

# La Genetica nel Linfedema: attuali conoscenze e prospettive future

Sandro MICHELINI<sup>1</sup>, Elena MANARA<sup>2</sup>, Paolo MALTESE<sup>2</sup>, Stefano PAOLACCI<sup>2</sup>, Serena MICHELINI<sup>3</sup>, Maurizio RICCI<sup>4</sup>, Matteo BERTELLI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ospedale San Giuseppe ASL Roma6 - Marino (Roma)

<sup>2</sup> Magi's Lab Rovereto

<sup>3</sup> Unità di Medicina Fisica e Riabilitativa – Ospedale S. Andrea – Università 'La Sapienza' – Roma

<sup>4</sup> U.O. Medicina Riabilitativa – Azienda Ospedaliero-Universitaria "Ospedali Riuniti" di Ancona

## Riassunto

Il Linfedema primario è una manifestazione fenotipica frequentemente determinata da mutazione genetica. I geni attualmente riconosciuti come responsabili della patologia sono diversi e le stesse mutazioni incidono in maniera diversificata e, spesso, complessa. Esistono forme familiari, sporadiche e sindromiche di linfedema. In tutti e tre i casi sono state descritte mutazioni genetiche che intervengono nel determinismo della patologia. I geni più frequentemente chiamati in causa quali responsabili sia delle forme familiari che sindromiche sono il VEGFR3 o FLT4 ed il FOXC2.

## Summary

Primary lymphedema is a phenotypic manifestation frequently caused by genetic mutation. The genes currently recognized as responsible for the disease are different and the same mutations affect in a diversified and often complex way. There are familial, sporadic and syndromic forms of lymphedema. In all three cases, genetic mutations that intervene in the determinism of the pathology have been described. The genes most frequently called into question as responsible for both familial forms and syndromes which are VEGFR3 or FLT4 and FOXC2.

**Parole chiave:** linfedema primario – genetica

**Key words:** primary lymphoedema - genetics

## Introduzione

Il Linfedema è una malattia determinata da alterazioni dello sviluppo loco-regionale del sistema linfatico (linfedema primario) o da asportazione chirurgica o sclerotizzazione radioterapica (linfedemi secondari, spesso a patologia oncologica). In entrambe i casi (quindi anche nelle forme secondarie) esiste una predisposizione anatomica, su base genetica, che è responsabile della manifestazione fenotipica; queste osservazioni spiegano anche il perché (a parità di età, tipo di neoplasia, tipo di intervento chirurgico, stesso operatore e di sedute radioterapiche) su quattro donne sottoposte ad intervento di quadrantectomia mammaria o mastectomia con linfoadenectomia ascellare, 1 su quattro sviluppa successivamente un linfedema secondario dell'arto superiore omolaterale e le altre tre rimangono con arti coincidenti in quanto a volume e consistenza tissutale. Le forme primarie appartengono al gruppo delle cosiddette "Malformazioni Linfatiche", (ML), con il quale termine si fa riferimento ad un gruppo eterogeneo di difetti del sistema linfatico quali l'aplasia, l'ipoplasia e l'iperplasia dei canali linfatici e dei linfonodi [1] e le lesioni unifocali localizzate, costituite da canali linfatici dilatati pieni di linfa ma disconnessi dal resto del sistema linfatico [2]. In molti casi questi difetti causano linfedema, ossia un accumulo anomalo di liquido interstiziale, come conseguenza di uno squilibrio tra la veloci-

tà di produzione della linfa e la sua rimozione attraverso il sistema linfatico stesso; in altri casi le ML non sono associate al linfedema.

In passato, le ML e il linfedema primario erano considerati due entità diverse, tuttavia secondo la classificazione di Amburgo (1989), il linfedema primario è una manifestazione clinica di ML che compare negli stadi successivi della linfoangiogenesi (ML tronculare) [1], mentre le lesioni extratruncolari (espressione di displasie linfatiche che possono localizzarsi nei tessuti molli o duri), note come linfoangiomi cistici/cavernosi, si sviluppano durante le prime fasi della linfoangiogenesi [1]. La prevalenza di ML tronculare ed extratruncolare è 1-5/10.000.

Nella prima fase della diagnosi, la storia clinica e l'esame obiettivo [3] dei pazienti con ML dovrebbero rivelare se la malformazione è tronculare, extratruncolare o sindromica (quadri in cui il linfedema costituisce uno degli aspetti clinici di un complesso di sintomi e segni, articolato e differente nei vari casi) se il disturbo è ereditario (familiare) o sporadico (in cui nessun altro membro della famiglia manifesta lo stesso problema) [4]. La linfo-scintigrafia si è dimostrata estremamente utile per la visualizzazione di specifiche anomalie linfatiche [3]. Con questa tecnica, come noto, il radiofarmaco debolmente radioattivo viene iniettato mediante iniezione sottocutanea in prossimità delle vie linfatiche che si desiderano esaminare (ad esempio sulle mani o sui piedi

nel caso si studi il circolo linfatico degli arti), e viene e ne viene, successivamente misurato, ad intervalli regolari l'assorbimento/captazione da parte dei linfonodi ascellari o inguinali, alla radice degli arti. La durata dell'esame è variabile da pochi minuti ad alcune ore in funzione del distretto osservato. La linfo-scintigrafia viene eseguita per determinare se vi è mancato assorbimento del tracciante radioattivo e fornisce importanti indicazioni sull'entità e l'esatta localizzazione del difetto di sviluppo linfatico, consentendo, peraltro, di individuare quadri sub-clinici a potenziale rischio di evoluzione verso la patologia conclamata. Altri strumenti diagnostici utilizzati per chiarire le sindromi linfoangioplasia/linfedema (anche nei neonati e nei bambini) includono la linfoangioscintigrafia, la risonanza magnetica (MR linfografia e MR angiografia), la tomografia computerizzata (TC), e la linfografia 3-D a contrasto con olio, CT-SPECT, ecografia, linfografia indiretta, imaging di fluorescenza ad infrarosso (noto anche come linfografia ICG) e microlinfoangiografia fluorescente [3].

La linfo-scintigrafia non è sempre essenziale per la diagnosi e non vincola l'esecuzione del test molecolare [5]. La diagnosi differenziale dovrebbe includere il linfedema ereditario; sindrome linfedema-distichiasi; sindrome di Emberger; sindrome da ipotricosi-linfedema-telangiectasia; sindrome da microcefalia-linfedema-displasia corioretinica, linfedema e ritardo mentale; atresia coanale posteriore - sindrome da linfedema; sindrome di Hennekam; sindrome displasia ectodermica anidrotica-immunodeficienza-osteopetrosi-linfedema; sindrome da eccessiva crescita lipomatosa congenita, malformazioni vascolari e sindrome dei nevi epidermici; sindrome di Klippel-Trenaunay.

Le ML sono associate a diverse condizioni caratterizzate da eterogeneità allelica e di locus con diversi modelli di ereditarietà. Questa può essere autosomica dominante, autosomica recessiva o recessiva legata al cromosoma X. Sono stati riportati anche geni coinvolti nella predisposizione a linfedema secondario da intervento chirurgico [6, 7].

Le malformazioni linfatiche vengono distinte comunemente in 'non sindromiche' e 'sindromiche' e possono essere trasmesse con modalità dominante (se presente la mutazione è sempre presente anche la patologia conclamata) o recessiva (in cui l'affezione può rimanere subclinica). Le più conosciute Malformazioni linfatiche non sindromiche, trasmesse con modalità di trasmissione autosomica dominante, sono

- Linfedema ereditario 1A (MLPH1A) o malattia di Milroy, gene **FLT4** (OMIM gene: 136352; OMIM malattia: 153100) [4];
- Linfedema ereditario 1C (MLPH1C), gene **GJC2** (OMIM gene: 608803; OMIM malattia 613480) [8];
- Linfedema ereditario 1D (MLPH1D), gene **VEGFC** (OMIM gene: 601528; OMIM malattia 615907) [9];
- Linfedema bilaterale degli arti inferiori, gene **CELSRI** (OMIM gene: 604523) e **HGF** (OMIM gene: 142409) [7, 10].

Tra le, sindromiche, trasmesse con modalità di trasmissione autosomica dominante, figurano:

- Linfedema-distichiasi, gene **FOXC2** (OMIM gene: 602402; OMIM malattia: 153400) [11];
- Linfedema primario con mielodisplasia o sindrome di Emberger, gene **GATA2** (OMIM gene: 137295; OMIM malattia: 614038) [12];
- Sindrome da ipotricosi-linfedema-telangiectasia (HLTS), gene **SOX18** (OMIM gene: 601618; OMIM malattia: 607823) [13];
- Sindrome da microcefalia-linfedema-displasia corioretinopatia (MLCRD) gene **KIF11** (OMIM gene: 148760; OMIM malattia: 152950) [14];
- Displasia oculo-dento-digitale e linfedema (ODDD), gene **GJA1** (OMIM gene: 121014; OMIM malattia: 164200) [15];
- Idrope fetale nonimmune e/o difetto del setto atriale (HFASD), gene **EPHB4** (OMIM gene: 600011; OMIM malattia: 617300) [16];
- Sindrome di Noonan 1, 3, 4, 6, 8 (NS), geni **PTPN11**, **KRAS**,

**SOS1**, **NRAS**, **RIT1** (OMIM gene: 176876, 190070, 182530, 164790, 609591; OMIM malattia: 163950, 609942, 610733, 613224, 615355) [17-21];

- Sindrome noonan-like con o senza leucemia mielomonocitica giovanile (NSLL), gene **CBL** (OMIM gene: 165360; OMIM malattia: 613563) [22];
- Sindrome di Costello gene **HRAS** (OMIM gene: 190020; OMIM malattia: 218040) [23];
- Sindrome simil-Noonan con capelli caduchi in fase 'anagen' (NSLH) gene **SHOC2** (OMIM gene: 602775; OMIM malattia: 607721) [21];
- Sindrome cardio-facio-cutanea 1, gene **BRAF** (OMIM gene: 164757; OMIM malattia: 115150) [24].

Le malformazioni linfatiche sindromiche trasmesse con modalità autosomica recessiva sono:

- Sindrome da ipotricosi-linfedema-telangiectasia (HLTS) gene **SOX18** (OMIM gene: 601618; OMIM malattia: 607823) [13];
- Atresia coanale posteriore- sindrome da linfedema, gene **PTPN14** (OMIM gene: 603155; OMIM malattia: 613611) [25];
- Sindrome da linfedema e linfedema Hennekam 1 e 2 (HKLLS1 e 2), geni **CCBE1**, **FAT4** (OMIM gene: 612753, 612411; OMIM malattia: 235510 e 616006) [26, 27];
- Linfedema ereditario 3 (MLPH3), gene **PIEZO1** (OMIM gene: 611184; OMIM malattia: 616843) [28];
- Linfedema Hennekam 3 (HKLLS3), gene **ADAMTS3** (OMIM gene: 605011) [29].

Mentre le malformazioni linfatiche sindromiche, trasmesse con modalità X-linked recessiva sono:

- Sindrome displasia ectodermica anidrotica-immunodeficienza-osteopetrosi-linfedema, gene **IKBKKG** (OMIM gene: 300248; OMIM malattia: 300301) [30].

Esistono infine Patologie associate a ML con ereditarietà para-dominante (come conseguenza di una seconda variazione, germinale + somatica).

Tra queste è utile ricordare le Malformazioni linfatiche correlate al gene **RASAI** (OMIM gene: 139150) [31, 32].

Le varianti patogenetiche possono includere piccole delezioni/inserzioni intrageniche, variazioni dei siti di splicing, variazioni missenso e non-senso. Per i geni **FOXC2**, **GATA2**, **NRAS**, **HRAS** e **BRAF** sono comunemente riportate delezioni/duplicazioni parziali o totali.

## Considerazioni

### Finalità del test

Con l'esecuzione del test genetico nelle malformazioni linfatiche troncolari è possibile:

- Identificare il difetto genico responsabile della patologia;
- Confermare la diagnosi clinica di malattia;
- Porre diagnosi differenziale;
- Accedere a trials clinici (<http://clinicaltrials.gov>);
- Stimare il rischio di ricorrenza per la coppia.
- Valutare eventuali consanguinei 'asintomatici' come possibili portatori della stessa mutazione (studio di segregazione) nei quali esiste un rischio concreto di slatentizzazione della malattia in epoche successive (prevenzione primaria)

La ricerca di variazioni nei geni sopra elencati si basa, oggi, sull'analisi di un pannello multi-genico mediante sequenziamento con tecnologia NGS (Next Generation Sequencing) delle regioni codificanti e delle relative giunzioni introne-esone.

Il pannello NGS potrebbe includere geni aggiuntivi a quelli sopra citati, per cui esistono attualmente limitate evidenze scientifiche a supporto di una possibile associazione con la patologia in esame. Dell'analisi di tali geni non vengono fornite informazioni nel referto. Il ruolo di tali geni può essere rivalutato con il progredire delle conoscenze scientifiche.

Il sequenziamento Sanger viene utilizzato per la conferma di almeno una variante potenzialmente causativa

identificata mediante NGS, per la copertura delle regioni a basso coverage e per gli studi di segregazione nei familiari.

Il test si propone di identificare nei soggetti con sospetto di "Linfedema primario/malformazioni linfatiche" le variazioni presenti nei geni noti causativi. Per effettuare la diagnosi molecolare è di norma sufficiente un singolo campione di materiale biologico. In rarissimi casi è possibile dover ripetere il prelievo/raccolta. Le conoscenze sull'associazione geni-malattia e sull'interpretazione delle varianti genetiche sono in continuo rapido aumento. Pertanto è possibile che i geni da analizzare riportati possano variare tra il momento della firma del consenso informato all'esecuzione del test genetico e l'effettuazione dell'analisi stessa a seguito dell'acquisizione di nuove informazioni scientifiche e mediche. È possibile inoltre che, al momento dell'analisi, non siano ancora state identificate tutte le cause genetiche di una patologia (come appunto il Linfedema primario), ma che possano venire individuate con il progredire delle conoscenze o che si possa attribuire, nell'immediato futuro, rilevanza clinica ad una variante genetica definita oggi "di significato sconosciuto o incerto".

## Possibili risultati del test

### Test positivo

L'identificazione di una o più varianti patogenetiche nei geni analizzati conferma la diagnosi clinica ed è un'indicazione per studi di segregazione nella famiglia.

Una variante è da ritenersi patogenetica se è già stata descritta in altri pazienti affetti o se il suo effetto predetto è quello di portare ad una perdita/alterazione di funzione della proteina o ad una modificazione delle interazioni proteina/proteina. In questo modo è quindi possibile determinare la diagnosi molecolare in un nuovo soggetto e/o stabilire un rischio di ricorrenza nei familiari al fine di poter poi programmare adeguate misure preventive e/o terapeutiche.

### Test non conclusivo

Identificazione di una o più varianti sconosciute o di significato patogenetico incerto: varianti mai descritte e/o prive di un evidente significato patogenetico, varianti con evidenze discordanti o non sufficienti per essere classificate come probabilmente benigne o probabilmente patogenetiche nell'ambito del sospetto indagato. In questi casi si consiglia di estendere la ricerca della, o delle varianti identificate ai consanguinei del probando per valutarne la segregazione e chiarirne il contributo. Per alcuni soggetti, potrebbero rendersi necessari eventuali ulteriori indagini clinico/strumentali per l'individuazione di segni minori o un'attenta rivalutazione clinica dei segni di malattia.

### Test negativo

L'assenza di variazioni nelle regioni genomiche indagate non esclude la diagnosi clinica ma suppone:

- La possibile presenza di alterazioni non identificabili mediante sequenziamento, ovvero grandi riarrangiamenti che determinano la perdita (delezione) o il guadagno (duplicazione) di estese porzioni geniche fatta eccezione per i casi per i quali può essere eseguita l'analisi del numero di copie mediante MLPA (Multiplex ligations Probe Amplification).
- La possibile presenza di variazioni di sequenza in regioni geniche non investigate con questo test, ovvero regioni regolatorie (5' e 3' UTR) e regioni profondamente introniche;
- La possibile presenza di variazioni in altri geni non indagati con il presente test.

### Risultati inattesi

Dall'esecuzione del test richiesto potrebbero emergere risultati inattesi (ad esempio informazioni su rapporti di consanguineità, mancata correlazione familiare o relativi alla possibilità di sviluppare malattie su base genetica) determinando il fenomeno meglio noto come 'serendepity'. Secondo le norme di legge attuali è possibile richiedere al clinico di non essere informato di tali risultati.



## Indicazioni del rischio per la prole

Nell'ereditarietà autosomica-dominante, la probabilità che un genitore affetto trasmetta la variante-malattia alla prole è pari al 50% per ciascuna gravidanza, indipendentemente dal sesso del concepito. Conseguentemente il nascituro ha il 50% di probabilità di presentare la patologia.

Nell'ereditarietà autosomica-recessiva, la probabilità che un genitore portatore trasmetta la variante-malattia alla prole è pari al 50% per ciascuna gravidanza. Pertanto in caso di coppia di portatori sani si avrà il 25% di probabilità di avere un figlio affetto, indipendentemente dal sesso del concepito.

Si segnala che, in caso di penetranza incompleta e/o di ridotta espressività, è possibile che la prole, sebbene abbia ereditato la variante malattia, non presenti la patologia o la manifesti con sintomatologia più lieve.

Le varianti somatiche (cioè quelle mutazioni che non vengono individuate sulle cellule germinali circolanti nel sistema cardiovascolare ma solo su frammenti di tessuto sede della lesione) non vengono ereditate dalla prole.

## Possibili limiti del test

- Limiti nella conoscenza scientifica relativa ai geni e alla patologia.
- Gli studi sul DNA non costituiscono un test diagnostico definitivo per tutti i casi e non sono esenti da possibilità di errore.

## Appropriatezza prescrittiva

Il test genetico è appropriato:

- Se il paziente soddisfa i criteri diagnostici per la patologia;
- Se la sensibilità diagnostica del test è maggiore o uguale rispetto a quanto riportato in letteratura per altri test pubblicati.
- Se la prescrizione del test viene effettuata dal genetista o dall'esperto linfologo (Chirurgo generale, Chirurgo Vascolare/Angiologo, Dermatologo, Fisiatra).

## Bibliografia

1. Lee BB, Villavicencio JL (2010) Primary lymphoedema and lymphatic malfor-

mation: are they the two sides of the same coin? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 39:646–653.

2. Brouillard P, Boon L, Vikkula M (2014) Genetics of lymphatic anomalies. *J Clin Invest* 124:898–904.
3. ISL (2016) The diagnosis and treatment of peripheral lymphedema: 2016 consensus document of the international society of lymphology. *Lymphology* 49:170–184.
4. Connell FC, Gordon K, Brice G, Keeley V, Jeffery S, et al. (2013) The classification and diagnostic algorithm for primary lymphatic dysplasia: An update from 2010 to include molecular findings. *Clin Genet* 84:303–314.
5. Brice GW, Mansour S, Ostergaard P, Connell F, Jeffery S, et al. (2014) *Milroy Disease*. (5th edn). Seattle: University of Washington, Seattle.
6. Finegold DN, Baty CJ, Knickelbein KZ, Perschke S, Noon SE, et al. (2012) Connexin 47 mutations increase risk for secondary lymphedema following breast cancer treatment. *Clin Cancer Res* 18:2382–2390.
7. Finegold DN, Schacht V, Kimak MA, Lawrence EC, Foeldi E, et al. (2008) HGF and MET mutations in primary and secondary lymphedema. *Lymphat Res Biol* 6:65–68.
8. Ferrell RE, Baty CJ, Kimak MA, Karlsson JM, Lawrence EC, et al. (2010) GJC2 missense mutations cause human lymphedema. *Am J Hum Genet* 86:943–948.
9. Gordon K, Schulte D, Brice G, Simpson MA, Roukens MG, et al. (2013) Mutation in vascular endothelial growth factor-c, a ligand for vascular endothelial growth factor receptor-3, is associated with autosomal dominant milroy-like primary lymphedema. *Circ Res* 112:956–960.
10. Gonzalez-Garay ML, Aldrich MB, Rasmussen JC, Guilliod R, Lapinski PE, et al. (2016) A novel mutation in CELSR1 is associated with hereditary lymphedema. *Vasc Cell* 8:1.
11. Fang J, Dagenais SL, Erickson RP, Arlt ME, Glynn MW, et al. (2000) Mutations in FOXC2 (MFH-1), a forkhead family transcription factor, are responsible for the hereditary lymphedema-distichiasis syndrome. *Am J Hum Genet* 67:1382–1388.
12. Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC, Steward CG, Brice G, et al. (2011) Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat Genet* 43:929–931.
13. Irrthum A, Devriendt K, Chitayat D, Matthijs G, Glade C, et al. (2003) Mutations in the transcription factor gene SOX18 underlie recessive and dominant forms of hypotrichosis-lymphedema-telangiectasia. *Am J Hum Genet* 72:1470–1478.
14. Ostergaard P, Simpson MA, Mendola A, Vasudevan P, Connell FC, et al. (2012) Mutations in KIF11 cause autosomal-dominant microcephaly variably associated with congenital lymphedema and chorioretinopathy. *Am J Hum Genet* 90:356–362.
15. Brice G, Ostergaard P, Jeffery S, Gordon K, Mortimer P, et al. (2013) A novel mutation in GJA1 causing oculodentodigital syndrome and primary lymphoedema in a three generation family. *Clin Genet* 84:378–381.
16. Martin-Almedina S, Martinez-Corral I, Holdhus R, Vicente A, Fotiou E, et al. (2016) EPHB4 kinase – inactivating mutations cause autosomal dominant lymphatic-related hydrops fetalis. *J Clin Invest* 126:1–9.
17. Tartaglia M, Kalidas K, Shaw A, Song X, Musat DL, et al. (2002) PTPN11 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, genotype-phenotype correlation, and phenotypic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 70:1555–1563.
18. Morcaldi G, Bellini T, Rossi C, Maghnie M, Boccardo F, et al. (2015) Lymphodysplasia and KRAS mutation: a case report and literature review. *Lymphology* 48:121–127.
19. Ekvall S, Wilbe M, Dahlgren J, Legius E, van Haeringen A, et al. (2015) Mutation in NRAS in familial Noonan syndrome – case report and review of the literature. *BMC Med Genet* 16:95.
20. Milosavljević D, Overwater E, Tamminga S, de Boer K, Elting MW, et al. (2016) Two cases of RIT1 associated Noonan syndrome: further delineation of the clinical phenotype and review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 170:1874–1880.
21. Allanson JE, Roberts AE (2016) *Noonan Syndrome*. (12th edn). Seattle: University of Washington, Seattle.
22. Hanson HL, Wilson MJ, Short JP, Chioza BA, Crosby AH, et al. (2014) Germline CBL mutation associated with a Noonan-like syndrome with primary lymphedema and teratoma associated with acquired uniparental isodisomy of chromosome 11q23. *Am J Med Genet Part A* 164:1003–1009.
23. Lo IFM, Brewer C, Shannon N, Shorto J, Tang B, et al. (2008) Severe neonatal manifestations of Costello syndrome. *J Med Genet* 45:167–171.
24. Joyce S, Gordon K, Brice G, Ostergaard P, Nagaraja R, et al. (2016) The lymphatic phenotype in Noonan and cardiofaciocutaneous syndrome. *Eur J Hum Genet* 24:690–696.
25. Au AC, Hernandez PA, Lieber E, Nardoo AM, Shen Y-M, et al. (2010) Protein tyrosine phosphatase PTPN14 is a regulator of lymphatic function and choanal development in humans. *Am J Hum Genet* 87:436–444.
26. Alders M, Hogan BM, Gjini E, Salehi F, Al-Gazali L, et al. (2009) Mutations in CCBE1 cause generalized lymph vessel dysplasia in humans. *Nat Genet* 41:1272–1274.

27. Alders M, Al-Gazali L, Cordeiro I, Dalla-piccola B, Garavelli L, et al. (2014) Hennekam syndrome can be caused by FAT4 mutations and be allelic to Van Maldergem syndrome. *Hum Genet* 133:1161–1167.
28. Fotiou E, Martin-Almedina S, Simpson MA, Lin S, Gordon K, et al. (2015) Novel mutations in PIEZO1 cause an autosomal recessive generalized lymphatic dysplasia with non-immune hydrops fetalis. *Nat Commun* 6:8085.
29. Brouillard P, Dupont L, Helaers R, Coulie R, Tiller GE, et al. (2017) Loss of ADAMTS3 activity causes Hennekam lymphangiectasia–lymphedema syndrome 3. *Hum Mol Genet* 26(21):4095–4104.
30. Döffinger R, Smahi A, Bessia C, Geismann F, Feinberg J, et al. (2001) X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF- $\kappa$ B signaling. *Nat Genet* 2001;27:277–285.
31. Macmurdo CF, Wooderchak-Donahue W, Bayrak-Toydemir P, Le J, Wallenstein MB, et al. (2016) RASA1 somatic mutation and variable expressivity in capillary malformation/arteriovenous malformation (CM/AVM) syndrome. *Am J Med Genet Part A* 170:1450–1454.
32. Burrows PE, Gonzalez-Garay ML, Rasmussen JC, Aldrich MB, Guillod R, et al. (2013) Lymphatic abnormalities are associated with RASA1 gene mutations in mouse and man. *Proc Natl Acad Sci* 110:8621–8626.
33. Tavian D, Missaglia S, Michelini S, Maltese PE, Manara E, Mordente A, Bertelli M. *FOXC2* Disease Mutations Identified in Lymphedema Distichiasis Patients Impair Transcriptional Activity and Cell Proliferation. *Int J Mol Sci*. 2020 Jul 20;21(14):5112. doi: 10.3390/ijms21145112. PMID: 32698337; PMCID: PMC7404146.
34. Maltese PE, Michelini S, Ricci M, Maitz S, Fiorentino A, Serrani R, Lazzerotti A, Bruson A, Paolacci S, Benedetti S, Bertelli M. Increasing evidence of hereditary lymphedema caused by CELSR1 loss-of-function variants. *Am J Med Genet A*. 2019 p;179(9):1718-1724. doi: 10.1002/ajmg.a.61269. Epub 2019 Jun 18. PMID: 31215153.
35. Michelini S, Vettori A, Maltese PE, Cardone M, Bruson A, Fiorentino A, Cappellino F, Sainato V, Guerri G, Marceddu G, Tezzele S, Bertelli M. Genetic Screening in a Large Cohort of Italian Patients Affected by Primary Lymphedema Using a Next Generation Sequencing (NGS) Approach. *Lymphology*. 2016 Jun;49(2):57-72. PMID: 29906362.
36. Michelini S, Cardone M, Haag M, Agga O, Bruson A, Maltese PE, Bonizzato A, Bertelli M. A Rare Case of Emberger Syndrome Caused By a De Novo Mutation in the GATA2 Gene. *Lymphology*. 2016 Mar;49(1):15-20. Erratum in: *Lymphology*. 2016 Jun;49(2):111. PMID: 29906059.
37. Michelini S, Degiorgio D, Cestari M, Corda D, Ricci M, Cardone M, Mander A, Famoso L, Contini E, Serrani R, Pinelli L, Cecchin S, Bertelli M. Clinical and genetic study of 46 Italian patients with primary lymphedema. *Lymphology*. 2012 Mar;45(1):3-12. Erratum in: *Lymphology*. 2012 Jun;45(2):87. PMID: 22768468.
38. Michelini S, Paolacci S, Manara E, Eretta C, Mattassi R, Lee BB, Bertelli M. Genetic tests in lymphatic vascular malformations and lymphedema. *J Med Genet*. 2018 Apr;55(4):222-232. doi: 10.1136/jmedgenet-2017-105064. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29440349.
39. Tavian D, Missaglia S, Maltese PE, Michelini S, Fiorentino A, Ricci M, Serrani R, Walter MA, Bertelli M. *FOXC2* disease-mutations identified in lymphedema-distichiasis patients cause both loss and gain of protein function. *Oncotarget*. 2016 Aug 23;7(34):54228-54239.