

# Genetica e Discinesia Ciliare Primitiva

Genetics and Primary Ciliary Dyskinesia

---

Martina Rinelli<sup>1</sup>, Marco Poeta<sup>2</sup>, Francesca Santamaria<sup>2</sup>, Antonio Novelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Sezione di Pediatria, Università Federico II, Napoli

**Corrispondenza:** Antonio Novelli **e-mail:** antonio.novelli@opbg.net

**Riassunto:** La Discinesia Ciliare Primitiva (DCP) è una rara malattia autosomica recessiva determinata da anomalie dell'ultrastruttura e della funzionalità ciliare, con notevole eterogeneità genotipica e fenotipica. Negli ultimi anni sono stati identificati un numero crescente di geni associati alla malattia, codificanti proteine assone-miche, citoplasmatiche e regolatorie coinvolte nell'assemblaggio, nella struttura e nella funzione ciliare. Questi progressi hanno modificato l'approccio ai test diagnostici per DCP, ciononostante considerate le difficoltà nella diagnosi e la rarità del disordine si conosce ancora poco riguardo le associazioni tra specifici genotipi e le manifestazioni cliniche della malattia, se non per le più comuni mutazioni.

**Parole chiave:** Discinesia Ciliare Primitiva, Genetica, *Next Generation Sequencing*, Sindrome di Kartagener

**Summary:** Primary Ciliary Dyskinesia (PCD) is a rare genetic disease characterized by ultrastructure and ciliary function abnormalities, with remarkable genotype and phenotype heterogeneity. In last years an increasing number of causative genes have been identified, encoding axonemic, cytoplasmic and regulatory proteins involved in assembly, structure and function of cilia. These advances have changed the approach to PCD diagnosis, however, given the rarity of the disorder, little is known about correlations between specific genotypes and clinical manifestations, except for the most frequent mutations.

**Keywords:** Primary Ciliary Dyskinesia, Genetics, Next Generation Sequencing, Kartagener Syndrome.

---

## INTRODUZIONE

La Discinesia Ciliare Primitiva (DCP) è una malattia rara (MIM no. 244400), caratterizzata da anomalie ultrastrutturali ciliari e conseguente compromissione della clearance mucociliare, con estrema variabilità clinica ed eterogeneità genotipica, la cui modalità di trasmissione è prevalentemente autosomica recessiva. Si tratta di una condizione frequente soprattutto nelle popolazioni con elevato tasso di matrimoni tra consanguinei. L'incidenza è di 1:10.000-1:15.000 nati vivi, anche se la DCP è probabilmente fortemente sottostimata in molti paesi, specie in assenza di difetti di lateralità, a causa di sintomi respiratori aspecifici comuni in età pediatrica (1). Il quadro clinico è caratterizzato da distress respiratorio neonatale, infezioni respiratorie ricorrenti (rinosinusite, otiti, bronchiti, polmoniti e conseguenti bronchiectasie) e broncopneumopatia cronica progressiva ad esordio in età pediatrica. Nel 40-50% dei casi si associa a *Situs viscerum inversus*, configurando il quadro della Sindrome di Kartagener, o a difetti di lateralità parziali (*Situs ambiguous*) a causa di disfunzione ciliare del nodo embrionale. Altre manifestazioni comuni sono l'ipoacusia di tipo trasmissivo e l'ipo-infertilità maschile e femminile (2).

Oltre ad un test di screening, la misurazione dell'ossido nitrico nasale (nNO), non è disponibile al momento un unico metodo diagnostico per la DCP, ma diversi test che combinati alle manifestazioni cliniche permettono di definire la diagnosi sebbene con diversi gradi di specificità e sensibilità. Ad esempio, lo studio dell'ultrastruttura ciliare in microscopia elettronica (TEM) e i pannelli di *Next Generation Sequencing* (NGS) per la ricerca di mutazioni nei geni noti associati non sono in grado di identificare il 20-30% dei pazienti affetti con possibili falsi negativi. In tal senso nuove metodiche quali lo studio del pattern e della frequenza del battito ciliare in videomicroscopia ad alta velocità (HSVMA) e dell'ultrastruttura ciliare in immunofluorescenza (IF) ad alta risoluzione permettono di ridurre il numero di diagnosi mancate. Giungere alla

diagnosi non è pertanto semplice e anche tra le società internazionali non c'è ancora consenso sul migliore protocollo diagnostico da utilizzare (3).

## GENETICA ED ULTRASTRUTTURA CILIARE

La DCP può essere causata da un difetto a livello dei polipeptidi dell'assonema delle ciglia o della coda dello spermatozoo, di proteine presenti nella membrana ciliare e nella matrice o di proteine necessarie per il corretto assemblaggio delle ciglia, influenzando la biogenesi e la motilità di queste strutture cellulari (4). Le ciglia mobili sono presenti sull'epitelio di tutto il tratto respiratorio e sono costituite da un assonema formato da nove coppie di microtubuli periferici che circondano un'unica coppia di microtubuli centrali. Ponti di nexina connettono coppie di micro-tubuli periferici adiacenti, ciascuna delle quali costituita da un microtubulo completo (microtubulo A) e da un microtubulo parziale (microtubulo B) e connessa mediante i *radial spokes* alla coppia di microtubuli centrali. Ogni microtubulo A ha due bracci, uno interno (*inner dynein arm*, IDA) ed uno esterno (*outer dynein arm*, ODA), formati dalla dineina, proteina motoria in grado di fornire energia per il movimento ciliare. Ogni ciglio è formato inoltre da un corpo basale che, connettendosi al centrosoma, permette di ancorare il ciglio al citoplasma apicale della cellula. A livello dell'epitelio respiratorio, questo tipo di ciglia facilita l'espulsione delle secrezioni mucose, svolgendo un importante meccanismo di difesa delle vie aeree.

Dall'analisi molecolare dei geni candidati, nel 1999 è stato possibile identificare il primo gene responsabile di DCP (5): *DNAI1* (dineina assomemale - catena intermedia 1). Le conoscenze sulla genetica della DCP si sono poi rapidamente evolute con l'identificazione continua di un numero crescente di geni (Tabella 1). La maggior parte dei geni causativi finora identificati codificano per componenti del braccio esterno della dineina (6-8): *DNAI* (10-12% dei pazienti), *DNAH5* (28% dei pazienti), *DNAI2* (2-4% dei pazienti), *DNAH11*, *TXNDC3*, *CCDC114* e *ARMC4* (identificati più raramente). Le mutazioni nei geni *LRRC50*, *DNAAF2*, *DNAAF3*, *CCDC103*, *HEATR2*, *LRRC6*, *ZMYND10* e *DYX1C1*, sono responsabili di difetti combinati dei bracci interno ed esterno della dineina (9-10). Mutazioni nei geni *RSPH9* e *RSPH4A* sono state descritte in soggetti affetti da DCP con assenza della coppia centrale (11-12). I difetti dei *radial spokes*, associati a mutazioni a carico dei geni *CCDC39* e *CCDC40*, coinvolgono il complesso regolatorio della dineina (DRC) ed i complessi regolatori della nexina (13-14). Infine, in pazienti con mutazioni a carico dei geni *HYDIN*, *CCDC164* e *CCDC65* le ciglia risultano normali o caratterizzate da anomalie ultrastrutturali molto lievi (15-16).

**Tab.1:** Geni noti associati a Discinesia Ciliare Primitiva e corrispettiva alterazione dell'ultrastruttura ciliare valutata in microscopia elettronica. <sup>a</sup> difetto solo delle sezioni ciliari distali; <sup>b</sup> ereditarietà X-linked; <sup>c</sup> TEM frequentemente normale o con sottili anomalie; <sup>d</sup> difetto evidenziato solo con tomografia.

<b>Difetto del braccio esterno della dineina</b> <i>DNAH5, DNAI1, DNAI2, DNALI1, NME8, DNAH9<sup>a</sup>, CCDC114, ARMC4, CCDC151, TTC25, MNS1</i>
<b>Difetto del braccio esterno e del braccio interno della dineina</b> <i>DNAAF1, DNAAF2, DNAAF3, DNAAF4, DNAAH5, LRRC6, ZMYND10, SPAG1, C21ORF59, PIH1D3<sup>b</sup>, CCDC103</i>
<b>Difetto del braccio interno della dineina e disorganizzazione microtubulare</b> <i>CCDC39, CCDC40</i>
<b>Disorganizzazione microtubulare</b> <i>CCDC164, CCDC65, GAS8</i>
<b>Difetto della coppia centrale</b> <i>RSPH1, RSPH3, RSPH4A, RSPH9, DNAJB13, HYDIN<sup>c</sup>, STK36<sup>c</sup></i>
<b>Assenza o ridotto numero di ciglia</b> <i>CCNO, MCIDAS</i>
<b>Ultrastruttura ciliare nella norma</b> <i>CCDC11, ENKUR, GAS2L2, LRRC56, DNAH11<sup>d</sup></i>

## INDAGINI GENETICHE

Alla luce di una eterogeneità genica estremamente elevata, la diagnosi di questa condizione risulta estremamente complessa, i metodi diagnostici si basano sull'analisi ultrastrutturale e funzionale delle ciglia, nonché sul corretto inquadramento genetico della condizione. Per differenziare difetti genetici congeniti da anomalie acquisite transitorie (discinesia secondaria), l'indagine genetica diventa fondamentale. Attualmente la diagnosi di DCP, che un tempo si basava principalmente sull'esame ultrastrutturale del ciglio mediante TEM, è supportata da test genetici specifici che sfruttano sofisticate tecniche di NGS, che consentono lo studio di molteplici geni in un'unica seduta analitica. L'analisi NGS si avvale di pannelli targhettati contenenti geni già descritti in associazione alla DCP. Tuttavia, qualora non emergano varianti associate nei geni noti, lo studio può essere ulteriormente esteso alla ricerca di varianti nell'intero esoma (*Clinical-Exome-Sequencing* e *Whole-Exome-Sequencing*). Seguendo tale approccio diagnostico, l'analisi dell'esoma clinico per la diagnosi di DCP non si limita a cercare varianti già conosciute e descritte, ma consente di identificare nuovi geni candidati ad oggi non ancora descritti in associazione ad uno specifico fenotipo clinico e verosimilmente correlabili alla patologia. La complessità di questo tipo di analisi risiede nella molteplicità di dati generati da ogni singolo esperimento, per cui sono necessari specifici software per il filtraggio e la prioritizzazione delle varianti. I geni associati al quadro clinico vengono selezionati sfruttando specifici database, OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) o *GeneReviews*, mentre le varianti vengono classificate in probabilmente benigne (classe 2), di significato incerto (VUS) (classe 3), probabilmente patogenetiche (classe 4) o patogenetiche (classe 5), secondo le linee guida dell'American College of Medical Genetics and Genomics (17). È noto che, ad influire sul quadro clinico e sulla presenza di segni clinici caratteristici, come il *Situs Viscerum Inversus*, concorre sia il tipo di gene coinvolto, sia la natura della variante genetica riscontrata. La maggior parte delle mutazioni ad oggi descritte come patogenetiche in associazione alla DCP sono *loss-of-function* (18) (non-senso o localizzate in un sito di *splicing* della proteina) e determinano l'assenza o la totale perdita di funzione della proteina con assente o ridotta motilità ciliare. Considerata la rarità della malattia è frequente il riscontro di varianti missenso di incerto significato. Per l'interpretazione di tali varianti e della loro effettiva associazione con il quadro clinico sono fondamentali il riferimento a precedenti casi descritti in letteratura, la ricerca delle varianti genetiche nei diversi database scientifici (*ClinVar*, *Human Gene Mutation Database*, *Leiden Open Variation Database*) e la frequenza allelica nella popolazione (*gnomAD - Genome Aggregation Database*), dalla cui analisi è possibile predire l'effetto della mutazione sulla proteina. In particolare per le varianti genetiche ad incerto significato clinico, i soli modelli predittivi *in silico* non sono sufficienti a predirne la patogenicità ed è fondamentale estendere il test ad altri componenti della famiglia. Considerate la modalità di trasmissione della patologia e la possibilità che due diverse varianti in uno stesso gene (eterozigosi composta) o in due geni differenti possano concorrere insieme nell'alterare la funzionalità della proteina, studiare la segregazione di specifiche mutazioni nei genitori del paziente con DCP diventa indispensabile per proseguire il corretto iter diagnostico.

## CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO

Il fenotipo così eterogeneo della DCP presenta una stretta relazione con i diversi difetti genetici: mutazioni di *CCDC39* e *CCDC40* si associano a peggiori funzione polmonare e parametri di crescita (19), mutazioni di *RSPH1* sono associate a *Situs solitus* e fenotipo respiratorio meno grave (20), mutazioni a carico di altri geni a normali livelli di nNO (*GAS8*, *RSPH1*), a specifici pattern di battito ciliare (*RSPH*, *CCDC39*, *CCDC40*, *DNAH11*), a disfunzione della ciliogenesi (*CCNO*, *MCIDAS*) o a difetti di lateralità (*CCDC11*) e disfunzione dei flagelli spermatici (*RSPH6A*) in assenza di manifestazioni respiratorie (1). Tali segnalazioni stanno rendendo più semplice lo studio dell'associazione genotipo-fenotipo, anche se, considerate le difficoltà

diagnostiche, la rarità della malattia e la presenza di geni causativi non ancora identificati tale correlazione non è ancora disponibile per tutti i casi.

## TERAPIA GENICA

Attualmente non esiste un trattamento specifico per la DCP, gli individui affetti soffrono di infezioni respiratorie ricorrenti con possibile sviluppo di bronchiectasie e progressivo deterioramento della funzionalità polmonare. L'identificazione delle mutazioni genetiche responsabili e la caratterizzazione di specifici geni coinvolti, offre l'opportunità di utilizzare le tecniche di "trasferimento genico" per correggere il difetto e ripristinare la normale funzione ciliare e la salute polmonare dei pazienti. Tuttavia, la rarità della DCP e l'assenza di modelli animali adeguati rende difficoltoso l'approccio per questi nuovi modelli di terapia genica. A fare da apripista per possibili modelli *in vitro*, è uno studio del 2010 in cui è stato utilizzato un vettore di trasferimento genico per esprimere la normale proteina DNAI1 in un modello murino di DCP (21). Più recentemente è stato inoltre descritto un modello di terapia genica basato su *DNAH5*-shRNA per il silenziamento del gene nelle cellule dell'epitelio bronchiale. Le dimensioni molto grandi di questi geni infatti rendono difficoltoso l'utilizzo dei vettori virali comunemente utilizzati in terapia genica e le cellule vengono pertanto trasdotte con un lentivirus che esprime uno shRNA per *DNAH5* (22). Infine, l'utilizzo *ex-vivo* del *gene editing* è risultato in grado di determinare la normalizzazione del pattern del battito ciliare in caso di mutazioni di *DNAH11* (23).

## LA NOSTRA ESPERIENZA

Si riporta l'esperienza del laboratorio di Genetica Medica dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma che ha studiato 27 pazienti con caratteristiche cliniche di DCP, provenienti dall'unità di Pneumologia Pediatrica dell'AOU Federico II di Napoli. La diagnosi è stata confermata in 10 dei pazienti analizzati, mediante il riscontro di varianti genetiche a carico di uno o più geni associati a DCP (Tabella 2). L'analisi genetico-molecolare è stata eseguita mediante NGS, utilizzando un pannello targhettato (Roche NimbleGen, Madison, WI) che comprende 50 geni correlati a DCP. La *pipeline BaseSpace* (Illumina, <https://basespace.illumina.com>) e il *software TGex* (LifeMap Sciences, Inc.) sono stati utilizzati rispettivamente per la chiamata e l'annotazione delle varianti identificate. Le varianti riscontrate e classificate come patogene e le varianti a significato incerto (VUS) sono state confermate contestualmente all'indagine di segregazione familiare sui genitori, mediante sequenziamento Sanger. Dallo studio è emerso che un paziente presentava due mutazioni verosimilmente patogenetiche, in uno dei geni codificanti per le componenti del complesso regolatorio della dineina (DRC), *CCDC40*. In 4 pazienti, lo studio familiare ha permesso di identificare la presenza di due varianti diverse in uno stesso gene, confermando una condizione di eterozigosi composta. A conferma di quanto riportato in letteratura scientifica, i geni principalmente mutati codificano per componenti ODA (*DNAH5*, *DNAH11* e *DNAI*). Nei restanti 17 pazienti, è stata riscontrata una sola variante monoallelica o più di una variante, in geni diversi associati a DCP. In questi casi la possibilità di indagare eventuali delezioni o duplicazioni a carico dei geni coinvolti costituisce una possibile ipotesi per chiarire la natura di queste mutazioni e confermare o meno la diagnosi genetica. Questo studio ha permesso di confermare, in molti dei pazienti studiati, la presenza di mutazioni nei geni più frequentemente coinvolti nello sviluppo della malattia, consentendo inoltre l'identificazione di varianti ad oggi non descritte in letteratura scientifica e classificate come VUS in geni da poco associati alla DCP, ponendo le basi per successivi studi scientifici che potrebbero chiarire la funzione delle varianti sull'attività della proteina.

**Tab.2:** Varianti genetiche riscontrate in 10 pazienti affetti da Discinesia Ciliare Primitiva seguiti presso l'AOU Federico II di Napoli e studiati presso il Laboratorio di Genetica Medica dell'Ospedale Pediatrico Bambin Gesù di Roma. In 4 dei pazienti analizzati l'assenza dei genitori non ha permesso di confermare l'eterozigosi composta. Alcune delle varianti sono riportate come verosimilmente patogenetiche/patogenetiche o VUS e sono principalmente varianti nonsenso o di *splicing*.

Chr	RefGene	Modifica Amminoacidica		Classificazione ACMG	Segregazione	Trasmissione
Chr7	DNAH11 - NM_001277115.1	p. Leu1546Pro	p.Ser1553Ter	VUS - Patogenetica		Eterozigosi composta
Chr9	DNAI1 - NM_001281428.1	p.Pro52LeufsTer		VUS	Non verificata	Omozigosi
Chr7	DNAH11 - NM_001277115.1	p.Ile1334Thr	p.Arg3888Cys	VUS	Non verificata	
Chr7	DNAH11 - NM_001277115.1	p.Gln1401Arg	p.Ser2863Thr	VUS	Non verificata	
Chr17	CCDC40 - NM_017950.3	c.856-18G>A	p.Thr864AsnfsTer10	VUS - Patogenetica	Non verificata	
Chr5	DNAH5 - NM_001369.2	p.Gln1450Ter	p.Arg1883Ter	Patogenetica		Eterozigosi composta
Chr17	CCDC103 - NM_213607.1	p.His154Pro		VUS	Non verificata	Omozigosi
Chr7	DNAH11 - NM_001277115.1	p.Val2745Asp	p.Pro4458Leu	VUS		Eterozigosi composta
Chr5	DNAH5 - NM_001369.2	c.3396+1G>T	c.7753-1G>T	Patogenetica		Eterozigosi composta
Chr9	DNAI1 - NM_001281428.1	p.Cys559Tyr	p.Gly515Ser	Probabilmente patogenetica	Non verificata	

## CONCLUSIONI

La DCP è una condizione rara con coinvolgimento multisistemico, tuttavia l'identificazione della causa genetica può favorire la diagnosi precoce. Ad oggi non è disponibile un unico test per la diagnosi, ma questa può essere raggiunta solo dalla combinazione di diverse metodiche (nNO, TEM, HSVMA, IF) con i risultati delle indagini genetiche. Infatti, considerato il coinvolgimento di un elevato numero di geni e mutazioni, con possibili ulteriori geni coinvolti non ancora identificati, l'analisi genetico-molecolare da sola non può essere ancora considerata un test diagnostico definitivo per la DCP. Un corretto inquadramento clinico della condizione, con il supporto di una consulenza genetica pre- e post- diagnosi, può aiutare nella corretta gestione dei pazienti e delle loro famiglie. Sebbene la comprensione delle influenze del genotipo sul fenotipo della malattia sia in aumento, i progressi in tal senso sono limitati dall'esiguo numero di pazienti affetti da DCP, per cui si rendono sempre più necessari studi collaborativi multicentrici.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Lucas JS, Davis SD, Omran H, et al. *Primary ciliary dyskinesia in the genomics age*. *Lancet Respir Med* 2020; 8: 202-216.
- (2) Mirra V, Werner C, Santamaria F. *Primary Ciliary Dyskinesia: An Update on Clinical Aspects, Genetics, Diagnosis, and Future Treatment Strategies*. *Front Pediatr* 2017; 5:135.
- (3) Shoemark A, Dell S, Shapiro A, et al. *ERS and ATS Diagnostic Guidelines for Primary Ciliary Dyskinesia: Similarities and Differences in Approach to Diagnosis*. *Eur Respir J* 2019; 54: 1901066.
- (4) Fassad MR, Patel MP, Shoemark A, et al. *Clinical utility of NGS diagnosis and disease stratification in a multiethnic primary ciliary dyskinesia cohort*. *J Med Genet* 2020; 57: 322-330.
- (5) Pennarun G, Escudier E, Chapelin C, et al. *Loss-of-function mutation in a human gene related to Chlamydomonas reinhardtii dynein IC78 result in primary ciliary dyskinesia*. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1508-1519.
- (6) Shoemark A, Dixon M, Corrin B, et al. *Twenty-year review of quantitative transmission electron microscopy for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia*. *J Clin Pathol* 2012; 65: 267-271.
- (7) Hjeij R, Lindstrand A, Francis R, et al. *ARMC4 mutations cause primary ciliary dyskinesia with randomization of left/right body asymmetry*. *Am J Hum Genet* 2013; 93: 357-367.
- (8) Duriez B, Duquesnoy P, Escudier E, et al. *A common variant in combination with a nonsense mutation in a member of the thioredoxin family causes primary ciliary dyskinesia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 3336-3341.
- (9) Duquesnoy P, Escudier E, Vincensini L, et al. *Loss-of-function mutations in the human ortholog of Chlamydomonas reinhardtii ODA7 disrupt dynein arm assembly and cause primary ciliary dyskinesia*. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 890-896.
- (10) Knowles MR, Leigh MW, Carson JL, et al. *Genetic Disorders of Mucociliary Clearance Consortium. Mutations of DNAH11 in patients with primary ciliary dyskinesia with normal ciliary ultrastructure*. *Thorax* 2012; 67: 433-441.
- (11) Castleman VH, Romio L, Chodhari R, et al. *Mutations in radial spoke head protein genes RSPH9 and RSPH4A cause primary ciliary dyskinesia with central-microtubular-pair abnormalities*. *Am J Hum Genet* 2009; 84: 197-209.
- (12) Kott E, Legendre M, Copin B, et al. *Loss-of-function mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with central-complex and radial-spoke defects*. *Am J Hum Genet* 2013; 93: 561-570.
- (13) Antony D, Becker-Heck A, Zariwala MA, et al. *Mutations in CCDC39 and CCDC40 are the major cause of primary ciliary dyskinesia with axonemal disorganization and absent inner dynein arms*. *Hum Mutat* 2013; 34: 462-472.
- (14) Merveille AC, Davis EE, Becker-Heck A, et al. *CCDC39 is required for assembly of inner dynein arms and the dynein regulatory complex and for normal ciliary motility in humans and dogs*. *Nat Genet* 2011; 43:72-78.
- (15) Knowles MR, Leigh MW, Carson JL, et al. *Genetic Disorders of Mucociliary Clearance Consortium. Mutations of DNAH11 in patients with primary ciliary dyskinesia with normal ciliary ultrastructure*. *Thorax* 2012; 67: 433-441.
- (16) Horani A, Brody SL, Ferkol TW, et al. *CCDC65 mutation causes primary ciliary dyskinesia with normal ultrastructure and hyperkinetic cilia*. *PLoS ONE* 2013; 8: e72299.
- (17) Richards S, Aziz N, Bale S, et al. *ACMG Laboratory Quality Assurance Committee Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. *Genet Med* 2015; 17: 405-424.

- (18) Pennarun G, Escudier E, Chapelin C, et al. *Loss-of-Function Mutations in a Human Gene Related to Chlamydomonas reinhardtii Dynein IC78 Result in Primary Ciliary Dyskinesia*. Am J Hum Genet 1999; 65: 1508-1519.
- (19) Davis SD, Ferkol TW, Rosenfeld M, et al. *Clinical features of childhood primary ciliary dyskinesia by genotype and ultrastructural phenotype*. Am J Respir Crit Care Med 2015; 191: 316-324.
- (20) Knowles MR, Ostrowski LE, Leigh MW, et al. *Mutations in RSPH1 cause primary ciliary dyskinesia with a unique clinical and ciliary phenotype*. Am J Respir Crit Care Med 2014; 189: 707-717.
- (21) Ostrowski LE, Yin W, Thompson KE, et al. *Pilot Studies Of Gene Therapy For Primary Ciliary Dyskinesia*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2010; 181: A6604.
- (22) Munye M, Hirst RA, O'Callaghan C, et al. *Towards gene therapy for primary ciliary dyskinesia*. Cilia 2012; 1: P109.
- (23) Lai M, Pifferi M, Bush A, et al. *Gene editing of DNAH11 restores normal cilia motility in primary ciliary dyskinesia*. J Med Genet 2016; 53: 242-249.