. Familial atrial septal defect and atrioventricular conduction disturbance associated with a point mutation in the cardiac homeobox gene CSX/NKX2-5 in a Japanese patient. *Jpn Circ J.* 1999; 63:425-6.

**Jacobsen P**, Hauge M, Henningsen K, Hobolth N, Mikkelsen M, Philip J. An (11;21) translocation in four generations with chromosome 11 abnormalities in the offspring. A clinical, cytogenetical, and gene marker study. *Hum Hered.* 1973;23:568-85

**Jiang ZY**, Pircova A, Sekarski N, Hack I, Laurini R, Janzer R, Payot M. Transposition of the great arteries, pulmonary atresia, and multiple ventricular septal defects associated with multiple cardiac rhabdomyomas in a case of tuberous sclerosis. *Pediatr Cardiol.* 2000;21:165-9

**K. Wennerberg**, K.L. Rossman and C.J. Der, The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* 2005 ; 105:843–846.

**Karkera JD**, Lee JS, Roessler E, et al. Loss-of-function mutations in growth differentiation factor-1 (GDF1) are associated with congenital heart defects in humans. *Am J Hum Genet* 2007;81:987-94.

**Kasahara H**, Lee B, Schott JJ, Benson DW, Seidman JG, Seidman CE, Izumo S. Loss of function and inhibitory effects of human CSX/NKX2.5 homeoprotein mutations associated with congenital heart disease. *J Clin Invest.* 2000;106:299-308

**Kathiriya IS**, Srivastava D. Left-right asymmetry and cardiac looping: implications for cardiac development and congenital heart disease. *Am J Med Genet.* 2000 Winter;97(4):271-9. Review.

**Kassenbrock**, C.K., and Anderson, S.M. Regulation of ubiquitin protein ligase activity in c-Cbl by phosphorylation- induced conformational change and constitutive activation by tyrosine to glutamate point mutations. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:28017–28027.

**Kathiriya IS**, Srivastava D. Left-right asymmetry and cardiac looping: implications for cardiac development and congenital heart disease. *Am J Med Genet.* 2000 Winter;97(4):271-9. Review.

**Kirby ML**, Turnage KL 3rd, Hays BM. Characterization of conotruncal malformations following ablation of "cardiac" neural crest. *Anat Rec.* 1985 Sep;213(1):87-93.

**Kirchhoff S**, Kim JS, Hagendorff A, et al. Abnormal cardiac conduction and morphogenesis in connexin40 and connexin43 double-deficient mice. *Circ Res* 2000;87:399–405.

**Kirklin JW**, Blackstone EH, Tchervenkov CI, Castaneda AR. Clinical outcomes after the arterial switch operation for transposition. Patient, support, procedural, and institutional risk factors. Congenital Heart Surgeons Society. *Circulation.* 1992;86:1501-15.

**Klopocki E**, Schulze H, Strauss G, Ott CE, Hall J, Trotier F, Fleischhauer S, Greenhalgh L, Newbury-Ecob RA, Neumann LM, Habenicht R, Konig R, Seemanova E, Megarbane A, Ropers HH, Ullmann R, Horn D, Mundlos S. Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Am J Hum Genet* 2007; 80:232-240

**Kosaki K**, Bassi MT, Kosaki R, Lewin M, Belmont J, Schauer G, Casey B. Characterization and mutation analysis of human LEFTY A and LEFTY B, homologues of murine genes implicated in left-right axis development. *Am J Hum Genet.* 1999;64:712-21.

**Kosaki R**, Gebbia M, Kosaki K, Lewin M, Bowers P, Towbin JA, Casey B. Left-right axis malformations associated with mutations in ACVR2B, the gene for human activin receptor type IIB. *Am J Med Genet.* 1999;82:70-6.

**Koudova M**, Seemanova E, Zenker M. Novel BRAF mutation in a patient with LEOPARD syndrome and normal intelligence. *Eur J Med Genet* 2009; 52:337–340.

**Lepri F**, De Luca A, Stella L, et al. SOS1 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, structural insights on pathogenic effects, and genotypephenotype correlations. *Hum Mutat* 2011; 32:1–13.

**Li QY**, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, Gebuhr T, Bullen PJ, Robson SC, Strachan T, Bonnet D, Lyonnet S, Young ID, Raeburn JA, Buckler AJ, Law DJ, Brook JD. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet.* 1997;15:21-9.

- Lin AE**, Alexander ME, Colan SD, et al. Clinical, pathological, and molecular analyses of cardiovascular abnormalities in Costello syndrome: a Ras/MAPK pathway syndrome. *Am J Med Genet A* 2011; 155:486–507.
- Loffredo CA**, Silbergeld EK, Ferencz C, Zhang J. Association of transposition of the great arteries in infants with maternal exposures to herbicides and rodenticides *Am J Epidemiol.* 2001 ;153:529-36.
- Loh**, M.L., Sakai, D.S., Flotho, C., Kang, M., Fliegau, M., Archambeault, S., Mullighan, C.G., Chen, L., Bergstraesser, E., Bueso-Ramos, C.E., et al. Mutations in CBL occur frequently in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 2009; 114, 1859–1863.
- Lyons I**, Parsons LM, Hartley L, et al. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev* 1995;9:1654–66.
- M. Bentires-Alj**, M.I. Kontaridis and B.G. Neel, Stops along the RAS pathway in human genetic disease. *Nat Med* 2006; 12: 283–285.
- Makishima**, H., Cazzolli, H., Szpurka, H., Dunbar, A., Tiu, R., Huh, J., Muramatsu, H., O’Keefe, C., Hsi, E., Paquette, R.L., et al. Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27:6109–6116.
- Männer J**, Seidl W, Steding G. Complete transposition in a chick embryo demonstrated by scanning electron microscopy. *Cardiol Young.* 1998 ;8:396-9.
- Marble M**, Morava E, Lopez R, Pierce M, Pierce R. Report of a new patient with transposition of the great arteries with deletion of 22q11.2. *Am J Med Genet.* 1998;78:317-8
- Marino B**, Capolino R, Digilio MC, et al. Transposition of the great arteries in asplenia and polysplenia phenotypes. *Am J Med Genet* 2002;110:292-4.
- Marino B**, Chiariello L, Bosman C, et al. Criss-cross heart with discordant atrioventricular connections. *Pediatr Cardiol* 1982;3:315–8.
- Marino B**, Digilio MC, Toscano A, Anaclerio S, Giannotti A, Feltri C, de Ioris MA, Angioni A, Dallapiccola B. Anatomic patterns of conotruncal defects associated with deletion 22q11. *Genet Med.* 2001;3:45-8.
- Marino B**, Guccione P, Carotti A, Malposition of the heart. In: Moller JH, Hoffman JE, eds. *Pediatric cardiovascular medicine.* New York, NY: Churchill Livingstone, 621-641.

**Marino B**, Marcelletti C. Complex congenital heart disease after in vitro fertilization. *Am J Dis Child*. 1989 Oct;143(10):1136-7

**Marino B**, Sanders SP, Pasquini L, Giannico S, Parness IA, Colan SD. Two-dimensional echocardiographic anatomy in crisscross heart. *Am J Cardiol* 1986;58:325–33.

**Marino B**. Patterns of congenital heart disease and associated cardiac anomalies in children with Down syndrome. In: Marino B, Pueschel SM, eds. *Heart disease in person with Down syndrome*. Baltimore, MD: Paul H Brookes Publishing, 1996:133-40

**Massagué J**, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*. 2000;103:295-309.

**Mazzanti L**, Cacciari E, Cicognani A, et al. Noonan-like syndrome with loose anagen hair: a new syndrome? *Am J Med Genet A* 2003; 118A:279–286.

**McDaniell R**, Warthen DM, Sanchez-Lara PA, Pai A, Krantz ID, Piccoli DA, Spinner NB. NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am J Hum Genet*. 2006;79:169-73.

**McElhinney DB**, Geiger E, Blinder J, Benson DW, Goldmuntz E. NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1650-5.

**Mefford H**, Sharp A, Baker C, Itsara A, Jiang Z, Buysse K, Huang S, Maloney WK, Crolla JA, Baralle D, Collins A, Mercer C, Norga K, de Ravel T, Devriendt K, Bongers E, de Leeuw N, Reardon W, Gimelli S, Bena F, Hennekam R, Male A, Gaunt L, Clayton-Smith J, Simonic I, Park S, Mehta S, Nik-Zainal S, Woods C, Firth H, Parkin G, Fichera M, Reitano S, Lo Giudice M, Li K, Casuga I, Broomer A, Conrad B, Schwerzmann M, Raber L, Gallati S, Striano P, Coppola A, Tolmie J, Tobias E, Lilley C, Armengol L, Spyschaert Y, Verloo P, De Coene A, Goossens L, Mortier G, Speleman F, van Binsbergen E, Nelen M, Hochstenbach R, Poot M, Gallagher L, Gill M, McClellan J, King M-C, Regan R, Skinner C, Stevenson R, Antonarakis S, Chen C, Estivill X, Menten B, Gimelli G, Gribble S, Schwarz S, Sutcliffe J, Walsh T, Knight S, Sebat J, Romano C, Schwarz C, Veltman J, de Vries B, Vermeesch J, Barber J, Willatt L, Tassabehji, Eichler E. Recurrent rearrangements of chromosome 1q21.1 and variable pediatric phenotypes. *N Engl J Med* 2008; 359:1685-1699.

**Mefford HC**, Eichler EE. Duplication hotspots, rare genomic disorders, and common disease. *Curr Opin Genet Devel* 2009; 19:1-9

**Melchionda S**, Digilio MC, Mingarelli R, Novelli G, Scambler P, Marino B, Dallapiccola B. Transposition of the great arteries associated with deletion of chromosome 22q11. *Am J Cardiol.* 1995 Jan 1;75(1):95-8. No abstract available

**Mohapatra B**, Casey B, Li H, et al. Identification and functional characterization of NODAL rare variants in heterotaxy and isolated cardiovascular malformations. *Hum Mol Genet* 2009;18:861-71

**Moller JH**, Allen HD, Clark EB, Dajani AS, Golden A, Hayman LL, Lauer RM, Marmer EL, McNulty JH, Oparil S, et al. Report of the task force on children and youth. American Heart Association. *Circulation* ;88:2479-86

**Muncke N**, Jung C, Rudiger H, Ulmer H, Roeth R, Hubert A, Goldmuntz E, Driscoll D, Goodship J, Schon K, Rappold G. Missense mutations and gene interruption in PROSIT240, a novel TRAP240-like gene, in patients with congenital heart defect (transposition of the great arteries). *Circulation.* 2003;108:2843-50.

**Muramatsu**, H., Makishima, H., Jankowska, A.M., Cazzolli, H., O'Keefe, C., Yoshida, N., Xu, Y., Nishio, N., Hama, A., Yagasaki, H., et al. Mutations of an E3 ubiquitin ligase c- Cbl but not TET2 mutations are pathogenic in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 2010; 115:1969–1975.

**N. Mitin**, K.L. Rossman and C.J. Der, Signaling interplay in Ras superfamily function. *Current Biology* 2005; 15:563–574.

**Nava C**, Hanna N, Michot C, et al. Cardio-facio-cutaneous and Noonan syndromes due to mutations in the RAS/MAPK signalling pathway: genotype- phenotype relationships and overlap with Costello syndrome. *J Med Genet* 2007; 44:763–771.

**Nemer G**, Fadlalah F, Usta J, Nemer M, Dbaibo G, Obeid M, Bitar F. A novel mutation in the GATA4 gene in patients with Tetralogy of Fallot. *Hum Mutat.* 2006;27:293-4.

**Niihori T**, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cave H, Verloes A, Okamoto N, Hennekam RC, Gillissen-Kaesbach G, Wieczorek D, Kavamura MI, Kurosawa K, Ohashi H, Wilson L, Heron D, Bonneau D, Corona G, Kaname T, Naritomi K, Baumann C, Matsumoto N, Kato K, Kure S, Matsubara Y. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet.* 2006;38:294-6.

**Nomura M**, Li E. Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature* 1998;393:786-90.



**Noonan JA**, Ehmke DA. Associated noncardiac malformations in children with congenital heart disease. *J Pediatr*. 1963;31:150-153.

**Nora JJ**, Fraser CC. *Medical genetics :principles and practice*. 2nd ed. Philadelphia :Lea and Febiger 1981.

**Nora JJ**, Nora AH. Update on counseling the family with a first-degree relative with a congenital heart defect. *Am J Med Genet*. 1988;29:137-42.

**Nora JJ**. Multifactorial inheritance hypothesis for the etiology of congenital heart diseases. The genetic-environmental interaction. *Circulation*. 1968;38:604-17.

**Oda T**, Elkahloun AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, Genin A, Piccoli DA, Meltzer PS, Spinner NB, Collins FS, Chandrasekharappa SC. Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet*. 1997;16:235-42

**Oishi K**, Zhang H, Gault WJ, et al. Phosphatase-defective LEOPARD syndrome mutations in PTPN11 gene have gain-of-function effects during Drosophila development. *Hum Mol Genet* 2009; 18:193–201.

**Okubo A**, Miyoshi O, Baba K et al. A novel GATA4 mutation completely segregated with atrial septal defect in a large Japanese family. *J Med Genet* 2004; 41: e97.

**Orkin SH**. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood*. 1992;80:575-81.

**Otten BJ**, Noordam C. Growth in Noonan syndrome. *Horm Res* 2009; 72 (Suppl 2):31–35.

**Pandit B**, Sarkozy A, Pennacchio LA, et al. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 2007; 39:1007–1012.

**Paznekas WA**, Boyadjiev SA, Shapiro RE, et al. Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet* 2003;72:408–18.

**Peeters H**, Devriendt K. Human laterality disorders. *Eur J Med Genet* 2006;49:349–62.

**Pehlivan T**, Pober BR, Brueckner M, Garrett S, Slauch R, Van Rheeden R, Wilson DB, Watson MS, Hing AV. GATA4 haploinsufficiency in patients with interstitial deletion of chromosome region 8p23.1 and congenital heart disease. *Am J Med Genet*. 1999 Mar 19;83:201-6.

**Pexieder T**, Blanc O, Pelouch V, Ostàdal B. Late fetal development of retinoic acid-induced transposition of great arteries: morphology, physiology, and biochemistry. In: Clark EB,

Markwald RR, Takao A, eds. Developmental mechanism of heart disease. Armonk, NY: Futura Publishing, 1995:297-307.

**Pitt DB.** 1962. A family study of Fallot's tetrad. *Ann Med* 11: 179–183. (Australian)

Pizzuti A, Flex E, Mingarelli R, Salpietro C, Zelante L, Dallapiccola B. A homozygous GJA1 gene mutation causes a Hallermann–Streiff/ODDD spectrum phenotype. *Hum Mutat* 2004;23:286.

**Quero-Jimenez M,** Perez Martinez V. Uncommon conal pathology in complete dextroposition of the great arteries with ventricular septal defect. *Chest* 1974; 66: 411-6

**Rajagopal SK,** Ma Q, Obler D et al. Spectrum of heart disease associated with murine and human GATA4 mutation. *J Mol Cell Cardiol* 2007: 43: 677–685.

**Ranganayakulu G,** Elliott DA, Harvey RP, Olson EN. Divergent roles for NK-2 class homeobox genes in cardiogenesis in flies and mice. *Development.* 1998; 125:3037-48.

**Rauen KA.** Cardiofaciocutaneous syndrome. In: Pagon RA, Bird TC, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [internet]. Seattle: University of Washington; 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1186/> [Accessed 18 April 2011].

**Razzaque MA,** Nishizawa T, Komoike Y, et al. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007; 39:1013–1017.

**Reamon-Buettner SM,** Borlak J. TBX5 mutations in non-Holt-Oram syndrome (HOS) malformed hearts. *Hum Mutat.* 2004A; 24:104.

**Reamon-Buettner SM,** Borlak J. GATA4 zinc finger mutations as a molecular rationale for septation defects of the human heart. *J Med Genet.* 2005; 42:e32.

**Reamon-Buettner SM,** Borlak J. HEY2 mutations in malformed hearts. *Hum Mutat.* 2006A; 27:118.

**Reamon-Buettner SM,** Borlak J. NKX2-5: an update on this hypermutable homeodomain protein and its role in human congenital heart disease (CHD). *Hum Mutat.* 2010 ;31:1185-94.

**Reamon-Buettner SM,** Borlak J. Somatic mutations in cardiac malformations. *J Med Genet.* 2006B; 43:e45.

**Reamon-Buettner SM,** Borlak J. Somatic NKX2-5 mutations as a novel mechanism of disease in complex congenital heart disease. *J Med Genet.* 2004C; 41:684-90.

**Reamon-Buettner SM**, Hecker H, Spanel-Borowski K, Craatz S, Kuenzel E, Borlak J. Novel NKX2-5 mutations in diseased heart tissues of patients with cardiac malformations. *Am J Pathol.* 2004B; 164:2117-25.

**Reaume AG**, de Sousa PA, Kulkarni S, et al. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 1995;267:1831-4.

**Redline RW**, Abramowsky CR. Transposition of the great vessels in an infant exposed to massive doses of oral contraceptives *Am J Obstet Gynecol.* 1981 Oct 15;141(4):468-9.

**Redon R**, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP, Aburatani H, Lee C, Jones KW, Schrerer SW, Hurles ME. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006; 444:444-454.

**Reecy JM**, Li X, Yamada M, DeMayo FJ, Newman CS, Harvey RP, Schwartz RJ. Identification of upstream regulatory regions in the heart-expressed homeobox gene *Nkx2-5*. *Development.* 1999;126:839-49.

**Reindl, C.**, Quentmeier, H., Petropoulos, K., Greif, P.A., Benthous, T., Argiropoulos, B., Mellert, G., Vempati, S., Duyster, J., Buske, C., et al. CBL exon 8/9 mutants activate the FLT3 pathway and cluster in core binding factor/11q deletion acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome subtypes. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15:2238-2247.

**Richardson R**, Donnai D, Meire F, Dixon MJ. Expression of *Gja1* correlates with the phenotype observed in oculodentodigital syndrome/type III syndactyly. *J Med Genet* 2004;41:60-7.

**Roberts A**, Allanson J, Jadico SK, et al. The cardiofaciocutaneous syndrome. *J Med Genet* 2006; 43:833-842.

**Roberts AE**, Araki T, Swanson KD, et al. Germline gain-of-function mutations in *SOS1* cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007; 39:70-74.

**Robinson SW**, Morris CD, Goldmuntz E, et al. Missense mutations in *CRELD1* are associated with cardiac atrioventricular septal defects. *Am J Hum Genet* 2003;72:1047-52.

**Rodriguez-Viciano P**, Tetsu O, Tidyman WE, Estep AL, Conger BA, Cruz MS, McCormick F, Rauen KA. Germline mutations in genes within the MAPK pathway cause cardio-facio-cutaneous syndrome. *Science*. 2006;311:1287-90.

**Roessler E**, Ouspenskaia MV, Karkera JD, et al. Reduced NODAL signaling strength via mutation of several pathway members including FOXH1 is linked to human heart defects and holoprosencephaly. *Am J Hum Genet* 2008;83:18-29.

Rokitansky C, Von die defekte der Scheidewande des Herzen . Vienna : Braumuller, 1875.

**Romano AA**, Allanson JE, Dahlgren J, et al. Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics* 2010; 126: 746–759.

**Rowland TW**, Hubbell JP Jr, Nadas AS. Congenital heart disease in infants of diabetic mothers. *J Pediatr*. 1973 Nov;83:815-20.

**Ruiz-Perez VL**, Ide SE, Strom TM, Lorenz B, Wilson D, Woods K, King L, Francomano C, Freisinger P, Spranger S, Marino B, Dallapiccola B, Wright M, Meitinger T, Polymeropoulos MH, Goodship J. Mutations in a new gene in Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrodental dysostosis. *Nat Genet*. 2000;24:283-6.

**Ruiz-Perez VL**, Tompson SW, Blair HJ, Espinoza-Valdez C, Lapunzina P, Silva EO, Hamel B, Gibbs JL, Young ID, Wright MJ, Goodship JA. Mutations in two nonhomologous genes in a head-to-head configuration cause Ellis-van Creveld syndrome. *Am J Hum Genet*. 2003;72:728-32.

**Sadler T. W.** *Embriologia medica di Langman*. Masson 2002

Samánek M. Congenital heart malformations: prevalence, severity, survival, and quality of life. *Cardiol Young*. 2000;10:179-85.

**Sanada**, M., Suzuki, T., Shih, L.Y., Otsu, M., Kato, M., Yamazaki, S., Tamura, A., Honda, H., Sakata-Yanagimoto, M., Kumano, K., et al. (2009). Gain-of-function of mutated CCBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature* 2009; 460: 904–908.

**Sargin**, B., Choudhary, C., Crosetto, N., Schmidt, M.H., Grundler, R., Rensinghoff, M., Thiessen, C., Tickenbrock, L., Schwabbe, J., Brandts, C., et al. Flt3-dependent transformation by inactivating c-Cbl mutations in AML. *Blood* 2007; 110:1004–1012.

**Sarkozy A**, Conti E, Neri C et al. Spectrum of atrial septal defects associated with mutations of NKX2.5 and GATA4 transcription factors. *J Med Genet* 2005: 42: e1

Sarkozy A, Digilio MC, Dallapiccola B. Leopard syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2008; 3:13.

Schinzel A. Catalog of unbalanced chromosome aberrations in man. Walter de Gruyter, Berlin, 2001

**Schluterman MK**, Krysiak AE, Kathiriya IS, Abate N, Chandalia M, Srivastava D, Garg V. Screening and biochemical analysis of GATA4 sequence variations identified in patients with congenital heart disease. *Am J Med Genet A*. 2007; 143A:817-23

Schmidt, M.H., and Dikic, I. The Cbl interactome and its functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:907–918.

**Schott JJ**, Benson DW, Basson CT, Pease W, Silberbach GM, Moak JP, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science*. 1998;281:108-11

**Schubbert S**, Zenker M, Rowe SL, Boll S, Klein C, Bollag G, van der Burgt I, Musante L, Kalscheuer V, Wehner LE, Nguyen H, West B, Zhang KY, Siermans E, Rauch A, Niemeyer CM, Shannon K, Kratz CP. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet*. 2006;38:331-6.

**Shaw GM**, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM, Lammer EJ. Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. *Am J Med Genet*. 1995;59:536-45.

**Sohl G**, Nielsen PA, Eiberger J, Willecke K. Expression profiles of the novel human connexin genes hCx30.2, hCx40.1, and hCx62 differ from their putative mouse orthologues. *Cell Commun Adhes* 2003;10:27–36.

**Sohl G**, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004;62:228–32.

**Splitt MP**, Burn J, Goodship J. Connexin43 mutations in sporadic and familial defects of laterality. *N Engl J Med* 1995;333:941 author reply 941–942.

**Stewart DR**, Kleefstra T. The chromosome 9q subtelomere deletion syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007; 145C: 383–392.

**Stewart RA**, Sanda T, Widlund HR, et al. Phosphatase-dependent and -independent functions of Shp2 in neural crest cells underlie LEOPARD syndrome pathogenesis. *Dev Cell* 2010; 18:750–762.

**Swaminathan, G.**, and Tsygankov, A.Y. The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *J. Cell. Physiol.* 2006; 209:21–43

**Tanaka M**, Chen Z, Bartunkova S, Yamasaki N, Izumo S. The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development.* 1999;126:1269-80.

**Tariq M**, Belmont JW, Lalani S, Smolarek T, Ware SM. SHROOM3 is a novel candidate for heterotaxy identified by whole exome sequencing. *Genome Biol.* 2011 ;12:R91

**Tartaglia M**, Kalidas K, Shaw A, et al. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 2002; 70:1555–1563.

**Tartaglia M**, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, van der Burgt I, Brunner HG, Bertola DR, Crosby A, Ion A, Kucherlapati RS, Jeffery S, Patton MA, Gelb BD. PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet.* 2002;70:1555-63.

**Tartaglia M**, Mehler EL, Goldberg R, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2001; 29:465–468.

**Tartaglia M**, Pennacchio LA, Zhao C, et al. Gain-of-function *SOS1* mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007; 39:75–79.

**Tartaglia M**, Zampino G, Gelb BD. Noonan syndrome: clinical aspects and molecular pathogenesis. *Mol Syndromol* 2010; 1:2-26.

**Tartaglia, M.** et al. Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nature Genet* 2004; 34:148-150.

**Thiene G**, Razzolini R, Dalla-Volta S. Aorto-pulmonary relationship, arterio-ventricular alignment, and ventricular septal defects in complete transposition of the great arteries. *Eur J Cardiol.* 1976 ;4:13-24.

**Tidyman WE**, Rauen KA. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19:230–236.

**Tomita-Mitchell A**, Maslen CL, Morris CD et al. GATA4 sequence variants in patients with congenital heart disease. *J Med Genet* 2007; 44: 779–783.

**van der Burgt I.** Noonan syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2:4.

**van Kempen MJ,** Fromaget C, Gros D, Moorman AF, Lamers WH. Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein, in the developing and adult rat heart. *Circ Res* 1991;68:1638–51.

**Van Mierop LH,** Kutsche LM. Cardiovascular anomalies in DiGeorge syndrome and importance of neural crest as a possible pathogenetic factor. *Am J Cardiol.* 1986 ;58:133-7

Van Praagh R ,Weinberg PM, Van Praagh S, Malpositions of the heart. In: Moss AJ, Adams FH,

**Van Praagh R,** Perez-Trevino C, López-Cuellar M, Baker FW, Zuberbuhler JR, Quero M, Perez VM, Moreno F, Van Praagh S. Transposition of the great arteries with posterior aorta, anterior pulmonary artery, subpulmonary conus and fibrous continuity between aortic and atrioventricular valves. *Am J Cardiol.* 1971;28:621-31.

**Verhagen JMA,** Papatsonis DNM, Grijseels EWM, de Krijger RR, de Leeuw N, Wessels MW. Familial 1q21.1 microduplication associated with cardiomyopathy and absent pulmonary valve. *Eur J Hum Genet* 2011; 19(Suppl 2):130 (Abstract)

**Ware SM,** Peng J, Zhu L, et al. Identification and functional analysis of ZIC3 mutations in heterotaxy and related congenital heart defects. *Am J Hum Genet* 2004;74:93-105.

**Watanabe Y,** Benson DW, Yano S, et al. Two novel frameshift mutations in NKX2.5 result in novel features including visceral inversus and sinus venosus type ASD. *J Med Genet* 2002;39:807-11.

**Weber M,** Schweitzer M, Andre JM, Tridon P, Vert P. [Epilepsy, anticonvulsants and pregnancy]. *Arch Fr Pediatr.* 1977;34:374-83. French

**Wellbrock, C.,** Karasarides, M. & Marais, R. The RAF proteins take centre stage. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; 5:875–885

**Wentzel C,** Fernstrom M, Ohrner Y et al. Clinical variability of the 22q11.2 duplication syndrome. *Eur J Med Genet* 2008;51: 501–510.

**Whittemore R,** Wells JA, Castellsague X. A second-generation study of 427 probands with congenital heart defects and their 837 children. *J Am Coll Cardiol.* 1994; 23:1459-67

**Wittinghofer A.** Signal transduction via Ras. *Biol Chem* 1998; 379:933–6 syndrome.

Ya J, Erdtsieck-Ernste EB, de Boer PA, et al. Heart defects in connexin43-deficient mice. *Circ Res* 1998;82:360–6.

**Yasui H**, Morishima M, Nakazawa M, Aikawa E. Anomalous looping, atrioventricular cushion dysplasia, and unilateral ventricular hypoplasia in the mouse embryos with right isomerism induced by retinoic acid. *Anat Rec*. 1998;250:210-9.

**Yoon G**, Rosenberg J, Blaser S, et al. Neurological complications of cardiofacio-cutaneous syndrome. *Dev Med Child Neurol* 2007; 49:894–899.

**Zenker M**, Buheitel G, Rauch R, et al. Genotype-phenotype correlations in Noonan syndrome. *J Pediatr* 2004; 144:368–374.

**Zenker M**. From Noonan syndrome to neurofibromatosis: disorders of the RAS-MAPK pathway. *Paädiatrische Praxis* (in press).

**Zenker M**. Genetic and pathogenetic aspects of Noonan syndrome and related disorders. *Horm Res* 2009; 72 (Suppl 2):57–63.

**Zetterqvist P**. Recurrence risk in CC. *Circulation*. 1977; 55:555-6

**Zhang W**, Li X, Shen A et al. GATA4 mutations in 486 Chinese patients with congenital heart disease. *Eur J Med Genet* 2008; 51: 527–535.

**Zheng**, N., Wang, P., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* 2000; 102: 533–539.