



## Sindrome di Noonan: identificazione di nuove mutazioni genetiche e correlazione genotipo-fenotipo

Laura Losa, Arianna Zaroli, Francesca Marabotto, Mariangela Cisternino

Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

---

### *Sindrome di Noonan: identificazione di nuove mutazioni genetiche e correlazione genotipo-fenotipo*

La sindrome di Noonan (SN [OMIM63950]) è una sindrome a trasmissione autosomica dominante correlata a mutazioni *germline* a carico di geni appartenenti al Ras-MAPK *pathway*: PTPN11, KRAS, SOS1 e RAF1. Le caratteristiche fenotipiche più importanti sono: *facies* tipica, anomalie cardiovascolari e bassa statura.

Su una coorte totale di 27 soggetti con SN diagnosticata sulla base dei criteri clinici di Van der Burgt, sono stati presi in esame i 16 soggetti risultati precedentemente negativi per mutazioni a carico di PTPN11 e KRAS. In questo gruppo, in 4 pazienti su 16 (25%) sono state individuate 4 diverse mutazioni a carico del gene SOS1 di cui una (R497Q) non precedentemente descritta in letteratura, localizzata sull'esone 10, e tre già note (Q477R, M269T e Y702H). Le mutazioni M269T e Q477R sono *de novo*, mentre le mutazioni R497Q e Y207H sono familiari. Un probando è risultato, inoltre, portatore di una doppia eterozigosi relativamente alla mutazione familiare SOS1 R497Q e alla mutazione *de novo* P261S in RAF1. Si tratta del primo caso descritto in letteratura di doppia mutazione in paziente affetto da SN: si ritiene che la mutazione familiare del gene SOS1 agisca da modificatore del fenotipo del probando, determinato, invece, dalla mutazione di RAF1.

Tutti i pazienti SOS1-positivi presentano una statura normale, tranne la madre di un caso familiare che in anamnesi presenta bassa statura e deficit transitorio di GH secondari a ritardo puberale. A differenza dei pazienti SOS1-positivi, quelli PTPN11-positivi presentano, nel 70% dei casi, bassa statura con o senza deficit di GH. Nello specifico, nessuno dei soggetti SOS1-positivi presenta una statura inferiore al 3° centile e la media dell'altezza espressa in SDS è risultata significativamente superiore a quella dei soggetti PTPN11-positivi e di quelli negativi per mutazione ( $P=0.0005$  e  $P=0.0051$ , rispettivamente). La statura dei pazienti SOS1-positivi, inoltre, è in accordo con il loro *target* genetico (TH) mentre nei casi PTPN11-positivi e in quelli negativi per mutazione è significativamente inferiore al TH ( $P=0.0012$  e  $P=0.0021$  rispettivamente). I pazienti SOS1-positivi sembrerebbero, inoltre, presentare una minor frequenza di ritardo mentale (12% vs 63%), di diatesi emorragica (50% vs 80%) e di stenosi della valvola polmonare (37% vs 77%) rispetto ai pazienti PTPN11-positivi.

Questi dati sottolineano come nella SN il fenotipo possa essere diverso a seconda del gene mutato.

Il riscontro di una doppia eterozigosi per mutazione in SOS1 e in RAF1, nel genotipo di un paziente, di cui la prima familiare e la seconda sporadica, suggerisce la necessità, anche in presenza di un gene mutato, di estendere la ricerca genetica agli altri geni coinvolti nella patogenesi della SN.

### **Noonan Syndrome: identification of new genetic mutations and genotype-phenotype correlation**

Noonan Syndrome (NS [OMIM63950]) is an autosomal dominant genetic condition, characterized by short stature (-1.9 DS vs normal population), characteristic facial features, and congenital heart defects. Familial or de novo mutations in PTPN11, RAF1, SOS1, KRAS, and NRAS are responsible for 60-75% of the cases, thus, additional genes are expected to be involved in the pathogenesis of NS.

Over a cohort of 27 patients affected by NS diagnosed on the bases of Van der Burgt clinical criteria [3], 16 patients previously resulted to be negative for PTPN11 and KRAS mutations, have been taken into account. In this group 4 out of 16 patients (25%) were found to be carriers of 4 different SOS1 mutations: one (R497Q) never described before and 3 (Q477R, M269T e Y702H) already known. M269T e Q477R mutations are *de novo* while R497Q e Y702H mutations are familial. Moreover, a proband resulted to be carrier of a double heterozygosis for both the familial R497Q mutation of SOS1 and the *de novo* P261S mutation of RAF1. This is the first described case of a patient affected of NS carrying a double heterozygosis: we believe that the familial mutation of SOS1 acts as modifier of the patient's phenotype while the typical NS phenotype is determined by RAF1 mutation.

All SOS1 mutated patients have a normal stature excepted for the mother of a proband that has anamnestic short stature and a transient GH deficiency secondary to retardation of pubertal development. Unlike SOS1 mutated patients, PTPN11 mutated present short stature, with or without GH deficiency, in 70% of cases. Specifically, none of SOS1 mutated patients has a stature < 3rd centile and average height expressed in SD has resulted to be significantly superior to the one of PTPN11 mutated patients and to the one of patients in which no mutation was found (P=0.0005 and P=0.0051, respectively). Moreover, SOS1 mutated patients have a stature that deals with the genetic target (TH), while PTPN11 mutated patients have a stature which is significantly inferior to the TH (P=0.0012 and P=0.0021, respectively). In SOS1 mutated patients we found also a lower frequency of mental retardation (12% vs 63%), bleeding diathesis (50% vs 80%), and pulmonary valve stenosis (37% vs 77%) than in PTPN11 patients.

These findings underline how different can be the phenotype of a NS patient depending on the genetic mutation that is at the basis of the syndrome. The double heterozygosis of SOS1 and RAF1 we found in a patient suggests the necessity of extending the search for mutations to all the other genes we know to be involved in NS pathogenesis.

---

## **Introduzione**

La sindrome di Noonan (SN) è stata descritta per la prima volta nel 1963 da J. Noonan, una cardiologa pediatra del Kentucky, che riportò in letteratura 9 casi con stenosi della valvola polmonare, facies sindromica e bassa statura. La SN presentava alcune caratteristiche cliniche in comune con la sindrome di Turner (bassa statura e pteriglio) ed interessava sia pazienti di sesso femminile sia maschile [1].

La SN è una patologia a trasmissione autosomica dominante, a penetranza completa ed espressività variabile. Tuttavia, molti casi sono sporadici e vi è evidenza anche di trasmissione autosomica recessiva.

Essa è caratterizzata da:

- bassa statura armonica;
- *facies* tipica;
- malformazioni cardiache congenite, più frequentemente stenosi della valvola polmonare (SVP) e cardiomiopatia ipertrofica (CMI);
- deformità scheletriche del petto (petto carenato/escavato);
- criptorchidismo nel maschio;
- pubertà ritardata.

L'incidenza della malattia varia da 1:1000 a 1:2500 [2].

L'età media alla diagnosi è di 9 anni.

L'aspettativa di vita è verosimilmente normale in assenza di grave malformazione cardiaca.

Generalmente si pone il sospetto diagnostico di SN in presenza della facies o delle tipiche malformazioni cardiache. Nei neonati la facies può essere meno evidente, ma l'edema generalizzato, i difetti cardiaci congeniti e l'eccesso di pliche nuchali possono orientare verso tale diagnosi.

La diagnosi di SN è principalmente clinica e è posta sulla base dei criteri di Van der Burgt (Tabella 1) [3]. Ad oggi, questi criteri sono quelli più diffusamente impiegati e permettono di selezionare i pazienti da sottoporre ad analisi genetica allo scopo di individuare le eventuali mutazioni genetiche. Secondo il modello presentato da Van der Burgt, per poter porre diagnosi di SN devono essere presenti *facies* tipica associata ad almeno un criterio maggiore o due minori, oppure *facies* suggestiva associata ad almeno due criteri maggiori o tre minori.

L'analisi delle caratteristiche cliniche dei pazienti con SN, con diagnosi confermata da studi molecolari, ha dimostrato che nessuna di queste da sola può portare ad una diagnosi certa di SN; al contrario, i criteri di Van der Burgt, che prendono in considerazione la facies, la statura, le deformità toraciche e i difetti cardiaci, si sono dimostrati uno strumento preciso ai fini diagnostici. Recentemente, a partire dal 2001, sono state identificate mutazioni genetiche a carico di alcuni geni del Ras-MAPK *pathway* (PTPN11, SOS1, KRAS e RAF1) che sono presenti in circa la metà dei soggetti affetti da SN.

La diagnosi di SN può, inoltre, essere sospettata in epoca prenatale per il riscontro di igroma cistico a livello della colonna spinale cervicale o di translucenza nucale all'ecografia fetale. Questi reperti, comuni ad altri quadri sindromici quali la sindrome di Turner e la sindrome di Down, rendono necessarie ulteriori indagini quali la villocentesi e l'amniocentesi per la ricerca di anomalie cromosomiche. Tuttavia, poiché in assenza di anomalie cromosomiche, la diagnosi di SN è posta solo nel 2% circa dei casi con edema nucale, la ricerca di mutazioni di PTPN11 di routine non è indicata a meno che non siano riscontrate caratteristiche cliniche aggiuntive. Inoltre, poiché la lunghezza alla nascita e il peso sono generalmente normali nella SN, i parametri della crescita fetale non sono di aiuto nella diagnosi [4].

## Scopo del lavoro

La SN ha un'incidenza variabile tra 1:1000 e 1:2500; in considerazione di tale dato, tutt'altro che trascurabile, di fronte a soggetti che presentano note dismorfiche facciali, bassa statura, cardiopatia, deformità scheletriche e dati anamnestici significativi, tra le ipotesi diagnostiche deve essere considerata, senza dubbio, anche tale condizione. La diagnosi clinica deve, inoltre, essere accompagnata dalla ricerca delle mutazioni geniche implicate nel determinismo della SN.

Primo obiettivo del nostro studio è stato quello di ricercare le mutazioni geniche identificate recentemente nella SN (SOS1 e RAF1) nei soggetti con diagnosi clinica di SN che precedentemente erano risultati negativi per le mutazioni PTPN11 e KRAS.

In secondo luogo, poiché la bassa statura, unitamente alle dismorfie facciali e alla cardiopatia, è il segno clinico per il quale più frequentemente i bambini con diagnosi di SN vengono condotti alla valutazione specialistica endocrinologica, l'attenzione è stata concentrata proprio su tale parametro auxologico.

Un'altezza inferiore al terzo centile, tradizionalmente considerata caratteristica importante della SN, in realtà è stata recentemente dimostrata essere diversamente presente in relazione alle diverse mutazioni geniche: alcune di queste, infatti, sembrerebbero preservare la crescita staturale dei soggetti portatori, pur presentando questi ultimi un fenotipo tipicamente Noonan.

Abbiamo quindi ricercato una correlazione genotipo-fenotipo relativamente al parametro staturale, per valutare se, nell'ambito della notevole variabilità fenotipica della SN, vi sia un diverso andamento della crescita a seconda della caratterizzazione genotipica.

## Materiali e metodi

È stato condotto uno studio su una coorte di 27 soggetti (13 M, 14 F) con SN diagnosticata sulla base dei criteri di Van der Burgt, di cui 11 su 27 (41%) erano precedentemente risultati positivi per mutazioni di PTPN11; i rimanenti 16 soggetti risultati negativi per mutazioni in PTPN11 e KRAS sono stati quindi sottoposti ad ulteriore analisi genetica. Undici soggetti sono giunti direttamente all'attenzione del nostro Centro di Endocrinologia Pediatrica, i restanti 16 casi sono stati inviati dai colleghi della Cardiologia Pediatrica della nostra Clinica.

Sono stati inclusi nello studio fenotipico anche 7 soggetti con SN, appartenenti ai nuclei familiari dei probandi, che sono risultati portatori di una mutazione genetica.

Tutti i pazienti coinvolti hanno dato il proprio consenso allo studio ed alla pubblicazione delle loro fotografie. Nel caso di pazienti minori si è ottenuto il consenso informato dei genitori.

I soggetti reclutati sono stati sottoposti ad un'attenta valutazione clinica ed auxologica, finalizzata alla ricerca dei criteri maggiori e minori secondo Van der Burgt, utilizzati per la diagnosi clinica di SN; in relazione al fenotipo presentato, casi selezionati hanno eseguito consulenze multidisciplinari in merito alle condizioni patologiche comprese nel quadro della SN (valutazione cardiologica, dermatologica, dell'età ossea, neuropsichiatrica, oftalmologica, otorinolaringoiatria e ortopedica).

I parametri auxologici e dello sviluppo puberale sono stati confrontati con gli standard di normalità di Tanner. Per la lettura dell'età ossea è stato utilizzato l'atlante di Greulich e Pyle.

Per la diagnosi di cardiopatia sono stati impiegati i criteri ecocardiografici classici. L'ipertrofia del ventricolo sinistro è stata esaminata a fine diastole in *short-axis* a livello della valvola mitrale e del muscolo papillare. Il movimento sistolico anteriore della mitrale è stato valutato con l'M-mode. Il gradiente di efflusso del ventricolo sinistro è stato determinato con la proiezione apicale delle 5 camere e con la parasternale usando il doppler pulsato e continuo. La valvola polmonare è stata studiata usando l'ecocardiografia bidimensionale. La displasia della valvola polmonare è stata diagnosticata quando il diametro della valvola polmonare risultava minore del valore medio e vi era un'asimmetria dello spessore delle cuspidi con movimento limitato delle cuspidi stesse. Lo studio della valvola polmonare è stato effettuato mediante la parasternale *short-axis* usando il doppler a colori pulsato e continuo. L'efflusso del ventricolo destro prima della valvola polmonare è stato valutato con il doppler per determinare un'eventuale stenosi sottovalvolare significativa. Il rigurgito della valvola polmonare è stato determinato secondo le metodiche standard. Una velocità Doppler elevata sulla valvola polmonare è stata definita come una velocità  $>2DS$  dal valore medio della popolazione normale. Una stenosi polmonare significativa è definita come una velocità al Doppler  $>300$  cm/sec. La diagnosi di CMI è stata posta sulla base di uno spessore massimo della parete ventricolare sinistra a fine diastole maggiore di 2DS rispetto alla media per l'età.

Previo consenso informato del genitore o del paziente, se maggiorenne, è stato eseguito prelievo di sangue periferico per l'analisi genetica, eseguita presso i laboratori del Dipartimento di Genetica dell'Università degli Studi di Milano. Nei casi risultati positivi per la mutazione l'analisi è stata estesa al nucleo familiare.

Il DNA da sequenziare è stato estratto dai linfociti del sangue periferico dei pazienti seguendo una procedura standard, che prevede una prima incubazione con *buffer* di lisi a base di Triton ed una seconda incubazione con proteinasi K. È stata, poi, eseguita l'amplificazione mediante PCR ed il sequenziamento. Il gene è stato, quindi, amplificato con *primer* specifici in frammenti che sono stati sequenziati attraverso l'allestimento di una reazione di polimerizzazione secondo la procedura prevista per il kit Big Dye Terminator ABI Prism (Applied Biosystem) e sottoposti ad elettroforesi capillare, utilizzando il sequenziatore automatico ABI Prism 3100. I dati sono stati, infine, elaborati da un *software* dedicato che fornisce un *output* in termini di picchi colorati corrispondenti alle 4 basi del DNA in sequenza che costituiscono l'elettroferogramma.

## **Risultati**

Dei 27 soggetti con SN inclusi nello studio, 11 (41%) erano in precedenza risultati positivi per mutazioni del gene PTPN11; in 9 casi (82%) la mutazione era sporadica, mentre nei rimanenti 2 casi (18%) familiare, essendo la stessa mutazione presente anche nelle mamme di due probandi.

Dei rimanenti 16 casi, risultati negativi per mutazioni PTPN11 e KRAS, 4 (15% della popolazione totale con SN) sono risultati positivi per mutazioni del gene SOS1; uno di questi ultimi pazienti è risultato positivo anche per la mutazione del gene RAF1. In 2 casi la mutazione è sporadica e nei rimanenti 2 familiare essendo la stessa mutazione presente rispettivamente in 3 ed in 2 membri del nucleo familiare del probando. Nei restanti 12/27 soggetti (44%) non sono state individuate mutazioni geniche.

Considerando la totalità dei probandi e dei familiari positivi per mutazioni, sono stati identificati 22 casi positivi. Le mutazioni PTPN11 sono state identificate in 13 soggetti (59%) e le mutazioni SOS1 in 9 (41%) casi, uno dei quali presenta anche la mutazione RAF1 (4%). A carico di PTPN11 sono state identificate mutazioni degli esoni 3, 7, 8, 12 e 13, tutte già precedentemente descritte in letteratura.

Per quanto riguarda, invece, il gene SOS1, l'analisi condotta ha evidenziato 4 diverse mutazioni: una a carico dell'esone 6 (M267T), una dell'esone 13 (Y702H) e due dell'esone 10 (Q477R e R497Q); di queste, la mutazione R497Q non era stata finora descritta in letteratura (Figura 1).

Per quanto riguarda i pazienti SOS1 positivi, in particolare, un bambino è risultato portatore della mutazione sporadica M269T. Le caratteristiche cliniche presenti in questo paziente comprendono: facies tipica, stenosi/displasia della valvola polmonare, petto scavato, anomalie ectodermiche (capelli crespi e cheratosi pilare), altezza e sviluppo neurocomportamentale nella norma.

Il paziente con mutazione Q477R presenta fenotipo caratterizzato da: facies tipica, stenosi della valvola polmonare, petto scavato inferiormente e carenato superiormente, criptorchidismo, anomalie ectodermiche (cheratosi pilare), dislessia, lieve ritardo mentale, diatesi emorragica (deficit di vWF e fattore VIII), altezza nella norma.

La mutazione familiare Y702H è stata individuata in 4 soggetti appartenenti allo stesso nucleo familiare (Figura 2): probanda (d), mamma (c), zio materno (b) e nonno materno (a). Un fenotipo subclinico è presente nei familiari mentre nella probanda il fenotipo è nettamente più espresso, in ragione soprattutto della cardiopatia congenita.

La quarta mutazione a carico del gene SOS1 identificata nella nostra coorte di pazienti, R497Q, anch'essa, come la precedente, non ancora descritta in letteratura, è a carattere familiare essendo stata riscontrata in tre individui appartenenti allo stesso nucleo familiare (Figura 3): probando (c), padre (b) e nonno paterno (a).

Il probando (a) presenta, inoltre, mutazione P261S a carico del gene RAF1; le sue caratteristiche fenotipiche sono: facies tipica, cardiomiopatia ipertrofica, stenosi della valvola polmonare, prolasso della valvola mitrale, anomalie ectodermiche, ptosi palpebrale, altezza nella norma. Al contrario, nel padre (b) e nel nonno paterno (c) sono presenti unicamente anomalie ectodermiche che comprendono, nel padre, cheratosi pilare, basso impianto delle orecchie, canizie precoce a 20 anni, sopracciglia folte, mentre nel nonno è presente cheratosi pilare; sia il nonno sia il bambino presentano la sovrapposizione del V dito del piede sul IV dito. Si tratta del primo caso descritto in letteratura di paziente affetto da SN e portatore di mutazione a carico sia del gene SOS1 sia del gene RAF1 [5].

Per quanto riguarda la statura, soltanto 1 dei 9 pazienti SOS1 positivi presenta una statura inferiore al 10° centile, mentre nessuno ha un'altezza inferiore al 3° centile, in netto contrasto con la coorte di pazienti PTPN11 positivi, nella quale 8 dei 13 soggetti presentano un'altezza inferiore al 3° centile e con la coorte dei pazienti negativi per mutazione in cui 1 presenta un'altezza inferiore al 10° centile e 7 inferiore al 3° centile.

Per quanto riguarda la media dell'H-SDS non sono state evidenziate differenze significative tra i PTPN11 positivi e i mutazione-negativi, mentre questa è risultata significativamente più alta nei SOS1 positivi rispetto agli altri 2 gruppi di pazienti (Tabella 2, Figura 4).

Inoltre, mentre la media dell'altezza espressa in SDS nei pazienti PTPN11 positivi e dei pazienti negativi per mutazione è risultata significativamente più bassa rispetto a quella del rispettivo target genetico (TH) ( $-1.9 \pm 0.88$  vs  $0.43 \pm 1.26$ ;  $P=0.0012$ ), nei pazienti SOS1 positivi è invece prossima al TH ( $-0.63 \pm 0.49$  vs  $-0.53 \pm 0.37$ ;  $P$  non significativa) (Tabella 2).

Alcuni dei pazienti arruolati nello studio presentano deficit di ormone della crescita: 3 PTPN11-positivi, 2 mutazione-negativi ed uno SOS1-positivo; quest'ultimo caso è la mamma di un probando, la quale ha presentato un deficit di GH transitorio e secondario al ritardo puberale.

Nonostante la statura nella norma, l'età ossea valutata con Rx della mano sinistra, ha evidenziato, un ritardo dell'età scheletrica in tutti e 4 i probandi SOS1-positivi (Tabella 3).

In anamnesi 3 familiari di uno dei casi SOS1-positivi, portatori della mutazione Y702H, hanno riferito ritardo puberale, in particolare la madre ha avuto il menarca a 16 anni.

Il dato anamnestico del peso alla nascita nella nostra coorte di pazienti ha mostrato valori di normalità nei soggetti SOS1-positivi (in cui il dato era ottenibile) e valori mediamente ma non significativamente inferiori nel gruppo dei PTPN11 positivi e nel gruppo negativo per mutazione. Inoltre, 4 dei pazienti sono nati SGA (*small for gestational age*), di cui 3 mutazione-negativi ed uno PTPN11-positivo (Figura 5).

Abbiamo, quindi, messo a confronto (Tabella 4) i nostri dati con quelli riportati nei tre studi più recenti presenti in letteratura relativi alle caratteristiche fenotipiche dei pazienti SOS1 positivi rispetto a quelli PTPN11 positivi, quelli di Zenker, Tartaglia e Roberts [6].

Anche nel nostro studio il ritardo mentale e la statura sono risultati meno frequenti nei casi portatori di mutazioni in SOS1 rispetto a quelli positivi per mutazioni PTPN11.

## Discussione

La SN è una sindrome caratterizzata da una significativa eterogeneità sia sul piano clinico sia genetico. Le manifestazioni cliniche principali comprendono le dismorfie facciali, la cardiopatia congenita e la bassa statura. Per quanto riguarda il genotipo, alle note mutazioni dei geni PTPN11 e KRAS negli ultimi due anni si sono aggiunte altre mutazioni a carico dei geni SOS1, RAF1 e MEK1, geni sempre facenti parte del Ras-MAPK *pathway*. Nella nostra coorte di pazienti con SN negativi per mutazione PTPN11 e KRAS sono state evidenziate mutazioni di SOS1 nel 25% dei casi; considerato il totale dei pazienti con SN la frequenza di queste mutazioni è del 15%. Due mutazioni SOS1 sono a carattere sporadico e due a carattere familiare, caratterizzate queste ultime da ampia variabilità di espressione fenotipica.

Dal confronto del fenotipo dei soggetti SOS1-positivi con quelli PTPN11-positivi e con quelli negativi per mutazioni geniche, si è evidenziata una significativa differenza per quanto riguarda la statura. In particolare, dei 9 soggetti SOS1-positivi inclusi nel nostro studio (4 probandi e 5 familiari), nessuno presenta una statura inferiore al 3° centile, tradizionalmente considerata bassa statura, a differenza degli altri gruppi esaminati in cui una bassa statura è presente nel 62% dei casi PTPN11 positivi e nel 58% dei mutazione-negativi.

Questo dato appare in accordo con la teoria secondo la quale la bassa statura nella SN dipenderebbe dalla presenza di mutazioni *gain of function* a carico del gene PTPN11. L'attivazione costituzionale della proteina fosfatase SHP2 determinata dalle mutazioni *germline* a carico di PTPN11 determinerebbe un'aumentata defosforilazione dei residui tirosinici presenti su GHR, JAK2 e STAT5 e, quindi, regolerebbe negativamente la risposta dei recettori al GH. L'assenza di mutazione a carico del gene

PTPN11 ed il conseguente venir meno di questo meccanismo patogenetico nei pazienti SOS1 positivi potrebbero essere una spiegazione della statura normale nei soggetti di questo gruppo. Il gene SOS1 codifica infatti per un Ras-GEF (*Ras-specific guanine nucleotide exchange factor*) che agisce a valle di SHP2 nel Ras-MAPK *pathway* e che non sembrerebbe essere implicato direttamente nella trasmissione del segnale del GH a differenza dell'SHP2 [7].

Al momento, in letteratura esistono dati discordanti per quanto riguarda la correlazione tra le mutazioni a carico del gene SOS1 e la bassa statura; in particolare, negli studi di Roberts e Tartaglia del 2007 è riportata una bassa frequenza di bassa statura nei SOS1-positivi (Tartaglia *et al.* 17% ; Roberts *et al.* 21%) rispetto ai PTPN11-positivi, mentre nello studio successivo di Zenker del 2007 è riportata una frequenza più elevata e pari al 52%. Le nostre osservazioni sono quindi in accordo con i dati pubblicati da Roberts e Tartaglia [8,9] ma non sarebbero confermati dagli studi di Zenker [6].

Nella nostra coorte di pazienti abbiamo osservato, oltre ad una minore frequenza di bassa statura, anche una minor frequenza di ritardo mentale e di diatesi emorragica nei soggetti SOS1-positivi rispetto a quelli PTPN11-positivi. La frequenza di criptorchidismo è risultata, invece, solo lievemente inferiore nei primi.

Diversamente da quanto riportato dagli studi che mostrano una stretta associazione tra le anomalie ectodermiche (principalmente i capelli crespi e la cheratosi pilare) e le mutazioni a carico del gene SOS1 [6], nella nostra coorte di pazienti non è stata riscontrata una frequenza maggiore di tali anomalie nei SOS1-positivi rispetto ai PTPN11-positivi ed a quelli negativi per le mutazioni note.

Per quanto riguarda la facies, possiamo confermare la maggior frequenza di ptosi palpebrale, presente nei 4 probandi SOS1-positivi e soltanto in 2 degli 11 probandi PTPN11-positivi.

Per quanto riguarda la cardiopatia, in letteratura non è riportata nessuna correlazione con il genotipo dei pazienti. Nel nostro studio abbiamo, invece, osservato una frequenza più bassa di stenosi della valvola polmonare nei SOS1-positivi rispetto ai PTPN11-positivi, poiché sembrerebbe rimandare alla stretta correlazione tra mutazioni del gene PTPN11 e SVP per il ruolo della proteina SHP2 nella valvulogenesi semilunare [10].

Inoltre, tra gli 8 pazienti SOS1 positivi nessuno presentava cardiomiopatia ipertrofica, ad eccezione del paziente portatore anche di mutazione a carico del gene RAF1, che, come recentemente descritto in letteratura, è implicata nel determinismo della cardiomiopatia [11].

Uno dei pazienti dello studio è risultato portatore di due mutazioni in eterozigosi: R497Q a carico del gene SOS1 e P261S a carico del gene RAF1. Il probando presenta un fenotipo completo per la presenza sia delle caratteristiche fenotipiche tipicamente correlate alla mutazione del gene RAF1 (la cardiomiopatia ipertrofica e la ptosi palpebrale) sia delle anomalie ectodermiche ascrivibili alle mutazioni del gene SOS1. Il padre ed il nonno paterno di questo bambino, portatori unicamente della mutazione R497Q, a carico del gene SOS1, mostrano solo anomalie ectodermiche e nessun'altra anomalia riscontrabile nella SN (vedi facies tipica, cardiopatia, bassa statura ecc.) [5]. Lo studio di questo nucleo familiare suggerisce, quindi, come più di un gene possa concorrere al determinismo delle caratteristiche cliniche della SN. Per tale motivo, il riscontro di positività a mutazioni del gene SOS1 non deve bloccare la ricerca di eventuali mutazioni a carico degli altri geni coinvolti nelle patogenesi della SN.

## Conclusioni

Mutazioni nei geni SOS1 e RAF1 sono state identificate rispettivamente nel 15% e 3% dei casi con SN risultati negativi per mutazioni a carico dei geni PTPN11 e KRAS. I pazienti affetti da SN con mutazioni a carico del gene SOS1, sembrano presentare una statura normale ed una minor frequenza di ritardo mentale e di diatesi emorragica rispetto ai soggetti PTPN11-positivi. Nonostante, quindi, la bassa statura sia considerata tra le caratteristiche principali della SN e sia un criterio maggiore per la diagnosi secondo Van der Burgt, questa non sembra far parte del fenotipo associato a mutazioni SOS1.

Queste osservazioni suggeriscono che L'assenza di bassa statura in soggetti PTPN11-negativi con un chiaro fenotipo Noonan deve orientare verso la ricerca di eventuali mutazioni a carico dei nuovi geni identificati implicati nella patogenesi della SN, SOS1 in particolare.

Il riscontro in un paziente di una doppia eterozigosi per mutazione di SOS1 e di RAF1, di cui la prima familiare e la seconda sporadica, suggerisce la necessità, anche in presenza di un gene mutato, di estendere la ricerca genetica agli altri geni coinvolti nella patogenesi della SN.

## Tabelle e figure

**Tabella 1. Criteri clinici per la diagnosi di SN in accordo con Van der Burgt.**

<b>Criteri</b>	<b>Maggiori</b>	<b>Minori</b>
<i>Facies</i>	Tipica	Suggestiva
<i>Difetti cardiaci</i>	SVP e/o ECG tipico	Altri difetti
<i>Statura</i>	<3° centile	<10° centile
<i>Deformità toraciche</i>	Petto carenato/escavato	Torace largo
<i>Storia familiare</i>	Parente di primo grado con SN	Parente di primo grado con sospetta SN
<i>Altri</i>	Tutti e tre (nel sesso maschile): - ritardo mentale - criptorchidismo - displasia linfatica	Uno tra: - ritardo mentale - criptorchidismo - displasia linfatica

**Tabella 2. Altezza in percentili e in SDS e target genetico dei pazienti con SN.**

<b>Mutazioni</b>	<b>PTPN11 (N 13)</b>	<b>SOS1 (N 9)</b>	<b>Negativi (N 12)</b>
<i>Centile altezza (media±DS)</i>	7.78±12.6	28.88±14.8	5.76±7.5
<i>SDS altezza (media±DS)</i>	-1.9±0.88*	-0.63±0.49	-2.18±1.4 <sup>§</sup>
<i>Target genetico</i>	0.43±1.26	-0.53±0.37	-0.33±1.2
*P=0.0012			
§P= 0.0021 vs <i>Target genetico</i>			

**Tabella 3. Confronto tra età cronologica ed età scheletrica nei 4 probandi SOS1 positivi.**

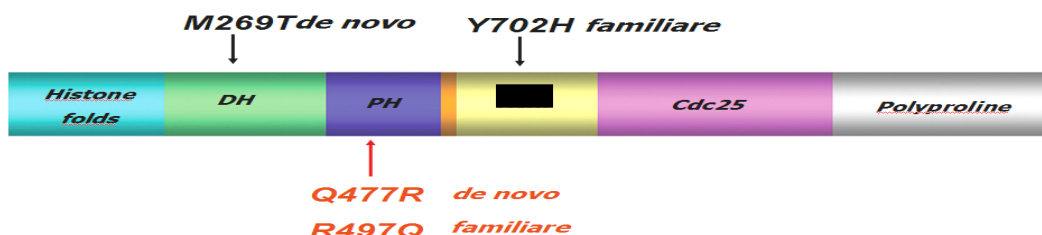
<b>Mutazione</b>	<b>Età cronologica</b>	<b>Età scheletrica</b>
<i>SOS1 R497Q</i> <i>RAF1 P261S</i>	4 anni	2 anni e mezzo/ 3 anni
<i>SOS1 Q477R</i>	10 anni	6 anni e mezzo
<i>SOS1 M269T</i>	3 anni	2 anni/ 2 anni e mezzo
<i>SOS1 Y702H</i>	4 anni	2 anni e mezzo



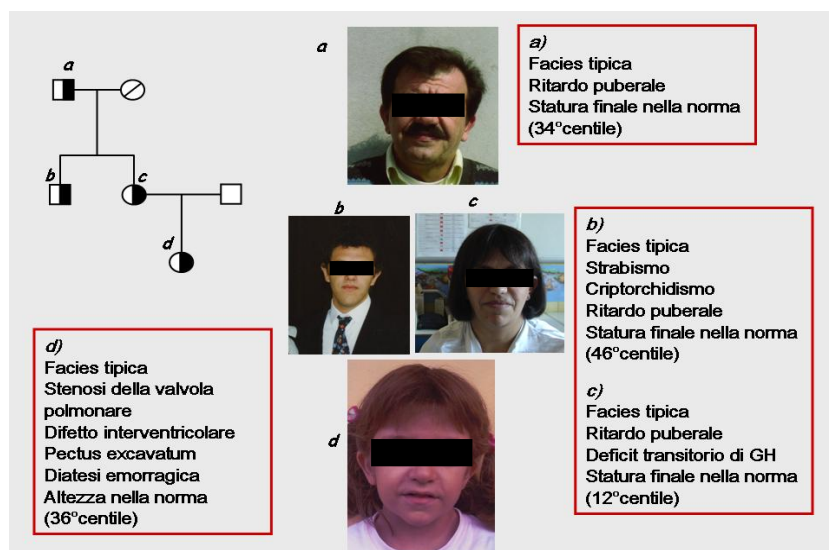
**Tabella 4. Caratteristiche fenotipiche a confronto nel gruppo PTPN11-positivi e nei SOS1-positivi.**

Caratteristiche fenotipiche	SOS1	SOS1/RAF1	PTPN11	Negativi	SOS1 <sup>#</sup>	PTPN11 <sup>#</sup>
<i>Facies tipica</i>	6/8 (75%)	+	7/13 (54%)	3/12 (25%)		
<i>Facies suggestiva</i>	0/8 (0%)	-	6/13 (46%)	9/12 (75%)		
<i>Anomalie ectodermiche</i>	3/8 (37%)	+	4/13 (31%)	4/12 (33%)		
<i>Deformità toraciche</i>	3/8 (37%)	+	8/12 (67%)	7/12 (58%)	33/40 (83%)	110/171 (64%)
<i>Ritardo mentale</i>	1/8 (12%)	-	7/11 (63%)	3/9 (25%)	9/51 (18%)	71/164 (43%)
<i>Criptorchidismo</i>	2/6 (33%)	+	2/5 (40%)	2/5 (40%)	10/21 (48%)	75/94 (80%)
<i>Ritardo puberale</i>	3/5 (60%)	-	4/6 (67%)	3/4 (75%)		
<i>Diatesi emorragica</i>	2/4 (50%)	-	4/5 (80%)		13/56 (23%)	46/90 (51%)
<i>SVP</i>	3/8 (37%)	+	10/13 (77%)	5/12 (42%)	41/56 (73%)	125/171 (73%)
<i>CMI</i>	0/8	+	3/13 (23%)	2/12 (16%)	6/56 (11%)	10/171 (6%)
<i>Altri difetti cardiaci</i>	0/8	+	5/13 (38%)	4/12 (30%)	10/50 (20%)	41/170 (24%)
<i>Altezza &lt;3° centile</i>	0/8 (0%)	-	8/13 (61%)	7/12 (58%)	19/53 (36%)	122/171 (71%)
<i>Altezza &lt;10° centile</i>	1/8 (12%)	-	1/13 (8%)	3/12 (25%)		
<i>SDS altezza</i>	-0.63±0.49	-0.05	-1.9±0.88*	-2.18 ± 1.4*		
<i>Deficit di GH</i>	1/8 (12%)	-	4/9 (44%)	3/12 (30%)		

\*P vs SOS1 <0.05  
<sup>#</sup>Dati letteratura



**Figura 1. Struttura del gene SOS1 e le mutazioni identificate.**



**Figura 2. Albero genealogico della famiglia con mutazione Y702H di SOS1.**

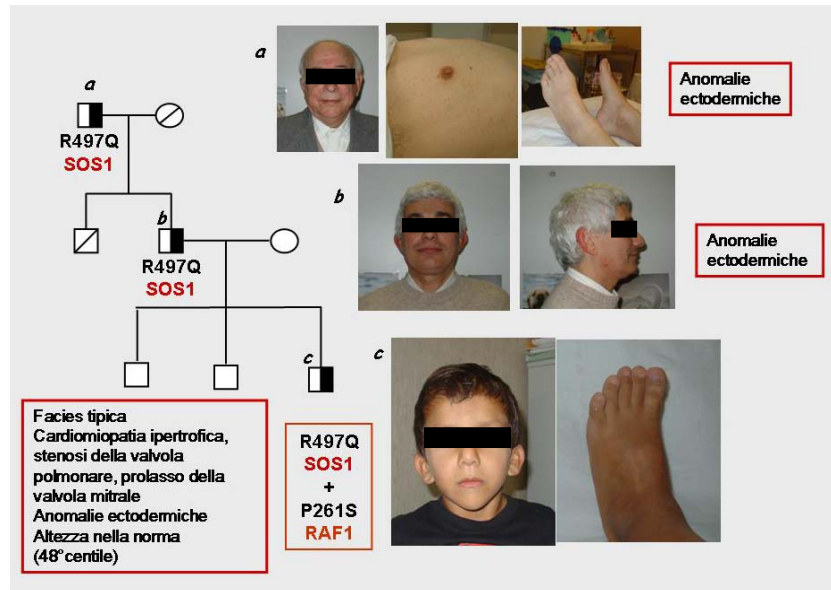


Figura 3. Albero genealogico della famiglia con mutazione R497Q in SOS1 e P261S in RAF1.

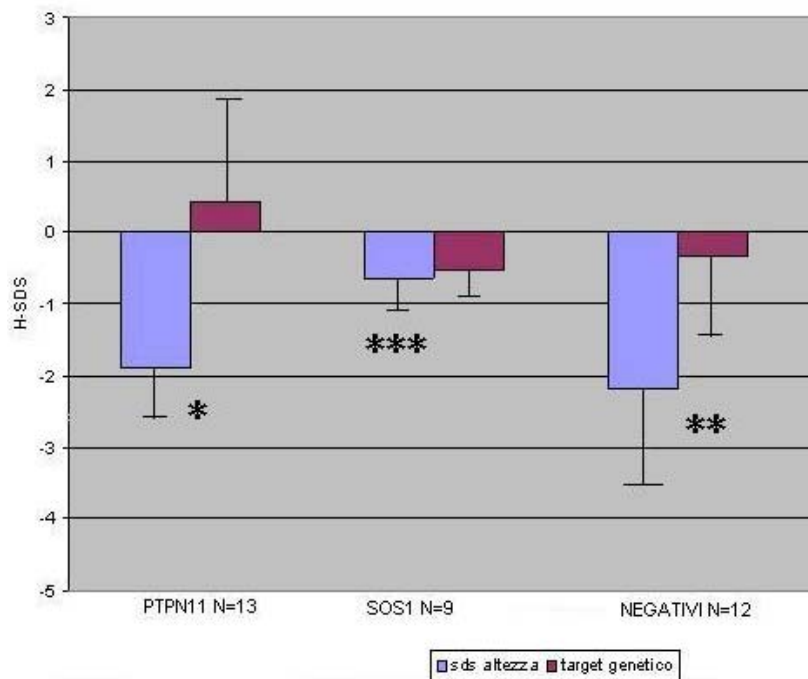


Figura 4. Confronto tra l'altezza in SDS nei pazienti PTPN11-positivi, SOS1-positivi e nei negativi per mutazione e il rispettivo target genetico (Legenda: \*P= 0.0012 vs Target genetico; \*\*P= 0.0021 vs Target genetico; \*\*\*P=0.0005 e P=0.0051 vs PTPN11-positivi e mutazione-negativi).

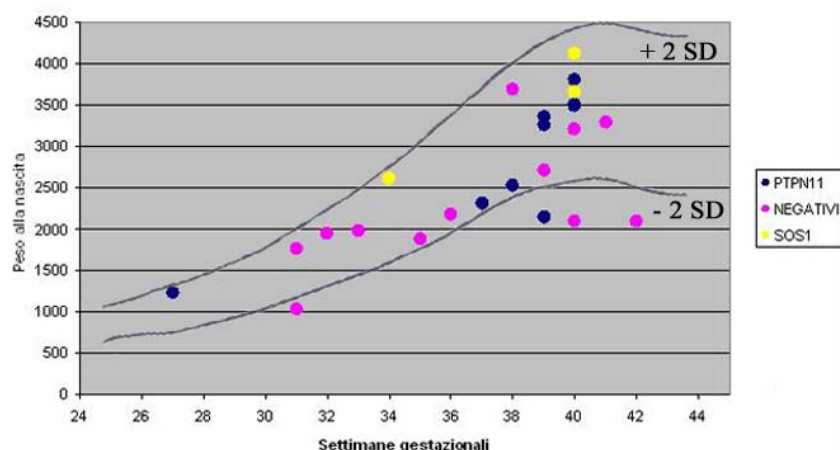


Figura 5. Peso alla nascita in relazione all'età gestazionale dei pazienti con SN arruolati nello studio. Le due linee nere indicano  $\pm 2$  DS in accordo con gli standard di Usher and McLean [7].

### Bibliografia

1. Mendez HMM, Opitz JM, Reynolds JF. Noonan syndrome, a review. *Am J Med Genet* 1985;21:493-506.
2. Sharland M. A clinical study of Noonan syndrome. *Arch Dis Child* 1992;67:178-183.
3. Van der Burgt I. Clinical and molecular studies in a large Dutch family with Noonan syndrome. *Am J Med Genet* 1994;53:187-191.
4. Tartaglia M. Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genom Human Genet* 2005;6:45-68.
5. Longoni M, Moncini S, Cisternino M et al. Noonan Syndrome associated with both a new Jnk-activating familial SOS1 and a de novo RAF1 mutations. *Am J Med Genet* 2010;152A:2176-2184.
6. Zenker M, Horn D. SOS1 is the second most common Noonan gene but plays no major role in cardio-facio-cutaneous syndrome. *J Medical Genetics* 2007;44:651-656.
7. Limal JM, Parfait B. Noonan syndrome: relationship between genotype, growth, and growth factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:300-306.
8. Roberts AE, Araki T, Swanson KD et al. Germline gain of function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007;39:70-74.
9. 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.
10. Noonan syndrome cardiac defects are caused by PTPN11 acting in endocardium to enhance endocardial-mesenchymal transformation. *PNAS* 2008.
11. Razzaque MA, Nishizawa T. Germline gain of function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2007;39:1013-1017.