



UNIVERSITÀ  
DI PAVIA

**Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”**

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Dipartimento di Medicina Molecolare  
Unità di Biologia Generale e Genetica Medica

Teleangiectasia emorragica ereditaria: analisi di varianti e messa a  
punto di un approccio quantitativo per gli studi funzionali

Relatore:

*Carla Olivieri*

Tesi Sperimentale di  
*Alessandro Piana*

Anno Accademico 2024/2025

## RIASSUNTO

La teleangectasia emorragica ereditaria (HHT) è una malattia genetica rara a trasmissione autosomica dominante, caratterizzata dalla presenza di anomalie vascolari e da episodi emorragici ricorrenti, in particolare epistassi. La prevalenza stimata nella popolazione generale è di circa 1 caso ogni 5000–8000 individui.

La diagnosi clinica di HHT si basa sui criteri di Curaçao, che includono epistassi spontanee e ricorrenti, teleangectasie mucocutanee, malformazioni artero-venose viscerali e familiarità per la patologia. La diagnosi è considerata definitiva quando sono presenti almeno tre di questi criteri. L'HHT è principalmente associata a varianti patogenetiche nei geni *ENG*, *ACVRL1*, *SMAD4* e *GDF2*, tutti coinvolti nei processi di segnalazione e regolazione dell'angiogenesi. Altri geni, come *RASAI*, *EPHB4* e *BMP2*, possono invece essere responsabili di patologie vascolari con manifestazioni cliniche parzialmente sovrapponibili all'HHT.

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di contribuire alla caratterizzazione funzionale di varianti genetiche associate all'HHT, mediante la messa a punto di un approccio quantitativo basato su Real-Time PCR con sonde TaqMan™.

A tal fine, sono stati analizzati campioni di sangue periferico di controlli sani sottoposti a estrazione di RNA totale, successiva retrotrascrizione e verifica della sintesi di cDNA. È stato inoltre sviluppato un workflow sperimentale standardizzato per l'impostazione delle analisi di espressione genica, volto a garantire uniformità nelle reazioni e ridurre la variabilità tecnica. Sono state selezionate sonde TaqMan™ specifiche per i geni *ENG* e *ACVRL1* e sono stati considerati geni endogeni di riferimento per la futura normalizzazione dei dati di espressione.

I risultati ottenuti hanno permesso di definire le basi metodologiche per l'analisi quantitativa dell'espressione genica nei campioni in studio e di confermare la fattibilità dell'approccio proposto. Il metodo messo a punto rappresenta uno strumento utile per futuri studi funzionali e per una migliore interpretazione del significato biologico delle varianti genetiche associate all'HHT.

## ABSTRACT

Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) is a rare autosomal dominant genetic disorder characterized by the presence of vascular abnormalities and recurrent bleeding episodes, particularly epistaxis. Its estimated prevalence in the general population is approximately 1 in 5,000–8,000 individuals.

The clinical diagnosis of HHT is based on the Curaçao criteria, which include spontaneous and recurrent epistaxis, mucocutaneous telangiectases, visceral arteriovenous malformations, and a positive family history. The diagnosis is considered definite when at least three of these criteria are present. At the molecular level, HHT is primarily associated with pathogenic variants in the *ENG*, *ACVRL1*, *SMAD4*, and *GDF2* genes, all involved in angiogenesis-related signalling pathways. Other genes, such as *RASA1*, *EPHB4*, and *BMPR2*, may instead be responsible for vascular disorders with clinical features partially overlapping with HHT.

The aim of this thesis was to contribute to the functional characterization of genetic variants associated with HHT by developing a quantitative approach based on Real-Time PCR using TaqMan™ probes.

To this end, peripheral blood control samples were analysed through total RNA extraction, followed by reverse transcription and verification of cDNA synthesis. A standardized experimental workflow was developed for gene expression analysis in order to ensure reaction uniformity and reduce technical variability. TaqMan™ probes specific for the *ENG* and *ACVRL1* genes were selected, and endogenous reference genes were considered for future normalization of gene expression data.

The results obtained allowed the definition of methodological bases for quantitative gene expression analysis in the samples under study and confirmed the feasibility of the proposed approach. The developed method represents a useful tool for future functional studies and for a better interpretation of the biological significance of genetic variants associated with HHT.

## INDICE

RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUZIONE .....	5
HHT: caratteristiche e sintomi.....	5
HHT: diagnosi clinica.....	8
HHT: diagnosi molecolare.....	11
Meccanismi di segnalazione del TGF- $\beta$ .....	13
<i>ENG</i> .....	17
Organizzazione strutturale e isoforme.....	17
Coinvolgimento di Endoglin nell'HHT di tipo 1.....	19
Classificazione e caratteristiche delle varianti del gene <i>ENG</i> .....	20
<i>ACVRL1</i> .....	22
Organizzazione strutturale.....	23
Coinvolgimento di ALK1 nell'HHT di tipo 2.....	24
Classificazione e caratteristiche delle varianti del gene <i>ACVRL1</i> .....	24
<i>SMAD4</i> .....	25
Organizzazione strutturale.....	26
Coinvolgimento di <i>SMAD4</i> nella sindrome JP-HT .....	27
Classificazione e caratteristiche delle varianti del gene <i>SMAD4</i> .....	28
<i>GDF2</i> .....	29
<i>RASA1</i> .....	30
<i>EPHB4</i> .....	32
<i>BMPR2</i> .....	34
MODELLO “SECOND HIT” IN HHT .....	34
NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS).....	36
PCR quantitativa (Real-Time PCR).....	38
SCOPO DEL LAVORO.....	41
MATERIALI E METODI .....	42
Campioni biologici .....	42
Estrazione RNA.....	42
Determinazione della concentrazione e della purezza dell'RNA .....	43
Retrotrascrizione di RNA in cDNA .....	44
Verifica dell'efficienza della retrotrascrizione mediante PCR.....	45

Analisi elettroforetica su gel di agarosio .....	47
Ricerca in letteratura per la selezione di sonde TaqMan™ .....	48
Selezione delle sonde TaqMan™ .....	48
Real-time PCR .....	49
RISULTATI .....	52
Campioni biologici .....	52
Quantificazione e valutazione della purezza dell'RNA .....	52
Determinazione delle quantità di RNA per la retrotrascrizione .....	53
Verifica della sintesi del cDNA .....	53
Ricerca in letteratura per la selezione di sonde TaqMan™ .....	55
Selezione delle sonde TaqMan™ .....	56
Determinazione dei volumi di reazione per l'analisi di Real-Time PCR .....	59
DISCUSSIONE .....	60
CONCLUSIONI .....	65
BIBLIOGRAFIA .....	66

## INTRODUZIONE

### **HHT: caratteristiche e sintomi**

La Teleangectasia Emorragica Ereditaria (HHT dall'acronimo inglese), nota anche come sindrome di Rendu-Osler-Weber, è una patologia vascolare rara a trasmissione autosomica dominante, con una prevalenza stimata di circa 1 individuo su 5.000 (Faughnan et al., 2020). La distribuzione della patologia non è uniforme a livello mondiale, mostrando significative variazioni regionali attribuibili all'effetto del fondatore. Questo fenomeno si verifica quando una mutazione genetica originatasi in un numero limitato di individui fondatori viene trasmessa alle generazioni successive all'interno di popolazioni relativamente isolate, in cui la ridotta variabilità genetica e i fenomeni di deriva genetica favoriscono l'aumento della frequenza allelica della mutazione stessa. Esempi di effetto fondatore sono stati descritti nella regione dell'Haut Jura in Francia e in alcune aree italiane (Lesca et al., 2008; Sbalchiero et al., 2022), nonché nella popolazione afrocaribica delle Antille Olandesi, dove si registra una delle prevalenze più elevate al mondo, pari a circa 1 individuo affetto ogni 1.639 abitanti (Gallione et al., 2000).

La presentazione clinica della HHT è caratterizzata da una spiccata eterogeneità fenotipica anche all'interno di una stessa famiglia e da una penetranza età-dipendente, con sintomi che tendono ad aggravarsi progressivamente nel corso della vita (Faughnan et al., 2020). La malattia è causata da mutazioni in geni che codificano per proteine coinvolte nella modulazione del pathway del Trasforming Grow Factor-Beta (TGF- $\beta$ ) all'interno delle cellule endoteliali nei vasi sanguigni (Govani & Shovlin, 2009).

L'epistassi spontanea e ricorrente è la manifestazione d'esordio più frequente, con una penetranza che aumenta progressivamente fino a interessare la quasi totalità della popolazione affetta entro la quinta decade di vita (Lesca et al., 2007; Plauchu et al., 1989). Tale sintomatologia deriva dalla presenza di teleangectasie che rappresentano la manifestazione vascolare più frequente e clinicamente visibile della malattia. Sono definite come dilatazioni focali delle venule post-capillari che si connettono direttamente alle arteriole terminali; tale anomalia determina la formazione di piccoli shunt artero-venosi superficiali, delle dimensioni di 1 – 2 mm causati dalla perdita del normale letto capillare

(Braverman et al., 1990). Clinicamente, queste si traducono in lesioni puntiformi o maculari di colore rosso-violaceo (Guttmacher et al., 1995)

Il difetto architettonico vascolare non si limita al distretto superficiale, ma coinvolge vasi di calibro maggiore negli organi interni sotto forma di Malformazioni Artero-Venose (AVMs). Le AVMs rappresentano l'espressione macroscopica dello stesso meccanismo fisiopatologico delle teleangectasie, dove l'assenza del filtro capillare permette al sangue di fluire ad alta pressione direttamente nelle vene, portando a una progressiva dilatazione e fragilità delle pareti vascolari. Questa fragilità strutturale, comune sia alle teleangectasie che alle AVMs, è riconducibile a un deficit del supporto di tessuto elastico e della componente muscolare liscia, che impedisce al vaso di rispondere correttamente alle sollecitazioni emodinamiche (Drapé et al., 2022). Le teleangectasie mostrano una distribuzione ubiquitaria con predilezione per le zone di transizione muco-cutanea e le estremità come mucosa nasale, labbra, lingua e polpastrelli, le malformazioni artero-venose (arteriovenous malformation, AVMs) invece interessano prevalentemente i distretti epatico, polmonare, cerebrale e gastrointestinale, definendo la prognosi e il rischio di complicanze sistemiche della malattia (Faughnan et al., 2020).

Il coinvolgimento epatico nella HHT si manifesta attraverso malformazioni vascolari (Hepatic AVMs – HAVMs) che alterano l'emodinamica dell'organo. Queste anomalie si strutturano in tre tipologie principali di shunt: artero-venosi, artero-portali e porto-venosi. Sebbene la maggior parte dei pazienti rimanga asintomatica, la presenza di tali connessioni anomale può portare a complicanze sistemiche quali l'insufficienza cardiaca ad alta gittata, l'ipertensione portale o la colangite ischemica fino ad arrivare, nei casi più estremi, alla necessità di un trapianto d'organo (Garcia-Tsao, 2007).

A livello dei polmoni (Pulmonary AVMs - PAVMs) le malformazioni assumono una rilevanza clinica critica, in quanto agiscono come shunt destro-sinistro, permettendo al sangue venoso di bypassare il letto capillare polmonare e immettersi direttamente nella circolazione sistemica. Tale fenomeno annulla la funzione di filtro fisiologico dei polmoni, esponendo il paziente al rischio di embolie paradosse: microemboli o aggregati batterici, che normalmente verrebbero rimossi, possono così raggiungere il distretto cerebrale determinando complicanze neurologiche severe quali l'ictus ischemico o l'ascesso cerebrale (Lacombe et al., 2013)

Le alterazioni a livello del sistema nervoso centrale (Cerebral AVMs - CAVMs) si manifestano prevalentemente con la presenza di malformazioni artero-venose cerebrali, riscontrabili in circa il 10-20% dei pazienti affetti. A differenza delle forme sporadiche, le lesioni associate alla HHT sono frequentemente multiple e possono rimanere asintomatiche per lungo tempo, pur mantenendo un rischio costante di rottura (Matsubara et al., 2000). Tali malformazioni presentano caratteristiche angioarchitetturali specifiche, spesso di dimensioni ridotte ma associate a un rischio di emorragia intracranica spontanea o crisi epilettiche, rendendo lo screening neuroradiologico precoce un passaggio fondamentale nella gestione del paziente (Brinjikji et al., 2017). La distribuzione e la gravità delle malformazioni viscerali mostrano una stretta correlazione con il profilo genetico del paziente (Lesca et al., 2007). In particolare, le lesioni a carico dell'apparato gastrointestinale si presentano come teleangectasie diffuse sulla mucosa, la cui tendenza al sanguinamento aumenta progressivamente con l'età. Questa manifestazione, tipicamente tardiva, rappresenta il fattore determinante nell'insorgenza dell'anemia nel soggetto adulto (Locke et al., 2022).

La HHT è una patologia genetica causata da mutazioni in geni che codificano per proteine chiave della via di segnalazione del Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fondamentale per la regolazione dell'angiogenesi. Nella maggior parte dei casi (circa 85–90%), la malattia è associata a varianti nei geni *ENG* (OMIM \*131195), localizzato sul cromosoma 9 (9q34.11) codificante per Endoglina, responsabile della forma HHT1 (OMIM #187300; McAllister et al., 1994), e *ACVRL1* (OMIM \*601284), localizzato sul cromosoma 12 (12q13.13) che codifica per una chinasi 1 simile al recettore dell'attivina (ALK1), presente sul cromosoma 12 (12q13.13) e responsabile dell'HHT2 (OMIM #600376; Johnson et al., 1996).

Una quota minoritaria di pazienti (<5%) presenta mutazioni nel gene *SMAD4* (OMIM \*600993), la cui alterazione determina una sindrome combinata caratterizzata dall'associazione tra HHT e poliposi giovanile del colon (JP-HHT; OMIM #175050; (C. J. Gallione et al., 2004a) e da *GDF2* (OMIM \*605120), che codifica per la proteina BMP9 e causa una forma rara di HHT denominata HHT5 (OMIM #615506), caratterizzata da un fenotipo HHT-like, confermando il ruolo critico di questa citochina come ligando specifico per il complesso recettoriale endoteliale (Wooderchak-Donahue et al., 2013).

## HHT: diagnosi clinica

La diagnosi clinica di HHT è stata standardizzata nel 2000 attraverso la formulazione dei “Criteri di Curaçao”, uno strumento diagnostico nato per uniformare l'identificazione della patologia a livello internazionale. Questi criteri si basano sulla presenza di: epistassi, teleangectasie, lesioni viscerali e una storia familiare di HHT (Shovlin *et al.*, 2000).

Criteri	Descrizione
Epistassi	Spontanee e ricorrenti
Teleangectasie	Multiple e in siti caratteristici: labbra, bocca, dita e naso
Lesioni viscerali	Malformazioni artero-venose (AVMs) gastrointestinali, polmonari, epatiche, cerebrali o spinali
Storia familiare	Parente di primo grado affetto da HHT secondo i criteri

Tabella 1. Criteri di Curaçao per la diagnosi clinica di Teleangectasia emorragica ereditaria (HHT). Shovlin *et al.*, 2000

In base al numero di criteri presenti in un soggetto la diagnosi di HHT può essere:

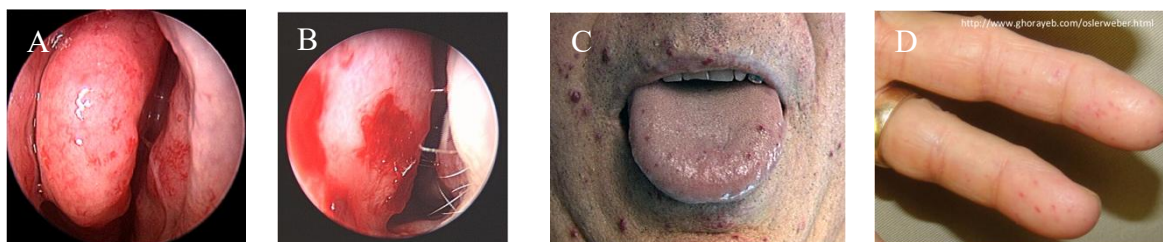
- Definitiva se presenti 3 o 4 criteri;
- Possibile o sospetta se presenti 2 criteri;
- Improbabile se presenti 1 o 0 criteri.

Studi recenti suggeriscono che in caso di presenza di una PAVM, la diagnosi viene considerata sospetta anche in presenza di questo solo criterio di Curaçao (Anderson *et al.*, 2022)

Le epistassi, come già anticipato, sono il più importante sintomo in molte delle persone con HHT e vanno a interferire con la vita di tutti i giorni (Hammill *et al.*, 2021). Per superare la soggettività nella valutazione del primo criterio di Curaçao, la pratica clinica si avvale di diversi metodi di valutazione, come l'Epistaxis Severity Score (ESS) ed il FID, presentato dai colleghi della U.O. Otorinolaringoiatria, al cui lavoro ha partecipato anche il nostro gruppo (Pagella *et al.*, 2020). Questi strumenti standardizzati permettono di quantificare la gravità dell'epistassi incrociando diversi fattori prognostici: la frequenza e la durata degli

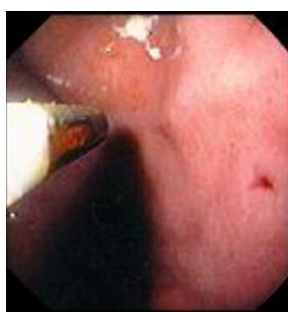
episodi, l'entità del flusso ematico, la presenza di anemia secondaria e la necessità di interventi medici o trasfusionali per il controllo dell'emostasi (Hoag et al., 2010).

Il criterio delle teleangectasie è considerato soddisfatto quando queste si presentano nei siti critici (Figura 1) in numero uguale o maggiore di 3. Sebbene questo dato però possa variare in base al fenotipo del paziente, le teleangectasie restano comunque di elevata significatività diagnostica (McDonald et al., 2023).



**Figura 1.** Manifestazioni cliniche di teleangectasie in diversi distretti corporei: (A-B) mucosa nasale, (C) lingua, (D) dita della mano. Courtesy Prof. F. Pagella et al., ENT Unit – Fondazione IRCCS Policlinico “S. Matteo”, Pavia.

La presenza di AVM nel tratto gastrointestinale coinvolge il 13-30% dei pazienti di età superiore ai 50 anni. La maggior parte di teleangectasie gastrointestinali si localizzano per il 46-75% nello stomaco (Figura 2) e per il 56-91% nell'intestino tenue (Canzonieri et al., 2014). Questi sanguinamenti a livello del tratto gastrointestinale sono molto invalidanti e una cronicizzazione porta a un'anemia da carenza di ferro che porta il paziente a subire trasfusioni e somministrazioni endovenose di ferro; tutto questo va a impattare sulla qualità della vita.



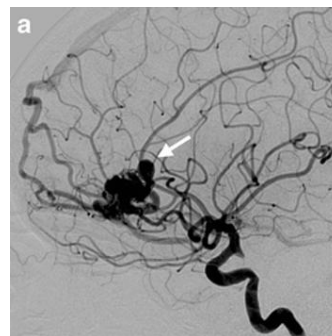
**Figura 2. Teleangectasia localizzata a livello dello stomaco.** Courtesy Dr. M Perego et coll. Gastrointestinal Endoscopy Unit Unit–Fondazione IRCCS Policlinico “S. Matteo”, Pavia

Nei bambini, invece, il sanguinamento è solitamente significativo solo in portatori di mutazioni nel gene *SMAD4*, poiché correlato alla presenza di polipi. Il sanguinamento gastrointestinale diventa sospetto nel caso in cui ci sia una carenza di ferro con o senza anemia, soprattutto quando questa è sproporzionata rispetto all'epistassi. Il primo metodo

per andare a valutare questa situazione è un'endoscopia seguita poi da un corretto trattamento in base al sanguinamento e all'anemia (Hermann et al., 2025).

Le AVMs viscerali, sebbene siano meno comuni delle epistassi, possono comportare un severo aggravamento del quadro clinico e un incremento dell'indice di letalità, qualora non vengano identificate o trattate tempestivamente. I pazienti che si sottopongono a screening e a un trattamento adeguato hanno una aspettativa di vita maggiore (De Gussem et al., 2016; Iyer et al., 2016).

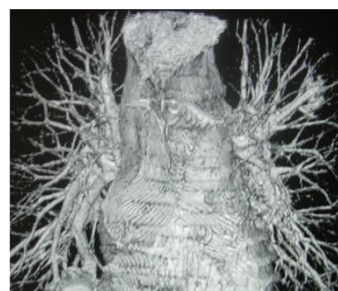
Le malformazioni vascolari cerebrali riscontrate nella HHT includono le AVMs (Figura 3), le fistole arterovenose (AVFs), le malformazioni della vena di Galeno, le malformazioni cavernose cerebrali (cavernomi), le anomalie venose dello sviluppo (DVA), le teleangectasie capillari e AVMs nidali; sono presenti in circa il 6% dei pazienti affetti senza discriminazione di età, sesso o popolazione. Le malformazioni artero-venose e le fistole sono quelle a più alto rischio di complicanze (Brinjikji et al., 2016; Kim et al., 2015). A



**Figura 3. AVM a livello cerebrale.** Courtesy: Dr. E. Boccardi Department of Neuroradiology, A.O. Niguarda Ca' Granda, Milano, Italy (From: Pierot et al. 2013)

differenza delle AVMs sporadiche, quelle cerebrali tendono a essere multiple e di dimensioni inferiori a 3 cm. Data la localizzazione spesso superficiale, a livello dei lobi cerebrali, e il basso grado secondo la scala di Spetzler-Martin, le malformazioni cerebrali associate a HHT tendono a presentare un rischio emorragico inferiore rispetto alle AVMs sporadiche. Tuttavia, i pazienti affetti da HHT mostrano complessivamente un rischio aumentato di emorragia intracranica rispetto alla popolazione generale, suggerendo una differente storia naturale di queste lesioni. A causa della loro molteplicità e di una natura asintomatica è importantissimo effettuare uno screening precoce tramite RM (Krings et al., 2005).

Nel caso delle PAVM (Figura 4), come anticipato in precedenza, si ha una malformazione che porta alla formazione di uno shunt destro-sinistro tra le arterie e le vene polmonari visibile tramite radiografia (Shovlin et al., 2017). Esse si sviluppano in tarda adolescenza con una crescita nulla o minima nel corso della vita (Hessels et al., 2023). Hanno un quadro clinico molto vario e si presentano come asintomatiche



**Figura 4. AVM polmonare.** Courtesy: Dr. R. Dore – Radiology Unit– Fondazione IRCCS Policlinico “S. Matteo”, Pavia

o con sintomi differenti. Possono manifestarsi con segni quali affaticamento, mancanza di respiro, ipossiemia ed emicranie. Le conseguenza più grave è l'embolia paradossa che porta a un maggiore rischio di ictus, attacco ischemico transitorio (TIA) e ascesso cerebrale (Hermann et al., 2025).

Le malformazioni a livello epatico sono età dipendenti e iniziano a svilupparsi solitamente intorno ai 50 anni (Buscarini et al., 2011). Le AVMs a livello del fegato portano a manifestazioni tipiche come l'insufficienza cardiaca ad alta gittata, ipertensione portale, encefalopatia, ischemia biliare e mesenterica (Kelly et al., 2024). Il fegato in questi casi ha una maggiore attività proliferativa che porta a una condizione di iperplasia nodulare rigenerativa (NRH) o iperplasia nodulare focale (FNH). Queste condizioni associate e fibrosi potrebbero portare a un'errata diagnosi di cirrosi. Un'alterazione a livello dei flussi epatici ha ripercussioni anche a livello del sistema nervoso centrale, nei casi di shunt porto-sistemico e anemia sideropenica si ha un'iperdensità dei gangli basali (Buscarini et al., 2004; Serra et al., 2017).

I criteri di Curaçao sono fondamentali e permettono di distinguere con precisione i soggetti affetti dai non affetti nella popolazione più anziana, dove il fenotipo è ormai completo, e consentono di confermare rapidamente la malattia nei bambini e nei giovani adulti che già manifestano i segni clinici. Un limite che emerge è il rischio di sottodiagnosi nei pazienti pediatrici, in cui le epistassi, se presenti, non possono essere immediatamente distinte da quelle che caratterizzano la popolazione pediatrica generale e in cui possono non manifestarsi ancora le teleangiectasie ma che possono già essere portatori di PAVM e CVM non diagnosticate. Il test genetico in questo caso è fondamentale per una diagnosi precoce che indirizzi questi pazienti ad un corretto screening clinico al fine di evitare complicanze (Faughnan et al., 2011).

### **HHT: diagnosi molecolare**

La diagnosi molecolare della HHT si basa sull'identificazione di varianti patogenetiche a carico di geni coinvolti nel pathway di segnalazione del TGF- $\beta$ , un complesso sistema proteico, essenziale per la regolazione dell'angiogenesi e il mantenimento dell'integrità dell'endotelio vascolare. Le varianti patogenetiche nei geni *ENG* e *ACVRL1*, che codificano rispettivamente per Endoglin e ALK1, costituiscono circa il 96% delle diagnosi di HHT classica. Il meccanismo principale che caratterizza l'HHT è l'aploinsufficienza, con la

presenza di una mutazione in eterozigosi su uno dei geni coinvolti nella patologia (McDonald et al., 2020). Oltre ai geni principali, l'1-2% dei pazienti affetti da HHT presenta mutazioni a livello del gene *SMAD4*. L'identificazione di tali varianti riveste un'importanza clinica cruciale, in quanto definisce la sindrome combinata di poliposi giovanile e HHT (JP-HHT). In questi soggetti, al fenotipo vascolare tipico si associa una spiccata predisposizione allo sviluppo di polipi gastrointestinali a rischio di degenerazione oncologica e un coinvolgimento nell'aortopatia (Gallione et al., 2010; Heald et al., 2015). Mutazioni a carico del gene *GDF2*, responsabile dell'HHT5, vanno ad ampliare l'aspetto molecolare di questa malattia. *GDF2* codifica per la proteina BMP9 (Bone Morphogenic Protein), la quale agisce come ligando specifico per i recettori ALK1 ed Endoglina. Una sua produzione alterata agisce sul pathway TGF- $\beta$  determinando un fenotipo HHT.

Un'ulteriore sfida diagnostica è rappresentata dalla sovrapposizione clinica con la Sindrome da Malformazioni Capillari-Artero-Venose (CM-AVM). Questa patologia, pur essendo distinta dalla HHT, può manifestarsi con lesioni vascolari cutanee e malformazioni artero-venose simili, ma è causata da mutazioni nei geni *RASAI* ed *EPHB4* (Hernandez et al., 2015; Wooderchak-Donahue et al., 2019).

A causa di queste somiglianze fenotipiche tra HHT1, HHT2, HHT5 e CM-AVM la diagnostica si basa sull'utilizzo di pannelli multi-genici analizzati tramite NGS. È possibile dunque effettuare uno screening simultaneo dei geni interessati (*ENG*, *ACVRL1*, *SMAD4*, *RASAI*, *GDF2*, *EPHB4*).

L'indagine molecolare è fondamentale non solo come conferma diagnostica ma anche come strumento predittivo e preventivo. Il test genetico viene utilizzato per analizzare i casi dubbi in cui sono presenti solo 2 criteri di Curaçao e in caso di soggetti asintomatici, con una particolare attenzione per i soggetti pediatrici in cui le manifestazioni possono non essere ancora evidenti (Faughnan et al., 2011). Nei pazienti portatori di mutazioni nel gene *SMAD4*, associati alla sindrome combinata JP-HHT, è necessario un approccio di sorveglianza clinica differenziato rispetto alle forme classiche di HHT. In questi soggetti, infatti, allo screening delle malformazioni vascolari tipiche della HHT deve essere associato un monitoraggio endoscopico periodico del tratto gastrointestinale mediante colonscopia e gastroscopia, al fine di identificare precocemente polipi amartomatosi e ridurre il rischio di progressione neoplastica (Haidle et al., 2022; Larsen et al., 2022). Nonostante l'accuratezza delle attuali tecniche di sequenziamento, una percentuale compresa tra il 10% e il 15% dei

pazienti con diagnosi clinica certa di HHT non presenta varianti patogenetiche identificabili con le tecniche di analisi delle sole regioni codificanti (esoma; Hammill et al., 2021).

## **Meccanismi di segnalazione del TGF- $\beta$**

Il Fattore di Crescita Trasformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) è una citochina pleiotropica e multifunzionale che gioca un ruolo centrale nella regolazione di processi biologici fondamentali, tra cui la proliferazione, la differenziazione, la migrazione e la sopravvivenza cellulare. Nei mammiferi, questa superfamiglia comprende oltre 30 ligandi, tra cui le tre isoforme classiche del TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, 2 e 3), secrete inizialmente in forma immatura e successivamente attivate da proteasi specifiche, e le proteine morfogenetiche dell'osso (BMPs) tra cui rivestono maggiore importanza nell'HHT BMP9 e BMP10 (Massagué et al., 2023). Sebbene il TGF- $\beta$  sia il membro principale, questa famiglia include un gruppo esteso e diversificato di molecole, come le activine, le inibine e i fattori di crescita e differenziazione (GDF), rendendo la segnalazione un sistema estremamente sofisticato e non riducibile a un singolo schema lineare. Nelle cellule endoteliali, questa complessità si traduce in un'integrazione di segnali multipli, in cui la specificità della risposta dipende dall'interazione coordinata tra ligandi e recettori specifici (Padua & Massagué, 2009).

Un aspetto peculiare della segnalazione BMPs nelle cellule endoteliali è rappresentato dalla natura sistemica dei suoi ligandi principali: BMP9 è prodotto prevalentemente nel fegato, mentre BMP10 è espresso principalmente nel cuore, contribuendo a una regolazione endocrina del segnale endoteliale (David et al., 2008). Prima dell'identificazione di BMP9 e BMP10 come ligandi ad alta affinità per ALK1 ed Endogлина, il TGF- $\beta$  era stato proposto come principale ligando di questo complesso recettoriale, sebbene con un'affinità significativamente inferiore e dipendente dalla presenza di ALK5 (Hermann et al., 2025).

La deregolazione del pathway TGF- $\beta$ /BMP nelle cellule endoteliali porta allo sviluppo di sindromi vascolari e gravi emorragie in patologie quali la HHT, la CCM (malformazione cavernosa cerebrale) e gli aneurismi aortici (Dupuis-Girod et al., 2010).

L'inizio della segnalazione presenta differenze strutturali e funzionali significative tra i vari membri della superfamiglia. Mentre le isoforme del TGF- $\beta$  richiedono un taglio proteolitico per essere liberate dallo stato di precursore inattivo, le BMPs vengono secrete in forma già biologicamente attiva (Ten Dijke et al., 2007). A differenza del sistema BMP, caratterizzato

da risposte graduate, il TGF- $\beta$  opera secondo un meccanismo 'switch-like'. Questa differenza permette di avere una trasduzione del segnale più rapida rispetto a una segnalazione più plastica del pathway BMP9/10 – ALK1 nell'endotelio (Groppe et al., 2008).

Il meccanismo di attivazione del pathway ha inizio quando i ligandi (come le isoforme del TGF- $\beta$  o le BMP9/10) promuovono la formazione di un complesso recettoriale eterotetramerico sulla membrana plasmatica. Questo complesso è costituito dall'associazione di due recettori di tipo II e due recettori di tipo I. Il legame del ligando permette ai recettori di tipo II di fosforilare il dominio GS intracellulare dei recettori di tipo I, attivandone la funzione chinastica e innescando un cambiamento conformazionale indispensabile per la trasduzione del segnale (Zhu & Sizeland, 1999).

La trasduzione del segnale a valle dei recettori della superfamiglia TGF- $\beta$ /BMP è mediata principalmente dalle proteine SMAD, una famiglia di trasduttori intracellulari che agiscono come regolatori trascrizionali (Massagué, 2012). Le SMAD si suddividono in tre classi funzionali: le R-SMAD (receptor-regulated SMAD), le Co-SMAD e le I-SMAD (inhibitory SMAD), ciascuna con un ruolo specifico nella modulazione del segnale (Feng et al., 2005).

Le R-SMAD comprendono SMAD1, SMAD5 e SMAD8/9, attivate prevalentemente dal pathway BMPs, in particolare dai ligandi BMP9 e BMP10 nelle cellule endoteliali, e SMAD2 e SMAD3, attivate dal pathway TGF- $\beta$ . In seguito all'attivazione del complesso recettoriale, i recettori di tipo I fosforilano le R-SMAD a livello del dominio C-terminale, promuovendone l'attivazione (Heldin et al., 2016). In particolare, nelle cellule endoteliali, il pathway BMP9/10–ALK1 induce la fosforilazione di SMAD1/5/8, mentre il segnale TGF- $\beta$  mediato da ALK5 porta all'attivazione di SMAD2/3 (Goumans et al., 2009). Una volta fosforilate, le R-SMAD formano un complesso con la Co-SMAD SMAD4, che rappresenta un elemento comune a entrambi i pathway. Questo complesso trasloca nel nucleo, dove regola l'espressione genica attraverso l'interazione con fattori di trascrizione e co-regolatori, determinando risposte cellulari dipendenti dal contesto (Massagué, 2012).

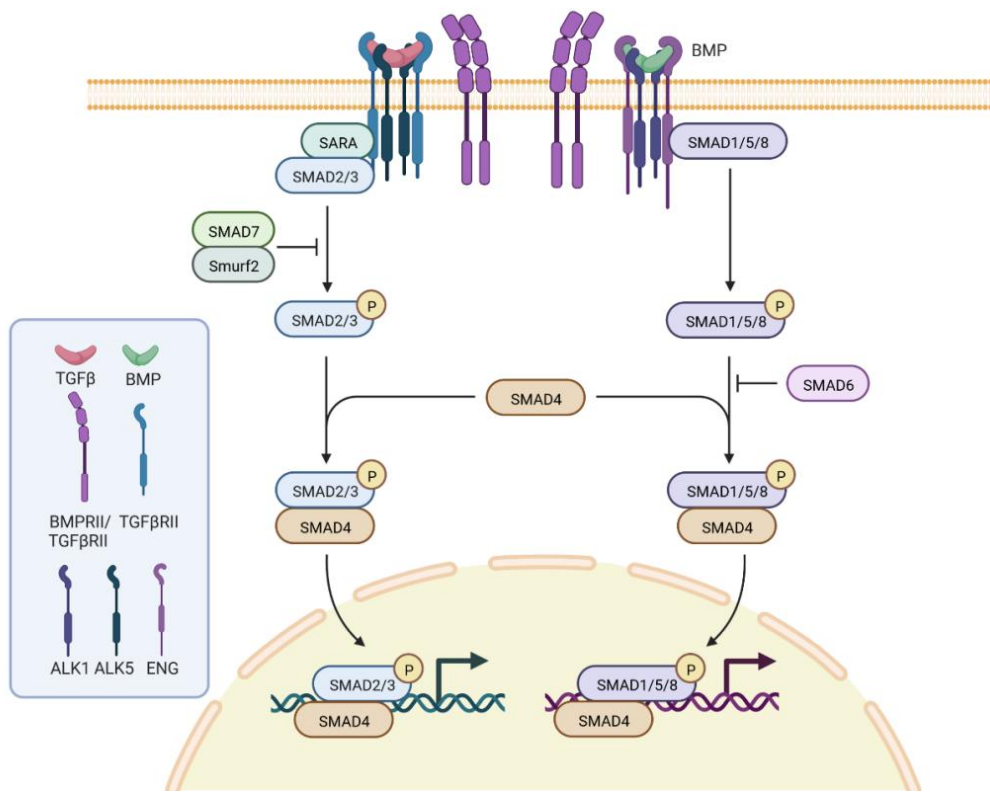
La regolazione negativa del pathway è mediata dalle I-SMAD, principalmente SMAD6 e SMAD7, che agiscono come inibitori intracellulari della segnalazione. SMAD6 esercita un'azione preferenziale sul pathway BMP, interferendo con la formazione dei complessi SMAD1/5/8–SMAD4, mentre SMAD7 inibisce prevalentemente il pathway TGF- $\beta$ , legandosi ai recettori di tipo I e impedendo la fosforilazione di SMAD2/3 (Miyazawa et al.,

2017). Inoltre, SMAD7 può reclutare E3 ubiquitina ligasi, promuovendo la degradazione dei recettori e contribuendo alla regolazione negativa del segnale (Pardali et al., 2010).

Nel contesto endoteliale, l'equilibrio tra l'attivazione delle SMAD1/5/8 e delle SMAD2/3, insieme all'azione modulatrice delle I-SMAD, è essenziale per il mantenimento dell'omeostasi vascolare. A questo livello di regolazione, diversi co-recettori contribuiscono a modulare la risposta del pathway TGF- $\beta$ /BMP nelle cellule endoteliali. Un ruolo fondamentale è svolto dall'Endogлина (*ENG*), un co-recettore di tipo III altamente espresso nell'endotelio vascolare, che non possiede attività chinastica intrinseca ma regola la segnalazione modulando l'interazione tra ligandi e recettori di tipo I e II. In particolare, Endogлина modula principalmente la segnalazione mediata dai ligandi BMP, contribuendo alla stabilizzazione del complesso recettoriale e alla regolazione della trasduzione del segnale a valle. Inoltre, partecipa al controllo dell'equilibrio tra le vie ALK1 e ALK5, influenzando la risposta endoteliale in funzione del contesto fisiologico (Schoonderwoerd et al., 2020).

Accanto a Endogлина, altri co-recettori della superfamiglia TGF- $\beta$ , come il betaglicano (TGF- $\beta$ RIII), partecipano alla modulazione della segnalazione, sebbene con un ruolo meno specifico nel contesto endoteliale e principalmente associato alla regolazione del segnale TGF- $\beta$  in diversi tipi cellulari (Gatza et al., 2010).

Tutti i geni causativi identificati nella Teleangectasia Emorragica Ereditaria codificano per proteine coinvolte nella segnalazione TGF- $\beta$ /BMP, evidenziando il ruolo centrale di questo pathway nella patogenesi della malattia.



**Figura 5.** Schema della via di segnalazione TGF- $\beta$ /BMP. Il legame dei ligandi TGF- $\beta$  e BMP ai rispettivi recettori di membrana di tipo I e II induce la fosforilazione delle R-SMAD (SMAD2/3 per TGF- $\beta$  e SMAD1/5/8 per BMP), che formano complessi con SMAD4 e traslocano nel nucleo, dove regolano l'espressione dei geni target. Il pathway è modulato negativamente da SMAD6 e SMAD7. From: Danesino et al., 2023

## ***ENG***

Il gene dell'Endogлина (*ENG*) rappresenta uno dei principali loci associati all'HHT ed è stato il primo gene identificato nella patogenesi di questa malattia (McAllister et al., 1994). Studi di linkage hanno localizzato il locus associato alla HHT nella regione del cromosoma (9q34.11; Fernández-Ruiz et al., 1993).

*ENG* presenta coordinate genomiche sul chr 9: 127,811,130-127,855,232 (GRCh38) ed è trascritto dal filamento reverse. Il gene codifica per una glicoproteina di membrana appartenente alla famiglia dei co-recettori di tipo III della superfamiglia TGF- $\beta$ , altamente espressa nelle cellule endoteliali. Endogлина partecipa alla regolazione della segnalazione TGF- $\beta$ /BMP e contribuisce al mantenimento dell'omeostasi vascolare. Mutazioni nel gene *ENG* (OMIM \*131195) sono responsabili della forma HHT di tipo 1 (HHT1; OMIM #187300) e determinano prevalentemente un meccanismo di aploinsufficienza, con conseguente riduzione dei livelli di Endogлина funzionale sulla superficie delle cellule endoteliali. Tale alterazione compromette la corretta trasduzione del segnale e contribuisce allo sviluppo delle caratteristiche malformazioni vascolari tipiche della malattia (Snodgrass et al., 2021).

### **Organizzazione strutturale e isoforme**

Endogлина (*ENG* o CD105) è una glicoproteina transmembrana di tipo I di circa 180 kDa che funge da co-recettore per i ligandi della superfamiglia TGF- $\beta$  ed è espressa prevalentemente nelle cellule endoteliali e nei monociti attivati, dove svolge un ruolo cruciale nei processi di angiogenesi (Arthur et al., 2000). La proteina è presente sulla superficie cellulare come omodimero costituito da due subunità di circa 95 kDa, stabilizzate da ponti disolfuro, ed è altamente conservata tra le diverse specie.

Nel genoma umano, il gene *ENG* è composto da 15 esoni ed è soggetto a splicing alternativo, che consente la generazione di diverse varianti trascrizionali; tuttavia, le principali isoforme proteiche risultanti sono rappresentate dalla L-Endogлина e dalla S-Endogлина (Schoonderwoerd et al., 2020).

L'isoforma più rappresentata è L-ENG, composta da 561 amminoacidi che compongono un grande dominio extracellulare, una singola regione transmembrana idrofobica e una breve coda citoplasmatica (Gougos et al., 1990). Il dominio extracellulare, che rappresenta la porzione predominante della proteina, è coinvolto nel legame con i ligandi e nella formazione dei complessi recettoriali. In questa regione sono presenti numerosi siti di glicosilazione, inclusi siti N-linked e una regione ricca in serina e treonina compatibile con modificazioni O-glicosidiche, fondamentali per la corretta maturazione, il folding e la stabilità della proteina sulla superficie cellulare. (López-Novoa et al., 2010).

Endogлина appartiene alla famiglia delle proteine contenenti il dominio ZP (nella regione extracellulare), una sequenza altamente conservata di circa 260 amminoacidi coinvolta nelle interazioni proteina-proteina e nella stabilizzazione strutturale del recettore (Jovine et al., 2005).

La porzione N-terminale presenta invece un dominio privo di omologia significativa con altre famiglie proteiche, definito "orphan domain", mentre è presente una sequenza Arg-Gly-Asp (RGD) implicata nei processi di adesione cellulare e nelle interazioni con componenti della matrice extracellulare (Llorca et al., 2007).

La coda citoplasmatica di Endogлина è relativamente corta, coerentemente con la sua funzione di co-recettore, ed è soggetta a fosforilazione da parte di chinasi serina/treonina, inclusi i recettori di tipo I e II della superfamiglia TGF- $\beta$  (Guerrero-Esteo et al., 2002). Inoltre, essa contiene un motivo di legame per proteine con dominio PDZ, coinvolto nella regolazione delle interazioni intracellulari e nella modulazione della localizzazione subcellulare della proteina (Bernabeu et al., 2009).

Sono state descritte due principali isoforme di Endogлина, generate mediante splicing alternativo: la forma lunga (L-Endogлина) e la forma corta (S-Endogлина), presenti sia nei tessuti umani che murini. Le due isoforme differiscono per la lunghezza della coda citoplasmatica, pari a 47 amminoacidi nella L-Endogлина e 14 amminoacidi nella S-Endogлина (Bellón et al., 1993). La L-Endogлина rappresenta la forma predominante nelle cellule endoteliali ed è associata alla promozione della segnalazione attraverso il pathway ALK1-SMAD1/5/8, favorendo processi quali proliferazione e migrazione cellulare. Al contrario, la S-Endogлина sembra essere coinvolta nella modulazione della segnalazione mediata da ALK5-SMAD2/3 ed è stata associata a effetti regolatori o inibitori della risposta

endoteliale, sebbene il suo ruolo non sia ancora completamente chiarito (Velasco et al., 2008).

Oltre alla forma di membrana, è stata descritta una forma solubile di Endogлина (sENG), derivante dal clivaggio proteolitico del dominio extracellulare. Questa forma circolante è in grado di legare ligandi della superfamiglia TGF- $\beta$ , agendo come modulatore negativo della segnalazione e contribuendo alla regolazione dei processi angiogenici e della funzione endoteliale (Venkatesha et al., 2006).

### **Coinvolgimento di Endogлина nell'HHT di tipo 1**

Endogлина è una glicoproteina prevalentemente espressa nelle cellule endoteliali, dove svolge un ruolo centrale nella regolazione dell'angiogenesi, contribuendo al mantenimento dell'integrità vascolare e alla modulazione della dinamica migratoria delle cellule endoteliali. Inoltre, Endogлина contribuisce al corretto sviluppo e rimodellamento della rete vascolare, processi essenziali per garantire la stabilità e la funzionalità dei vasi sanguigni (Alt et al., 2012).

L'importanza biologica di Endogлина è stata ampiamente dimostrata in modelli animali: topi knock-out per il gene *ENG* presentano una letalità embrionale precoce, associata a gravi difetti nello sviluppo vascolare e a un'alterata organizzazione del plesso vascolare. Questi dati evidenziano il ruolo cruciale di Endogлина nei processi di angiogenesi durante lo sviluppo embrionale (Arthur et al., 2000).

A livello molecolare, Endogлина agisce come co-recettore della superfamiglia TGF- $\beta$ , contribuendo alla modulazione della segnalazione TGF- $\beta$ /BMP nelle cellule endoteliali. La perdita della funzione di Endogлина determina un'alterazione dell'equilibrio tra i pathway coinvolti nel controllo dell'angiogenesi, compromettendo i meccanismi di regolazione dell'omeostasi vascolare e favorendo lo sviluppo di anomalie vascolari (Goumans et al., 2009a). Endogлина è inoltre coinvolta nei processi di migrazione e rimodellamento delle cellule endoteliali, contribuendo ai cambiamenti morfologici necessari per la formazione e la stabilizzazione dei vasi. Alterazioni di questi processi possono favorire lo sviluppo di anomalie vascolari, tra cui le malformazioni artero-venose caratteristiche della HHT (Bautch, 2017).

Mutazioni nel gene *ENG* sono responsabili della forma HHT di tipo 1 (HHT1) e determinano principalmente un meccanismo di aploinsufficienza, con conseguente riduzione dei livelli di Endogлина funzionale. Questa condizione compromette la corretta trasduzione del segnale TGF- $\beta$ /BMP e altera l'equilibrio tra le vie ALK1 e ALK5, contribuendo alla formazione di vasi anomali e fragili (Abdalla et al., 2006).

Dal punto di vista clinico, la HHT1 è frequentemente associata alla presenza di malformazioni artero-venose, in particolare a livello polmonare e cerebrale. La perdita della funzione di Endogлина porta a un difetto nei meccanismi di maturazione e stabilizzazione vascolare, favorendo la formazione di connessioni dirette tra arterie e vene prive di un adeguato letto capillare (Shovlin, 2010). Recenti evidenze suggeriscono che Endogлина sia espressa anche in cellule del sistema immunitario e contribuisca alla modulazione della risposta immunitaria. In particolare, sembra essere in grado di contrastare gli effetti immunosoppressivi mediati dal TGF- $\beta$  e di influenzare la regolazione dell'ambiente immunitario. Inoltre, è altamente espressa nei vasi tumorali ed è stata proposta come bersaglio terapeutico per l'inibizione dell'angiogenesi tumorale (Schmidt-Weber et al., 2005).

Infine, studi recenti hanno evidenziato come Endogлина partecipi alla risposta delle cellule endoteliali agli stimoli emodinamici, in particolare allo "shear stress" generato dal flusso sanguigno. Alterazioni di questo meccanismo, in presenza di mutazioni in *ENG*, compromettono i processi di rimodellamento vascolare dipendenti dal flusso, contribuendo alla formazione di malformazioni artero-venose caratteristiche della HHT (Baeyens et al., 2016).

### **Classificazione e caratteristiche delle varianti del gene *ENG***

Le varianti nel gene *ENG* associate alla HHT sono eterogenee e comprendono diverse tipologie di alterazioni genomiche che determinano, nella maggior parte dei casi, una perdita di funzione della proteina. La distribuzione di tali varianti interessa prevalentemente la regione codificante del gene, sebbene siano state descritte anche alterazioni nelle regioni non codificanti, incluse le sequenze regolatorie e le regioni UTR, in grado di influenzare i livelli di espressione genica (Shovlin et al., 2024).

Dal punto di vista molecolare, le varianti di *ENG* possono essere classificate in diverse categorie, tra cui mutazioni nonsense, frameshift, missenso, varianti nei siti di splicing e alterazioni nelle regioni non codificanti.

Le mutazioni nonsense e frameshift introducono codoni di stop prematuri, determinando la produzione di trascritti instabili frequentemente soggetti a degradazione attraverso il meccanismo di nonsense-mediated mRNA decay (NMD), con conseguente riduzione dei livelli di Endogлина funzionale (Lenato & Guanti, 2006). A supporto di questo meccanismo, sono state descritte specifiche varianti associate alla produzione di trascritti instabili o non rilevabili a livello di cDNA. In particolare, è stata riportata una delezione genomica estesa comprendente gli esoni 9A–14, che coinvolge il sito di poliadenilazione e determina verosimilmente un trascritto instabile. Inoltre, una mutazione nonsense localizzata nell'esone 4, come la variante c.511C>T (p.Arg171\*) è risultata non rilevabile a livello di cDNA, suggerendo una rapida degradazione del trascritto (Shovlin et al., 1997). Sono stati inoltre descritti alleli nulli derivanti da mutazioni a carico del codone di inizio della traduzione (ATG), come la variante *ENG*: c.2T>C, che determina una sostituzione metionina-treonina e impedisce la corretta sintesi della proteina (Gallione et al., 1998).

Le varianti missenso determinano la sostituzione di un singolo amminoacido e possono alterare il corretto ripiegamento della proteina o la sua localizzazione sulla superficie cellulare. In alcuni casi, queste mutazioni possono interferire con la formazione del dimero di Endogлина o con la sua capacità di interagire con altri componenti del complesso recettoriale, compromettendone la funzione (Ruiz-Llorente et al., 2017).

Le varianti nei siti di splicing possono determinare un'alterazione del processamento dell'mRNA, con conseguente esclusione di esoni o inclusione di sequenze introniche, generando proteine aberranti o non funzionali. Inoltre, varianti localizzate nelle regioni non codificanti, come le 5'-UTR, sono state associate alla creazione di siti di inizio della traduzione alternativi o a modificazioni della regolazione trascrizionale, con effetti sui livelli di espressione della proteina. In particolare, alcune varianti localizzate nella regione 5'-UTR di *ENG* sono state descritte come potenzialmente patogenetiche, in quanto in grado di alterare l'inizio della traduzione e i livelli di espressione della proteina. Ad esempio, la variante c.-127C>T è stata associata alla creazione di un nuovo sito di inizio della traduzione, determinando la produzione di una proteina aberrante e non funzionale (Damjanovich et al., 2011). Analogamente, varianti come c.-79C>T e c.-68G>A sono state descritte come responsabili della formazione di upstream open reading frames (uORFs), con

conseguente riduzione dei livelli di Endoglin e compromissione della sua funzione (Soukarieh et al., 2023).

Nel complesso, la maggior parte delle varianti patogenetiche di *ENG* determina una perdita di funzione della proteina, coerentemente con il meccanismo di aploinsufficienza osservato nella HHT1. I dati disponibili nei database genetici, come ClinVar, evidenziano che le varianti più frequenti includono frameshift, mutazioni nei siti di splicing e mutazioni nonsense, mentre le varianti missenso rappresentano una quota significativa ma con effetti funzionali variabili (Landrum et al., 2018).

### ***ACVRL1***

Il gene *ACVRL1* (OMIM \*601284; Activin A Receptor Type II Like 1) rappresenta uno dei principali loci associati alla Teleangectasia Emorragica Ereditaria (HHT) ed è responsabile della forma HHT di tipo 2 (OMIM #600376). *ACVRL1* codifica per il recettore di tipo I ALK1, una chinasi serina/treonina appartenente alla superfamiglia dei recettori del Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), coinvolta nella regolazione della segnalazione TGF- $\beta$ /BMP nelle cellule endoteliali (Johnson et al., 1996).

Il gene è localizzato sul cromosoma 12, in posizione 12q13.13, e si estende nella regione genomica compresa tra chr12:51,907,504–51,923,361 (GRCh38) ed è trascritto sul filamento forward. La sua espressione è prevalentemente osservata nelle cellule endoteliali, dove svolge un ruolo cruciale nella regolazione dell'angiogenesi e nel mantenimento dell'omeostasi vascolare. In particolare, ALK1 media la trasduzione del segnale indotto dai ligandi BMP9 e BMP10, promuovendo l'attivazione delle SMAD1/5/8 e contribuendo al controllo della risposta endoteliale (Goumans et al., 2009).

Mutazioni nel gene *ACVRL1* determinano una perdita di funzione del recettore ALK1, alterando la trasduzione del segnale TGF- $\beta$ /BMP e compromettendo i meccanismi di regolazione dell'angiogenesi. Analogamente a quanto osservato per *ENG*, anche per *ACVRL1* il meccanismo patogenetico principale è rappresentato dall'aploinsufficienza, che porta allo sviluppo di anomalie vascolari caratteristiche della HHT (McDonald et al., 2015).

## Organizzazione strutturale

Il gene *ACVRL1* si estende per oltre 15 kb e il trascritto codificante dà origine a una proteina di 503 amminoacidi. La regione codificante è organizzata in nove esoni, con il codone di inizio localizzato nell'esone 2 e il codone di terminazione nell'esone 10 (Berg et al., 1997). Gli introni del gene seguono generalmente la regola canonica GT-AG, ad eccezione dell'introne 6, che presenta una sequenza di giunzione atipica. Sono state inoltre descritte due varianti della regione 5' non tradotta (5'-UTR) di *ACVRL1*: nella prima, la sequenza 5'-UTR è interamente contenuta nell'esone 2, mentre nella seconda deriva dallo splicing dell'esone 1 con una giunzione localizzata pochi nucleotidi a monte del codone di inizio, mentre il resto della sequenza rimane invariato (Attisano et al., 1993; ten Dijke et al., 1993).

Dal punto di vista strutturale, ALK1 è una proteina transmembrana di tipo I appartenente alla superfamiglia dei recettori del Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), caratterizzata da un'elevata omologia con gli altri recettori di tipo I, in particolare nei sottodomini chinasi serina/treonina, nel dominio GS e nella porzione C-terminale (ten Dijke et al., 1994). La proteina matura è organizzata in quattro regioni principali: un peptide segnale (SP), che viene rimosso durante il processamento, un dominio extracellulare ricco in residui di cisteina coinvolto nel legame con i ligandi, una singola regione transmembrana e un dominio intracellulare dotato di attività chinasi. Il dominio extracellulare contiene 10 residui di cisteina conservati, che contribuiscono alla stabilità strutturale della proteina, e un potenziale sito di N-glicosilazione (Abdalla et al., 2003). Il dominio intracellulare comprende una regione ricca in glicina e serina (dominio GS), localizzata in posizione juxtamembrana (residui 172–201), che svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dell'attività chinasi del recettore, e il dominio chinasi vero e proprio (residui 202–492), responsabile della fosforilazione delle proteine SMAD1/5/8.

ALK1 presenta un elevato grado di omologia con gli altri recettori di tipo I, in particolare per quanto riguarda il dominio GS, i sottodomini della chinasi serina/treonina e la porzione C-terminale, mentre il dominio extracellulare mostra caratteristiche strutturali distintive (Ten Dijke et al., 1994). È stato inoltre osservato che ALK1 è privo del residuo fenilalanina in posizione 85 (F85), coinvolto solitamente nelle interazioni idrofobiche tra i ligandi BMP e i recettori di tipo I (González-Núñez et al., 2013; Groppe et al., 2008). Questa caratteristica strutturale conferisce ad ALK1 una modalità di legame peculiare, che potrebbe contribuire

a spiegare la maggiore affinità di BMP9 per questo recettore rispetto ad altri membri della famiglia BMPs (David et al., 2009).

## **Coinvolgimento di ALK1 nell'HHT di tipo 2**

La maggior parte delle mutazioni a carico del gene *ACVRL1* determina la produzione di proteine instabili e non funzionali, con conseguente riduzione dei livelli di recettore ALK1 funzionale. Questo dato supporta il modello dell'aploinsufficienza come principale meccanismo patogenetico alla base della HHT2 (Abdalla et al., 2006).

A livello molecolare, ALK1 svolge un ruolo centrale nella regolazione della segnalazione TGF- $\beta$ /BMP nelle cellule endoteliali, mediando in particolare la risposta ai ligandi BMP9 e BMP10 e promuovendo l'attivazione della via SMAD1/5/. La riduzione della funzione di ALK1 compromette questi pathway, alterando i meccanismi di controllo della proliferazione e della migrazione delle cellule endoteliali (Goumans et al., 2009). In condizioni fisiologiche, la segnalazione mediata da ALK1 contribuisce al corretto rimodellamento della rete vascolare e al mantenimento dell'omeostasi endoteliale. La sua alterazione determina una risposta endoteliale disorganizzata, con formazione di vasi immaturi e instabili. Inoltre, è stato dimostrato che ALK1 è coinvolto nella risposta delle cellule endoteliali agli stimoli emodinamici, in particolare allo shear stress, e che la sua perdita di funzione compromette i processi di rimodellamento vascolare dipendenti dal flusso (Baeyens et al., 2016).

Queste alterazioni favoriscono la formazione di malformazioni artero-venose (AVMs), caratterizzate da connessioni dirette tra arterie e vene prive di un adeguato letto capillare, che rappresentano una delle principali manifestazioni della HHT (Shovlin, 2010).

## **Classificazione e caratteristiche delle varianti del gene *ACVRL1***

Le varianti patogenetiche del gene *ACVRL1* sono eterogenee e comprendono mutazioni missenso, nonsense, frameshift, varianti a carico dei siti di splicing e delezioni genomiche, determinando nella maggior parte dei casi una perdita di funzione del recettore ALK1 (Letteboer et al., 2005). Dal punto di vista della distribuzione lungo la proteina, circa il 75%

delle mutazioni di *ACVRL1* è localizzato nel dominio intracellulare, in particolare nel dominio chinasi, mentre una quota minore interessa il dominio extracellulare e solo una percentuale limitata la regione transmembrana. Questa distribuzione evidenzia il ruolo centrale del dominio chinasi nella funzione del recettore ALK1 e nella patogenesi della HHT2 (Abdalla et al., 2006).

Le varianti patogenetiche non risultano distribuite uniformemente lungo il gene, ma tendono a concentrarsi in specifiche regioni hotspot. In particolare, gli esoni 3, 7 e 8 rappresentano le regioni più frequentemente coinvolte, come evidenziato sia nei database mutazionali sia in coorti europee. L'esone 3, che codifica per il dominio extracellulare, è spesso interessato da mutazioni che coinvolgono residui altamente conservati, fondamentali per la stabilità strutturale e il corretto legame con il ligando (Olivieri et al., 2007).

Nel dominio chinasi intracellulare, le mutazioni missenso colpiscono frequentemente residui conservati tra specie e tra i diversi recettori di tipo I, suggerendo un impatto diretto sull'attività catalitica del recettore. Studi di modellamento strutturale indicano che tali sostituzioni possono alterare proprietà fondamentali degli amminoacidi, come carica, polarità o idrofobicità, determinando un errato ripiegamento della proteina e la formazione di strutture instabili e non funzionali. Inoltre, molte varianti determinano la formazione di codoni di stop prematuri o proteine tronche prive del dominio chinasi, compromettendo completamente la capacità del recettore di trasdurre il segnale. Nel complesso, questi dati supportano il modello dell'aploinsufficienza come principale meccanismo molecolare alla base della HHT2 (Abdalla et al., 2006; Bossler et al., 2006).

## ***SMAD4***

Il locus del gene *SMAD4* (OMIM\* 600993), noto anche come *MADH4*, è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 18, nella regione 18q21.2. La localizzazione genomica del gene, secondo il genoma di riferimento GRCh38, è compresa tra le coordinate 18:51,030,633–51,109,256 ed è trascritto dal filamento forward. Il gene *SMAD4* codifica per una proteina appartenente alla famiglia delle SMAD, coinvolte nella via di segnalazione del TGF- $\beta$ , uno dei principali pathway regolatori dei processi cellulari.

Il gene è stato inizialmente associato alla sindrome da poliposi giovanile del colon (Juvenile Polyposis Syndrome, JPS), una patologia autosomica dominante caratterizzata dalla presenza di polipi amartomatosi nel tratto gastrointestinale (Howe et al., 1998). Successivamente, è stato dimostrato che mutazioni in *SMAD4* possono essere responsabili anche della teleangectasia emorragica ereditaria (HHT) o di una forma combinata delle due patologie, nota come sindrome JP-HHT (OMIM#175050; Gallione et al., 2004).

### **Organizzazione strutturale**

La proteina SMAD4 è una proteina intracellulare di 552 amminoacidi, altamente conservata tra le specie, e rappresenta il principale mediatore comune delle vie di segnalazione del Transforming Growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e delle Bone Morphogenic Proteins (BMPs; Shi et al., 2003). A differenza dei recettori di membrana della stessa via, SMAD4 non possiede attività chinastica intrinseca, ma svolge un ruolo centrale nella trasduzione del segnale a livello nucleare.

Dal punto di vista strutturale, SMAD4, in quanto co-SMAD, presenta un'organizzazione conservata tipica della famiglia delle proteine SMAD, caratterizzata dalla presenza di due domini altamente conservati: il dominio MH1 (Mad Homology 1) all'estremità N-terminale e il dominio MH2 all'estremità C-terminale, separati da una regione linker centrale (Heldin et al., 1997). Il dominio MH1 è coinvolto nel legame diretto con il DNA e contiene segnali di localizzazione nucleare (NLS), oltre a una struttura a  $\beta$ -hairpin che media l'interazione con le sequenze regolatorie dei geni target (Tzavlaki et al., 2020). In particolare, SMAD4 riconosce specifiche sequenze consenso palindromiche presenti nei promotori dei geni target, note come SMAD-binding elements (SBE), caratterizzate dalla sequenza GTCTAGAC (Vincent et al., 2009).

Il dominio MH2 invece è fondamentale per le interazioni proteina-proteina e per la trasduzione del segnale. In particolare, SMAD4 possiede una regione strutturale conservata, nota come loop L3, che è essenziale per l'interazione con le R-SMAD fosforilate e per la formazione dei complessi trimerici attivi che traslocano nel nucleo (Tzavlaki et al., 2020).

A differenza delle R-SMAD, SMAD4 non contiene il motivo C-terminale Ser-X-Ser (SXS), necessario per la fosforilazione diretta da parte dei recettori TGF- $\beta$  di tipo I, ma agisce come mediatore comune della segnalazione (co-SMAD), formando complessi eteromerici con le R-SMAD attivate e consentendo la traslocazione nucleare del complesso attivo e la

regolazione della trascrizione genica. SMAD4 rappresenta il punto di convergenza delle vie di segnalazione TGF- $\beta$  e BMP, integrando i segnali extracellulari e traducendoli in risposte trascrizionali specifiche. La regione linker che separa i domini MH1 e MH2 presenta una struttura meno conservata e più flessibile, contenente diversi siti di fosforilazione coinvolti nella regolazione della stabilità proteica, della localizzazione subcellulare e dell'attività funzionale di SMAD4 (Xu et al., 2016).

Sono state inoltre descritte diverse varianti trascrizionali generate mediante splicing alternativo, che possono dare origine a isoforme con espressione tessuto-specifica e potenzialmente coinvolte nella modulazione fine della risposta TGF- $\beta$ /BMP (Tao et al., 2010).

Questa organizzazione strutturale consente a SMAD4 di integrare i segnali provenienti dalle diverse vie TGF- $\beta$ /BMP e di coordinare in modo preciso la regolazione trascrizionale dei geni target, evidenziando la stretta relazione tra struttura proteica e funzione biologica.

### **Coinvolgimento di *SMAD4* nella sindrome JP-HT**

La poliposi giovanile del colon (Juvenile Polyposis Syndrome, JPS) è una sindrome ereditaria a trasmissione autosomica dominante, contraddistinta dalla formazione di numerosi polipi lungo l'intero tratto gastrointestinale, associata a un aumentato rischio di sviluppo di neoplasie gastrointestinali. Il termine "juvenile" non si riferisce all'età di insorgenza della malattia, bensì all'aspetto istologico dei polipi, caratterizzati da una superficie liscia e non irregolare (Zbuk & Eng, 2007).

La diagnosi clinica di JPS si basa su criteri ben definiti, che includono la presenza di almeno cinque polipi giovanili nel colon-retto, la presenza di polipi giovanili in altri tratti del tratto gastrointestinale, oppure la presenza di qualsiasi numero di polipi giovanili in un individuo con una storia familiare positiva per JPS (Jass et al., 1988).

Dal punto di vista genetico, mutazioni germinali nei geni *SMAD4* e *BMPRIA* sono responsabili della maggior parte dei casi di JPS, rappresentando complessivamente circa il 50–60% dei casi descritti. In particolare, le mutazioni nel gene *SMAD4* sono associate a una forma sindromica caratterizzata dalla coesistenza delle manifestazioni tipiche della poliposi giovanile e della teleangectasia emorragica ereditaria (HHT), definita come sindrome JP-HHT (Gallione et al., 2004).

*SMAD4* codifica per un mediatore centrale della via di segnalazione TGF- $\beta$ /BMP, coinvolto nella regolazione della proliferazione cellulare, del differenziamento e dell'omeostasi tissutale. Le mutazioni a carico di questo gene determinano un'alterazione della trasduzione del segnale e della regolazione trascrizionale, contribuendo allo sviluppo sia delle lesioni polipoidi del tratto gastrointestinale sia delle anomalie vascolari caratteristiche della HHT (Heldin et al., 1997).

### **Classificazione e caratteristiche delle varianti del gene *SMAD4***

Le varianti patogenetiche del gene *SMAD4* comprendono un ampio spettro di alterazioni genetiche, tra cui mutazioni missenso, nonsense, frameshift, varianti dei siti di splicing e delezioni genomiche, che determinano nella maggior parte dei casi una perdita di funzione della proteina.

Le mutazioni nonsense e frameshift introducono codoni di stop prematuri e sono frequentemente associate alla degradazione del trascritto mediante il meccanismo di nonsense-mediated mRNA decay (NMD), con conseguente riduzione dei livelli di proteina funzionale. Analogamente, le varianti che alterano i siti di splicing possono generare trascritti aberranti o proteine tronche non funzionali (Gallione et al., 2004).

Le varianti missenso rappresentano una quota significativa delle mutazioni descritte e risultano frequentemente localizzate nel dominio MH2, regione cruciale per le interazioni proteina-proteina e per la formazione dei complessi SMAD attivi. Alterazioni in questo dominio possono compromettere la capacità di SMAD4 di interagire con le R-SMAD fosforilate e con i cofattori trascrizionali, determinando una riduzione dell'efficienza della trasduzione del segnale TGF- $\beta$ /BMP (Gallione et al., 2006; Pyatt et al., 2006). Le mutazioni localizzate nel dominio MH1, sebbene meno frequenti, possono interferire con il legame al DNA e con la regolazione della trascrizione genica.

Nel complesso, la maggior parte delle varianti di SMAD4 è associata a una perdita di funzione della proteina, supportando un modello patogenetico basato sull'aploinsufficienza. Tuttavia, in alcuni casi, è stato suggerito che specifiche mutazioni possono determinare effetti dominanti negativi o alterazioni selettive della funzione trascrizionale, contribuendo alla variabilità fenotipica osservata nei pazienti con sindrome JP-HHT (Gallione et al., 2010).

## ***GDF2***

Il gene *GDF2* (Growth Differentiation Factor 2), noto anche come *BMP9* (Bone Morphogenetic Protein 9), è localizzato sul cromosoma 10 (10q11.22) e si estende nella regione genomica compresa tra chr10:47,322,454–47,327,588 (GRCh38), sul filamento forward. Esso codifica per una proteina appartenente alla superfamiglia del Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), coinvolta nelle corrispondenti vie di segnalazione TGF- $\beta$ /BMP.

La proteina BMP9 è sintetizzata come un precursore costituito da un peptide segnale, una regione pro-peptidica che regola il corretto folding e la maturazione proteica, e un dominio C-terminale maturo, responsabile dell'attività biologica. A seguito del processamento proteolitico, BMP9 viene secreto nel circolo sanguigno, dove agisce come ligando circolante ad alta affinità per specifici recettori di membrana.

In particolare, BMP9 si lega ai recettori di tipo I, tra cui ALK1, e ai recettori di tipo II, nonché al corecettore accessorio Endoglina, contribuendo alla regolazione della funzione endoteliale e al mantenimento dell'omeostasi vascolare (Miyazono et al., 2010).

In uno studio condotto su una coorte di 191 individui non imparentati con sospetto clinico di HHT, ma negativi per mutazioni nei geni *ENG*, *ACVRL1* e *SMAD4*, sono state identificate tre varianti patogenetiche nel gene *GDF2* (Wooderchak-Donahue et al., 2013). I pazienti presentavano epistassi e lesioni cutanee compatibili con teleangectasie, suggerendo un ruolo diretto di *GDF2* nello sviluppo di fenotipi vascolari sovrapponibili alla HHT.

È stata inoltre descritta una variante missenso nel gene *GDF2*, c.1282T>C, identificata in soggetti affetti da HHT all'interno della stessa famiglia e associata a una significativa riduzione dei livelli circolanti di BMP9. Studi funzionali hanno dimostrato che tale variante compromette il corretto processamento della proteina precursore, impedendo la formazione della forma matura secreta.

Di conseguenza, tale mutazione comporta una riduzione dell'attivazione della via di segnalazione BMP e una diminuzione dell'espressione dei geni target nelle cellule endoteliali, confermando il ruolo patogenetico delle varianti loss-of-function di *GDF2* nello sviluppo delle anomalie vascolari (Balachandar et al., 2022).

Un'ulteriore variante missenso nel gene *GDF2*, c.950G>A, è localizzata in una regione critica per il processamento della proteina. *GDF2* è infatti sintetizzato come un precursore inattivo che richiede un clivaggio proteolitico mediato dalla proteasi furina per generare la

forma matura biologicamente attiva (Bidart et al., 2012). La variante c.950G>A interessa il sito di riconoscimento della furina, in particolare la posizione P3 del motivo conservato di clivaggio, alterando le interazioni elettrostatiche necessarie per il corretto legame tra enzima e substrato (Brown et al., 2005). Analisi strutturali hanno evidenziato che la sostituzione di un residuo basico con uno neutro riduce l'efficienza del clivaggio proteolitico, determinando una diminuzione della produzione della forma matura di BMP9 (Shiryaev et al., 2013).

Nel complesso, le evidenze disponibili indicano che le varianti patogenetiche di *GDF2* determinano una perdita di funzione del ligando BMP9 attraverso meccanismi differenti, tra cui difetti nel processamento proteolitico, ridotta secrezione o alterata interazione con i recettori. Tali alterazioni convergono in una compromissione della segnalazione mediata da ALK1 e della via SMAD1/5/8, confermando il ruolo centrale della via TGF- $\beta$ /BMP nel mantenimento dell'omeostasi vascolare e nella patogenesi delle malformazioni vascolari caratteristiche della HHT.

## ***RASAI***

Il gene *RASAI* (RAS p21 protein activator 1; OMIM #139150) è localizzato sul cromosoma 5, in posizione 5q14.3 e si estende nella regione genomica compresa tra chr5:87,267,778–87,391,939 (GRCh38), sul filamento positivo. Esso codifica per una proteina citoplasmatica, nota come p120-RasGAP, coinvolta nella regolazione negativa della via di segnalazione RAS/MAPK, attraverso la promozione dell'idrolisi del GTP legato a RAS e la conseguente inattivazione della proteina.

*RASAI* svolge un ruolo fondamentale nel controllo della proliferazione, della migrazione e della sopravvivenza cellulare, risultando essenziale per il corretto sviluppo e mantenimento della rete vascolare. La perdita della funzione di *RASAI* determina un'iperattivazione della via RAS/MAPK, con conseguente alterazione dei processi di angiogenesi e rimodellamento vascolare (Eerola et al., 2003).

L'identificazione dell'associazione tra malformazioni capillari e malformazioni artero-venose (capillary malformation–arteriovenous malformation, CM–AVM; OMIM #608354) ha rappresentato il risultato di studi di linkage condotti su famiglie affette, che hanno portato all'individuazione di mutazioni germinali nel gene *RASAI* (Eerola et al., 2002, 2003). Le malformazioni capillari osservate in questi pazienti presentano caratteristiche peculiari,

essendo tipicamente multifocali, di piccole dimensioni, di forma rotondeggiante e con colorazione rosa-rossastra, e rappresentano il segno clinico cardine della patologia (Revencu et al., 2008).

Queste lesioni cutanee, generalmente asintomatiche, possono essere considerate veri e propri “red flags”, in quanto segnalano la possibile presenza di malformazioni vascolari ad alto flusso sottostanti. In una quota significativa di pazienti, infatti, le malformazioni capillari sono associate a malformazioni artero-venose (AVMs) o fistole artero-venose (AVFs), localizzate in diversi distretti anatomici, tra cui cute, muscolo, arti, volto, cervello e midollo spinale (Eerola et al., 2002; Revencu et al., 2008). Le lesioni intracraniche, spesso di tipo macrofistuloso, possono manifestarsi precocemente nella vita e risultare particolarmente rilevanti dal punto di vista clinico.

Mutazioni eterozigoti nel gene *RASA1* sono quindi associate alla sindrome CM–AVM, caratterizzata dalla presenza di malformazioni capillari cutanee e lesioni vascolari ad alto flusso. Dal punto di vista clinico, tali lesioni risultano generalmente più grandi rispetto alle teleangectasie osservate nella teleangectasia emorragica ereditaria (HHT), pur mantenendo un diametro solitamente inferiore a 1 cm e un aspetto omogeneo (Boon et al., 2005).

In alcuni casi, mutazioni nel gene *RASA1* sono associate alla sindrome di Parkes Weber, una forma più severa caratterizzata dalla presenza di malformazioni artero-venose ad alto flusso associate a ipertrofia degli arti. Questa condizione, inizialmente considerata sporadica, è oggi riconosciuta come parte dello spettro delle *RASA1*-correlate vascular anomalies (Eerola et al., 2003). Tali pazienti possono presentare complicanze emodinamiche rilevanti, tra cui sovraccarico cardiaco e insufficienza cardiaca, sottolineando l'importanza di un corretto inquadramento diagnostico.

Sebbene la sindrome CM–AVM possa essere clinicamente distinta dalla HHT sulla base di specifiche caratteristiche fenotipiche, esiste un significativo overlap tra le due condizioni. In particolare, sono stati descritti pazienti con mutazioni in *RASA1* che presentano epistassi e lesioni cutanee compatibili con teleangectasie, suggerendo possibili meccanismi patogenetici condivisi e rendendo talvolta complessa la diagnosi differenziale (Hernandez et al., 2015). Tuttavia, a differenza della HHT, che coinvolge frequentemente fegato e polmoni, le malformazioni associate a *RASA1* mostrano una distribuzione preferenziale a livello degli arti e del distretto cranio-facciale.

Le varianti patogenetiche del gene *RASAI* sono rappresentate prevalentemente da mutazioni troncanti che introducono codoni di stop prematuri, determinando la produzione di proteine incomplete prive di domini funzionali essenziali, tra cui i domini SH2, SH3 e la regione plekstrin-homology. Tali mutazioni sono generalmente associate a un meccanismo di perdita di funzione della proteina. In rari casi, sono state descritte anche varianti missenso, come la sostituzione p.Cys540Tyr, che interessa un residuo altamente conservato e probabilmente cruciale per la funzione di *RASAI* (Boon et al., 2005).

La distribuzione multifocale delle lesioni e la variabilità clinica osservata nei pazienti suggeriscono che il meccanismo patogenetico non sia completamente spiegato dalla sola mutazione germinale. È stato infatti ipotizzato un modello “two-hit”, in cui una seconda alterazione somatica a livello locale potrebbe essere necessaria per la formazione delle malformazioni vascolari, analogamente a quanto descritto in altre patologie vascolari ereditarie. Tuttavia, i meccanismi molecolari alla base della localizzazione e della formazione delle lesioni multiple rimangono ancora in larga parte non completamente chiariti (Brouillard et al., 2002).

### ***EPHB4***

Il gene *EPHB4* (EPH receptor B4; OMIM #600011) è localizzato sul cromosoma 7 in posizione 7q22.1 e codifica per un recettore tirosin-chinasico transmembrana appartenente alla famiglia dei recettori Eph, coinvolto nella regolazione delle interazioni cellula-cellula e nei processi di sviluppo vascolare (H. U. Wang et al., 1998). In particolare, *EPHB4* è espresso prevalentemente nelle cellule endoteliali venose e interagisce con il suo ligando EFNB2 (ephrin-B2), espresso nelle cellule arteriose, contribuendo alla corretta specificazione artero-venosa durante l’embriogenesi (Bai et al., 2014).

Mutazioni germinali nel gene *EPHB4* sono state identificate come causa di una seconda forma di capillary malformation–arteriovenous malformation, definita CM–AVM2, distinta dalla forma classica associata a mutazioni di *RASAI* (CM–AVM1). Le due condizioni condividono diverse caratteristiche cliniche, tra cui la presenza di malformazioni capillari multifocali e un aumentato rischio di malformazioni vascolari ad alto flusso, ma presentano anche differenze rilevanti ai fini della diagnosi differenziale (Revenu et al., 2008). Le malformazioni capillari in CM–AVM2 sono generalmente di piccole dimensioni, distribuite in modo casuale e spesso associate a caratteristiche peculiari, quali la presenza di Bier spots

e di aree centrali più pallide. Inoltre, nei pazienti con CM–AVM2 si osserva frequentemente la presenza di teleangectasie, in particolare a livello delle labbra, della regione periorale e del torace, elemento che rappresenta un importante criterio distintivo rispetto alla CM–AVM1. Le malformazioni artero-venose (AVMs) e le fistole artero-venose (AVFs) possono essere presenti in entrambe le condizioni, sebbene il rischio complessivo risulti inferiore nella CM–AVM2 rispetto alla CM–AVM1 (18% vs 31%).

Il coinvolgimento del sistema nervoso centrale è meno frequente, ma include tipicamente malformazioni aneurismatiche della vena di Galeno, suggerendo un possibile ruolo di *EPHB4* nello sviluppo di specifiche anomalie vascolari intracraniche. Dal punto di vista clinico, la presenza concomitante di malformazioni capillari e teleangectasie può generare confusione diagnostica con la teleangectasia emorragica ereditaria (HHT). Tuttavia, a differenza della HHT, le malformazioni associate a *EPHB4* interessano prevalentemente il distretto cutaneo, sottocutaneo e muscolare, con coinvolgimento del volto, del collo e degli arti, mentre le AVMs polmonari ed epatiche risultano caratteristiche della HHT.

Le varianti patogenetiche di *EPHB4* sono prevalentemente mutazioni loss-of-function, tra cui varianti nonsense, frameshift e mutazioni dei siti di splicing, che determinano la degradazione dell'mRNA o la produzione di proteine tronche e instabili. Anche le varianti missenso, spesso localizzate nel dominio chinasi, possono compromettere la stabilità della proteina attraverso meccanismi di degradazione lisosomiale (Amyere et al., 2017).

La distribuzione multifocale delle lesioni suggerisce che, analogamente ad altre malformazioni vascolari ereditarie, anche nella CM–AVM2 possa essere coinvolto un meccanismo “two-hit”, in cui una seconda alterazione somatica porta alla completa perdita della funzione di *EPHB4* nelle cellule endoteliali coinvolte (Revencu et al., 2013).

Dal punto di vista molecolare, la segnalazione mediata da *EPHB4* coinvolge pathway intracellulari chiave, tra cui RAS-MAPK-ERK e PI3K-AKT-mTORC1 (Xiao et al., 2012). È stato inoltre dimostrato che *EPHB4* interagisce funzionalmente con p120-RasGAP, codificata dal gene *RASA1*, evidenziando un legame diretto tra le due condizioni CM–AVM1 e CM–AVM2 (Amyere et al., 2017).

Nel complesso, le evidenze indicano che la deregolazione della via *EPHB4*–RAS–ERK rappresenta un meccanismo centrale nella patogenesi delle malformazioni capillari e artero-venose, suggerendo che CM–AVM1 e CM–AVM2 condividano pathway molecolari convergenti nonostante l'origine genetica distinta.

## ***BMPR2***

Il gene *BMPR2* (Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2; OMIM #600799) è localizzato sul cromosoma 2 in posizione 2q33.1 e codifica per un recettore di tipo II appartenente alla superfamiglia del Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), coinvolto nella trasduzione del segnale delle Bone Morphogenetic Proteins (BMPs).

*BMPR2* svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi vascolare, in particolare a livello del circolo polmonare, regolando la proliferazione, la migrazione e l'apoptosi delle cellule endoteliali e delle cellule muscolari lisce vascolari (Machado et al., 2015).

Mutazioni germinali nel gene *BMPR2* rappresentano la principale causa genetica dell'ipertensione arteriosa polmonare ereditaria (Heritable Pulmonary Arterial Hypertension, HPAH), una patologia caratterizzata da un progressivo aumento della resistenza vascolare polmonare e da rimodellamento vascolare (Deng et al., 2000). Le varianti patogenetiche di *BMPR2* comprendono mutazioni nonsense, frameshift, missenso e varianti dei siti di splicing, generalmente associate a un meccanismo di perdita di funzione del recettore. Tali mutazioni determinano una ridotta attivazione della via BMP/SMAD e una deregolazione dei processi cellulari coinvolti nell'omeostasi vascolare.

Sebbene *BMPR2* non sia direttamente coinvolto nella patogenesi della teleangectasia emorragica ereditaria, esso condivide con i geni *ENG*, *ACVRL1* e *SMAD4* la partecipazione alla via di segnalazione TGF- $\beta$ /BMP. Inoltre, sono stati descritti casi in cui mutazioni di *ACVRL1* o *SMAD4* si associano a fenotipi sovrapposti tra HHT e ipertensione polmonare, suggerendo una possibile interazione tra i diversi componenti della via (Trembath et al. 2001; Machado et al., 2015). Nel complesso, *BMPR2* rappresenta un elemento chiave nella regolazione della segnalazione BMP e dell'omeostasi vascolare, e la sua alterazione contribuisce allo sviluppo di patologie vascolari che, pur distinte dalla HHT, condividono meccanismi molecolari comuni.

## **MODELLO “SECOND HIT” IN HHT**

Il modello “second-hit”, originariamente proposto da Alfred Knudson per spiegare la patogenesi dei tumori associati a geni oncosoppressori, rappresenta oggi un paradigma

fondamentale anche nello studio delle malformazioni vascolari ereditarie. Secondo questo modello, la presenza di una mutazione germinale eterozigote non è sufficiente a determinare la formazione della lesione, ma è necessario un secondo evento genetico somatico (“second hit”) che porti alla perdita completa della funzione del gene nelle cellule interessate (Bernabeu et al., 2020).

Nel contesto della teleangectasia emorragica ereditaria (HHT), la base molecolare della patologia è rappresentata da una ridotta espressione dei geni coinvolti, in particolare *ENG* e *ACVRL1*, dovuta a perdita monoallelica e conseguente aplosufficienza. Tale condizione determina una deregolazione della via di segnalazione TGF- $\beta$ /BMP nelle cellule endoteliali, con effetti negativi su proliferazione, migrazione e reclutamento cellulare durante il rimodellamento vascolare e l’angiogenesi (McDonald et al., 2020).

Nonostante l’aplosufficienza sia ampiamente riconosciuta come il principale meccanismo patogenetico della HHT (Abdalla et al., 2006), essa non è sufficiente a spiegare la distribuzione focale delle lesioni vascolari. Infatti, le teleangectasie e le malformazioni artero-venose compaiono solo in specifiche regioni dell’organismo, piuttosto che essere diffuse uniformemente in tutti i tessuti. Questo apparente paradosso ha portato all’introduzione del modello “second-hit” anche per la HHT.

A supporto di questa ipotesi, studi recenti basati su tecnologie di sequenziamento di nuova generazione hanno dimostrato la presenza di mutazioni somatiche a bassa frequenza nelle teleangectasie di pazienti affetti da HHT1 e HHT2. In particolare, Kris Snellings et al. hanno evidenziato come la perdita biallelica di *ENG* o *ACVRL1* sia necessaria per lo sviluppo delle lesioni vascolari, suggerendo che la mutazione germinale rappresenti un evento predisponente, mentre il secondo hit somatico sia determinante per l’insorgenza locale della patologia (Snellings et al., 2019).

Oltre alle mutazioni somatiche, è stato proposto che fattori ambientali e fisiologici possano contribuire alla comparsa delle lesioni vascolari. Tra questi, danno vascolare, infiammazione e stimoli angiogenici rappresentano potenziali trigger in grado di favorire l’attivazione di processi patologici nelle cellule endoteliali già predisposte geneticamente (López-Novoa et al., 2010). Questo modello multifattoriale consente di spiegare la marcata variabilità fenotipica osservata tra pazienti, anche all’interno della stessa famiglia.

Come già discusso nei paragrafi precedenti, un meccanismo analogo è stato ipotizzato anche nelle forme di malformazioni capillari e artero-venose associate ai geni *RASAI* ed *EPHB4*,

nelle quali una seconda alterazione somatica nelle cellule endoteliali risulta probabilmente necessaria per determinare la completa inattivazione della proteina. Questo evento porta all'attivazione aberrante di pathway intracellulari, tra cui RAS/MAPK e PI3K/AKT, contribuendo alla formazione delle lesioni multifocali (Brouillard et al., 2002; Revencu et al., 2013).

Nel complesso, il modello “two-hit” rappresenta un'importante chiave interpretativa per comprendere la patogenesi delle malformazioni vascolari ereditarie. Esso integra il concetto di predisposizione genetica con l'intervento di eventi somatici e fattori ambientali, offrendo una spiegazione plausibile della distribuzione focale delle lesioni e della variabilità clinica osservata. Inoltre, questo paradigma sottolinea come la perdita completa della funzione genica a livello cellulare rappresenti un evento critico per l'insorgenza delle anomalie vascolari, aprendo la strada allo sviluppo di strategie terapeutiche mirate ai pathway molecolari coinvolti.

## **NEXT GENERATION SEQUENCING (NGS)**

Le prime tecniche di sequenziamento del DNA, sviluppate negli anni '70, includono il metodo di Sanger e quello di Maxam-Gilbert, rappresentando la cosiddetta prima generazione di sequenziamento. In particolare, il metodo di Sanger, basato sull'incorporazione di dideossinucleotidi (ddNTPs) che interrompono l'allungamento della catena, ha costituito la base delle moderne tecnologie di sequenziamento ed è tuttora considerato il precursore delle metodologie successive (Kchouk et al., 2017; Sanger et al., 1977). Successivamente, l'introduzione delle tecnologie di Next Generation Sequencing (NGS), a partire dal 2005 con la piattaforma “454”, ha permesso il sequenziamento massivo parallelo di milioni di frammenti di DNA, riducendo drasticamente tempi e costi e rivoluzionando gli studi genomici. Le tecnologie di seconda generazione, note come NGS, sono state sviluppate per superare le limitazioni delle metodiche di prima generazione, consentendo un sequenziamento massivo parallelo del DNA (Kchouk et al., 2017).

Il processo di sequenziamento NGS prevede inizialmente la frammentazione del DNA e la successiva costruzione di librerie di DNA a singolo filamento. Successivamente, i frammenti amplificati vengono sequenziati attraverso cicli di sintesi del DNA complementare, durante i quali l'incorporazione dei nucleotidi viene rilevata attraverso

segnali specifici, permettendo la determinazione della sequenza nucleotidica (Gullapalli et al., 2012). Le tecnologie NGS si basano principalmente su approcci di sequencing by synthesis (SBS) o sequencing by ligation (SBL), che consentono la generazione simultanea di milioni di reazioni di sequenziamento, rendendo possibile l'analisi massiva parallela del DNA (Goodwin et al., 2016).

A seconda della tecnologia utilizzata, il sequenziamento può produrre letture corte (short-read) o lunghe (long-read), ciascuna con specifici vantaggi e limitazioni in termini di accuratezza, copertura e capacità di identificare varianti strutturali (Mandlik et al., 2024).

Le applicazioni possibili di NGS variano in base al loro scopo:

- **sequenziamento de novo:** consente di determinare la sequenza di un genoma in assenza di una sequenza di riferimento. (Shendure & Aiden, 2012).
- **analisi delle varianti geniche:** L'analisi delle varianti genetiche viene generalmente condotta su organismi per i quali è disponibile una sequenza genomica di riferimento. Essa comprende diversi approcci, tra cui il sequenziamento del DNA, il sequenziamento dell'RNA e l'analisi dell'epigenoma. In particolare, il sequenziamento del DNA può essere eseguito mediante diverse strategie, tra cui il sequenziamento dell'intero esoma (Whole Exome Sequencing, WES), il sequenziamento dell'intero genoma (Whole Genome Sequencing, WGS) e il sequenziamento mirato di specifiche regioni genomiche (Ng & Kirkness, 2010).
- **analisi del trascrittoma:** consiste nella sintesi di DNA complementare (cDNA) a partire da molecole di RNA, seguita dal sequenziamento del cDNA ottenuto (Wang et al., 2009).
- **studi dell'epigenoma** e dei processi di regolazione del genoma si avvale ampiamente delle tecnologie di Next Generation Sequencing. In particolare, la tecnica di cromatin immunoprecipitation seguita da sequenziamento (ChIP-seq) è ampiamente utilizzata per analizzare le interazioni tra DNA e proteine, consentendo di identificare le regioni genomiche coinvolte nella regolazione dell'espressione genica (Park, 2009).

Per quanto riguarda la teleangectasia emorragica ereditaria (HHT), l'approccio diagnostico ha subito un'evoluzione significativa nel tempo, passando dal sequenziamento Sanger all'analisi mediante pannelli genici associati a tecniche di MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), fino all'introduzione del Whole Exome Sequencing

(WES). Più recentemente, in ambito di ricerca, è stato progressivamente adottato anche il Whole Genome Sequencing (WGS). La disponibilità di tecnologie di sequenziamento dell'intero esoma e dell'intero genoma ha aperto nuove prospettive, consentendo non solo di facilitare l'identificazione di nuovi geni coinvolti nella patogenesi della malattia, ma anche di individuare possibili modificatori genetici responsabili della variabilità clinica osservata tra i pazienti. Inoltre, tali approcci permettono di ampliare lo spettro dei disordini ereditari correlati alla HHT, contribuendo a una migliore caratterizzazione molecolare della patologia (McDonald et al., 2015).

### **PCR quantitativa (Real-Time PCR)**

La Real-Time PCR (PCR quantitativa in tempo reale, qPCR) rappresenta una delle tecniche più utilizzate per l'analisi quantitativa dell'espressione genica, grazie alla sua elevata sensibilità, specificità e capacità di fornire dati in tempo reale durante il processo di amplificazione (Bustin et al., 2009). Questa metodica consente di monitorare l'accumulo del prodotto di PCR ciclo dopo ciclo, attraverso la rilevazione di un segnale fluorescente proporzionale alla quantità di DNA amplificato (Heid et al., 1996).

L'obiettivo principale della Real-Time PCR è quello di rilevare e quantificare in modo preciso specifiche sequenze di acidi nucleici, anche quando presenti in quantità molto ridotte nel campione.

La tecnica si basa sull'amplificazione di una sequenza target mediante PCR, accompagnata dal monitoraggio in tempo reale del processo di amplificazione attraverso l'emissione di un segnale fluorescente. In particolare, il numero di cicli necessari affinché il segnale fluorescente superi una determinata soglia (threshold) è inversamente correlato alla quantità iniziale di acido nucleico presente nel campione, consentendone la quantificazione.

La possibilità di monitorare l'amplificazione in tempo reale è resa possibile dall'impiego di specifiche strategie di rilevazione basate su molecole fluorescenti.

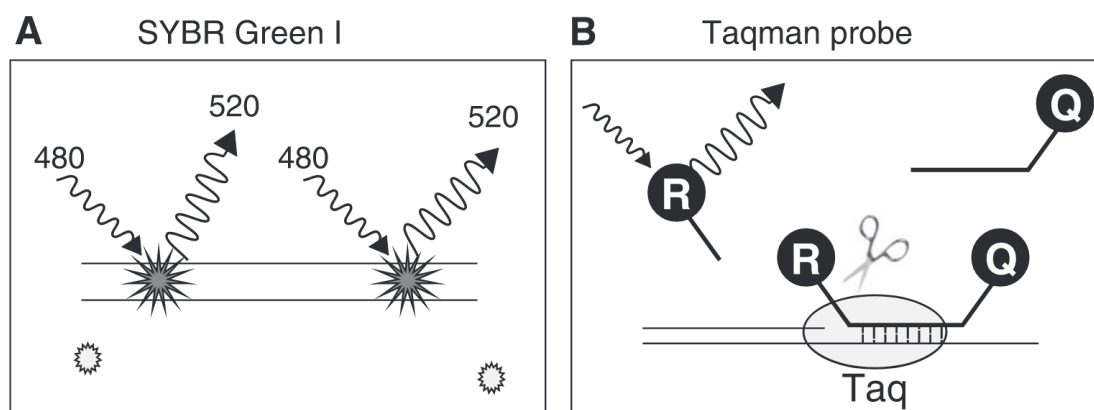
Il prodotto di amplificazione può essere ulteriormente caratterizzato mediante analisi della curva di melting, che prevede l'aumento graduale della temperatura al fine di determinare il punto di dissociazione del doppio filamento di DNA. Tale parametro dipende dalla lunghezza del frammento e dalla sua composizione nucleotidica, rappresentando una proprietà caratteristica del prodotto amplificato (Valasek & Repa, 2005).

Diverse tipologie di chimiche sono state sviluppate per questo scopo, tra cui coloranti intercalanti del DNA, come il SYBR Green, e sonde specifiche, come le sonde TaqMan™ (sonde di idrolisi).

Il SYBR Green I è un colorante che si lega al solco minore del DNA a doppio filamento, emettendo un segnale fluorescente significativamente maggiore rispetto alla forma libera in soluzione. Di conseguenza, l'intensità della fluorescenza aumenta proporzionalmente alla quantità di DNA amplificato durante la reazione (Wittwer et al., 1997). Tuttavia, l'utilizzo di coloranti intercalanti presenta il limite della scarsa specificità, in quanto il segnale fluorescente viene generato da qualsiasi DNA a doppio filamento presente nella reazione, inclusi prodotti aspecifici e primer-dimers. Per questo motivo, è spesso necessario eseguire un'analisi della curva di melting, che consente di valutare la specificità dell'amplificazione in base alla temperatura di dissociazione del prodotto amplificato. La presenza di più picchi nella curva di melting indica la formazione di prodotti multipli e quindi una possibile amplificazione aspecifica (Valasek & Repa, 2005).

Le sonde di idrolisi, note anche come 5'-nuclease probes, rappresentano una delle principali strategie per migliorare la specificità nella Real-Time PCR e sono tra i formati più ampiamente utilizzati. Tra queste, le sonde TaqMan™ costituiscono il sistema più diffuso (Mackay, 2004). Tali sonde sono oligonucleotidi a doppia marcatura, costituiti da un fluoroforo reporter e da un quencher. Quando reporter e quencher si trovano in prossimità, il segnale fluorescente viene soppresso attraverso un meccanismo di trasferimento di energia (FRET). Durante l'amplificazione, l'attività 5'-3' esonucleasica della DNA polimerasi determina la degradazione della sonda, con conseguente separazione di reporter e quencher e liberazione del segnale fluorescente. L'aumento della fluorescenza è quindi direttamente correlato all'amplificazione specifica della sequenza target (Figura 6).

Rispetto ai coloranti intercalanti, le sonde TaqMan™ garantiscono un'elevata specificità, in quanto il segnale fluorescente viene generato esclusivamente in presenza del target specifico, riducendo il rischio di rilevare prodotti aspecifici. A parità di precisione rispetto al SYBR Green, esse offrono una maggiore affidabilità nell'analisi quantitativa (Wilhelm, 2003).



**Figura 6. Principi di rilevazione nella Real-Time PCR.** (A) Il colorante SYBR Green I emette fluorescenza quando si lega al DNA a doppio filamento (dsDNA), assorbendo luce a una lunghezza d'onda di circa 480 nm ed emettendo a circa 520 nm. L'intensità del segnale fluorescente è proporzionale alla quantità di DNA presente. (B) Altri sistemi di rilevazione si basano su sonde fluorescenti specifiche, come nel caso delle sonde TaqMan. Queste sono costituite da un fluoroforo reporter (R) e da un quencher (Q); quando i due sono in prossimità, il segnale del reporter viene soppresso. Durante l'amplificazione, l'attività esonucleasica della DNA polimerasi (Taq) determina la degradazione della sonda, separando reporter e quencher e consentendo l'emissione di un segnale fluorescente rilevabile. (Valasek & Repa, 2005)

In ambito di genetica molecolare, e in particolare nello studio di varianti genetiche associate a patologie come la teleangectasia emorragica ereditaria (HHT), la Real-Time PCR rappresenta uno strumento fondamentale per l'analisi quantitativa dell'espressione genica e per la validazione funzionale di varianti identificate mediante tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS; Bustin et al., 2009).

L'impiego di sonde specifiche, come le sonde TaqMan™, consente di ottenere dati quantitativi più affidabili e riproducibili, risultando particolarmente adatto allo studio funzionale delle varianti genetiche.

## SCOPO DEL LAVORO

A partire dal 1993, il Laboratorio di Ricerca Molecolare sull'HHT del Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università di Pavia ha raccolto un'ampia coorte di campioni biologici di pazienti affetti da HHT, provenienti sia dall'Italia sia da altri Paesi europei. Il laboratorio opera in stretta collaborazione con la Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia, uno dei quattro centri di riferimento nazionali per la diagnosi e la gestione clinica della HHT.

L'attività di ricerca è finalizzata a una comprensione sempre più approfondita dei meccanismi patogenetici alla base della malattia. L'identificazione di varianti patogenetiche nei pazienti con manifestazioni cliniche consente non solo di confermare la diagnosi, ma anche di effettuare uno screening precoce nei familiari a rischio, permettendo l'individuazione di soggetti portatori prima della comparsa dei segni clinici.

La teleangectasia emorragica ereditaria (HHT) è una patologia genetica caratterizzata da un'elevata eterogeneità mutazionale, che rende spesso complessa l'interpretazione funzionale delle varianti identificate, risulta dunque fondamentale affiancare all'analisi genetica strumenti sperimentali in grado di valutare l'impatto delle varianti a livello molecolare.

Questo lavoro di tesi sperimentale si propone di sviluppare e standardizzare un approccio quantitativo per lo studio dell'espressione genica a partire da cDNA ottenuto da campioni di sangue. In particolare, l'obiettivo principale è stato quello di mettere a punto un metodo basato su PCR quantitativa mediante sonde TaqMan™, al fine di valutare in maniera affidabile i livelli di espressione dei geni maggiormente coinvolti nella patologia, in particolare *ENG* e *ACVRL1*. A tal fine, è stato ottimizzato un workflow sperimentale comprendente l'estrazione di RNA da sangue periferico, la retro-trascrizione in cDNA e la successiva analisi quantitativa mediante Real-Time PCR. La standardizzazione del metodo ha incluso la selezione e validazione di sonde specifiche, nonché la definizione delle condizioni sperimentali ottimali per garantire riproducibilità e accuratezza dei risultati.

L'obiettivo finale è quello di fornire uno strumento affidabile per l'analisi funzionale delle varianti genetiche, con potenziali applicazioni in ambito diagnostico e nella caratterizzazione molecolare dei pazienti affetti da HHT.

## **MATERIALI E METODI**

### **Campioni biologici**

I campioni biologici utilizzati in questo studio consistono in sangue periferico prelevato da sei individui sani. Per ciascun soggetto sono stati raccolti 2 mL di sangue in provette contenenti reagente stabilizzante (Tempus™ Blood RNA Tubes), specificamente progettate per la conservazione dell'RNA totale in campioni ematici.

Questo sistema consente la rapida lisi delle cellule ematiche e l'inattivazione delle RNasi endogene, preservando l'integrità dell'RNA e mantenendo stabile il profilo di espressione genica al momento del prelievo. Questo aspetto risulta particolarmente rilevante in studi di espressione genica, in quanto riduce le variazioni dovute a processi degradativi o a modificazioni indotte da condizioni di trasporto e conservazione.

Inoltre, l'utilizzo delle provette Tempus™ permette la raccolta di campioni anche in contesti clinici decentralizzati, garantendo la stabilità del materiale biologico durante il trasporto verso il laboratorio di analisi, senza compromettere la qualità dell'RNA.

I campioni sono stati analizzati presso il Laboratorio di Ricerca Molecolare HHT, presso il Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università di Pavia.

Tutti i campioni sono stati raccolti previo consenso informato, in accordo con le normative etiche vigenti.

### **Estrazione RNA**

L'RNA totale è stato estratto a partire dai campioni di sangue periferico raccolti in provette Tempus™ utilizzando il kit Tempus™ Spin RNA Isolation Kit (Applied Biosystems), seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

Il protocollo di estrazione si basa su una procedura di purificazione mediante cromatografia su colonne a membrana in silice, che permette il legame selettivo degli acidi nucleici in presenza di opportune condizioni chimico-fisiche.

Dopo una fase iniziale di lisi e omogeneizzazione del campione, volta a garantire la completa rottura delle strutture cellulari e la solubilizzazione del contenuto intracellulare, il lisato ottenuto viene caricato sulla colonna. In questa fase, l'RNA viene adsorbito alla membrana, mentre le impurità, quali proteine, lipidi e altri componenti cellulari, vengono rimosse attraverso una serie di lavaggi con soluzioni tampone specifiche.

I successivi passaggi di lavaggio consentono di eliminare contaminanti residuali, migliorando la purezza del campione e garantendo l'ottenimento di RNA di elevata qualità. Questo aspetto risulta fondamentale per le successive applicazioni di biologia molecolare, in quanto la presenza di contaminanti può interferire con le reazioni enzimatiche a valle.

Infine, l'RNA purificato viene eluito mediante l'utilizzo di una soluzione di eluizione priva di nucleasi (Nucleic Acid Purification Elution Solution), come previsto dal protocollo del kit, risultando idoneo per le successive applicazioni di biologia molecolare, in particolare per la sintesi del cDNA e le analisi di espressione genica.

### **Determinazione della concentrazione e della purezza dell'RNA**

La concentrazione e la purezza dell'RNA estratto sono state valutate mediante spettrofotometria utilizzando uno spettrofotometro NanoDrop™ ND-1000 (EuroClone).

Il principio della tecnica si basa sulla misurazione dell'assorbanza della soluzione a specifiche lunghezze d'onda. In particolare, gli acidi nucleici presentano un massimo di assorbimento a 260 nm, dovuto alla presenza delle basi azotate aromatiche. La concentrazione dell'RNA è stata quindi determinata a partire dall'assorbanza misurata a 260 nm, secondo la legge di Lambert-Beer, che correla l'assorbanza alla concentrazione della molecola in soluzione.

Oltre alla quantificazione, è stata valutata anche la purezza dei campioni mediante il calcolo dei rapporti di assorbanza A260/A280 e A260/A230. Il rapporto A260/A280 è indicativo della contaminazione proteica, mentre il rapporto A260/A230 fornisce informazioni sulla presenza di eventuali contaminanti organici o residui di reagenti utilizzati durante le fasi di estrazione. Valori di A260/A280 prossimi a 2.0 e di A260/A230 compresi tra 2.0 e 2.2 sono considerati indicativi di RNA di buona qualità.

Prima di ogni misurazione, lo strumento è stato calibrato utilizzando il buffer di eluizione impiegato durante la fase di estrazione dell'RNA come bianco. Successivamente, per

ciascun campione è stato prelevato 1  $\mu\text{L}$  di soluzione e sottoposto a misurazione per determinarne la concentrazione e la purezza. Ogni lettura è stata effettuata in duplicato.

### **Retrotrascrizione di RNA in cDNA**

La sintesi del DNA complementare (cDNA) è stata effettuata a partire dall'RNA totale estratto utilizzando il kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems), seguendo le istruzioni fornite dal produttore.

La retrotrascrizione rappresenta un passaggio fondamentale nelle analisi di espressione genica, in quanto consente la conversione dell'RNA messaggero (mRNA) in DNA complementare (cDNA), una molecola più stabile e compatibile con le tecniche di amplificazione basate su DNA, come la PCR. Questo processo permette quindi di analizzare indirettamente i livelli di espressione genica a partire dall'RNA presente nei campioni biologici. Tale reazione è mediata dall'enzima trascrittasi inversa, che sintetizza una catena di DNA utilizzando l'RNA come stampo, permettendo così di preservare l'informazione genetica originaria in una forma più facilmente manipolabile.

Il kit utilizzato consente una retrotrascrizione efficiente e riproducibile grazie alla presenza di una miscela ottimizzata di enzimi e primer (in particolare, random examers), che garantiscono la sintesi del cDNA a partire dalle diverse specie di RNA presenti nel campione. La reazione è stata allestita secondo le indicazioni del produttore, utilizzando quantità appropriate di RNA totale e reagenti forniti dal kit (Tabella 2).

<b>Componenti</b>	<b>Volume per reazione</b>	
	<b>RT+</b>	<b>NTC</b>
2X RT Buffer Mix	10.0 $\mu\text{L}$	10.0 $\mu\text{L}$
20X RT Enzyme Mix	1.0 $\mu\text{L}$	1.0 $\mu\text{L}$
Campione RNA	fino a 9 $\mu\text{L}$	-
H <sub>2</sub> O Nucleasi-free	Q.S. $\mu\text{L}$	9.0 $\mu\text{L}$
Volume finale	20.0 $\mu\text{L}$	20.0 $\mu\text{L}$

**Tabella 2.** Composizione della miscela di reazione per la sintesi del cDNA mediante retrotrascrizione, riportante i volumi dei reagenti utilizzati nelle condizioni RT+ (con trascrittasi inversa) e NTC (No Template Control).

Per verificare l'assenza di contaminazioni nei reagenti e nelle condizioni di reazione, sono stati inclusi controlli negativi di amplificazione (NTC, No Template Control), in cui la reazione è stata allestita in assenza di RNA, sostituito con acqua priva di nucleasi.

Le reazioni di retrotrascrizione sono state effettuate utilizzando il termociclatore GeneAmp PCR 9700 (Applied Biosystems), impostato secondo il programma termico previsto dal protocollo del kit, al fine di consentire le diverse fasi enzimatiche necessarie alla sintesi del cDNA.

Programma di amplificazione:

- 1) 37 ° per 60 minuti
- 2) 95° per 5 minuti
- 3) 4 ° ∞

Il cDNA ottenuto è stato successivamente impiegato come template per le analisi di amplificazione mediante PCR e per l'impostazione dell'approccio quantitativo basato su sonde TaqMan™.

Per ciascun campione sono state effettuate tre reazioni di retrotrascrizione, al fine di ottenere una quantità di cDNA sufficiente per le analisi successive. Il numero di retrotrascrizioni è stato definito sulla base dei volumi richiesti per le analisi a valle, prevedendo una quantità leggermente superiore rispetto al minimo necessario.

I prodotti delle tre retrotrascrizioni sono stati successivamente uniti (pooling) per ciascun campione, al fine di ottenere un volume adeguato e garantire una maggiore uniformità nella quantità di cDNA impiegata nelle analisi successive.

### **Verifica dell'efficienza della retrotrascrizione mediante PCR**

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica di biologia molecolare impiegata per ottenere l'amplificazione in vitro di specifiche sequenze di DNA.

La procedura prevede la preparazione di una miscela di reazione contenente tutti i componenti necessari per il processo di amplificazione. Le quantità dei singoli reagenti vengono stabilite in relazione al volume finale della reazione, che può variare in base alle esigenze sperimentali (Tabella 3).

Reagenti PCR	Volumi per reazione
H <sub>2</sub> O	3.9 µL
Buffer di reazione (10x)	1 µL
MgCl <sub>2</sub>	1 µL
dNTPs mix (200µM)	1 µL
Taq DNA Polimerasi FIREpol® (5 U/ µL)	0.1 µL
Primer Forward + primer Reverse (2 µM ciascuno)	1 µL ciascuno
cDNA o DNA	1 µL
<b>TOTALE</b>	<b>10 µL</b>

**Tabella 3. Reagenti per la PCR.** In tabella sono elencati i reagenti con le concentrazioni iniziali e i volumi utilizzati per una reazione di 10 µL di volume finale.

L'efficienza della retrotrascrizione è stata verificata mediante amplificazione PCR del cDNA ottenuto, al fine di confermare la presenza di cDNA nei campioni analizzati.

A tal fine, sono stati utilizzati primers specifici per il gene *ENG*, già disponibili in laboratorio (Tabella 4):

PRIMER	SEQUENZA
qE1F → Forward	5'– GCCACTGGACACAGGATAAG –3'
mEbR → Reverse	5'– GATGTGCGCCTCCTTGTG –3'

**Tabella 4. Sequenze dei primers utilizzati per la verifica dell'efficienza della retrotrascrizione mediante amplificazione PCR del cDNA del gene ENG.**

Le reazioni di PCR sono state eseguite in un termociclatore (S1000™ Thermal Cycler di Bio Rad Laboratories) impostando il seguente programma:

- 1) 95 ° per 5 minuti
  - 2) 95 ° per 40 secondi
  - 3) 60 ° per 40 secondi
  - 4) 72° per 40 secondi
  - 5) 72° per 5 minuti
  - 6) 4 ° ∞
- } 40 cicli

### **Analisi elettroforetica su gel di agarosio**

I prodotti di amplificazione ottenuti mediante PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio, tecnica che consente la separazione dei frammenti di DNA in base alla loro dimensione.

Il gel di agarosio al 1,5% è stato preparato sciogliendo agarosio in soluzione tampone Tris-Borato-EDTA (TBE1X) e portando la miscela ad ebollizione fino a completa solubilizzazione. Dopo un parziale raffreddamento, è stato aggiunto GelRed™ come agente intercalante del DNA, al fine di permettere la visualizzazione delle bande. La soluzione è stata quindi versata in un'apposita vaschetta e lasciata solidificare in presenza di un pettine per la formazione dei pozzetti.

Una volta polimerizzato, il gel è stato posizionato nella cella elettroforetica e ricoperto con tampone di corsa TBE 1X. I campioni sono stati caricati nei pozzetti previa aggiunta di un buffer di caricamento (Orange G), utile per monitorare la migrazione durante la corsa.

Durante la corsa elettroforetica, i frammenti di DNA, carichi negativamente, migrano all'interno del gel verso l'anodo sotto l'effetto del campo elettrico applicato, con una velocità inversamente proporzionale alla loro dimensione.

Al termine della corsa, le bande di DNA sono state visualizzate mediante un sistema di acquisizione con transilluminatore (ChemiDoc®, Bio-Rad). Per la stima della dimensione dei frammenti amplificati è stato utilizzato un marcatore di peso molecolare (DNA ladder).

## **Ricerca in letteratura per la selezione di sonde TaqMan™**

Al fine di individuare studi già pubblicati relativi all'utilizzo di sonde TaqMan™ nello studio dei geni associati all'HHT, è stata effettuata una ricerca in letteratura su PubMed.

La ricerca è stata effettuata utilizzando diverse stringhe di interrogazione, tra cui "TaqMan probe AND HHT", "TaqMan probe AND Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia", "TaqMan AND *ACVRL1*", "TaqMan probe AND ENG" e "TaqMan probe AND Endoglin".

I risultati ottenuti hanno evidenziato una sostanziale carenza di studi riguardanti l'impiego di sonde TaqMan™ per i geni implicati nella malattia; pertanto, il passaggio successivo ha riguardato la selezione delle sonde direttamente sul sito del produttore.

## **Selezione delle sonde TaqMan™**

È stata condotta una ricerca sul sito del produttore Thermo Fisher Scientific, nella sezione dedicata ai saggi TaqMan™ Gene Expression Assays, inserendo i nomi dei geni di interesse, *ACVRL1* ed *ENG*, al fine di individuare sonde disponibili per l'analisi dell'espressione genica.

La selezione è stata effettuata sulla base delle informazioni fornite dal produttore, incluse le mappe di localizzazione all'interno del trascritto e i dati relativi ai trascritti di riferimento, con particolare attenzione alla posizione rispetto agli esoni e alle giunzioni esone-esone. In particolare, sono state privilegiate sonde progettate a cavallo di giunzioni esone-esone e appartenenti alla tipologia *\_m1*, specifiche per il rilevamento di trascritti di mRNA, al fine di garantire la specificità per il cDNA ed evitare l'amplificazione di DNA genomico.

Inoltre, sono state selezionate sonde distribuite lungo diverse regioni del gene, che comprendono porzioni prossimali all'estremità 5', regioni centrali e porzioni prossimali all'estremità 3', al fine di ottenere una copertura rappresentativa del trascritto e ridurre possibili effetti legati alla posizione della sonda rispetto alle variabili che andremo a studiare.

La selezione è stata quindi orientata verso sonde caratterizzate da elevata specificità, riproducibilità e idoneità per applicazioni di analisi quantitativa mediante Real-Time PCR.

## Real-time PCR

L'analisi di espressione genica mediante Real-Time PCR verrà eseguita utilizzando il kit TaqMan™ Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), secondo le indicazioni fornite dal produttore.

La composizione della miscela di reazione e i volumi dei reagenti impiegati per ciascuna reazione sono riportati in Tabella 5.

Componenti	Volume per reazione
TaqMan™ Gene Expression Master Mix (2X)	10.0 µL
TaqMan™ Assay (20X)	1.0 µL
cDNA template + Nuclease-free Water	9.0 µL
Volume totale di reazione	20.0 µL

**Tabella 5. Composizione della miscela di reazione per l'analisi di espressione genica mediante Real-Time PCR.** Sono riportati i volumi dei reagenti utilizzati per ciascuna reazione in modalità singleplex su piastra a 96 pozzetti.

Ogni saggio verrà eseguito in duplicato, al fine di garantire l'affidabilità dei dati ottenuti.

Per ciascun saggio verranno inclusi controlli negativi di amplificazione (NTC, No Template Control), in cui il template è sostituito con acqua priva di nucleasi, al fine di verificare l'assenza di contaminazioni nei reagenti e nelle condizioni di reazione.

Inoltre, saranno inclusi controlli derivanti dalle reazioni di retrotrascrizione negative (Bianco), al fine di escludere eventuali contaminazioni introdotte nelle fasi precedenti.

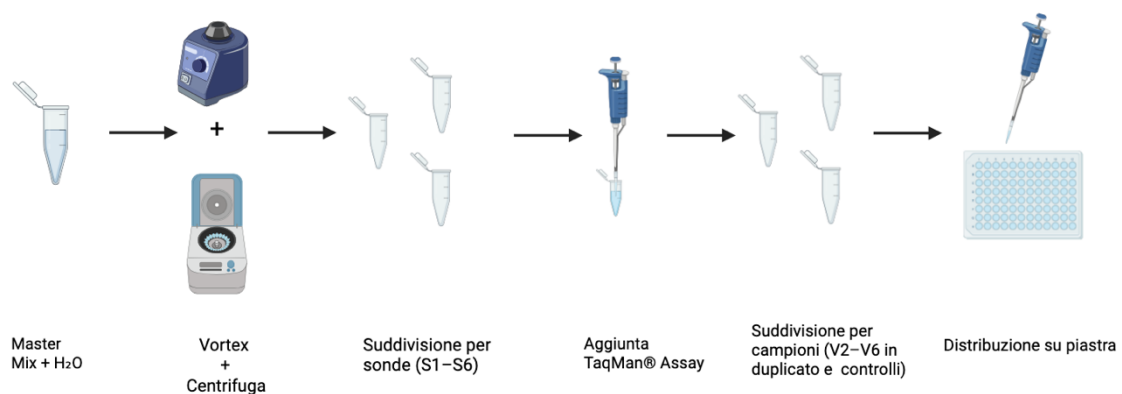
Al fine di garantire una corretta organizzazione delle reazioni e ridurre il rischio di errori di pipettaggio, è stato definito un layout specifico della piastra, riportato in Tabella 6.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	V2 S1	V2 S1	V3 S1	V3 S1	V4 S1	V4 S1	V5 S1	V5 S1	V6 S1	V6 S1	NTC	Bianco
B	V2 S2	V2 S2	V3 S2	V3 S2	V4 S2	V4 S2	V5 S2	V5 S2	V6 S2	V6 S2	NTC	Bianco
C	V2 S3	V2 S3	V3 S3	V3 S3	V4 S3	V4 S3	V5 S3	V5 S3	V6 S3	V6 S3	NTC	Bianco
D	V2 S4	V2 S4	V3 S4	V3 S4	V4 S4	V4 S4	V5 S4	V5 S4	V6 S4	V6 S4	NTC	Bianco
E	V2 S5	V2 S5	V3 S5	V3 S5	V4 S5	V4 S5	V5 S5	V5 S5	V6 S5	V6 S5	NTC	Bianco
F	V2 S6	V2 S6	V3 S6	V3 S6	V4 S6	V4 S6	V5 S6	V5 S6	V6 S6	V6 S6	NTC	Bianco
G												
H												

**Tabella 6. Schema della disposizione dei campioni e dei controlli nella piastra da 96 pozzetti per l'analisi di espressione genica mediante Real-Time PCR.** I campioni (V2–V6) sono stati analizzati in duplicato (colonne affiancate), mentre le righe (S1–S6) corrispondono alle diverse sonde utilizzate. La colonna 11 è dedicata ai No Template Control (NTC) delle retrotrascrizioni, mentre la colonna 12 è dedicata al Bianco della Real-Time PCR.

Al fine di garantire la massima uniformità tra le reazioni e ridurre al minimo la variabilità dovuta alle operazioni di pipettaggio, verrà adottato un workflow standardizzato per l'allestimento della piastra (Figura 7).

Verrà inizialmente preparata una miscela unica (master mix) contenente TaqMan™ Gene Expression Master Mix (2X) e acqua priva di nucleasi, in quantità sufficienti per il numero totale di reazioni previste. Tale scelta sarà possibile in quanto i campioni presentano la stessa concentrazione di cDNA. La miscela verrà successivamente vortexata e centrifugata brevemente per garantirne l'omogeneità. La master mix verrà quindi suddivisa in sei aliquote distinte, corrispondenti alle diverse sonde utilizzate (S1–S6), alle quali verrà aggiunto il rispettivo TaqMan™ Assay (20X). Ciascuna miscela specifica per sonda verrà ulteriormente suddivisa in provette separate per i diversi campioni, includendo anche le condizioni di controllo negativo (NTC) e di controllo senza template. Successivamente, verrà aggiunto il cDNA nelle provette corrispondenti ai campioni, mentre nei controlli NTC verrà aggiunta acqua priva di nucleasi in sostituzione del template. Infine, le miscele di reazione verranno distribuite nei pozzetti della piastra come stabilito dal layout.



**Figura 7. Workflow per l'allestimento delle reazioni di Real-Time PCR.** Il master mix viene preparato e suddiviso in aliquote corrispondenti alle diverse sonde (S1–S6), seguito dall'aggiunta del TaqMan™ Assay, dalla distribuzione nei campioni (in duplicato) e nei controlli negativi, e infine dal caricamento nella piastra. Immagine creata con Biorender.

L'amplificazione verrà condotta utilizzando il profilo termico suggerito dal produttore del kit (Figura 8).

Hold 50°C	Hold 95°C	Denature 95°C	Anneal / extend 60°C
2 minutes	10 minutes	15 seconds	60 seconds

**Figura 8. Profilo termico utilizzato per l'amplificazione mediante Real-Time PCR, secondo le indicazioni del produttore del kit TaqMan® Gene Expression Master Mix.** Il programma prevede una fase iniziale di attivazione enzimatica a 50°C per 2 minuti, seguita da una denaturazione iniziale a 95°C per 10 minuti e da cicli di amplificazione costituiti da denaturazione a 95°C per 15 secondi e annealing/estensione a 60°C per 60 secondi.

Nell'ambito dell'analisi di espressione genica relativa, la selezione di geni di riferimento endogeni rappresenterà un passaggio fondamentale, in quanto consentirà di normalizzare eventuali variazioni nella quantità di campione analizzato. A tal fine, verrà utilizzata la TaqMan™ Express Human Endogenous Control Plate (Figura 9), contenente 32 geni candidati, ciascuno analizzato in triplicato. Tali geni sono stati selezionati sulla base di dati presenti in letteratura e di analisi di espressione su diversi tessuti umani, e sono caratterizzati da un'espressione costitutiva e relativamente stabile.

Gene Symbols	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB
B	ACTB	B2M	HMBS	IPC8	ACTB	B2M	HMBS	IPC8	ACTB	B2M	HMBS	IPC8
C	PGK1	RPLP0	TBP	TFRC	PGK1	RPLP0	TBP	TFRC	PGK1	RPLP0	TBP	TFRC
D	UBC	YWHAZ	PPIA	POLR2A	UBC	YWHAZ	PPIA	POLR2A	UBC	YWHAZ	PPIA	POLR2A
E	CASC3	CDKN1A	CDKN1B	GADD45A	CASC3	CDKN1A	CDKN1B	GADD45A	CASC3	CDKN1A	CDKN1B	GADD45A
F	PUM1	P3MC4	EIF2B1	PES1	PUM1	P3MC4	EIF2B1	PES1	PUM1	P3MC4	EIF2B1	PES1
G	ABL1	ELF1	MT-ATP8	MRPL19	ABL1	ELF1	MT-ATP8	MRPL19	ABL1	ELF1	MT-ATP8	MRPL19
H	POP4	RPL37A	RPL30	RPS17	POP4	RPL37A	RPL30	RPS17	POP4	RPL37A	RPL30	RPS17

**Figura 9. Layout della TaqMan™ Express Human Endogenous Control Plate.**

La piastra verrà utilizzata per valutare la stabilità di espressione dei geni candidati nei campioni analizzati, mediante un'analisi preliminare su una piastra di prova. In particolare, verranno selezionati come geni di riferimento quelli che mostreranno valori di Ct comparabili e con minore variabilità tra i campioni analizzati, così da garantire una corretta normalizzazione dei dati nelle analisi successive.

## RISULTATI

### Campioni biologici

I campioni biologici analizzati provengono da 6 volontari sani, utilizzati come controlli. Il gruppo era composto da 3 soggetti di sesso maschile e 3 di sesso femminile, con un'età compresa tra 21 e 26 anni (Figura 11).

ID	Sesso	Età
V1	M	26
V2	M	25
V3	F	21
V4	F	23
V5	F	23
V6	M	23

Tabella 7. Caratteristiche anagrafiche dei volontari sani inclusi nello studio, con indicazione di ID, sesso ed età (in anni).

### Quantificazione e valutazione della purezza dell'RNA

La quantificazione e la valutazione della purezza dell'RNA estratto dai campioni analizzati hanno evidenziato concentrazioni comprese tra 63 e 118,5 ng/ $\mu$ L, con valori del rapporto A260/A280 compatibili con RNA di buona qualità (Tabella 8). Tali risultati indicano l'idoneità dei campioni alle successive fasi di retrotrascrizione.

ID	ng/ $\mu$ L	260/280	260/230
V1	63,0	2,07	1,97
V2	101,7	2,20	2,39
V3	118,5	2,15	2,32
V4	103,5	2,14	2,11
V5	98,0	2,03	2,39
V6	98,0	2,03	2,43

Tabella 8. Valori di concentrazione e purezza dell'RNA estratto dai campioni analizzati. I valori rappresentano la media di due misurazioni indipendenti effettuate per ciascun campione.

## **Determinazione delle quantità di RNA per la retrotrascrizione**

Al fine di garantire condizioni uniformi di retrotrascrizione tra i campioni inclusi nello studio, è stata effettuata una normalizzazione della quantità di RNA utilizzata in ciascuna reazione. Il campione V1, caratterizzato da una concentrazione inferiore rispetto agli altri, è stato escluso a priori dalle analisi successive ed è stato utilizzato esclusivamente come prova preliminare per verificare il corretto funzionamento del kit di retrotrascrizione.

Tra i campioni inclusi nello studio (V2, V3, V4, V5 e V6), i campioni V5 e V6 presentavano la concentrazione più bassa, pari a circa 98 ng/ $\mu$ L. Sulla base di tale valore, e considerando il volume massimo consentito dal protocollo per la retrotrascrizione (9  $\mu$ L), è stata definita una quantità pari a 882 ng di RNA. Per i restanti campioni, il volume di RNA da utilizzare è stato determinato dividendo tale quantità per la concentrazione di ciascun campione, al fine di ottenere un volume tale da garantire la stessa quantità totale di RNA in tutte le reazioni di retrotrascrizione.

V2: 8,7  $\mu$ L di RNA + 0,3  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O RNasi-free

V3: 7,5  $\mu$ L di RNA + 1,5  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O RNasi-free

V4: 8,7  $\mu$ L di RNA + 0,3  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O RNasi-free

V5: 9  $\mu$ L di RNA

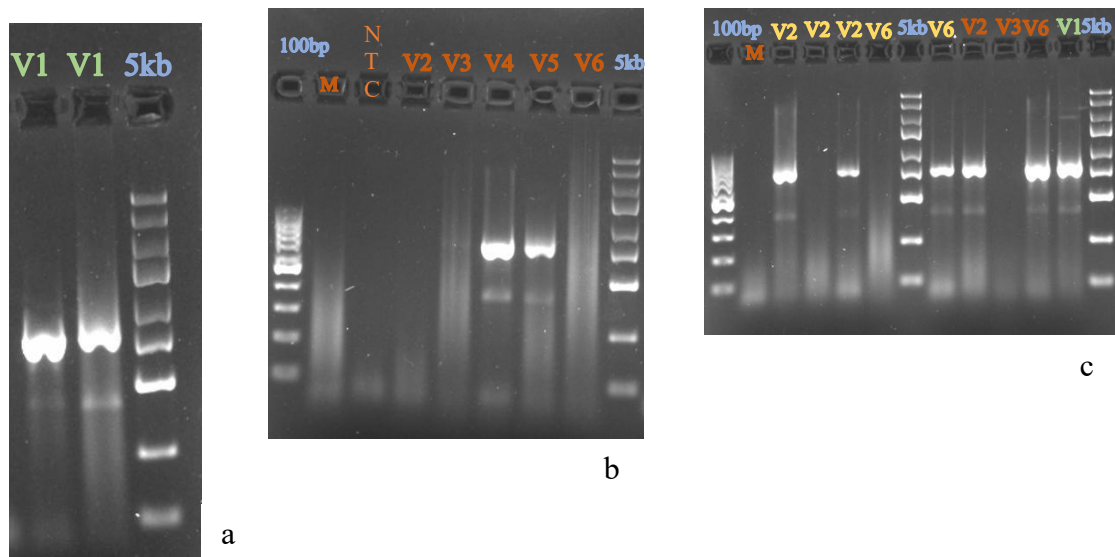
V6: 9  $\mu$ L di RNA

## **Verifica della sintesi del cDNA**

La sintesi del cDNA è stata verificata mediante amplificazione PCR del gene *ENG*, utilizzando primer specifici per la regione che comprende gli esoni dall'1 al 5. I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio, evidenziando la presenza di bande della dimensione attesa (710 bp) nei campioni analizzati, a conferma dell'avvenuta retrotrascrizione.

I controlli negativi non hanno mostrato amplificazione, escludendo la presenza di contaminazioni.

I risultati dell'analisi elettroforetica sono riportanti in Figura 11.



**Figura 10. Analisi elettroforetica su gel di agarosio dei prodotti di PCR.** In tutti i campioni è osservabile una banda della dimensione attesa, a conferma dell'avvenuta retrotrascrizione. Il controllo negativo (NTC) non mostra amplificazione, le mix di reazione (M) non mostrano amplificazione. I marker di peso molecolare sono indicati in blu.

Le immagini riportate confermano il corretto funzionamento della PCR e, di conseguenza, l'avvenuta sintesi del cDNA. Nella Figura 10a si osserva l'amplificazione del campione V1, risultata corretta in entrambe le repliche. La Figura 10b rappresenta invece il primo blocco di retrotrascrizioni effettuato sui restanti campioni, nel quale risultano correttamente amplificati solo i campioni V4 e V5.

Alla luce di questi risultati, si è deciso di ripetere le retrotrascrizioni dei campioni V2 e V6, evitando questa volta il pooling prima della PCR di controllo. Nella successiva analisi sono state inoltre ricaricate anche le precedenti retrotrascrizioni per un ulteriore confronto, confermando la corretta funzionalità anche dei campioni V2 e V6 come si può osservare nella figura 10c.

L'assenza di amplificazione nel campione V3 ha reso necessaria la ripetizione della reazione di retrotrascrizione.

## Ricerca in letteratura per la selezione di sonde TaqMan™

La ricerca in letteratura, condotta come descritto nella sezione Materiali e Metodi, non ha prodotto risultati significativi per quanto riguarda l'utilizzo di sonde TaqMan™ per l'analisi dei geni associati alla teleangectasia emorragica ereditaria. In particolare, le stringhe di ricerca utilizzate non hanno restituito studi pertinenti relativi all'impiego di sonde TaqMan™ per il gene *ACVRL1*, mentre per il gene *ENG* è stato identificato un singolo lavoro di Zhou et al. 2022, in cui è stata utilizzata una sonda TaqMan™ per il gene *ENG* (Assay ID: Hs00923996\_m1, Thermo Fisher) nell'ambito di un'analisi di espressione genica basata su quantificazione assoluta (Zhou et al., 2022).

Nel complesso, tali evidenze indicano un'assenza di protocolli standardizzati per l'analisi quantitativa mediante sonde TaqMan™ dei geni associati alla HHT, evidenziando la necessità di sviluppare approcci metodologici più sistematici, specifici e riproducibili.

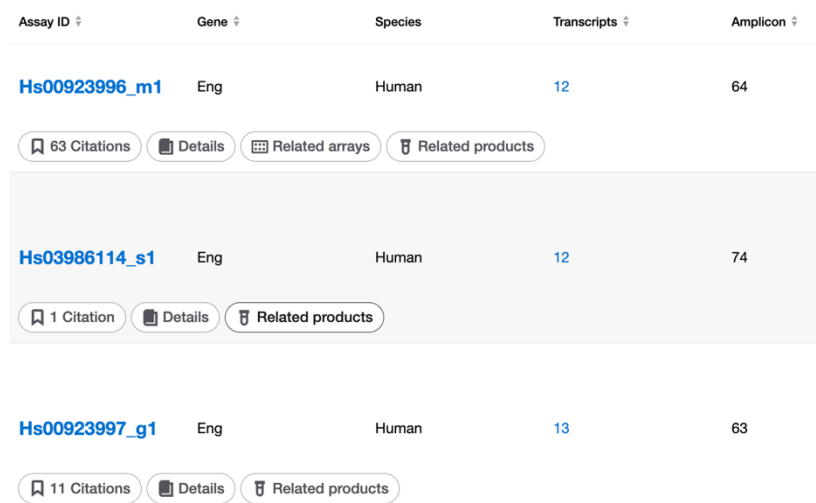
Una ricerca aggiuntiva mediante motori di ricerca ha permesso di individuare un preprint del 2022 ("Identifying transcriptomic downstream targets of genes commonly mutated in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia"), nel quale venivano analizzati i geni *ALK1* (*ACVRL1*) ed *ENG* mediante approccio TaqMan™. Tuttavia, nello studio non vengono specificate le sonde utilizzate per tali geni, limitando la possibilità di utilizzare queste informazioni come riferimento per la progettazione sperimentale.

Nel complesso, la ricerca bibliografica ha evidenziato una scarsa disponibilità di dati in letteratura riguardanti l'utilizzo e la selezione di sonde TaqMan™ per lo studio dell'espressione genica nei geni coinvolti nella HHT.

## Selezione delle sonde TaqMan™

La ricerca condotta sul sito del produttore Thermo Fisher Scientific ha permesso di identificare diverse sonde TaqMan™ disponibili per i geni di interesse, *ENG* e *ACVRL1*, appartenenti a differenti tipologie di assay, tra cui “\_g1”, “\_s1” e “\_m1”.

Le sonde disponibili per ciascun gene sono state visualizzate tramite l’interfaccia del sito del produttore, come mostrato in Figura 11.



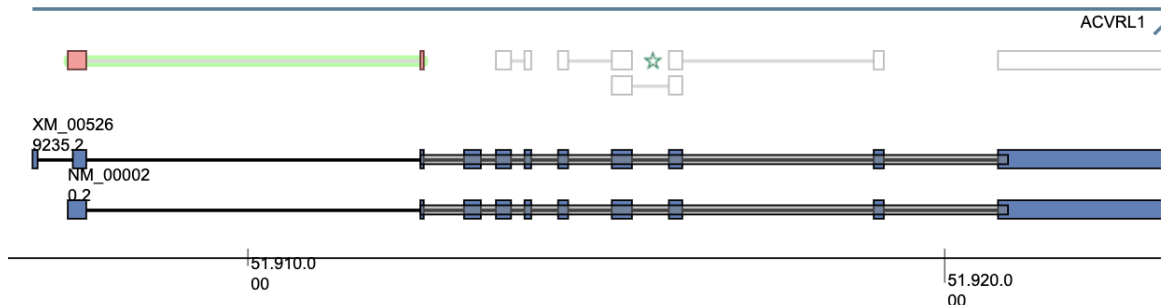
Assay ID	Gene	Species	Transcripts	Amplicon
<a href="#">Hs00923996_m1</a>	Eng	Human	12	64
<a href="#">63 Citations</a> <a href="#">Details</a> <a href="#">Related arrays</a> <a href="#">Related products</a>				
<a href="#">Hs03986114_s1</a>	Eng	Human	12	74
<a href="#">1 Citation</a> <a href="#">Details</a> <a href="#">Related products</a>				
<a href="#">Hs00923997_g1</a>	Eng	Human	13	63
<a href="#">11 Citations</a> <a href="#">Details</a> <a href="#">Related products</a>				

**Figura 11. Esempio di visualizzazione delle sonde TaqMan disponibili per il gene ENG sul sito del produttore Thermo Fisher Scientific.** Sono evidenziate le diverse tipologie di assay (“\_g1”, “\_s1” e “\_m1”) identificabili durante la fase di ricerca. Una distribuzione analoga è stata osservata anche per il gene *ACVRL1*. (Modificato da [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com))

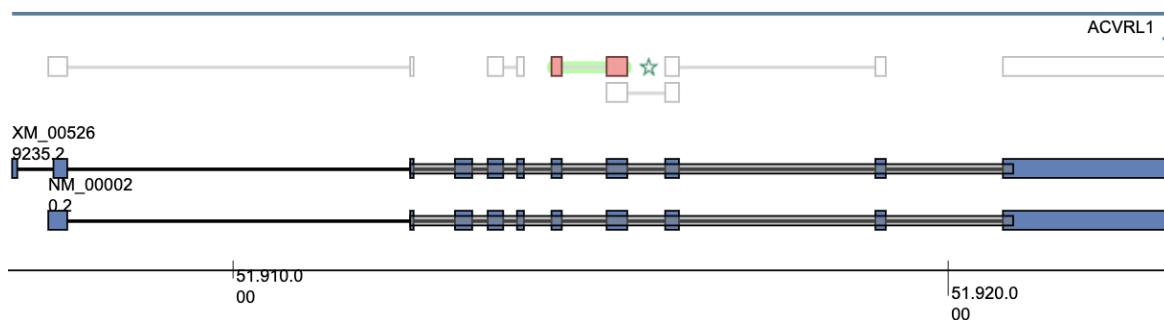
Una prima selezione è stata effettuata sulla base della tipologia di sonda: in particolare, sono state escluse le sonde di tipo “\_g1” e “\_s1”, in quanto potenzialmente meno specifiche per il cDNA e maggiormente suscettibili all’amplificazione di DNA genomico. La selezione è stata quindi focalizzata sulle sonde di tipo \_m1, progettate per il rilevamento di trascritti di mRNA e generalmente localizzate su giunzioni esone-esone.

Tra le sonde di tipo “\_m1”, è stata effettuata un’ulteriore selezione sulla base della loro localizzazione all’interno del gene, privilegiando sonde distribuite lungo diverse regioni del trascritto, comprendenti porzioni prossimali all’estremità 5’, regioni centrali e porzioni prossimali all’estremità 3’, al fine di ottenere una copertura rappresentativa del gene.

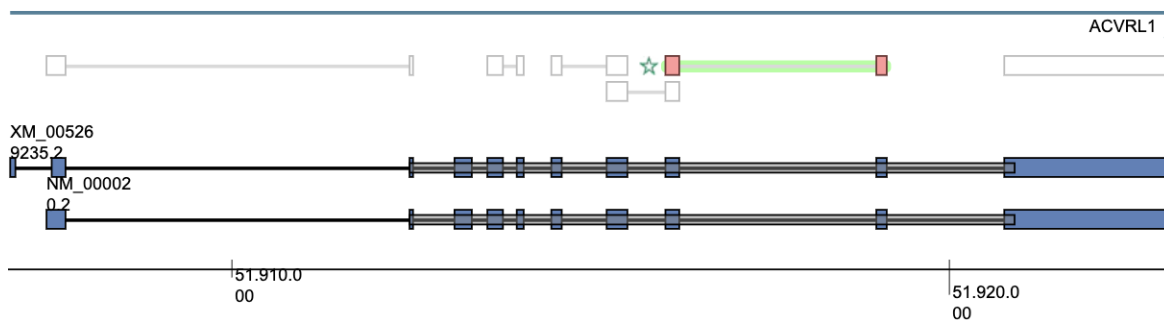
Sulla base di questi criteri, sono state selezionate tre sonde per ciascun gene. Per il gene *ACVRL1*, erano disponibili 7 sonde, di cui 4 sono state escluse perché appartenenti alle categorie “\_g1” e “\_s1”. Le tre sonde rimanenti “\_m1” che sono state selezionate sono le sonde Hs00163543\_m1 (esoni 1–2; Figura 12), Hs00953803\_m1 (esoni 6–7; Figura 13) e Hs00953798\_m1 (esoni 8–9; Figura 14), distribuite lungo le diverse regioni del trascritto.



**Figura 12. Localizzazione della sonda TaqMan Hs00163543\_m1 sul gene ACVRL1, visualizzata tramite il sito del produttore Thermo Fisher Scientific.** La sonda è progettata su una giunzione esone-esone e riconosce una regione conservata tra diversi trascritti del gene, risultando localizzata tra gli esoni 1-2 nel trascritto di riferimento NM\_000020.2.



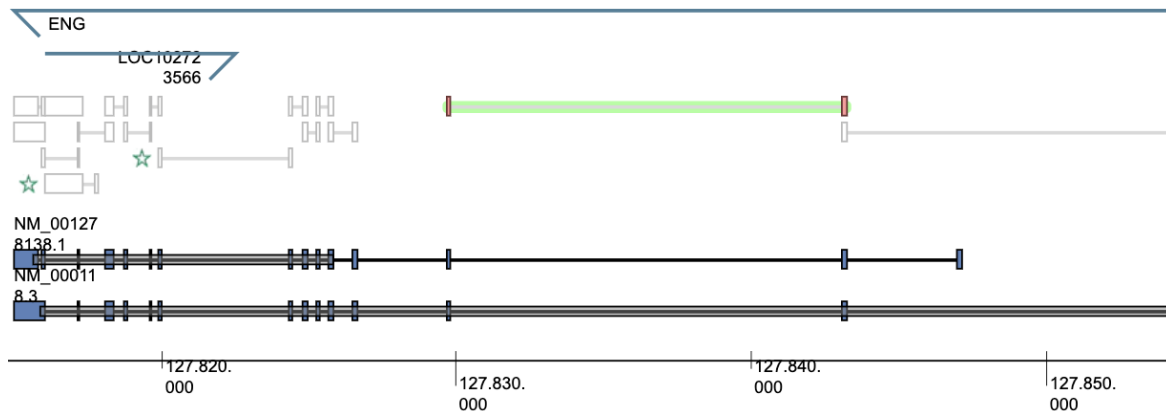
**Figura 13. Localizzazione della sonda TaqMan Hs00953803\_m1 sul gene ACVRL1, visualizzata tramite il sito del produttore Thermo Fisher Scientific.** La sonda è progettata su una giunzione esone-esone e riconosce una regione conservata tra diversi trascritti del gene, risultando localizzata tra gli esoni 6-7 nel trascritto di riferimento NM\_000020.2.



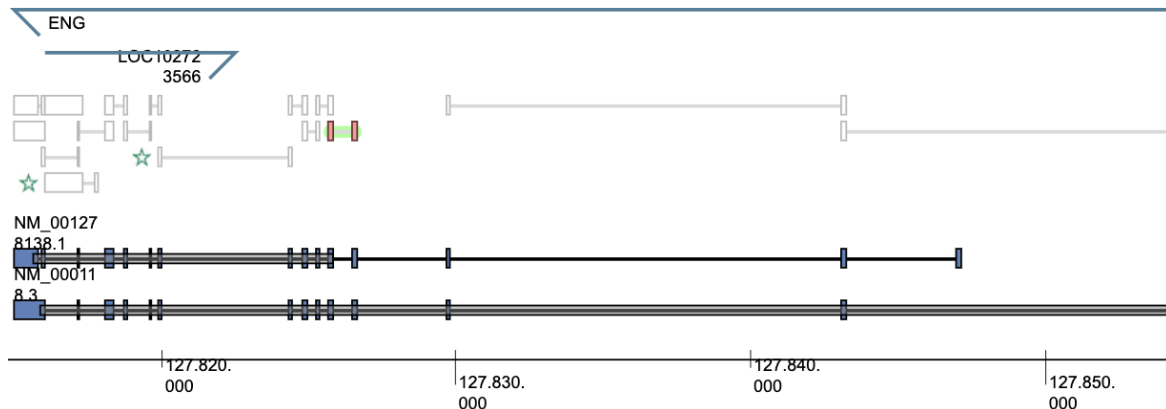
**Figura 14. Localizzazione della sonda TaqMan Hs00953798\_m1 sul gene ACVRL1, visualizzata tramite il sito del produttore Thermo Fisher Scientific.** La sonda è progettata su una giunzione esone-esone e riconosce una regione conservata tra diversi trascritti del gene, risultando localizzata tra gli esoni 8-9 nel trascritto di riferimento NM\_000020.2.

Per il gene *ENG*, erano disponibili 13 sonde, di cui 7 sono state escluse poiché appartenenti alle categorie “\_g1” e “\_s1”. Delle 6 sonde rimanenti, ulteriori 3 sono state escluse poiché non localizzate nelle regioni di interesse. Tuttavia, queste ultime sono state mantenute come possibili alternative nel caso in cui le sonde selezionate non si dimostrassero adeguate.

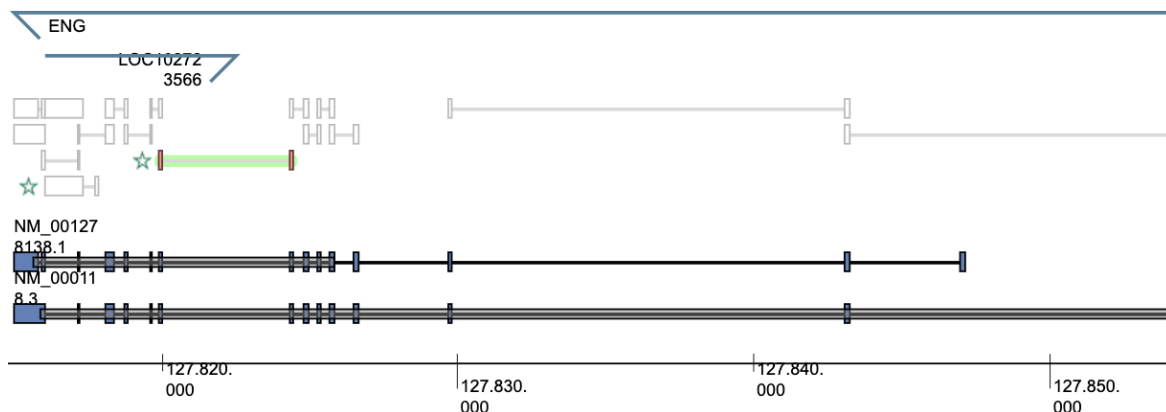
Le 3 sonde “\_m1” che rispondevano ai nostri criteri sono le sonde Hs00164438\_m1 (esoni 2-3; Figura 15), Hs00923992\_m1 (esoni 4-5; Figura 16) e Hs00923996\_m1 (esoni 8-9; Figura 17), distribuite lungo le diverse regioni del trascritto.



**Figura 15. Localizzazione della sonda TaqMan Hs00164438\_m1 sul gene ACVRL1, visualizzata tramite il sito del produttore Thermo Fisher Scientific.** La sonda è progettata su una giunzione esone-esone e riconosce una regione conservata tra diversi trascritti del gene, risultando localizzata tra gli esoni 2-3 nel trascritto di riferimento NM\_000118.3.



**Figura 16. Localizzazione della sonda TaqMan Hs00923992\_m1 sul gene ACVRL1, visualizzata tramite il sito del produttore Thermo Fisher Scientific.** La sonda è progettata su una giunzione esone-esone e riconosce una regione conservata tra diversi trascritti del gene, risultando localizzata tra gli esoni 4-5 nel trascritto di riferimento NM\_000118.3.



**Figura 17. Localizzazione della sonda Hs00923996\_m1 sul gene ACVRL1, visualizzata tramite il sito del produttore Thermo Fisher Scientific.** La sonda è progettata su una giunzione esone-esone e riconosce una regione conservata tra diversi trascritti del gene, risultando localizzata tra gli esoni 8-9 nel trascritto di riferimento NM\_000118.3.

Le sonde così selezionate saranno utilizzate nelle successive analisi quantitative per la valutazione dell'espressione dei geni di interesse *ENG* e *ACVRL1*.

## **Determinazione dei volumi di reazione per l'analisi di Real-Time PCR**

A seguito della retrotrascrizione, effettuata in un volume finale di 20  $\mu\text{L}$ , è stata calcolata la concentrazione del cDNA ottenuto, dividendo la quantità iniziale di RNA (882 ng) per il volume finale di reazione, ottenendo un valore di circa 44 ng/ $\mu\text{L}$ .

Considerando che il protocollo della Real-Time PCR prevede l'utilizzo di una quantità di cDNA compresa tra 10 e 100 ng per reazione, è stato scelto di impiegare 100 ng di cDNA per ciascun campione. Il volume di cDNA da utilizzare è stato quindi determinato dividendo la quantità desiderata (100 ng) per la concentrazione ottenuta (44 ng/ $\mu\text{L}$ ), ricavando un volume di circa 2,3  $\mu\text{L}$  per reazione.

Il volume restante è stato completato con acqua RNasi-free, aggiungendo 6,7  $\mu\text{L}$ , al fine di raggiungere il volume previsto per il campione. Questo metodo consente di mantenere costante la quantità di cDNA tra le diverse reazioni, garantendo condizioni sperimentali uniformi.

Le reazioni così preparate saranno impiegate per l'allestimento della piastra di Real-Time PCR, in accordo con il protocollo descritto nei Materiali e Metodi.

## DISCUSSIONE

La Teleangectasia Emorragica Ereditaria (HHT dall'acronimo inglese), nota anche come sindrome di Rendu-Osler-Weber, è una patologia vascolare rara a trasmissione autosomica dominante, con una prevalenza stimata di circa 1 individuo su 5.000 (Faughnan et al., 2020).

La diagnosi clinica della teleangectasia emorragica ereditaria (HHT) si basa sui criteri di Curaçao, che comprendono epistassi spontanee e ricorrenti, teleangectasie mucocutanee, malformazioni artero-venose viscerali e familiarità per la patologia (Shovlin et al., 2000). Tuttavia, poiché le manifestazioni cliniche della malattia sono spesso età-dipendenti, nei pazienti più giovani non sempre è possibile formulare una diagnosi certa esclusivamente sulla base dei criteri clinici.

I test genetici assumono un ruolo fondamentale, in quanto consentono di identificare la presenza di varianti patogenetiche responsabili della malattia e permettono di ottenere una diagnosi definitiva anche in assenza di un quadro clinico completo. La diagnosi molecolare si basa sulla ricerca di varianti nei principali geni causali noti, tra cui *ENG*, *ACVRL1*, *SMAD4* e *GDF2*, tutti coinvolti nel pathway di segnalazione del TGF- $\beta$ .

È noto che circa il 90% dei pazienti con diagnosi clinica certa di HHT presenta varianti patogenetiche nei geni *ENG* e *ACVRL1*, responsabili rispettivamente delle forme HHT1 e HHT2 (McDonald et al., 2015). Tuttavia, una quota non trascurabile di pazienti, stimata intorno al 10–15%, non mostra alterazioni identificabili mediante le tecniche di analisi molecolare standard, come il sequenziamento dell'esoma (WES) o pannelli genici mirati (Hammill et al., 2021). Questo dato evidenzia la presenza di meccanismi patogenetici ancora non completamente chiariti e sottolinea la necessità di sviluppare approcci complementari, in grado di indagare il possibile impatto funzionale di varianti non rilevate o localizzate in regioni non codificanti del genoma.

La presente tesi sperimentale si è concentrata sullo sviluppo e sull'ottimizzazione di un metodo basato su PCR quantitativa mediante sonde TaqMan™, con l'obiettivo di valutare in modo affidabile i livelli di espressione dei principali geni coinvolti nella patologia, in particolare *ENG* e *ACVRL1*. Tale approccio è stato applicato allo studio di varianti genetiche identificate mediante analisi di sequenziamento dell'intero genoma (WGS), che non risultano direttamente coinvolte nei meccanismi di splicing, ma che potrebbero esercitare un effetto a livello dell'espressione genica. In questo contesto, l'analisi quantitativa

dell'espressione rappresenta uno strumento fondamentale per indagarne il possibile impatto funzionale.

Un aspetto fondamentale per l'affidabilità delle analisi di espressione genica è rappresentato dalla qualità e dalla quantità dell'RNA di partenza. Infatti, variazioni nella concentrazione o nella purezza dell'RNA possono influenzare l'efficienza della retrotrascrizione e, di conseguenza, la comparabilità dei risultati ottenuti.

I campioni analizzati hanno mostrato valori di purezza compatibili con RNA di buona qualità, mentre le concentrazioni hanno evidenziato una certa variabilità tra i diversi campioni. Per ovviare a questa problematica, è stata effettuata una normalizzazione della quantità di RNA impiegata nelle reazioni di retrotrascrizione, al fine di garantire condizioni uniformi tra i campioni e ridurre la variabilità tecnica.

Questo passaggio si è rivelato cruciale per l'impostazione del workflow sperimentale, in quanto ha permesso di ottenere una maggiore standardizzazione delle condizioni di reazione, migliorando l'affidabilità delle analisi successive.

La fase di retrotrascrizione ha rappresentato un passaggio particolarmente critico nell'impostazione del workflow sperimentale, evidenziando alcune problematiche che hanno reso necessaria un'ottimizzazione delle condizioni di reazione. In particolare, non tutti i campioni hanno mostrato inizialmente un'amplificazione efficace nella PCR di controllo, suggerendo una possibile variabilità nell'efficienza della retrotrascrizione. Questa osservazione ha reso necessario un riesame delle modalità operative adottate, portando alla ripetizione di alcune reazioni e alla modifica di specifici passaggi, come l'utilizzo o meno del pooling prima della PCR di controllo. Tali interventi hanno consentito di migliorare l'affidabilità del processo e di confermare la corretta sintesi del cDNA nella maggior parte dei campioni.

L'analisi di espressione genica mediante Real-Time PCR rappresenta uno strumento altamente sensibile e specifico per la quantificazione dei trascritti, ma richiede un'attenta standardizzazione delle condizioni sperimentali per garantire risultati affidabili e riproducibili. Lo studio ha posto particolare attenzione alla messa a punto di un workflow sperimentale che consentisse di minimizzare la variabilità tecnica, attraverso l'ottimizzazione dei volumi di reazione, delle condizioni di amplificazione e della gestione dei campioni. L'utilizzo di sonde TaqMan™ ha rappresentato un elemento chiave, in quanto permette un'elevata specificità di rilevazione grazie al riconoscimento simultaneo di

sequenze target mediante primer e sonda. Un aspetto critico delle analisi di Real-Time PCR è rappresentato dalla necessità di garantire condizioni uniformi tra le diverse reazioni, al fine di rendere i dati confrontabili. È stata posta particolare attenzione alla preparazione delle miscele di reazione e all'organizzazione del workflow, riducendo al minimo le variazioni operative e il numero di manipolazioni.

Un aspetto fondamentale nelle analisi di espressione genica mediante Real-Time PCR è rappresentato dalla scelta dei geni di riferimento endogeni, utilizzati per la normalizzazione dei dati. Tale selezione non può essere casuale, ma deve basarsi su una valutazione sperimentale della stabilità di espressione nei campioni analizzati.

Un parametro chiave è rappresentato dal ciclo soglia (Ct), che consente di stimare il livello di espressione dei diversi geni candidati. I geni endogeni più idonei sono quelli che mostrano valori di Ct comparabili tra i campioni e una bassa variabilità, risultando quindi espressi in modo costante indipendentemente dalle condizioni sperimentali. A tal fine, verrà condotto un saggio preliminare sui campioni in esame, volto a valutare il comportamento delle sonde selezionate e a determinare i relativi valori di Ct. L'analisi di questi dati consentirà di individuare i geni di riferimento più appropriati per la normalizzazione. Inoltre, saranno sfruttati dati sperimentali preliminari ottenuti su piastra di controllo e gentilmente messi a disposizione dalla Prof.ssa Elisa Giorgio, utili per una prima valutazione della stabilità dei geni candidati.

Sebbene geni housekeeping comunemente utilizzati, come  $\beta$ -actina (*ACTB*), tubulina e *GAPDH*, siano frequentemente impiegati come controlli endogeni, è noto che la loro espressione può variare in funzione del tessuto, del tipo cellulare e del contesto patologico, rendendo necessaria una validazione preliminare per ciascun sistema sperimentale. In letteratura, i dati di real time per i geni legati all'HHT sono stati ottenuti usando diversi geni housekeeping. La nostra esperienza, però, con i saggi con Sybr green ha evidenziato una differenza significativa fra il Ct di uscita dei campioni rispetto all'housekeeping sia per *ACTB* sia per *GAPDH* (unpublished data). In alcuni lavori, è stata usata tubulina ma successivamente è stato riportato come mutazioni nel gene *ENG* possano determinare alterazioni nei livelli di questa proteina; di conseguenza, il suo utilizzo come gene di riferimento potrebbe compromettere la corretta normalizzazione dei dati, portando a una stima inaccurata dell'espressione dei geni target.

Qualora non fosse possibile identificare un singolo gene di riferimento universalmente stabile, sarà valutata la possibilità di utilizzare geni endogeni differenti per ciascun saggio, al fine di garantire una normalizzazione più accurata e adattata alle specifiche condizioni sperimentali, anche se questo impedirebbe un confronto diretto fra i diversi saggi.

Per quanto riguarda la scelta delle sonde TaqMan™, una analisi preliminare della letteratura ha evidenziato un singolo lavoro in cui tale approccio veniva utilizzato per lo studio dei geni legati all'HHT, in particolare per studiare *ENG* (Zhou et al. 2022).

In tale approccio, la quantificazione veniva effettuata mediante curve standard ottenute utilizzando plasmidi contenenti il target di interesse, permettendo di determinare il numero assoluto di copie di trascritto. Tuttavia, questo tipo di metodologia, sebbene altamente quantitativa, risulta più complessa e non direttamente applicabile a studi di espressione relativa o a contesti sperimentali differenti, come quello della HHT.

In questa tesi, quindi, la selezione è stata effettuata *ex novo*, partendo dai dati forniti dal produttore e privilegiando sonde di tipo “\_m1”, progettate per il riconoscimento di sequenze di cDNA e generalmente localizzate a livello delle giunzioni esone-esone. Questa caratteristica consente di ridurre il rischio di amplificazione di DNA genomico contaminante, aumentando la specificità dell'analisi. Inoltre, è stata posta particolare attenzione alla distribuzione delle sonde lungo il trascritto, selezionando regioni differenti del gene, comprendenti porzioni prossimali all'estremità 5', regioni centrali e porzioni prossimali all'estremità 3'. Questo approccio permette di ottenere una valutazione più completa dell'espressione genica e di evidenziare eventuali alterazioni che potrebbero interessare specifiche regioni del trascritto.

L'importanza di un'analisi quantitativa accurata dell'espressione genica risulta particolarmente evidente nel contesto delle varianti genetiche deep introniche, che non alterano direttamente la sequenza codificante ma possono influenzare il trascritto e i livelli di espressione genica. In questo senso, l'approccio sviluppato nel presente studio potrà essere applicato per indagare il possibile impatto funzionale di tali varianti, contribuendo a chiarire il loro ruolo nella patogenesi della malattia. A supporto di questo, studi precedenti del nostro gruppo hanno dimostrato come varianti introniche del gene *ENG* possano influenzare significativamente la trascrizione genica senza modificare la sequenza proteica. In particolare, è stato evidenziato che mutazioni localizzate in siti di legame per fattori trascrizionali, come Sp1, possono determinare una riduzione dell'espressione di *ENG*,

contribuendo al fenotipo patologico (Plumitallo et al., 2022). Questi dati confermano l'importanza di approcci quantitativi per la valutazione dell'espressione genica e rafforzano la validità della strategia adottata in questo studio.

## CONCLUSIONI

Il presente studio ha avuto come obiettivo la messa a punto di un approccio quantitativo per l'analisi dell'espressione genica nei geni maggiormente coinvolti nella teleangectasia emorragica ereditaria, in particolare *ENG* e *ACVRL1*. È stato sviluppato e ottimizzato un workflow sperimentale, comprendente le fasi di estrazione e quantificazione dell'RNA, retrotrascrizione, verifica della sintesi del cDNA e impostazione delle analisi di espressione mediante Real-Time PCR con sonde TaqMan™. Durante queste fasi è stata posta particolare attenzione alla standardizzazione delle condizioni sperimentali e alla riduzione della variabilità tecnica, elementi fondamentali per garantire l'affidabilità e la riproducibilità dei risultati. L'ottimizzazione della retrotrascrizione e la gestione della variabilità tra i campioni hanno rappresentato passaggi cruciali nella definizione del metodo. Parallelamente, la selezione dei geni di riferimento endogeni è stata affrontata attraverso un approccio critico, basato sulla valutazione dei valori di ciclo soglia (Ct) e sulla stabilità di espressione nei campioni analizzati, evidenziando l'importanza di una validazione specifica per ciascun sistema sperimentale. Un ulteriore elemento rilevante è stato rappresentato dalla scelta delle sonde TaqMan™, effettuata sulla base di criteri di specificità per il cDNA e distribuzione lungo il trascritto, al fine di garantire una rilevazione accurata e rappresentativa dell'espressione genica. Il lavoro svolto ha quindi permesso di definire un metodo quantitativo robusto e riproducibile, che rappresenta una solida base per future analisi funzionali. In particolare, l'approccio sviluppato potrà essere applicato allo studio di varianti genetiche che non alterano direttamente la sequenza codificante, ma che possono influenzare il trascritto e i livelli di espressione genica, come nel caso delle varianti deep introniche. L'integrazione tra dati genetici e analisi funzionali rappresenta, infatti, un aspetto sempre più rilevante nello studio delle malattie genetiche complesse, come l'HHT. In questo contesto, l'approccio messo a punto potrà contribuire a una migliore interpretazione del significato biologico delle varianti identificate, supportando sia la diagnosi molecolare sia la comprensione dei meccanismi patogenetici alla base della malattia.

In prospettiva, l'applicazione di questo metodo a un numero più ampio di campioni e a differenti tipologie di varianti potrà fornire ulteriori informazioni utili per la caratterizzazione funzionale delle alterazioni genetiche e per lo sviluppo di strategie diagnostiche sempre più accurate e integrate.

## BIBLIOGRAFIA

Abdalla, S. A., Cymerman, U., Johnson, R. M., Deber, C. M., & Letarte, M. (2003). Disease-associated mutations in conserved residues of ALK-1 kinase domain. *European Journal of Human Genetics*, *11*(4), 279–287. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200919>

Abdalla, S. A., & Letarte, M. (2006). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: Current views on genetics and mechanisms of disease. *Journal of Medical Genetics*, *43*(2), 97–110. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.030833>

Ali MK, Liu Y, Schimmel K, et al. Identifying transcriptomic downstream targets of genes commonly mutated in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *bioRxiv*. (2022). doi:10.1101/2022.11.25.517570 (preprint).

Alt, A., Miguel-Romero, L., Donderis, J., Aristorena, M., Blanco, F. J., Round, A., Rubio, V., Bernabeu, C., & Marina, A. (2012). Structural and Functional Insights into Endoglin Ligand Recognition and Binding. *PLoS ONE*, *7*(2), e29948. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029948>

Amyere, M., Revencu, N., Helaers, R., Pairet, E., Baselga, E., Cordisco, M., Chung, W., Dubois, J., Lacour, J.-P., Martorell, L., Mazereeuw-Hautier, J., Pyeritz, R. E., Amor, D. J., Bisdorff, A., Blei, F., Bombei, H., Domp martin, A., Brooks, D., Dupont, J., ... Vikkula, M. (2017). Germline Loss-of-Function Mutations in EPHB4 Cause a Second Form of Capillary Malformation-Arteriovenous Malformation (CM-AVM2) Deregulating RAS-MAPK Signaling. *Circulation*, *136*(11), 1037–1048. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026886>

Anderson, E., Sharma, L., Alsafi, A., & Shovlin, C. L. (2022). Pulmonary arteriovenous malformations may be the only clinical criterion present in genetically confirmed hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thorax*, *77*(6), 628–630. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2021-218332>

Arthur, H. M., Ure, J., Smith, A. J. H., Renforth, G., Wilson, D. I., Torsney, E., Charlton, R., Parums, D. V., Jowett, T., Marchuk, D. A., Burn, J., & Diamond, A. G. (2000). Endoglin, an Ancillary TGF $\beta$  Receptor, Is Required for Extraembryonic Angiogenesis and Plays a Key Role in Heart Development. *Developmental Biology*, *217*(1), 42–53. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9534>

Attisano L, Cárcamo J, Ventura F, Weis FM, Massagué J, Wrana JL. (1993) Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell*. Nov 19;75(4):671-80. doi: 10.1016/0092-8674(93)90488-c. PMID: 8242742.

Baeyens, N., Larrivé, B., Ola, R., Hayward-Piatkowskyi, B., Dubrac, A., Huang, B., Ross, T. D., Coon, B. G., Min, E., Tsarfati, M., Tong, H., Eichmann, A., & Schwartz, M. A. (2016). Defective fluid shear stress mechanotransduction mediates hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Journal of Cell Biology*, 214(7), 807–816. <https://doi.org/10.1083/jcb.201603106>

Bai, J., Wang, Y., Liu, L., & Zhao, Y. (2014). Ephrin B2 and EphB4 selectively mark arterial and venous vessels in cerebral arteriovenous malformation. *Journal of International Medical Research*, 42(2), 405–415. <https://doi.org/10.1177/0300060513478091>

Bautch, V. L. (2017). Endoglin moves and shapes endothelial cells. *Nature Cell Biology*, 19(6), 593–595. <https://doi.org/10.1038/ncb3543>

Bellón, T., Corbi, A., Lastres, P., Calés, C., Cebrián, M., Vera, S., Cheifetz, S., Massague, J., Letarte, M., & Bernabéu, C. (1993). Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor- $\beta$ -binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *European Journal of Immunology*, 23(9), 2340–2345. <https://doi.org/10.1002/eji.1830230943>

Berg, J. N., Gallione, C. J., Stenzel, T. T., Johnson, D. W., Allen, W. P., Schwartz, C. E., Jackson, C. E., Porteous, M. E. M., & Marchuk, D. A. (1997). The Activin Receptor-Like Kinase 1 Gene: Genomic Structure and Mutations in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 2. *The American Journal of Human Genetics*, 61(1), 60–67. <https://doi.org/10.1086/513903>

Bernabeu, C., Bayrak-Toydemir, P., McDonald, J., & Letarte, M. (2020). Potential Second-Hits in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Journal of Clinical Medicine*, 9(11), 3571. <https://doi.org/10.3390/jcm9113571>

Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J. M., & Quintanilla, M. (2009). The emerging role of TGF- $\beta$  superfamily coreceptors in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1792(10), 954–973. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.07.003>

- Bidart, M., Ricard, N., Levet, S., Samson, M., Mallet, C., David, L., Subileau, M., Tillet, E., Feige, J.-J., & Bailly, S. (2012). BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *69*(2), 313–324. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0751-1>
- Boon, L. M., Mulliken, J. B., & Viskula, M. (2005). RASA1: Variable phenotype with capillary and arteriovenous malformations. *Current Opinion in Genetics & Development*, *15*(3), 265–269. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.03.004>
- Bossler, A. D., Richards, J., George, C., Godmilow, L., & Ganguly, A. (2006). Novel mutations in *ENG* and *ACVRL1* identified in a series of 200 individuals undergoing clinical genetic testing for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT): Correlation of genotype with phenotype. *Human Mutation*, *27*(7), 667–675. <https://doi.org/10.1002/humu.20342>
- Braverman, I. M., Keh, A., & Jacobson, B. S. (1990). Ultrastructure and Three-Dimensional Organization of the Telangiectases of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Journal of Investigative Dermatology*, *95*(4), 422–427. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12555569>
- Brinjikji, W., Iyer, V. N., Wood, C. P., & Lanzino, G. (2017). Prevalence and characteristics of brain arteriovenous malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurosurgery*, *127*(2), 302–310. <https://doi.org/10.3171/2016.7.JNS16847>
- Brinjikji, W., Iyer, V. N., Yamaki, V., Lanzino, G., Cloft, H. J., Thielen, K. R., Swanson, K. L., & Wood, C. P. (2016). Neurovascular Manifestations of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: A Consecutive Series of 376 Patients during 15 Years. *American Journal of Neuroradiology*, *37*(8), 1479–1486. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A4762>
- Brouillard, P., Boon, L. M., Mulliken, J. B., Enjolras, O., Ghassibé, M., Warman, M. L., Tan, O. T., Olsen, B. R., & Viskula, M. (2002). Mutations in a Novel Factor, Glomulin, Are Responsible for Glomuvenous Malformations (“Glomangiomas”). *The American Journal of Human Genetics*, *70*(4), 866–874. <https://doi.org/10.1086/339492>
- Brown, M. A., Zhao, Q., Baker, K. A., Naik, C., Chen, C., Pukac, L., Singh, M., Tsareva, T., Parice, Y., Mahoney, A., Roschke, V., Sanyal, I., & Choe, S. (2005). Crystal Structure of BMP-9 and Functional Interactions with Pro-region and Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(26), 25111–25118. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503328200>

- Buscarini, E., Danesino, C., Plauchu, H., De Fazio, C., Olivieri, C., Brambilla, G., Menozzi, F., Reduzzi, L., Blotta, P., Gazzaniga, P., Pagella, F., Grosso, M., Pongiglione, G., Cappiello, J., & Zambelli, A. (2004). High prevalence of hepatic focal nodular hyperplasia in subjects with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Ultrasound in Medicine & Biology*, *30*(9), 1089–1097. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2004.08.004>
- Buscarini, E., Leandro, G., Conte, D., Danesino, C., Daina, E., Manfredi, G., Lupinacci, G., Brambilla, G., Menozzi, F., De Grazia, F., Gazzaniga, P., Inama, G., Bonardi, R., Blotta, P., Forner, P., Olivieri, C., Perna, A., Grosso, M., Pongiglione, G., ... Zambelli, A. (2011). Natural History and Outcome of Hepatic Vascular Malformations in a Large Cohort of Patients with Hereditary Hemorrhagic Teleangiectasia. *Digestive Diseases and Sciences*, *56*(7), 2166–2178. <https://doi.org/10.1007/s10620-011-1585-2>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Canzonieri, C., Centenara, L., Ornati, F., Pagella, F., Matti, E., Alvisi, C., Danesino, C., Perego, M., & Olivieri, C. (2014). Endoscopic evaluation of gastrointestinal tract in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and correlation with their genotypes. *Genetics in Medicine*, *16*(1), 3–10. <https://doi.org/10.1038/gim.2013.62>
- Damjanovich, K., Langa, C., Blanco, F. J., McDonald, J., Botella, L. M., Bernabeu, C., Wooderchak-Donahue, W., Stevenson, D. A., & Bayrak-Toydemir, P. (2011). 5'UTR mutations of ENG cause hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *6*(1), 85. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-85>
- David, L., Feige, J.-J., & Bailly, S. (2009). Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *20*(3), 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.05.001>
- David, L., Mallet, C., Keramidas, M., Lamandé, N., Gasc, J.-M., Dupuis-Girod, S., Plauchu, H., Feige, J.-J., & Bailly, S. (2008). Bone Morphogenetic Protein-9 Is a Circulating Vascular Quiescence Factor. *Circulation Research*, *102*(8), 914–922. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.165530>

- De Gussem, E. M., Edwards, C. P., Hosman, A. E., Westermann, C. J. J., Snijder, R. J., Faughnan, M. E., & Mager, J. J. (2016). Life expectancy of parents with Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *11*(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13023-016-0427-x>
- Deng, Z., Morse, J. H., Slager, S. L., Cuervo, N., Moore, K. J., Venetos, G., Kalachikov, S., Cayanis, E., Fischer, S. G., Barst, R. J., Hodge, S. E., & Knowles, J. A. (2000). Familial Primary Pulmonary Hypertension (Gene PPH1) Is Caused by Mutations in the Bone Morphogenetic Protein Receptor–II Gene. *The American Journal of Human Genetics*, *67*(3), 737–744. <https://doi.org/10.1086/303059>
- Drapé, E., Anquetil, T., Larrivée, B., & Dubrac, A. (2022). Brain arteriovenous malformation in hereditary hemorrhagic telangiectasia: Recent advances in cellular and molecular mechanisms. *Frontiers in Human Neuroscience*, *16*, 1006115. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2022.1006115>
- Dupuis-Girod, S., Bailly, S., & Plauchu, H. (2010). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: From molecular biology to patient care. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *8*(7), 1447–1456. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2010.03860.x>
- Eerola, I., Boon, L. M., Mulliken, J. B., Burrows, P. E., Dompmartin, A., Watanabe, S., Vanwijck, R., & Vikkula, M. (2003). Capillary Malformation–Arteriovenous Malformation, a New Clinical and Genetic Disorder Caused by RASA1 Mutations. *The American Journal of Human Genetics*, *73*(6), 1240–1249. <https://doi.org/10.1086/379793>
- Eerola, I., Boon, L. M., Watanabe, S., Grynberg, H., Mulliken, J. B., & Vikkula, M. (2002). Locus for susceptibility for familial capillary malformation (‘port-wine stain’) maps to 5q. *European Journal of Human Genetics*, *10*(6), 375–380. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200817>
- Faughnan, M. E., Mager, J. J., Hetts, S. W., Palda, V. A., Lang-Robertson, K., Buscarini, E., Deslandres, E., Kasthuri, R. S., Lausman, A., Poetker, D., Ratjen, F., Chesnutt, M. S., Clancy, M., Whitehead, K. J., Al-Samkari, H., Chakinala, M., Conrad, M., Cortes, D., Crocione, C., ... Zarrabeitia, R. (2020). Second International Guidelines for the Diagnosis and Management of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Annals of Internal Medicine*, *173*(12), 989–1001. <https://doi.org/10.7326/M20-1443>
- Faughnan, M. E., Palda, V. A., Garcia-Tsao, G., Geisthoff, U. W., McDonald, J., Proctor, D. D., Spears, J., Brown, D. H., Buscarini, E., Chesnutt, M. S., Cottin, V., Ganguly, A.,

- Gossage, J. R., Gutmacher, A. E., Hyland, R. H., Kennedy, S. J., Korzenik, J., Mager, J. J., Ozanne, A. P., ... Zarrabeitia, R. (2011). International guidelines for the diagnosis and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Journal of Medical Genetics*, *48*(2), 73–87. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.069013>
- Feng, X.-H., & Derynck, R. (2005). SPECIFICITY AND VERSATILITY IN TGF- $\beta$  SIGNALING THROUGH SMADS. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *21*(1), 659–693. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.022404.142018>
- Fernández-Ruiz, E., St-Jacques, S., Bellón, T., Letarte, M., & Bernabéu, C. (1993). Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34→qter. *Cytogenetic and Genome Research*, *64*(3–4), 204–207. <https://doi.org/10.1159/000133576>
- Gallione CJ, Klaus DJ, Yeh EY, Stenzel TT, Xue Y, Anthony KB, McAllister KA, Baldwin MA, Berg JN, Lux A, Smith JD, Vary CP, Craigen WJ, Westermann CJ, Warner ML, Miller YE, Jackson CE, Gutmacher AE, Marchuk DA. Mutation and expression analysis of the endoglin gene in hereditary hemorrhagic telangiectasia reveals null alleles. *Hum Mutat*. 1998;11(4):286-94. doi: 10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:4<286::AID-HUMU6>3.0.CO;2-B. PMID: 9554745.
- Gallione, C. J., Scheessele, E. A., Reinhardt, D., Duits, A. J., Berg, J. N., Westermann, C. J. J., & Marchuk, D. A. (2000). Two common endoglin mutations in families with hereditary hemorrhagic telangiectasia in the Netherlands Antilles: Evidence for a founder effect. *Human Genetics*, *107*(1), 40–44. <https://doi.org/10.1007/s004390000326>
- Gallione, C. J., Repetto, G. M., Legius, E., Rustgi, A. K., Schelley, S. L., Tejpar, S., Mitchell, G., Drouin, É., Westermann, C. J., & Marchuk, D. A. (2004). A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). *The Lancet*, *363*(9412), 852–859. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15732-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15732-2)
- Gallione, C. J., Richards, J. A., Letteboer, T. G. W., Rushlow, D., Prigoda, N. L., Leedom, T. P., Ganguly, A., Castells, A., Ploos Van Amstel, J. K., Westermann, C. J. J., Pyeritz, R. E., & Marchuk, D. A. (2006). SMAD4 mutations found in unselected HHT patients. *Journal of Medical Genetics*, *43*(10), 793–797. <https://doi.org/10.1136/jmg.2006.041517>
- Gallione, C., Aylsworth, A. S., Beis, J., Berk, T., Bernhardt, B., Clark, R. D., Clericuzio, C., Danesino, C., Drautz, J., Fahl, J., Fan, Z., Faughnan, M. E., Ganguly, A., Garvie, J., Henderson, K., Kini, U., Leedom, T., Ludman, M., Lux, A., ... Marchuk, D. A. (2010).

- Overlapping spectra of *SMAD4* mutations in juvenile polyposis (JP) and JP–HHT syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 152A(2), 333–339. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33206>
- Garcia-Tsao, G. (2007). Liver involvement in hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT). *Journal of Hepatology*, 46(3), 499–507. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.12.008>
- Gatza, C. E., Oh, S. Y., & Blobel, G. C. (2010). Roles for the type III TGF- $\beta$  receptor in human cancer. *Cellular Signalling*, 22(8), 1163–1174. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.01.016>
- González-Núñez, M., Muñoz-Félix, J. M., & López-Novoa, J. M. (2013). The ALK-1/Smad1 pathway in cardiovascular physiopathology. A new target for therapy? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1832(10), 1492–1510. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.016>
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Gougos, A., & Letarte, M. (1990). Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 265(15), 8361–8364. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)38892-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38892-1)
- Goumans, M.-J., Liu, Z., & Ten Dijke, P. (2009). TGF- $\beta$  signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Research*, 19(1), 116–127. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.326>
- Govani, F. S., & Shovlin, C. L. (2009). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: A clinical and scientific review. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 17(7), 860–871. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.35>
- Groppe, J., Hinck, C. S., Samavarchi-Tehrani, P., Zubieta, C., Schuermann, J. P., Taylor, A. B., Schwarz, P. M., Wrana, J. L., & Hinck, A. P. (2008). Cooperative Assembly of TGF- $\beta$  Superfamily Signaling Complexes Is Mediated by Two Disparate Mechanisms and Distinct Modes of Receptor Binding. *Molecular Cell*, 29(2), 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.039>
- Guerrero-Esteo, M., Sánchez-Elsner, T., Letamendia, A., & Bernabéu, C. (2002). Extracellular and Cytoplasmic Domains of Endoglin Interact with the Transforming Growth

- Factor- $\beta$  Receptors I and II. *Journal of Biological Chemistry*, 277(32), 29197–29209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111991200>
- Gullapalli, R. R., Desai, K. V., Santana-Santos, L., Kant, J. A., & Becich, M. J. (2012). Next generation sequencing in clinical medicine: Challenges and lessons for pathology and biomedical informatics. *Journal of Pathology Informatics*, 3(1), 40. <https://doi.org/10.4103/2153-3539.103013>
- Guttmacher, A. E., Marchuk, D. A., & White, R. I. (1995). Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *The New England Journal of Medicine*.
- Hammill, A. M., Wusik, K., & Kasthuri, R. S. (2021). Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT): A practical guide to management. *Hematology*, 2021(1), 469–477. <https://doi.org/10.1182/hematology.2021000281>
- Heald, B., Rigelsky, C., Moran, R., LaGuardia, L., O'Malley, M., Burke, C. A., & Zahka, K. (2015). Prevalence of thoracic aortopathy in patients with juvenile Polyposis Syndrome-Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia due to *SMAD4*. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 167(8), 1758–1762. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37093>
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res*. Oct;6(10):986-94. doi: 10.1101/gr.6.10.986. PMID: 8908518.
- Heldin, C.-H., & Miyazono, K. (1997). TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*. Dec 4;390(6659):465-71. doi: 10.1038/37284. PMID: 9393997
- Heldin CH, Moustakas A. Signaling Receptors for TGF- $\beta$  Family Members. (2016) *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Aug 1;8(8):a022053. doi: 10.1101/cshperspect.a022053. PMID: 27481709; PMCID: PMC4968163.
- Hermann, R., Shovlin, C. L., Kasthuri, R. S., Serra, M., Eker, O. F., Bailly, S., Buscarini, E., & Dupuis-Girod, S. (2025). Hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Nature Reviews Disease Primers*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41572-024-00585-z>
- Hernandez, F., Huether, R., Carter, L., Johnston, T., Thompson, J., Gossage, J. R., Chao, E., & Elliott, A. M. (2015). Mutations in *RASA1* and *GDF2* identified in patients with clinical features of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Human Genome Variation*, 2(1), 15040. <https://doi.org/10.1038/hgv.2015.40>

- Hessels J, Kroon S, Vorselaars VVM, Boerman S, Mager JJ, Post MC. Evolution of Pulmonary Arteriovenous Malformations: The Role of Contrast Echocardiography. *Chest*. 2023 Mar;163(3):669-677. doi: 10.1016/j.chest.2022.11.005. Epub 2022 Nov 9. PMID: 36368615
- Hoag, J. B., Terry, P., Mitchell, S., Reh, D., & Merlo, C. A. (2010). An epistaxis severity score for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *The Laryngoscope*, 120(4), 838–843. <https://doi.org/10.1002/lary.20818>
- Howe, J. R., Roth, S., Ringold, J. C., Summers, R. W., Järvinen, H. J., Sistonen, P., Tomlinson, I. P. M., Houlston, R. S., Bevan, S., Mitros, F. A., Stone, E. M., & Aaltonen, L. A. (1998). Mutations in the *SMAD4/DPC4* Gene in Juvenile Polyposis. *Science*, 280(5366), 1086–1088. <https://doi.org/10.1126/science.280.5366.1086>
- Iyer, V. N., Brinjikji, W., Pannu, B. S., Apala, D. R., Lanzino, G., Cloft, H. J., Misra, S., Krowka, M. J., Wood, C. P., & Swanson, K. L. (2016). Effect of Center Volume on Outcomes in Hospitalized Patients With Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Mayo Clinic Proceedings*, 91(12), 1753–1760. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.07.005>
- Jass, J. R., Williams, C. B., Bussey, H. J. R., & Morson, B. C. (1988). Juvenile polyposis—a precancerous condition. *Histopathology*, 13(6), 619–630. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1988.tb02093.x>
- Johnson, D. W., Berg, J. N., Baldwin, M. A., Gallione, C. J., Marondel, I., Yoon, S.-J., Stenzel, T. T., Speer, M., Pericak-Vance, M. A., Diamond, A., Guttmacher, A. E., Jackson, C. E., Attisano, L., Kucherlapati, R., Porteous, M. E. M., & Marchuk, D. A. (1996). Mutations in the activin receptor–like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nature Genetics*, 13(2), 189–195. <https://doi.org/10.1038/ng0696-189>
- Jovine, L., Darie, C. C., Litscher, E. S., & Wassarman, P. M. (2005). ZONA PELLUCIDA DOMAIN PROTEINS. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 83–114. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133039>
- Kchouk, M., Gibrat, J. F., & Elloumi, M. (2017). Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine*, 09(03). <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000395>

- Kelly, C., Buscarini, E., Manfredi, G., Gregory, S., & Heneghan, M. A. (2024). Hepatic manifestations of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Liver International*, *44*(9), 2220–2234. <https://doi.org/10.1111/liv.16008>
- Kim, H., Nelson, J., Krings, T., terBrugge, K. G., McCulloch, C. E., Lawton, M. T., Young, W. L., Faughnan, M. E., BVMC HHT Investigator Group, Chakinala, M., Gossage, J. R., Henderson, K., Iyer, V., Kasthuri, R., Lin, D., Mager, J. J., McWilliams, J., McDonald, J., Pawlikowska, L., ... Wilcox, P. (2015). Hemorrhage Rates From Brain Arteriovenous Malformation in Patients With Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Stroke*, *46*(5), 1362–1364. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.007367>
- Krings, T., Ozanne, A., Chng, S. M., Alvarez, H., Rodesch, G., & Lasjaunias, P. L. (2005). Neurovascular phenotypes in hereditary haemorrhagic telangiectasia patients according to age: Review of 50 consecutive patients aged 1 day–60 years. *Neuroradiology*, *47*(10), 711–720. <https://doi.org/10.1007/s00234-005-1390-8>
- Lacombe, P., Lacout, A., Marcy, P.-Y., Binsse, S., Sellier, J., Bensalah, M., Chinnet, T., Bourgault-Villada, I., Blivet, S., Roume, J., Lesur, G., Blondel, J.-H., Fagnou, C., Ozanne, A., Chagnon, S., & El Hajjam, M. (2013). Diagnosis and treatment of pulmonary arteriovenous malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: An overview. *Diagnostic and Interventional Imaging*, *94*(9), 835–848. <https://doi.org/10.1016/j.diii.2013.03.014>
- Landrum, M. J., Lee, J. M., Benson, M., Brown, G. R., Chao, C., Chitipiralla, S., Gu, B., Hart, J., Hoffman, D., Jang, W., Karapetyan, K., Katz, K., Liu, C., Maddipatla, Z., Malheiro, A., McDaniel, K., Ovetsky, M., Riley, G., Zhou, G., ... Maglott, D. R. (2018). ClinVar: Improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Research*, *46*(D1), D1062–D1067. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153>
- Larsen Haidle J, MacFarland SP, Howe JR. Juvenile Polyposis Syndrome. 2003 May 13 [updated 2022 Feb 3]. In: Adam MP, Bick S, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2026. PMID: 20301642.
- Lenato, G., & Guanti, G. (2006). Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia (HHT): Genetic and Molecular Aspects. *Current Pharmaceutical Design*, *12*(10), 1173–1193. <https://doi.org/10.2174/138161206776361291>

Lesca, G., Olivieri, C., Burnichon, N., Pagella, F., Carette, M.-F., Gilbert-Dussardier, B., Goizet, C., Roume, J., Rabilloud, M., Saurin, J.-C., Cottin, V., Honnorat, J., Coulet, F., Giraud, S., Calender, A., Danesino, C., Buscarini, E., & Plauchu, H. (2007). Genotype-phenotype correlations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: Data from the French-Italian HHT network. *Genetics in Medicine*, *9*(1), 14–22. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31802d8373>

Lesca, G., on behalf of the French-Italian HHT Network, Genin, E., Blachier, C., Olivieri, C., Coulet, F., Brunet, G., Dupuis-Girod, S., Buscarini, E., Soubrier, F., Calender, A., Danesino, C., Giraud, S., & Plauchu, H. (2008). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: Evidence for regional founder effects of *ACVRL1* mutations in French and Italian patients. *European Journal of Human Genetics*, *16*(6), 742–749. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.3>

Letteboer, T. G. W., Zewald, R. A., Kamping, E. J., De Haas, G., Mager, J. J., Snijder, R. J., Lindhout, D., Hennekam, F. A. M., Westermann, C. J. J., & Ploos Van Amstel, J. K. (2005). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: ENG and ALK-1 mutations in Dutch patients. *Human Genetics*, *116*(1–2), 8–16. <https://doi.org/10.1007/s00439-004-1196-5>

Llorca, O., Trujillo, A., Blanco, F. J., & Bernabeu, C. (2007). Structural Model of Human Endoglin, a Transmembrane Receptor Responsible for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Journal of Molecular Biology*, *365*(3), 694–705. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.10.015>

López-Novoa, J. M., & Bernabeu, C. (2010). The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *299*(4), H959–H974. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01251.2009>

Locke T, Gollamudi J, Chen P. Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT). 2022 Dec 12. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2026 Jan—. PMID: 35201714.).

Machado, R. D., Southgate, L., Eichstaedt, C. A., Aldred, M. A., Austin, E. D., Best, D. H., Chung, W. K., Benjamin, N., Elliott, C. G., Eyries, M., Fischer, C., Gräf, S., Hinderhofer, K., Humbert, M., Keiles, S. B., Loyd, J. E., Morrell, N. W., Newman, J. H., Soubrier, F., ... Grünig, E. (2015). Pulmonary Arterial Hypertension: A Current Perspective on Established and Emerging Molecular Genetic Defects. *Human Mutation*, *36*(12), 1113–1127. <https://doi.org/10.1002/humu.22904>

- Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(3), 190–212. <https://doi.org/10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x>
- Mandlik, J. S., Patil, A. S., & Singh, S. (2024). Next-Generation Sequencing (NGS): Platforms and Applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 16(Suppl 1), S41–S45. [https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs\\_838\\_23](https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_838_23)
- Massagué, J. (2012). TGF $\beta$  signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10), 616–630. <https://doi.org/10.1038/nrm3434>
- Massagué, J., & Sheppard, D. (2023). TGF- $\beta$  signaling in health and disease. *Cell*, 186(19), 4007–4037. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.07.036>
- Matsubara S, Mandzia JL, ter Brugge K, Willinsky RA, Faughnan ME. (2000) Angiographic and clinical characteristics of patients with cerebral arteriovenous malformations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *AJNR Am J Neuroradiol*. Jun-Jul;21(6):1016-20. Erratum in: *AJNR Am J Neuroradiol* 2001 Aug;22(7):1446. Manzia JL [corrected to Mandzia JL]. PMID: 10871005; PMCID: PMC7973909.
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet*. 1994 Dec;8(4):345-51. doi: 10.1038/ng1294-345. PMID: 7894484.
- McDonald, J., Woodechak-Donahue, W., VanSant Webb, C., Whitehead, K., Stevenson, D. A., & Bayrak-Toydemir, P. (2015). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: Genetics and molecular diagnostics in a new era. *Frontiers in Genetics*, 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00001>
- McDonald, J., Bayrak-Toydemir, P., DeMille, D., Woodechak-Donahue, W., & Whitehead, K. (2020). Curaçao diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia is highly predictive of a pathogenic variant in ENG or ACVRL1 (HHT1 and HHT2). *Genetics in Medicine*, 22(7), 1201–1205. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-0775-8>
- McDonald, J., Kornish, J., Stevenson, D. A., Hanson-Kahn, A., Balch, H., James, J., Naik, H., & Whitehead, K. J. (2023). Frequency of epistaxis and telangiectasia in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) in comparison with the general population:

- Curaçao diagnostic criteria revisited. *Genetics in Medicine*, 25(8), 100865. <https://doi.org/10.1016/j.gim.2023.100865>
- Miyazawa, K., & Miyazono, K. (2017). Regulation of TGF- $\beta$  Family Signaling by Inhibitory Smads. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(3), a022095. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022095>
- Miyazono, K., Kamiya, Y., & Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *Journal of Biochemistry*, 147(1), 35–51. <https://doi.org/10.1093/jb/mvp148>
- Ng, P. C., & Kirkness, E. F. (2010). Whole Genome Sequencing. In M. R. Barnes & G. Breen (A c. Di), *Genetic Variation* (Vol. 628, pp. 215–226). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-367-1\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-367-1_12)
- Olivieri, C., Pagella, F., Semino, L., Lanzarini, L., Valacca, C., Pilotto, A., Corno, S., Scappaticci, S., Manfredi, G., Buscarini, E., & Danesino, C. (2007). Analysis of ENG and ACVRL1 genes in 137 HHT Italian families identifies 76 different mutations (24 novel). Comparison with other European studies. *Journal of Human Genetics*, 52(10), 820–829. <https://doi.org/10.1007/s10038-007-0187-5>
- Padua, D., & Massagué, J. (2009). Roles of TGF $\beta$  in metastasis. *Cell Research*, 19(1), 89–102. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.316>
- Pagella, F., Maiorano, E., Matti, E., Tinelli, C., De Silvestri, A., Ugolini, S., Lizzio, R., Oliveri, C., Pusateri, A., & Spinozzi, G. (2020). FID Score: An effective tool in Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia - related epistaxis. *Rhinology Journal*, 0(0), 0–0. <https://doi.org/10.4193/Rhin20.078>
- Pardali, E., Goumans, M.-J., & Ten Dijke, P. (2010). Signaling by members of the TGF- $\beta$  family in vascular morphogenesis and disease. *Trends in Cell Biology*, 20(9), 556–567. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.06.006>
- Park, P. J. (2009). ChIP-seq: Advantages and challenges of a maturing technology. *Nature Reviews Genetics*, 10(10), 669–680. <https://doi.org/10.1038/nrg2641>
- Plauchu, H., De Chadarevian, J., Bideau, A., & Robert, J. (1989). Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *American Journal of Medical Genetics*, 32(3), 291–297. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320320302>

Plumitallo S, Ruiz-Llorente L, Langa C, Morini J, Babini G, Cappelletti D, Scelsi L, Greco A, Danesino C, Bernabeu C, Olivieri C. (2018) Functional analysis of a novel ENG variant in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) identifies a new Sp1 binding-site. *Gene*. 647:85-92. doi: 10.1016/j.gene.2018.01.007. Epub 2018 Jan 4. PMID: 29305977.

Pyatt, R. E., Pilarski, R., & Prior, T. W. (2006). Mutation Screening in Juvenile Polyposis Syndrome. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 8(1), 84–88. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2006.050072>

Revenu, N., Boon, L. M., Mendola, A., Cordisco, M. R., Dubois, J., Clapuyt, P., Hammer, F., Amor, D. J., Irvine, A. D., Baselga, E., Dompmartin, A., Syed, S., Martin-Santiago, A., Ades, L., Collins, F., Smith, J., Sandaradura, S., Barrio, V. R., Burrows, P. E., ... Vikkula, M. (2013). *RASA1* Mutations and Associated Phenotypes in 68 Families with Capillary Malformation-Arteriovenous Malformation. *Human Mutation*, 34(12), 1632–1641. <https://doi.org/10.1002/humu.22431>

Revenu, N., Boon, L. M., Mulliken, J. B., Enjolras, O., Cordisco, M. R., Burrows, P. E., Clapuyt, P., Hammer, F., Dubois, J., Baselga, E., Brancati, F., Carder, R., Quintal, J. M. C., Dallapiccola, B., Fischer, G., Frieden, I. J., Garzon, M., Harper, J., Johnson-Patel, J., ... Vikkula, M. (2008). Parkes Weber syndrome, vein of Galen aneurysmal malformation, and other fast-flow vascular anomalies are caused by *RASA1* mutations. *Human Mutation*, 29(7), 959–965. <https://doi.org/10.1002/humu.20746>

Ruiz-Llorente, L., Gallardo-Vara, E., Rossi, E., Smadja, D. M., Botella, L. M., & Bernabeu, C. (2017). Endoglin and alk1 as therapeutic targets for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(10), 933–947. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1365839>

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>

Sbalchiero, A., Abu Hweij, Y., Mazza, T., Buscarini, E., Scotti, C., Pagella, F., Manfredi, G., Matti, E., Spinozzi, G., & Olivieri, C. (2022). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: First demonstration of a founder effect in Italy; the *ACVRL1* c.289\_294del variant originated in the country of Bergamo 200 years ago. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 10(8), e1972. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1972>

- Schmidt-Weber, C. B., Letarte, M., Kunzmann, S., Rückert, B., Bernabéu, C., & Blaser, K. (2005). TGF- $\beta$  signaling of human T cells is modulated by the ancillary TGF- $\beta$  receptor endoglin. *International Immunology*, *17*(7), 921–930. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh272>
- Schoonderwoerd, M. J. A., Goumans, M.-J. T. H., & Hawinkels, L. J. A. C. (2020). Endoglin: Beyond the Endothelium. *Biomolecules*, *10*(2), 289. <https://doi.org/10.3390/biom10020289>
- Serra, M. M., Besada, C. H., Cabana Cal, A., Saenz, A., Stefani, C. V., Bauso, D., Golimstok, A. B., Bandi, J. C., Giunta, D. H., & Elizondo, C. M. (2017). Central nervous system manganese induced lesions and clinical consequences in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *12*(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0632-2>
- Shendure, J., & Aiden, E. L. (2012). The expanding scope of DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, *30*(11), 1084–1094. <https://doi.org/10.1038/nbt.2421>
- Shiryayev, S. A., Chernov, A. V., Golubkov, V. S., Thomsen, E. R., Chudin, E., Chee, M. S., Kozlov, I. A., Strongin, A. Y., & Cieplak, P. (2013). High-Resolution Analysis and Functional Mapping of Cleavage Sites and Substrate Proteins of Furin in the Human Proteome. *PLoS ONE*, *8*(1), e54290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054290>
- Shovlin, C. L., Hughes, J. M. B., Scott, J., Seidman, C. E., & Seidman, J. G. (1997). Characterization of Endoglin and Identification of Novel Mutations in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *The American Journal of Human Genetics*, *61*(1), 68–79. <https://doi.org/10.1086/513906>
- Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, Kjeldsen AD, Plauchu H. (2000) Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet.* Mar 6;91(1):66-7. doi: 10.1002/(sici)1096-8628(20000306)91:1<66::aid-ajmg12>3.0.co;2-p. PMID: 10751092.
- Shovlin, C. L. (2010). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: Pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Reviews*, *24*(6), 203–219. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2010.07.001>
- Shovlin, C. L., Condliffe, R., Donaldson, J. W., Kiely, D. G., & Wort, S. J. (2017). British Thoracic Society Clinical Statement on Pulmonary Arteriovenous Malformations. *Thorax*, *72*(12), 1154–1163. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-210764>

- Shovlin, C. L., Almaghlouth, F. I., Alsafi, A., Coote, N., Rennie, C., Wallace, G. M., Govani, F. S., & Research Consortium, G. E. (2024). Updates on diagnostic criteria for hereditary haemorrhagic telangiectasia in the light of whole genome sequencing of ‘gene-negative’ individuals recruited to the 100 000 Genomes Project. *Journal of Medical Genetics*, *61*(2), 182–185. <https://doi.org/10.1136/jmg-2023-109195>
- Snellings, D. A., Gallione, C. J., Clark, D. S., Vozoris, N. T., Faughnan, M. E., & Marchuk, D. A. (2019). Somatic Mutations in Vascular Malformations of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Result in Bi-allelic Loss of ENG or *ACVRL1*. *The American Journal of Human Genetics*, *105*(5), 894–906. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.09.010>
- Snodgrass, R. O., Chico, T. J. A., & Arthur, H. M. (2021). Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia, an Inherited Vascular Disorder in Need of Improved Evidence-Based Pharmaceutical Interventions. *Genes*, *12*(2), 174. <https://doi.org/10.3390/genes12020174>
- Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. (2003) *Cell*. Jun 13;113(6):685-700. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00432-x. PMID: 12809600.
- Soukariéh, O., Tillet, E., Proust, C., Dupont, C., Jaspard-Vinassa, B., Soubrier, F., Goyenvalle, A., Eyries, M., & Trégouët, D.-A. (2023). uAUG creating variants in the 5’UTR of ENG causing Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Npj Genomic Medicine*, *8*(1), 32. <https://doi.org/10.1038/s41525-023-00378-5>
- Tao, S., & Sampath, K. (2010). Alternative splicing of SMADs in differentiation and tissue homeostasis. *Development, Growth & Differentiation*, *52*(4), 335–342. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01163.x>
- ten Dijke P, Ichijo H, Franzén P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin CH, Miyazono K. (1993) Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene*. Oct;8(10):2879-87. PMID: 8397373.
- ten Dijke, P. (1994). Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science*. *264*(5155):101-4. doi: 10.1126/science.8140412. PMID: 8140412.
- Ten Dijke, P., Franzén, P., Yamashita, H., Ichijo, H., Heldin, C.-H., & Miyazono, K. (1994). Serine/threonine kinase receptors. *Progress in Growth Factor Research*, *5*(1), 55–72. [https://doi.org/10.1016/0955-2235\(94\)90017-5](https://doi.org/10.1016/0955-2235(94)90017-5)

- Ten Dijke, P., & Arthur, H. M. (2007). Extracellular control of TGF $\beta$  signalling in vascular development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(11), 857–869. <https://doi.org/10.1038/nrm2262>
- Tzavlaki, K., & Moustakas, A. (2020). TGF- $\beta$  Signaling. *Biomolecules*, 10(3), 487. <https://doi.org/10.3390/biom10030487>
- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, 29(3), 151–159. <https://doi.org/10.1152/advan.00019.2005>
- Velasco, S., Alvarez-Muñoz, P., Pericacho, M., Dijke, P. T., Bernabéu, C., López-Novoa, J. M., & Rodríguez-Barbero, A. (2008). L- and S-endoglin differentially modulate TGF $\beta$ 1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *Journal of Cell Science*, 121(6), 913–919. <https://doi.org/10.1242/jcs.023283>
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y. M., Bdolah, Y., Lim, K.-H., Yuan, H.-T., Libermann, T. A., Stillman, I. E., Roberts, D., D'Amore, P. A., Epstein, F. H., Sellke, F. W., Romero, R., Sukhatme, V. P., Letarte, M., & Karumanchi, S. A. (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature Medicine*, 12(6), 642–649. <https://doi.org/10.1038/nm1429>
- Vincent, T., Neve, E. P. A., Johnson, J. R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P. L., Crystal, R. G., De Herreros, A. G., Moustakas, A., Pettersson, R. F., & Fuxe, J. (2009). A SNAIL1–SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- $\beta$  mediated epithelial–mesenchymal transition. *Nature Cell Biology*, 11(8), 943–950. <https://doi.org/10.1038/ncb1905>
- Wang, H. U., Chen, Z.-F., & Anderson, D. J. (1998). Molecular Distinction and Angiogenic Interaction between Embryonic Arteries and Veins Revealed by ephrin-B2 and Its Receptor Eph-B4. *Cell*, 93(5), 741–753. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81436-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81436-1)
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Wilhelm, J. (2003). Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Research*, 31(10), 56e–556. <https://doi.org/10.1093/nar/gng056>
- Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A., & Rasmussen, R. P. (1997). Continuous Fluorescence Monitoring of Rapid Cycle DNA Amplification. *BioTechniques*, 22(1), 130–138. <https://doi.org/10.2144/97221bi01>

- Wooderchak-Donahue, W. L., McDonald, J., O'Fallon, B., Upton, P. D., Li, W., Roman, B. L., Young, S., Plant, P., Fülöp, G. T., Langa, C., Morrell, N. W., Botella, L. M., Bernabeu, C., Stevenson, D. A., Runo, J. R., & Bayrak-Toydemir, P. (2013). BMP9 Mutations Cause a Vascular-Anomaly Syndrome with Phenotypic Overlap with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *The American Journal of Human Genetics*, *93*(3), 530–537. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.07.004>
- Wooderchak-Donahue, W. L., Akay, G., Whitehead, K., Briggs, E., Stevenson, D. A., O'Fallon, B., Velinder, M., Farrell, A., Shen, W., Bedoukian, E., Skrabann, C. M., Antaya, R. J., Henderson, K., Pollak, J., Treat, J., Day, R., Jacher, J. E., Hannibal, M., Bontempo, K., ... McDonald, J. (2019). Phenotype of CM-AVM2 caused by variants in EPHB4: How much overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT)? *Genetics in Medicine*, *21*(9), 2007–2014. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0443-z>
- Xiao, Z., Carrasco, R., Kinneer, K., Sabol, D., Jallal, B., Coats, S., & Tice, D. A. (2012). EphB4 promotes or suppresses Ras/MEK/ERK pathway in a context-dependent manner: Implications for EphB4 as a cancer target. *Cancer Biology & Therapy*, *13*(8), 630–637. <https://doi.org/10.4161/cbt.20080>
- Xu, P., Lin, X., & Feng, X.-H. (2016). Posttranslational Regulation of Smads. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(12), a022087. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022087>
- Zbuk, K. M., & Eng, C. (2007). Hamartomatous polyposis syndromes. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, *4*(9), 492–502. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0902>
- Zhu, H.-J., & Sizeland, A. M. (1999). A Pivotal Role for the Transmembrane Domain in Transforming Growth Factor- $\beta$  Receptor Activation. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(17), 11773–11781. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11773>
- Zhou, J., Hu, Y., Zhu, W., Nie, C., Zhao, W., Faje, A. T., Labelle, K. E., Swearingen, B., Lee, H., Hedley-Whyte, E. T., Zhang, X., Jones, P. S., Miller, K. K., Klubanski, A., Zhou, Y., & Soberman, R. J. (2022). Sprouting Angiogenesis in Human Pituitary Adenomas. *Frontiers in Oncology*, *12*, 875219. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.875219>