



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA
Terapia Pediatrica e Farmacologia dello Sviluppo
Ciclo XXVIII

Identificazione di una variante missenso
nel gene *RBM10* in una famiglia sarda con
disabilità intellettiva X-linked

Settore scientifico disciplinare di afferenza
MED/03

Presentata da:	Dott.ssa Cristiana Meloni
Coordinatore Dottorato	Prof. Paolo Moi
Tutor	Dott.ssa Maria Addis

Esame finale anno accademico 2014 – 2015

INDICE

Abstract	1
INTRODUZIONE.....	2
Disabilità intellettiva	3
Eziologia.....	6
Cause genetiche	6
Disabilità intellettiva X-Linked (XLID).....	8
OBIETTIVO	13
MATERIALI e METODI	15
Famiglia	16
Studi preliminari	17
Studio attuale	18
Next generation sequencing (NGS).....	18
Estrazione del DNA.....	20
Studio NGS.....	20
Sequenziamento con metodo Sanger.....	24
RVIS	25
RISULTATI	26
Next Generation Sequencing	27
Analisi delle mutazioni e sequenziamento Sanger	32
PNMA3	35
RBM10	36
DISCUSSIONE.....	38
CONCLUSIONE	44
BIBLIOGRAFIA	46

Abstract

Identification of a *RBM10* missense variant in a Sardinian family with X-linked intellectual disability

X-linked intellectual disability (XLID) is a heterogeneous disorder, and mutations causing monogenic XLID have now been reported in over 100 genes. We report a five-generation Sardinian family in which seven affected male family members had intellectual disability and craniofacial dysmorphisms. Large-scale next generation exome resequencing of X chromosome genes detected a rare missense variant (c.995G>A, p.Arg332His) located within a highly conserved domain in the *RBM10* gene at Xp11.23. Sanger sequencing confirmed the presence of the variant in affected males and in their mothers. The variant was not present in non affected male family members, has not been reported in variant databases and is disease-causing according to a web-based prediction tool. *RBM10* is an RNA binding protein involved in the regulation of transcription, alternative splicing and message stabilization. *RBM10* nonsense and frameshift mutations are associated with TARP syndrome characterized by Talipes equinovarus, Atrial septal defect, Robin sequence and Persistence of the left superior vena cava and pre- or postnatal lethality in affected males. *RBM10* has not been reported in XLID patients until now. Genic intolerance score suggested that *RBM10* may be “intolerant” of functional mutations. Although our finding suggest that *RBM10* is a reasonable candidate gene for XLID, functional studies and mutations screening in other patients are needed to prove a definite causal relationship between the variant and the phenotype.

INTRODUZIONE

Disabilità intellettiva

La disabilità intellettiva (ID - precedentemente chiamata ritardo mentale) è un disturbo con insorgenza nell'età evolutiva, prima dei 18 anni, che include deficit intellettivi e adattivi negli ambiti della concettualizzazione, della socializzazione e delle capacità pratiche.

I livelli di gravità vengono definiti sulla base del funzionamento adattivo e non sui punteggi di quoziente intellettivo (QI), poiché è stato giudicato che sia il funzionamento adattivo, nelle aree della concettualizzazione, della socializzazione e delle abilità pratiche, a determinare il livello di supporto necessario a mantenere una condizione di vita accettabile.

Per poter formulare la diagnosi in accordo al DSM-V (Diagnostic and Statistical Manual of disorders-fifth edition), devono venir soddisfatti i seguenti 3 criteri:

A. Deficit delle funzioni intellettive (Q.I. < 70), come il ragionamento, la soluzione di problemi, la pianificazione, il pensiero astratto, il giudizio, l'apprendimento scolastico o l'apprendimento dall'esperienza, confermato sia da valutazione clinica che da prove d'intelligenza individualizzate e standardizzate.

B. Deficit del funzionamento adattivo che si manifesti col mancato raggiungimento degli standard di sviluppo e socio-culturali per l'indipendenza personale e la responsabilità sociale. Senza supporto continuativo i deficit adattivi limitano il funzionamento in una o più attività della vita quotidiana,

quali la comunicazione, la partecipazione sociale e la vita indipendente; in più ambiti diversi, come la casa, la scuola, il lavoro e la comunità.

C. Insorgenza dei deficit intellettivi e adattivi nell'età evolutiva.

Si possono distinguere 4 livelli di gravità: lieve, moderato, grave ed estremo, per ognuno dei quali vengono esaminati tre ambiti: concettuale, sociale e pratico.

DISABILITÀ INTELLETTIVA LIEVE

Ambito concettuale: possono esserci anomalie concettuali evidenti, difficoltà nell'apprendimento, nelle abilità scolastiche e nel concetto di tempo e denaro.

Ambito sociale: l'individuo è immaturo nelle interazioni sociali, può avere difficoltà nel controllare stati emozionali.

Ambito pratico: l'individuo può funzionare in maniera adeguata all'età per quanto concerne la cura personale, ma non nelle attività della vita quotidiana.

DISABILITÀ INTELLETTIVA MODERATA

Ambito concettuale: le abilità concettuali dell'individuo restano marcatamente inferiori a quelle dei coetanei.

Ambito sociale: l'individuo mostra marcate differenze rispetto ai coetanei nel comportamento sociale e comunicativo durante lo sviluppo.

Ambito pratico: l'individuo può prendersi cura dei propri bisogni personali e raggiungere la partecipazione a tutte le attività domestiche sebbene siano richiesti un ampio periodo d'insegnamento e molto tempo.

DISABILITÀ INTELLETTIVA GRAVE

Ambito concettuale: l'individuo in genere comprende poco il linguaggio scritto e i concetti che comportano numeri, quantità, tempo e denaro, necessitando di un sostegno esteso durante tutta la vita.

Ambito sociale: il linguaggio parlato è abbastanza limitato. Gli individui comprendono i discorsi semplici e la comunicazione gestuale.

Ambito pratico: l'individuo richiede un sostegno in tutte le attività della vita quotidiana.

DISABILITÀ INTELLETTIVA ESTREMA

Ambito concettuale: le abilità concettuali in genere si riferiscono al mondo fisico piuttosto che ai processi simbolici.

Ambito sociale: l'individuo può comprendere alcuni gesti e istruzioni semplici ed esprime i propri desideri e le proprie emozioni principalmente attraverso la comunicazione non verbale, non simbolica. Ambito pratico: l'individuo è dipendente dagli altri in ogni aspetto della cura fisica, della salute e della sicurezza quotidiane. Compromissioni fisiche e sensoriali concomitanti rappresentano ostacoli frequenti alla partecipazione ad attività domestiche, ricreative e professionali. [1] [2]

Eziologia

La disabilità intellettiva (ID) rappresenta, nei paesi sviluppati, la causa più frequente di grave handicap nei bambini. Si stima che la sua prevalenza a livello mondiale sia dell'1% e la sua incidenza nei bambini sia dell'1-2%, ma questo valore tende ad aumentare nelle nazioni in via di sviluppo, sia a causa di fattori ambientali, quali la malnutrizione e le precarie condizioni di assistenza sanitaria, sia per l'azione di fattori eziologici a rilevanza genetica, come la consanguineità parentale.

Entrambi questi fattori, considerati responsabili della ID, possono agire sullo sviluppo e sul funzionamento del sistema nervoso centrale in età prenatale, perinatale e postnatale. I fattori genetici incidono in circa il 30% dei ritardi moderati, mentre i fattori ambientali (malnutrizione durante la gravidanza, neurotossicità ambientale, nascita prematura, ischemia cerebrale perinatale, sindrome feto-alcolica FAS, infezioni pre- o postnatali) giocano un ruolo importante nella patogenesi della disabilità intellettiva lieve. [3] [4] [5]

Cause genetiche

Le cause genetiche, responsabili del 25-50% dei casi di ID grave, possono essere suddivise in :

- riarrangiamenti cromosomici, che determinano essenzialmente alterazioni deleterie del dosaggio genico e sono responsabili del 25% dei casi

(considerando sia le anomalie cromosomiche citogeneticamente visibili che le anomalie strutturali submicroscopiche);

- alterata regolazione dell'imprinting di specifici geni o di regioni genomiche;
- disfunzione di singoli geni importanti per lo sviluppo delle funzioni cognitive.

Convenzionalmente, le forme ereditarie di disabilità intellettiva vengono suddivise in due classi principali: ID sindromica, caratterizzata dall'associazione con altre manifestazioni cliniche e ID non sindromica o non specifica, in cui il deficit cognitivo rappresenta l'unica manifestazione della patologia. Sebbene questa distinzione sia molto utile per scopi clinici, recenti studi stanno indicando che il confine tra le forme sindromiche e non sindromiche sta scomparendo, e alcune forme non sindromiche possono, successivamente, essere riconosciute come forme sindromiche. Infatti, in diversi casi, distinte mutazioni sullo stesso gene possono determinare l'uno o l'altro tipo di disabilità intellettiva, a seconda del loro effetto sull'attività della proteina (es. perdita completa o parziale della funzione), del pattern di inattivazione dei geni X-linked nelle femmine affette o del background genetico [6].

La disabilità intellettiva ha una penetranza ed un'espressività variabili. A causa della sua complessità genetica, ancora poco si sa sui fattori genetici di predisposizione alla ID.

Per le cause monogeniche, le forme di disabilità intellettiva date da mutazioni recessive sui geni autosomici (ARID) possono essere responsabili per circa

10-20% dei casi, mentre forme autosomiche dominanti sono state trovate solo su un ridotto numero di geni; sul cromosoma X sono stati trovati numerosi geni, responsabili per il 10-12% dei casi. Nel complesso sono stati individuati oltre 700 geni tra X-linked, autosomici recessivi e autosomico dominanti, che possono essere utilizzati per la diagnosi molecolare sia di ID sindromiche che non sindromiche. [5] [7]

Disabilità intellettiva X-Linked (XLID)

Le forme di disabilità intellettiva legate all'X sono facilmente identificabili grazie al loro caratteristico modello di ereditarietà, in cui il fenotipo recessivo si manifesta nei maschi emizigoti. La prevalenza nella popolazione è mantenuta elevata dalla presenza di femmine portatrici sane, la cui fitness riproduttiva è conservata.

Osservazioni cliniche e studi di linkage in famiglie hanno rivelato che la disabilità intellettiva X-linked (XLID) è una condizione molto eterogenea. Uno dei primi geni identificati come coinvolti in XLID è *FMRI* (MIM 309550), il cui silenziamento trascrizionale mediato da un'espansione instabile delle triplette CGG in 5'UTR porta alla Sindrome dell'X-fragile (MIM 300624); questa rappresenta circa l'1-2% di tutti i casi di ID, e rimane ancora la più comune causa XLID. Le disabilità intellettive X-linked sono generalmente suddivise in forme sindromiche e forme non sindromiche a seconda che si evidenzino o no ulteriori anomalie in aggiunta alla disabilità intellettiva. Il numero dei geni responsabili di XLID negli anni è cresciuto esponenzialmente

da soli 11 nel 1992 agli oltre 100 identificati fino ad ora (Fig.1). Ognuno di questi geni singolarmente non spiega più dello 0,1% di ID, ma tutti insieme spiegano più del 10% della disabilità intellettiva nei maschi. Circa il 50% di questi geni sembrano associati a forme non-sindromiche o paucisindromiche; l'altra metà associa la disabilità intellettiva ad altri fenotipi (per esempio, ID associata a manifestazioni cliniche o metaboliche ben definite), questo facilita l'identificazione di mutazioni causative sullo stesso gene perché probandi non correlati con fenotipi analoghi potranno essere correlati più facilmente. Tuttavia, la distinzione tra XLID sindromica e XLID non sindromica viene offuscata dalla presenza di mutazioni "mild", come in *RPS6KA3* (Sindrome di Coffin Lowry – MIM 303600) o in *ARX* (Sindrome da ritardo mentale correlato all'ARX MIM 300419), e/o di specifici segni clinici a penetranza incompleta in alcuni individui portatori di mutazioni in geni associati con XLID sindromica. Vari approcci sono stati sviluppati per l'identificazione di geni e di mutazioni responsabili di XLID :

- (1) clonaggio posizionale basato sui riarrangiamenti cromosomici o sulle copy number variation (CNV) ,
- (2) screening dei geni individuati tramite l'analisi di linkage in famiglie con XLID,
- (3) sequenziamento diretto dei geni candidati con una funzione o un pattern di espressione specifico che possano spiegare i segni clinici o metabolici dei soggetti affetti,

(4) Next Generation Sequencing che consente lo screening di mutazioni su ampi pannelli di geni, sull'esoma o sull'intero genoma.

I progressi nelle tecnologie genomiche possono notevolmente accelerare l'analisi dei contributi genetici alla malattia. La tecnica di sequenziamento massivo parallelo sull'intero esoma permette una rapida valutazione delle mutazioni che causano la malattia umana. La convalida di varianti potenzialmente dannose in un nuovo gene associato con XLID richiede studi funzionali e/o analisi genetiche, soprattutto quando l'identificazione si basa sulla presenza di queste mutazioni in pochissime famiglie o in casi singoli. La validazione genetica di una mutazione di solito comprende l'analisi della cosegregazione della mutazione nella famiglia del probando unita ai test che confermino l'assenza della mutazione in una popolazione di controllo.

Gli studi funzionali valutano direttamente l'impatto della mutazione a livello della proteina, della cellula, dell'organismo o delle connessioni funzionali coinvolte nella malattia (ad esempio il coinvolgimento della organizzazione o della plasticità sinaptica).

La maggior parte delle proteine codificate da questi geni è implicata, direttamente o attraverso la loro funzione regolativa, nello sviluppo delle cellule neuronali o nella comunicazione sinaptica tra queste cellule. Queste proteine influenzano l'apprendimento e/o la memoria. Nei pazienti affetti da XLID, la funzione e lo sviluppo del cervello e/o la plasticità neuronale sono alterati. Inoltre, in alcune famiglie affette da XLID, sono state identificate mutazioni geniche specifiche. Tuttavia il gene-malattia non è ancora stato

individuato nella metà di queste famiglie. L'identificazione di questi geni permette oggi di effettuare studi clinici basati sull'approccio gene per gene. L'approccio multidisciplinare basato su strumenti neurologici, psicologici e psichiatrici e sull'imaging ad alta definizione ha permesso di dimostrare la presenza di alcuni segni caratteristici, come una presunta anomalia morfologica del verme cerebellare (gene *OPHN1* - MIM 300127) o disturbi molto specifici del movimento delle mani (gene *ARX* - MIM 300383). In questo modo, alcune forme in precedenza classificate come "non specifiche" hanno dimostrato con il tempo di avere una specificità gene-dipendente.

E' possibile che in futuro si possa identificare un fenotipo specifico per ogni gene implicato nell' XLID, tale da consentire l'implementazione di un protocollo di analisi economico e efficiente destinato ai maschi affetti da disabilità intellettiva. L'individuazione dei diversi segni potrebbe orientare la diagnosi verso una forma o un'altra di XLID e dimostrare la trasmissione attraverso il cromosoma X, anche se ne è affetto un solo soggetto.[5] [8]

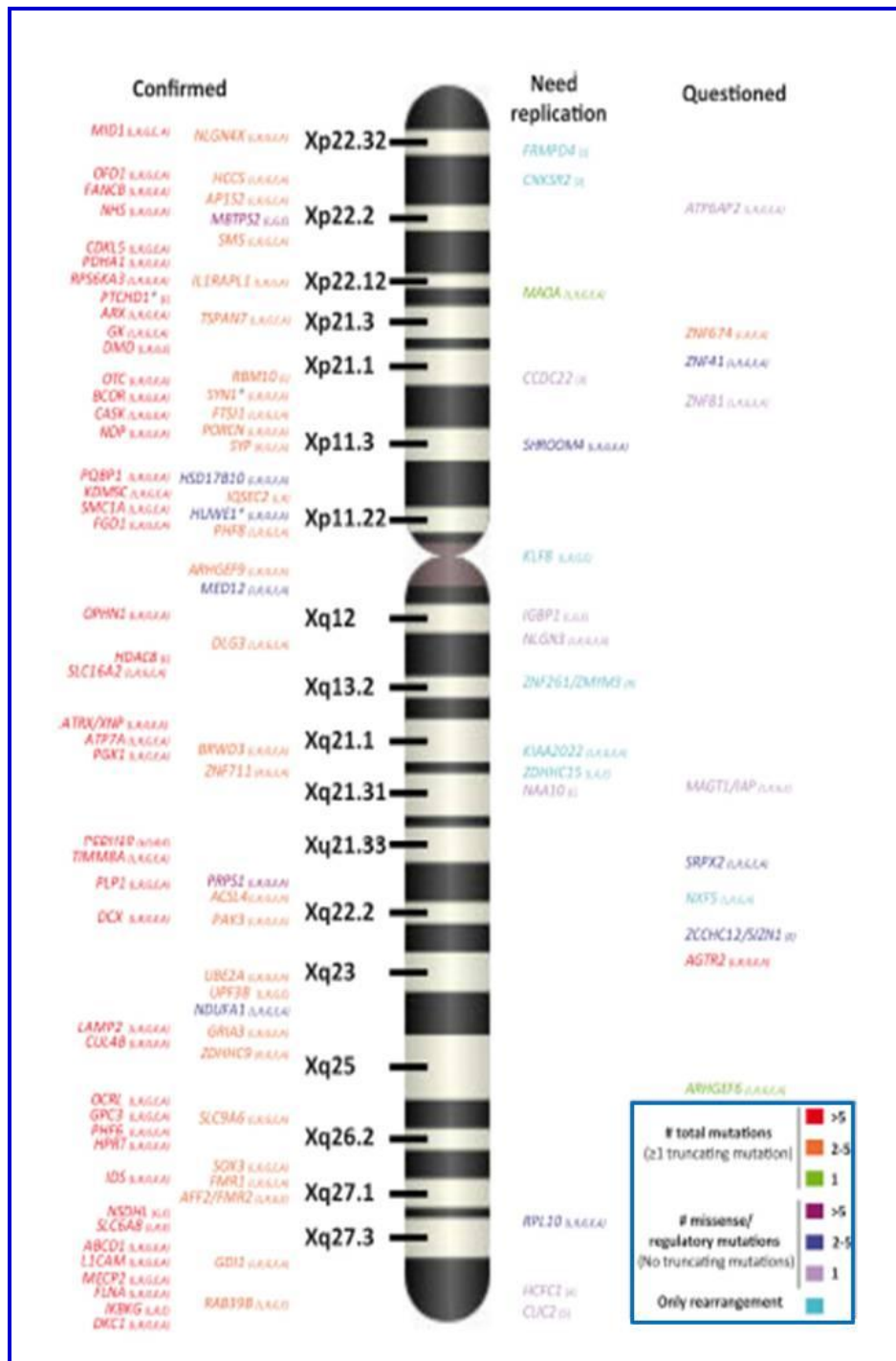


Figura 1 **Rappresentazione nel cromosoma X dei 106 geni le cui mutazioni sono state riportate responsabili di XLID e classificazione secondo il tipo e numero di mutazioni riportate in OMIM** Sul lato sinistro del cromosoma sono indicati i geni per i quali l'implicazione con ID è confermata, sul lato destro quelli per cui è dubbia o deve essere confermata.[8]

OBIEITIVO

L'obiettivo di questo studio è la definizione del difetto genetico responsabile della disabilità intellettiva legata al cromosoma X in una famiglia sarda, attraverso l'utilizzo della Next Generation Sequencing.

Ottenere una diagnosi finale per la XLID è impegnativo. Tuttavia, l'uso del sequenziamento massivo parallelo con sequenziatori di ultima generazione ha reso questo compito più facile. Questa strategia permette più ampie correlazioni genotipo-fenotipo. Ora, infatti, è possibile determinare se geni specifici per un determinato disturbo possano essere responsabili anche di altre caratteristiche cliniche.[9]

MATERIALI e
METODI

Famiglia

La famiglia di origine sarda, è composta da 40 soggetti distribuiti in cinque generazioni. In questa famiglia 7 maschi sono affetti da disabilità intellettiva mentre tutte le femmine non sono affette. (Fig.2)

Tutti gli affetti sono vivi tranne uno, deceduto all'età di 10 anni, ed il loro fenotipo è simile ed è caratterizzato da disabilità intellettiva, dismorfismi craniofaciali, epilessia e leucomalacia.

L'analisi dell'albero genealogico suggerisce una trasmissione recessiva del tratto legato all' X.

Sono stati analizzati 15 soggetti, 6 dei quali maschi affetti da disabilità intellettiva X-linked (XLID).

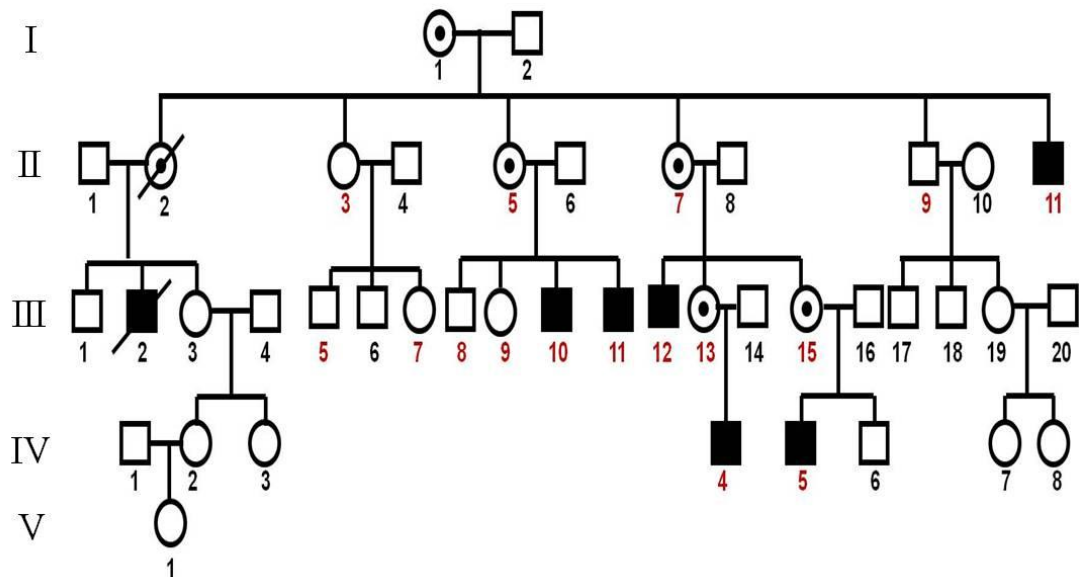


Figura 2 **Albero genealogico famiglia in studio**, i numeri in rosso indicano i soggetti che rientrano nello studio presentato.

Studi preliminari

Nei soggetti affetti è stata esclusa, innanzitutto, la sindrome dell'X fragile che è il primo test diagnostico da effettuare nei casi di XLID. Inoltre, poiché le delezioni/duplicazioni di numerosi geni e delle regioni subtelomeriche del cromosoma X possono essere causa di XLID, tali difetti sono stati esclusi effettuando l'analisi MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) utilizzando il kit SALSA probemix P106 MRX che include probes per 14 differenti geni XLID: PQBP1, TM4SF2, ARX, IL1RAPL1, RPS6KA3, OPHN1, FAFL4, DCX, PAK3, ARHGEF6, FID1, FID2, GDI1, SLC6A8, e i kit SALSA MLPA P036-E1 e SALSA MLPA P070-B1 che contengono una probe per ogni regione subtelomerica. L'analisi di linkage effettuata utilizzando l'ABI-PRISM Linkage Mapping set (Perkin-Elmer) costituito da 7 marcatori localizzati sul braccio corto (Xp) e 11 sul braccio lungo (Xq), che definiscono una mappa con una risoluzione di circa 10 Mb dell'intero cromosoma X ha mostrato un valore di Lod Score di 2.53 per il marcatore DXS8051 in Xp22.31 a circa 9,4 Mb dall'estremità telomerica del braccio corto. La ricerca di mutazioni nei geni *NLGN4X*, *VCXA*, *MID1*, *CLCN4*, presenti in questa regione e con caratteristiche associate a disabilità intellettiva, tramite sequenziamento diretto (ABIPrism 3130) ha dato esito negativo.[10]

Studio attuale

Lo studio della famiglia in esame è proseguito con lo screening di mutazioni nel cromosoma X effettuato grazie al sequenziamento massivo in parallelo o next generation sequencing dell'esoma.

Next generation sequencing (NGS)

La tecnologia di NGS utilizzata per questo studio è quella proposta da Illumina che si basa sull'utilizzo di terminatori fluorescenti reversibili. L'amplificazione clonale avviene attraverso la metodica detta "bridge PCR". Una prima reazione permette, tramite una reazione di ligasi, di connettere ai frammenti da amplificare delle sequenze di riconoscimento universali dette "adattatori" che successivamente vengono distribuiti su un supporto rigido (flow cell) a cui si legano per complementarità gli adattatori posizionati sul supporto. Ciascun frammento viene clonato attraverso una reazione di "bridge PCR" (Fig.3) che dà luogo alla costituzione di microaree nelle quali sono presenti i frammenti clonati da un unico template di partenza.

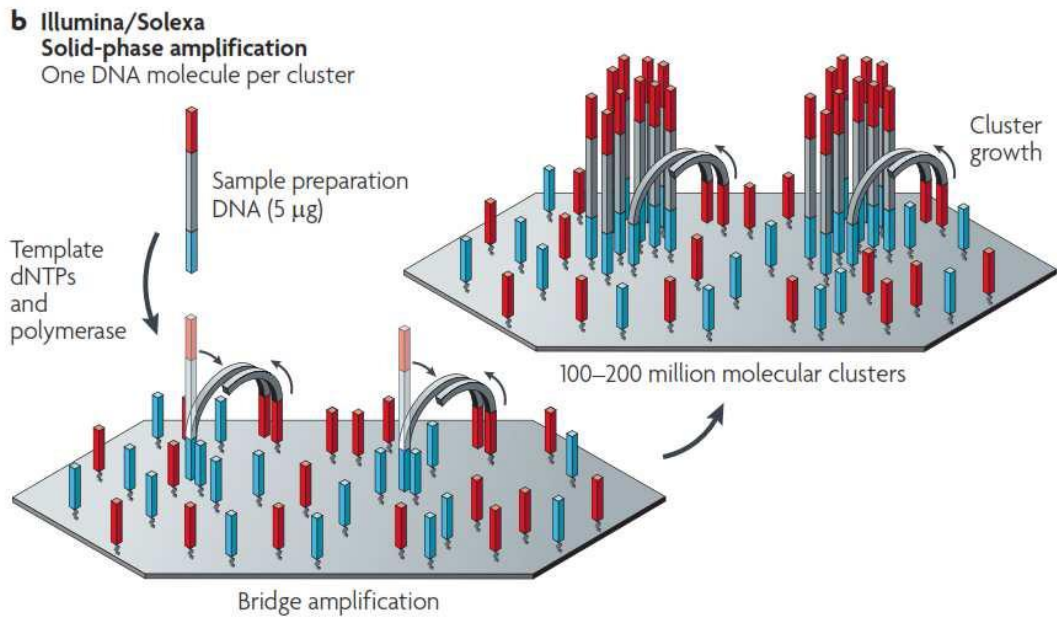


Figura 3 **Amplificazione clonale attraverso Bridge PCR.** [11]

Il sequenziamento avviene attraverso l'utilizzo di nucleotidi con gruppi terminatori fluorescenti (Fig. 4) reversibili: ad ogni ciclo del processo di sequenziamento. Una miscela contenente i terminatori e una DNA polimerasi modificata permette l'incorporazione di uno dei dNTP fluorescenti, la cui successiva emissione luminosa viene rilevata e convertita dal sistema in immagini della superficie della flow cell. Successivamente il rilascio dei gruppi terminatori consente la prosecuzione del processo ciclo dopo ciclo.

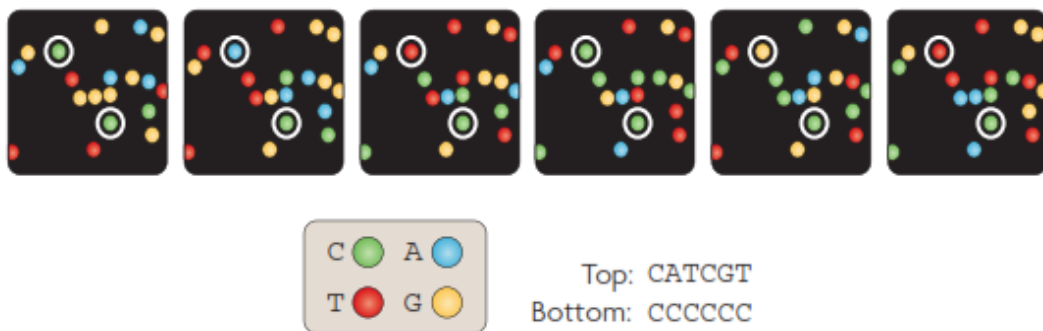


Figura 4: **Incorporazione dei dNTP fluoriscinati e lettura della sequenza.** [11]

Il sistema proposto da Illumina è ad oggi il più diffuso tra le tecnologie NGS; questo grazie, sia all'elevata accuratezza dei dati prodotti sia alla disponibilità commerciale di sequenziatori con caratteristiche adattabili alle molteplici esigenze dei laboratori di ricerca.[11]

Estrazione del DNA

Il DNA genomico è stato estratto dai linfociti di campioni di sangue periferico utilizzando metodi standard.

Studio NGS

Il targeted Next generation Sequencing è stato effettuato presso la next generation sequencing core del CRS4 (Centro di Ricerca, Sviluppo e Studi Superiori in Sardegna, situato nel Parco Scientifico e Tecnologico (Polaris), Loc. Piscina Manna, Edificio 1 - 09010 Pula (CA)) su tre maschi affetti II-11, III-12 e IV-4 e una femmina portatrice II-7. (Fig.5)

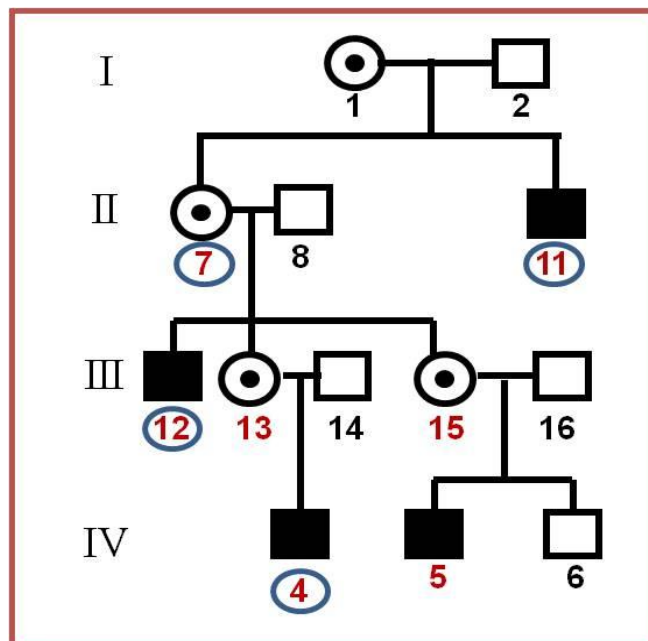


Figura 5 Dettaglio albero genealogico famiglia in esame
cerchiati di blu i soggetti studiati con NGS

Whole-exome sequencing workflow

Il DNA genomico è stato frammentato mediante tagmentazione e le librerie di sequenziamento del genoma sono state preparate utilizzando il NextEra Rapid Capture Expanded Kit exome (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) secondo le istruzioni del produttore (Fig.6). Questo kit fornisce la preparazione della libreria e l'arricchimento partendo anche da basse concentrazioni di DNA (circa 50ng) e include 62 Mb di regioni genomiche, inclusi esoni, regioni non tradotte (UTRs) e miRNA. Il kit include >340.000 sonde 95mer per arricchire 201.121 esoni che coprono 20.794 geni. Il controllo di qualità della tagmentazione e delle librerie post- amplificazione è stato valutato mediante chip DNA-1000 tramite Bioanalyzer 2100 (Agilent) e quantificazione fluorimetrica utilizzando Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen). Le librerie di sequenziamento sono state caricate su Flow cell v3 con un approccio Paired Ends mediante la CBOT Illumina e sequenziate per 101+101 cicli su HiSeq 2000 utilizzando il kit SBS chimica v3 (Illumina).

Questo approccio ha permesso di raggiungere una copertura media di 80x sui 62MB delle regioni target con più del 95 % delle regioni totali coperte più di 10x. La generazione del dato è stata effettuata utilizzando una pipeline di analisi implementato in Orione. [12]

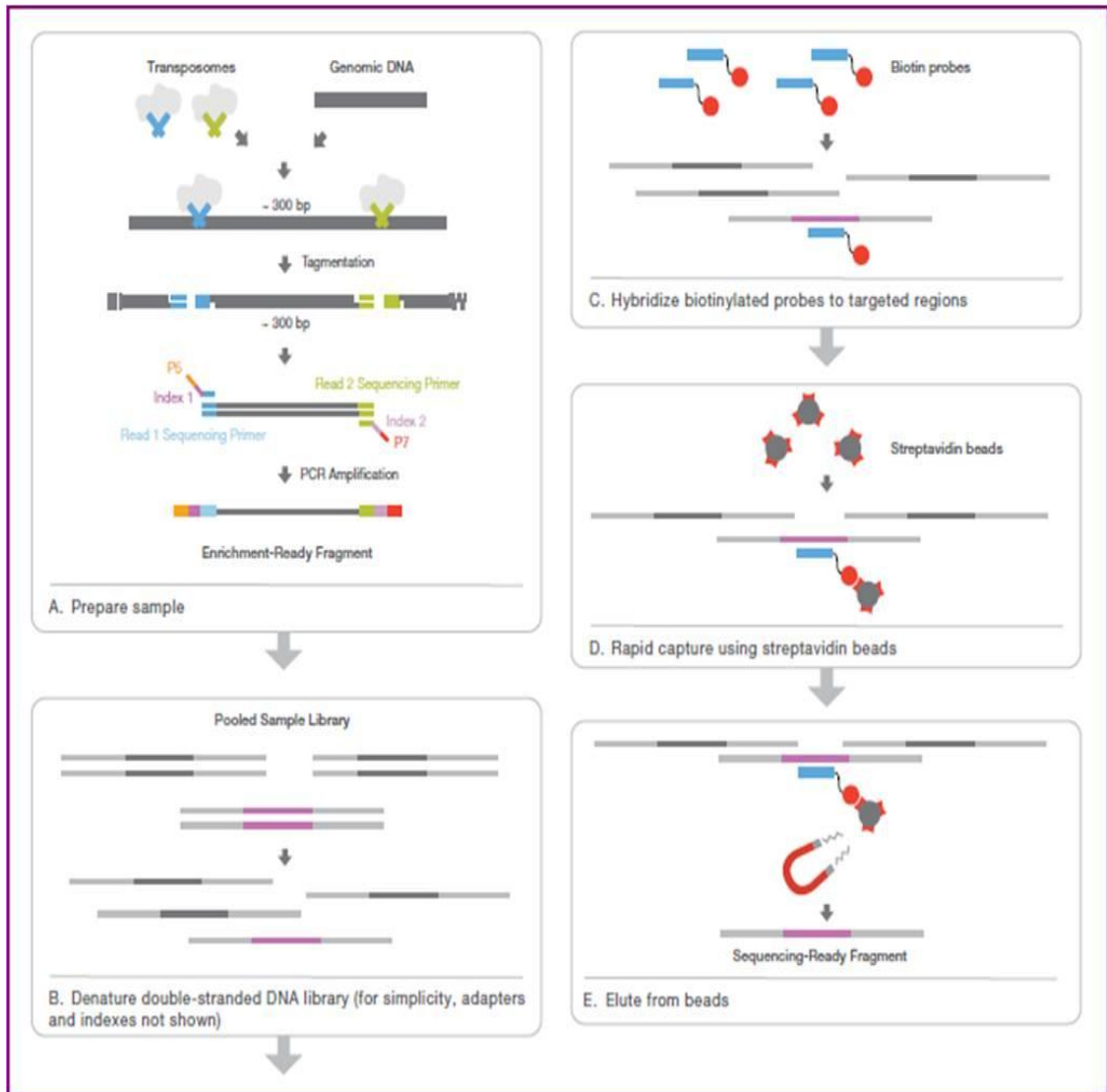


Figura 6 Integrated Nextera Exome Enrichment Workflow

Analisi delle sequenze e annotazione delle varianti

I dati riguardanti il cromosoma X derivanti dai risultati del sequenziamento dell'esoma dei campioni sono stati mappati utilizzando come genoma di riferimento hg19 - GRCh37. Il pacchetto software utilizzato per la mappatura e l'allineamento delle sequenze è BWA-MEM (Burrows-Wheeler Aligner) (0.7.9a) generalmente utilizzato per le query di alta qualità, in quanto è più veloce e più accurato; il rilevamento dei duplicati di PCR è stato effettuato con il software Picard MarkDuplicates. Per l'individuazione delle singole variazioni nucleotidiche e delle inserzioni/delezioni è stato utilizzato GATK Unified Genotyper.

Le varianti sono state analizzate utilizzando i software Annotator GATK Variante e KggSeq che annotano:

- la categoria funzionale secondo la trascrizione nella relativa regione (5' UTR, 3' UTR, intronic, synonymous coding, non-synonymous coding, splice site, stop gain and stop loss);
- la frequenza dell'allele minore (MAF) ricavata da database come 1.000 genomi, dbSNP e ESP6500;
- la patogenicità della variazione valutata utilizzando strumenti di previsione, come SIFT, Polyphen 2, LRT, MutationTaster, PhyloP e CADD.

Interpretazione biologica e identificazione degli alleli patogenetici

Le varianti identificate sono state selezionate in base ai seguenti criteri:

- Informazioni genealogiche e modalità di trasmissione (X-linked). In alcuni casi, data la consanguineità, sono state esaminate le varianti di mappatura nelle regioni in omozigosi identificate con H3M2 & PLINK, nei geni candidati. Nel caso di malattie rare ad ereditarietà mendeliana, il presupposto utilizzato è stato quello di selezionare varianti causali a penetranza completa e con una frequenza dell'allele minore (MAF) <5%. [13]
- Tipologia delle varianti. Ci si è concentrati sulla ricerca di varianti non-sinonime (missenso, nonsense, difetti splice-site, indels frameshift), più frequentemente responsabili di gravi disturbi mendeliani.
- Livello di conoscenza. La *disease network analysis* aggiunge ulteriori informazioni ai dati di sequenziamento. Infatti si prevede che il gene responsabile abbia un ruolo in una via biologica e / o nell'interazione con i geni o le proteine che sono noti causare un fenotipo simile a quello dei pazienti in esame facilitando così la chiarificazione del loro ruolo putativo nella patogenesi della malattia.

Sequenziamento con metodo Sanger

Ogni variante di sequenza identificata come potenzialmente patogenetica durante la fase di screening è stata convalidata con metodo Sanger e

strumento ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Life Technologies) utilizzando i Kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Life Technologies), AmPure XP e CleanSeq (Agencourt; Beckman) su piattaforma robotizzata Biomek NX (Beckman).

RVIS

RVIS (Residual Validation Intolerance Score) è un punteggio basato sui dati di frequenza allelica presenti nel database NHLBI-ESP6500 che raccoglie i dati di 6500 esomi effettuati su una popolazione sana.

Il punteggio di RVIS (genic-intolerance.org) viene calcolato per classificare i geni in base alla presenza di varianti genetiche funzionali più o meno comuni in relazione all'aspettativa rispetto al genoma di varianti neutre nel gene. Un punteggio positivo indica che le varianti funzionali del gene sono più comuni ed il gene sarà definito "tollerante", mentre un punteggio negativo indica che le varianti funzionali del gene sono meno comuni ed il gene sarà definito "intollerante". Per esempio, il gene ATP1A3 che ha un punteggio RVIS di -1.53 e un percentile di 3,37%, il che significa che è tra il 3,37% dei geni umani più intolleranti (EVS-v.0.0.14, 2012).

RISULTATI

Next Generation Sequencing

Lo studio del cromosoma X in NGS su una selezione di 4 campioni (II-7,

II-11, III-12 e IV-4) appartenenti alla famiglia in esame ha portato alla individuazione di 6 varianti probabilmente patogenetiche localizzate su altrettanti geni. Nessuno di questi geni mappa nella regione Xp22.31, che all'analisi di linkage, ha mostrato un LOD score di 2.53.

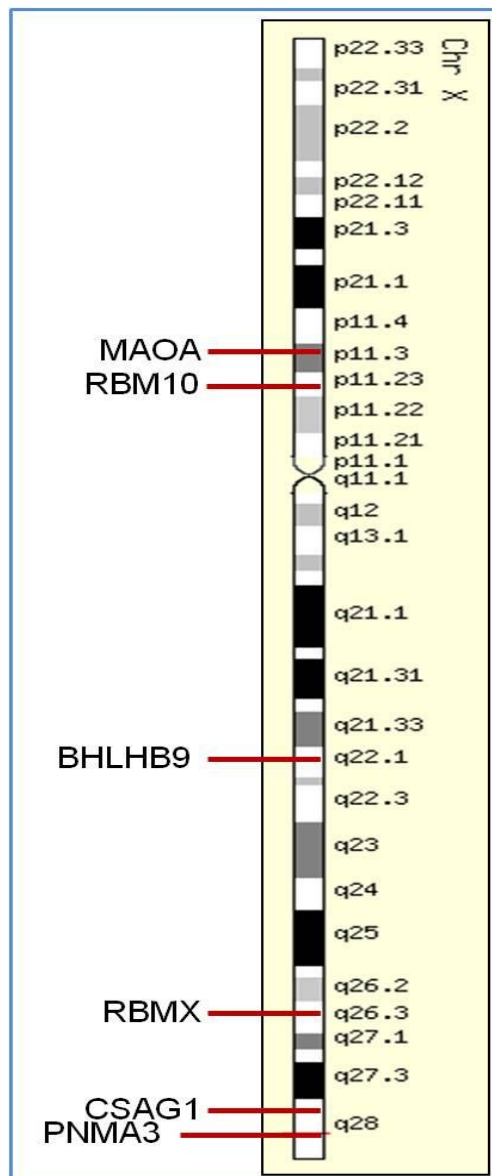


Figura 7 Disposizione dei geni identificati con NGS sul cromosoma X

La selezione di queste varianti è stata effettuata applicando 2 differenti filtri necessari per individuare tra tutte le varianti trovate solo quelle che potrebbero essere di nostro interesse.

Filtro 1

- Varianti localizzate sul cromosoma X
- MAF < 0,05
- no UTR
- Stato emizigote nei maschi affetti
- Stato eterozigote nella femmina portatrice obbligata

Questo filtro ha portato alla selezione delle seguenti 5 varianti:

Gene	Posizione (hg19-GRCh37)	Ref/Alt	Variazione in NGS		rsID
<i>RBM10</i>	ChrX:47039372	G>A	c.995G>A p.Arg332Hys Esone 10	missenso	NA
<i>CSAG1</i>	ChrX:151909173	G>C	c.202G>C p.Val68Leu Esone 5	missenso	rs141987063
<i>BHLHB9</i>	ChrX:102004317	A>G	c.394A>G p.Ser132Gly Esone 4	missenso	rs2179675
<i>RBMX</i>	ChrX:135961586	TG/T-	c.-1-1delCA 5'UTR	frameshift	rs201673579
<i>PNMA3</i>	ChrX:152226749	C>T	c.1337C>T p.Ser446Leu Esone 2	missenso	NA

Tabella 1 Schematizzazione delle varianti trovate tramite NGS

RBM10

La variante missenso individuata sull'esone 10 del gene *RBM10* (Xp11.23) è una sostituzione nucleotidica in posizione c.995G>A che genera la sostituzione amminoacidica p.Arg332His. Il gene *RBM10* codifica per una proteina di legame dell'RNA coinvolta nella regolazione della trascrizione, nello splicing alternativo e nella stabilizzazione del messaggero. Mutazioni in *RBM10* sono associate con la sindrome di TARP e con il cancro del polmone e del pancreas.[14]

CSAG1

La variazione missenso individuata sul gene *CSAG1* (Xq28) è una sostituzione nucleotidica nell'esone 5 in posizione c.202G>C che genera la sostituzione amminoacidica p.Val68Leu. Il gene *CSAG1* è associato al condrosarcoma nelle linee cellulari di tipo 1 e 2, tra tumori primari e dei tessuti, l'espressione *CSAG1* è stata rilevata nel testicolo e nel sarcoma dei tessuti molli. Le linee cellulari che esprimono CSAG1 sono espresse anche negli antigeni associati a melanoma (MAGE). [15]

BHLHB9

La variazione missenso individuata sul gene *BHLHB9* (Xq22.1) è una sostituzione nucleotidica nell'esone 4 in posizione c.394A>G che genera la sostituzione amminoacidica p.Ser132Gly. Il gene *BHLHB9* codifica per una

proteina regolatoria della trascrizione (p60TRP) che interagisce con altre due proteine coinvolte nel trasporto nucleare (RANBP5) e nel signaling cellulare (PP2A). Questa proteina è coinvolta nella regolazione dell'invecchiamento e della sopravvivenza neuronale. Una ridotta espressione di p60TRP nell'ippocampo e nella corteccia parietale è stata riscontrata in pazienti affetti da Alzheimer. [16]

RBMX

La delezione individuata sul gene *RBMX* (Xq26.3) in posizione c.-1_1delCA è localizzata nella regione 5'UTR. Il gene *RBMX* è stato associato con una nuova sindrome XLID caratterizzata da lieve ritardo mentale e riconoscibile per i dimorfismi cranio facciali chiamata Sindrome di Shashi. Nei modelli animali si è visto che la ridotta espressione della proteina codificata dal gene *Rbmx* è responsabile di uno sviluppo cerebrale anormale. [17] [18]

PNMA3

La variazione missenso individuata sul gene *PNMA3* (Xq28) è una sostituzione nucleotidica nell'esone 2 in posizione c.1337C>T che genera la sostituzione amminoacidica p.Ser446Leu. Il gene *PNMA3* appartiene alla famiglia dei geni paraneoplastici "Ma" che codificano una serie di antigeni associati a disturbi paraneoplastici, il cui funzionamento non è ancora chiaro, ma i gravi effetti neurologici di espressione ectopica (espressione di un gene in

una sede non propria) nelle cellule tumorali indicano la loro importanza nel cervello. L'antigene paraneoplastico PNMA3 viene espresso nel cervello, nel testicolo e in numerosi altri tessuti sistemici. [19][20]

Il secondo filtro ha portato all'individuazione di una variante.

Filtro 2

- Varianti localizzate sul cromosoma X
- MAF < 0,05
- solo UTR
- Stato emizigote nei maschi affetti
- Stato eterozigote nella femmina portatrice obbligata
- no rs

Gene	Posizione (hg19-GRCh37)	Ref/Alt	Variazione in NGS	rsID
<i>MAOA</i>	ChrX:43603842	T/A	c.*82T>A 3'UTR	NA

Tabella 3 Schematizzazione della variante trovata tramite NGS

MAOA

Il gene *MAOA* (Xp11.3) mostra una sostituzione nucleotidica in posizione c.*82T>A in 3'UTR. Il gene *MAOA* codifica per la monoaminoossidasi A che viene espressa nella membrana mitocondriale esterna. La funzione di questa monoaminoossidasi è di ossidare preferenzialmente serotonina, dopamina, noradrenalina. Mutazioni nonsense in questo gene sono responsabili della

Sindrome di Brunner caratterizzata da disabilità intellettiva lieve e disturbi comportamentali di rilievo, mutazioni missenso sono associate anche ad autismo. [8]

Analisi delle mutazioni e sequenziamento Sanger

Le variazioni missenso sui geni *BHLHB9* e *CSAG1* sono descritte in emizigosi rispettivamente su HapMap e 1000 Genomi, e su ExAc e NHLBI. La sostituzione in 3'UTR nel gene *MAOA* è stata identificata, in emizigosi in un maschio ed in eterozigosi in una femmina, in 6600 esomi di controllo di cui 3500 sardi presenti in un database di controllo. La delezione nell'esone 2 del gene *RBMX* è stata individuata nella popolazione sarda di controllo.[30] Da questo si evince che le variazioni sui geni *BHLHB9*, *CSAG1*, *MAOA* e *RBMX* non possono essere considerate responsabili della disabilità intellettiva X-linked presente nella famiglia in esame.

Le variazioni individuate nei geni *RBM10* e *PNMA3* sono state confermate attraverso il sequenziamento con il metodo Sanger nel paziente affetto III-12 e in un campione di controllo. (Tab.4)

GENE	Variazione in NGS	Ensemble/UCSC Genome Browser	III-12	Controllo Normale
<i>RBM10</i>	c.995G>A p.Arg332His Esone 10 Missenso	NA	PRESENTE	ASSENTE
<i>PNMA3</i>	c.1337C>T p.Ser446Leu Esone 2 Missenso	NA	PRESENTE	ASSENTE

Tabella 4 Conferma variazioni in NGS su Sanger

Nei geni *PNMA3*, *RBM10* la variazione viene confermata nel paziente (III-12) e risulta assente nel controllo normale; pertanto la ricerca della variante viene estesa ai familiari. (Figg.11,12,13)

PNMA3

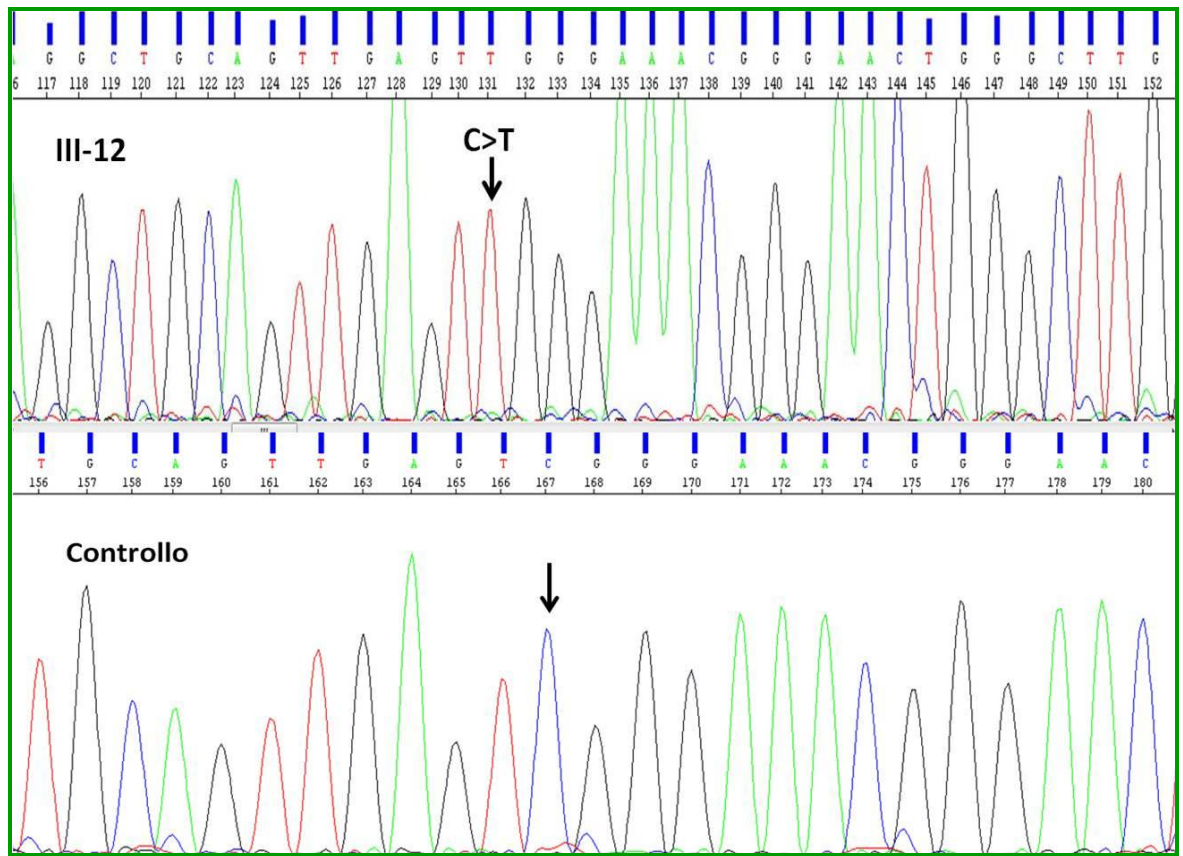


Figura 11 Cromatogramma variazione missenso sull'esone 2 del gene PNMA3

RBM10

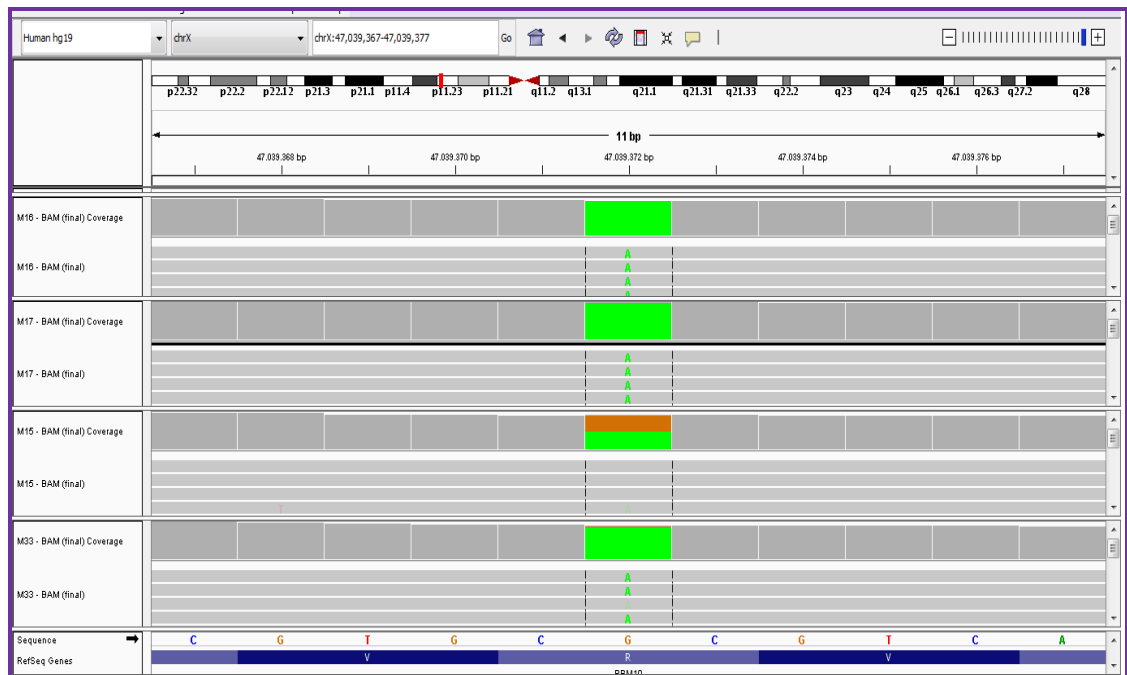


Figura 12 Risultato NGS per il gene RBM10

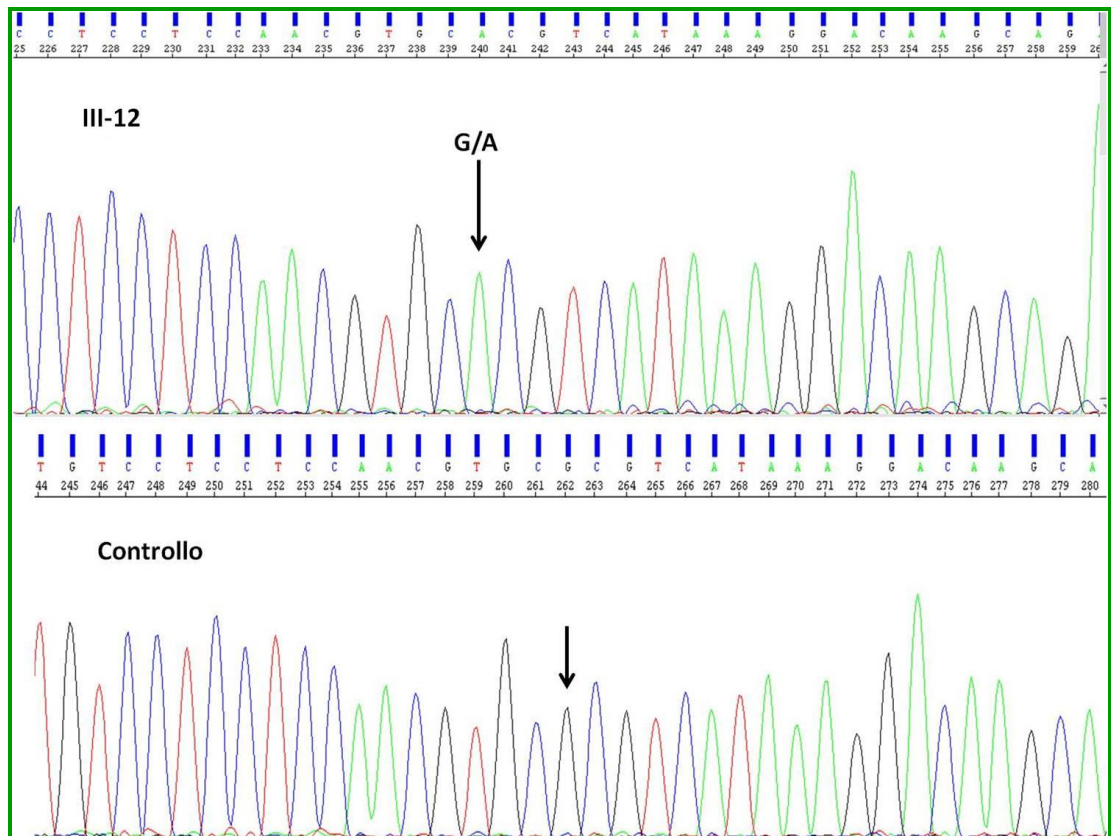


Figura 13 Cromatogramma variazione missenso sull'esone 10 del gene RBM10

PNMA3

La ricerca della variante c.1337C>T p.Ser446Leu nei familiari ha messo in evidenza la sua presenza nell'individuo sano II-9 e la sua assenza negli affetti III-10 e IV-5 e nella portatrice obbligata III-15. (Fig.14). Pertanto tale variante non segrega con la disabilità intellettiva X-linked.

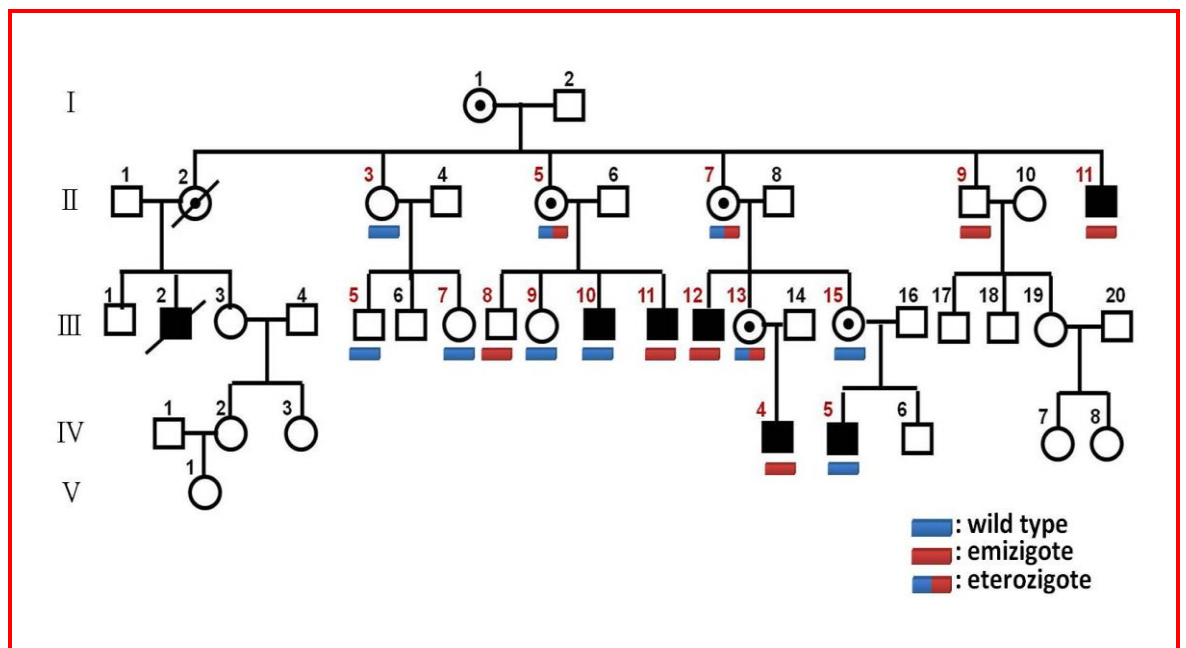


Figura 14 Albero genealogico famiglia in esame. Segregazione variazione missenso sul gene PNMA3

RBM10

La ricerca della variante c.995G>A p.Arg332His del gene *RBM10* nei familiari ha mostrato che tale variazione segrega perfettamente con la disabilità intellettiva X-linked (XLID) (Fig.15). Inoltre, questa sostituzione non è stata trovata né nei database internazionali (ExAc, NHLBI) né in un database costituito da 6600 individui adulti sani di cui 3500 sardi. [30]

Il punteggio RVIS di *RBM10* è risultato negativo con un valore di -0,67 corrispondente ad un percentile di 15,76%. Pertanto *RBM10* è definito “intollerante” alle mutazioni funzionali.

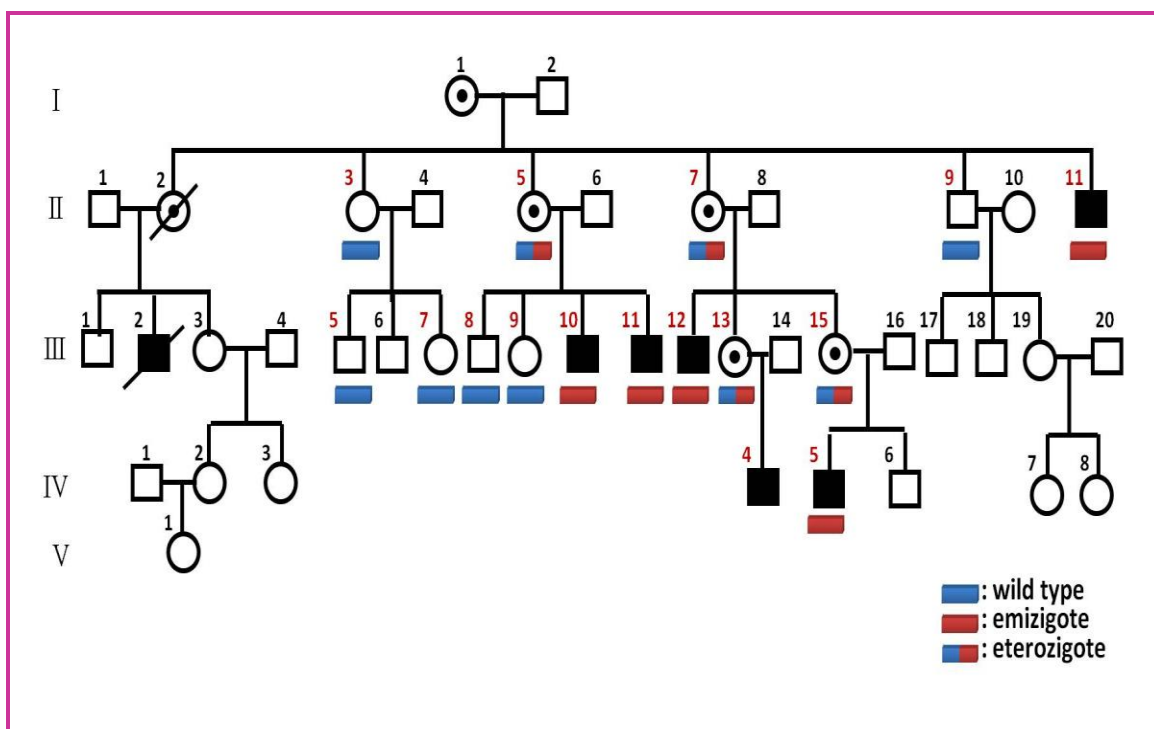
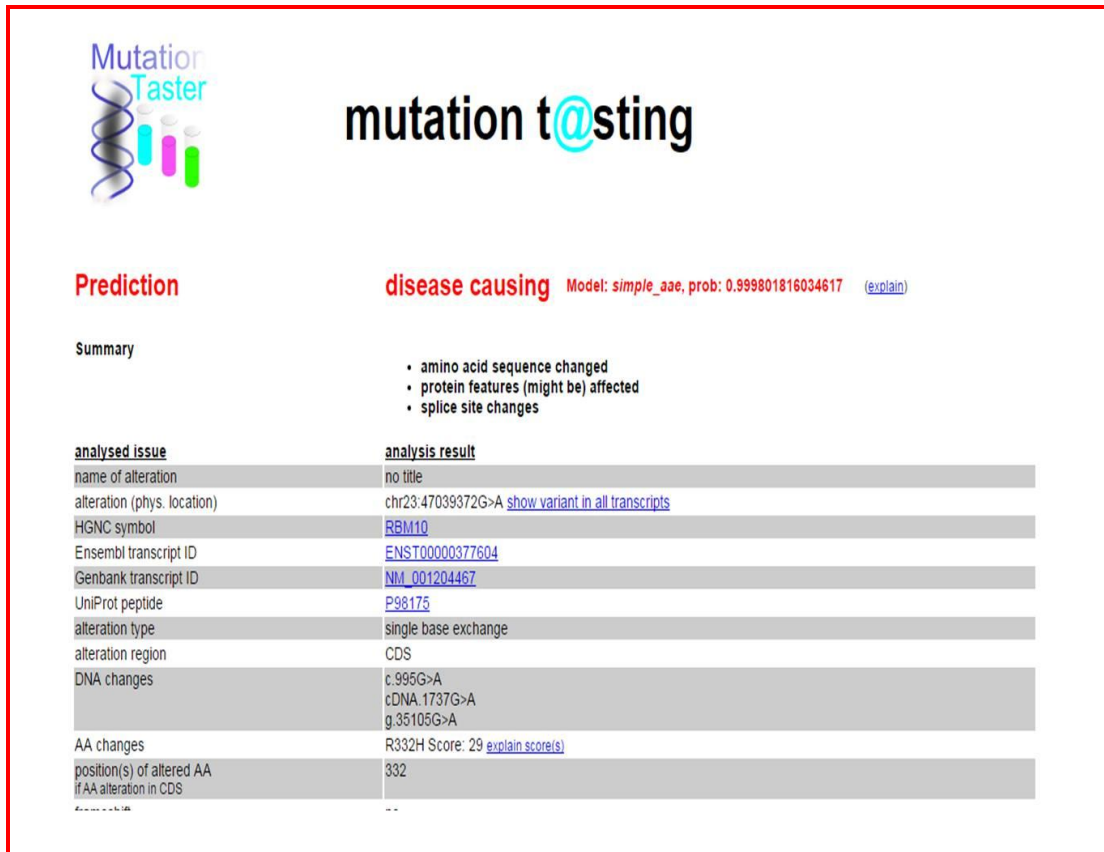


Figura 15 Albero genealogico famiglia in esame. Segregazione variazione missenso sul gene *RBM10*

Questa sostituzione viene, inoltre, predetta come patogenetica dal software Mutation Taster. (Fig.16)



Prediction **disease causing** Model: *simple_aae*, prob: 0.999801816034617 [\(explain\)](#)

Summary

- amino acid sequence changed
- protein features (might be) affected
- splice site changes

analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr23:47039372G>A show variant in all transcripts
HGNC symbol	RBM10
Ensembl transcript ID	ENST00000377604
Genbank transcript ID	NM_001204467
UniProt peptide	P98175
alteration type	single base exchange
alteration region	CDS
DNA changes	c.995G>A cDNA.1737G>A g.35105G>A
AA changes	R332H Score: 29 explain score(s)
position(s) of altered AA if AA alteration in CDS	332 --

Figura 16 Risultato software Mutation Taster

DISCUSSIONE

La variante del cromosoma X, presente in emizigosi nei maschi affetti da XLID, in eterozigosi nelle femmine portatrici obbligate e assente nei maschi sani presenti all'interno della famiglia, è situata sul gene *RBM10* appartenente alla famiglia dei geni *RNA binding motif* (RBM).

Si tratta di una variante missenso (c.995G>A p.Arg332His) localizzata nell'esone 10 del gene *RBM10* (ENST00000377604) situato nel braccio corto del cromosoma X in posizione Xp11.23 e formato da 24 esoni. Alla famiglia dei geni *RNA binding motif* (RBM) appartengono numerosi geni, ma solo in alcuni sono state individuate mutazioni responsabili di patologie quali: disabilità intellettiva (MIM300238), causata da mutazioni in *RBMX* (MIM300199), cardiomiopatia dilatativa (MIM 613172), causata da mutazioni nel gene *RBM20* (MIM 613171) e Sindrome dell'X-Fragile (MIM300624) causata da mutazioni nel gene *FMR1* (MIM309550). [21][22].

Il gene *RBM10* codifica per diverse isoforme di pre-mRNA: la variante 1 (RBM10v1) che include l'esone 4 e codifica per una proteina di 930 aminoacidi (NM_005676, 23 esoni codificanti), la variante 2 (RBM10v2) che perde l'esone 4 per effetto dello splicing alternativo (AS) e codifica per una proteina di 852 aminoacidi (NM_152856, 22 esoni codificanti). Inoltre nel cervello e nei muscoli cardiaci e scheletrici del topo è stata identificata la variante 3 (RBM10v3) che codifica per una proteina di circa 17 kDa, un potenziale paralogo di una piccola isoforma umana di *RBM10* [23].

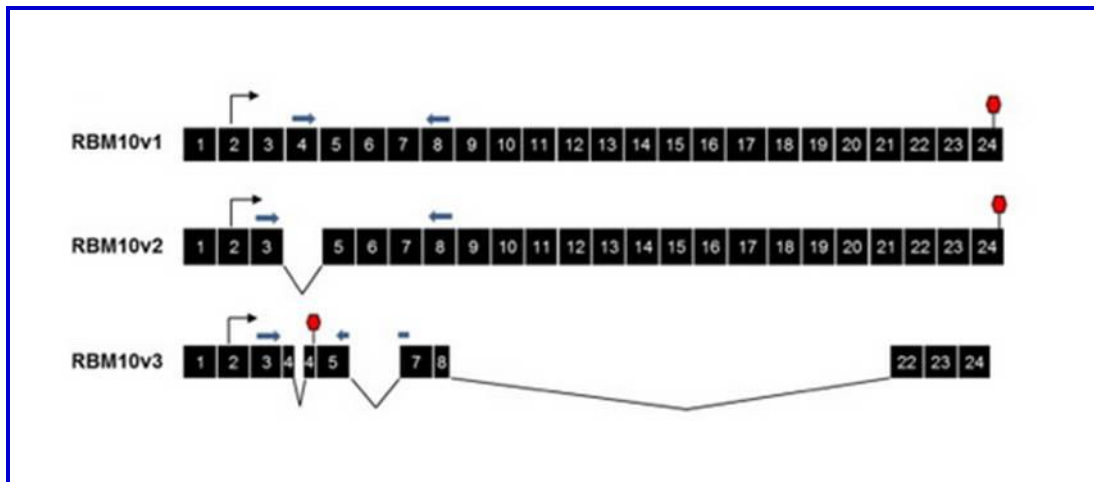


Figura 17 Rappresentazione schematica isoforme di RBM10

RBM10 contiene nella sua parte codificante 6 domini conservati: 2 RRM (RNA Recognition Motifs), 2 ZnF (Zinc finger), una sequenza OCRE (Octamer Repeat Sequence Motif) e una sequenza G-patch. (Fig.17) [24]

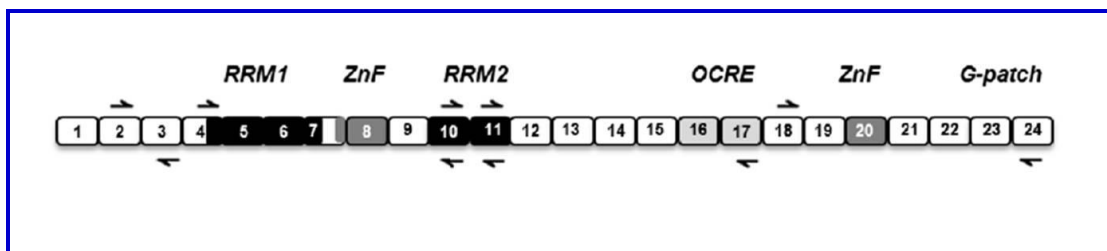


Figura17 Struttura gene *RBM10*

Inoltre studi di espressione ipotizzano che RBM10 possa svolgere, insieme ad altri geni della stessa famiglia (*RBMX*, *RBM3*), la funzione di modulatore dell'apoptosi. [25][26]

RBM10 è una *RNA binding protein* coinvolta nello splicing alternativo (AS). Questo è considerato il meccanismo più importante per la diversità proteomica negli eucarioti multicellulari. Lo splicing alternativo permette di produrre molteplici isoforme di mRNA da uno stesso pre-mRNA. L'AS può essere tessuto specifico, ma anche stadio di sviluppo specifico. L'RBM10 si lega in

prossimità dei siti di splicing (Fig.18) facilitando lo skipping degli esoni cassetta fiancheggiati da siti di splicing relativamente deboli.

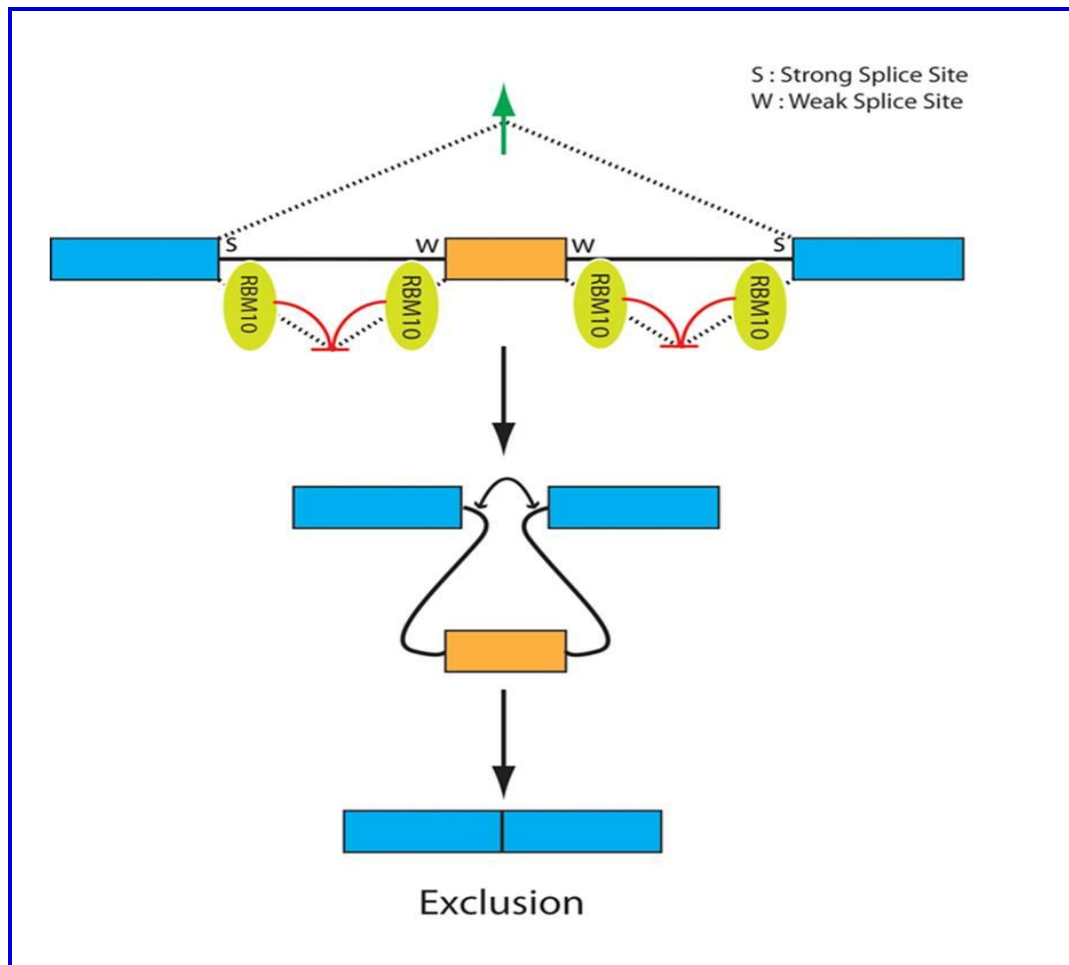


Figura 18 **RBM10** meccanismo di Splicing Alternativo

L'RBM10 è una proteina ubiquitaria con diversi livelli di espressione a seconda dei tessuti. Livelli elevati di espressione sono stati misurati anche nel feto. Studi effettuati sul topo hanno evidenziato livelli più alti di espressione nel cervello rispetto alla pelle, e nel cuore rispetto al muscolo scheletrico. [23]

La variante missenso individuata in questo studio (c.995G>A p.R332H) è localizzata nell'esone 10. Gli esoni 10 e 11 codificano per il dominio RRM2 altamente conservato. Studi recenti hanno dimostrato che

l'abilità di RBM10v1 di regolare lo splicing alternativo dipende, almeno in parte, da variazioni strutturali all'interno di RRM2. Infatti è stata dimostrata l'esistenza di una nuova isoforma della proteina caratterizzata dalla mancanza dell'ultima valina in 3' all'esone 10 (RBM10v1: V354del, RBM10v2: 277del). Questa isoforma permette l'inclusione dell'esone 11 del gene NUMB, che codifica per una proteina regolatoria della proliferazione cellulare, nell'm-RNA causando un incremento della proliferazione cellulare. Queste due isoforme sono entrambe in grado di legarsi al pre-mRNA di NUMB, ma l'isoforma senza la Valina ha una maggiore affinità. [24]

Mutazioni non senso e frameshift sul gene *RBM10* sono responsabili della Sindrome di Tarp una patologia con alta mortalità pre e post natale caratterizzata principalmente da: piedi torti equino-vari, difetto del setto atriale, sequenza di Pierre Robin, persistenza della vena cava superiore. I casi con una lunga sopravvivenza (max 12 anni) presentano ipoacusia neurosensoriale, atrofia ottica e disabilità visiva corticale associati ad incapacità comunicativa e grave disabilità intellettiva. Non sono state descritte mutazioni missenso in pazienti affetti da sindrome di Tarp. Mutazioni somatiche missenso e mutazioni troncanti sono state identificate in adenocarcinomi polmonari. [27][28]

La variante individuata nell'esone 10 di *RBM10* non è stata riportata nei seguenti database internazionali:

- NHLBI- Exome sequencing project la cui versione attuale (ESP6500SI-V2) contiene 6503 esomi di campioni prelevati da più coorti di esomi.
- ExAc (Exome Aggregation Consortium) il cui dataset si estende su 60.706 individui sequenziati non imparentati.

Inoltre, dato che in Sardegna si trovano varianti genetiche molto rare in altre popolazioni, è stato consultato un database costituito da 6600 individui adulti sani di cui 3500 sardi, anche in questo database la variante in studio non è stata individuata.[30]

L'RVIS del gene *RBM10* è risultato di -0,67 con un percentile di 15,76%. Questo valore suggerisce che *RBM10* è "intollerante" alle varianti geniche funzionali. Altri geni sicuramente coinvolti in XLID quali IQSEC2 (-0.52, percentile 21.2%) e CASK (-0.71, percentile 14.4%) hanno un punteggio simile a *RBM10*.

La regione Xp11.3-Xp11.23 sembra essere un hotspot per forme di XLID sindromiche e non sindromiche.[29]

CONCLUSIONE

Tutti questi dati supportano l'ipotesi che *RBM10* possa essere un gene candidato per XLID. Tuttavia non è escluso che la mutazione causativa della XLID nella famiglia in esame possa trovarsi in un altro gene che non è stato identificato con l'exome sequencing.

Studi funzionali e la ricerca di mutazioni di *RBM10* in altri pazienti sardi affetti da XLID potranno ulteriormente chiarire il ruolo di *RBM10* nella disabilità intellettiva legata al cromosoma X.

Una completa caratterizzazione dei difetti genetici che sono alla base della disabilità intellettiva consentirà una migliore comprensione della sua base biologica. Inoltre, contribuirà a migliorare la diagnosi clinica e permetterà l'individuazione delle portatrici, la diagnosi prenatale e la consulenza genetica.

BIBLIOGRAFIA

- [1] American Psychiatric Association (APA) *Diagnostic and Statistical Manual of disorders-fifth edition (DSM-5)* 2013
American Psychiatric Association *DSM-5. Manuale diagnostico e statistico dei disturbi mentali*, Ed. it. a cura di Massimo Biondi, Raffaello Cortina Editore, 2014.
- [2] A. Alexsovits *Valutazione e trattamento neuropsicomotorio del bambino con disabilità intellettiva: analisi del funzionamento esecutivo e delle prassie all'interno del profilo di sviluppo adattivo*. 2013/2014 Tratto da: www.neuropsicomotricista.it.
- [3] Chelly J, Khelfaoui M, Francis F, Chérif B, Bienvenu T. *Genetics and pathophysiology of mental retardation*. *Eur J Hum Genet*; 14(6):701-13. 2006.
- [4] Ropers HH. *Genetics of intellectual disability*. *Curr Opin Genet Dev*; 18(3):241-50.- 2008
- [5] Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA. *Genetic studies in intellectual disability and related disorders*. *Nat Rev Genet*. 2016 Jan;17(1):9-18.
- [6] Vaillend C, Poirier R, Laroche S. *Genes, plasticity and mental retardation*. *Behav Brain Res*; 192(1):88-105.- 2008.
- [7] Musante L, Ropers HH. *Genetics of recessive cognitive disorders*. *Trends Genet*. 2014 Jan;30(1):32-9. Review.
- [8] Piton A, Redin C, Mandel JL. *XLID-causing mutations and associated genes challenged in light of data from large-scale human exome sequencing*. *Am J Hum Genet*. 2013 Aug 8;93(2):368-83.
- [9] Yamamoto T, Shimojima K A novel MED12 mutation associated with non-specific X-linked intellectual disability *Human Genome Variation 2*, Article number: 15018 (2015)
- [10] Serrenti M. *Studio del ritardo mentale aspecifico legato al cromosoma X*. Tesi di dottorato (Ciclo23) 2011 - Terapia Pediatrica e Farmacologia dello Sviluppo settore Genetica Medica - Università degli Studi di Cagliari.
- [11] Metzker ML *Sequencing technologies - the next generation*. *Nat Rev Genet*. 2010 Jan;11(1):31-46 Review.
- [12] Cuccuru G, Orsini M, Pinna A, Sbardellati A, Soranzo N, Travaglione A, Uva P, Zanetti G, and Fotia G. *Orione, a web-based framework for NGS analysis in microbiology*. *Bioinformatics* 2014-30, 1928–1929.
- [13] Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J. *Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery*. *Nat Rev Genet*. 2011 Sep 27;12(11):745-55. Review.
- [14] Tessier SJ, Loisel JJ, McBain A, Pullen C, Koenderink BW, Roy JG, Sutherland LC. *Insight into the role of alternative splicing within the RBM10v1 exon 10 tandem donor site*. *BMC Res Notes*. 2015 Feb 19;8:46.

- [15] Lin C, Mak S, Meitner PA, Wolf JM, Bluman EM, Block JA, Terek RM. *Cancer/testis antigen CSAGE is concurrently expressed with MAGE in chondrosarcoma*. *Gene* 285: 269-278, 2002.
- [16] Heese K, Yamada T, Akatsu H, Yamamoto T, Kosaka K, Nagai Y, Sawada T. *Characterizing the new transcription regulator protein p60TRP*. *J. Cell. Biochem.* 91: 1030-1042, 2004.
- [17] Shashi V., Berry MN, Shoa, S., Sciote JJ, Goldstein D., Hart TC. *A unique form of mental retardation with a distinctive phenotype maps to Xq26-q27*. *Am. J. Hum. Genet.* 66: 1472 2000
- [18] Shashi V, Xie P, Schoch K, Goldstein DB, Howard TD, Berry MN, Schwartz CE, Cronin K, Sliwa S, Allen A, Need AC. *The RBMX gene as a candidate for the Shashi X-linked intellectual disability syndrome*. *Clin Genet.* 2015 Oct;88(4):386-90.
- [19] Rosenfeld MR, Eichen JG, Wade DF, Posner JB, Dalmau J. *Molecular and clinical diversity in paraneoplastic immunity to Ma proteins*. *Ann. Neurol.* 50: 339-348, 2001.
- [20] Wills NM, Moore B, Hammer A, Gesteland RF, Atkins JF. *A functional -1 ribosomal frameshift signal in the human paraneoplastic Ma3 gene*. *J Biol Chem.* 2006Mar17;281(11):7082-8.
- [21] Johnston JJ, Teer JK, Cherukuri PF, Hansen NF, Loftus SK; NIH Intramural Sequencing Center (NISC), Chong K, Mullikin JC, Biesecker LG. *Massively parallel sequencing of exons on the X chromosome identifies RBM10 as the gene that causes a syndromic form of cleft palate*. *Am J Hum Genet.* 2010 May 14;86(5):743-8
- [22] Shashi V, Xie P, Schoch K, Goldstein DB, Howard TD, Berry MN, Schwartz CE, Cronin K, Sliwa S, Allen A, Need AC. *The RBMX gene as a candidate for the Shashi X-linked intellectual disability syndrome*. *Clin Genet.* 2015 Oct;88(4):386-90.
- [23] Ozuemba B., Masilamani TJ, Loiselle JJ, Koenderink B, Vanderbeck KA, Knee J, Larivière C, Sutherland LC *Co- and post-transcriptional regulation of Rbm5 and Rbm10 in mouse cells as evidenced by tissue-specific, developmental and disease-associated variation of splice variant and protein expression levels* *Gene* Vol. 580, Issue 1, 10 April 2016, Pag. 26–36
- [24] Tessier SJ, Loiselle JJ, McBain A, Pullen C, Koenderink BW, Roy JG, Sutherland LC. *Insight into the role of alternative splicing within the RBM10v1 exon 10 tandem donor site*. *BMC Res Notes.* 2015 Feb 19;8:46.
- [25] Fernando Martínez-Arribas, David Agudo, Marina Pollán, Francisco Gómez-Esquer, Gema Díaz-Gil, Raul Lucas, José Schneider. *Positive correlation between the expression of X-chromosome RBM genes (RBMX, RBM3, RBM10) and the proapoptotic Bax gene in human breast cancer*. *J Cell Biochem* 2006 Apr;97(6):1275-82

- [26] Sutherland LC, Rintala-Maki ND, White RD, Morin CD. *RNA binding motif (RBM) proteins: a novel family of apoptosis modulators?* J Cell Biochem. 2005 Jan 1;94(1):5-24.
- [27] Gripp KW, Hopkins E, Johnston JJ, Krause C, Dobyns WB, Biesecker LG. *Long-term survival in TARP syndrome and confirmation of RBM10 as the disease-causing gene.* Am J Med Genet A. 2011 Oct;155A(10):2516-20.
- [28] Wang Y, Gogol-Döring A, Hu H, Fröhler S, Ma Y, Jens M, Maaskola J, Murakawa Y, Quedenau C, Landthaler M, Kalscheuer V, Wieczorek D, Wang Y, Hu Y, Chen W. *Integrative analysis revealed the molecular mechanism underlying RBM10-mediated splicing regulation.* EMBO Mol Med. 2013 Sep;5(9):1431-42.
- [29] Thiselton DL, McDowall J, Brandau O, Ramser J, D'Esposito F, Bhattacharya SS, Ross MT, Hardcastle AJ, Meindl A. *An integrated, functionally annotated gene map of the DXS8026-ELK1 interval on human Xp11.3-Xp11.23: potential hotspot for neurogenetic disorders.* Genomics. 2002 Apr;79(4):560-72.
- [30] Sidore C, Busonero F, Maschio A, Porcu E, Naitza S, Zoledziwska M, Mulas A, Pistis G, Steri M, Danjou F, Kwong A, Ortega Del Vecchio VD, Chiang CW, Bragg-Gresham J, Pitzalis M, Nagaraja R, Tarrier B, Brennan C, Uzzau S, Fuchsberger C, Atzeni R, Reinier F, Berutti R, Huang J, Timpson NJ, Toniolo D, Gasparini P, Malerba G, Dedoussis G, Zeggini E, Soranzo N, Jones C, Lyons R, Angius A, Kang HM, Novembre J, Sanna S, Schlessinger D, Cucca F, Abecasis GR. *Genome sequencing elucidates Sardinian genetic architecture and augments association analyses for lipid and blood inflammatory markers.* Nat Genet. 2015 Nov;47(11):1272-81