

Volume Atti

15-18  
Novembre  
**2017**  
NAPOLI

**XX**

CONGRESSO  
NAZIONALE



**SIGU**

[www.congresso.sigu.net](http://www.congresso.sigu.net)



**BioMEDIA**  
La condivisione del sapere



## *Comunicazioni Orali*





**C01**  
**1510 diagnosi postnatale effettuate mediante CMA (Chromosomal Microarrays Analysis) in pazienti riferiti unicamente per disabilità intellettiva/ritardo dello sviluppo. Studio collaborativo del GdL SIGU di Cito-genetica/genomica**

L. Catusi<sup>1</sup>, M.P. Recalcati<sup>1</sup>, M. Garzo<sup>1</sup>, M. Alfonsi<sup>2</sup>, A. Alghisi<sup>3</sup>, S. Cappellani<sup>4</sup>, R. Casalone<sup>5</sup>, R. Caselli<sup>6</sup>, C. Ceccarini<sup>7</sup>, C. Ceglia<sup>8</sup>, A.M. Ciaschini<sup>9</sup>, D. Coviello<sup>10</sup>, F. Crosti<sup>11</sup>, A. D'Aprile<sup>7</sup>, A. Fabretto<sup>4</sup>, R. Genesio<sup>12</sup>, M. Giagnacovo<sup>13</sup>, P. Granata<sup>5</sup>, I. Longo<sup>6</sup>, M. Malacarne<sup>10</sup>, G. Marseglia<sup>14</sup>, A. Montaldi<sup>3</sup>, A.M. Nardone<sup>15</sup>, C. Palka<sup>16</sup>, V. Pecile<sup>4</sup>, C. Pessina<sup>5</sup>, D. Postorivo<sup>15</sup>, S. Redaelli<sup>17</sup>, A. Renieri<sup>6</sup>, C. Rigon<sup>18</sup>, F. Tiberi<sup>9</sup>, M. Tonelli<sup>19</sup>, C. Valtorta<sup>1</sup>, N. Villa<sup>11</sup>, A. Zilio<sup>3</sup>, D. Zuccarello<sup>18</sup>, A. Novelli<sup>20</sup>, L. Larizza<sup>1</sup>, D. Giardino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Citogenetica Medica e Genetica Molecolare, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano, Italia (giardino@auxologico.it, i.catusi@auxologico.it)

<sup>2</sup>U.O.C. di Genetica medica Ospedale SS Annunziata, Chieti, Italia

<sup>3</sup>U.O.S. Genetica e Biologia Molecolare, Azienda ULSS 6, Vicenza, Italia

<sup>4</sup>S.C. Genetica Medica, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste, Italia

<sup>5</sup>SMeL specializzato Citogenetica e Genetica Medica, ASST Sette Laghi, Osp. di Circolo e Fond. Macchi, Varese, Italia

<sup>6</sup>U.O.C. Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italia

<sup>7</sup>Lab. di Citogenetica, A.O.U. Ospedali Riuniti di Foggia, Foggia, Italia

<sup>8</sup>U.O.C. Genetica Medica, AORN S.G. MOSCATI, Avellino, Italia

<sup>9</sup>Lab. Genetica Medica SOS Malattie Rare, AO.U Ospedali Riuniti Umberto I-G.M.Lancisi-G.Salesi di Ancona, Ancona, Italia

<sup>10</sup>Lab. di Genetica Umana, E.O. Ospedali Galliera, Genova, Italia

<sup>11</sup>U.S. Genetica Medica, Ospedale San Gerardo- ASST Monza, Italia

<sup>12</sup>U.O.C. di Citogenetica, A.O.U. Federico II, Napoli, Italia

<sup>13</sup>Lab. di Genetica, ASST Lariana - Ospedale Sant' Anna di Como, Como, Italia

<sup>14</sup>S.O.D. Diagnostica Genetica, A.O.U. Careggi, Firenze, Italia

<sup>15</sup>U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, Policlinico Tor Vergata, Roma, Italia

<sup>16</sup>Dipartimento di Pediatria, Universit G. D'Annunzio, Chieti-Pescara, Italia

<sup>17</sup>Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Universit di Milano-Bicocca, Monza, Italia

<sup>18</sup>U.O.C. Genetica e Epidemiologia Clinica, A.O.U. di Padova, Padova, Italia

<sup>19</sup>LCGM Dipartimento di Medicina Molecolare e Trasazionale Universit di Brescia, Italia

<sup>20</sup>U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico del Bambino Gesù, Roma, Italia

Sono qui presentati i risultati delle CMA (Chromosomal Microarray Analyses) condotte su 1510 pazienti riferiti esclusivamente per Disabilità intellettiva/Ritardo dello sviluppo (DI/RS) idiopatici da 17 laboratori italiani che hanno partecipato al progetto collaborativo nato nell'ambito del Gruppo di Lavoro SIGU di Cito-genetica e Citogenomica. Complessivamente sono state identificate 528 CNVs (Copy Number Variations) in 411 dei 1510 pazienti (27%), di cui 258 maschi (63%) e 153 femmine (37%). Delle 528 CNVs, 139 sono state osservate in 128 pazienti (8%) e classificate come patogenetiche (26%), mentre 389 come varianti di significato incerto (74%) (VOUS, Variants Of Unknown Significance). In quest'ultimo gruppo sono comprese 57 VOUS probabilmente patogenetiche (11%),

83 VOUS probabilmente benigne (16%) e 249 VOUS senza sotto-classificazione (47%).

Tra le 528 CNVs identificate, 231 sono risultate delezioni (44%) mentre 297 duplicazioni (56%); tra le CNVs patogenetiche predominano le delezioni (60%), mentre tra le VOUS le duplicazioni (62%).

La dimensione media delle CNVs totali è di 2,3 Mb, 6,4 Mb per le CNVs patogenetiche e 907 kb per le VOUS. L'origine parentale è stata determinata per 285 CNVs (54%), che sono risultate ereditate per la maggior parte (87%). I cromosomi che presentano il maggior numero di CNVs sono in ordine decrescente i cromosomi 22, 15, X, 16 e 17.

I risultati ottenuti dal presente studio, che aggrega la più numerosa casistica italiana, verranno discussi alla luce di analoghi studi della letteratura.

**C02**  
**Breaking TADs: an emerging pathogenic mechanism exemplified by Autosomal Dominant demyelinating LeukoDystrophy (ADLD)**

E. Giorgio<sup>1</sup>, M. Spielmann<sup>2</sup>, B.C. Nmezi<sup>3</sup>, G. Vaula<sup>7</sup>, A. Lehman<sup>4</sup>, A. Bartoletti-Stella<sup>5</sup>, A. Brussin<sup>1</sup>, S. Cavalieri<sup>6</sup>, M. Ferrero<sup>1</sup>, E. Di Gregorio<sup>6</sup>, C. Mancini<sup>1</sup>, E. Pozzi<sup>1</sup>, E. Riberi<sup>1</sup>, P. Cortelli<sup>5</sup>, S. Capellari<sup>5</sup>, Q.S. Padiath<sup>3</sup>, A. Brusco<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Dep. of Medical Sciences, Medical Genetics Unit, University of Torino, Torino

<sup>2</sup>Max-Planck-Institute for Molecular Genetics, Berlin

<sup>3</sup>Dept. of Human Genetics, University of Pittsburgh, Pennsylvania

<sup>4</sup>Dept. of Medical Genetics, University of British Columbia, Vancouver, Canada

<sup>5</sup>Dept. of Biomedical and Neuromotor Sciences, University of Bologna, Bologna

<sup>6</sup>Medical Genetics Unit, Città della Salute e della Scienza University Hospital, Torino

<sup>7</sup>Dept of Neurology, Città della Salute e della Scienza University Hospital

Genomic rearrangements and copy-number variants (CNVs) are structural aberrations of the human genome which contribute to human disease. It is well established that structural abnormalities spanning coding genes can have pathogenic consequences due to gene dosage effect (coding CNVs). However, the increasing knowledge about regulatory elements, spatial folding of DNA, and more recently the discovery of Topologically Associated Domains (TADs) allowed the identification of rearrangements that modify the regulatory context of disease genes, without affecting their coding region (non-coding CNVs). Here, we describe an instructive and unique example of a neurodegenerative disorder (Autosomal Dominant adult-onset demyelinating LeukoDystrophy, ADLD) associated to both coding and noncoding CNVs at the LMNB1 locus. ADLD is a hereditary, progressive and fatal disorder affecting myelin in the central nervous system. ADLD is due to LMNB1 gene duplication, causing its overexpression at mRNA and protein levels. We have collected four patients with clinical and MRI findings suggestive of ADLD, without LMNB1 duplication. Using array-CGH and long range PCR, we have identified four different overlapping deletions located upstream LMNB1 and we have characterized their breakpoints (deletions coordinates, hg19: US1 chr5: 125,352,465-126,024,979; US2 chr5: 125,492,412-126,101,296; KOR chr5: 125,857,895-126,108,379; ITA chr5: 125,386,030-126,046,459). The minimal deleted region was 167 kb and span the physiological enhancer of the LMNB1 gene already characterized by our group. Furthermore, it eliminates a TAD boundary, allowing foreign interactions between the LMNB1 promoter and four strong brain-specific enhancers located 1.8, 1.45, 1.4 and 0.76 Mb apart (enhancer-adoption mechanism). We demonstrated LMNB1 overexpression (2.5-4 fold) in fibroblasts (n=2), and in postmortem brain sample (n=1). In conclusion, ADLD is always caused by LMNB1 overexpression due to two alternative mechanisms: the duplication of the LMNB1 gene and a position effect that alters LMNB1 regulatory landscape. This latter represents an emerging pathogenic mechanism that should be taken into account in the presence of genomic rearrangements in clinical practice.



**C03**  
**Il programma vite coraggiose - pazienti senza diagnosi**

M. Tartaglia<sup>1</sup>, S. Barresi<sup>1</sup>, A. Bruselles<sup>1</sup>, A. Ciolfi<sup>1</sup>, M.L. Dentici<sup>1</sup>, M. Niceta<sup>1</sup>, F. Pantaleoni<sup>1</sup>, S. Pizzi<sup>1</sup>, F.C. Radio<sup>1</sup>, M. Macchiaiolo<sup>1</sup>, A. Masotti<sup>1</sup>, M. Trivisano<sup>1</sup>, A. Capuano<sup>1</sup>, R. Carozzo<sup>1</sup>, L. Travaglini<sup>1</sup>, G. Zanni<sup>1</sup>, A. D'Amico<sup>1</sup>, A. Baban<sup>1</sup>, R. Cutrera<sup>1</sup>, G. Zambruno<sup>1</sup>, G. Torre<sup>1</sup>, C. Dionisi-Vici<sup>1</sup>, N. Specchio<sup>1</sup>, A. Novelli<sup>1</sup>, A. Bartuli<sup>1</sup>, M.C. Digilio<sup>1</sup>, E. Bertini<sup>1</sup>, B. Dallapiccola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ospedale Pediatrico Bambino Gesù

La diagnosi è il punto di partenza per una corretta presa in carico. Tuttavia, la scarsa caratterizzazione della variabilità clinica e della storia naturale della maggior parte delle malattie rare e la presenza di oltre 8000 entità nosologiche descritte rende difficile giungere a diagnosi in circa il 30-40% dei pazienti. Il ritardo diagnostico può essere secondario ad una presentazione clinica atipica, all'assenza di maniglie diagnostiche, alla presenza di più condizioni concomitanti o di una condizione nuova, non descritta in precedenza. Le recenti acquisizioni nel campo della genomica, lo sviluppo di nuove tecnologie di sequenziamento e di approcci bioinformatici che consentono di analizzare la grande mole di dati prodotta aprono la possibilità di impiegare queste conoscenze e queste tecnologie su larga scala nella pratica clinica. Il presente contributo riporta i primi risultati di un progetto in corso presso l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù basato sull'uso della genomica nella pratica clinica per la diagnosi di pazienti orfani di diagnosi. La coorte di studio ha incluso 300 pazienti con sospetto di patologia mendeliana arruolati consecutivamente attraverso una valutazione clinica multidisciplinare. Il sequenziamento dell'esoma e l'analisi bioinformatica dei dati prodotti è stata effettuata mediante un workflow implementato in-house. Il tasso di successo diagnostico ottenuto dall'analisi dell'esoma è risultato superiore al 48%. Il progetto ha portato all'identificazione di 15 nuovi geni-malattia e di 8 malattie genetiche precedentemente non conosciute oltre a numerosi geni-malattia candidati, la cui rilevanza clinica è attualmente in corso di validazione attraverso collaborazioni nazionali e internazionali. L'attività ha permesso inoltre di caratterizzare più accuratamente lo spettro clinico e la storia naturale di diverse malattie genetiche rare e di definire nuove correlazioni genotipo-fenotipo. Il presente programma dimostra l'efficienza diagnostica dell'analisi esomica nella pratica clinica e l'opportunità di utilizzarlo come approccio di primo livello nei pazienti orfani di diagnosi.





C04

**The Network for Italian Genomes NIG: clinical utility of having an Italian reference sequence**

A. Renieri<sup>1,2</sup>, T. Castrignan<sup>3</sup>, M. D'Antonio<sup>3</sup>, G. Fiameni<sup>3</sup>, T. Flati<sup>3,4</sup>, S. Gioiosa<sup>3,4</sup>, G. Chillemi<sup>5</sup>, T. Pippucci<sup>5</sup>, F. Musacchia<sup>6</sup>, S. Furini<sup>7</sup>, A. Bruselles<sup>8</sup>, A. Ciolfi<sup>8</sup>, G. Birolò<sup>9</sup>, C. Viberti<sup>9</sup>, V. Nigro<sup>10</sup>, E.M. Valente<sup>11</sup>, O. Zuffardi<sup>11</sup>, F. Amati<sup>12</sup>, D. Toniolo<sup>13</sup>, G. Casari<sup>13</sup>, G. Tonon<sup>13</sup>, P. Gasparini<sup>14</sup>, M. Seri<sup>15</sup>, G. Matullo<sup>9</sup>, M. Tartaglia<sup>8</sup>

- <sup>1</sup>Medical Genetics, University of Siena, Siena, Italy
- <sup>2</sup>Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italy
- <sup>3</sup>SuperComputing Applications and Innovation Department, CINECA, SCAI, Rome, Italy
- <sup>4</sup>Istituto di Biomembrane e Bioenergetica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bari, Italy
- <sup>5</sup>Medical Genetics Unit, Sant Orsola - Malpighi Hospital, Bologna, Italy
- <sup>6</sup>Dept. of Biology and Evolution of Marine Organisms, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli, Italy
- <sup>7</sup>Dept. of Medical Biotechnology, University of Siena, Siena, Italy
- <sup>8</sup>Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCCS, Roma, Italy
- <sup>9</sup>Dept. of Medical Sciences, University of Turin, Turin, Italy
- <sup>10</sup>Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli, Italy
- <sup>11</sup>Dept. of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy
- <sup>12</sup>Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma, Italy
- <sup>13</sup>Ospedale San Raffaele s.r.l. IRCCS, Milan, Italy
- <sup>14</sup>Università degli Studi di Trieste, Trieste, Italy
- <sup>15</sup>Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche dell'Alma Mater Studiorum, Università di Bologna, Bologna, Italy

The Network for Italian Genomes (NIG, <http://www.nig.cineca.it>) was officially born on December 7<sup>th</sup> 2016 with the aim of providing a population-specific repository for genomic variation to be used for the identification of: i) genes implicated in Mendelian and complex diseases in both basic and translational researches; ii) genetic variants contributing to interindividual differences in drug response, and as informative markers in population and forensic purposes; iii) new targets for diagnosis and treatment of genetic diseases. During the first 6 months of activity, exome and SNP array data from hundreds of samples, covering more than 2 millions high-quality variants, have been stored by the 9 founder Institutions. Upon applicant identification the repository can be easily interrogated either by referring to the genomic coordinate or gene name/symbol. With the increasing use of exome sequencing in the clinical practice, especially in the neonatal intensive care unit (<https://www.sigu.net/show/documenti/5/1/linee%20guida>), the availability of a specific Italian reference sequence is mandatory in order to avoid misinterpretation of exome results and erroneous certification of disease. Data storage and analysis is guaranteed by the partnership with Cineca, and the repository has been designed to ensure the privacy protection and confidentiality of data, in agreement with the Italian and European regulations. Having built such a precious tool, we invite the scientific Italian community to become NIG affiliate and to contribute of data pooling (<http://www.nig.cineca.it/index.php/contact/>).

C05

**MSTO1: un nuovo gene malattia identificato mediante analisi WES in pazienti con distrofia muscolare congenita e atassia cerebellare**

M. Neri<sup>1</sup>, A. Nascia<sup>2</sup>, C. Scotton<sup>1</sup>, I. Zaharieva<sup>3</sup>, R. Selvatici<sup>1</sup>, O.T. Magnusson<sup>4</sup>, A. Gal<sup>5</sup>, D. Weaver<sup>5</sup>, G. Hajnocy<sup>5</sup>, A. Sarkozy<sup>3</sup>, R. Rossi<sup>1</sup>, A. Armadori<sup>1</sup>, A. Cecconi<sup>6</sup>, C. Sewry<sup>3</sup>, R. Phadke<sup>3</sup>, L. Feng<sup>3</sup>, I. Hughes<sup>7</sup>, A. Donati<sup>8</sup>, M. Pane<sup>9</sup>, E. Mercuri<sup>9</sup>, M. Zeviani<sup>10</sup>, F. Muntoni<sup>3</sup>, D. Ghezzi<sup>2</sup>, A. Ferlini<sup>1</sup>

- <sup>1</sup>Medical Genetics Unit, Department of Medical Sciences, University of Ferrara, Ferrara, Italy
- <sup>2</sup>Molecular Neurogenetics Unit, Foundation IRCCS Neurological Institute Besta, Milan, Italy
- <sup>3</sup>UCL Great Ormond Street Institute of Child Health, London UK
- <sup>4</sup>deCODE Genetics, Reykjavik, Iceland
- <sup>5</sup>MitoCare Center for Mitochondrial Imaging Research and Diagnostics, Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA
- <sup>6</sup>Pediatrics Medical Genetics, Hospital S. Maria Annunziata, Florence, Italy
- <sup>7</sup>Royal Manchester Children's Hospital, Manchester, UK
- <sup>8</sup>Unit of Metabolic and Muscular Diseases, Meyer Children Hospital, Florence, Italy
- <sup>9</sup>Neuropsychiatry Unit, Catholic University, Policlinico Gemelli, Rome, Italy
- <sup>10</sup>Mitochondrial Biology Unit - MRC, Cambridge, UK

**PREMESSA** Le malattie neuromuscolari sono patologie rare con una grande eterogeneità clinica e genetica: una elevata percentuale di pazienti è orfana di diagnosi molecolare. L'utilizzo del sequenziamento di nuova generazione ha lo scopo di migliorare e velocizzare la diagnosi e di identificare nuovi geni malattia in pazienti con fenotipi peculiari. **SCOPO DELLO STUDIO** Nell'ambito del progetto europeo Neuromics abbiamo studiato tre pazienti appartenenti a due famiglie non relate e con un fenotipo neuromuscolare peculiare: ritardo psicomotorio, distrofia muscolare congenita e incremento del CK sierico, ipotrofia cerebellare e atassia. **MATERIALI E METODI** Analisi WES su DNA da sangue periferico e analisi bioinformatica sulle variazioni ottenute. Analisi del trascritto su RNA estratto da fibroblasti/muscolo e studio in Western Blot della proteina. Studio del network mitocondriale nei fibroblasti. **RISULTATI** Due sorelle affette sono risultate eterozigoti composte per le mutazioni c.1033C>T (p.R345C) e c.1128C>A (p.F376L) nel gene MSTO1; in un'altra paziente, con fenotipo simile studiata nell'ambito del progetto Neuromics, l'analisi WES ha evidenziato, sempre nel gene MSTO1, una eterozigosi composta c.971C>T (p.T324I) e c.966+1G>A.L analisi del trascritto MSTO1 ha mostrato una riduzione dell'espressione in entrambe le sorelle confermata anche dalla riduzione della proteina in WB; nell'altra paziente l'analisi ha evidenziato un trascritto muscolare aberrante a causa della mutazione di splicing. Lo studio del network mitocondriale nei fibroblasti ha mostrato una frammentazione dello stesso rispetto ad un controllo; tale frammentazione è causata dalla riduzione degli eventi di fusione mitocondriale. **CONCLUSIONI** Riportiamo per la prima volta mutazioni nel gene MSTO1 come causa di una patologia neuromuscolare ereditaria caratterizzata da distrofia muscolare congenita, ipotrofia cerebellare, atassia e ritardo psicomotorio. Il ruolo patogenetico di MSTO1 è stato confermato da studi su fibroblasti e mioblasti dei pazienti: il trascritto e la proteina sono ridotti ed è alterato il network mitocondriale. Non sono invece presenti anomalie biochimiche quali incremento del lattato sierico o alterazioni della catena respiratoria che caratterizzano altre patologie mitocondriali.

C06

**The Italian Telethon Undiagnosed Diseases Program (TUDP)**

\*. Telethon Undiagnosed Diseases Program<sup>1,2,3,4,5,6</sup>, G. Casari<sup>1,7</sup>  
<sup>1</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Pozzuoli, NA  
<sup>2</sup>Dip. Pediatria, Uni. Federico II, Napoli  
<sup>3</sup>Uni. Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli  
<sup>4</sup>Osp. S. Anna, Como e San Gerardo, Monza  
<sup>5</sup>Ist. G.Gaslini, Genova  
<sup>6</sup>Policlinico Umberto I, Roma  
<sup>7</sup>San Raffaele University, Milan

Childhood-onset and unknown genetic disease are the object of the Telethon initiative that aims at diagnosing rare undiagnosed diseases by means of next generation sequencing (NGS). The molecular definition of the disease causes will lead to better understanding of the disease, earlier diagnosis and making possible the genetic counseling of families. Also, this will be pivotal to the characterization of pathomechanisms and possibly to test and develop new targeted therapies. Since April 2016, a national network of clinical genetics and pediatrics centers proposes undiagnosed patients for genome-wide molecular investigation through a specifically developed web tool. The three years program is centered at the Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM) where NGS activities converge, and aims at finally diagnosing 400 families. The Telethon network counts on a core network of clinical centers: Ospedale San Gerardo-Fondazione MBBM, Monza and Ospedale S. Anna, Como; Dep. Pediatrics, Federico II University, Naples; Istitute G. Gaslini, Genoa; Policlinico Umberto I, Rome. Patients with unknown genetic syndromes undergo an initial clinical evaluation by clinical partners of the program and selected cases are then discussed in plenary sessions in the presence of all the clinicians and researchers of the Telethon UDP. The cases are placed in order of priority based on several criteria, including the severity of the case and the exclusion of a number of genetic testing. Selected cases are recruited for exome or genome analysis of the entire family, in most cases a trio. The results are shared and compared with those produced by analogous international rare and undiagnosed diseases initiatives to recognize additional patients sharing the phenotype and carrying mutations within the same gene, through the adoption of international standardized instruments as Phenolips and Phenome Central. At present, the registered physicians and the proposed families with undiagnosed disease were 120 and 250, respectively. The Program has already prioritized and entered into the whole exome sequencing process 105 families, mainly composed of trios-quartets, with an overall positive results in 52% of cases.

C07

**The Italian map of hereditary hearing loss genes: a peculiar case of Uniparental Disomy (UPD) and the discovery of new genes**

G. Giroto<sup>1,2</sup>, A. Morgan<sup>1,2</sup>, S. Lenarduzzi<sup>2</sup>, M. Morgutti<sup>2</sup>, M. La Bianca<sup>2</sup>, F. Faletra<sup>2</sup>, F. Sirchia<sup>2</sup>, C. Graziano<sup>2</sup>, E. Orzan<sup>2</sup>, V. Pecile<sup>2</sup>, P. Gasparini<sup>1,2</sup>

- <sup>1</sup>Università degli Studi di Trieste, Trieste
- <sup>2</sup>IRCCS Burlo Garofolo, Trieste
- <sup>3</sup>Università di Bologna, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna

Hereditary Hearing Loss (HHL) is one of the most prevalent sensory deficit for which the identification of the genetic causes is essential for proper genetic counselling, recurrence risk estimation, prognosis, and innovative therapeutic options. Thus, there is an urgent need to further explore the landscape of causative genes and mutations. Eighty-one Italian cases (40 familial and 41 sporadic) were screened using omics technologies (i.e. Next generation sequencing-NGS using Life technologies platforms and Illumina HighDensity-SNPs array) followed by functional validation of new HL-candidate genes. Annotated genomic variants were filtered according to: a) pedigree pattern of inheritance, b) allele frequency, c) pathogenicity prediction. Functional studies were carried out by in vivo (Zebrafish K/O-K/I models using CRISPR-Cas9 system) and in vitro experiments (expression clones containing either the wild-type or the mutant cDNA). After excluding ~40% of GJB2 positive cases, results led to: 1) the identification of the first case of Uniparental disomy (UPD) with the presence of both the small isodisomy segment spanning the LOXHD1 gene plus the heterodisomy on the remaining parts of Chr18 thus suggesting that UPD in our case is the result of a non-disjunction occurred in meiosis I followed by trisomy rescue, 2) the identification of 2 large deletions in OTOA and STRC genes, 3) the definition of TECTA gene as the major player involved in the Italian population (found to be mutated in both autosomal recessive and dominant families), followed by MYO7A, PDZD7, TMPRSS3 and ACTG1, 4) the discovery of five new HHL genes: TBL1Y as the first Y-linked gene so far described, PLS1, PSIP1, SPATC1L, ATP2B2 as novel genes uniquely involved in dominant HHL forms. Furthermore, in vitro and in vivo studies supported the pathogenic role of all variants, while for the new 5 genes, K/I, K/O models are in the final steps of validation. These results confirmed the wide genetic heterogeneity of hearing impairment; nevertheless, overall 58% of cases were molecularly characterized thanks to our integrative approach, based on an accurate phenotypic characterization, innovative omics technologies and in vivo/in vitro functional studies.







**C08**  
**Efficacia economica della genomica nella pratica clinica**

F.C. Radio<sup>1</sup>, M. Tartaglia<sup>1</sup>, B. Dallapiccola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetica e Malattie Rare, Osp. Ped. Bambino Gesù, IRCCS, Roma

**Premessa.**

Le malattie rare sono condizioni eterogenee, croniche, spesso ad elevata complessità assistenziale, che in circa il 90% dei casi hanno una causa genetica. Circa 1/3 di questi pazienti è orfano di diagnosi e rischia di convivere per anni o addirittura per tutta la vita con una patologia resta senza nome. Quasi tutti questi pazienti condividono percorsi percorsi clinici complessi che configurano una vera e propria odissea diagnostica lungo la quale si sono susseguite ospedalizzazioni, test strumentali e diagnostici, nell'arco di anni, che incidono economicamente sul sistema sanitario e sulle famiglie.

**Scopo dello studio.**

Questo studio ha valutato l'efficacia economica dell'uso della genomica nella pratica clinica in una coorte di 200 pazienti consecutivi afferenti al programma dedicato ai pazienti orfani di diagnosi dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (OPBG).

**Materiali e metodi.**

La valutazione clinica e l'analisi dell'esoma (WES) sono state eseguite su pazienti arruolati tra il 2014 e il 2016 mediante un workflow dedicato. L'analisi dei costi è stata effettuata in una sub-coorte di 121 pazienti (età: 3 m-43 aa) la cui storia clinica era estensivamente registrata nel sistema informativo dell'OPBG. Il costo delle procedure diagnostiche (ricoveri, valutazioni e indagini strumentali e di laboratorio) a carico del SSN e il costo per ogni anno di ritardo nella diagnosi sono stati calcolati sulla base del nomenclatore tariffario in vigore e sono stati confrontati con il costo dell'approccio WES (~3.000 €/trio).

**Risultati.**

Il costo medio complessivo per paziente è stato stimato in 13.453 € (range: 75.840 - 160 €) ed ha mostrato una correlazione diretta con la complessità del quadro clinico e l'età del paziente. Il costo medio per paziente per anno di ritardo diagnostico è stato stimato in 2.190 € (range: 9.706 - 75 €).

**Conclusioni.**

Le malattie rare sono la prima causa di accesso ospedaliero pediatrico. In una parte di questi pazienti è possibile raggiungere una diagnosi clinica già alla prima valutazione. Tuttavia, un sottogruppo significativo di pazienti presenta segni non-patognomonicamente, fenotipi frustranti o aspecifici o condizioni di difficile inquadramento o non ancora conosciute, che non consentono di ottenere una diagnosi basata su criteri clinici e strumentali. Questo studio dimostra la costo-efficacia del WES nei pazienti orfani di diagnosi e raccomanda il suo inserimento nei LEA.

**C09**  
**Investigating the Italian Exome: population-specific differences in the coding genome**

G. Birolo<sup>1,2</sup>, C. Di Gaetano<sup>2,1</sup>, S. Aneli<sup>2,1</sup>, A. Allione<sup>1,2</sup>, E.M. Paraboschi<sup>3,4</sup>, D. Ardisino<sup>5</sup>, S. Duga<sup>3,4</sup>, R. Asselta<sup>3,4</sup>, G. Matullo<sup>2,1</sup>

<sup>1</sup>IIGM, Italian Institute for Genomic Medicine (former HuGeF), Torino, Italy

<sup>2</sup>Dept. of Medical Sciences, Università di Torino, Italy

<sup>3</sup>Dept. of Biomedical Sciences, Humanitas University, Rozzano, Milan, Italy

<sup>4</sup>Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano, Milan, Italy

<sup>5</sup>Division of cardiology, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, Parma, Italy

Just a small portion of the human genomic variability has been explored so far, especially rare and population-specific variants. Even within the relatively homogeneous European population, there are variants whose frequencies vary widely across different areas. This is of special interest concerning exome variants, since they allow for better interpretation of phenotypic differences between populations, especially in a clinical context.

Although many variant frequency databases exist, population-specific frequencies of coding variants are needed to distinguish real disease associations from population-specific polymorphisms.

Whole-exome sequencing data of around 1700 healthy Italian individuals from almost all Italian regions were analyzed. The sample size provides enough power for detecting 90% of variants with allelic frequency of 0.01% and virtually all the variants with frequency greater than 0.02%.

Significant differences in allele frequencies of exome variants were found between Italy and Europe and between Northern and Southern Italy as well, focusing on variants with a functional role in diseases and drug response.

Several thousands of identified variants are not listed in dbSNP. As expected, most of these novel variants are rare. However, a small amount of high-quality variants have frequency greater than 1%, mostly indels in noncoding regions and thus are frequently occurring variants (polymorphisms) private to the Italian population.

Comparing allele frequency within Italy, significant differences were found: for instance, in the HERC2 (hair and eye color), LCT (lactose intolerance) and ADH1B (ethanol metabolism) genes and in variants associated with hypertension and with methotrexate-induced toxicity. Further population-specific variant differences in functional categories will be described.

**C10**  
**Genome-wide analysis of DNA tandem repeats in ALS from Whole Genome Sequencing data**

L. Corrado<sup>1</sup>, M.L. Genovese<sup>3</sup>, E. Mangano<sup>2</sup>, A. Di Piero<sup>1</sup>, N. Barizzone<sup>1</sup>, R. Bordoni<sup>2</sup>, F. Geraci<sup>3</sup>, R. D'Aurizio<sup>3</sup>, R. Croce<sup>1</sup>, F. De Marchi<sup>5</sup>, L. Mazzini<sup>5</sup>, R. Cantello<sup>5</sup>, G. De Bellis<sup>2</sup>, G. Manzini<sup>4,3</sup>, M. Sevrignini<sup>2</sup>, M. Pellegrini<sup>3</sup>, S. D'Alfonso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. of Human Genetics, Dep. of Health Sciences, UPO, Novara, Italy

<sup>2</sup>Institute for Biomedical Technologies, National Research Council (CNR-ITB), Segrate (MI), Italy

<sup>3</sup>Institute of Informatics and Telematics of CNR, Pisa, Italy

<sup>4</sup>UPO, Vercelli, Italy

<sup>5</sup>ALS Center AOU Maggiore della Carità, Novara

Tandem repeats polymorphisms (TRPs) have recently been implicated in ALS. The C9ORF72 gene repeat expansion is the most frequent cause of ALS. Long repeats alleles in ATXN-1, ATXN-2, NIPA1 genes are associated to ALS susceptibility. Thus, TRPs are good candidates for missing heritability in ALS and TRs expansions could explain SALS cases, as de novo disease cause consequent of the meiotic instability of TRs. ALS-associated TRPs were never systematically analyzed because they represent a remarkable challenge to NGS. The general aim of this study is to perform a systematic analysis of TRPs by combining NGS and novel bioinformatics tools, taking advantage of a multidisciplinary team. After a pilot experiment on 10000 TRP loci which demonstrated the feasibility of TRP characterization by sequencing and counting, we extended our analysis performing a whole genome sequencing (WGS, Illumina HiSeq X Ten, avg. coverage 30X, 2 x 150 bp length) on a cohort of 70 ALS cases enriched in FALS cases and patients with familiarity or comorbidity for other neurodegenerative diseases. Tandem repeats were evaluated by means of two software developed within our consortium and by a literature software (lobSTR) with the aim to detect either expansions with a repeat size within the NGS reads sizes similar to the ATXN2, and repeat expansions larger than the NGS reads sizes, resembling the C9ORF72. The analysis of short tandem repeat expansion was performed for about 600K loci in 70 ALS cases and 300 healthy samples with sequence data from the literature on the same loci (Willems, Gymrek, & Highnam, 2014) and led to the selection of 20 TRPs showing a significant distribution among patients and controls. The validation of these loci by traditional methods revealed a high technical consistency (70%). However, the replication on an independent sample of up to 208 Italian ALS patients and 229 matched controls was not able to replicate the involvement of these loci in ALS pathogenesis. Moreover, our strategy for large repeat expansions detection on the WGS data of the 70 ALS patients focused on a catalog of about 700K TRPs and identified 16 loci with potential very large repeat expansion observed in 1 or 2 of the 70 patients, and whose validation and replication is ongoing.



**C11**  
**Dominantly acting mutations in HIST1H1E cause a syndromic intellectual disability disorder characterized by aged appearance and accelerated cellular senescence**

E. Flex<sup>1</sup>, A. Van Dijck<sup>2</sup>, X. Ge<sup>3</sup>, S. Martinelli<sup>1</sup>, E. Coluzzi<sup>4</sup>, G. Catanzaro<sup>5</sup>, C. Andreoli<sup>6</sup>, S. Cecchetti<sup>7</sup>, L. Pannone<sup>8</sup>, E. Carcarino<sup>9</sup>, S. Pizzi<sup>8</sup>, A. Ciolfi<sup>8</sup>, G. Carpentieri<sup>1,5</sup>, S. Majore<sup>10</sup>, A. De Luca<sup>11</sup>, E. Ferretti<sup>5</sup>, R. Rota<sup>9</sup>, A. Sgura<sup>4</sup>, K. Van Gassen<sup>12</sup>, M. Walkiewicz<sup>3</sup>, F. Kooy<sup>2</sup>, M. Tartaglia<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Dep. of Oncology and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

<sup>2</sup>University of Antwerp, Edegem, Belgium

<sup>3</sup>Baylor College of Medicine, Houston, TX

<sup>4</sup>Dep. of Science, University of Rome Roma Tre, Rome, Italy

<sup>5</sup>Dep. of Experimental Medicine, Università Sapienza, Rome, Italy

<sup>6</sup>Dep. of Environment and Primary Prevention, Surveillance and Health Promotion, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

<sup>7</sup>Confocal Microscopy Unit NMR and Confocal Microscopy Area Core Facilities, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

<sup>8</sup>Genetics and Rare Diseases Research Division, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Rome, Italy

<sup>9</sup>Oncematology Research Division, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Rome, Italy

<sup>10</sup>Dep. of Molecular Medicine, Sapienza University San Camillo-Forlanini Hospital, Rome, Italy

<sup>11</sup>Mendel Laboratory, Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy

<sup>12</sup>University Medical Center, Utrecht, The Netherlands

Histones mediate dynamical packing of nuclear DNA in chromatin, a process that must be finely controlled to accomplish chromosomal segregation during mitosis, and allow DNA replication and transcription. Somatic histone gene mutations affecting residues involved in key regulatory post-transcriptional modifications controlling gene expression, cell differentiation and telomere maintenance, occur in cancer. Using whole exome sequencing, we identified germline mutations in HIST1H1E, which encodes a member of the linker histone family facilitating higher order chromatin folding, underlying a human developmental disorder characterized by intellectual disability, overgrowth and dysmorphic features. Mutations were de novo frameshift changes specifically affecting the C-terminal tail of the protein. Functional studies performed on patient's fibroblasts and transfected cells show that the disease-causing mutant proteins are stable, localize in the nucleus and binds to chromatin, which however results less compacted compared to wild type cells. Remarkably, adult patients with heterozygous HIST1H1E mutations exhibit an aged phenotype, and patient's fibroblasts have a dramatically reduced proliferation rate due to a specific difficulty in entering the S phase, and display accelerated senescence. Overall, we characterized the clinical impact of dominantly acting germline mutations in a histone gene, and provide a direct link between aberrant chromatin remodeling and cellular senescence.





**C12**  
**Sindrome di Malan: Studio multicentrico collaborativo europeo per analisi fenotipica e mutazionale e ridefinizione della condizione**

M. Priolo<sup>1</sup>, C. Mamm<sup>1</sup>, M. Zollino<sup>3</sup>, L. Pintomalli<sup>1</sup>, L. Musolino<sup>1</sup>, L. Bernardini<sup>3</sup>, A. Novelli<sup>4</sup>, M. Fichera<sup>5</sup>, M.A. Pisanti<sup>6</sup>, K. Tatton-Brown<sup>7</sup>, J. Tenorio<sup>8</sup>, R. Tenconi<sup>9</sup>, M. Zenker<sup>10</sup>, R.C. Hennekam<sup>11</sup>

<sup>1</sup>SSD di Genetica Medica, Grande Ospedale Metropolitano Bianchi-Melacrino-Morelli, Reggio Calabria

<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, Institute of Medical Genetics, Catholic University, Rome

<sup>3</sup>Istituto CSS-Mendel Viale Regina Margherita 261, Roma

<sup>4</sup>UOC Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambin Gesù, Roma

<sup>5</sup>Department of Biomedical and Biotechnological Sciences, Medical Genetics, University of Catania, Catania

<sup>6</sup>UOC Genetica Medica Azienda Ospedaliera Cardarelli Napoli

<sup>7</sup>Division of Genetics and Epidemiology, Institute of Cancer Research, 15 Cotswold Road, London SM2 5NG, UK

<sup>8</sup>Institute of Medical and Molecular Genetics (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

<sup>9</sup>Università di Padova

<sup>10</sup>Institute of Human Genetics, University Hospital Magdeburg, Magdeburg, Germany

<sup>11</sup>Department of Pediatrics, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands

La sindrome di Malan (MIM 614753) è una condizione caratterizzata da iperaccrescimento con caratteristiche fenotipiche e faciali peculiari (facies allungata, fronte prominente, occhi infossati, bocca piccola) ed anomalie comportamentali. Dal punto di vista molecolare è causata da mutazioni in eterozigosi o delezioni del gene NFIX con definitivo meccanismo di loss of function. Sin dalla prima descrizione nel 2010 ad opera di Malan et al sono stati descritti circa 34 pazienti. Riportiamo i dati molecolari e clinici relativi ad una grossa nuova casistica di pazienti (42), in associazione ad una accurata revisione di tutti i casi di sindrome di Malan riportati in letteratura e comparazione dei dati clinici e molecolari con quelli relativi alla sindrome di Marshall Smith, la sindrome di Sotos e la sindrome di Weaver. I pazienti sono stati raccolti grazie ad un grande lavoro multicentrico collaborativo europeo e riferiti da altri specialisti per diagnosi clinica o molecolare per sindrome di Malan. Lo score delle caratteristiche cliniche e dismorfologiche dei pazienti è stato eseguito in maniera indipendente da due specialisti dismorfologi che hanno confrontato i dati reciproci e risolto le incongruenze dopo discussione. I dati molecolari sono stati ottenuti tramite analisi WES, resequencing targettato per i più comuni geni responsabili di sindromi con iperaccrescimento o Array-CGH. I dati clinici e molecolari ci hanno permesso di definire con maggiore certezza le caratteristiche della condizione ampliando lo spettro fenotipico e quello mutazionale. I risultati in nostro possesso rappresentano la raccolta di pazienti con sindrome di Malan più grande al momento conosciuta.

**C13**  
**"GRIN2B-related syndrome": una condizione sottodiagnosticata?**

C. Romano<sup>1</sup>, M. Vinci<sup>2</sup>, L. Grillo<sup>2</sup>, O. Galesi<sup>2</sup>, L. Castiglia<sup>2</sup>

<sup>1</sup>U.O.C. di Pediatria e Genetica Medica, I.R.C.C.S. Associazione Oasi Maria Santissima, Troina (EN)

<sup>2</sup>U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica; I.R.C.C.S. Associazione Oasi Maria Santissima, Troina (EN)

**Premessa**

La "GRIN2B-related syndrome" è definita come il complesso delle condizioni cliniche correlate a mutazioni o aploinsufficienza del gene GRIN2B. Questo è un gene che ha un ruolo importante nella trasmissione del segnale cerebrale. Mutazioni puntiformi o delezioni sono state associate a tali fenotipi. Il database OMIM cita due fenotipi associati a tale eziologia: 1) MRD6 (Mental Retardation Dominant type 6), 2) EIEE27 (Early Infantile Epileptic Encephalopathy type 27). L'epidemiologia della sindrome, secondo il sito "UNIQUE" evidenzia 20 pazienti pubblicati nella letteratura scientifica. Tuttavia, questi dati sono certamente sottodimensionati, poiché il database HGMD Professional, alla data del 4 settembre 2017, elenca 49 diverse mutazioni, in pazienti con fenotipo variabile dalla Disabilità Intellettiva all'epilessia e ai Disturbi dello Spettro Autistico.

**Scopo dello Studio**

Lo scopo dello studio è evidenziare la prevalenza delle mutazioni e delezioni di GRIN2B in una popolazione di pazienti con disabilità intellettiva afferenti all'I.R.C.C.S. Associazione Oasi Maria Santissima di Troina (EN) Materiali e Metodi Per perseguire in maniera efficiente gli scopi dello studio ci si è rivolti alla collaborazione del Prof. Evan Eichler, che ha testato con la metodica del Molecular Inversion Polymorphisms (M.I.P.) 1115 pazienti che rispondevano alle caratteristiche citate nello scopo dello studio. I pazienti erano stati tutti preventivamente testati nell'I.R.C.C.S. Associazione Oasi Maria Santissima con array CGH senza evidenziare in nessuno delezioni o duplicazioni patogenetiche di GRIN2B.

**Risultati**

Quattro pazienti sono risultati portatori di varianti verosimilmente patogenetiche: tre di esse erano di novo ed una ereditata dalla madre. Le varianti definite con l'M.I.P. screening sono state confermate con tecnica Sanger presso i Laboratori dell'I.R.C.C.S. Associazione Oasi Maria Santissima.

**Conclusioni**

I risultati di questo studio depongono per una prevalenza di mutazioni patogenetiche di GRIN2B in una popolazione affetta da Disabilità Intellettiva variabile da 1:300 a 1:400 ed evidenziano l'utilità di valutare attentamente tale possibilità nella diagnosi della disabilità intellettiva e dell'epilessia.

**C14**  
**La diagnosi laboratoristica di sindrome di Turner mediante whole genome sequencing a bassa copertura identifica le condizioni di mosaicismi con efficacia e costi competitivi**

P. Reho<sup>1</sup>, D. Larizza<sup>2</sup>, C. Montalbanò<sup>2</sup>, D. Vergani<sup>3</sup>, M. Carella<sup>3</sup>, A. Provenzano<sup>1</sup>, A. La Barbera<sup>1</sup>, V. Palazzo<sup>1</sup>, S. Landini<sup>1</sup>, E. Bosi<sup>1</sup>, R. Artuso<sup>4</sup>, A. Pagliuzzi<sup>4</sup>, L. Giunti<sup>4</sup>, S. Giglio<sup>1,4</sup>, O. Zuffardi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche "Mario Serio", Università degli Studi di Firenze, Firenze

<sup>2</sup>Endocrinologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

<sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare, Laboratorio di Diagnosi Citogenetica Prenatale e Molecolare, Università degli Studi di Pavia, Pavia

<sup>4</sup>SOC di Genetica Medica, Azienda Universitaria-Ospedaliera Anna Meyer, Firenze

La diagnosi laboratoristica della sindrome di Turner (ST) viene effettuata analizzando almeno 30 metafasi da sangue in modo da evidenziare eventuali mosaicismi a carico dei cromosomi sessuali. Il rilevamento di un 46 cromosoma di dubbia origine richiede inoltre indagini di FISH o array-CGH/SNP per capire se si tratti di materiale derivato dal X anziché dal Y. Quest'ultimo è infatti prodromico al trattamento con GH che, in presenza di cromosoma Y, aumenterebbe il rischio di gonadoblastoma. L'applicazione dell'array-CGH/SNP (a-CGH), meno indagosa della citogenetica convenzionale, e della FISH, richiede di utilizzare piattaforme ad alta risoluzione e di effettuare l'esperimento in doppio, ibridando il DNA della probanda sia con una linea cellulare XX che con una XY in modo da ottenere rapporti logaritmici che valutino correttamente la quantità di DNA dei cromosomi X e Y. Abbiamo messo a punto un protocollo di sequenziamento massivo dell'intero genoma (WGS) a bassa copertura (~0.2x) a partire dal DNA libero plasmatico in 64 soggetti con sindrome di Turner, già analizzati con citogenetica, e 44 maschi e femmine di controllo. L'analisi dei dati è stata effettuata mediante pipeline informatica appositamente creata. In tutti i soggetti con ST, l'analisi è stata affiancata da a-CGH (60K) su DNA da sangue periferico. In 50 casi (42 confermati da a-CGH) i dati WGS erano in linea con l'analisi citogenetica. In 9 casi (6 confermati da a-CGH) WGS ha identificato riarrangiamenti a carico del cromosoma X che non erano stati rilevati dal cariotipo, viceversa in 2 pazienti, una linea con un cromosoma X ad anello vista al cariotipo non è stata confermata mediante WGS o a-CGH. In 4 casi, WGS ha identificato la presenza di un cromosoma Y non rilevata né dalla citogenetica né da a-CGH e validata da ddPCR su DNA da sangue. La diagnosi cromosomica su DNA libero plasmatico con sequenziamento massivo a bassa copertura e superiore sia alla citogenetica convenzionale che all'array CGH/SNP e potrebbe essere applicata sistematicamente al loro posto. Il sequenziamento in contemporanea di numerosi casi (≥ 20-30), permetterebbe l'abbassamento degli attuali costi e dei tempi delle indagini. Nelle nostre condizioni (24 DNA analizzati in contemporanea su HiSeq2500), i costi di materiale sono stati di 170 a caso.



**C15**  
**Mutations in fibronectin cause spondylometaphyseal dysplasia, corner fractures type**

M. Niceta<sup>1</sup>, C.S. Lee<sup>2</sup>, H. Fu<sup>3</sup>, N. Baratang<sup>3</sup>, J. Rousseau<sup>3</sup>, H. Kumra<sup>2</sup>, V.R. Sutton<sup>4</sup>, A. Cioffi<sup>1</sup>, G. Yamamoto<sup>5</sup>, D. Bertola<sup>5</sup>, C.L. Marcelis<sup>6</sup>, A. Bartuli<sup>1</sup>, C. Kim<sup>7</sup>, J. Hoover-Fong<sup>8</sup>, N. Sobreira<sup>8</sup>, C. Bacino<sup>4</sup>, M.A. Alvarez<sup>9</sup>, E. Lausch<sup>10</sup>, S. Unger<sup>11</sup>, A. Superti-Furga<sup>11</sup>, J.T. Lu<sup>12</sup>, D.H. Cohn<sup>13</sup>, B.H. Lee<sup>4</sup>, D. Reinhardt<sup>2</sup>, P.M. Campeau<sup>3</sup>, M. Tartaglia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetica e Malattie Rare, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia

<sup>2</sup>Dept. of Anatomy and Cell Biology, McGill University, Montreal, QC, Canada

<sup>3</sup>CHU-Sainte Justine Research Centre, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

<sup>4</sup>Dept. of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA..

<sup>5</sup>Clinical Genetics Unit, Inst. da Criança HC-FMUSP - Univ. de São Paulo, SP, Brazil.

<sup>6</sup>Dept. of Human Genetics, Donders Centre for Brain, Cognition and Behaviour, Radboud Univ. Medical Center, Nijmegen, The Netherlands.

<sup>7</sup>Dept. of Pharmacology, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA.

<sup>8</sup>McKusick-Nathans Inst. of Genetic Medicine, Johns Hopkins Univ. School of Medicine, Baltimore, USA.

<sup>9</sup>Div. de Pediatría, Pontificia Univ. Católica de Chile, Pediatra-Genetista, Unid. de Genética, Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna, Santiago, Chile

<sup>10</sup>Dept. of Pediatrics, Medical Center, Fac. of Medicine, Univ. of Freiburg, Freiburg, Germany.

<sup>11</sup>Serv. of Medical Genetics, Lausanne Univ. Hosp. (CHUV), Lausanne, Switzerland.

<sup>12</sup>Helix, San Carlos, CA, USA

<sup>13</sup>Dept. of Human Genetics, Molecular Biology Inst., David Geffen School of Medicine, Univ. of California Los Angeles, Los Angeles, California, USA.

Spondylometaphyseal dysplasias (SMD) are skeletal disorders with short stature, vertebral anomalies, and growth plate irregularities. Although dominant inheritance have been hypothesized, the molecular causes are still unknown in a large proportion of cases. Here, we report the identification of FN1 (MIM#135600) as the disease gene implicated in SMD. By using a trio based WES approach in a male subject with a complex phenotype, characterized by short stature, vertebral anomalies such as scoliosis, growth plate irregularities and facial dysmorphism, we identified a de novo (c.367T>C, p.Cys123Arg) FN1 variant as the major event underlying this trait. FN1 encodes Fibronectin, a glycoprotein found in many extracellular matrices (ECM) in basement membranes and in blood, which acts as a master organizer of ECM by promoting assembly of collagens, fibrillin, and heparan sulfate proteoglycans. The protein is also known to play roles in skeletal tissues through its expression in osteoblasts, chondrocytes and mesenchymal cells, affecting bone matrix properties. Of note, dominant mutations specifically affecting the domains of FN1, mediating binding to collagens, fibrillin, and proteoglycans, have previously associated with glomerulopathy with fibronectin deposits type 2 (MIM# 601894). In a collaborative study, we identified five additional affected individuals with novel variants in FN1, all of which involved highly conserved residues localized in the N-terminal region of the protein, which is implicated in fibronectin assembly. In two individuals, the variants segregated with the disease while they







were de novo events in the remaining cases. Functional characterization of three disease-associated missense changes (p.Cys87Phe, p.Tyr240Asp, or p.Cys260Gly) documented that, differentially the wild-type protein, all tested mutants were either not secreted, or secreted into the culture medium at significantly lower amounts. Consistently, immunofluorescence analysis demonstrated increased intracellular retention of the mutant proteins. These observations provide evidences that mutations in FN1 underlie multiple different disorders, and that defective fibronectin secretion in cartilage and bone causes SMD.

C16

**Craniosinostosi sindromica al di fuori del complesso FGFR: componente clinica significativa nelle RASopatie, cromatinopatie, neurocrestopatie e nei disordini associati a KAT6B.**

M. Zollino<sup>1</sup>, S. Lattante<sup>1</sup>, D. Orteschi<sup>1</sup>, S. Frangella<sup>1</sup>, P.N. Doronzio<sup>1</sup>, I. Contaldo<sup>2</sup>, E. Mercuri<sup>2</sup>, G. Marangi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Medicina Genomica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

<sup>2</sup>Istituto di Neuropsichiatria Infantile, Policlinico Agostino Gemelli, Roma

La craniosinostosi è una condizione eterogenea causata dalla fusione prematura di una o più suture del cranio con un'incidenza di 1:2500 nuovi nati. Nel 70-85% dei casi, essa si presenta in forma isolata, non sindromica, e la sua insorgenza è determinata dal contributo di fattori genetici ed ambientali. Nel restante 15-30% dei casi la craniosinostosi si presenta invece in forma sindromica, associata ad una serie di varianti intrageniche o di alterazioni cromosomiche anche submicroscopiche. Le più comuni e note forme sindromiche sono causate da varianti nei geni appartenenti alla famiglia dei recettori del fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR) o in altri geni coinvolti nello stesso pathway. Tuttavia c'è crescente evidenza che il segno craniosinostosi può essere associato a numerosi altri difetti genici al di fuori del pathway di FGFR. Sulla base di osservazioni personali, e della revisione della letteratura, abbiamo definito due distinti gruppi di craniosinostosi sindromiche inusuali. In base alla funzione biologica delle proteine, alla frequenza relativa di craniosinostosi nelle varie condizioni e a modelli animali, ove disponibili, i due gruppi riflettono una specifica azione genica (gruppo 1), consentendo il suggerimento di nuovi geni candidati, oppure l'effetto aspecifico di geni pleiotropici (gruppo 2). Sono discusse come esempio di condizioni nel gruppo 1 le RASopatie, le delezioni 9p22 e la sindrome di Bohring-Opitz, e specificamente i geni KRAS, PTPN11, SHOC2, BRAF, FREM1, PTPRD e ASXL1. Sono discusse come esempio di condizioni nel gruppo 2 le cromatinopatie, le neurocrestopatie, i disordini associati a KAT6B (sindrome di Ohdo) e molte anomalie cromosomiche. Sono presentate e discusse le frequenze relative di craniosinostosi nelle varie condizioni e la rilevanza per la sorveglianza e la diagnosi personalizzata. In particolare, la sorveglianza contro craniosinostosi va estesa a molte forme sindromiche di disabilità intellettiva, e l'esame di array-CGH offerto a forme di craniosinostosi apparentemente nonsindromiche.

C17

**A single-center study on a large cohort of Italian cerebral cavernous malformations patients: 23 new mutations and functional characterization of a CCM3 whole-gene deletion**

G. Nardella<sup>1,2</sup>, G. Visci<sup>1</sup>, P. Stanziale<sup>1</sup>, M. Granatiero<sup>1</sup>, V. Guarnieri<sup>1</sup>, O. Palumbo<sup>1</sup>, C. Vaira<sup>1</sup>, M. Scieratti<sup>3</sup>, V. D'Angelo<sup>4</sup>, M. Accadia<sup>5</sup>, L. Bisceglia<sup>1</sup>, M. Carella<sup>1</sup>, M. Castori<sup>1</sup>, G. Merla<sup>1</sup>, L. D'Agruma<sup>1</sup>, C. Fusco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical Genetics Unit, IRCCS Casa Sollievo Della Sofferenza, viale Cappuccini, 71013 San Giovanni Rotondo, Italy

<sup>2</sup>Department of Experimental Medicine, Sapienza University of Rome, Italy

<sup>3</sup>Department of Neurosurgery, University of Marche, Riuniti Umberto I hospital, Ancona, Italy

<sup>4</sup>Department of Neurosurgery, Humanitas Research Hospital, Milan, Italy

<sup>5</sup>Medical Genetic Service, Hospital Cardinale G. Panico, Tricase, Italy

Cerebral cavernous malformation (CCMs; OMIM 116860) is a congenital vascular anomaly characterized by abnormally enlarged and clustered tortuous capillary cavities. CCM can be clinically sporadic or inherited in an autosomal dominant fashion with incomplete penetrance and variable clinical expression (FCCM). To date three genes have been associated with the pathogenesis of CCM including CCM1/KRIT1, CCM2/MGC4607 and CCM3/PDCD10. From a pool of 200 Italian index patients with FCCM we found 47 pathogenic/likely pathogenic variants, with 67 mutation carriers, for a total of 117 mutated subjects including affected relatives. Our molecular genetic testing has been based on direct sequencing and MLPA analysis, discovering heterozygous mutations in CCM1 (35/47, 74%), CCM2 (6/47, 12.7%) and CCM3 (6/47, 12.7%) genes. In agreement with previous reports, the majority of patients carry frameshift mutations (48%), stop mutations (21%), deletions (15%), split site mutations (10%) and missense variants (6%). Notably, we detected 19 novel variants for CCM1, 2 for CCM2 and 2 for CCM3 gene. Among them, we reported a novel familial deletion of CCM3 spanning exons 4-10. To gain insight into the disease mechanism, we used patient's skin fibroblast cell cultures and test the ability of CCM3 to assemble in a complex with CCM1 and CCM2. Co-immunoprecipitation showed that CCM3 haploinsufficiency reduces strength of interaction between CCM1-CCM2 proteins, suggesting that CCM3 could act as stabilizing protein of the CCM complex. Recently in a ccm3-knockout mouse model was identified a defective autophagy, one of the major degradative process inside the cell. Thus, we analysed autophagy activity, confirming an impaired of the process in human CCM3 affected cell lines, outlining autophagy as a potential key aspect in the pathogenesis of CCM disease. The present study enriches the mutation spectrum of CCM genes, which is useful for genetic counselling via the description of a large set of novel CCM variants. Collection of novel CCM mutations also represents a valid tool to design functional studies highlighting the molecular mechanisms underlying this disease and to improve clinical management.



C18

**Eterogeneità clinica e genetica di condizioni nello spettro fenotipico della sindrome di Pitt-Hopkins: presentazione di un'ampia casistica italiana**

G. Marangi<sup>1</sup>, S. Frangella<sup>1</sup>, S. Ricciardi<sup>1</sup>, P. Chiurazzi<sup>1</sup>, R. Pettinato<sup>3</sup>, A. Zanin<sup>4</sup>, E. Martinez<sup>5</sup>, C. Magnani<sup>6</sup>, C. Pantaleoni<sup>7</sup>, C. Perria<sup>8</sup>, G. Scarano<sup>10</sup>, V. Saletti<sup>7</sup>, P. Bonanni<sup>11</sup>, G. Vasco<sup>13</sup>, C. Lo Rizzo<sup>14</sup>, A. Volzone<sup>15</sup>, E. Alfei<sup>7</sup>, F. Faletta<sup>16</sup>, S. Romano<sup>17</sup>, A. Renieri<sup>14</sup>, M. Giannotta<sup>18</sup>, C. Minetti<sup>19</sup>, C. Bruno<sup>19</sup>, M. Piccione<sup>20</sup>, F. Stanziale<sup>21</sup>, M. Della Monica<sup>17</sup>, A. Ardissoni<sup>7</sup>, M. Di Giacomo<sup>22</sup>, A. Battaglia<sup>21</sup>, C. Graziano<sup>22</sup>, L. Garavelli<sup>23</sup>, M. Zollino<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Medicina Genomica, Univ. Cattolica del Sacro Cuore, Roma

<sup>2</sup>Fondaz. Policlinico Gemelli, Roma

<sup>3</sup>Lab. di Citogenetica-Dip. dei Laboratori-IRCCS OASI Maria Santissima, Troina (EN)

<sup>4</sup>Dip. di Neurologia Pediatrica Univ. degli Studi-Azienda Osp. di Padova

<sup>5</sup>IRCCS MEDEA, Milano

<sup>6</sup>Az. Osp. Univ. di Parma

<sup>7</sup>Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

<sup>8</sup>Strutt. Semplice Dipart. Genetica Clinica - Arcisp. Santa Maria Nuova, Reggio Emilia

<sup>9</sup>A.O.R.N. "Gaetano Rummo", Benevento

<sup>10</sup>IRCCS E.Medea - La Nostra Famiglia, Conegliano (TV)

<sup>11</sup>IRCCS Eugenio Medea, Brindisi

<sup>12</sup>UOC Genetica Medica, Univ. Policlinico Santa Maria alle Scotte, Siena

<sup>13</sup>IRCCS E.Medea - La Nostra Famiglia, Piasan di Prato (UD)

<sup>14</sup>Genetica Clinica IRCCS "Burlo Garofalo", Trieste

<sup>15</sup>SOD Genetica Medica AOU Meyer, Firenze

<sup>16</sup>NPI IRCCS Ist. delle Scienze Neurologiche di Bologna

<sup>17</sup>IRCCS Istituto G. Gaslini - Osp. Pediatrico, Genova

<sup>18</sup>Dip. Materno Infantile-Az. Osp. Ospedali Riuniti "Villa Sofia-Cervello", Palermo

<sup>19</sup>Consulenza Genetica A.O. Trentino Alto Adige, Bolzano

<sup>20</sup>Az. Ospedaliera S. Carlo, Potenza

<sup>21</sup>IRCCS Fondazione Stella Maris, Pisa

<sup>22</sup>UO Genetica Medica - Policlinico S.Orsola Malpighi, Bologna

<sup>23</sup>Strutt. Semplice Dip. Ie di Genetica Clinica - Arcisp. Santa Maria Nuova, Reggio Emilia

La sindrome di Pitt-Hopkins (PTHS, OMIM #610954) è un raro ma emergente disordine del neurosviluppo causato da perdita di funzione del gene TCF4 in 18q21. Clinicamente si caratterizza con disabilità intellettiva grave con assenza del linguaggio, microcefalia ad insorgenza postnatale, tipici dismorfismi facciali, anomalie del respiro, lievi anomalie del SNC, problemi oculistici e sintomi nello spettro autistico. Nella letteratura scientifica sono riportati finora circa 300 casi di PTHS associati a varianti in eterozigosi del gene TCF4. Negli ultimi 8 anni sono stati riferiti presso il nostro centro un totale di 310 pazienti per sospetta sindrome di Pitt-Hopkins. La maggior parte dei pazienti aveva eseguito un numero variabile di test genetici, con risultati normali. La diagnosi clinica e genetica è stata condotta con la seguente procedura: a) valutazione clinica (diretta o condivisa tramite fotografie e questionari); b) analisi diretta di TCF4; c) analisi NGS di pannello genico, o di esoma clinico o di esoma completo; d) esame cromosomico convenzionale/FISH. Una diagnosi di causa è stata ottenuta in 58 pazienti. Tutti si sono selezionati nel gruppo di 158 pazienti sui 310 totali, che avevano presentato un fenotipo clinico maggiormente consistente con PTHS. Le varianti patogenetiche osservate hanno interessato i seguenti geni: TCF4 (tot 42), UBE3A





(Tot 4), MECP2 (Tot 6), FOXG1 (Tot 2), ZEB2 (Tot 2), EHMT1 (Tot 1) e SZT2 (Tot 1). Presentiamo i dati preliminari su una mappa fenotipica intragenica di TCF4, che riflette la selettiva disfunzione dei domini funzionali della proteina. Sono discusse le rilevanze cliniche e le proposte di un efficiente percorso diagnostico di approccio a condizioni nello spettro di encefalopatie epilettiche tipo PTHS.

**C19**  
**Missense mutation in Afg3l2 impairs m-AAA function: a novel option for therapeutic strategy in SCA28**

C. Mancini<sup>1</sup>, E. Hoxha<sup>2,3</sup>, L. Iommarini<sup>4</sup>, A. Brussino<sup>1</sup>, U. Richter<sup>5</sup>, F. Montarolo<sup>2,3</sup>, C. Cagnoli<sup>1</sup>, R. Parolisi<sup>2,3</sup>, D.I. Gondor Morosini<sup>2,3</sup>, V. Nicol<sup>2,3</sup>, L. Muratori<sup>3,7</sup>, G. Ronchi<sup>3,7</sup>, S. Geuna<sup>3,7</sup>, E. Giorgio<sup>1</sup>, S. Cavalieri<sup>1,9</sup>, E. Di Gregorio<sup>1,9</sup>, E. Pozzi<sup>1</sup>, M. Ferrero<sup>1</sup>, E. Riberi<sup>1</sup>, F. Altruda<sup>10</sup>, E. Turco<sup>10</sup>, G. Gasparre<sup>8</sup>, B.J. Battersby<sup>5</sup>, A.M. Porcellì<sup>4</sup>, F. Tempia<sup>2,3</sup>, A. Brusco<sup>1,9</sup>

<sup>1</sup>Dep. of Medical Sciences, University of Turin, Turin, Italy.

<sup>2</sup>Dep. of Neuroscience, University of Turin, Turin, Italy.

<sup>3</sup>Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO), Orbassano, Italy.

<sup>4</sup>Dep. of Pharmacy and Biotechnology (FABIT), University of Bologna, Bologna, Italy.

<sup>5</sup>Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Helsinki, Finland.

<sup>6</sup>Dep. of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, Turin, Italy.

<sup>7</sup>Molecular Biotechnology Center, Dep. of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Univ. di Turin, Turin, Italy.

<sup>8</sup>Dep. Medical and Surgical Sciences, Medical Genetics, University of Bologna, Bologna, Italy.

<sup>9</sup>Medical Genetics Unit, Citt. della Salute e della Scienza University Hospital, Turin, Italy.

SpinoCerebellar Ataxia type 28 (SCA28, OMIM#610246) is a rare autosomal dominant cerebellar ataxia, accounting for ~1.5% of the European cases. The causative gene, AFG3L2, encodes for a mitochondrial protein that assembles into homo- or hetero-hexamers with paraplegin, to form the matrix-ATPase Associated with various cellular Activities (m-AAA) protease. The m-AAA protease is a crucial component of the mitochondrial protein quality-control system, exerts chaperone-like activity and participates in mitochondrial protein processing and maturation. Taking advantages of the knockin (KI) Afg3l2<sup>M665R</sup> mouse we generated in our lab, and derived-MEFs, we evaluated: i) mitochondrial morphology and function, studying both homo- and heterozygous Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF) obtained at E13.5; ii) mitochondrial dynamics (Opa1 immunoblot and mt-RFP vector transfection); iii) bioenergetics (Seahorse assay and ATP synthesis). Mitochondrial bioenergetics revealed a reduction of basal oxygen consumption and decreased ATP synthesis in both KI-ho and KI-hz, indicating a general mitochondrial dysfunction. Furthermore, we detected a complete loss of long Opa1 isoforms in homozygous mutated MEFs, with a marked fragmented mitochondrial network. A similar imbalance of Opa1 isoforms was present in cerebellum homogenates derived from KI-hz mice., suggesting that this mechanism may represent the primum movens in SCA28 pathogenesis. Mitochondrial network anomalies cause trafficking defects in neurons, which are directly linked to neurodegeneration. We speculated that the excess of Opa1 processing, and the consequent mitochondrial fragmentation, might be triggered by an impairment in the quality control of newly synthesized mitochondrial proteins, linked to the loss of Afg3l2 function in mt-quality control process. Indeed, when we treated Afg3l2<sup>M665R</sup> MEFs with chloramphenicol, a drug able to inhibit mitochondrial de novo translation, we blocked the stress response and reversed MEFs phenotype. We propose that Afg3l2 missense mutations alter mitochondrial proteostasis in SCA28, and negatively affects the m-AAA quality control function, leading to a toxic engulfment of mitochondria by de novo synthesized proteins. Moreover, our findings suggest that the modulation of mitochondrial

translation may be useful to reduce proteotoxicity, opening the way to a novel therapeutic strategy in SCA28.



**C20**  
**CRISPR/Cas9 engineering approach on urine derived podocytes-lineage cells: a new therapeutic perspective in treatment of ATS**

S. Daga<sup>1</sup>, F. Donati<sup>6,8</sup>, M. Baldassarri<sup>1,2</sup>, C. Lo Rizzo<sup>1,2</sup>, C. Fallarini<sup>1</sup>, E. Landucci<sup>1</sup>, V. Imperatore<sup>1</sup>, I. Longo<sup>1,2</sup>, E. Frullanti<sup>1</sup>, L. Massella<sup>3</sup>, C. Pecoraro<sup>4</sup>, G. Garosi<sup>5</sup>, F. Ariani<sup>1,2</sup>, M.A. Mencarelli<sup>1,2</sup>, F. Mari<sup>1,2</sup>, M. Doria<sup>9</sup>, A. Auricchio<sup>9,10</sup>, S. Conticello<sup>6,7</sup>, A. Renieri<sup>1,2</sup>, A.M. Pinto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Medical Genetics, University of Siena, Siena, Italy

<sup>2</sup>Medical Genetics, A.O.U.S., Siena, Italy

<sup>3</sup>Division of Nephrology and Dialysis, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome

<sup>4</sup>Santobono Children's Hospital, Naples, Italy

<sup>5</sup>Nephrology, Dialysis and Transplantation, A.O.U.S., Siena, Italy

<sup>6</sup>Core Research Laboratory, Istituto Toscano Tumori, Florence, Italy

<sup>7</sup>Department of Oncology, A.O.U. Careggi, Florence, Italy

<sup>8</sup>Department of Medical Biotechnology - University of Siena, Siena, Italy

<sup>9</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Naples, Italy

<sup>10</sup>Medical Genetics, Department of Translational Medicine, Federico II University, Naples, Italy

Alport syndrome (ATS) is a rare genetic disorder caused by mutations in COL4V genes, leading to ultrastructural lesions of the GBM up to end-stage renal disease. Podocytes are key-players in ATS pathogenesis and they are the main cellular component of the glomerulus. Despite their unique ability to produce the three collagens IV alpha chains in the kidney, podocytes-targeted therapeutic strategies, have been hampered by their inaccessibility. For the first time, we prove that it is possible to isolate podocyte-lineage cells from urine of ATS patients, thus providing an easily available cell system closer to podocytes physiological conditions. On this ex-vivo cellular model, we applied the CRISPR/Cas9 gene editing approach in combination with therapeutic safe AAV delivery system, currently under patent procedure, in order to snip out the causative mutations and stably restoring the wild type genotype. As pilot study we corrected three ATS mutations: one (p.Gly624Asp in COL4A5) representing X-Linked model, and two (p.Pro1234Glu\* in COL4A4 and c.2567G>A p.Gly856Glu in COL4A3) representing the Autosomal Dominant model. We have constructed two plasmids, one bringing the Cas9, with specific auto-cleaving sequences, in order to avoid prolonged expression over the time; and another bringing the Donor DNA, the mCherry reporter system and the sgRNA, to properly direct the Cas9 on the specific nucleotides that we want to correct. Both plasmids are completed with the Poly-A and the ITR sequences, the last one fundamental for the encapsulation inside empty AAV. The second step will be to administer CRISPR/Cas9 delivered by AAV (selected properly for unique glomerular tropism) in a mouse model that brings stop codon in the exon 20 of COL4A4 and in a dog model which naturally brings a deletion of 10bp in exon 9 of COL4A5 gene. If the preclinical trial will confirm a well-tolerated response to infection and good percentage of correction, we envision to move forward with a pilot phase I clinical trial, where we will recruit the same patients for which we successfully performed the correction ex-vivo, proposing the first administration of AAV with intra-ureteral injection and opening up the possibility for the first gene therapy on humans.







C21

**In vitro Efficacy of ARQ 092, an Allosteric AKT Inhibitor, on Primary Fibroblast Cells Derived from Patients with PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum (PROS)**

D.C. Loconte<sup>1</sup>, V. Grossi<sup>1</sup>, S. Di Tommaso<sup>1</sup>, C. Ranieri<sup>1</sup>, P. Sanese<sup>1</sup>, R. Bagnulo<sup>1</sup>, F.C. Susca<sup>1</sup>, G. Forte<sup>2</sup>, A. Peserico<sup>1</sup>, A. De Luisi<sup>1</sup>, A. Bartuli<sup>3</sup>, A. Selicorni<sup>4</sup>, D. Melis<sup>5</sup>, M. Lerone<sup>6</sup>, M. Ruggieri<sup>7</sup>, G. Abbadessa<sup>8</sup>, Y. Yu<sup>9</sup>, B. Schwartz<sup>8</sup>, C. Simone<sup>1</sup>, N. Resta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Divisione di Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana (DIMO) Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

<sup>2</sup>Laboratorio di Genetica del Cancro, IRCCS "S. de Bellis", Castellana Grotte, Bari

<sup>3</sup>Unit di Malattie Rare e Genetica Medica, Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", Roma

<sup>4</sup>Unit di Pediatria, Presidio San Fermo, ASST Lariana, Como

<sup>5</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Traslocazionali, Sezione di Pediatria, Università di Napoli "Federico II", Napoli

<sup>6</sup>Unit di Genetica Medica, Istituto Giannina Gaslini, Genova

<sup>7</sup>Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione di Pediatria e Neuropsichiatria Infantile, Università degli Studi di Catania

<sup>8</sup>Clinical Development, Translational Research, Medical Affairs, ArQule, Inc., Burlington, Massachusetts, USA

<sup>9</sup>Translational Research, ArQule, Inc., Burlington, Massachusetts, USA

Background: Postzygotic mutations of the PIK3CA gene constitutively activate the PI3K/AKT/mTOR pathway in PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS) patients, causing congenital mosaic tissue overgrowth that even multiple surgeries cannot solve. PROS patients could be ideal candidates for enrolment in trials with PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors, considering the clean cellular setting in which a unique driver, a PIK3CA mutation, is present. Aim of study: We aimed to assess the effects of blocking the upstream pathway of mTOR on PROS patient-derived cells by using ARQ 092, an AKT inhibitor, with long-term activity and tolerability, currently under clinical development for treatment of cancer and Proteus syndrome. Subjects samples: primary fibroblasts were derived from cultured tissues obtained from six PROS patients whose spectrum of PIK3A-related overgrowth included HHML (Hemihyperplasia multiple lipomatosis), CLOVES (Congenital Lipomatosis, Overgrowth, Vascular malformations, Epidermal nevi, Spinal/skeletal anomalies, scoliosis), macrodactyly and MCAP (Megalencephaly-Capillary Malformation Polymicrogyria). Methods: We performed: (a) a deep sequencing assay of PI3K/AKT/mTOR pathway genes to identify the causative mutations; and (b) a pathway analysis to assess the phosphorylation status of AKT and its downstream targets (PRAS40, S6, and p70S6K). The anti-proliferative effect of ARQ 092 was tested and compared to other PI3K/AKT/mTOR inhibitors (wortmannin and rapamycin) in the same patients. Results: Using ARQ 092 to target AKT we observed: (1) strong anti-proliferative activity: ARQ 092 abolished phosphorylation of AKT and its downstream targets and inhibited proliferation after 72 hours; (2) stronger efficiency and less cytotoxicity as compared to rapamycin and wortmannin. Conclusions: The present findings demonstrate: (a) that PROS cells are dependent on AKT; (b) PROS patients could benefit from inhibition of AKT rather than mTOR, since inhibiting the pathway immediately downstream of PI3K could circumvent problems depending on alternative pathways activation. Clinical development of ARQ 092 in PROS patients is ongoing in these patients.

C22

**Medicina personalizzata: nuove prospettive per la diagnosi e trattamento delle malattie renali**

S. Landini<sup>1</sup>, A. Provenzano<sup>1</sup>, V. Palazzo<sup>1</sup>, L. Dosa<sup>3</sup>, F. Becherucci<sup>2</sup>, B. Mazzinghi<sup>2</sup>, A. Pagliuzzi<sup>3</sup>, E. Bosi<sup>1</sup>, R. Artuso<sup>3</sup>, A. La Barbera<sup>1</sup>, P. Reho<sup>1</sup>, G. Traficante<sup>3</sup>, S. Bargiacchi<sup>3</sup>, S. Ciabattini<sup>3</sup>, F. Peluso<sup>3</sup>, L. Giunti<sup>3</sup>, M. Garonzi<sup>4</sup>, L. Xumerle<sup>4</sup>, R. Roperto<sup>2</sup>, G. Sansavini<sup>2</sup>, M. Allinovi<sup>1</sup>, M. Della Monica<sup>3</sup>, P. Romagnani<sup>1,2</sup>, S. Giglio<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche "Mario Serio", Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia

<sup>2</sup>SOC di Nefrologia e Dialisi, Azienda Universitaria-Ospedaliera Anna Meyer, Firenze, Italia

<sup>3</sup>SOC di Genetica Medica, Azienda Universitaria-Ospedaliera Anna Meyer, Firenze, Italia

<sup>4</sup>Dipartimento di Biotecnologie, Università degli Studi di Verona, Verona, Italia

La proteinuria è un segno peculiare dei disordini renali e rappresenta un fattore determinante nella progressione verso le malattie renali croniche (CKD), specialmente nei bambini e nei giovani adulti. Al fine di espandere le conoscenze sulla eziopatogenesi di tali patologie, abbiamo deciso di effettuare il sequenziamento dell'intero esoma (WES) in 110 pazienti affetti da proteinuria associata ai seguenti disordini diagnosticati sia clinicamente che mediante esame bioptico: Sindrome Nefrosica Steroide-Sensibile (SNSS), Sindrome Nefrosica Steroide-Resistente (SNSR), Glomerulopatia a Lesioni Minime (MCD), Sclerosi Mesangiale Diffusa (DMS) e Glomerulosclerosi Focale Segmentale (GSFS) con età d'insorgenza inferiore ai 20 anni. Abbiamo identificato varianti potenzialmente patogenetiche nel 53% dei pazienti. Nessun caso di quelli con SNSS presentava varianti in geni espressi a livello renale. Tra i soggetti che mostravano varianti patogenetiche, più frequentemente veniva riportato il fenotipo da GSFS indipendentemente dalla diversa base genetica, ma il fenotipo clinico all'esordio rispecchiava in modo preciso il tipo di gene coinvolto (es. geni podocitari). Inoltre, la presenza di varianti patogenetiche è stata associata alla mancanza di risposta a trattamenti immunosoppressivi, mentre la remissione completa della malattia può essere osservata solo nel gruppo di pazienti negativi all'analisi genetica. La progressione verso la CKD, infine, è significativamente maggiore nei pazienti con varianti patogenetiche rispetto ai pazienti negativi, suggerendo che la presenza di difetti genetici è altamente predittiva dell'esito clinico di questi pazienti. Questi risultati suggeriscono che l'elemento chiave per capire se una patologia renale evolve verso la CKD o la remissione è la presenza di varianti in specifici geni, che oltre a predire l'esito dei pazienti, indirizzano verso specifiche terapie che ne migliorano la prognosi, sostenendo così l'opportunità di includere il WES nella flow-chart diagnostica di questi disordini, soprattutto nei pazienti con un inizio precoce della malattia.

C23

**Individuals with FANCM biallelic mutations do not develop Fanconi anemia, but show risk for breast cancer, chemotherapy toxicity, early menopause, and may display chromosome fragility**

I. Catucci<sup>1</sup>, A. Osorio<sup>2</sup>, B. Arver<sup>3</sup>, G. Neidhardt<sup>4</sup>, M. Bogliolo<sup>5</sup>, F. Zanardi<sup>1</sup>, M. Riboni<sup>1</sup>, S. Minardi<sup>1</sup>, R. Pujol<sup>5</sup>, J. Azzollini<sup>6</sup>, B. Peissel<sup>6</sup>, S. Manoukian<sup>6</sup>, G. De Vecchi<sup>1</sup>, S. Casola<sup>1</sup>, J. Hauke<sup>4</sup>, L. Richters<sup>4</sup>, K. Rhiem<sup>4</sup>, R. Schmutzler<sup>4</sup>, K. Wallander<sup>7</sup>, T. T. mgren<sup>8</sup>, T. Borg<sup>8</sup>, P. Radice<sup>9</sup>, J. Surrallés<sup>5</sup>, E. Hahnen<sup>4</sup>, H. Ehrencrona<sup>10</sup>, A. Kivist<sup>8</sup>, J. Benitez<sup>2</sup>, P. Peterlongo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genome Diagnostics Program, IFOM - the FIRG Institute of Molecular Oncology, Milan, Italy

<sup>2</sup>Spanish National Cancer Research Center (CNIO) and Spanish Network on Rare Diseases, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Dept. of Oncology Pathology, Karolinska University Hospital, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

<sup>4</sup>Center for Familial Breast and Ovarian Cancer, Center for Integrated Oncology (CIO), Medical Faculty, University Hospital Cologne, Germany

<sup>5</sup>Dept. of Genetics and Microbiology, Genetics Dept. of Hospital de les Santes Creus i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

<sup>6</sup>Unit of Medical Genetics, Dept. of Preventive and Predictive Medicine, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy

<sup>7</sup>Dept. of Molecular Medicine and Surgery, Karolinska Institute, and Dept. of Clinical Genetics, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

<sup>8</sup>Div. of Oncology, Department of Clinical Sciences, Lund University, Sweden

<sup>9</sup>Unit of Molecular Bases of Genetic Risk and Genetic Testing, Dept. of Preventive and Predictive Medicine, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy

<sup>10</sup>Dept. of Clinical Genetics, Lund University, Sweden

Purpose: Monoallelic germ-line mutations in the BRCA1/FANCS, BRCA2/FANCD1 and PALB2/FANCN genes confer high risk of breast cancer. Biallelic mutations in these genes cause Fanconi anemia (FA), characterized by malformations, bone marrow failure, chromosome fragility, and cancer predisposition (BRCA2/FANCD1 and PALB2/FANCN), or an FA-like disease presenting a phenotype similar to FA but without bone marrow failure (BRCA1/FANCS). FANCM monoallelic mutations have been reported as moderate risk factors for breast cancer, but there are no reports of any clinical phenotype observed in carriers of biallelic mutations.

Methods: Female breast cancer probands were subjected to mutation analysis by sequencing gene panels or testing DNA damage response genes.

Results: Five cases homozygous for FANCM loss-of-function mutations were identified. They show a heterogeneous phenotype including cancer predisposition, toxicity to chemotherapy, early menopause, and possibly chromosome fragility. Phenotype severity might correlate with mutation position in the gene.

Conclusion: Our data indicate that biallelic FANCM mutations do not cause classical FA, providing the first clinical evidence that FANCM is not a canonical FA gene. Moreover, our observations support previous findings suggesting that FANCM is a breast cancer-predisposing gene. Mutation testing of FANCM might be considered for individuals with the above-described clinical features.

C24

**Fine-mapping and functional evaluation of BARD1 susceptibility locus to high-risk neuroblastoma**

F. Cimmino<sup>1,2</sup>, M. Avitabile<sup>1,2</sup>, L. Pezone<sup>1,2</sup>, A. Testori<sup>1,2</sup>, V.A. Lasorsa<sup>1,2</sup>, P. Pignataro<sup>1,2</sup>, A. Iolascon<sup>1,2</sup>, M. Capasso<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Naples, Italy

<sup>2</sup>CEINGE Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy

<sup>3</sup>IRCCS SDN, Istituto di Ricerca Diagnostica e Nucleare, Naples, Italy

Understanding of the way in which a risk variant initiates disease pathogenesis progresses is the major challenge in the post-GWAS era. Our genome-wide association studies (GWAS) have previously demonstrated that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in BARD1 (BRCA1-associated RING domain protein 1) locus are associated with the risk development of neuroblastoma (NB), a pediatric tumor which arises from the sympathetic ganglia and adrenal medulla. To identify the risk variants in BARD1 locus which may be functionally responsible for the occurrence of disease by affecting regulatory mechanisms of BARD1 expression we have performed a fine mapping analysis. The imputation and genetic association analyses of BARD1 locus in 556 high-risk NB and 2575 controls with European-American ancestry identify two risk SNPs in BARD1 locus not identified by GWAS. Particularly, a risk allelic variant in the promoter of BARD1 is the most significantly associated with NB and correlates with low expression of the full length (fl) mRNA BARD1 in adrenal gland (GTEx data) and lymphocytes from normal donors. This genetic association has been further validated in three independent populations with different origins (Africans: 159 high-risk cases and 2244 controls, Italians: 166 high-risk cases and 742 controls, Spanish: 39 high-risk cases and 60 controls). These findings highlighted a tumor suppressor role of (fl)BARD1 that still remains uncharacterized in NB. BARD1 is an important regulator of the tumor-suppressor function of BRCA1 but may act as a tumor suppressor itself. By in vitro functional analyses in NB cell lines, we have demonstrated that repression of (fl)BARD1 promotes proliferation and invasion, and causes genomic instability leading to cell death. Cells that survive in the absence of BARD1 are therefore primed for malignant transformation. In conclusion, our study suggests that the low expression of (fl) BARD1 due to a functional variant predisposes to the risk of NB development. Moreover, we have demonstrated that (fl) BARD1 acts as tumor-suppressor gene in NB tumorigenesis. These biological insights can be translated to clinical benefits, including reliable biomarkers and effective strategies for screening and disease prevention.





C25  
**TRIM8 participates to the mitotic spindle formation: implications for human diseases**

S. Venuto<sup>1,2</sup>, L. Montefonio<sup>3</sup>, M. Monti<sup>4</sup>, T. Mazza<sup>6</sup>, C. Fusco<sup>1</sup>, A.I. Croce<sup>1</sup>, I. Appolloni<sup>5</sup>, D. Valente<sup>3</sup>, P. Pucci<sup>4</sup>, P. Malatesta<sup>5</sup>, S. Soddu<sup>3</sup>, G. Merla<sup>1</sup>, L. Micale<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical Genetics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, San Giovanni Rotondo, Foggia

<sup>2</sup>PhD Program, Experimental and Regenerative Medicine, University of Foggia, Foggia

<sup>3</sup>Unit of Cellular Networks and Molecular Therapeutic Targets, Regina Elena National Cancer Institute - IRCCS, Rome

<sup>4</sup>CEINGE Advanced Biotechnology and Department of Chemical Sciences Federico II University, Napoli

<sup>5</sup>U.O. Trasferimento Genico, IRCCS-AOU San Martino-IST, Genova

<sup>6</sup>Bioinformatics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, Mendel Institute, Rome

Assembly of a bipolar mitotic spindle is essential to ensure accurate chromosome segregation and prevent aneuploidy, and severe mitotic spindle defects are typically associated to human diseases and cancer. We reported the E3 ubiquitin ligase TRIM8 as a brain gene aberrantly expressed in glioma. Although TRIM8 mutations in patients with epileptic encephalopathy were recently identified, TRIM8 function in the brain remains largely uncharacterized. To dissect TRIM8 role in brain biology, we profiled TRIM8-related transcript and protein signatures in Neural Stem Cells. Global gene expression profile identified pathways related to neurotransmission and CNS including Axonal Guidance, GABA Receptor, Ephrin B, Synaptic long-term potentiation/depression and Glutamate receptor signalling. Proteomic analysis identified 50 TRIM8 interactors counting 11 (22%) mitosis-related proteins including KIF11 and KIFC1, two kinesins involved in the bi-polarization of mitotic spindles. Aberrant KIF11 and KIFC1 expression was also associated to brain cancers and neurological disorders. Given the proteomic data we explored the TRIM8 role in mitotic spindle organization. Immunofluorescence analysis revealed that TRIM8 co-localizes with alpha tubulin in the mitotic spindle throughout mitosis and in the midbody during cytokinesis and that TRIM8 depletion induces the formation of monopolar spindles in metaphase cells, similar to the phenotype due to KIF11 and KIFC1 perturbation. Live cell microscopy imaging and immunoblot showed that TRIM8 silencing slows down mitosis progression in HeLa cells. Moreover, our currently studies strongly suggest that TRIM8 might control mitosis progression through an aberrant regulation of KIF11 and KIFC1 levels. Finally, since aneuploidy might be a consequence of impaired mitosis, we examined the effect of TRIM8 depletion on genomic stability. Trypsin-Giemsa banding technique showed that the TRIM8-depleted primary fibroblast cells resulted in an increase of cells with abnormal chromosome numbers implying a TRIM8 role in chromosomal instability as result of mitotic abnormalities. Overall these results uncover a putative role of TRIM8 in mitotic spindle formation. We are now exploring the molecular mechanism of how TRIM8 is involved in this intriguing process

C26  
**Genetic testing for melanoma dominant and subordinate cancer syndromes: from gene panel testing to new diagnostic algorithms?**

W. Bruno<sup>1</sup>, O. Lucero<sup>3</sup>, L. Pastorino<sup>1</sup>, V. Andreotti<sup>1</sup>, B. Dalmaso<sup>1</sup>, A. Cianflone<sup>1</sup>, P. Queirolo<sup>2</sup>, S. Leachman<sup>3</sup>, P. Ghiorzo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetics of Rare Cancers, Dept. of Internal Medicine and Medical Specialties, University of Genoa and Policlinico San Martino, Genoa, Italy

<sup>2</sup>Medical Oncology, Policlinico San Martino, Genoa, Italy

<sup>3</sup>Dept. of Dermatology and Knight Cancer Institute, Oregon Health & Science University, Portland, OR, USA

About 45% of familial melanomas have been attributed to inheritance of a mutation in a highly penetrant predisposition gene, such as CDKN2A, but distinct melanoma predisposition syndromes have been defined and genetic tests are increasingly available for the associated causative genes. The recommendations for genetic testing published so far are population and incidence-based (e.g. in low-incidence areas a pedigree should have two rather than three primary melanomas to meet the threshold) but mostly not intended for the non-CDKN2A melanoma syndromes. Moreover, melanoma can also be a subordinate cancer within other syndromes. Here we describe an international consensus on the extension of the rule of twos and threes for melanoma genetic testing. Starting from 100 high risk melanoma patients negative for CDKN2A mutations, the use of a customized gene-panel based including newly identified or candidate susceptibility genes for melanoma-dominant syndromes led us to increase diagnostic yield of a further 7% ranging to 12% if we include variants in genes under investigation in a research context. To develop a more tailored approach to genetic testing for the full spectrum of hereditary melanoma, we therefore implemented an algorithm that incorporates cancers and genes yet seen in association with melanoma, also integrated with a score system to evaluate the personal and familial cancer history of the proband, for a final threshold of three. The algorithm separates melanoma syndromes in two types: a) melanoma dominant, in which melanoma is a predominant cancer although others may also be observed. These syndromes are associated e.g. with mutations in CDKN2A, CDK4, MITF, BAP1 and POT1; b) melanoma subordinate, with an increased but lower risk of melanoma than that of other cancers in the syndromes, often associated with well-established predisposition genes. Nevertheless, the personal and family cancer history of a proband could also constitute a clear indication for a single test, e.g. for BAP1-associated syndrome. This algorithm could also represent a tool towards the update of the SIGU recommendations for melanoma genetic testing and the implementation of a gene-panel approach for genetic testing that also embraces melanoma-subordinate syndromes.

C27  
**Constitutive supernumerary marker chromosomes are the chromothripsis remnant of the supernumerary chromosome present in trisomic embryos**

E.N. Kurtas<sup>1</sup>, L. Xumerle<sup>2</sup>, L. Leonardelli<sup>2</sup>, M. Delledonne<sup>2</sup>, A. Brusco<sup>3</sup>, K. Chrzaowska<sup>4</sup>, A. Schinzel<sup>5</sup>, S. Gueneri<sup>6</sup>, E. Manolakos<sup>7</sup>, S. Giglio<sup>8</sup>, T. Liehr<sup>9</sup>, O. Zuffardi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. of Molecular Medicine, Uni. of Pavia, Pavia, Italy

<sup>2</sup>Dep. of Biotechnology, Uni. of Verona, Verona, Italy

<sup>3</sup>Dep. of Medical Sciences, Uni. of Turin, Torino, Italy

<sup>4</sup>Dep. of Medical Genetics, The Children's Memorial Health Inst., Warsaw, Poland

<sup>5</sup>Inst. of Medical Genetics, Uni. of Zurich, Zurich, Switzerland

<sup>6</sup>Lab. of Medical Genetics, Fondazione IRCCS Ca' Granda Osp. Maggiore Policlinico, Milan, Italy

<sup>7</sup>Lab. of Genetics, Access to genome P.C., Thessaloniki, Greece

<sup>8</sup>Biomedical Experimental and Clinical Sciences "Mario Serio", Uni. of Florence, Firenze, Italy

<sup>9</sup>Inst. of Human Genetics, Jena University Hospital, Jena, Germany

We hypothesize that most de novo constitutional non-recurrent supernumerary marker chromosomes (sSMC) are the final outcome, via a chromothripsis event, of the partial trisomy rescue of supernumerary chromosomes present in trisomic embryos. The hypothesis is based on the following facts, fully in line with the known biological characteristics of human trisomies: (i) sSMCs are associated with maternal age, (ii) most sSMCs are in mosaic with a normal cell line, (iii) in some sSMCs maternal UPD for the chromosome by which the marker derives was reported. To investigate this hypothesis, we performed a detailed characterization of 8 cases of non-recurrent de novo sSMCs using whole genome paired-end sequencing (WGS). We also performed trio analysis by microsatellites spread along the entire chromosome by which the sSMC originated. As a result, in six cases, namely sSMC2a, sSMC2b, sSMC7a, sSMC8a, sSMC17, sSMC18, markers are constituted by a disordered assembly of two or more segments of their corresponding chromosomes. In remaining two cases, sSMC7b and sSMC8b, only a single chromosomal region was involved in their construction. In each case the novel order of the chromosomal segments was confirmed by breakpoints (bps) PCR amplification and cloning. In all bps the fusion signature showed repair mechanisms such as non-homologous end joining and microhomology mediated processes. In two of them, sSMC7a and sSMC2b, we could demonstrate that the marker was even more complex, revealing some regions that were represented at different level of copy number gain (duplicated, triplicated, or even amplified) as if multiple types of sSMC were present in the different blood cells. Microsatellite and SNPs analysis in the trios indicated a maternal origin of marker with biparental origin of the related homologous chromosomes in 4 cases, and a paternal origin with maternal hetero/isodisomy of their related chromosomes in the remaining 4 cases. These data demonstrate both a link between numerical and structural anomalies and that early lethal trisomies may leave a dramatic legacy in the postnatal life.



C28  
**Contributo della CMA nella diagnosi di individui con dismorfismi. Studio collaborativo del GdL SIGU di Citogenetica/genomica.**

M. Garzo<sup>1</sup>, I. Catusi<sup>1</sup>, M.P. Recalcati<sup>1</sup>, M. Alfonsi<sup>2</sup>, A. Alghisi<sup>3</sup>, S. Cappellani<sup>4</sup>, R. Casalone<sup>5</sup>, R. Caselli<sup>6</sup>, C. Ceccarini<sup>7</sup>, C. Ceglie<sup>8</sup>, A.M. Ciaschini<sup>9</sup>, D. Coviello<sup>10</sup>, F. Crosti<sup>11</sup>, A. D'Aprile<sup>7</sup>, A. Fabretto<sup>4</sup>, R. Genesio<sup>12</sup>, M. Giagnacovo<sup>13</sup>, P. Granata<sup>5</sup>, I. Longo<sup>6</sup>, M. Malacarne<sup>10</sup>, G. Marseglia<sup>14</sup>, A. Montaldi<sup>5</sup>, A.M. Nardone<sup>15</sup>, C. Palka<sup>16</sup>, V. Pecile<sup>4</sup>, C. Pessina<sup>5</sup>, D. Postorivo<sup>15</sup>, S. Redaelli<sup>17</sup>, A. Renieri<sup>8</sup>, C. Rigon<sup>18</sup>, F. Tiberi<sup>9</sup>, M. Tonelli<sup>19</sup>, C. Valtorta<sup>1</sup>, N. Villa<sup>11</sup>, A. Zilio<sup>5</sup>, D. Zuccarello<sup>18</sup>, A. Novelli<sup>20</sup>, L. Larizza<sup>1</sup>, D. Giardino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Lab. di Citogenetica Medica e Genetica Molecolare, Milano, Italia (giardino@auxologico.it, m.garzo@auxologico.it)

<sup>2</sup>Ospedale SS Annunziata, U.O.C. di Genetica medica, Chieti, Italia

<sup>3</sup>Azienda ULSS 6, U.O.S. Genetica e Biologia Molecolare, Vicenza, Italia

<sup>4</sup>IRCCS Burlo Garofolo, S.C. Genetica Medica, Trieste, Italia

<sup>5</sup>ASST Sette Laghi, Osp. di Circolo e Fond. Macchi, SMeL specializzato Citogenetica e Genetica Medica, Varese, Italia

<sup>6</sup>Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, U.O.C. Genetica Medica, Siena, Italia

<sup>7</sup>A.O.U. Ospedali Riuniti, Lab. di Citogenetica, Foggia, Italia

<sup>8</sup>AORN SG Moscati, UOSD Genetica Medica, Avellino, Italia

<sup>9</sup>A.O.U. Ospedali Riuniti Umberto I-G.M.Lancisi-G.Salesi, Lab. Genetica Medica SOS Malattie Rare, Ancona, Italia

<sup>10</sup>E.O. Ospedali Galliera, Lab. di Genetica Umana, Genova, Italia

<sup>11</sup>Ospedale San Gerardo - ASST Monza, U.S. Genetica Medica, Monza, Italia

<sup>12</sup>A.O.U. Federico II, U.O.C. di Citogenetica, Napoli, Italia

<sup>13</sup>ASST Lariana - Ospedale Sant' Anna, Lab. di Genetica, Como, Italia

<sup>14</sup>A.O.U. Careggi, S.O.D. Diagnostica Genetica, Firenze, Italia

<sup>15</sup>Policlinico Tor Vergata, U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, Roma, Italia

<sup>16</sup>Universit G. D'Annunzio, Dipartimento di Pediatria, Chieti-Pescara, Italia

<sup>17</sup>Universit di Milano-Bicocca, Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Monza, Italia

<sup>18</sup>A.O.U. di Padova, U.O.C. Genetica e Epidemiologia Clinica, Padova, Italia

<sup>19</sup>Universit di Brescia, LCGM Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslaazionale, Brescia, Italia

<sup>20</sup>Ospedale Pediatrico del Bambino Gesù, U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, Roma, Italia

L'analisi cromosomica mediante microarray (CMA, Chromosomal Microarray Analysis) ha implementato in modo significativo possibilità di identificare variazioni nel numero di copie (CNVs) di sequenze di DNA associate ad un ampio spettro di disordini genomici. Su iniziativa del Gruppo di Lavoro SIGU di Citogenetica e Citogenomica sono state raccolte le informazioni provenienti da 17 laboratori italiani relative a 780 pazienti riferiti alla CMA per presenza di dismorfismi (D) come unica manifestazione clinica (21%) o per dismorfismi associati a disabilità intellettiva/ritardo dello sviluppo (DI/RS) (57%), malformazioni (M) (10%), disturbi dello spettro autistico (DSA) (6%), epilessia (E) (3%) e ad anomalie della crescita (AC) (3%). Un cariotipo molecolare anomalo è stato osservato in 266 pazienti (34%), di cui ben 56 (21%) analizzati per la sola presenza di D. Nei restanti 210 pazienti con cariotipo molecolare anomalo (79%) i D erano associati ad







altri segni clinici. Nel campione CMA-positivo sono state individuate complessivamente 329 CNVs, di cui 78 nei soggetti con D come unica indicazione all'analisi, suddivise in 28 CNV patogenetiche (pCNVs) (36%) e 50 (64%) VOUS (Variants Of Unknown Significance). Quest'ultima classe comprende 5 (10%) VOUS interpretate come probabilmente patogenetiche (VOUSpp), 6 (12%) VOUS probabilmente benigne (VOUSpb) e 39 (78%) VOUS senza possibilità di sottoclassificazione (VOUSss). Nei soggetti con indicazione all'analisi di D insieme ai diversi segni clinici sopraelencati, sono state evidenziate 251 CNVs, di cui 95 (38%) classificate come pCNV e 156 (62%) come VOUS [16 (6%) VOUSpp, 25 (10%) VOUSpb e 115 (46%) VOUSss]. La dimensione media delle CNVs totali è risultata pari a 2,9 Mb, con dimensione delle pCNV >6 Mb e delle VOUS inferiore <1 Mb. La delezione rappresenta lo sbilanciamento genomico più frequente nella classe delle pCNVs. Questo studio cooperativo ha permesso di valutare la detection rate (DR) della CMA in pazienti riferiti per dismorfismi come unica manifestazione clinica ed in pazienti con D associati ad altri segni clinici. Dall'analisi dei dati relativi alla nostra casistica è emersa l'utilità, finora non specificatamente accertata, dell'applicazione della CMA anche in pazienti che presentano dismorfismi come unica manifestazione clinica.

C29

**Prenatal WES: non solo consulenza genetica ma migliore comprensione dello sviluppo fetale**

E. Errichello<sup>1</sup>, A. Arossa<sup>2</sup>, A. Iasci<sup>2</sup>, A. Vetro<sup>1,5</sup>, G. Fiandrino<sup>3</sup>, S. Cesari<sup>3</sup>, A. Meroni<sup>1,2</sup>, M.F. Bedeschi<sup>4</sup>, F. Lalatta<sup>4</sup>, O. Zuffardi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Medicina Molecolare, Lab. Diagnosi Citogenetica Prenatale e Molecolare, Università degli Studi di Pavia, Pavia

<sup>2</sup>Dip. Materno-infantile, U.O. Ostetricia e Ginecologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

<sup>3</sup>Dip. Medicina Diagnostica e Servizi, U.O. Anatomia Patologica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

<sup>4</sup>Dip. Salute della Donna, del Bambino e del Neonato, U.O. Genetica Medica, Fondazione IRCCS Ca' Granda - Osp. Maggiore Policlinico, Milano

<sup>5</sup>Lab. Neurogenetica, Osp. Meyer, Firenze

L'analisi dell'esoma (Whole Exome Sequencing, WES) in epoca prenatale (prenatal WES) è in grado di svelare anomalie genetiche in un maggior numero di casi rispetto ai test convenzionali, quali cariotipo o array CGH. Nella recente revisione di Best et al. (2017), in cui sono state considerate 31 pubblicazioni di prenatal WES nel periodo 2012-2017, è stata riportata una resa diagnostica estremamente variabile (6,2%-80%), maggiore nelle analisi di trio o nel caso di anomalie fetali multiple. In questo studio sono stati analizzati 18 casi, di cui 13 trio ed una intera famiglia con 3 feti affetti e due figli sani. In 10 casi, raccolti nell'ambito del tema strategico di Ateneo UNIPV TSA MIGRAT.IN.G. (MIGRATIONS: towards an Interdisciplinary Governance model), era dichiarata consanguineità. In tutti i casi erano evidenti anomalie morfologiche del feto all'ecografia (prevalentemente scheletriche) e l'analisi cromosomica e/o di array CGH era negativa. In 14 casi (77,8%) sono state identificate varianti associate a geni malattia ed è stata formulata una diagnosi genetica, mentre negli altri non è stato possibile identificare in prima battuta il gene causativo e sono stati avviati approfondimenti funzionali al fine di stabilire una correlazione genotipo-fenotipo. La maggior parte delle varianti erano a carico di geni codificanti per proteine coinvolte nella citogenesi (DNAAF1, DYNC2H1, INPP5E, KIAA0586, TCTN1: 6/14, 42,9%) o fattori di trascrizione (CHD7, TBX6, WT1: 3/14, 21,4%), mentre nei restanti casi le varianti identificate erano nei geni CRTAP, CSNK1A1, PI4KA, SCN2A e TTC37. In tutti i casi le varianti riguardavano geni malattia già noti, ad eccezione di CSNK1A1, coinvolto nel pathway di Wnt, per cui è stato tuttavia possibile validare il dato tramite un'estesa analisi di segregazione nella famiglia ed in base a precedenti studi. In aggiunta alle maggiori capacità diagnostiche, l'impiego del prenatal WES permette una migliore comprensione di disordini genetici già noti rispetto alle caratteristiche fenotipiche fetali, nonché l'identificazione di nuove sindromi letali in epoca prenatale. Quest'ultimo aspetto risulta di particolare rilievo in relazione al fenomeno della consanguineità di sempre più frequente riscontro nel counseling prenatale.

C30

**Diagnosi preimpianto per malattia di Huntington: presentazione di 10 casi clinici e considerazioni etiche**

D. Zuccarello<sup>1</sup>, C. Patassini<sup>1</sup>, V. Romanelli<sup>1</sup>, L. Girardi<sup>1</sup>, D. Cimadomo<sup>1</sup>, L. Rienzi<sup>2</sup>, F.M. Ubaldi<sup>2</sup>, C. Livi<sup>3</sup>, F. Benini<sup>3</sup>, L. Buffo<sup>4</sup>, C. Gentile<sup>4</sup>, B. Iussig<sup>4</sup>, A. Capalbo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>GENETYX srl, Marostica (VI)

<sup>2</sup>GENERA, Centro di Medicina della Riproduzione, Roma

<sup>3</sup>Centro Procreazione Assistita Demetra, Firenze

<sup>4</sup>GENERA VENETO, Centro di Medicina della Riproduzione, Marostica (VI)

La diagnosi genetica preimpianto (PGT, Preimplantation Genetic Test) è considerata la forma più precoce di diagnosi prenatale per le coppie a rischio, offrendo anche la possibilità di valutare al contempo eventuali aneuploidie embrionali. Tale diagnosi combinata (monogenica + cromosomica) consente di offrire alle coppie la possibilità di non essere informati dell'eventuale status di portatore della malattia (not disclosure test), e tale metodica si rivela particolarmente indicata nelle coppie con familiarità con malattia di Huntington (HD). La PGT per HD viene eseguita mediante studio dell'aplotipo a rischio, dato che non è tecnicamente possibile in fase di PGT definire con precisione la grandezza dell'espansione (triplette CAG) del gene HTT. Negli ultimi 2 anni si sono rivolti al nostro Servizio di consulenza genetica 10 coppie con familiarità (2) o partner affetto (n. 8, 6 uomini e 2 donne) da HD, intenzionati ad eseguire una PGT. Dopo diversi colloqui di consulenza genetica, alle due coppie con familiarità è stata offerta la possibilità di effettuare una PGT con "not disclosure test", previa fattibilità al set-up preliminare. Delle 8 coppie con partner affetto, 3 sono state giudicate "non eseguibili" per motivazioni tecniche (unico affetto vivente in famiglia o familiari non disponibili per analisi di linkage) o percentuali di successo cumulativo scarse (combinazione di rischio del 50% di HD con et femmine avanzata - 44 anni); altre 5 coppie invece hanno invece iniziato il percorso di PGT (in corso). Con tutte le coppie in consulenza genetica si è discusso delle percentuali di successo cumulativo (gravidanza a termine), delle possibili alternative (fecondazione eterologa e adozione), delle problematiche tecniche (necessità di coinvolgimento dei familiari per studio aplotipo a rischio, percentuale di trasmissione del gene mutato superiore al 50% per frequenti fenomeni di ricombinazione, rischio elevato di espansione della tripletta in caso di trasmissione paterna) e, non ultimo, delle importanti implicazioni e ricadute di una possibile genitorialità in una famiglia con partner Huntington (sia giovane/asintomatico che di et avanzata/sintomatico), aspetto quest'ultimo che ha spesso richiesto un appropriato supporto psicologico per la coppia.

C31

**WES su feti con anomalie ecografiche complesse: possiamo espandere la nostra conoscenza delle malattie genetiche durante lo sviluppo fetale? Diagnosi di sindrome di Shwachman-Diamond come esempio.**

E. PELUSO<sup>1</sup>, S. CIABATTONI<sup>1</sup>, A. PAGLIAZZI<sup>1</sup>, G. CARIGNANI<sup>1</sup>, S. BARGIACCHI<sup>2</sup>, G. TRAFICANTE<sup>2</sup>, L. DOSA<sup>2</sup>, M. DELLA MONICA<sup>2</sup>, F. ROMANO<sup>3</sup>, C. AZZARI<sup>3</sup>, A. MAROZZA<sup>4</sup>, E. AGOSTINI<sup>5</sup>, P. FIORINI<sup>5</sup>, C. DE FILIPPI<sup>6</sup>, R. BIAGIOTTI<sup>7</sup>, S. GIGLIO<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> SOC Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche Mario Serio, Università degli Studi di Firenze, Firenze

<sup>2</sup> SOC Genetica Medica, AOU A. Meyer, Firenze

<sup>3</sup> Divisione di Immunologia Pediatrica, Dipartimento di Pediatria, AOU A. Meyer, Firenze

<sup>4</sup> Unit di Genetica Medica, Ospedale Universitario Careggi

<sup>5</sup> SOC Terapia Intensiva Neonatale, AOU A. Meyer, Firenze

<sup>6</sup> Dipartimento di Diagnostica Per Immagini- AOU A. Meyer, Firenze

<sup>7</sup> Unit di Diagnosi Prenatale, AOU A. Meyer, Firenze

La sindrome di Shwachman-Diamond (SDS) è una condizione rara, trasmessa con modalità autosomica recessiva e causata da mutazioni nel gene SBDS. È caratterizzata da disfunzioni del pancreas esocrino, bassa statura, displasia metafisaria e alterazioni midollari; nel 30-50% dei casi anomalie della gabbia toracica. Spesso la diagnosi è tardiva per variabile espressività del fenotipo. Abbiamo valutato un neonato, nato alle 37<sup>15</sup> settimane, ricoverato in TIN per distress respiratorio. La coppia parentale era stata valutata in consulenza prenatale per duo test positivo (NT 4mm). Cariotipo, a-CGH e geni del pathway delle RASopatie erano risultati negativi. All'eco morfologica, i parametri biometrici (ossa lunghe e circonferenza addominale) erano <3 centile; sono state escluse mutazioni di FGFR3 e UPD del cromosoma 7. Alle 32 settimane è stata effettuata RM fetale: disproporzione tra l'estremo cefalico e il distretto toraco-addominale a sfavore di quest'ultimo, e aspetto disomogeneo del parenchima polmonare. Tutti questi reperti non orientavano verso una specifica condizione. Alla nascita, l'associazione di ipoplasia della gabbia toracica, insufficienza pancreatica e piastrinopenia marcata (13x10<sup>9</sup>/l) ponevano il sospetto clinico di SDS con un quadro molto più grave rispetto a quelli finora descritti. L'analisi molecolare del gene SBDS confermava la presenza di due varianti in eterozigosi composta, già descritte in letteratura. Nel nostro caso, la morfologia toracica particolarmente compromessa ha causato una grave ipoplasia polmonare con exitus a soli 2 mesi di vita. Per quanto resti fondamentale l'approccio multidisciplinare in epoca prenatale per distinguere patologie malformative complesse, in molti casi non è possibile avere una diagnosi clinica fino alla nascita. Il WES è sempre più considerato come un test di primo livello con la maggiore utilità diagnostica e clinica rispetto alle indagini standard e in questo caso, in epoca prenatale, avrebbe indirizzato verso la diagnosi con un certo convincimento, viste le varianti riscontrate. Infatti l'accumulo delle conoscenze sta contribuendo a migliorare il rendimento diagnostico del WES anche in epoca prenatale, ampliando la nostra conoscenza della presentazione prenatale di condizioni genetiche note.





C32

**Prestazioni e criticità dei test screening prenatali non invasivi basati su DNA circolante che indagano tutti gli sbilanciamenti citogeneticamente visibili lungo tutto il genoma: proiezioni derivate della citogenetica del citotrofoblasto**

F.R. Grati<sup>1</sup>, F. Maggi<sup>1</sup>, G. Simoni<sup>1</sup>, P. Benn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica, citogenetica e ricerca e sviluppo, TOMA, Advanced Biomedical Assays S.p.A., Busto Arsizio (Varese)

<sup>2</sup>Department of Genetics and Genome Sciences, University of Connecticut Health Center, Farmington, CT USA

Premessa: il DNA fetale analizzato dai test non-invasivi basati su DNA libero circolante  $\Delta$  derivato prevalentemente dal citotrofoblasto. Esso viene routinariamente analizzato durante la diagnosi prenatale citogenetica su villo coriale tramite analisi diretta o semi-diretta. Scopo: Revisionare il tipo e la frequenza delle anomalie cromosomiche presenti nel citotrofoblasto per predire le prestazioni dei test di screening genomewide (GW-NIPT). Materiali e metodi: Partendo dal database citogenetico del laboratorio TOMA, sono state identificate tutte le anomalie cromosomiche del citotrofoblasto associate a perdita fetale, ad un fenotipo patologico alla nascita o confermate al feto. È stato anche considerato il rischio di disomia uniparentale (UPD), di ritardo di crescita intrauterino (IUGR) e di complicazioni della gravidanza. Non sono stati considerati gli sbilanciamenti submicroscopici (microdelezioni/duplicazioni) e ulteriori fonti di risultati falsi positivi tipiche dei GW-NIPT. Risultati: I GW-NIPT si associano ad un tasso di risultato positivo dello 0.8% in aggiunta a quello per trisomie 13,18,21 e aneuploidie X e Y. Tale valore comprende trisomie autosomiche rare (RAT; 0.5%) e sbilanciamenti parziali (PI; 0.3%). Di questo 0.8%,  $\approx$ 0.1% si associa a perdita fetale dovuta a RAT (mosaico/omogenee);  $\approx$ 0.06% si associa ad anomalie fetali alla nascita dovute a PI a mosaico o omogenee nel feto o UPD. Il rimanente 0.64% si riferisce a mosaicismi confinati alla placenta e marcatori sovranumerari che si associano a rischio variabile di anomalie fetali o rischio residuo incerto in termini di anomalie fetali, IUGR o complicanze della gravidanza. Conclusioni: Il GW-NIPT può riconoscere anomalie cromosomiche clinicamente rilevanti in aggiunta a quelle identificate da NIPT standard. Tuttavia questa resa diagnostica aggiuntiva (0.16%) va bilanciata contro un più ampio numero di casi con outcome clinico incerto (0.64%), che rimangono tali anche dopo ecografia e diagnosi prenatale. Inoltre, tale valutazione si basa su prestazioni del GW-NIPT sovrastimate, con la stessa sensibilità della diagnosi prenatale citogenetica su citotrofoblasto e nessun falso positivo dovuto ad altre componenti tipiche del test. Pertanto l'utilità clinica del GW-NIPT rimane ancora da dimostrare.

C33

**Translucenza nucale  $\geq$  3.5 mm (99 centile) in una serie di 74 feti con cariotipo/CMA nella norma: quale counselling?**

B. Ficarella<sup>1</sup>, C. Votino<sup>2</sup>, A. Pansini<sup>1</sup>, A.L. Buonadonna<sup>1</sup>, M.F. Antonucci<sup>1</sup>, P. Zambetti<sup>1</sup>, P. Volpe<sup>2</sup>, M. Gentile<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UOC Lab. Genetica Medica, ASL Bari, Bari

<sup>2</sup>UOC Medicina Fetale, ASL Bari, Bari

Razionale

La translucenza nucale (NT)  $\Delta$  ampiamente validata, nell'ambito dello screening integrato del I trimestre, sia come marcatore di anomalie fetali, che come marcatore prognostico, essendo, in diverse evidenze della letteratura, riportato in associazione a problematiche fetoneonatali (malformazioni cardiache e non, sindromi su base genetica) ovvero ad esito infausto della gravidanza (aborto spontaneo, morte intrauterina). Nel presente lavoro si  $\Delta$  valutato l'outcome in una serie di feti caratterizzati da NT  $\geq$  3.5 mm e cariotipo/CMA nella norma.

Materiali e Metodi

Le pazienti gravide afferenti al nostro Centro per un esame di screening del I trimestre sono state seguite prospetticamente. In caso di NT  $\geq$  3.5 mm  $\Delta$  stata proposta la valutazione del cariotipo fetale e, in presenza di cariotipo nella norma, CMA. In assenza di aberrazioni citogenetiche e genomiche  $\Delta$  stato articolato un follow-up ecografico fino alla 32 settimana.

Risultati

Nel periodo 2012-2016 sono stati identificati e seguiti in follow-up 74 feti con NT  $\geq$  3.5 mm e cariotipo/CMA nella norma. In 3 casi (4%), si  $\Delta$  verificato un aborto spontaneo entro la 16 settimana ed in un caso un parto prematuro alla 25 settimana con morte neonatale. Il follow-up ecografico ha permesso di individuare 10 cardiopatie fetali (13.5%): 2 isomerismi con cardiopatie complesse, 1 TGA, 1 sindrome del cuore sinistro ipoplasico, 1 DORV, 1 raddoppiamento, 3 DIV ed 1 ARSA. I follow-up ecografici successivi hanno evidenziato un caso di ernia diaframmatica, un caso di malformazione di Dandy Walker associata ad ipoplasia degli arti, un caso di pielectasia ed un caso di anomalia discordante in gemelli monooriali. Nel complesso,  $\Delta$  stato riscontrato una anomalia e/o un outcome avverso nel 27% dei casi.

Conclusioni

La presenza di NT  $\geq$  3.5 mm in una popolazione di feti identificati al I trimestre con cariotipo e CMA nella norma, necessita di un follow-up ecografico attento e dettagliato in quanto tale condizione rappresenta un fattore di rischio per cardiopatie congenite, patologie malformative ed outcome avverso. Tale follow-up va poi esteso almeno sino all'età scolare, per valutare un eventuale aumento del rischio di anomalie, specie nell'area dello sviluppo motorio, neurolinguistico e comportamentale.

C34

**Primo caso di microdelezione 20q11.21q12 in mosaico: conferma e ulteriore definizione della sindrome da microdelezione 20q11.2**

S. Loddo<sup>1</sup>, V. Alesi<sup>1</sup>, V. Orlando<sup>1</sup>, C. Calacci<sup>1</sup>, S. Genovese<sup>1</sup>, F. Restaldi<sup>1</sup>, D. Pompili<sup>1</sup>, M.C. Digilio<sup>1</sup>, B. Dallapiccola<sup>1</sup>, A. Novelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetics and Rare Diseases Research Division, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy

Le delezioni interstiziali del braccio lungo del cromosoma 20 sono molto rare. Al momento sono noti solo 11 pazienti con del(20q11.2), che si associano a quadri clinici variabili in rapporto alle dimensioni della regione deleta, caratterizzati da ritardo psicomotorio e della crescita, dismorfismi e brachi-clinodattilia. Riportiamo il primo caso di del(20q11.2q12) in mosaico. La paziente di 5 anni era affetta da lieve ritardo psicomotorio, difficoltà nell'alimentazione, ritardo dello sviluppo prenatale e della crescita postnatale, dismorfismi craniofacciali, brachimesofalangia e clinodattilia del V dito delle mani. Nel primo anno di vita ha sviluppato otiti ricorrenti e iteate nella perforazione del timpano. L'analisi mediante SNP-array ha evidenziato una delezione in mosaico nel 20% delle cellule, estesa per 7.6 Mb. La regione deleta comprendente 72 geni OMIM. La minima regione di sovrapposizione (1.6 Mb) nei pazienti con del(20q11.2)  $\Delta$  inclusa nella delezione presente nella probanda. Oltre ai tre geni OMIM (GDF5, EPB41L1 e SAMHD1) in precedente candidati al fenotipo ricorrente nei pazienti, proponiamo il ruolo patogenetico di altri geni fiancheggiati la regione critica, in particolare GHRH (Growth Hormone-Releasing Factor), implicato nella produzione dell'ormone della crescita, che potrebbe essere coinvolto nel ritardo della crescita e forse nei problemi uditivi riscontrati in alcuni di questi pazienti. Questo caso conferma l'utilità dell'uso delle piattaforme di CMA (Chromosomal Microarray Analysis) per il riconoscimento dei mosaicismi diluiti e supporta l'esistenza di una sindrome da microdelezione 20q11.2.



C35

**Haploinsufficiency models of CHD8 in neuronal cells display alterations in chromatin landscape and regulatory consequences in Wnt Signaling**

M. Biagioli<sup>1</sup>, E. Kerschbamer<sup>1</sup>, T. Tripathi<sup>1</sup>, S. Erdin<sup>2,3</sup>, F. Di Leva<sup>1</sup>, J.F. Gusella<sup>2,3</sup>, S. Piazza<sup>1</sup>, M.E. Talkowski<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Centre for Integrative Biology, University of Trento, Trento, Italy

<sup>2</sup>Center for Genomic Medicine, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, United States

<sup>3</sup>Department of Neurology, Harvard Medical School, Boston, MA, United States

Autism Spectrum Disorders (ASD) is a collection of heterogeneous neurodevelopmental disorders defined by social impairment and repetitive behaviors with significant genotypic and phenotypic complexity. Mutations in several hundred loci have been associated with the disease, but the chromodomain helicase DNA binding protein 8 (CHD8) represents a recurrent and independently validated ASD-risk gene. All ASD mutations in CHD8 gene have been reported to be disruptive, leading to haploinsufficiency. In physiological conditions, CHD8 binds to the DNA at promoter and enhancers regions where it regulates transcriptional initiation. Here we investigate how chromatin landscape reacts to CHD8 suppression by analyzing different histone modifications through Chromatin Immunoprecipitation and Sequencing (ChIP-seq) in iPS-derived neural progenitors after CHD8 knock-down. We interrogated transcriptionally active and repressed regions as well as active and poised enhancers to explore the potential impact of loss-of-function mutations in CHD8 on regulatory networks and pathways. CHD8 suppression alters the overall chromatin landscape and  $\sim$ 4000 poised enhancers (enriched for H3K4me1) targeting genes implicated in cancer and Wnt signaling pathways. CHD8 suppression also affected  $\sim$ 5000 actively transcribed gene bodies (enriched for H3K36me3) that were again associated with Wnt signaling and RNA pol II transcription activity, as well as  $\sim$ 2000 silent promoters (-5Kb/+2Kb of the transcription start site; enriched for H3K27me3) involved in biological processes such as axon guidance and synaptic transmission. The majority of loci that undergo chromatin changes are unique to one specific histone mark, while other genomic regions (enriched for H3K4me2, H3K4me3 and H3K27ac) seem to be less sensitive to CHD8 suppression. Our results point toward both broad regulatory consequence of CHD8 suppression as well as association with specific biological pathways of relevance to ASD pathogenesis.







C36  
**KCNQ1 molecular defects shared in Beckwith-Wiedemann and Long QT1 syndromes**

F. Cerrato<sup>1</sup>, A. Sparago<sup>1</sup>, F.M. Valente<sup>1</sup>, A. Freschi<sup>1</sup>, J. Bliëk<sup>2</sup>, K. Hill-Harfe<sup>3</sup>, C. Williams<sup>3</sup>, G.B. Ferrero<sup>4</sup>, A. Riccio<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e Farmaceutiche, Università della Campania Luigi Vanvitelli, Caserta, IT

<sup>2</sup>Dep. of Clinical Genetics/DNA diagnostics, Amsterdam, The Netherlands

<sup>3</sup>Dep of Pediatrics, University of Florida College of Medicine, Gainesville, FL, USA

<sup>4</sup>Dip. di Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche, Università degli Studi di Torino, IT

<sup>5</sup>Istituto di Genetica e Biofisica "Adriano Buzzati Traverso" CNR, Napoli, IT

Variants in KCNQ1 (potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily, member 1) gene are found associated with the Long QT syndrome 1 (LQTS1), a congenital condition of the heart characterized by perturbed QT intervals polymorphic ventricular arrhythmias (torsade de pointes). These cardiac arrhythmias may result in recurrent syncope, seizure, or sudden death and ventricular arrhythmia, that may result in recurrent syncope, seizure, or sudden death. KCNQ1 falls within the human chromosome 11p15.5-p15.4, a region subject to imprinting, also involved in another genetic condition, the overgrowth related Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS; OMIM 130650). BWS is caused by the altered expression of growth controlling genes, some of which are regulated by a differentially methylated region, the Imprinting Centre 2 (IC2). Located in intron 10 of KCNQ1, IC2 corresponds to the promoter of KCNQ1OT1, an antisense non coding RNA, expressed on the paternal allele and silencing the flanking growth inhibitor gene, CDKN1C. On the maternal allele, DNA methylation of IC2 avoids KCNQ1OT1 expression allowing activation of the maternal CDKN1C. Loss of methylation (LOM) at IC2 is responsible for about 50% of BWS cases. To investigate the risk of cardiac arrhythmias, we screened BWS patients for the presence of prolonged QT interval. We identified three patients with such clinical phenotypes and maternal KCNQ1 mutations. Intriguingly, all three cases were associated with complete IC2 LOM, suggesting defects in imprinting establishment. The first patient carries a previously described maternal inverted 160kb duplication including a non methylated copy of IC2. The second case is associated with a ~100 kb deletion including the KCNQ1 promoter. Finally, the third patient carries an aberrant splice variant of the donor site of KCNQ1 first intron. In summary, our results indicate that rare molecular defects within KCNQ1 are responsible for both BWS and LQTS1 in the same patients. In the three cases we describe, the genetic mutations are maternally inherited and affect KCNQ1 transcription upstream of IC2, likely interfering with establishment of IC2 methylation in oocytes. This results in BWS with IC2 LOM, and LQTS1 by KCNQ1 haploinsufficiency or dominant negative effect. In consideration of the demonstrated association between BWS and LQTS1 and the relative risk of sudden death, we propose that cardiac function should be carefully evaluated in all cases of BWS with IC2 LOM for a correct diagnosis, follow up and genetic counselling.

C37  
**Molecular diagnosis and genetic bases of multilocus methylation defects in Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes**

L. Fontana<sup>1</sup>, C. Farò<sup>2</sup>, A. Seresini<sup>3</sup>, F. Cortini<sup>3</sup>, S. Sirchia<sup>4</sup>, V. Pecile<sup>10</sup>, A. Selicorni<sup>5</sup>, S. Maitz<sup>6</sup>, A. Cereda<sup>7</sup>, D. Milani<sup>8</sup>, F. Lalatta<sup>9</sup>, F. Bedeschi<sup>9</sup>, M. Miozzo<sup>1,2</sup>, S. Tabano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

<sup>2</sup>Division of Pathology, Fondazione IRCCS Ca Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

<sup>3</sup>Molecular Genetics Laboratory, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

<sup>4</sup>Medical Genetics, Department of Health Sciences, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

<sup>5</sup>Department of Genetics, Institute for Maternal and Child Health IRCCS Burlo Garofolo, Trieste, Italy

<sup>6</sup>UOC Pediatria ASST Lariana, Como, Italy

<sup>7</sup>Clinical Pediatric Genetics Unit, Pediatric Clinics, MBBM Foundation, San Gerardo Hospital, Monza, Italy, Milan, Italy

<sup>8</sup>Medical Genetics Unit, Papa Giovanni XXIII Hospital, Bergamo, Italy

<sup>9</sup>Pediatric Highly Intensive Care Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

<sup>10</sup>Medical Genetics Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

Introduction. Recent evidences highlighted that several patients with imprinting disorders (IDs) exhibit multilocus methylation imprinting disturbances (MLIDs). MLID is characterized by epigenetic alterations not only at the disease-specific loci but extended to other chromosomal regions. MLID may account for the variable presentation and the phenotypic overlap between IDs, that make clinical diagnosis often difficult and highlight the need for a reliable method for methylation testing at multiple imprinted loci. Causative mutations in genes involved in methylation establishment have been identified only in few cases and the majority of MLID cases the causative defect remains unknown. The developmental stage at which such trans-acting factors act in modulating methylation is also unclear. Materials and Methods. We developed a quantitative methylation test by MassARRAY to detect alterations at 12 imprinted regions in 21 pre- and post-natal Beckwith-Wiedemann (BWS) and 7 post-natal Silver-Russell patients. Targeted NGS analysis was performed on MLID positive patients, to identify possible causative mutations in a panel of 25 genes involved in methylation establishment and maintenance. Results. About 50% of BWS and 29% of SRS patients showed MLID, with loss of methylation confined to maternally imprinted loci. NGS allowed the detection of two novel mutations in NLRP2 and ZFP42 genes in two MLID patients. In our cohort, MLID appears higher frequent in females, with a male-to-female ratio of 1:4. No significant differences in clinical features between classical (monolocus) and MLID patients were observed. However, a number of clinical features appeared more frequent in BWS MLID patients, i.e. macroglossia, outer ears anomalies and facial nevus flammeus. Conclusions. The MassARRAY platform allows a higher frequent detection of MLID in BWS/SRS patients compared to literature, thanks to the analysis of several imprinted genes. The detection of MLID confined to maternally imprinted loci, suggests alterations in trans-acting factors involved in methylation establishment/maintenance in the oocyte, as confirmed by mutations found in MLID patients. In silico analysis and bioinformatics modelling confirm the pathogenic effects of these mutations.

Supported by Ministero della Salute Regione Lombardia, RF-2011-02347106.



C38  
**Phenotypic heterogeneity in familial Amyotrophic Lateral Sclerosis: the contribution of epigenetic modifications**

F. Coppede<sup>1</sup>, A. Stoccoro<sup>1</sup>, L. Mosca<sup>2</sup>, R. Gallo<sup>1</sup>, C. Tarlarini<sup>2</sup>, C. Lunetta<sup>3</sup>, A. Marocchi<sup>2</sup>, L. Migliore<sup>1</sup>, S. Penco<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Ricerca Traslationale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa, Pisa

<sup>2</sup>Unit di Genetica Medica, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano

<sup>3</sup>Neuromuscular Omnicentre, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano

<sup>4</sup>This work is dedicated to the memory of Dr. Silvana Penco, who passed away on April 13th, 2017. She largely inspired this research. We are particularly grateful to her.

Introduction: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) results from the degeneration of motor neurons in the motor cortex, brainstem and spinal cord. Increasing evidence suggests that epigenetic modifications contribute to motor neuron death and disease progression, as observed in blood and spinal cord DNA of ALS patients, as well as in monozygotic twins discordant for the disease. Superoxide dismutase 1 (SOD1) has been the first identified causative ALS gene, with over 180 different mutations described so far in ALS families, including not completely penetrant ones. This last group includes certain SOD1 mutations that may present different clinical courses, even within the same family members, suggesting that additional genetic, environmental or epigenetic factors contribute to the clinical phenotype. Aim of the study: We collected 35 DNA samples from five ALS families with not fully penetrant SOD1 mutations (p.Asn65Ser, p.Gly72Ser, p.Gly93Asp, and p.Gly130\_Glu133del) in order to evaluate whether or not epigenetic modifications could partially contribute to the observed phenotypic heterogeneity among carriers of those mutations. Materials and Methods: Global DNA methylation (5-methylcytosine) and hydroxymethylation levels (5-hydroxymethylcytosine) levels were determined in blood DNA samples. Mutation screening and methylation analysis of the four major ALS genes (SOD1, FUS, TARDBP and C9orf72) was performed in all family members. Mitochondrial DNA methylation was assessed as methylation levels of the mitochondrial regulatory (D-loop) region. Results: Global DNA methylation levels were significantly higher in blood DNA of ALS patients than in asymptomatic/paucisymptomatic carriers or in non-carriers of SOD1 mutations. A positive correlation between global DNA methylation levels and disease duration (months) was observed. No additional mutation in SOD1, FUS, TARDBP and C9orf72 was detected in the studied families, and their promoters were hypomethylated in all subjects. However, carriers of SOD1 mutations showed a significantly lower methylation of the mitochondrial D-loop region than non-carrier family members. Conclusions: The present study suggests that global changes in both nuclear and mitochondrial DNA methylation might contribute to the ALS phenotype in carriers of not fully penetrant SOD1 mutations.





C39

**Alterazione di domini cromatinici topologicamente associati ed effetto posizione nella sindrome da microdelezione NF1**

L. Ferrari<sup>1</sup>, G. Scuvera<sup>2</sup>, F. Rusconi<sup>1</sup>, A. Tucci<sup>2</sup>, F. Menni<sup>2</sup>, M. Volontè, E. Martinoli<sup>1</sup>, E. Battaglioli<sup>1</sup>, D. Milani<sup>2</sup>, P. Riva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milano

<sup>2</sup>Dipartimento Donna-Bambino-Neonato, UOSD Pediatria ad Alta Intensità di Cura, Fondazione IRCCS Ca Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

La sindrome da microdelezione NF1 è una forma rara e grave di Neurofibromatosi di tipo 1 causata dalla delezione in eterozigosi del gene NF1 e di un numero variabile di geni ad esso contigui. La correlazione genotipo-fenotipo è complessa poiché i tratti fenotipici sono caratterizzati da espressività variabile ed è quindi necessario identificare nuovi marcatori in grado di migliorare la consulenza e la prognosi dei pazienti. Nella sindrome da microdelezione NF1, come nelle altre sindromi da geni contigui, la lesione genetica comporta la delezione non solo di regioni codificanti, ma anche di regioni regolatorie. Tale evento può causare un effetto posizione, fino ad oggi mai considerato, in grado di alterare la regolazione dell'espressione dei geni fiancheggiati, che potrebbe quindi contribuire al fenotipo. A questo scopo abbiamo indagato l'organizzazione topologica del DNA nella regione 17q11.2 mediante analisi bioinformatica e abbiamo osservato che la microdelezione NF1 di tipo 1 causa la perdita di due interi domini cromatinici topologicamente associati (TD) implicati in meccanismi epigenetici, mentre le delezioni di tipo 2 e 3 determinano l'interruzione di due TD adiacenti. Abbiamo recentemente caratterizzato una microdelezione NF1 atipica in un paziente con fenotipo complesso. La delezione comporta la generazione del gene chimerico RNF135-SUZ12 che nel sangue periferico è risultato iper-espresso rispetto all'allele selvatico rispettivamente di RNF135 e SUZ12. L'analisi bioinformatica ha permesso di osservare che la delezione comporta l'interruzione di due TD adiacenti e il gene ADAP2, mappato 13 kb prossimalmente a RNF135, è risultato iper-espresso nel paziente rispetto ai controlli analizzati, rivelando l'effetto posizione della delezione. Stiamo indagando i livelli di espressione degli altri geni fiancheggiati la delezione e localizzati all'interno dei TD coinvolti. L'identificazione di un effetto posizione nel caso in analisi e l'estensione dello studio a una casistica più ampia, che includa anche microdelezioni NF1 tipiche, permetterebbe di chiarire la rilevanza di questo meccanismo nella sindrome da microdelezione NF1, favorendo inoltre la messa a punto di nuovi approcci diagnostici per il miglioramento del trattamento e della prognosi dei pazienti.

C40

**Kabuki syndrome: a pathological example of the interplay between epigenetics and metabolism**

I. Adipietro<sup>1</sup>, C. Pacelli<sup>2</sup>, N. Malerba<sup>1,3</sup>, D. Cocciaferro, G.M. Squeo<sup>1</sup>, B. Augello<sup>1</sup>, C. Piccoli<sup>2</sup>, L. Micale<sup>1</sup>, N. Capitanio<sup>2</sup>, G. Merla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical Genetics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG), Italy

<sup>2</sup>Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Foggia, Foggia, Italy

<sup>3</sup>Ph.D program in Experimental and Regenerative Medicine, University of Foggia, Italy

Kabuki syndrome is one of the most well characterized pediatric chromatinopathies, mainly caused by mutations in the KMT2D and KDM6A genes and hallmarked by multiple congenital anomalies and intellectual disabilities. KMT2D encodes a methyltransferase responsible for histone 3 lysine 4 (H3K4) dimethylation and trimethylation, which is an epigenetic mark for euchromatin and active transcription. KDM6A, an important component of the KMT2D-containing complex (called ASCOM) is a H3K27 demethylase responsible for removal of repressive polycomb-derived methylation marks. Considering the emerging role played by the bioenergetic metabolism in development, we tested the hypothesis that KMT2D mutations could affect the mitochondrial metabolic profile. Using a metabolic fluxes analyser (SeaHorse technology) we showed a significant reduction of the mitochondrial oxygen consumption rate (OCR) in intact KMT2D-KO MEFs as compared with control cells, accompanied with a significant increase in production of reactive oxygen species. Conversely, the glycolytic flux did not show appreciable differences. Measurements of the specific activities of the mitochondrial respiratory chain complexes resulted in a significant inhibition of CxI (NADH dehydrogenase) and CxIV (cytochrome c oxidase). This result was further supported by the observed decrease of the protein content of both complexes. Next, we assessed the specific contributions of glucose, fatty acids and glutamine to the respiratory phenotype of KMT2D-KO MEFs using a combination of specific inhibitors of metabolic pathways. The results obtained unveiled impaired oxidation of glucose and larger reliance on oxidation of fatty acids in KMT2D-KO MEFs as compared with control cells. Further investigations are ongoing to define the mechanism by which KMT2D/MLL2 affects the mitochondria metabolism. All together our findings clearly indicate a link between the epigenetic profile of the cell and its metabolic phenotype that altered in KS may contribute to the development of the disease. The possibility to rewire the metabolism paves the way to new therapeutic approaches.

C41

**Evidences of constitutional epimutation in Retinoblastoma**

E. Gelli<sup>1</sup>, S. Somma<sup>1</sup>, A.M. Pinto<sup>1,2</sup>, V. Imperatore<sup>1</sup>, T. Hadjistilianou<sup>3</sup>, S. De Francesco<sup>3</sup>, D. Galimberti<sup>1</sup>, M. Bruttini<sup>1,2</sup>, F. Mari<sup>1,2</sup>, A. Renieri<sup>1,2</sup>, F. Ariani<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica, Dip. di Biotecnologie Mediche, Università di Siena, Siena, Italia

<sup>2</sup>Genetica Medica, A.O.U.S. Siena, Italia

<sup>3</sup>Dip. di Oftalmologia, Dip. di Scienze Neurologiche e Sensoriali, A.O.U.S. Osp. Santa Maria alle Scotte, Siena, Italia

<sup>4</sup>U.O. Pediatria, Dip. Materno infantile, A.O.U.S. Osp. Santa Maria alle Scotte, Siena, Italia

Retinoblastoma, which represents the most common eye cancer in children, is caused by biallelic inactivation of RB1 tumor suppressor gene. Promoter hypermethylation represents a quite common somatic event inactivating one allele but evidences of constitutional epimutations are currently lacking. In the present study, we screened for the presence of RB1 aberrant promoter methylation in a series of 50 mutation-negative RB patients by Methylation Specific Multiplex Ligation-dependent Probes Amplification (MS-MLPA). The assay, performed on DNA extracted from blood leukocytes, demonstrated aberrant methylation of one CpG island (CpG106) in a 19-month-old child. The same assay in parents' DNA did not reveal any epigenetic abnormality. Targeted analysis of the promoter region by high-depth Next Generation Sequencing after DNA sodium bisulfite conversion allowed to confirm results and quantify the amount of CpG methylation. The same analysis across multiple tissues demonstrated the soma-wide distribution of the aberration. To investigate the effects on gene expression, we employed a Real-Time qPCR Taqman assay that revealed transcriptional silencing, comparable with the decrease observed in an RB1 deleted patient. In conclusion, we have documented that promoter methylation can act as the first hit in Knudson's model inactivating one RB1 allele as already demonstrated for MLH1 and MSH2 genes in Lynch syndrome. This epimutation mimics the effect of an inactivating mutation and, in doing so, phenocopies RB onset. In genetic counseling, these findings raise complex questions regarding inheritance pattern and associated penetrance/expressivity. Concerning therapeutic options, given that epigenetic changes can be reverted by multiple drugs, these findings have important implications for the development of new strategies.

C42

**Exploring the puzzling complexity of the dose-dependent activity of Lysine-Specific Demethylase 5C encoded by an X-linked gene escaping X-inactivation**

A. Padula<sup>1</sup>, A. Izzo<sup>2</sup>, R. Genesio<sup>2</sup>, L. Poeta<sup>1</sup>, M.C. Tuccillo<sup>1</sup>, L. Nitsch<sup>2</sup>, A. Conti<sup>2</sup>, M.G. Miano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Biophysics Adriano Buzzati Traverso CNR, Naples

<sup>2</sup>Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples Federico II, Naples

XY male and XX female mammals equalize X-linked gene expression through the transcriptional inactivation of an X-chromosome in females. Although most genes are silent on the inactive-X, some escape silencing and are expressed at higher levels in females versus males. Recently it has been found that the escaped KDM5C, encoding H3K4me2/3 demethylase, induces Xist and silences X-linked genes. Mutations in KDM5C cause X-linked intellectual disability (XLID), epilepsy, aggression and autism. In mouse, KDM5C controls brain development, neuronal differentiation and dendritic outgrowth. Here, we describe the functional relationship between the expression level of KDM5C, its substrate and effector genes in a complementary series of KDM5C dose-sensitive cellular models. First, we explored the impact of KDM5C downregulation and overexpression on H3K4me3 profiling, by RNA interference and transfection of WT cDNA, respectively. Therefore, in human cell lines we observed that variations in the expression level of KDM5C inversely correlate with H3K4me3 at X-linked loci. Next, we examined its activity in lymphoblastoid B-cell lines derived from XLID male patients mutated in KDM5C regulators confirming that the KDM5C depletion corresponds to an increase in H3K4me3 signal. Second, we studied the expression level of KDM5C in fibroblasts carrying additional copies of the X chromosome. Specifically, we examined fibroblast-derived cell lines obtained from females with trisomy X (47,XXX) and tetrasomy X (48,XXXX). Interestingly, we observed a strong association between the additional X chromosomes and the extra-dosage of KDM5C, suggesting that the supernumerary X copies are not fully inactivated. Indeed KDM5C, that normally escapes, is present in triple or quadruple rather than double dose. Since we cannot exclude that the KDM5C overexpression may alter brain functioning, even if slightly, a clinical evaluation of the aneuploid females will be discussed. Finally, to better understand the functional impact of an extra-dosage of KDM5C, we are generating a Cre/loxP KDM5C-ROSA26-targeted conditional mouse. This explorative study confirms the importance of dose-dependent activity of KDM5C as well as unveiled novel regulatory mechanisms involved in key aspects of X-linked disorders.







C43

**Mutazioni del gene GSX2 causano anomalie congenite della giunzione diencefalo-mesencefalica.**

S. Tardivo<sup>1</sup>, R. De Mori<sup>2</sup>, D. Anello<sup>1</sup>, B. Illi<sup>3</sup>, A. Micalizzi<sup>2,1</sup>, M. Ginevrino<sup>4,1</sup>, A. Casella<sup>1</sup>, J.G. Gleeson<sup>5</sup>, E.M. Valente<sup>4,1</sup>

<sup>1</sup>Unit di Neurogenetica, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma, Italia

<sup>2</sup>Dip. di Scienze Biologiche e Ambientali, Università di Messina, Messina, Italia

<sup>3</sup>Ist. di Biologia e Patologia Molecolari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma, Italia

<sup>4</sup>Dip. di Medicina Molecolare, Università di Pavia, Pavia, Italia

<sup>5</sup>Lab. per le Patologie Cerebrali Pediatriche, Rady Children's Institute for Genomic Medicine, Università della California San Diego, Howard Hughes Medical Institute, La Jolla (CA), Stati Uniti

GSX2 (Genomic Screened homeobox 2) è un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia dei geni homeobox, regolatori chiave dei processi di sviluppo embrionali, caratterizzati da un dominio di legame al DNA noto come homeobox o homeodomain (HD).

In particolare, GSX2 viene espresso nei progenitori cerebrali embrionali a livello telencefalico, ed è necessario per la formazione e il mantenimento dei neuroni della proiezione striatale e degli interneuroni del bulbo olfattorio. Attraverso analisi Whole Exome Sequencing (WES) sono state identificate, in due famiglie non consanguinee, due nuove varianti in omozigosi di GSX2, c.26C>A (p.Ser9\*) e c.752A>G (p.Gln251Arg). I soggetti portatori di queste varianti presentano una malformazione congenita peculiare della giunzione diencefalo-mesencefalica, caratterizzata da fusione ipotalamo-mesencefalica, cleft ventrale-mesencefalico a farfalla, agenesia del putamen e del globo pallido e ipoplasia/agenesia dei bulbi olfattori, un fenotipo assolutamente sovrapponibile a quello presentato dal topo knock-out per GSX2.

La variante missenso p.Gln251Arg coinvolge un residuo amminoacidico altamente conservato del dominio HD e risulta essere dannosa in tutti i siti di predizione in silico investigati. Analisi di dinamica molecolare sul modello bioinformatico della proteina ne hanno evidenziato la perdita di stabilità strutturale nonché una maggiore flessibilità a livello del dominio HD, a causa dell'instaurarsi di un'interazione più debole tra proteina e DNA. Analisi funzionali sui fibroblasti del paziente hanno mostrato livelli di espressione della proteina mutata più bassi rispetto a quelli della proteina selvatica, in seguito ad una ridotta espressione del gene stesso, verosimilmente legata ad una alterata auto-regolazione trascrizionale.

Entrambe le mutazioni causano inoltre importanti alterazioni nei livelli di espressione di altri geni regolati da GSX2 (tra cui ASCL1 e PAX6).

Questi dati confermano la patogenicità delle varianti identificate nei due pazienti, identificando, così, il primo gene noto responsabile di malformazione della giunzione diencefalo-mesencefalica.

C44

**Neurodegenerative mechanisms in Frontotemporal Dementia (FTD): A CRISPR-Cas9 neuronal cell model of PGRN deficiency**

S. Napolitano<sup>1</sup>, H. Kukreja<sup>2</sup>, A. Rendina<sup>1</sup>, A. Riccio<sup>2</sup>, E. Vitale<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Protein Biochemistry, CNR, Naples, Italy

<sup>2</sup>Institute of Genetic and Biophysics, CNR, Naples, Italy.

**ABSTRACT**

Frontotemporal dementia (FTD) is a neurodegenerative disorder characterized by clinical and neuropathological heterogeneity and high genetic complexity. Granulin gene (GRN) is an important predisposing factor for FTD and the proposed disease mechanism is deficiency of the protein. Progranulin (PGRN) is a secreted glycoprotein with several roles and expressed across a wide range of tissues including the brain, however, the neurobiology of this secreted glycoprotein remains unclear. It is known that FTD patients with PGRN deficiency show ubiquitin-positive inclusions in the brain with accumulation of TDP-43, altered protein conformations or aggregates trigger neuronal dysfunction and can spread to neighboring neurons. We performed a genetic study on 256 FTD patients and identified a rare exon six GRN deletion g10325\_10331delCTGCTGT (relative to nt 1 in NG\_007886.1) alias Cys157LysfsX97, in three in three autosomal dominant Southern Italian pedigrees in which FTD segregates with autosomal dominant inheritance patterns. Transcriptional and translational analysis showed that FTD patients carrying this GRN mutation present deficiency of the protein. We identified and analyzed the effect of GRN mutation at transcriptional and translational levels showing that this deletion leads to haploinsufficiency of the protein. Our findings provide further support for a previously proposed role for the GRN gene in the genetic etiology of FTD and its phenotypic variability. To provide an efficient system to investigate the effects of PGRN depletion on neuronal cells, we generated a stable clone with PGRN deficiency by CRISPR-Cas9. To begin testing the hypothesis that patients with PGRN deficiency have an impaired autophagic-lysosomal pathway, we performed mRNA expression analysis of autophagy-related genes. Preliminary results demonstrated decreased expression of autophagy-related genes Beclin2 and LC3 in GRN knock-out cells compared to wild-type cells. We can speculate a role of PGRN in the regulation of autophagic-lysosomal pathway, we are now carrying further analysis to confirm this hypothesis and to identify the connection with FTD onset.

C45

**SPG20 loss-of-function alters neuronal morphology and mitochondrial functionality in hereditary spastic paraplegia**

C. Diquigiovanni<sup>1</sup>, C. Bergamini<sup>2</sup>, R. Diaz<sup>4</sup>, F. Buscherini<sup>1</sup>, A. Tranchina<sup>1</sup>, A. Wischmeijer<sup>3</sup>, R. Fato<sup>2</sup>, J.M. Lucocq<sup>4</sup>, S. Paracchini<sup>4</sup>, M. Seri<sup>1</sup>, E. Bonora<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical and Surgical Sciences, DIMEC, St. Orsola-Malpighi Hospital, University of Bologna, Italy

<sup>2</sup>Department of Pharmacy and Biotechnology, FABIT, University of Bologna, Italy

<sup>3</sup>School of Medicine, University of St Andrews, St Andrews, KY16 9TF UK

<sup>4</sup>Clinical Genetics Service, Department of Pediatrics, Regional Hospital of South Tyrol, Bolzano, Italy

Object: Whole exome sequencing in two affected sibs which presented short stature, spasticity of the lower extremities and psychomotor retardation identified a novel homozygous insertion c.892dupA in SPG20 gene. The variant generated a frameshift with a premature stop codon at amino acid 314 and was inherited from the consanguineous heterozygous parents. Loss-of-function mutations in SPG20 have been reported in Troyer's syndrome<sup>1</sup>, a recessive form of hereditary spastic paraplegia that targets motor neurons, resulting in muscle weakness, distal atrophy, short stature, and cognitive defects. In recent years overwhelming evidence of mitochondrial damage and dysfunction as cause of neurodegenerative disorders is emerging.

Aim and methods: To investigate the functional role of the novel SPG20 variant we knocked-in the mutation c.892dupA in neuroblastoma-derived SH-SY5Y cell line using the CRISPR/Cas9 technology. Cell lines were assayed for neuronal morphology, reactive oxygen species (ROS) production and mitochondrial functionality.

Results: SPG20 protein in mutant cell lines was absent, resulting in an altered neuronal survival and growth. Compared to controls, mutant cells exhibited significantly enhanced neurite outgrowth/length and increased NANOG expression, in line with other studies showing that this gene is re-expressed during neuronal specification<sup>2</sup>. We found increased ROS production and concomitant decreased expression of detoxifying enzymes in SPG20 mutant cells. Moreover, mutant cells showed a reduced mitochondrial membrane potential and decreased respiration rate in the presence of the uncoupler FCCP. Moreover, the absence of SPG20 led to OXPHOS complex I impairment and altered mitochondrial network.

Conclusions: Neurons are susceptible to oxidative stress and our data suggested that SPG20-derived complex I deficiency could directly contribute to neurodegeneration by ROS production, decreased respiratory chain activity (leading to energetic failure) and extended axonal morphology prone to injury. These defects may prove relevant in disease progression observed in patients with Troyer's syndrome.

Supported by Telethon grant GGP15171.

<sup>1</sup>Cross H. E. et al. (1967) Arch. Neurol 16:473-485

<sup>2</sup>Alvarez A et al. (2010) NM 1, 1-13

C46

**CRISPR/CAS9 as an innovative therapeutic approach for FOXP1-related Rett syndrome**

I. Meloni<sup>1</sup>, S. Daga<sup>1</sup>, E. Landucci<sup>1</sup>, F.T. Papa<sup>1</sup>, F. Donati<sup>3</sup>, C. Lo Rizzo<sup>2</sup>, D. Lopercolo<sup>1,2</sup>, L. Pancrazi<sup>4</sup>, M. Doria<sup>5</sup>, A. Auricchio<sup>5</sup>, M. Costa<sup>4</sup>, S. Conticello<sup>3</sup>, A. Renieri<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Medical Genetics, University of Siena, Siena, Italy

<sup>2</sup>Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italy

<sup>3</sup>Molecular Mechanisms of Oncogenesis, ITT Core Research Laboratory (CRL), Firenze, Italy

<sup>4</sup>Institute of Neuroscience, Laboratory of Neurophysiology, Italian National Research Council (CNR), Pisa, Italy

<sup>5</sup>TIGEM (Telethon Institute of Genetics and Medicine), Napoli, Italy

Mutations in FOXP1 lead to congenital Rett syndrome (OMIM#613454), the most severe form in the spectrum of Rett disorders, which is characterized by features of classic Rett syndrome but early developmental delay. No cure or disease-modifying therapy is available. To identify innovative therapeutic approaches for this devastating disorder, we decided to test the safety and efficacy of CRISPR/Cas9 gene editing technology to correct FOXP1 mutations. As an in vitro model we selected neurons differentiated from induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) derived from patients fibroblasts, a disease-relevant patient-specific cellular model that has successfully been developed in our laboratory. For the delivery of the correction vectors we sought a strategy that could be transferred to patients treatment for future clinical trials with minimal modifications. Hence, we developed an AAV (Adeno-Associated Viruses) based system, that is currently under patent application. The vectors for contemporarily delivery of the components of the CRISPR/Cas9 system into the iPSC cells were already generated. The first vector harbors the Cas9 gene with two flanking target regions for Cas9 auto-cleaving to avoid its prolonged expression, preventing accumulation of Cas9 in the cell and thus increasing the safety of the system. The second vector brings the Donor DNA with the wild type sequence that will replace the mutated one; this vector also bears a reporter system to visualize and select the cells in which Cas9 has been active. We have designed vectors for the correction of three FOXP1 mutations, c.640Gdup - p.Glu154Gly fs\*300; c.765G>A - p.W255\* and c.688C>T - p.Arg230Cys. With regards to the latter, development of a mouse model is ongoing to test the correction system in parallel in patient cells and in an in vivo model. This mutation was selected since the very young age of the patient makes such approach especially relevant for a subsequent clinical trial.





C47  
**Patient specific cell lines as model for Smith-Magenis Syndrome**

J. Rosati<sup>1</sup>, E.M. Turco<sup>1,3</sup>, F. Altieri<sup>1</sup>, E. Vinci<sup>1,3</sup>, A. De Jaco<sup>3</sup>, L. Trobiani<sup>3</sup>, B. Torres<sup>2</sup>, A.M. Nardone<sup>4</sup>, G. Mazzoccoli<sup>6</sup>, L. Bernardini<sup>2</sup>, M. Della Monica<sup>5</sup>, A.M. Tata<sup>3</sup>, A.L. Vescovi<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Cellular Reprogramming Unit, Mendel Institute- IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Italy

<sup>2</sup>Cytogenetics Unit, Mendel Institute-IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Italy

<sup>3</sup>Department of Biology and Biotechnologies 'Charles Darwin', Sapienza University of Rome, Italy

<sup>4</sup>Medical Genetics Unit, Tor Vergata Hospital Foundation, Rome, Italy

<sup>5</sup>Medical Genetics Unit, Ospedale Pediatrico Meyer, Florence, Italy

<sup>6</sup>IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Italy

Smith-Magenis syndrome (SMS, MIM 182290) is a complex developmental disorder characterized by behavioral deficits, craniofacial alterations, intellectual disability and circadian rhythm dysregulation. About 90% of SMS cases are due to the 17p11.2 deletion containing retinoic acid induced 1 (RAI1) gene, the remaining 10% is due to heterozygous mutation within the RAI1 coding region. RAI1 is a nuclear protein with transcription factor activity, however little is known about its role. Here we characterized a newly described mutation, NM\_030665.3:c.1194delC, creating a premature stop codon and generating a truncated form of RAI1. In order to characterize the mutated protein and its implication in disorder, we have over-expressed wild type and mutant RAI1 encoding plasmids in HEK293 cells and we showed that the mutant truncated RAI1 protein is not found in the nucleus but rather accumulates in the cytoplasm. For functional studies we have collected skin biopsies from the SMS patient carrying c.1194del and her relatives without gene mutation, in order to obtain primary human fibroblasts expressing endogenously the mutated (COL04) and wild-type RAI1 (COL03). To investigate consequences of the RAI1 mutation fibroblasts were reprogrammed to induce pluripotent stem cells (iPSCs) by a virus free protocol. All iPSCs clones with a flat and uniform morphology are characterized for their stemness and pluripotency, both in vitro through embryoid bodies formation and in vivo through teratoma assay. Also we differentiated iPSCs from COL04 and COL03 lines in neurospheres, which spontaneously differentiate into a neural population of astrocytes, oligodendrocytes and neuron cells. We used these three cellular lines to characterize at functional levels this mutation. We have focused our attention on one of the principal consequences of Smith Magenis syndrome: the alteration of circadian rhythm. To better understand its roles we treated COL03 and COL04 fibroblast and iPSCs with retinoic acid and we have investigated the expression of different circadian genes by quantitative RT-PCR and WB analysis. Our data show that the mutated form of RAI1 results in an altered expression of critical genes involved in circadian rhythm.

C48  
**Next Generation Sequencing approach for the diagnosis and the definition of a large cohort of patients with brain malformations**

E. Parrini<sup>1</sup>, D. Mei<sup>1</sup>, E. Cellini<sup>1</sup>, C. Bianchini<sup>1</sup>, D. Pucatti<sup>1</sup>, D. Rutigliano<sup>1</sup>, S. Virdi<sup>1</sup>, D. De Vita<sup>1</sup>, Clinical Study Group<sup>1</sup>, R. Guerrini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Neurogenetica, AOU Meyer

**Background:** Brain malformations represent a major cause of developmental disabilities, severe epilepsy, and reproductive disadvantage. Because of substantial genotypic and phenotypic heterogeneity for these malformations, a comprehensive analysis of clinical, imaging, and genetic data is needed to properly define these disorders.

**Purpose:** We performed a NGS approach of targeted resequencing in patients with brain malformations and an accurate genotype-phenotype correlation to better define the associated phenotypic spectrum.

**Methods:** We analyzed a cohort of 337 singletons with brain malformations with a panel targeting 86 genes for brain malformation. Target enrichment and sequencing was performed with a custom Nextera Rapid Capture design on Illumina MiSeq/NextSeq platforms. **Results:**

We identified 64 patients carrying pathogenic variants in 31 genes (including mosaic mutations and genomic rearrangements), corresponding to a molecular yield of 19% (64/337). The most mutated gene resulted LIS1 (9), followed by TUBA1A (7), DYNC1H1 (5), CASK (4), WDR62 (4) and ASPM (3). 32 mutations were identified in 25 additional genes, most of them recently associated with brain malformations. We sub-classified the patients into 3 main groups: Group 1- Neuronal migration disorders (195) Group 2- Pontocerebellar hypoplasia (42) Group 3- Microcephaly (102) The mutation rates observed in each group were: 23% for Group 1, 26% for Group 2 and 10% for Group 3.

**Conclusion:** Our extensive study on a large cohort of patients having brain malformations confirms the role of major genes, such as LIS1 or TUBA1A for lissencephalies. However, the high genetic heterogeneity of these disorders is highlighted by the identification of single/few mutations in a wide number of genes recently or rarely associated with brain malformations. In a diagnostic setting, gene panels permit to obtain a good sequence coverage of each gene with affordable costs and limited time, thus representing a first-line diagnostic option in all cases without a clear differential diagnosis, to facilitate personal medical care and reduce the number of patients to enroll for whole exome sequencing. In addition, this approach has the invaluable advantage to expand the known genotype-phenotype correlation.

C49  
**Approccio combinato di SNP-array e Whole Exome Sequencing: diagnosi molecolare e cura di una rara condizione di deficit di CoQ10**

A. Terracciano<sup>1</sup>, V. Alesi<sup>1</sup>, R.E. Papa<sup>3</sup>, S. Genovese<sup>1</sup>, S. Loddo<sup>1</sup>, G. Vasco<sup>3</sup>, R. Carrozzo<sup>2</sup>, E.S. Bertini<sup>2</sup>, A. Novelli<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Unit di Neuroriabilitazione, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma.

<sup>3</sup>Unit Malattie Neuromuscolari e Neurodegenerative, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

La diffusione di metodologie Next-Generation Sequencing (NGS) e di strumenti di ultima generazione ha dato una notevole spinta allo studio di patologie genetiche ed in particolare alla caratterizzazione di malattie rare. In questo lavoro descriviamo l'implementazione di un approccio combinato di SNP-array e Whole Exome Sequencing (WES) su un'unica piattaforma di nuova generazione, come metodologia per lo studio di malattie genetiche con base autosomica recessiva. Descriviamo il caso di due sorelle affette da una grave forma di encefalopatia epilettica e tetraparesi spastica ad esordio infantile nate da genitori non consanguinei. L'analisi di SNP-array condotta su entrambe le pazienti ha portato all'identificazione di alcuni blocchi di omozigosi; la successiva analisi di WES, condotta su una sola delle probande, ha consentito l'individuazione della variante genomica c.190C>T in omozigosi nel gene COQ4 (NM\_016035) interna al blocco di omozigosi (chr9). Il gene COQ4 codifica per uno dei numerosi enzimi che rientrano nella complessa via biosintetica del coenzima Q10, la cui carenza è associata a quadri clinici con una notevole variabilità fenotipica. Il deficit di CoQ10 (MIM) rappresenta una delle poche patologie rare per cui è disponibile un trattamento farmacologico mirato con supplementazione di Ubiquinone. La variante c.190 C>T è gi descritta in letteratura (AmJMG 96, 309 317, 2015) in associazione ad uno stesso quadro clinico di encefalopatia epilettica con quadro di risonanza magnetica fortemente identificativo del difetto. Presentiamo tale lavoro come paradigma di una metodologia combinata di citogenetica molecolare e genomica applicabile allo studio di malattie rare con presunta base autosomica recessiva; tale approccio presenta un duplice vantaggio: di accelerare e supportare l'analisi bioinformatica per l'identificazione di varianti genomiche puntiformi causative, ed inoltre di completare l'approccio di WES con lo screening di eventuali micro-delezioni/duplicazioni non ancora diagnosticabili con approcci Next-Generation sequencing. In questo caso le indagini molecolari hanno portato all'individuazione del difetto mitocondriale causativo della patologia consentendo una corretta gestione clinica delle pazienti, un'adeguata terapia farmacologica con supplementazione di ubiquinone e la possibilità di counseling familiare.

C50  
**Digenic mutations in hereditary neuropathies**

D. Lopergolo<sup>1</sup>, C. Fallerini<sup>1</sup>, G. Capocci<sup>3,4</sup>, C. Lo Rizzo<sup>2</sup>, A.M. Pinto<sup>2</sup>, F. Giannineschi<sup>3,4</sup>, N. Volpi<sup>3,4</sup>, J. Daolio<sup>1</sup>, A. Giliberti<sup>1</sup>, A. Malandrini<sup>3,5</sup>, A. Federico<sup>3,5</sup>, M.A. Mencarelli<sup>2</sup>, A. Renieri<sup>1</sup>, F. Giannini<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Medical Genetics, University of Siena, Siena, Italy

<sup>2</sup>Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italy

<sup>3</sup>Department of Medical, Surgical and Neurological Sciences, University of Siena, Siena, Italy

<sup>4</sup>UOC Neurologia e Neurofisiologia Clinica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italy

<sup>5</sup>UOC Neurologia e Malattie Neurometaboliche, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italy

Hereditary motor and sensory neuropathy (HMSN) is a common neuromuscular disorder with a prevalence of 14 to 282 per million. Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease is the most common HMSN (90% of diagnosed cases). Duplication in the PMP-22 gene produces CMT disease type 1A (CMT1A), while PMP-22 deletions result in another subtype of HMSN, hereditary neuropathy with liability to pressure palsies (HNPP). Both CMT1A and HNPP have an autosomal dominant inheritance. In the last years the number of HMSN related gene has increased considerably and the advent of next generation sequencing (NGS) panels, with the ability of effectively sequence and interpret simultaneously different HMSN related genes, has made it possible to detect a digenic model that could explain a particular phenotype or inheritance. Digenic models of HMSN are rarely reported: a previous study dated 2011 identified dual pathology in 1.4 % of CMT patients (Saporta et al); in 2014, a more recent study identified a 10% of possible digenic model (Hyer et al). Here we present families with HMSN that underwent a custom NGS panel of 28 genes and we discuss the consequences for genetic counseling and risk assessment. Out of eighteen families harboring pathogenic or probably pathogenic variants in HMSN related genes, we identified six families (33%) with likely digenic pattern of transmission. In two families the probands, who showed a more severe phenotype mimicking an autosomal dominant inheritance, harboured a PMP22 and MFN2 mutation associated with GARS and FIG4 variants respectively. Four families that also showed a severe phenotype mimicking instead an autosomal recessive inheritance, were suggestive of digenic inheritance involving gene mutations causative of HMSN. This study highlights the impact of digenic inheritance in HMSN and underlines that the atypical presentations are due to additive effect of multiple variants. Moreover, according to our data, digenic cases were underestimated and are not as rare as previously stated. Thus, in presence of atypical or more severe than expected phenotype, it may be worthwhile to investigate selected patients for more than one genetic cause combining NGS with CNV screening in order to avoid erroneous identification of at risk members. In addition, complex inheritance should be considered when reviewing prognosis and recurrence risks.

References:  
-Saporta A.S.D., et al. Charcot-Marie-Tooth disease subtypes and genetic testing strategies. Annals of Neurology, 2011; 69:22-33  
-Hyer H., et al. Genetic diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease in a population by next-generation sequencing. Biomed Res Int. 2014;2014:210401.







C51

**Il ruolo della CMA nello studio dei disturbi del neurosviluppo: annotazione funzionale delle Copy Number Variations in 604 pazienti caratterizzati mediante RM encefalica**

C. Cesario<sup>1,2</sup>, M. Goldoni<sup>1</sup>, R. Milone<sup>3</sup>, A. Giovannetti<sup>2</sup>, M. Truglio<sup>1</sup>, A. Traversa<sup>1</sup>, B. Torres<sup>1</sup>, C. Fusilli<sup>1</sup>, A. Novelli<sup>4</sup>, T. Mazza<sup>1</sup>, V. Caputo<sup>2</sup>, R. Battini<sup>3</sup>, L. Bernardini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fondazione Casa Sollievo della Sofferenza, IRCCS, San Giovanni Rotondo (FG), Lab. Mendel (Roma)

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università la Sapienza di Roma

<sup>3</sup>IRCCS Dipartimento Clinico di Neuroscienze dell'Et Evolutiva, Fondazione Stella Maris, Calambrone, Pisa

<sup>4</sup>Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

Le analisi mediante microarray (CMA) e il test di I livello per lo studio di pazienti affetti da disturbi del neurosviluppo, quali disabilità intellettiva (ID), autismo (ASD), epilessia, disturbi del linguaggio e/o psichiatrici. Circa il 15-20% di queste analisi evidenzia microriarrangiamenti (CNV) patogenetici (PATO). Una percentuale analoga di CNV rimane a significato incerto (VUS), in base ai criteri canonici di classificazione ad oggi in uso. Presentiamo i risultati della CMA ottenuti da 604 pazienti affetti da ID, isolato o in associazione ad altri disturbi del neurosviluppo, tutti caratterizzati mediante analisi neuroradiologica (RM). Il 30% è risultato positivo all'analisi con un tasso di CNV PATO del 16% e di VUS del 11%. Le CNV sono state successivamente riclassificate mediante un protocollo di annotazione basato su geni sensibili al dosaggio, geni evolutivamente conservati (onologhi), regioni regolatorie ed RNA non codificanti, al fine di individuare nuovi elementi genomici potenzialmente utili all'interpretazione delle CNV e di esplorare la relazione tra disturbi del neurosviluppo, malformazioni cerebrali e microriarrangiamenti genomici. Questo studio ci ha permesso di verificare come il potenziale diagnostico della CMA sia significativamente più elevato nei pazienti RM positivi rispetto a quelli RM negativi, evidenziando in particolare nei soggetti con anomalie della fossa cranica posteriore un tasso di CNV PATO (29%) e una densità media di geni sensibili al dosaggio superiore rispetto a quelli con altre malformazioni. Lo studio di elementi non canonici inclusi nelle CNV identificate ha evidenziato una più elevata frequenza di RNA non codificanti nelle CNV PATO, in particolare nei pazienti ID rispetto ai pazienti ID+ASD, e ha permesso di ridurre il numero di VUS. Infine, la frequenza di CNV contenenti almeno un gene onologo è risultata più alta nelle CNV PATO (89%) rispetto alle VUS e alle benigne, sostenendo il potere predittivo di patogenicità dei geni onologhi. Questi risultati suggeriscono che annotazioni funzionali dettagliate integrate ad una puntuale caratterizzazione clinica forniscono un utile strumento per l'interpretazione delle CNV, in particolare per quelle di significato incerto.

C52

**Portare la NIPT al livello successivo: lo screening per la sindrome di Down mediante qPCR**

P. Guanciali Franchi<sup>1</sup>, S. Werler<sup>2</sup>, M. Sachse<sup>2</sup>, J. Bonnet<sup>2</sup>, S. Busche<sup>2</sup>, W. Hofmann<sup>2</sup>, G. Luparia<sup>3</sup>, C. Palka<sup>1</sup>, G. Di Pasqua<sup>1</sup>, G. Calabrese<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Università di Chieti-Pescara, Italia

<sup>2</sup>LifeCodexx AG, Konstanz, Germania

<sup>3</sup>ArchiMed Srl, Milano, Italia

I test non invasivi prenatali (NIPT) per la sindrome di Down (SD) comprendono numerosi approcci: screening biochimici (Bitest, Test Integrato e Contingente), valutazione ecografica per la ricerca di specifici markers, analisi del DNA fetale circolante mediante Next Generation Sequencing (NGS).

Dal gennaio 2016 abbiamo sottoposto 966 gestanti allo screening prenatale per la SD mediante qPCR per selezionare quelle gravidanze ad alto rischio da inviare alla diagnosi prenatale invasiva (IPD). Questa nuova metodica di NIPT si basa sulla differente metilazione di alcune regioni del cf-DNA fetale circolante rispetto alle stesse regioni delle cellule sanguigne materne: nel DNA fetale alcune regioni sono ipermetilate, mentre in quello materno sono ipometilate. Tale differenza nella metilazione permette di isolare il DNA fetale mediante digestione enzimatica e di misurare il rapporto tra il livello di DNA del cromosoma 21 rispetto a quello di un cromosoma fetale di riferimento con una qPCR, permettendo l'individuazione delle gravidanze da indirizzare alla IPD.

Nei 966 campioni analizzati sono state individuate 35 gravidanze a rischio per sindrome di Down, successivamente confermata mediante IPD, con una sensibilità del 100% (35/35 affetti) ed una specificità del 100% (931/931 non affetti), con un numero di falsi positivi e falsi negativi finora pari a zero.

Tale tecnica permette di avere un tempo di refertazione di 24-48 ore, una drastica diminuzione dei costi rispetto alle tecniche basate su NGS, affidabilità comparabile ai test in uso, analisi di campioni con frazione fetale a partire da valori del 2.4%, possibilità di impiego in qualsiasi laboratorio di genetica molecolare.

Questi risultati preliminari indicano che la qPCR è una metodica valida nell'individuazione delle gravidanze a rischio per la SD, anche se necessita di essere testata su un più ampio numero di campioni.

C53

**Doppia trisomia autosomica in un feto identificato come euploide alla diagnosi genetica preimpianto**

F. Lonardo<sup>1</sup>, F. Scarano<sup>1</sup>, M.S. Lonardo<sup>1</sup>, M. Ciavarella<sup>1</sup>, M. Maioli<sup>1</sup>, G. Cantalupo<sup>1</sup>, G. Scarano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.S.D. di Genetica Medica, A.O.R.N. G. Rummo, Benevento

La diagnosi genetica preimpianto delle aneuploidie (Preimplantation Genetic Diagnosis of Aneuploidies, o PGD-A) è stata proposta più di 20 anni fa allo scopo di migliorare il tasso di successo delle tecniche di fecondazione in vitro (In Vitro Fecondation, o IVF). Si basa principalmente su 5 assunzioni: (1) La maggior parte dei cicli di IVF non hanno esito positivo a causa di un'aneuploidia presente nell'embrione. (2) L'eliminazione degli embrioni aneuploidi prima dell'embryo transfer può migliorare i risultati dell'IVF. (3) Una singola biopsia del trofoectoderma (TEB) allo stadio della blastocisti è rappresentativa dell'intero trofoectoderma (TE). (4) La ploidia del TE rappresenta in modo affidabile quella della massa cellulare interna (ICM). (5) La ploidia non cambia nelle fasi dello sviluppo successive a quella della blastocisti. Purtroppo nessuna di queste assunzioni ha trovato finora una conferma definitiva. La recente introduzione di nuove tecniche diagnostiche sembrava poter dare un nuovo impulso all'utilizzo della PGD-A, ma non tutti i problemi sono stati risolti. Presentiamo il caso di una paziente infertile di 39 anni che si è sottoposta ad un ciclo di IVF presso un centro estero che garantiva anche la PGD-A mediante NGS su TEB. Degli 11 embrioni analizzati, 5 risultavano aneuploidi, 4 presentavano anomalie multiple e 2 risultavano euploidi. È stato impiantato uno degli embrioni euploidi, con il risultato di una gravidanza inizialmente in normale evoluzione, che poi si è interrotta spontaneamente a 9 settimane e 4 giorni. Dal materiale deciduo-coriale giunto in laboratorio è stato possibile isolare dei villi coriali, con i quali è stata allestita una coltura cellulare. L'esame citogenetico, condotto su 20 metafasi da 4 diverse colture, ha evidenziato un cariotipo omogeneo 48,XX,+7,+8 (cariotipo femminile aneuploide con presenza, in tutte le cellule esaminate, di una trisomia del cromosoma 7 e del cromosoma 8). Ci sembra interessante, prendendo spunto da questo caso, discutere dei vantaggi e dei limiti della PGD-A.

C54

**CNV reciproche nelle sindromi da microdelezione/microduplicazione 16p11.2**

M.P. Patrizio<sup>1</sup>, R. Genesio<sup>1</sup>, P. Pignataro<sup>1</sup>, A. Izzo<sup>1</sup>, N. Mollo<sup>1</sup>, V. Samataro<sup>1</sup>, L. Passariello<sup>1</sup>, A. Conti<sup>1</sup>, L. Nitsch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italia;

La tecnologia array-CGH ha permesso l'identificazione di Copy Number Variations (CNV) responsabili dello sviluppo di patologie multisistemiche, dette nuove sindromi. Tra queste si annoverano le sindromi da microdelezione/microduplicazione 16p11.2, che si differenziano in prossimale (circa 550 Kb) e distale (circa 220 Kb). Il quadro clinico associato a queste sindromi può variare da deficit cognitivo, obesità, autismo o disturbi del linguaggio fino ad un fenotipo normale. I casi finora descritti hanno spesso un fenotipo a specchio in quanto la delezione è associata ad obesità e macrocefalia, mentre la duplicazione mostra calo ponderale e microcefalia. Allo scopo di stabilire la frequenza delle sindromi 16p11.2 nella popolazione campana, è stata effettuata un'analisi statistica retrospettiva su 646 pazienti pediatrici sindromici sottoposti ad array-CGH. Lo studio ha mostrato in 7 pazienti un riarrangiamento 16p11.2 prossimale e in 4 un riarrangiamento 16p11.2 distale, con una frequenza rispettivamente di 1,1% e 0,6%, notevolmente più alta delle frequenze di 0,5% e 0,4% riportate in letteratura. Allo scopo di restringere le regioni critiche dei due tipi di riarrangiamento abbiamo combinato la nostra casistica con i casi riportati in DECIPHER, caratterizzati da CNV sovrapponibili e fenotipo conclamato. Il confronto ha permesso di escludere i geni ATXN2L e TUFM come causativi di tratti fenotipici severi per il riarrangiamento distale e il gene SPN per il riarrangiamento prossimale. Uno studio di associazione genotipo-fenotipo ha mostrato che i segni clinici riscontrati nei riarrangiamenti prossimali sono piuttosto sovrapponibili a quelli riportati nei riarrangiamenti distali, il che suggerisce che le CNV nella regione distale e prossimale possano non essere causative di due sindromi separate. A supporto di tale ipotesi è stato riportato che nel locus 16p11.2 la regione prossimale può interagire in cis con quella distale, mediante la formazione di un complex chromatin looping. Infine, a differenza di quanto riportato in letteratura, nella maggior parte dei casi da noi studiati non è stato osservato un fenotipo a specchio tra delezione e duplicazione delle regioni indagate.





C55

**A syndromic extreme insulin resistance caused by biallelic POC1A mutations restricted to exon 10: a new example of pleiotropy in Mendelian diseases**

E. Giorgio<sup>1</sup>, E. Rubino<sup>2,5</sup>, A. Bruselles<sup>3</sup>, S. Pizzi<sup>4</sup>, I. Rainero<sup>2</sup>, S. Duca<sup>5</sup>, S. Cavalleri<sup>6</sup>, M. Ferrero<sup>1</sup>, E. Di Gregorio<sup>6</sup>, C. Mancini<sup>1</sup>, E. Pozzi<sup>1</sup>, E. Riberi<sup>1</sup>, B. Pasini<sup>1,6</sup>, M. Tartaglia<sup>4</sup>, A. Brusco<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Medical Sciences, Medical Genetics Unit, University of Torino, Torino

<sup>2</sup>Dept. of Neuroscience Rita Levi Montalcini, University of Torino, Torino

<sup>3</sup>Dept. of Oncology and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Rome

<sup>4</sup>Genetics and Rare Diseases Research Division, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCCS, Rome.

<sup>5</sup>Koelliker Hospital, Torino

<sup>6</sup>Medical Genetics Unit, Città della Salute e della Scienza University Hospital, Torino

Pleiotropy is a common phenomenon in Mendelian diseases, and mutations affecting genes with pleiotropic effects can frequently cause distinct phenotypes. Here we describe an instructive example in which pleiotropy is associated with mutations affecting two distinct isoforms of the POC1A gene. Its protein has a role in centriole assembly and stability, and in cillogenesis. Biallelic loss of function mutations affecting POC1A cause SOFT syndrome, an ultra-rare condition characterized by short stature, onychodysplasia, facial dysmorphism and hypotrichosis. Using exome sequencing, we identified a homozygous frameshift mutation (c.1047\_1048dupC; p.G337Rfs\*25) in a patient presenting with short stature, facial hirsutism, alopecia, dyslipidemia and extreme insulin resistance, a phenotype only partially resembling SOFT (variant POC1A-related syndrome, vPOC1A). The truncating variant is located in exon 10 and affects only two of the three POC1A isoforms. The POC1A isoform lacking exon 10 (in frame 48 a.a. deletion) is expressed and functional. Our hypothesis, corroborated by a vPOC1A case described in the literature with a biallelic nonsense mutation in exon 10, is that SOFT syndrome is due to a complete loss of function of POC1A, whereas vPOC1A has a more complex pathogenic mechanism. A residual POC1A activity may account for the milder overlapping features with SOFT, whereas the insulin resistant hyperinsulinemia, a distinctive phenotype of vPOC1A, may be due to a gain of function related to the unbalance of the 10+/10- isoforms. In conclusion, biallelic mutations in POC1A gene cause two clinically distinct conditions: SOFT syndrome, characterized by short stature, onychodysplasia, facial dysmorphism, and hypotrichosis, and vPOC1A, a less severe phenotype, which includes, as additional feature, extreme insulin resistance. Our findings suggest that a restricted class of mutations in POC1A may be present in patients with idiopathic insulin resistance and short stature. Furthermore, we provide an example of a genetic condition presenting with clinical heterogeneity due to alternative transcript processing.

C56

**Un nuovo caso di Sindrome De Barys risolto con esoma clinico**

C. De Luca<sup>1</sup>, P. Caforio<sup>1</sup>, C. Orsini<sup>1</sup>, N. Aragione<sup>3</sup>, C. De Chiara<sup>3</sup>, P. Siani<sup>2</sup>, D. De Brasi<sup>2</sup>, E. Agolini<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina molecolare e Biotecnologie mediche, Università Federico II, Napoli

<sup>2</sup>Dip. di Pediatria, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli

<sup>3</sup>Dip. integrato delle Emergenze, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli

<sup>4</sup>UOC Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

Ad oggi sono note diverse condizioni sindromiche di tipo progeroide. Tra queste, la Sindrome De Barys è una patologia autosomica recessiva caratterizzata da disabilità intellettiva, dismorfismi facciali, aspetto vecchieggiante, cutislaxa, anomalie delle fibre elastiche alla biopsia cutanea, lassità articolare, nanismo, ipotonia, movimenti atetoidi e iperreflessia. La prevalenza nella popolazione generale è <1:1.000.000. Si descrive il caso di una paziente valutata in consulenza a 17 giorni di vita per estremo IUGR e note dismorfiche. Nata a termine, SGA, all'esame obiettivo presentava bassa statura, macrocefalia relativa con fontanelle ampie, aspetto vecchieggiante con cute e sottocute sottili e grinzose con evidenza dell'albero vascolare sottostante, occhi alonati, iposomia e ipotonia generalizzata. L'aspetto complessivo suggeriva una condizione progeroide ad esordio neonatale. Presentava inoltre anomalie all'ecografia cerebrale e all'ecocardiogramma. Sono stati effettuati esami del cariotipo risultato normale ed array CGH, con rilievo di una microduplicazione sul cromosoma 16 non causativa. Successivamente l'indagine molecolare tramite pannello NGS dei geni associati a condizione progeroide ad esordio neonatale (LMNA, ZMPSTE24, WRN, BANF1 e POLD1) ha dato esito negativo. Infine lo studio dell'esoma clinico mirato ai geni associati a condizione progeroide ha identificato le varianti c.2212G>A e c.1273C>T nel gene ALDH18A1 in eterozigosi composta. La paziente ha presentato quindi una progressiva estrema difficoltà ad alimentarsi che ha determinato in una prima fase la necessità di alimentazione per via enterale con s.n.g. e, in una seconda fase, alimentazione parenterale totale, con sopraggiunto exitus per complicanze cardiorespiratorie. Il caso descritto arricchisce la casistica della Sindrome di De Barys, una forma molto rara di progeria ad esordio neonatale, che ad oggi conta meno di 30 casi al mondo. Inoltre dimostra l'importanza del ruolo dell'esoma clinico nella diagnosi di casi irrisolti di sindromi molto rare e complesse, permettendo di formulare una diagnosi specifica anche ai fini di un corretto consulto genetico familiare, come nel nostro caso.

C57

**WES per identificare varianti causative in un bambino con encefalopatia epilettica precoce, eterotopia periventricolare e convulsioni: i pannelli NGS spesso non sono esaustivi**

A. Pagliuzzi<sup>1</sup>, S. Bargiacchi<sup>2</sup>, A. Provenzano<sup>1</sup>, V. Conti<sup>3</sup>, E. Andreucci<sup>2</sup>, F. Peluso<sup>1</sup>, E. Errichello<sup>4</sup>, L. Xumerle<sup>5</sup>, E. Parrini<sup>3</sup>, R. Guerrini<sup>3</sup>, O. Zuffardi<sup>4</sup>, S. Giglio<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica, Dip. di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche "Mario Serio", Università di Firenze, Firenze

<sup>2</sup>SOC Genetica Medica, AOU Meyer, Firenze

<sup>3</sup>Neurologia Pediatrica, Unit e Lab. di Neurogenetica e Neurobiologia, Dip. di Neuroscienze, AOU Meyer, Università di Firenze, Firenze

<sup>4</sup>Dip. di Medicina Molecolare, Università di Pavia, Pavia

<sup>5</sup>Dip. di Biotecnologie, Università di Verona, Verona

Il gene seizure threshold 2 (SZT2) codifica per una proteina fortemente conservata, associata ad epilettogenesi. Recentemente, mutazioni bialleliche di SZT2 sono state individuate in 7 pazienti (da 5 famiglie) con encefalopatia epilettica (Encefalopatia Epilettica Infantile tipo 18) associata a caratteristiche dismorfiche e/o disabilità intellettiva non sindromica con o senza malformazioni cerebrali. Presentiamo il caso di un bambino giunto alla nostra osservazione per epilessia (diagnosi a 10 mesi), macrocefalia, ipotono assiale, eterotopia periventricolare ed ernia diaframmatica posteriore sinistra. Array-CGH negativo. Il sequenziamento di un pannello di geni associati a malformazioni cerebrali ha evidenziato due varianti, in eterozigosi composta, nel gene FAT4, associato a Sindrome di Van Maldergem 2 ed eterotopia periventricolare. L'analisi Western Blot effettuata sui fibroblasti ha evidenziato una riduzione statisticamente significativa dell'espressione della proteina FAT4 rispetto al controllo. Poiché il fenotipo non era ben correlabile, abbiamo eseguito il sequenziamento dell'esoma che, oltre alle varianti in FAT4, ha rilevato due varianti in eterozigosi composta nel gene SZT2. I casi descritti in letteratura mostrano un fenotipo con caratteristiche sovrapponibili a quello del nostro paziente, ad esclusione della presenza di ernia diaframmatica, al momento mai riportata. Data la recente associazione di SZT2 con alcune malformazioni dello sviluppo corticale e con un fenotipo ascrivibile a quello da noi osservato, abbiamo eseguito anche l'analisi dell'RNA messaggero sulla linea linfoblastoide, che ha evidenziato un parziale decadimento (nonsense-mediated mRNA decay, NMD) del trascritto. Resta da chiarire se si tratti di un caso ad elevata complessità in cui i due geni possano avere entrambi un ruolo causativo. La scelta tra pannelli genici e WES, come approccio di primo livello, può non essere così semplice, ma i principali vantaggi del WES sono la rilevazione di alterazioni in geni recentemente caratterizzati, il potenziale per nuove caratterizzazioni geniche e la capacità di sequenziare quasi tutti i geni. La copertura di alto livello raggiunta (90-95% di copertura esome-wide) conferma ancora una volta il vantaggio rispetto ai test di pannelli NGS.



C58

**Re-reading parents' exome for solving clinical issues**

A. Curr<sup>1</sup>, A.M. Pinto<sup>2</sup>, F. Mari<sup>1</sup>, E. Frullanti<sup>1</sup>, V. Imperatore<sup>1</sup>, D. Lopercolo<sup>1</sup>, M.A. Mencarelli<sup>2</sup>, A. Renieri<sup>1</sup>, C. Lo Rizzo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medical Genetics, University of Siena, Siena, Italy

<sup>2</sup>Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italy

Whole Exome Sequencing (WES) is playing a great role in Medical Genetics. The technique has such a high power that is able to solve not only the clinical issue in the probands but also to reach a diagnosis of relatives' conditions. Here we present 3 indicative clinical cases in which WES has been useful for proband's relatives.

Case 1: we visited a couple who had two pregnancies with multiple congenital anomalies, namely cleft lip and palate and posterior fossa anomalies, ended in voluntary interruptions. WES revealed the fetuses had a missense mutation in MID1, gene of Opitz G/BBB syndrome. The same mutation was found in their mother, in her brother and in their grandmother. A clinical reevaluation at follow-up revealed the presence of lymphedema in the mother and in the grandmother. Re-reading of mother's WES analysis led to the identification of a FLT4 mutation, a gene related to hereditary lymphedema. The mutation was also found in her mother's DNA sample.

Case 2: we performed WES analysis on a baby died at age 14 months after respiratory crises. WES showed two missense mutations in compound heterozygosity in RAPSN gene, responsible of a myasthenic syndrome potentially treatable. Upon mother's recent request to know the risk for future pregnancies to develop any pathology and the risk for her, we reevaluated her personal and family history, which turned to be positive for cardiovascular problems and for epilepsy. A focused re-reading of her WES analysis unmasked both a mutation in a gene related to heart disease and a mutation in a gene related to epilepsy.

Case 3: we visited a 37-years-old female with epilepsy and intellectual disability. WES analysis showed a pathogenic variant on TSC2 gene. The father reported a neurological history characterized by cerebellar hemorrhage. A reevaluation of his WES led to the detection of a pathogenic mutation on PKD1. US revealed bilateral cysts, confirming the molecular diagnosis of polycystic kidney disease, that could benefit of the new therapy with Tolvaptan. WES technology gives clinicians an enormous amount of information. It's up to us using it for the best patients' management.







# Poster





**P001**  
**Riarrangiamenti genomici atipici 22q11.2 e disordini del neurosviluppo: report clinico e correlazione genotipo-fenotipo di due pazienti**

M. Piccione<sup>2</sup>, V.T. Consiglio<sup>2</sup>, D. Vecchio<sup>2</sup>, A.M. Crivello, G. Cavarretta<sup>2</sup>, A. Giambona  
<sup>1</sup>Centro di Riferimento Regionale per il controllo e la cura della Sindrome di Down e delle patologie cromosomiche e genetiche A.O. Osp. Riuniti Villa Sofia-Cervello, Palermo Dip di Scienze per la Promozione della Salute e Materno Infantile "G.  
<sup>2</sup>U.O.S.D. Diagnostica Molecolare Malattie Rare A.O. Osp. Riuniti Villa Sofia-Cervello, Palermo

Premessa Riarrangiamenti genomici che occorrono durante la meiosi sul locus genomico 22q11.2 sono quasi esclusivamente determinati da eventi di ricombinazione omologa non allelica (NAHR) mediati da 8 low copy repeats (LCRs22) presenti nella regione. Dalla variabile combinazione di NAHR inter- o intra-cromosomica tra LCR22s centromeriche (A-D) e telomeriche (E-H) possono pertanto essere generate numerose aneuploidie segmentali ad estensione variabile rispetto le più frequentemente osservate delezioni di 1.5 o 3 Mb associate alla Sindrome di DiGeorge [OMIM 192430] o alle reciproche duplicazioni interstiziali. Scopo dello studio Correlazione genotipo-fenotipo di 2 pazienti di sesso maschile giunti alla nostra osservazione in et evolutiva per inquadramento etiologico di disordine del neurosviluppo e diagnosi di riarrangiamento genomico de novo rispettivamente riscontrato tra le LCRs22 C-D ed F-G. Materiali e metodi Entrambi i probandi sono stati sottoposti a work-up diagnostico per ritardo globale dello sviluppo in et pediatrica in accordo alle linee guida internazionali dedicate e comprensivo di: ricerca riarrangiamenti genomici mediante a-CGH, analisi molecolare del gene FMR1, diagnostica biochimico-clinica volta all'esclusione di errori congeniti del metabolismo. Risultati La ricerca dei riarrangiamenti genomici mediante a-CGH ha evidenziato nei pazienti rispettivamente: la presenza di una microduplicazione 22q11.21 di 614Kb che coinvolge il locus del gene SNAP29 e la presenza di una microdelezione 22q11.22 di 243Kb che coinvolge il locus del gene TOP3B. I prodotti di entrambi i geni intervengono in processi di maturazione e/o funzionamento del sistema nervoso centrale con un ruolo dosaggio-sensibile le cui alterazioni potrebbero, secondo la letteratura dedicata, essere causative del neurofenotipo osservato. Conclusioni Questo lavoro contribuisce a delineare ulteriormente un profilo nosologico autonomo per le sindromi atipiche da microdelezione/microduplicazione 22q11.2 prevalentemente rappresentato da ritardo globale dello sviluppo/disabilità intellettiva, disturbo dello spettro autistico ed un dismorfismo intermedio in assenza di anomalie congenite maggiori.

**P002**  
**Offerta estesa del test del portatore di Fibrosi Cistica e accesso alla consulenza genetica in Veneto**

L. Mammi<sup>1</sup>, C. Castellani<sup>2</sup>, E. Casati<sup>2</sup>, S. Boni<sup>3</sup>, G. Piccolin<sup>3</sup>, L. Turolla<sup>4</sup>, D. Baldo<sup>4</sup>  
<sup>1</sup>Serv. Genetica Medica Osp. Dolo (VE) AULSS 3 Serenissima  
<sup>2</sup>Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata Verona  
<sup>3</sup>Osp Belluno, Azienda ULSS 1 Dolomiti  
<sup>4</sup>U.O.S. Genetica Medica AULSS 2 Marca Trevigiana, Treviso

Nel Veneto orientale è attiva da più di vent'anni una vasta offerta del test del portatore di fibrosi cistica (FC) rivolta alla popolazione generale, con più di 200.000 test eseguiti e quasi 7000 eterozigoti identificati. Il test viene abitualmente prescritto da ginecologi e medici di base ed eseguito in laboratori pubblici o privati. Tale offerta non è per inserita in un programma strutturato di screening, ma piuttosto lasciata all'iniziativa dei singoli professionisti. Non è chiaro se e come le persone analizzate vengano informate e se vengano eseguite consulenze genetiche pre e post-test. Scopo di questo studio è stato valutare quanti portatori e coppie di portatori identificati in questo contesto accedano ad una consulenza genetica. Sono stati presi in considerazione gli anni dal 2014 al 2016, i portatori identificati nelle province di Venezia, Treviso e Belluno e le consulenze per FC che hanno avuto luogo nei servizi di consulenza genetica di Dolo (VE), Treviso e Belluno. Su 11239 test eseguiti sono stati identificati 358 eterozigoti (frequenza del portatore 1/31, stimata per l'area 1/27-28). Non è noto quante coppie di portatori siano state identificate. Le consulenze genetiche sono state 120, 17 a coppie di portatori, 103 a coppie con singolo portatore. Lo studio presenta alcuni limiti. Non tutti i laboratori dell'area in esame che eseguono il test FC hanno potuto fornire il dato sulla residenza dei soggetti testati, ed è quindi verosimile che il rapporto consultati/portatori sia inferiore a quanto riportato. Al contrario, alcuni portatori avrebbero potuto rivolgersi a servizi di consulenza esterni alla loro provincia, un evento potenzialmente in grado di controbilanciare l'osservazione precedente. Solamente un terzo degli eterozigoti identificati da un'ampia offerta del test del portatore sembrano accedere ad un servizio di consulenza genetica, mentre parrebbe che le coppie di portatori cerchino con maggior frequenza la consulenza. I risultati sottolineano l'importanza di inserire l'offerta del test del portatore FC alla popolazione generale in un programma strutturato di screening che oltre all'equità dell'offerta preveda adeguate modalità di accesso all'informazione pre-test ed alla consulenza dopo l'analisi. Supportato da grant Fondazione Fibrosi Cistica 26/2015

**P003**  
**Sei casi di Sindrome di Gorlin**

V. Nicotra<sup>1</sup>, C. Berera<sup>1</sup>, M.V. Enzo<sup>2</sup>, S.C. Gorgone<sup>1</sup>, F. Guarnaccia<sup>1</sup>, U. Hladnik<sup>2</sup>, F. Mannino<sup>1</sup>, T. Mattina<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Genetica Medica Università di Catania, Centro di Riferimento Regionale HUB per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare, A.O.U Policlinico - V.E., Catania  
<sup>2</sup>Laboratorio di Genetica Medica Fondazione Malattie Rare Mauro Baschirotto o.n.i.u.s.

Negli ultimi 10 anni presso il nostro Centro sono stati osservati 6 pazienti (3 maschi e 3 femmine) con S. di Gorlin, di età compresa al momento del primo accesso tra i 12 e i 57 anni: 5/6 presentano carcinomi basocellulari multipli e cisti odontogene; 1/6 presenta calcificazione falce cerebrale e cisti odontogene, ma non carcinomi basocellulari. All'esame molecolare in 5/6 pazienti abbiamo avuto anche una conferma molecolare: tre pazienti sono risultati positivi per una mutazione del gene PTCH1 de novo, in un caso con storia familiare positiva, è stata riscontrata, come atteso, la mutazione familiare; in un caso negativo per mutazioni, è stata riscontrata delezione del gene PTCH1 evidenziata mediante MLPA, poiché il paziente presentava un quadro clinico particolarmente complesso è stato eseguito Array CGH che ha confermato una delezione ampia che includeva il gene PTCH1. Un paziente, pur presentando un quadro clinico caratterizzato da cisti odontogene e carcinomi basocellulari, è risultato negativo all'analisi molecolare dei geni PTCH1, PTCH2 e SUFU ad oggi conosciuti responsabili di S. di Gorlin. La S. di Gorlin (#109400) è una malattia autosomica dominante a penetranza completa ed espressività variabile con un rapporto maschi/femmine di 1:1. La prevalenza della patologia è 1.1/10000 nella popolazione mondiale. I principali sintomi clinici sono: carcinomi basocellulari multipli (presenti nell'80% dei pazienti con eterogeneità clinica e istopatologica, insorgono tarda adolescenza, localizzati a viso, dorso e torace in numero da poche decine a centinaia), cheratocisti odontogene della mascella e/o mandibola, Pits palmo delle mani e della pianta dei piedi, anomalie scheletriche, calcificazioni ectopiche endocraniche; Più raramente presenti dismorfismi facciali (macrocefalia, schisi labiopalatina, difetti oculari) e deficit intellettivo (nel 5% dei casi). La S. di Gorlin è dovuta a mutazioni del gene PTCH1 (9q22.3-q31) in circa metà dei casi, meno frequentemente sono coinvolti il gene PTCH2 (1p34.1) e il gene SUFU (10q24.32). Il nostro paziente potrebbe essere uno di quei casi in cui la sindrome è dovuta ad un gene non ancora identificato. WES?  
 Bibliografia  
 Nevoid basal cell carcinoma syndrome Evans DG, Fardon PA. GeneReviews 2002 Jun 20 [updated 2015 Oct 1].



**P004**  
**Attività di Diagnosi Genetica Preimpianto presso la struttura pubblica della Azienda Ospedaliera Universitaria Senese**

S. Amitrano<sup>1</sup>, C. Lo Rizzo<sup>1</sup>, S. Ricci<sup>2</sup>, V. Ambrosino<sup>2</sup>, I. Longo<sup>2</sup>, F. Ciociola<sup>2</sup>, I. Mancipoli<sup>2</sup>, S. Magnolfi<sup>2</sup>, G. Caserta<sup>2</sup>, M.A. Mencarelli<sup>1</sup>, G. Baldini<sup>3</sup>, F. Mari<sup>1</sup>, L. Mencaglia<sup>2</sup>, A. Renieri<sup>1</sup>, M. Bruttini<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena  
<sup>2</sup>P.O.3 USL Toscana Sud Est, Centro di PMA, Ospedale Santa Margherita, La Fratta  
<sup>3</sup>Facoltà di Scienze Politiche C. Alfieri, Università degli Studi di Firenze, Firenze

Ad oggi la Regione Toscana è l'unica sul territorio nazionale ad aver deliberato al fine di regolamentare l'attività di Diagnosi Genetica Preimpianto (PGD) e il percorso di accesso delle coppie richiedenti. La Regione Toscana si è espressa tramite la delibera n.4183 del 7 Aprile 2017, standardizzando un iter che risulta finemente regolato. L'Azienda Ospedaliera Universitaria Senese è la prima struttura pubblica in Italia ad effettuare tale servizio. L'accesso al percorso avviene attraverso la valutazione di ogni singola coppia da parte di un team di specialisti del settore: genetista clinico e biologo esperti in PGD, ginecologo e psicologo coinvolti nei percorsi di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA). Secondo la delibera sopracitata il team che ha effettuato la prima valutazione sottopone il caso ad un gruppo regionale multidisciplinare (GMR), in cui sono rappresentate le stesse figure professionali, ma esterne al percorso. Il GMR esprime un parere sulla percezione di gravità della patologia manifestata dalla coppia entro una settimana dall'invio della richiesta. Il principio di cui tiene conto il GMR per stabilire l'idoneità all'accesso è mutato dalla legge n.194 del 22 Maggio 1978 che regola l'interruzione volontaria di gravidanza. Allo stato attuale la nostra attività si svolge in collaborazione con il Centro di PMA dell'Ospedale di Cortona (AR). Le patologie per cui è stato effettuato un percorso di PMA-PGD ad oggi includono: Beta-Talassemia, Aniridia, Distrofia Muscolare di Duchenne, traslocazione t(3;6)(p26;q23).ish t(3;6)(tel3p;:tel3p+) e sindrome di Alport X-legata. Attualmente in corso casi di: Corea di Huntington, sindrome di Saethre-Chotzen, NF1, sindrome di Lowe, Nail-Patella, FAP, VHL, Osteogenesi Imperfetta e sindrome L1CAM. Prevediamo che sempre più coppie si avvicinano a questo percorso innovativo per eludere un'interruzione volontaria di gravidanza, usufruendo di un servizio fortemente personalizzato. L'esperienza ottenuta fino ad ora avvalorata l'importanza di una stretta collaborazione tra tutti gli specialisti di riferimento per fornire alle coppie le informazioni più dettagliate e adeguate utili ad affrontare ogni scelta in questo percorso.







**P005**  
**L'ambulatorio malattie rare non diagnosticate dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù: primo anno di attività**

F.C. Radio<sup>1</sup>, M. Macchiaio<sup>1</sup>, A. Novelli<sup>1</sup>, M. Tartaglia<sup>1</sup>, A. Bartuli<sup>1</sup>, B. Dallapiccola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetica e Malattie Rare, Osp. Ped. Bambino Gesù, IRCCS, Roma

**Premessa.**

Le malattie rare sono condizioni eterogenee dal punto di vista clinico e molecolare. Nonostante le loro bassa frequenza individuale, complessivamente rappresentano un problema di dimensione sociale, che condivide sia difficoltà diagnostiche che di presa in carico stante la limitata o mancata conoscenza delle cause, della storia naturale e della variabilità clinica interindividuale. Particolarmente problematici sono i pazienti senza diagnosi (circa 1/3 dei malati rari). L'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (OPBG) ha aperto nel 2016 il primo ambulatorio italiano dedicato alle Malattie Rare Non Diagnosticate (AMRND), un servizio basato su approcci telematici, ambulatoriali e multidisciplinari, finalizzato a fornire risposte ai pazienti e alle loro famiglie.

**Scopo dello studio.**

Verificare l'attività dell'AMRND e i risultati ottenuti nel primo anno.

**Materiali e metodi.**

220 famiglie hanno scelto l'accesso telematico. In base alle richieste pervenute, il team multidisciplinare ha predisposto percorsi di diagnosi e di presa in carico, compreso il supporto psicologico-logistico-sociale.

**Risultati.**

Oltre il 95% delle famiglie è stata presa in carico con un percorso basato sulla telemedicina. Circa il 30% delle famiglie aveva contattato il servizio per avere chiarimenti su una diagnosi già formulata in altra sede (20%) o per essere inserita in un percorso di presa in carico (12%). Il 16% dei pazienti (affetti da quadri clinici complessi) è stato valutato ambulatorialmente o durante un ricovero programmato. Gli approfondimenti genetici sono stati impostati sulla base del sospetto clinico (sequenziamento di pannelli di geni malattia, CGH/SNP array e/o esoma clinico o di ricerca). Questo protocollo, implementato dalla discussione collegiale dei casi clinici tra esperti di discipline diverse ha permesso di ottenere la diagnosi nel 50% dei pazienti valutati (70% dei pazienti nei quali l'analisi è conclusa).

**Conclusioni.**

L'esperienza acquisita suggerisce l'utilità di potenziare la telemedicina come modello di prima linea per i pazienti senza diagnosi. Inoltre, la presenza di un percorso clinico-laboratoristico integrato permette di applicare le nuove tecnologie alla pratica clinica, incrementando in maniera significativa il tasso di successo diagnostico.

**P006**  
**Consulenza e test genetico per le demenze ereditarie: applicazione del protocollo ItalianDIAfN**

A. Mega<sup>1</sup>, M. Pievani<sup>1</sup>, S. Galluzzi<sup>1</sup>, M. Bocchetta<sup>2</sup>, L. Benussi<sup>3</sup>, L. Bernardi<sup>4</sup>, G. Binetti<sup>3,5</sup>, I. Bizzozero<sup>6</sup>, C. Bonvicini<sup>7</sup>, C.A. Defanti<sup>8</sup>, G. Di Fede<sup>6</sup>, S. Fascendini<sup>8</sup>, S. Fostinelli<sup>9</sup>, O. Gambini<sup>9</sup>, C. Geroldi<sup>10</sup>, R. Ghidoni<sup>3</sup>, G. Lussignoli<sup>10</sup>, M. Mirabelli<sup>4</sup>, C. Muscio<sup>6</sup>, S. Prioni<sup>6</sup>, V. Redaelli<sup>6</sup>, G. Rossi<sup>6</sup>, N. Smirne<sup>4</sup>, S. Stefanini<sup>8</sup>, F. Tagliavini<sup>6</sup>, M. Gennarelli<sup>7,11</sup>, A.C. Bruni<sup>4</sup>, G.B. Frisoni<sup>1,12</sup>, E. Di Maria<sup>13,14</sup>

<sup>1</sup>Lab. Neuroimmagine e Epidemiologia Alzheimer, IRCCS San Giovanni di Dio Fatebenefratelli, Brescia

<sup>2</sup>Dementia Research Centre, Dep of Neurodegenerative Disease, UCL Institute of Neurology, Londra

<sup>3</sup>Lab. Marcatori Molecolari, IRCCS San Giovanni di Dio Fatebenefratelli, Brescia

<sup>4</sup>Lab Genetica Formale e Molecolare, Centro Regionale di Neurogenetica, Lamezia Terme

<sup>5</sup>MAC Centro per la Memoria, IRCCS San Giovanni di Dio Fatebenefratelli, Brescia

<sup>6</sup>Dip. Neurologia V e Neuropatologia, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

<sup>7</sup>U.O. Genetica, IRCCS San Giovanni di Dio Fatebenefratelli, Brescia

<sup>8</sup>Fondazione Europea Ricerca Biomedica, Centro di Eccellenza Alzheimer, Ospedale Briolini Gazzaniga, Bergamo

<sup>9</sup>Dip. Scienze della Salute, Università di Milano

<sup>10</sup>U.O. Alzheimer, IRCCS San Giovanni di Dio Fatebenefratelli, Brescia

<sup>11</sup>Dip. Medicina Molecolare e Traslazionale, Università di Brescia

<sup>12</sup>Memory Clinic and LANVIE - Laboratory of Neuroimaging of Aging, HUG, Ginevra, Svizzera

<sup>13</sup>Dip. Scienze della Salute, Università di Genova

<sup>14</sup>SSD Genetica Medica, EO Osp. Galliera, Genova

**Premessa:** Il Network ItalianDIAfN ha sviluppato un protocollo di consulenza e test genetico conforme alle buone pratiche e linee-guida internazionali per le forme genetiche di demenza.

**Scopo dello studio:** Valutare gli esiti preliminari derivanti dall'applicazione del protocollo ItalianDIAfN in tre centri del Network.

**Materiali e metodi:** Il protocollo di consulenza e test genetico ItalianDIAfN è costituito dalle seguenti fasi: incontri pre-test, test genetico, restituzione dell'esito, tre incontri di follow-up. Dal 2014 sono state valutate 132 famiglie con familiarità per demenza. Lo studio comprende ad oggi 64 partecipanti, pazienti e familiari a rischio (35 con familiarità per Alzheimer; 23 per demenza frontotemporale; 2 per malattia da Prioni; 4 per altre malattie neurodegenerative) appartenenti a 43 famiglie.

**Risultati:** Dei 64 partecipanti, 23 (36%) hanno terminato il protocollo; 29 (45%) lo hanno abbandonato; 12 (19%) ne stanno continuando le procedure. Nel 31% dei casi (20 su 64) si sono osservate delle deviazioni dalle procedure del protocollo: per il 30% di essi (6/20) si è trattato di un accorpamento di più incontri al pre-test; per il 50% (10/20) valutazioni non in presenza al follow-up; per il 20% (4/20) in entrambe le fasi. Gli abbandoni si sono registrati nel 38% dei casi (11/29) nelle fasi di pre-test e test genetico, prevalentemente da parte dei familiari a rischio per la non volontà di conoscere il proprio status genetico; nel restante 62% (18/29) a seguito della restituzione dell'esito genetico, prevalentemente in seguito alla comunicazione di un risultato favorevole o per l'aggravamento delle condizioni cliniche. Nel 37% dei casi studiati geneticamente (18/49) è stata identificata una mutazione genetica associata a forme

autosomiche dominanti di demenza (geni: APP; PSEN1; PSEN2; PRNP; GRN; VCP).

**Conclusioni:** Il protocollo ItalianDIAfN rappresenta il primo tentativo di fornire procedure standardizzate a livello nazionale per la presa in carico di persone con familiarità per demenza. Sar tuttavia necessaria una revisione critica del protocollo per migliorarne l'applicabilità.



**P007**  
**Should I stay or should I go - Regions of homozygosity (ROH), counseling strategies and implications**

N. Bukvic<sup>1</sup>, O. Palumbo<sup>2</sup>, P. Palumbo<sup>2</sup>, M. Carella<sup>2</sup>, N. Resta<sup>3</sup>, M. Castori<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UOC Genetica Medica, Azienda Ospedaliero Universitaria Consorziale Policlinico di Bari, Bari

<sup>2</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

<sup>3</sup>UOC Laboratorio di Genetica Medica, DIMO-Università degli Studi di Bari, Bari

Today, linkage-based methods are used increasingly less due to the revolution in application of new technical approaches such as the advent of high-density single nucleotide polymorphism genotyping arrays and/or next-generation DNA sequencing as powerful methods to discover disease-causing variations. The high-density single nucleotide polymorphism genotyping arrays has provided an opportunity to detect these variations but in the same time to identify the presence of regions of homozygosity (ROH), which in some cases were associated with complex phenotypes/disease. Whether one is seeking to discover the molecular basis for a disease in a research setting or trying to interpret results from a clinical genetic test, predicting the phenotypic effect of genetic variation has emerged as a formidable challenge with many evolving solutions. Herein, we reported some clinical situation (patients: A. macroglossia, B. esophageal atresia) which permitted us to make differential diagnostic hypothesis and on the basis of this suspect to perform genetic tests. Even though the genetic test strategy failed to confirmed differential diagnostic suspect on the basis of ROH regions as incidental findings we reached the results and possible pathoetiology explanation when ROH has been signed and discuss between laboratory and clinical geneticists. Understanding these approaches will contribute to improving use of genetic information in clinical practice and interpretation of genomic data, even though further investigations are necessary to confirm this observation. Establishing causality of putative disease-causing variants in monogenic and genetically complex traits is an important and evolving concept in modern medicine/genetic counseling and we would like to propose one collaborative effort between geneticists, genetic testing laboratory professionals, clinicians and, where appropriate, researchers to make guidelines for the professionals which have to cope with interpretation and decision either to continue or to stop further genetic testing.





P008

**L'Evoluzione nel counseling prenatale del test del DNA libero circolante (NIPT) : review internazionale nel training professionale e sue criticit**

R. Catania

<sup>1</sup>Lab. Analisi - Casa Di Cura Candela Palermo

Introduzione:Il counseling prenatale oggi trova nel test del DNA libero fetale un'evoluzione continua di metodologie di aggiornamento e l'esigenza di evidenziare i settori di criticit per tutte le professionalit interessate.

Scopo dello studio :Valutare le criticit e le strategie educazionali nel training in counseling prenatale a livello internazionale. Materiali e metodi : Su motori di ricerca ( Obgin.Wiley,PubMed,Reaserchgate, ) le voce training resources/prenatal counselling/ NIPT abbiamo selezionato nove pubblicazioni sulle training resources e criticit ,uno anche su grave afferenti al counseling.

Risultati:Le ditte commerciali produttrici dei test nel 28,7 % e nel 47,8% offrono indicazioni ed aggiornamento. .Tra le figure professionali svolgono il counseling il consulente genetico ,ma in alternativa il 52,7 % ginecologi e il 38 % delle ostetriche ma indirizzano poi nel 34,6 % al consulente genetico e nel 11,2 % allo specialista materno -fetale. Un solo lavoro qualifica come necessario un tempo minimodi consulenza face to face di 20 minuti richiesto dalle pazienti.Quanto al materiale didattico Ł stato l'uso di tre questionari per il follow up e dei focus group al termine delle lezioni con presentazione di power point e materiale cartaceo .La quota dei falsi positivi,time around table (TAT ) per i risultati,livelli di DNA fetale ed epoche di gestazione,origine placentare del DNA i punti salienti.La raccomandazione committee opinion ACOG -SMM sul Dna libero come metodo di screening n.504 09/2015 su rischio-beneficio,e scelta di non eseguire il NIPT trova conferma in un 8% di pazienti che rinunciano al test dopo il counseling.Un internet network Ł attivo in Olanda per approfondimenti.Si sottolinea una pubblicazione che riporta il 14,6% di interruzioni di gravidanza solo sul risultato del NIPT.Mentre il 13% circa svolge 11 sedute di counseling prenatale a settimana.

Conclusioni: il counseling genetico Ł secondo il metodo di Roger centrato sulla paziente e non direttivo e mira al rispetto dell'autonomia riproduttiva della donna e della coppia.Una esigenza di aggiornamento e ricerca dei temi da evidenziare offrono alla donna un supporto al decisional making per evitare la standardizzazione di una scelta autonoma.

P009

**Confronto tra differenti strategie di screening prenatale per la rilevazione di tutte le anomalie citogenetiche**

F.R. Grati<sup>1</sup>, K. Bajaj<sup>2</sup>, B. Grimi<sup>1</sup>, L. Marcato<sup>1</sup>, B. Malvestiti<sup>1</sup>, F. Maggi<sup>1</sup>, G. Simoni<sup>1</sup>, S.J. Gross<sup>1</sup>, J. Ferreira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica, citogenetica e ricerca e sviluppo, TOMA Advanced Biomedical Assays S.p.A., Busto Arsizio (VA)

<sup>2</sup>Department of Obstetrics & Gynecology, NYC Health + Hospitals/ Jacobi, Bronx, NY

<sup>3</sup>Albert Einstein College of Medicine, Bronx NY

<sup>4</sup>Genomed SA, Warsaw, Poland

Premessa: Rispetto ai test tradizionali su siero (TSS), i test su DNA libero circolante nel plasma materno (cfDNA-test) mostrano una migliore sensibilit (DR) e un rischio di falso positivo (FPR) inferiore per le trisomie 13,18,21 (T13,18,21). Tuttavia, grazie alla misurazione della traslucenza nucale e al tasso piŁ elevato di diagnosi prenatali reflex, i TSS possono rilevare anomalie cromosomiche fetali aggiuntive che non sono il target del test (off-target). Scopo: confrontare la sensibilit alla nascita di differenti strategie di screening che includono TSS e cfDNA-test (-X/Y) universali e approcci contingent per tutte le anomalie citogenetiche fetali (target e off-target). Materiali e metodi: Utilizzando un modello derivato dai dati di prevalenza di tutte le anomalie citogenetiche fetali (Ferreira et al, 2016) Ł stata calcolata la capacit di individuare tutte le anomalie cromosomiche di 7 strategie di screening prenatale. I calcoli sono stati effettuati per 3 et materne rappresentative, 25, 35 e 45 anni. Risultati: il cfDNA-test universale per T21,18,21+Y/X mostra la piŁ elevata capacit di identificare tutte le anomalie cromosomiche fetali a tutte le et. Nelle donne giovani il cfDNA-test per T21,18,13 ha una sensibilit piŁ bassa di qualsiasi TSS perchŁ FPR del 5% comporta una maggiore capacit di identificare le anomalie off-target che dominano il rischio a priori nelle donne giovani; il cfDNA-test universale per T21,18,13 per eguaglia o supera il TSS a 38 anni, quando le trisomie oggetto del test iniziano a dominare il rischio a priori. Conclusioni: la capacit di identificare tutte le anomalie cromosomiche dipende dalla distribuzione delle anomalie cromosomiche del rischio a priori ad ogni et materna. Pertanto, benchŁ due strategie possano avere percentualmente la stessa sensibilit, i TSS favoriscono la identificazione di una ampia gamma di anomalie al costo per di un rischio residuo rilevante per le trisomie oggetto del test; i cfDNA-test universali invece identificano efficacemente le trisomie oggetto del test ma con scarsa possibilit di rilevare altre anomalie off-target. Questo studio Ł utile per lo sviluppo di modelli economici di implementazione di screening per i decisori di politica sanitaria pubblica.

P010

**Implicazioni della presenza dei mosaicismi fetoplacentari sulle performance dei test su DNA libero circolante nel plasma materno**

E. Maggi<sup>1</sup>, K. Bajaj<sup>3</sup>, V. Zanatta<sup>1</sup>, F. Malvestiti<sup>1</sup>, B. Malvestiti<sup>1</sup>, L. Marcato<sup>1</sup>, B. Grimi<sup>1</sup>, G. Simoni<sup>1</sup>, S.J. Gross<sup>2</sup>, J. Ferreira<sup>4,5</sup>, F.R. Grati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica, citogenetica e ricerca e sviluppo, TOMA, Advanced Biomedical Assays S.p.A., Busto ArsizioV (Varese)

<sup>2</sup>Albert Einstein College of Medicine, Bronx NY

<sup>3</sup>Department of Obstetrics & Gynecology, NYC Health + Hospitals/ Jacobi, Bronx, NY

<sup>4</sup>Genomed SA, Warsaw, Poland

<sup>5</sup>Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane, Maputo, Mozambique

Premessa: I test prenatali su DNA libero circolante (cfDNA-test) indagano la presenza di aneuploidie omogenee dei cromosomi sessuali (SCAs). I cromosomi sessuali possono generare mosaicismi feto-placentari con piŁ linee cellulari e ci ha implicazioni significative sulle prestazioni e la gestione dei test. Scopo: predire il rischio di falso positivo (FPR) e negativo (FNR) per tutte le SCAs conseguenti ai mosaicismi feto-placentari; predire i valori predittivi positivi (PPV) e negativi (NPV) dei risultati su cfDNA ad alto e basso rischio. Materiali e metodi: analisi retrospettiva di 67030 diagnosi citogenetiche su villo coriale (CVS). La predizione delle performances dei cfDNA-test Ł stata effettuata partendo dal cariotipo del citotrofoblasto e trasformando la percentuale di ogni linea cellulare in dosage-equivalent al fine di predire il risultato con cfDNA-test.Risultati: Il FPR dovuto a mosaicismi confinati alla placenta (CPM) tipo 1/3 Ł 0.04-0.07%; altri fenomeni biologici (es: mosaicismi materni e vanishing twin) contribuiscono ai rimanenti falsi positivi. Il FNR per tutte le SCAs Ł 0-5.7%; esso Ł piŁ elevato per i casi 45,X a mosaico con ecografia normale (58-74%). Il PPV Ł >90% per la maggior parte delle SCAs (99.4% per 45,X con ecografia anormale). Esso Ł molto piŁ basso per i casi 45,X senza anomalie ecografiche: un risultato 45,X con una ecografia normale potrebbe riflettere un mosaicismo placentare nel 33-53% dei casi oppure un risultato discordante o un mosaicismo negli amniociti nel 18% dei casi. Il NPV per tutte le SCAs Ł 99.9%.Conclusioni: un cfDNA-test positivo per 45,X dovrebbe essere interpretato e gestito nel contesto di una valutazione ecografica: nel caso di igroma o NT aumentata, pu essere proposto un CVS di conferma dato che tale risultato rifletter con alta probabilit un cariotipo 45,X in forma omogenea nella placenta; se l'ecografia Ł normale l'amniocentesi Ł da preferirsi per caratterizzare la composizione citogenetica del feto. Per le rimanenti SCAs una conferma tramite CVS pu essere una opzione anche in assenza di anomalie ecografiche benchŁ associata ad una probabilit di mosaicismo placentare dello 0-8%. Il NPV alto indica che il cfDNA-test Ł utile per escludere la presenza di SCAs.



P011

**Efficace alternativa all'analisi del cariotipo negli aborti spontanei**

N. Guercini<sup>1</sup>, B. Mancini<sup>1</sup>, P. Celli<sup>1</sup>, A. Cal<sup>1</sup>, D. Sacilotto<sup>1</sup>, S. Zanchetti<sup>1</sup>, A. Montaldi<sup>1</sup>, A. Alghisi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>U.O.S. Genetica e Biologia molecolare U.O.C. Medicina Trasfusionale ULSS 8 Berica Osp. S. Bortolo Vicenza

<sup>2</sup>U.O.C. Medicina Trasfusionale ULSS 8 Berica Osp. S. Bortolo Vicenza

Il riscontro di riarrangiamenti cromosomici coinvolge approssimativamente il 50% degli aborti spontanei durante il primo trimestre di gravidanza e costituisce un significativo fattore prognostico nella valutazione del rischio riproduttivo per le successive gravidanze.Negli ultimi tre anni presso il nostro laboratorio sono state eseguite in parallelo su tessuto abortivo analisi citogenetica convenzionale e tecniche molecolari quali dosaggio MLPA su regioni subtelomeriche e analisi di polimorfismi STR. Lo scopo di questo studio Ł stato quello di valutare efficacia ed efficienza delle analisi molecolari e di definire il percorso diagnostico piŁ appropriato.In particolare sono stati valutati 87 casi giunti presso il nostro laboratorio da giugno 2014 a giugno 2017 sui quali sono state applicate analisi del cariotipo convenzionale e dosaggio MLPA (pannelli P036 e P070) come esame molecolare di prima scelta e, a seguire, analisi di polimorfismi STR.I risultati ottenuti dal confronto tra i due approcci (citogenetico e molecolare) avvalorano i dati fino ad oggi riportati in letteratura. E stato evidenziato come il metodo molecolare risulti piŁ rapido ed efficace fornendo dati analizzabili anche in quei casi con crescita cellulare assente o in quei casi con presenza di contaminazione materna.La tecnica MLPA ha permesso inoltre di evidenziare del/dup a carico di regioni subtelomeriche non risolvibili con analisi citogenetica standard. Per contro l'analisi molecolare non ha rilevato la presenza di mosaici inferiori al 20-30%, traslocazioni bilanciate e genotipi tetraploidi.Alla luce dei nostri risultati riteniamo ragionevole sostituire l'analisi del cariotipo convenzionale di materiale abortivo con un percorso esclusivamente molecolare che preveda analisi di primo livello mediante dosaggio allelico di polimorfismi STR nei cromosomi tra quelli maggiormente coinvolti (13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y) seguita, in caso di negativit , da analisi MLPA relativa ai loci subtelomeric.







P012

**L'identificazione dello stato di mosaicismi per i cromosomi sessuali da sangue periferico non aumenta il rischio di aneuploidie negli embrioni preimpianto in cicli IVF-PGT**

C. Patassini<sup>1</sup>, D. Cimadomo<sup>2</sup>, V. Romanelli<sup>1</sup>, L. Girardi<sup>1</sup>, M. Moretto<sup>1</sup>, D. Zuccarello<sup>1</sup>, L. Rienzi<sup>2</sup>, F.M. Ubaldi<sup>2</sup>, A. Capalbo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetyx srl, Marostica (VI)

<sup>2</sup>Genera, Centro di Medicina della Riproduzione, Roma

La refertazione del mosaicismi cromosomico pone ancora dubbi interpretativi. La presenza di picchi di linee cellulari può dipendere da mosaicismi costituzionale vero, chimerismo, artefatti culturali e aneuploidie dei cromosomi sessuali legate all'età. Una linea con monosomia X fino al 10% può essere considerata priva di significato in una donna fenotipicamente normale tra 40 e 50 anni. Nonostante le incertezze interpretative, l'identificazione di mosaicismi è spesso seguita da indicazioni per investigazioni genetiche prenatali (villo o amniocentesi) o test genetico preimpianto (PGT-A) durante cicli di IVF. Lo scopo del nostro studio è stato definire se un cariotipo da sangue periferico a mosaico per i cromosomi sessuali aumenti effettivamente il rischio di aneuploidie correlate negli embrioni e possa essere confermato come indicazione propria per il PGT-A. Per dimostrarlo abbiamo confrontato i risultati di PGT-A di 99 blastocisti derivate da 26 pazienti (età media 38,7-3,2) con cariotipo a mosaico per i cromosomi sessuali con i risultati di blastocisti derivate da 2371 pazienti controllo (AMA, RFI e RPL, età media 38,5-3,4) attraverso analisi di regressione logistica. Aneuploidie dei cromosomi sessuali sono state riscontrate nel 2% (2/99; 95%CI:0.25-7%) delle blastocisti di pazienti con cariotipo a mosaico e nell'1,8% (154/8339; 95%CI:1,6-2,2%; p<0,4) delle blastocisti di pazienti controllo. Le 2 blastocisti con aneuploidie dei cromosomi sessuali derivano da 2 coppie diverse con grado di mosaicismi dell'8% e con cariotipo 45,X0/47,XXX/46XX. Il trend di questi dati sembra indicare che il cariotipo a mosaico per i cromosomi sessuali non aumenti significativamente il rischio di aneuploidie correlate nella linea germinale, suggerendo invece una condizione somatica acquisita o generazione di artefatti culturali. Potendo la PGT valutare cariotipo di più embrioni della stessa paziente, l'estensione di questo dataset permetterà di definire in modo powered il valore clinico predittivo del mosaicismi riscontrato in campioni di sangue periferico relativamente al rischio riproduttivo. Come atteso, invece, risultano significative le correlazioni tra aneuploidie dei cromosomi sessuali ed età materna (p<0,024), morfologia delle blastocisti (p<0,0001) e giorno di biopsia (p<0,004).

P013

**Diagnosi genetica preimpianto non-invasiva: evidenza di contaminazione di DNA materno nei campioni di blastocisto e nel mezzo di coltura embrionale**

L. Girardi<sup>1</sup>, A. Giancani<sup>1,2</sup>, V. Romanelli<sup>1</sup>, C. Patassini<sup>1</sup>, D. Cimadomo<sup>1,2</sup>, E. SCEPI<sup>1,2</sup>, S. CATELLO<sup>2</sup>, R. MAGGIULLI<sup>2</sup>, F.M. UBALDI<sup>1,2</sup>, L. RIENZI<sup>1,2</sup>, A. CAPALBO<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Genetyx srl, Marostica (VI)

<sup>2</sup>Genera, Centro di Medicina della Riproduzione, Roma

La biopsia del trofoectoderma (TE) allo stadio di blastocisti fornisce una quantità di DNA embrionale sufficiente per la diagnosi genetica preimpianto di anomalie cromosomiche (PGT-A) e malattie monogeniche (PGT-M), con minimo impatto sull'embrione. Procedure di analisi meno invasive sono attualmente in valutazione, ma i risultati sono contrastanti fra i vari laboratori. Lo scopo del nostro lavoro è verificare se il fluido del blastocisto (BF) e il mezzo di coltura della blastocisti (SBM) forniscono risultati consistenti con quelli dalla biopsia del TE corrispondente. A tale scopo sono stati prelevati 89 campioni di BF e 66 campioni di SBM allo stadio di blastocisti espansi. La PGT-A è stata effettuata su 23 campioni di BF mediante Next Generation Sequencing (NGS) protocollo Veriseq Illumina e i risultati sono stati comparati con il TE corrispondente analizzato mediante qPCR. La PGT-M è stata realizzata mediante SNP Genotyping con un totale di 69 sonde Taqman: 56 per gli SNP informativi e 13 per l'analisi delle mutazioni. Sono stati analizzati in totale 66 BF e 66 SBM con le stesse sonde utilizzate per definire l'aplotipo del TE corrispondente. La PGT-A effettuata sui campioni di BF mostra un fallimento di amplificazione del 60.9% (n=14/23;95%CI=38.5-80.3), la discordanza fra BF e TE è del 13.0% (n=3/23;95%CI=2.8-33.6) e la diagnosi è concordante solo nel 26.1% (n=6/23;95%CI=10.2-48.1) dei casi. Per quanto riguarda la PGT-M lo stato possibile definire l'aplotipo completo nel 21.2% (n=14/66;95%CI=12.1-33.0) dei campioni di SBM e nel 3.0% (n=2/66;95%CI=0.4-10.5) dei campioni di BF (p=0.0023). Abbiamo ottenuto discordanza nel 30.2% (n=105/348;95%CI=25.4-35.3) delle sonde testate nei campioni di SBM e nel 14.2% (n=47/332; 95%CI=10.6-18.4) di BF. La non concordanza è dovuta principalmente a drop-out degli alleli paterni, probabilmente per contaminazione da DNA extra-embriale. Infine, la presenza di mutazioni di origine materna nel 33.3% dei campioni di SBM, ottenuti da embrioni omozigoti wt (n=4/12;95%CI=9.9-65.1), suggerisce l'ipotesi di contaminazione di origine materna. I risultati ottenuti in questo studio mostrano come il BF e il SBM non possano essere attualmente considerati fonti alternative di DNA embrionale affidabili per scopi diagnostici.

P014

**Diagnosi genetica preimpianto: l'importanza del counselling genetico-ginecologico integrato per stabilire a priori le percentuali di successo della singola coppia**

D. Zuccarello<sup>1</sup>, C. Patassini<sup>1</sup>, L. Buffo<sup>2</sup>, C. Gentile<sup>2</sup>, C. Livi<sup>3</sup>, V. Romanelli<sup>1</sup>, L. Girardi<sup>1</sup>, L. Rienzi<sup>4</sup>, F.M. Ubaldi<sup>4</sup>, A. Capalbo<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>GENETYX srl, Marostica (VI)

<sup>2</sup>GENERA, Centro di Medicina della Riproduzione, Marostica (VI)

<sup>3</sup>Centro Procreazione Assistita Demetra, Firenze

<sup>4</sup>GENERA, Centro di Medicina della Riproduzione, Roma

La diagnosi genetica preimpianto (PGT, Preimplantation Genetic Test) è considerata la forma più precoce di diagnosi prenatale che consente di diagnosticare la presenza di una specifica malattia di cui la coppia risulta essere portatrice al fine di trasferire in utero l'embrione non affetto. Al contempo, sulla medesima biopsia embrionaria, è possibile effettuare la ricerca delle aneuploidie cromosomiche al fine di fornire alla coppia una informazione il più completa possibile sullo stato di salute dell'embrione, in modo da prioritizzare il trasferimento degli embrioni non affetti ed euploidi. Negli ultimi 2 anni si sono rivolti al nostro Servizio di consulenza genetica 320 coppie richiedenti PGT con le seguenti motivazioni: malattia monogenica (PGT-M, n. 184), anomalia cromosomica strutturale (PGT-RS, n. 72), infertilità, poliabortività, e maternità avanzata (PTG-A, n. 64). La maggior parte delle coppie afferenti per PGT-M e PGT-RS avevano già ricevuto consulenza genetica (CoGe) in altra sede con inquadramento molecolare della patologia e valutazione del rischio genetico; si è dunque discusso con la coppia degli aspetti specifici della PGT, ed in particolare delle opzioni riproduttive, della attendibilità e accuratezza diagnostica, tipo di tecnica PGT da utilizzare nel caso specifico, fattibilità, rischio di errata diagnosi, tempistica di esecuzione. Non per ultimo sono state discusse con la coppia le percentuali di successo cumulativo (gravidanza a termine) tenendo conto della probabilità combinata di malattia geneticamente trasmissibile e rischio di aneuploidia embrionale per età materna avanzata. Il successivo inquadramento del ginecologo della riproduzione responsabile del ciclo di fecondazione assistita che effettua una serie di analisi e visite preventive (valutazione della riserva ovarica con dosaggio ormonale e dell'AMH, conta dei follicoli antrali, isteroscopia diagnostica, etc...) consente una valutazione integrata genetico-ginecologica che offre alla coppia una stima più precisa delle loro possibilità di successo del percorso di PGT.



P015

**Determinazione della ploidia embrionale in cicli di diagnosi preimpianto per il recupero clinico di zigoti a fecondazione anomala**

V. Romanelli<sup>1</sup>, D. Cimadomo<sup>2</sup>, R. Maggiulli<sup>2</sup>, G. Orlando<sup>2</sup>, C. Patassini<sup>1</sup>, L. Girardi<sup>1</sup>, L. Rienzi<sup>2</sup>, F.M. Ubaldi<sup>2</sup>, A. Capalbo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>GENETYX srl, Marostica (VI)

<sup>2</sup>GENERA, Centro di Medicina della Riproduzione, Roma

Convenzionalmente, in un ciclo di IVF gli ovociti che presentano una fecondazione atipica non vengono considerati trasferibili in quanto non è possibile determinarne la ploidia: zigoti con un singolo pronucleo (1PN) sono ritenuti a più elevato rischio di aploidia e zigoti con più di due pronuclei sono a rischio di poliploidie. In questo studio abbiamo settato un protocollo per la determinazione della ploidia embrionale, realizzabile su una singola biopsia di trofoectoderma in parallelo al convenzionale test preimpianto per la diagnosi delle aneuploidie cromosomiche (qPCR), e basato sulla stima delle frequenze alleliche di 40 SNPs altamente polimorfici. La validazione prospettica in doppio cieco su 40 linee cellulari triploidi e diploidi mostra una concordanza del 100% con l'atteso e ha permesso di definire i valori soglia necessari per discriminare le due popolazioni cellulari. In fase clinica, previo consenso all'analisi della ploidia embrionale, in 26 cicli su 718 (3.6%) si è ottenuto almeno un embrione evolutivo da zigoti con fecondazione anomala. Delle 27 blastocisti analizzate, 12 sono risultate cromosomicamente normali, di cui 8 diploidi e, pertanto, trasferibili. L'analisi della ploidia è stata effettuata anche sulle blastocisti aneuploidi e, al fine di validare ulteriormente la tecnologia, è stato applicato un protocollo in cieco su biopsie indipendenti di targeted-NGS con high-throughput SNPs allelic ratio per i siti eterozigoti. I risultati hanno confermato tutte le diagnosi di ploidia ottenute con il protocollo di 40 SNPs. Attualmente sono stati effettuati quattro trasferimenti, esiti in 2 gravidanze a termine di bambini cariotipicamente normali. Nei cicli IVF, particolarmente nelle pazienti a bassa prognosi e di avanzata età riproduttiva, uno dei principali fattori che limita il successo è proprio il numero di embrioni utilizzabili. Questo nuovo approccio permette il recupero per uso clinico di embrioni che altrimenti sarebbero scartati dai trattamenti di IVF. I prossimi step prevedono il monitoraggio del follow-up ostetrico e neonatale, e un'applicazione clinica su più larga scala.





P016

**Mola idatiforme parziale o completa ricorrente: la diagnosi genetica preimpianto pu essere risolutiva?**

F. Benini<sup>1</sup>, A. Lo Re<sup>2</sup>, C. Patassini<sup>3</sup>, V. Romanelli<sup>3</sup>, L. Girardi<sup>3</sup>, D. Cimadomo<sup>3</sup>, M. Moretto<sup>3</sup>, L. Rienzi<sup>4</sup>, F.M. Ubaldi<sup>4</sup>, C. Livi<sup>1</sup>, A. Capalbo<sup>3,4</sup>, D. Zuccarello<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro Procreazione Assistita Demetra, Firenze

<sup>2</sup>Ospedale Casa di Cura Pederzoli, Peschiera del Garda (VR)

<sup>3</sup>GENETIX srl, Marostica (VI)

<sup>4</sup>GENERA, Centro di Medicina della Riproduzione, Roma

La diagnosi genetica preimpianto (PGT-A, Preimplantation Genetic Test - Aneuploide) è considerata la forma più precoce di diagnosi prenatale che consente di diagnosticare la presenza di aneuploidie cromosomiche in modo da prioritizzare il trasferimento degli embrioni euploidi. La mola idatiforme, in particolare la parziale, è un evento frequente negli aborti spontanei precoci (5-10% dei casi) e non se ne conosce la base genetica. Le gravidanze molar si dividono in parziali e complete. Una mola completa è causata dalla penetrazione di un singolo spermatozoo (90% dei casi) oppure di due spermatozoi (10% dei casi) all'interno di un ovulo che ha perso il suo DNA (lo spermatozoo poi si duplica formando un corredo di 46 cromosomi). Il genotipo è diploide (46,XX o 46,XY), a seguito di successiva mitosi dello spermatozoo fecondante. Al contrario, una mola parziale si verifica quando un ovulo viene fecondato da due spermatozoi o da uno spermatozoo che duplica se stesso dando luogo ai genotipi 69,XXY (triploide) o 92,XXXY (tetraploide). Una mola idatiforme completa presenta un rischio più elevato di evolvere in coriocarcinoma (tumore maligno delle cellule del trofoblasto) rispetto ad una mola parziale. Negli ultimi 2 anni si sono rivolti al nostro Servizio di consulenza genetica n. 5 coppie con mola ricorrente (2 o più aborti cromosomicamente accertati), di cui n. 4 con mola parziale (triploidia e tetraploidia) e una con mola completa ricorrente (2 gravidanze successive), richiedendo di effettuare un ciclo di fecondazione assistita con PGT-A per migliorare le loro performance riproduttive. In consulenza genetica è stato spiegato alle coppie che, con metodica q-PCR, è possibile effettuare PGT-A solo per mola parziale triploide e mola completa, poiché tale tecnica non consente di visualizzare gli embrioni tetraploidi. È stato inoltre discusso che, poiché la maggior parte delle coppie erano con partner femminile di giovane età (< 35 anni) ed il rischio di ulteriore ripetizione è piuttosto basso, non è giustificato il ricorso a tecniche di fecondazione assistita con PGT-A ed è stato suggerito loro di ritentare in maniera naturale.

P017

**Diagnosi preimpianto di rene policistico autosomico dominante: quando è fattibile? Presentazione di 8 casi clinici**

C. IZZI<sup>1</sup>, G. Savoldi<sup>2</sup>, C. Mazza<sup>2</sup>, F. Scolari<sup>3</sup>, L. Buffo<sup>4</sup>, C. Gentile<sup>4</sup>, L. Dusi<sup>4</sup>, C. Livi<sup>5</sup>, F. Benini<sup>5</sup>, C. Patassini<sup>6</sup>, V. Romanelli<sup>6</sup>, A. Capalbo<sup>6,7</sup>, D. Zuccarello<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Nefrologia e Dialisi, Presidio di Montichiari, ASST-Spedali Civili di Brescia - Ginecologia e Ostetricia, ASST-Spedali Civili di Brescia

<sup>2</sup>Sezione di Citogenetica e Genetica Medica - UO Anatomia Patologica, ASST-Spedali Civili di Brescia

<sup>3</sup>Nefrologia e Dialisi, Presidio di Montichiari, ASST-Spedali Civili di Brescia e Università di Brescia

<sup>4</sup>GENERA VENETO, Centro di Medicina della Riproduzione, Marostica (VI)

<sup>5</sup>Centro Procreazione Assistita Demetra, Firenze

<sup>6</sup>GENETIX srl, Marostica (VI)

<sup>7</sup>GENERA, Centro di Medicina della Riproduzione, Roma

La diagnosi genetica preimpianto (PGT-M, Preimplantation Genetic Test - Monogenic disease) è considerata la più precoce diagnosi prenatale che consente di diagnosticare una specifica malattia di cui la coppia risulta essere portatrice al fine di trasferire in utero l'embrione non affetto. Al contempo, sulla medesima biopsia embrionaria, è possibile effettuare la ricerca delle aneuploidie cromosomiche in modo da prioritizzare il trasferimento degli embrioni non affetti ed euploidi. Il rene policistico autosomico dominante (ADPKD) è la malattia genetica renale più frequente (prevalenza 1:400/1:2400), caratterizzata da comparsa/crescita di cisti renali bilaterali, in grado di causare insufficienza renale terminale. L'ADPKD è responsabile del 6-10% dei casi di dialisi ed è geneticamente eterogenea essendo associata a mutazioni nei geni PKD1 e PKD2. La recente introduzione della PGT-M in Italia ha finalmente cambiato le scelte riproduttive delle coppie con partner affetto da ADPKD. Negli ultimi 2 anni si sono rivolti al nostro Servizio di consulenza genetica preimpianto n. 8 coppie con partner affetto da ADPKD. Sei partner affetti presentavano mutazioni patogenetiche in eterozigosi in PKD1: c.11498G>C (p.Arg3833Pro), c.7288C>T (p.Arg2430\*), c.1803delG (p.Arg601\*), c.12682C>T (p.Arg4228\*), c.10009\_10010insT (p.Tyr3337LeufsX52) e c.7915C>T (p.R2639\*). Due pazienti hanno avviato la caratterizzazione molecolare presso il centro di riferimento per ADPKD di Brescia. Alle coppie in consulenza genetica preimpianto è stato spiegato che nei portatori di mutazioni nel gene PKD1 non sempre la PGT-M è realizzabile, a causa di problematiche tecniche correlate alla duplicazione degli esoni 1-33 (su 46 totali) in sei pseudogeni ad elevata omologia di sequenza (>95%). Le mutazioni che cadono in questa porzione non sono quindi diagnosticabili in preimpianto se non tramite aplotipo familiare, che necessita di avere familiari viventi affetti (per cui l'impossibilità ad eseguire la diagnosi nei casi de novo). Cinque coppie hanno al momento completato il percorso di PGT, di cui 2 in attesa di transfert embrionario e 2 in gravidanza (12 e 23 s.g.).

P018

**Cryopreservation has no effects on Dynactin and PLK1 expression, which are modulated by maternal aging**

M.C. Budani<sup>1</sup>, M. D'Aurora<sup>2,3</sup>, S. Franchi<sup>2,3</sup>, G.M. Tiboni<sup>1</sup>, G. Palka<sup>4</sup>, L. Stuppia<sup>2,3</sup>, V. Gatta<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicine and Aging Sciences, School of Medicine and Health Sciences, G. d'Annunzio University, Chieti

<sup>2</sup>Department of Psychological, Health and Territorial Sciences, School of Medicine and Health Sciences, G.d'Annunzio University, Chieti

<sup>3</sup>Molecular Genetics Unit, CeSI-Met, Chieti

<sup>4</sup>Department of Medical, Oral and Biotechnological Science, G.d'Annunzio University, Chieti

The storage of surplus oocytes by cryopreservation (OC) is a widely used tool in assisted reproductive technology (ART) protocols. Cryopreservation renders oocytes vulnerable to physical injuries, causing alterations in oocyte microstructures, such as meiotic spindles, microtubules, and microfilaments leading to an alteration of chromosomal with failure of normal fertilization, increasing aneuploidy or polyploidy incidence, and termination of embryonic development. This study is aimed to test the effect of cryopreservation and aging on dynactin pathway by analyzing the expression of PLK1, and dynactin subunits (DCTN3, DCTN1, DCTN2 and DCTN6). Little is known about dynactin complex dynamics in the oocyte even though these genes seem to be promising markers of the aneuploidy risk in oocyte. We tested the expression of these transcripts in fresh and cryopreserved oocytes as well as in oocytes from young and older women (age > or < 35 years), in a total of 32 patients. The comparison between cryopreserved oocytes and fresh oocytes did not show significant differences, whereas results highlighted significant differences for all the analyzed genes in aged oocytes when compared to young oocytes. DCTN3 and PLK1 were up-regulated of 1.69 and 1.64 folds, respectively. DCTN1 subunit showed a decrease in expression in of about one third, while DCTN2 and DCTN6 expression was doubled. Data showed that maternal aging, rather than cryopreservation, modulates the expression of all the transcripts studied, confirming its role in affecting proper chromosomal segregation. In conclusion, we demonstrate that dynactin and PLK1 could represent focus molecules in the oocyte competence pathway and, for the first time, we report that oocyte cryopreservation doesn't seem to affect the expression of the same genes, evidencing that oocyte freezing do not increase aneuploidy risk, which instead are altered by maternal aging.



P019

**Diagnosi Prenatale di Osteogenesi Imperfecta di tipo 4 mediante NGS**

A. Mesoraca<sup>1</sup>, C. Dello Russo<sup>1</sup>, A. Cima<sup>1</sup>, M.A. Barone<sup>1</sup>, A. Viola<sup>1</sup>, S. Longo<sup>1</sup>, C. Giorlandino<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servizio di Genetica Medica, Altamedica di Artemisia, Roma

<sup>2</sup>Servizio di Medicina Fetale, Altamedica di Artemisia, Roma

Si descrive il caso di una paziente affetta da una forma ipoteticamente supposta di Osteogenesi Imperfecta, gravida alla 11a settimana di gestazione, e presentatasi presso il nostro Centro per una villocentesi richiesta a seguito di un'evidenza ecografica di NT di 5 mm. La paziente ha dichiarato di essere affetta da fragilità ossea e suscettibilità alle fratture. La consulenza genetica alla quale venne sottoposta rilevò la volontà da parte della coppia di effettuare la villocentesi per lo studio delle aneuploidie cromosomiche ed, in caso di negatività alle stesse, procedere ad un approfondimento che andasse a rilevare anche quei geni che potessero avere avuto un ruolo sul determinismo della propria patologia. Sulle cellule del trofoblasto prelevate, dopo avere escluso in giornata le aneuploidie dei cromosomi 21,13,18, il DNA fetale, assieme a quello estratto da un campione di sangue periferico della paziente venne sottoposto a sequenziamento utilizzando la metodologia della Next Generation Sequencing. Per la preparazione della libreria venne utilizzato un protocollo di enrichment sviluppato da Illumina e costituito da 4.813 geni, una cumulativa target region size di 12Mb, per un totale di circa 62.000 esoni coperti. Per il sequenziamento venne utilizzata la piattaforma della NextSeq500. Mediante il software di analisi dei dati si è focalizzata l'attenzione su un subset di geni coinvolti nei fenomeni di anomalie nella sintesi del collagene. Utilizzando tale approccio diagnostico si è identificata la presenza di una mutazione c.2684delC (descritta già da Ward nel 2001 e pubblicata su Human Mutation, 17, 434) a livello del gene COL1A1 ed associata ad Osteogenesi Imperfecta di tipo 4 a trasmissione dominante. Tale mutazione è stata riscontrata sulla paziente e confermata essere presente anche sul feto. Anche se l'osteogenesi imperfecta di tipo 4 rappresenta una forma genetica moderata, i pazienti affetti comunque presentano moderata bassa statura, scoliosi lieve-moderata, sclere bianche o grigiastre e dentinogenesi imperfecta. La prevalenza è complessivamente stimata tra 1/10.000 e 1/20.000, ma la prevalenza del tipo 4 non è nota. Essendo il resto del test risultato normale abbiamo ritenuto che l'aumento della NT possa essere stata determinata dalla mutazione riscontrata. Considerando i tempi rapidi di tale approccio, riteniamo utile confermare l'importanza, nella gestione di tali emergenze in diagnosi prenatale, dell'applicazione del protocollo descritto e dell'utilizzo della NGS anche in epoca prenatale, oltre che per la diagnosi di quelle forme cliniche di difficile interpretazione.







**P020**  
**Microdelezione della regione 3p26.3-3p25.3 e microduplicazione della regione 15q26.1-15q26.3: Case Report**

P.A. Falcone<sup>1</sup>, F.M. Pegoraro<sup>1</sup>, A. Panetto<sup>1</sup>, G. D'Alessandro<sup>2</sup>, M. Di Benedetto<sup>1</sup>, E. Di Gregorio<sup>2</sup>, E. Grosso<sup>2</sup>

<sup>1</sup>S.C. Analisi Cliniche, Osp. U.Parini, Aosta

<sup>2</sup>S.C. Genetica Medica U., AOU Citt della Salute e della Scienza, Torino

Descriviamo il caso di una bambina, secondogenita di genitori non consanguinei, nata a termine dopo gravidanza normodecorsa che presenta ritardo del linguaggio, parametri auxologici ai limiti superiori alla norma e facies con tratti peculiari. L'analisi per ricerca di mutazioni NSD1 e l'analisi per distrofia miotonica sono risultate nella norma. L'analisi array-CGH che rileva la delezione di una copia della regione 3p26.3-3p25.3, di dimensioni comprese tra 8,6 e 8,7 Mb, e la duplicazione di una copia della regione 15q26.1-15q26.3, di dimensioni comprese tra 10,3 e 10,4 Mb. Il cariotipo standard dei genitori risulta normale; la FISH con sonde delle regioni subtelomeriche 3p e 15q rileva una traslocazione criptica bilanciata (3;15) materna. Delezioni della regione 3p sono segnalate in soggetti che presentano un quadro clinico variabile, caratterizzato da disabilit intellettiva, microcefalia, basso peso alla nascita, ritardo di crescita ed ipotonia. Il quadro clinico più tipicamente osservato potrebbe essere dovuto alla delezione di geni, come SETD5, che per non risultano deleti nel nostro caso: È quindi verosimile che la delezione qui osservata possa comportare segni clinici più sfumati. All'interno della regione deleta sono presenti due geni con effetto dose conosciuto: ITPR1, la cui delezione comporta la predisposizione all'insorgenza di una forma di atassia cerebellare (SCA15), e CAV3, la cui delezione potrebbe comportare una predisposizione a miopatia ad insorgenza tardiva e/o a cardiomiopatia e alterazioni del ritmo cardiaco (QT lungo). Duplicazioni della regione 15q sono segnalate in soggetti con eccesso di crescita prenatale e postnatale, tratti clinici peculiari con sinostosi cranica, disabilit intellettiva e dolicocefalia, aumentata incidenza di malformazioni dell'apparato urinario. La caratterizzazione mediante FISH potrà essere utile per valutare se vi sia un rischio riproduttivo aumentato nei familiari.

**P021**  
**Genome-wide cfDNA screening: AMES laboratory experience with 10,500 pregnant women**

L. De Falco<sup>1,2</sup>, G. Savarese<sup>2</sup>, R. Ruggiero<sup>2</sup>, R. D' Angelo<sup>2</sup>, P. Savarese<sup>2</sup>, L. D' Amore<sup>2</sup>, T. Suero<sup>2</sup>, C. Ramiro<sup>2</sup>, A. Di Carlo<sup>2</sup>, E. Evangelista<sup>2</sup>, L. Circelli<sup>2</sup>, G. Furino<sup>2</sup>, D.R. Agnello<sup>2</sup>, A. Fico<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Universit degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

<sup>2</sup>Lab. di Genetica Ames Centro Polispecialistico Strumentale, Srl, Napoli

**Background**

The traditional cfDNA screening tests are typically limited to a selected subset of chromosomal abnormalities, including trisomies 21, 18 and 13, as well as sex chromosome aneuploidies. Whole-genome sequencing (WGS) of maternal plasma cell-free DNA (cfDNA) can potentially evaluate all 24 chromosomes to identify abnormalities of the placenta, fetus, or pregnant woman.

**Aim**

We hypothesized that by systematically analyzing WGS data from all chromosomes, we could identify rare autosomal trisomies (RATs) to improve understanding of fetoplacental biology. We also aimed to compare the performance of the two tests in a this large population of pregnant women, in order to assess the clinical utility of the genome-wide screening.

**Material and Methods**

Here, we review the results from 10500 pregnant women submitted to the AMES genetic laboratory for genome-wide cfDNA screening. Sequencing data were analyzed using an algorithm optimized to identify aneuploidies and subchromosomal aberrations.

**Results**

The mean age of pregnant women was 34.5–3.7 years (range, 18–47). Screen positive test results were reported in 164 cases, leading to a screen positive rate of approximately 1.6%, and confirmed by karyotyping or array-CGH following invasive prenatal diagnosis in 155 (1.5%) cases. Trisomies involving chromosomes 21 (N=65), 18 (N=22) and 13 (N=11) are most frequently reported (1.2%). A total of 30 samples were reported to screen positive for aneuploidies of autosomes other than chr 21, 18 and 13. Most often affected were chr16 (12 cases), chr7 (7 cases), chr22 (6), chr3 (5). 33 aneuploidies involved sexual chromosomes (22 X0 and 11XXY). Subchromosomal events were reported on all autosomes with the exception of chr19 and 17. Also an unbalanced translocation event was found t(3;5)(q24;p15). Overall, clinical sensitivity and specificity were 100% and 99.78%, respectively.

**Conclusion**

This report provides our clinical experience with genome-wide cfDNA analysis for prenatal diagnosis. Genome-wide screening allowed detection of 31 (7.4%) potentially viable clinically relevant chromosomal abnormalities, which would have remained overlooked if only conventional NIPT had been performed.

**P022**  
**Un caso di Holt-Oram in Diagnosi Prenatale. Come la NGS ricorre in aiuto**

A. Mesoraca<sup>1</sup>, A. Cima<sup>1</sup>, C. Dello Russo<sup>1</sup>, M.A. Barone<sup>1</sup>, A. Viola<sup>1</sup>, S. Longo<sup>1</sup>, C. Giorlandino<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servizio di Genetica Medica, Altamedica di Artemisia Roma

<sup>2</sup>Servizio di Diagnosi Prenatale, Altamedica di Artemisia, Roma

E giunta alla nostra attenzione una paziente, inviata dal Servizio ecografico del ns/ Centro, gravida alla 16 settimana di gestazione con morfologia fetale caratterizzata da incompleta visualizzazione del radio di sinistra e modificazione dell'asse metacarpale, ipoplasia del radio di destra, pronazione della mano di destra. Tale condizione ecografica è compatibile con le evidenze cliniche del partner della paziente, portatore di anomalie radiali degli arti superiori, malformazione delle ossa carpali, agenesia del pollice della mano sinistra, disuguaglianza nella lunghezza delle braccia. Nel corso della vita, tale paziente, non aveva mai eseguito un'indagine genetica. In accordo con la coppia, dopo avere discusso sulle possibili cause alla base della problematica ecografica rilevata, si è stabilito di procedere con urgenza alla esecuzione di un' amniocentesi allo scopo anche di porre una diagnosi di certezza sul compagno, sugli amniociti prelevati e su un campione di DNA isolato dal sangue del partner, si è eseguito un sequenziamento utilizzando la metodologia della Next Generation Sequencing. Per la preparazione della libreria abbiamo utilizzato un protocollo di enrichment sviluppato da Illumina e costituito da 4,813 geni, una cumulativa target region size di 12Mb, per un totale di circa 62,000 esoni coperti. Per il sequenziamento venne utilizzata la piattaforma della NextSeq500. Mediante il software di analisi dei dati si è focalizzata l'attenzione su un subset di geni coinvolti nella displasia atrio digitale. Il sequenziamento ha messo in evidenza la presenza, sia sul feto che sul padre, la mutazione NM\_181486.2:c.243-1G>A a livello del gene TBX5, associato alla Sindrome di Holt-Oram. La mutazione non è descritta in letteratura ma sulla base delle caratteristiche ecografiche riscontrate e la natura, sia del gene TBX5 che della mutazione sporadica riscontrata, se ne è ritenuto il possibile ruolo causativo e patogenetico, il tutto discusso nell'ambito di una consulenza genetica conclusiva. Grazie ai tempi rapidi di tale approccio e l'applicazione del protocollo descritto con l'utilizzo della NGS in Diagnosi Prenatale è stata permessa la caratterizzazione genetica di una patologia, fin a quel momento non individuata, e la consegna di un'informazione importante alla coppia che ha dato loro la possibilità, in epoca successiva, di effettuare una diagnosi preimpianto, avvenuta con successo.



**P023**  
**Delezione 7p14.3p14.1 rilevata mediante CGH-Array in gravidanza con polidramnios e malformazioni multiple**

V. Margiani<sup>2</sup>, I. Bellini<sup>2</sup>, R. Murru<sup>1</sup>, S. Deidda<sup>1</sup>, A. Azzena<sup>1</sup>, V.M. Licheri<sup>1</sup>, M. Angiolucci<sup>3</sup>, F. Congiu<sup>3</sup>, S. Orrò<sup>2</sup>, C. Carcassi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. Citogenetica, SC Genetica Medica, PO Binaghi, ATS Sardegna, ASSL Cagliari

<sup>2</sup>Sez. Genetica Medica, Dip. Scienze Mediche, Universit degli Studi di Cagliari

<sup>3</sup>Sez. Ostetricia e Ginecologia, Dip. Scienze Chirurgiche, Universit degli Studi di Cagliari

Descriviamo il caso di una primigravida di 27 anni, con test di screening nel I trimestre (NT e QuadriTest) nella norma. Alla 28ma settimana è comparso un severo polidramnios per il quale sono stati eseguiti accertamenti ecografici e amniocentesi evacuativa. L'esame ecografico ha evidenziato malformazioni fetali (sospetta atresia esofagea, arteria ombelicale unica) che hanno reso necessario lo studio del cariotipo su liquido amniotico risultato nella norma. La piccola, nata pretermine, mostrava un quadro clinico caratterizzato da palatoschisi, tracheomalacia, malformazioni cardiache (difetto interatriale) e restringimento dell'istmo aortico. L'esame FISH della regione critica per la Sindrome di George/VCFS è risultato negativo. L'esame CGH-Array, eseguito con DNA estratto da amniociti in coltura, eseguita con piattaforma OGT e software di analisi CytoSure (OGT) v4.8.32, ha messo in evidenza una delezione nelle bande 7p14.3p14.1 di 8.35 Mb. La regione deleta contiene, tra gli altri, 9 geni malattia: NPSR1, TBX20, ANLN, NME8, SFRP4, POU6F2, MPLKIP, C7orf10, GLI3. Mutazioni di TBX20, con perdita di funzione, sono state identificate in famiglie con difetti del setto atriale (ASD) e altre patologie cardiache congenite simili a quelle riscontrate nel nostro caso. Mutazioni del gene GLI3 (sensibile al dosaggio) sono associate a diverse malattie, tra cui la Cefalopolisindattilia di Greig, sindrome rara associata ad anomalie congenite multiple dovuta alla perdita di funzione del gene e la Sindrome di Pallister-Hall, malattia malformativa caratterizzata da un quadro clinico eterogeneo che comprende alcune caratteristiche riscontrate nella nostra paziente quali difetti cardiaci, palatoschisi e malformazioni delle vie aeree. Pur presentando caratteristiche fenotipiche simili a tali sindromi e l'interessamento degli stessi geni, il caso riportato non può essere classificato in nessuna di queste, ma rientra in un quadro più complesso con coinvolgimento multigenico dovuto alla microdelezione dell'intera regione. Non essendo presente in letteratura, ad oggi, un caso simile, la descrizione di tale microdelezione può aiutare la comprensione della funzione dei geni coinvolti e dei meccanismi che ne regolano l'espressione, e offrire un prezioso contributo per la diagnostica.





**P024**  
**Effetto benefico della curcumina sul DNA di spermatozoi crioconservati**

F. Mottola<sup>1</sup>, M. Santonastaso<sup>2</sup>, C. Iovine<sup>1</sup>, M. Ferrara<sup>1</sup>, V. Feola<sup>1</sup>, M. Di Donato<sup>1</sup>, F. Farina<sup>1</sup>, N. Colacurci<sup>2</sup>, L. Rocco<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dip. di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e Farmaceutiche, Univ. degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Caserta  
<sup>2</sup>Dip. della Donna, del Bambino e di Chirurgia Generale e Specialistica, Univ. degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli

La preservazione della fertilit maschile ricorre sempre piu frequentemente alla crioconservazione del liquido seminale, molto spesso prelinare ad un percorso di Procreazione Medicalmente Assistita (PMA). La qualita dello spermatozoo, in seguito a crioconservazione, e altamente dipendente dal sistema antiossidante; questo processo infatti produce un elevato implemento dei ROS che si traduce in una riduzione della capacita fecondante, a causa del danno indotto al DNA dai ROS stessi. Dati in letteratura, evidenziano la capacita della curcumina, un pigmento dalla tipica colorazione giallo-arancio piuttosto intensa estratto dalla pianta di Curcuma, di contrastare alcuni effetti avversi conseguenti a crioconservazione spermatica. Scopo del lavoro e stato valutare la capacita della curcumina di determinare la riduzione della frammentazione del DNA (DFI) e la variazione dei livelli di espressione del gene antiossidante GPX4, nonché l'aumento della percentuale di spermatozoi mobili e la riduzione dei ROS intracellulari, in spermatozoi crioconservati per 30 giorni. In particolare sono state testate due differenti concentrazioni di curcumina (10µM e 20µM) in aggiunta al terreno di congelamento di 45 campioni di liquido seminale. I risultati hanno mostrato la riduzione statisticamente significativa del DFI e il miglioramento della motilit degli spermatozoi per la concentrazione piu alta testata, oltre alla diminuzione significativa della percentuale di ROS per i campioni trattati con entrambe le concentrazioni di curcumina. Inoltre l'aggiunta di curcumina 20µM causa un aumento statisticamente significativo dei livelli di espressione genica di GPX4 rispetto al controllo. Dunque l'effetto protettivo della curcumina emerge in particolare nei campioni trattati con la massima concentrazione, che non solo e in grado di proteggere il citoplasma dello spermatozoo, ma esplica anche un ruolo protettivo per il DNA manifestato da una overespressione del gene GPX4, un elemento chiave nella maturazione nemaspermica e nella stabilit della cromatina spermatica. La curcumina sarebbe quindi in grado di potenziare il sistema antiossidante fisiologico della cellula e di ridurre i processi apoptotici, migliorando la tecnica di crioconservazione.

**P025**  
**Test contingente e cellule fetali circolanti nella selezione delle gestanti per la diagnosi prenatale invasiva**

P. Guanciali Franchi<sup>1</sup>, C. Palka<sup>1</sup>, E. Morizio<sup>1</sup>, G. Sabbatinelli<sup>1</sup>, M. Alfonsi<sup>1</sup>, D. Fantasia<sup>2</sup>, G. Sitar<sup>1</sup>, P. Benn<sup>3</sup>, G. Calabrese<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Universita di Chieti-Pescara, Italia  
<sup>2</sup>Dipartimento di Ematologia, Ospedale di Pescara, Italia  
<sup>3</sup>Dipartimento di Genetica e Scienze Genomiche, University of Connecticut Health Center, Farmington, CT, USA

Negli ultimi anni sono stati sviluppati molteplici approcci per l'analisi prenatale non invasiva che comprendono gli screening biochimici sul siero materno, la valutazione di specifici marcatori ecografici e l'analisi del DNA fetale circolante. Questi nuovi approcci hanno permesso il conseguimento di alti tassi di rilevazione, la diminuzione dell'utilizzo dei test invasivi (villocentesi e amniocentesi) e, conseguentemente la riduzione di costi e del numero dei feto abortiti. Da gennaio 2013 ad agosto 2016, 24408 gestanti sono state sottoposte al test Contingente per selezionare le gravidanze ad alto rischio per sindrome di Down (SD) da inviare alla diagnosi prenatale invasiva (IPD). Le gestanti nel primo trimestre sono state suddivise in 3 gruppi: rischio elevato, con valori di cut-off di  $\geq 1:30$  (IPD consigliata), rischio intermedio, da 1:31 a 1:899 (consigliato lo screening nel secondo trimestre), e basso rischio,  $\leq 1:900$  (senza ulteriori test), mentre nel secondo trimestre e stato utilizzato un valore di cut-off di  $\geq 1:250$ . Da gennaio 2014, alle gestanti con risultato positivo nel primo trimestre e stata, inoltre, offerta l'analisi delle cellule fetali dal sangue periferico materno. Per la diagnosi fetale di SD il tasso di rilevazione e stato di 96,8% con un tasso di falsi positivi di 2,8% determinando una probabilit di avere un feto affetto con un test positivo (OAPR) di 1:11 (equivalente al valore predittivo positivo-PPV di 8,1%). Sono state, inoltre, identificate altre anomalie cromosomiche determinando un valore di OAPR per tutte le anomalie cromosomiche di 1:6 (PPV 14,1%). Per un sottogruppo di gestanti con risultato positivo al test Contingente, l'analisi in FISH delle cellule fetali circolanti nel sangue materno ha identificato 39 casi normali e 7 anomalie, comprendenti 4 casi con trisomia 21, 2 con trisomia 18 e 1 con triploidia, con il 100% di specificita e il 100% di sensibilit. In conclusione, il test Contingente risulta essere molto efficace nell'identificazione delle gravidanze a rischio e pu essere ulteriormente migliorato in combinazione con l'analisi delle cellule fetali circolanti.

**P026**  
**Diagnosi prenatale su liquido amniotico di una traslocazione sbilanciata 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;q11.2)**

C.E. Vaticano<sup>1</sup>, I.E. Bova, M.G. D'Errigo<sup>1</sup>, R. Ligato<sup>1</sup>, R. Bumbaca<sup>1</sup>, A. Commisso<sup>1</sup>, V. Alesi<sup>2</sup>, A.S. Rulli<sup>1</sup>, A. Novelli<sup>2</sup>, M. Priolo<sup>1</sup>, C. Mamm<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>SSD Genetica Medica, Grande Ospedale Metropolitano Bianchi-Melacrino-Morelli, Reggio Calabria  
<sup>2</sup>UOC Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Bambin Gesù, Roma

Le traslocazioni che coinvolgono i cromosomi X ed Y rappresentano, nell'uomo, un evento raro che, tuttavia, potrebbe influenzare la funzione riproduttiva. Si originano dall'appaiamento delle sequenze omologhe delle regioni pseudoautosomiche in Xp e Yq durante la meiosi paterna e i punti di rottura generalmente coinvolti sono Xp22 e Yq11. Riportiamo un caso di diagnosi prenatale su liquido amniotico definito con un approccio integrato di metodiche di citogenetica convenzionale e molecolare. La paziente, in gravidanza gemellare, e giunta all'indagine prenatale invasiva per et avanzata. All'analisi citogenetica uno dei feto risulta con cariotipo normale 46,XY mentre l'altro presenta un cariotipo a 46 cromosomi con un cromosoma X normale e un cromosoma X derivativo. Il cariotipo dei genitori risulta essere normale. Per caratterizzare il riarrangiamento de novo viene eseguita un'indagine molecolare con metodica Array-CGH che evidenzia la delezione Xp22.33p22.31 (circa 8.4 Mb) e la contemporanea presenza della regione cromosomica del braccio lungo del cromosoma Y a livello della regione Yq11.221q12 (circa 42.8 Mb). Il test con metodica FISH ha permesso di associare il riarrangiamento ad un derivativo da traslocazione sbilanciata tra i cromosomi X e Y, con punti di rottura rispettivamente in Xp22.31 e Y11.221. Alla luce di questi risultati, il cariotipo e stato ridefinito come 46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;q11.2). In letteratura sono riportati piu di 50 casi con tale cariotipo, nella maggior parte dei casi associato ad individui di sesso femminile ed un solo caso di maschio affetto che risulta essere nato morto. Nei casi riportati di sesso femminile, la caratteristica piu frequente e la bassa statura (93%) dovuta probabilmente all'aploinsufficienza del gene SHOX; altre caratteristiche descritte consistono in lievi dimorfismi facciali (28%) e difetti dello scheletro (28%), mentre cardiopatie, anomalie oculari o disabilit intellettive sembrano essere molto piu rare. Non sembrano essere compromesse la fertilit, la regolarita del ciclo mestruale e/o la riserva ovarica delle donne affette. Seguir follow-up alla nascita per la valutazione della correlazione cariotipo-fenotipo.



**P027**  
**Digital droplet PCR e real time PCR nella determinazione del genotipo fetale RHD**

E. Picchiassi, F. Tarquini<sup>1</sup>, S. Meniconi<sup>1</sup>, G.C. Di Renzo<sup>1</sup>, G. Coata<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dip. Scienze chirurgiche e biomediche, Sez. Ostetricia e Ginecologia, Lab. Biochimica e Biologia Molecolare Prenatale, Osp. S. Maria della Misericordia

**Premessa**  
 La genotipizzazione RHD fetale e utile nella selezione di gestanti RHD-negative, che necessitano di immunoprofilassi per prevenire la malattia emolitica del feto e del neonato. A questo scopo, la scoperta del DNA libero fetale nel sangue materno ha permesso lo sviluppo di test prenatali non invasivi, la maggior parte dei quali impiega la real time PCR (rtPCR) e raggiunge risultati ottimali soprattutto se l'analisi avviene al secondo e terzo trimestre di gravidanza, quando la frazione fetale del DNA (FF) e piu alta. Recentemente, e stata introdotta la droplet digital PCR (ddPCR), caratterizzata da elevata sensibilit diagnostica.

**Obiettivo**  
 L'obiettivo di questo studio e stato quello di confrontare l'accuratezza diagnostica di due approcci metodologici per la genotipizzazione di RHD fetale al primo trimestre di gestazione: il primo, basato sulla rtPCR (Picchiassi et al., 2015) e il secondo sulla ddPCR.

**Metodi**  
 Da 89 donne RhD-negative a 10 - 13 settimane di gestazione, e stato ottenuto il plasma. Ciascun campione e stato diviso in due aliquote: il DNA estratto dall'aliquota di 1 ml con QIAmp DSP Virus kit (Qiagen) e stato analizzato in rtPCR (come richiesto dal nostro precedente approccio) mentre il DNA estratto dall'aliquota di 5 ml con QIAmp Circulating Kit (Qiagen) e stato analizzato in ddPCR. Per stabilire il genotipo fetale RHD sono stati utilizzati primer e sonde specifici per gli esoni 5 e 7 del gene RHD, mentre telomerasi e argonata 1 sono stati usati come geni di riferimento.

**Risultati**  
 Dalla tipizzazione sierologica postnatale, e risultato che 24 donne hanno partorito un neonato RhD negativo e 65 positivo. La rtPCR ha determinato correttamente il genotipo fetale RHD in 79 campioni ottenendo una sensibilit del 87,7% e specificita del 91,7% con il 12,3% dei risultati falsi negativi (FN) mentre la ddPCR ha raggiunto una sensibilit del 96,9%, specificita del 100% con 3,1% di FN. Tra i campioni di donne con feto RHD-positivo, 3 campioni avevano una FF molto bassa ( $\leq 4\%$ ) e 2 di questi sono risultati FN in rtPCR.

**Conclusioni**  
 La ddPCR ha mostrato un'accuratezza diagnostica maggiore della rtPCR, identificando correttamente il 97,8% dei campioni, anche quelli con FF molto bassa. Quindi, l'impiego della ddPCR potrebbe consentire una genotipizzazione RHD fetale piu accurata gi al primo trimestre di gravidanza, riducendo il numero dei FN. Pertanto, l'approccio basato sulla ddPCR potrebbe essere offerto come test prenatale non invasivo evitando sia le conseguenze negative sulla salute fetale che le immunoprofilassi prenatali non mirate.







P028

**Restrictive dermatopathy: novel ZMPSTE24 mutation and clues for prenatal diagnosis**

V. Guida<sup>1</sup>, A. De Luca<sup>1</sup>, E. Marchionni<sup>2,3</sup>, L. Menale<sup>2,3</sup>, G. Fatigante<sup>4</sup>, A. Giovannetti<sup>5</sup>, T. Mazza<sup>5</sup>, V. Caputo<sup>3</sup>, A. Pizzutti<sup>3</sup>, A. Ferraris<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Molecular Genetics Unit, Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy

<sup>2</sup>Clinical Genetics Unit, Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy

<sup>3</sup>Department of Experimental Medicine, Sapienza University, Rome, Italy

<sup>4</sup>Obstetrics and Gynecology Unit, Santo Spirito Hospital, Rome, Italy

<sup>5</sup>Bioinformatics Unit, Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, San Giovanni Rotondo, Italy

**Introduction**

Restrictive dermatopathy (RD) is a rare lethal genodermatosis caused by either heterozygous mutations in the lamin A/C gene (LMNA) or by biallelic mutations in the zinc metalloproteinase STE24 gene (ZMPSTE24).

**Materials and Methods**

In a couple of apparently non consanguineous parents, two consecutive pregnancies were complicated by oligohydramnios, premature rupture of membranes, preterm delivery, and similar foetal abnormalities detected by ultrasonography, including intrauterine growth restriction, dysmorphisms and reduced foetal movements. Both male babies shared at birth facial dysmorphisms, proximal and distal arthrogyposis, and a progeroid appearance suggestive of a laminopathy. The first one was a stillborn at 31 weeks of gestation, while the second one, born at 28 weeks, died at 8 days. A DNA sample of the second child and his parents was obtained to perform genetic tests, including cytogenomic microarray and next generation sequencing.

**Results**

A homozygous splicing mutation in the ZMPSTE24 gene was identified in the second child. Both parents were heterozygous carriers. This novel frameshift mutation, determining exon 7 skipping and introducing a premature stop codon, is compatible with the severe RD phenotype observed in both children. Analysis of LMNA and array-CGH were negative.

**Conclusions**

While the postnatal RD phenotype can be fairly recognizable, an extensive description of prenatal ultrasound findings is lacking. Comparing data of present patients with a review of the literature, we suggest that several foetal anomalies are recurrent in RD and its recognizable combination should help the prenatal diagnosis of this condition.

P029

**Studio multicentrico retrospettivo del Gruppo di Studio Italiano sui DSD (Disturbi della Differenziazione Sessuale): aspetti clinici, endocrinologici e genetici di una coorte di soggetti con mutazioni in NR5A1**

F. Baldinotti<sup>1</sup>, L. Baldazzi<sup>2</sup>, A. Balsamo<sup>3</sup>, F. Baronio<sup>3</sup>, A. Cassio<sup>3</sup>, G. Corsello<sup>4</sup>, S. Einaudi<sup>5</sup>, M. Giuffrè<sup>1</sup>, P. Grammatico<sup>6</sup>, N.A. Greggio<sup>7</sup>, J. Gutierrez-Rubalcava<sup>7</sup>, N. Improda<sup>12</sup>, S. Majore<sup>6</sup>, P. Marchese<sup>8</sup>, G. Marrocco<sup>9</sup>, S. Menab<sup>2</sup>, E. Merlini<sup>10</sup>, A. Michelucci<sup>1</sup>, R. Ortolano<sup>3</sup>, A.M. Rapone<sup>6</sup>, G. Russo<sup>11</sup>, M. Salerno<sup>12</sup>, S. Scommegna<sup>13</sup>, M. Stancampiano<sup>11</sup>, D. Tessaris<sup>5</sup>, M.A. Caligo<sup>1</sup>, S. Bertelloni<sup>8</sup>

<sup>1</sup>SOD Genetica Molecolare, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Osp. S.Chiera, Pisa

<sup>2</sup>Lab. Genetica Molecolare, U.O. Pediatria, Azienda Ospedaliero Universitaria S.Orsola-Malpighi, Bologna

<sup>3</sup>U.O. Pediatria, Dip. Scienze Mediche e Chirurgiche, Azienda Ospedaliero Universitaria S.Orsola-Malpighi, Bologna

<sup>4</sup>U.O. Genetica e U.O. Neonatologia, Dip. Materno Infantile, Universit di Palermo

<sup>5</sup>SSD Endocrinologia Pediatrica, Osp. Regina Margherita - Universit degli Studi di Torino, Citta' della Salute e della Scienza, Torino

<sup>6</sup>U.O. Genetica Medica, Osp. S.Camillo Forlanini, Roma

<sup>7</sup>Endocrinologia e Adoloscenza Pediatrica, Dip. di Salute della Donna e del Bambino, Osp. Univ. Padova

<sup>8</sup>U.O. Pediatria, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Osp. S.Chiera, Pisa

<sup>9</sup>U.O. Chirurgia Pediatrica, Osp. S.Camillo Forlanini, Roma

<sup>10</sup>Chirurgia Pediatrica, Osp. Regina Margherita, Torino

<sup>11</sup>U.O. Pediatria e Endocrinologia, Osp. S.Raffaele, Milano

<sup>12</sup>U.O. Endocrinologia Pediatrica, Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Universit Federico II, Napoli

<sup>13</sup>U.O. Endocrinologia Pediatrica, Osp. S.Camillo Forlanini, Roma

**Premessa**

Il gene NR5A1 codifica per SF1 (Steroidogenic Factor 1), uno dei principali regolatori trascrizionali dello sviluppo surrenale/gonadico e della funzione riproduttiva. Mutazioni in NR5A1, inizialmente rilevate in casi di disgenesia gonadica (DG) e insufficienza surrenale (IS), sono state oggi associate ad uno spettro fenotipico di 46,XY DSD più ampio con/senza IS, che varia da genitali esterni completamente femminili a genitali ambigui, forme lievi di DG, forme di ipospadia grave, ma anche infertilità maschile isolata.

**Scopo**

Valutare le caratteristiche cliniche, endocrinologiche e genetiche di una coorte di pazienti italiani con 46,XY DSD e mutazioni di NR5A1.

**Metodo**

Studio retrospettivo multicentrico del Gruppo di Studio Italiano dei DSD (It-DSD) su soggetti seguiti e caratterizzati molecularmente nei centri It-DSD.

**Risultati**

Sono stati reclutati 23 soggetti afferenti a 7 centri italiani. Il fenotipo, alla prima osservazione, variava da femminile con clitoridomegalia e/o ernia inguinale contenente gonadi, a maschile con micropene. L'ipotesi di deficit di SF1 da alterazione genetica di NR5A1 era stata sospettata come prima diagnosi solo in un caso. Alla nascita era stato assegnato il sesso femminile in 15 casi, quello maschile in 7 ed in uno non c'era stata assegnazione. Durante il follow-up in 3 casi è stato riattribuito del sesso anagrafico. L'analisi genetica aveva rilevato mutazioni del gene NR5A1 in eterozigosi in 22 soggetti ed in omozigosi in uno, che presentava anche IS.

**Conclusioni**

Nella maggioranza dei casi italiani con 46,XY DSD da mutazione di NR5A1 è stato assegnato il sesso femminile. L'ipotesi diagnostica iniziale è risultata errata nella maggior parte dei soggetti, suggerendo che l'assegnazione di sesso dovrebbe essere fatta dopo adeguate indagini endocrinologiche e genetiche che consentano una corretta caratterizzazione. In tal senso le nuove tecnologie NGS permettono oggi una più rapida e completa identificazione dei difetti genetici. La nostra casistica di pazienti con mutazioni di NR5A1 ha permesso di meglio definire lo spettro clinico e genetico di questo raro 46,XY DSD. Il Gruppo di Studio It-DSD può rappresentare un modello per ulteriori studi collaborativi nell'ambito dei DSD in concerto con le Società scientifiche di riferimento.



P030

**Diagnosi di esclusione di sindrome di Treacher Collins mediante NGS su DNA da amniociti coltivati**

S. Amabile<sup>1,2</sup>, E. Agolini<sup>3</sup>, A. Novelli<sup>3</sup>, P. Fontana<sup>1</sup>, M.S. Lonardo<sup>1</sup>, M. Falco<sup>1,2</sup>, R. Pettillo<sup>1,4</sup>, G. Scarano<sup>1</sup>, F. Lonardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.S.D. di Genetica Medica, A.O.R.N. G. Rummo, Benevento

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Universit degli Studi di Napoli Federico II

<sup>3</sup>UOC Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

<sup>4</sup>Servizio di Cardiologia e Genetica Medica, Universit della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli

La s. di Treacher Collins (TCS) è caratterizzata da ipoplasia delle ossa zigomatiche e della mandibola, anomalie dell'orecchio esterno, rime oculari rivolte verso il basso e l'esterno, coloboma della palpebra inferiore, assenza delle ciglia nel terzo esterno delle palpebre inferiori. Circa il 40%-50% degli individui ha una perdita uditiva conduttiva attribuibile alla malformazione della catena degli ossicini ed all'ipoplasia delle cavità dell'orecchio medio. Altre anomalie meno comuni comprendono la palatoschisi con o senza labioschisi, e la stenosi o l'atresia (unilaterale o bilaterale) delle coane. Solitamente l'intelligenza è normale, anche se sono stati segnalati casi con disabilità intellettiva lieve. La prevalenza è stimata tra 1:10.000 e 1:50.000. La TCS solitamente è dovuta a mutazioni nei geni TCOF1 (78%-93%), POLR1C o POLR1D (8%). La trasmissione è autosomica dominante, ma sono noti casi con trasmissione autosomica recessiva, dovuti principalmente a mutazioni in POLR1C. Riportiamo il caso di una paziente di 35 anni affetta da disabilità intellettiva moderata e dismorfismi facciali, giunta in consulenza prenatale alla XXI settimana di gestazione. All'anamnesi familiare si evidenziavano numerosi individui con fenotipo clinico fortemente suggestivo di TCS, mai indagati da un punto di vista molecolare. Considerata la modalità di trasmissione della patologia nell'ambito della famiglia (AD), e la presenza di due casi di decessi neonatali, abbiamo ritenuto opportuno tentare di escludere che il nascituro fosse affetto da TCS. Il tempo a disposizione era limitatissimo, ma sfruttando la tecnologia Next Generation Sequencing (NGS) è stato possibile testare nel DNA della probanda un pannello di geni associati alla sindrome, eseguendo un unico esame. È stata individuata la variante patogenetica frameshift c.3118\_3119dupG; p.Ala1040GlyfsTer47 nel gene TCOF1 in eterozigosi. È stata quindi immediatamente effettuata la ricerca della stessa variante anche nel DNA fetale, con esito negativo. Attraverso la presentazione di questo caso vogliamo sottolineare l'importanza, particolarmente in ambito prenatale, di poter contare sulla tecnologia NGS, che consente di giungere rapidamente ad una diagnosi anche in casi in cui la variante genica da ricercare non è nota.





**P031  
Diagnostic Yield of Genome-Wide SNP Arrays in a Retrospective Cohort of Malformed Fetuses**

A.M. Spinelli<sup>1</sup>, S. Cappellani<sup>2</sup>, I. Fantasia<sup>2</sup>, F. Guidolin<sup>1</sup>, S. Sarman<sup>1</sup>, E. Rubinato<sup>4</sup>, L. Zandon<sup>3</sup>, A. Fabretto<sup>2</sup>, P. Guastalla<sup>2</sup>, R. Bussani<sup>3</sup>, T. Stampalija<sup>2</sup>, V. Pecile<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University of Padova, Padova, Italy  
<sup>2</sup>Institute for Maternal and Child Health IRCCS Burlo Garofolo, Trieste, Italy  
<sup>3</sup>Institute of Pathologic Anatomy, University of Trieste, Trieste, Italy  
<sup>4</sup>University of Trieste, Trieste, Italy

Introduction. In the last fifteen years microarrays have rapidly become the de facto standard to test for constitutive genomic diseases in clinical genetics and they have then made a similar fast-paced entrance into the field of prenatal diagnosis.

With this work we aim to chart what have been done at our Centre since the systematic implementation of SNP arrays as a first line test in cases of in utero malformations.

Methods. We reviewed records of all cases of fetal malformations diagnosed by prenatal ultrasound at Trieste Children's Hospital from January 1<sup>st</sup>, 2012 to April 30<sup>th</sup>, 2017. DNA was isolated from chorionic villi, amniocytes, cord blood or fetal skin by standard methods and then processed on the Illumina Human OmniExpress-12 Bead Chip platform, according to manufacturer's protocol. Normalization of raw image intensity data, genotype calls and clustering were performed with Illumina GenomeStudio software v2011.1. CNVs were called using the PennCNV program and mapped to human reference genome hg19 after filtering out those found in the Database of Genomic Variants. Clinical relevance was assessed as currently recommended (Kearney HM et al., 2011; Hehir-Kwa JY et al., 2013).

Results. We identified causative cytogenomic anomalies in 25 fetuses. As a precautionary measure two other CNVs were classified as likely pathogenic, since evidence was not sufficient to ascertain their significance beyond a reasonable doubt. Of all those findings, four would have definitely been missed with standard banding chromosome analysis and one could possibly have, but was in fact visible at microscope. aSNP also revealed chromosome 16 uniparental disomy as a consequence of trisomy rescue, showed maternal contamination and quickly traced down the genic content of a small, mosaic, supernumerary marker chromosome.

Discussion. In our 5-year experience at a tertiary care centre, molecular karyotyping with aSNP contributed to establishing a definite diagnosis in around 12.5% of structural ultrasound defects (25+2 CNVs out of 215 singleton pregnancies). The additional yield of aSNP after a normal karyotype was 2.3%. These results are entirely in line with previous studies in the peer-reviewed literature (Shaffer LG et al., 2013; Callaway JLA et al., 2013; De Wit MC et al., 2014). In addition SNP arrays made possible a range of tasks that almost invariably required genotype information and, thus, would have triggered further time-consuming laboratory work-up.

In conclusion both aggregate data and case study support the notion that SNP arrays are a robust diagnostic tool in fetal medicine.

**P032  
Una nuova mutazione di splicing in MAP3K7 causa una variante della sindrome cardio-spondilo-carpo-facciale sovrapponibile alla sindrome da microdelezione di TAB2**

S. Morlino<sup>1</sup>, C. Dordoni<sup>2</sup>, V. Cinquina<sup>2</sup>, G. Santoro<sup>2</sup>, P. Grammatico<sup>1</sup>, M. Venturini<sup>3</sup>, M. Colombi<sup>2</sup>, M. Castori<sup>4</sup>, M. Ritelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UOC Lab. di Genetica Medica, Dip. di Medicina Molecolare, AO San Camillo-Forlanini, "Sapienza" Università di Roma  
<sup>2</sup>Lab. di Citogenetica e Genetica Molecolare, Sez. di Biologia e Genetica, Dip. di Medicina Molecolare e Traslationale, Università degli Studi di Brescia  
<sup>3</sup>UO Dermatologia, Dip. Di Scienze Cliniche e Sperimentali, Osp. Univ. Spedali Civili, Brescia  
<sup>4</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (Foggia)

Rare mutazioni dominanti nel gene MAP3K7, che codifica per la chinasi 1 attivata dal TGF-beta (TAK1), causano la sindrome cardio-spondilo-carpo-facciale (CSCFS), una condizione finora descritta in 6 casi, 3 sporadici e 3 familiari. Mutazioni gain-of-function nello stesso gene si associano alla displasia frontometafisaria (DFM) di tipo 2. La DFM è una condizione geneticamente eterogenea, associata anche a mutazioni in FLNA (DFM tipo 1) e, raramente, in TAB2 (DFM tipo 3). Per questo gruppo di geni, benché mutazioni in FLNA possano causare anche altri fenotipi, non sono disponibili evidenze circa l'esistenza di altre serie fenotipiche che comprendano la CSCFS. Presentiamo il caso di una bambina di 7 anni affetta da CSCFS con una nuova mutazione in MAP3K7, che genera un nuovo sito accettore di splicing, come dimostrato dall'analisi dell'mRNA. Il confronto di questo caso con quello di altri due nostri pazienti, precedentemente descritti con aploinsufficienza di TAB2, ha evidenziato un significativo overlap clinico. In particolare, entrambe le condizioni (CSCFS e delezione/aploinsufficienza di TAB2) sono riconoscibili per l'associazione di facies peculiare, bassa statura, brachidattilia, soffici dei tessuti, ipermobilità articolare generalizzata ed eventuali difetti cardiaci o del tratto digerente. Questi dati sono ulteriormente supportati dalla recente pubblicazione di altri casi con delezione di TAB2 da parte di altri gruppi di ricerca. Questa sovrapposizione riflette le strette correlazioni molecolari tra le proteine codificate da TAB2 e MAP3K7. Infatti TAB2 codifica per la proteina adattatrice di TAK1, codificata a sua volta da MAP3K7, con cui interagisce strettamente nella pathway non canonica del TGF-beta. Proponiamo pertanto che la CSCFS e la sindrome da aploinsufficienza di TAB2 rappresentino una nuova serie fenotipica nell'ambito delle patologie correlate alla pathway non canonica del TGF-beta.

**P033  
Ri-definizione clinico-molecolare dell'overlap sindrome di Ehlers-Danlos ipermobile/osteogenesi imperfetta**

S. Morlino<sup>1</sup>, E. Agolini<sup>2</sup>, M. Ritelli<sup>3</sup>, T. Mazza<sup>4</sup>, D. D'Angelantonio<sup>1</sup>, G. Fabozzi<sup>1</sup>, M. Di Rocco<sup>5</sup>, P. Grammatico<sup>1</sup>, A. Novelli<sup>2</sup>, M. Colombi<sup>3</sup>, M. Castori<sup>6</sup>

<sup>1</sup>UOC Lab. di Genetica Medica, Dip. di Medicina Molecolare, AO San Camillo-Forlanini, "Sapienza" Università di Roma  
<sup>2</sup>UO Lab. di Genetica Medica, Dip. dei Laboratori e Diagnostica di Immunologia, IRCCS Osp. Ped. "Bambino Gesù", Roma  
<sup>3</sup>Lab. di Citogenetica e Genetica Molecolare, Sez. di Biologia e Genetica, Dip. di Medicina Molecolare e Traslationale, Università degli Studi di Brescia  
<sup>4</sup>UO Bioinformatica, Ist. CSS Mendel, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, Roma  
<sup>5</sup>UO Malattie Rare, Dip. di Pediatria, Ist. Giannina Gaslini, Genova  
<sup>6</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (Foggia)

La sindrome di Ehlers Danlos (SED) ipermobile (SEDI) L tra le più comuni connettivopatie ereditarie, caratterizzata da ipermobilità articolare generalizzata, manifestazioni muscolo-scheletriche secondarie e coinvolgimento sistemico. Ad oggi rimane priva di causa molecolare nota. E verosimile che nel fenotipo SEDI si collochino manifestazioni atipiche di patologie affini, che sfuggono alla conferma molecolare per l'assenza dei criteri diagnostici attualmente noti. La nuova classificazione del 2017 ha definito per la SEDI criteri diagnostici che prevedono la diagnosi differenziale con altre patologie tramite test genetico. Tra queste, l'osteogenesi imperfetta (OI) nella sua forma attenuata mostra segni clinici comuni alla SEDI, suggerendo l'esistenza di uno spettro continuo. L'OI è solitamente causata da mutazioni in COL1A1/2. Di rilievo, nessuno dei pochissimi pazienti descritti, con caratteristiche overlap tra OI/SED (fenotipo escluso dalla nuova classificazione) e mutazioni in regioni specifiche di COL1A1/2, ha presentato caratteristiche cliniche suggestive di altre varianti monogeniche di SED. Qui descriviamo cinque famiglie (due casi sporadici e tre familiari) originariamente classificate come SEDI, risultate positive allo screening molecolare di COL1A1/2. Ognuna di queste famiglie era stata accertata per la presenza nel caso indice di ipermobilità articolare generalizzata ed almeno una manifestazione muscolo-scheletrica secondaria. L'esecuzione del test genetico, avvenuto tramite un pannello NGS contenente i geni associati alle forme principali di SED, è stato richiesto per la presenza di sclere blu ed in assenza di tasso annuale di fratture prepuberali > 1, dentinogenesi imperfetta, deformità delle ossa lunghe, scoliosi deformante o bassa statura. Il nostro studio si pone l'obiettivo di evidenziare l'esistenza di un sottogruppo di pazienti con sospetta SEDI e mutazioni patogene in COL1A1/2. Questi possono essere selezionati per la presenza di sclere blu ed altre significative caratteristiche minori. La conferma molecolare aiuta nel riconoscimento della patologia e nella definizione di programmi assistenziali dedicati. Questi dati preliminari stimolano l'opportunità di istituire registri nazionali ed internazionali sull'argomento.



**P034  
From perinatal period to adulthood: the variable effect of COL4A1-COL4A2 mutations**

A. Asaro<sup>1</sup>, M. Valente<sup>1</sup>, L. Pantoni<sup>2</sup>, D. Battaglia<sup>3</sup>, P. Martelli<sup>4</sup>, S. Gagliardi<sup>1</sup>, G. Grieco<sup>1</sup>, S. Orcesi<sup>5</sup>, G. Micieli<sup>6</sup>, C. Cereda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genomic and Post-Genomic Center, C. Mondino National Neurological Institute, Pavia, Italy  
<sup>2</sup>NEUROFARBA Department, Neuroscience section, Florence, Italy  
<sup>3</sup>Child Neurology and Psychiatry Unit, Catholic University, Rome, Italy  
<sup>4</sup>Unit of Neuropsychiatry, A.O. Spedali Civili, Brescia, Italy  
<sup>5</sup>Unit of Child Neurology and Psychiatry, C. Mondino National Neurological Institute, Pavia, Italy  
<sup>6</sup>Department of Emergency Neurology, C. Mondino National Neurological Institute, Pavia, Italy

Introduction: COL4A1 and COL4A2 are extracellular matrix proteins that form heterotrimers and are present in almost all basement membranes in every tissue. COL4A1 and COL4A2 are pleiotropic genes and their mutations contribute to a broad spectrum of disorders including cerebral small vessel disease of varying severity like porencephaly, white matter abnormalities in infants and spontaneous intracerebral hemorrhages during adulthood, ocular manifestations of variable types and nephropathy. The aim of the study: to expand the genotype-phenotype correlation of COL4A1 and COL4A2 mutations and to obtain a fast and accurate strategy for genetic diagnosis in infant and adult diseases. Materials and Methods: DNA was isolated from peripheral blood of a cohort of 58 unrelated patients (30 infants and 28 adults) referred to our laboratory; the coding regions of COL4A1 and COL4A2 genes were analyzed by performing a TruSeq Custom Amplicon Low Input (Illumina) assay for targeted-resequencing. Sanger sequencing was used for variant confirmation. Results: Data analysis detected mutations in 9 patients (15.5%) of our cohort with an autosomal dominant pattern of inheritance. Six of them are infants affected by perinatal intraventricular hemorrhage, with varying degrees of severity and other additional features, such as brain calcification and cataracts, instead three of them are adult presented with recurrent cerebral stroke. The segregation analysis was performed on the available parents and relatives. Overall, 8 different variants were identified, 7 of them are new mutations (5 in COL4A1 and 2 in COL4A2), while in two cases was found a previously reported pathogenetic variation in COL4A1. As ours, the most commonly pathogenetic mutations are located in the collagenous domain, essential to form stable triplehelices. Conclusions: COL4A1 and COL4A2 mutations are responsible of a broad range of diseases starting from fetal period until late adulthood. In this study we found 7 new mutations (6 missense and 1 splicing) and confirmed that allelic heterogeneity contributes to phenotypic variability. Further studies on large cohorts of patients are needed to understand the pathological mechanisms of this genetic disorders and to set prognostic tools for developing targeted treatments.







**P035**  
**Transcriptome analysis in skin fibroblasts of patients with vascular Ehlers-Danlos syndrome due to dominant negative COL3A1 mutations reveals abnormal endoplasmic reticulum homeostasis related to the extracellular matrix disassembly**

G. Carini<sup>1</sup>, N. Chiarelli<sup>1</sup>, N. Zoppi<sup>1</sup>, M. Ritelli<sup>1</sup>, M. Colombi<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Div. of Biology and Genetics, Dep. of Molecular and Translational Medicine, University of Brescia, Brescia, Italy

Vascular Ehlers-Danlos syndrome (vEDS) is a dominant inherited connective tissue disorder caused by mutations in the COL3A1 gene that encodes type III collagen (COLLIII), which is the most expressed collagen in blood vessels and hollow organs. The majority of disease-causing variants in COL3A1 are glycine substitutions and in-frame splice mutations in the triple helix domain that, through a dominant negative effect, are associated with the severe clinical spectrum of vEDS, characterized by fragility of soft connective tissues with arterial and organ ruptures. Although disruption of the COLLIII triple helical structure leads to abnormal protein folding, the molecular mechanism thereby contributing to the etiology of vEDS is poorly studied. To shed lights into disease mechanisms underlying vEDS, we performed gene expression profiling in cultured skin fibroblasts from three patients with different structural COL3A1 mutations. Transcriptome analysis revealed significant changes in the expression levels of genes involved in maintenance of cell redox and endoplasmic reticulum (ER) homeostasis, COLs biosynthesis/folding and extracellular matrix (ECM) organization, formation of the proteasome complex, and cell cycle regulation. Protein studies showed that aberrant COLLIII expression is associated with the disassembly of many structural ECM constituents, such as fibrillins, elastin, and EMILINs, as well as with the reduction of the proteoglycans perlecan, decorin, and versican, all playing a pivotal role in the maintenance of vascular ECM homeostasis. Furthermore, the altered distribution of the ER marker protein disulfide isomerase PDI and the strong reduction of the COLs-modifying enzyme FKBP22 are consistent with the disturbance of ER-related homeostasis and COLs biosynthesis/post-translational modifications indicated by microarray data. Our findings provide a picture of the gene expression changes in vEDS skin fibroblasts and highlight that dominant negative mutations in COL3A1 affect maturation and deposition into the ECM of several structural proteins crucial to the integrity of soft connective tissues, and that ER dysfunction might play an important role in the etiology of this severe vascular disorder.

**P036**  
**Further delineation of the linkeropathy syndrome due to glucuronyltransferase I-deficiency in a family with B3GAT3 compound heterozygosity for two novel mutations revealed by whole exome sequencing**

G. Santoro<sup>1</sup>, C. Dordoni<sup>1</sup>, E. Giacomuzzi<sup>1</sup>, N. Chiarelli<sup>1</sup>, M. Venturini<sup>2</sup>, M. Colombi<sup>1</sup>, M. Ritelli<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Div. of Biology and Genetics, Dep. of Molecular and Translational Medicine, University of Brescia, Brescia, Italy  
<sup>2</sup>Div. of Dermatology, Dep. of Clinical and Experimental Sciences, Spedali Civili University Hospital, Brescia, Italy

Linkeropathies are a group of heterogeneous syndromes along a spectrum of skeletal and connective tissue disorders (CTDs) with the full disease range yet to be defined. Linkeropathy genes encode for enzymes branching glycosaminoglycan chains onto proteoglycans via a common tetrasaccharide linker; two encode for xylosyltransferases (XYLT1/2), two for galactosyltransferases (B4GALT7, B3GALT6), and one for a glucuronyltransferase (B3GAT3). XYLT1 and XYLT2 mutations are associated respectively with Desbuquois dysplasia type 2 and with spondylo-ocular syndrome; B4GALT7 and B3GALT6 mutations lead to spondylodysplastic Ehlers-Danlos syndrome (spEDS), and B3GAT3 mutations are reported with multiple joint dislocations, short stature, congenital heart defects, and craniofacial dysmorphism. For B3GAT3, only 23 patients, all - except 1 - from 9 consanguineous families with homozygous missense variants, have been described ranging in phenotypic severity from mild to severe and resembling Larsen-, Antley-Bixler-, Shprintzen-Goldberg-, and Geroderma osteodysplastica-like syndromes. Here, we report on a 16-year-old Italian girl with a clinical suspicion of EDS. The patient was born to non-consanguineous parents and presented with facial dysmorphism, i.e., dolichocephaly, prominent forehead, enophthalmos, midface hypoplasia, micrognathia, and low-set ears, short stature, severe kyphoscoliosis, pectus carinatum, joint laxity with recurrent dislocations, muscle hypotonia, bilateral radio-ulnar synostosis, atlanto-occipital instability, and bilateral pes planovalgus. Medical history included severe low bone density, congenital hip dislocation, atrial septal defect, and anterior ectopic anus. Overall this clinical presentation was more consistent with a Larsen-like phenotype. Whole exome sequencing revealed compound heterozygosity for two novel B3GAT3 missense mutations within the glycosyltransferase domain of the protein (p.Arg161Trp/p.Arg297Trp). Our findings expand the B3GAT3 allelic repertoire and confirm the extended phenotypic range of B3GAT3 mutations overlapping skeletal dysplasias and soft CTDs including EDS. We provide a comparative overview of the phenotypic features of linkeropathies offering future perspectives for EDS nosology and clinical research in this field.



**P037**  
**Rivalutazione di una coorte di 50 pazienti affetti da Sindrome di Ehlers-Danlos vascolare secondo la nosologia di Villefranche con la nuova nosologia del 2017**

C. Dordoni<sup>1</sup>, C. Rovati<sup>1</sup>, M. Venturini<sup>2</sup>, M. Castori<sup>3</sup>, M. Ritelli<sup>1</sup>, M. Colombi<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Sez. di Biologia e Genetica, Dip. di Medicina Molecolare e Trasazionale, Università di Brescia, Brescia, Italia  
<sup>2</sup>U.O. di Dermatologia, Dip. di Scienze Cliniche e Sperimentali, Spedali Civili, Brescia, Italia  
<sup>3</sup>U.O.C. di Genetica Medica, IRCCS-Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Foggia, Italia

La sindrome di Ehlers-Danlos vascolare (vEDS) è una rara connettivopatia ereditaria dovuta a mutazioni dominanti in COL3A1 che codifica per il collagene di tipo III, un componente strutturale di vasi sanguigni e organi cavi. La fragilità dei vasi e degli organi interni facilita la formazione di dissecazioni/rotture spontanee e determina una ridotta aspettativa di vita. La diagnosi è posta generalmente in et giovane-adulta, in seguito a una complicanza maggiore, o post-mortem. Nella nosologia di Villefranche il sospetto di vEDS era posto in presenza di 2 segni maggiori tra: cute sottile, traslucida; fragilità arteriosa/uterina/intestinale; marcata propensione alla formazione di ecchimosi; facies caratteristica. Nella nuova nosologia del 2017 il test genetico è raccomandato in presenza di almeno 1 dei seguenti criteri minimi: storia familiare con mutazione definita, rottura/dissecazione arteriosa prima dei 40 anni, rottura spontanea del sigma, pneumotorace spontaneo in combinazione con altri segni minori, ma suggestivi di vEDS. Presentiamo la rivalutazione, in base ai criteri minimi della nosologia del 2017, di una casistica di 50 pazienti vEDS (37 famiglie), con mutazione causale nota, diagnosticati secondo la nosologia di Villefranche. Il 92% dei pazienti rispetta i criteri diagnostici della nosologia di Villefranche, ma solo il 72% presenta almeno uno dei criteri minimi della nuova nosologia; la familiarità è il solo criterio minimo presente nel 24% dei casi (10 famiglie). La presenza di propensione alla formazione di ecchimosi, cute sottile/traslucida, facies caratteristica, rottura uterina ha permesso la diagnosi secondo la nosologia di Villefranche in quei pazienti che non presentano nessun criterio minimo di quella nuova. In conclusione i criteri minimi della nosologia delle EDS del 2017 benché verosimilmente più specifici di quelli di Villefranche sembrano essere meno sensibili e possono quindi ridurre il sospetto clinico nei casi senza storia familiare e/o complicanze vascolari/intestinali maggiori. La valutazione dei segni mucocutanei e vascolari minori e il test genetico restano quindi fondamentali per la diagnosi precoce dei pazienti con una presentazione clinica incompleta/atipica in assenza di storia familiare ed eventi catastrofici.

**P038**  
**Expanding the clinical and mutational spectrum of B4GALT7-spondylodysplastic Ehlers-Danlos syndrome**

V. Cinquina<sup>1</sup>, C. Dordoni<sup>1</sup>, M. Venturini<sup>2</sup>, G. Santoro<sup>1</sup>, P. Calzavara-Pintoni<sup>2</sup>, M. Colombi<sup>1</sup>, M. Ritelli<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Div. of Biology and Genetics, Dep. of Molecular and Translational Medicine, University of Brescia, Brescia, Italy  
<sup>2</sup>Div. of Dermatology, Dep. of Clinical and Experimental Sciences, Spedali Civili University Hospital, Brescia, Italy

Spondylodysplastic Ehlers-Danlos syndrome (spEDS) is a very rare connective tissue disorder that groups the phenotypes caused by biallelic B4GALT7, B3GALT6, and SLC39A13 mutations. In the 2017 EDS nosology, minimal criteria (general and gene-specific) for a clinical suspicion of spEDS have been proposed, but confirmatory molecular testing is mandatory to reach a final diagnosis. B4GALT7 and B3GALT6 encode galactosyltransferase I (β4GALT7 and β3GALT6), respectively, that are Golgi-resident enzymes involved in synthesizing the glycosaminoglycan linker region of proteoglycans; SLC39A13 encodes the trans-membrane Zrt/irt like protein 13 that regulates the influx of zinc into the cytosol. The majority of spEDS patients presented with short stature, skin hyperextensibility, facial dysmorphisms, peculiar radiological findings, muscle hypotonia and joint laxity and/or its complications. To date only 7 patients with β4GALT7-deficiency (spEDS-B4GALT7) have been described and their clinical data suggested that, in addition to short stature and muscle hypotonia, radioulnar synostosis, hypermetropia, and delayed cognitive development might be a hallmark of this specific type of spEDS. Additional 22 patients affected with an overlapping phenotype, i.e., Larsen of Reunion Island syndrome (LRS), all carrying a homozygous B4GALT7 mutation, are also recognized. Here, we report on a 30-year-old Moroccan woman who fitted the minimal criteria to suspect spEDS, but lacked radioulnar synostosis and intellectual disability and presented with neurosensorial hearing loss and limb edema of lymphatic origin. Sanger sequencing of B4GALT7 was performed since the evaluation of the spEDS gene-specific minor criteria suggested this specific subtype, which revealed the novel homozygous c.829G>T, p.Glu277\* mutation. RT-PCR on RNA from patient's blood demonstrated that the variant, which affects the first nucleotide of exon 6, leads to multiple aberrant splice outcomes. Our findings expand both the clinical and mutational spectrum of this ultrarare connective tissue disorder and the comparison of the patient's features with those of the other spEDS and LRS patients reported up to now offers future perspectives for spEDS nosology and clinical research in this field.





**P039**  
**Spectrum of mucocutaneous, ocular and facial features and delineation of novel presentations in a cohort of 62 classical Ehlers-Danlos syndrome patients**

C. Dordoni<sup>1</sup>, M. Venturini<sup>2</sup>, C. Ciaccio<sup>1</sup>, M. Gatti<sup>1</sup>, N. Chiarelli<sup>1</sup>, S. Morlino<sup>3</sup>, A. Zanca<sup>2</sup>, P. Calzavara-Pinton<sup>2</sup>, N. Zoppi<sup>1</sup>, M. Ritelli<sup>1</sup>, M. Castori<sup>4</sup>, M. Colombi<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Div. of Biology and Genetics, Dep. of Molecular and Translational Medicine, University of Brescia, Brescia, Italy  
<sup>2</sup>Div. of Dermatology, Dep. of Clinical and Experimental Sciences, Spedali Civili University Hospital, Brescia, Italy  
<sup>3</sup>Lab. of Medical Genetics, Dep. of Molecular Medicine, Sapienza University, San Camillo-Forlanini Hospital, Rome, Italy  
<sup>4</sup>Div. of Medical Genetics, IRCCS Casa "Sollievo della Sofferenza", San Giovanni Rotondo, Foggia, Italy

Classical Ehlers-Danlos syndrome (cEDS) is a rare connective tissue disorder mainly characterized by marked cutaneous involvement. According to the 2017 nosology, cEDS should be suspected in the presence of skin hyperextensibility and atrophic scarring. This combination must be present together with generalized joint hypermobility (JH) (Beighton score, BS  $\geq 5/9$ ) and/or with at least 3 of the minor criteria, i.e., easy bruising, skin fragility, molluscoid pseudotumors, subcutaneous spheroids, hernia, epicanthal folds, JH complications, flexible flatfoot, and positive family history. Confirmatory molecular testing is required. Here, we report a cross-sectional work on 62 cEDS patients from 44 families with a defined dominant COL5A1/2 mutation. We present an in-depth analysis of mucocutaneous features, facial dysmorphic traits, and JH that were analyzed by sex and age. In our cohort, we did not observe any mandatory clinical sign. In particular, skin hyperextensibility plus atrophic scars was present in ~82% of patients and generalized JH decreased with age (89% in patients  $\leq 18$  years vs 58% in adults). Skin was more commonly hyperextensible on elbows, neck, and knees. The sites more frequently affected by atrophic scarring included knees, face (especially forehead), pretibial area, and elbows. Facial dysmorphism commonly affected midface/orbital areas with epicanthal folds and infraorbital creases more common in young patients. Our study suggests that the combination of  $\geq 1$  eye dysmorphism and facial/forehead scars may support the diagnosis in children. Minor acquired traits, such as molluscoid pseudotumors, subcutaneous spheroids, and signs of premature skin aging may be equally useful in adults. Our data expand the knowledge on cEDS allowing for a more comprehensive picture of easy detectable mucocutaneous manifestations and other signs evaluable by direct observation, thus offering clues to improve the clinical diagnosis of cEDS. Our results highlight that a minor subset of patients with an incomplete presentation, i.e., absence of generalized skin hyperextensibility plus atrophic scarring and a BS  $< 5/9$ , can be characterized by molecular testing after careful evaluation of the other minor signs and family history.

**P040**  
**Ippofosfatasia dell'adulto in pazienti con fibromialgia: associazione fortuita o misdiagnosi?**

C. Orsini<sup>1</sup>, M. Scutifero<sup>1</sup>, L. Cinque, L. Passamano<sup>1</sup>, V. Guarnieri<sup>3</sup>, L. Politano<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Cardiologia e Genetica Medica, Università della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli  
<sup>2</sup>Servizio di Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

L'ippofosfatasia (HPP) è una malattia rara, caratterizzata da difetto di mineralizzazione ossea e deficit dell'attività della fosfatasi alcalina (PA) serica ed ossea. Si riconoscono sei forme cliniche: perinatale (letale), benigna perinatale, neonatale, infantile, dell'età adulta e l'odontopofosfatasi. È dovuta a mutazioni nel gene ALPL, che codifica per la fosfatasi alcalina tessuto-non specifica (TNAP). L'incidenza è di 1:300.000 nati per la forma grave, 1:6370 individui, per quella lieve. La diagnosi si basa sulle analisi di laboratorio e sul sequenziamento genico. La forma dell'adulto si trasmette con meccanismo autosomico dominante, le forme infantili con meccanismo autosomico-recessivo. Descriviamo quattro casi con pregressa diagnosi di fibromialgia, che ampliano lo spettro clinico nell'adulto. Tutti i pazienti (3 maschi ed una femmina, di età compresa tra 31 e 63 a.) sono giunti alla nostra osservazione per il riscontro di ipercreatininemia (CK), variabile da 1 a 3 volte il valore max normale, associata a mialgie diffuse. L'obiettività muscolare era negativa in tutti i pazienti. Il sospetto diagnostico è sorto per la presenza di valori ridotti di PA, confermato dal riscontro di aumentati valori di vitamina B6 nel siero e di FosfoEtanolAmina (PEA) e calcio delle 24 h, nelle urine. L'indagine molecolare del gene APLP ha identificato in due pazienti mutazioni missenso note, in eterozigosi, rispettivamente nell'esone 6 (c.455G>C,Arg152His) e nell'esone 10 (c.892G>A,Glu298Lys), confermando la diagnosi clinica. Negli altri due pazienti sono state riscontrate lunghe regioni di omozigosi, attualmente in corso di studio per la presenza di possibili estese delezioni. I casi riportati dimostrano l'importanza del dosaggio della fosfatasi alcalina nell'iter diagnostico di una ipercemia, specialmente se associata a mialgie ed impongono una rivalutazione diagnostica dei casi di fibromialgia.

**P041**  
**Clinical and molecular diagnosis of Osteocraniostenosis in a fetus**

S. Rosato<sup>1</sup>, B. Campos-Xavier<sup>2</sup>, M. Pollazon<sup>1</sup>, I. Ivanovski<sup>1,3</sup>, M. Castori<sup>4</sup>, M.P. Bonasoni<sup>5</sup>, G. Comitini<sup>6</sup>, S. Unger<sup>2</sup>, A. Superti-Furga<sup>2</sup>, L. Garavelli<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Clinical Genetics Unit, Maternal and Pediatric Dep., IRCCS-Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia, Italy  
<sup>2</sup>Division of Genetic Medicine, Lausanne University Hospital (CHUV), Lausanne, Switzerland  
<sup>3</sup>Dep. of Surgical, Medical, Dental and Morphological Sciences with interest in Transplant, Oncology and Regenerative Medicine, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy  
<sup>4</sup>Medical Genetics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Italy  
<sup>5</sup>Pathology Unit, IRCCS-Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia, Italy  
<sup>6</sup>Unit of Obstetrics and Gynecology, IRCCS-Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia, Italy

We describe a post-mortem diagnosis of osteocraniostenosis (OMIM 602361) in a fetus of a non consanguineous couple (mother from Romania and father from Albania). Prenatal ultrasounds at 20<sup>th</sup> week of gestation found: cloverleaf-shaped skull, microphthalmia, microretrognathia, hypoplastic thorax, short long bones and flexed feet. Karyotype on amniotic fluid was 46,XY. Molecular analysis of FGFR3 gene on amniotic fluid was normal. After termination, fetus showed: weight 396 g (3p), length 24 cm (<3p), OFC 17 cm (<3p), parietal bossing, large bregmatic fontanel, short palpebral fissures, hypertelorism, small mouth, low-set ears, camptodactyly of proximal interphalangeal joints of II-III-IV and V fingers, short I toe, micropenis and asplenia. Babygram X-rays pointed out: hypoossified skull, 11 pairs of thin ribs, mild platyspondyly, mild irregular cervical vertebrae and thin long bones with metaphyseal flaring. Considering the cardinal features described above, we considered the clinical diagnosis of osteocraniostenosis. Molecular analysis of the FAM111A gene on fetal tissues and on parental blood DNA showed a de novo heterozygous mutation, leading to p.Ser343del, already associated with OCS (Unger et al, AJHG 2013), confirming the diagnosis. Osteocraniostenosis is a perinatally lethal condition characterized by gracile bones with thin diaphyses, premature closure of basal cranial sutures and microphthalmia. Another important feature is splenic hypoplasia. In males, micropenis is present. The condition is allelic to the non-lethal, dominant disorder, Kenny Caffey syndrome. Confirmation of the diagnosis in the fetus and the results of molecular diagnosis have been essential for the family, in particular for recurrence risk in a new pregnancy.



**P042**  
**Un altro caso neonatale di CLOVES: precoce riconoscimento e management**

M. Della Monica<sup>1</sup>, F. Peluso<sup>1</sup>, A. Pagliuzzi<sup>1</sup>, T. Oranges<sup>2</sup>, C. Filippeschi<sup>2</sup>, E. Agostini<sup>3</sup>, P. Fiorini<sup>3</sup>, C. Defilippi<sup>4</sup>, E. Pisaneschi<sup>5</sup>, S. Giglio<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>SOC Genetica Medica AOU Meyer Firenze  
<sup>2</sup>Dermatologia AOU Meyer Firenze  
<sup>3</sup>TIN AOU Meyer Firenze  
<sup>4</sup>Radiologia AOU Meyer Firenze  
<sup>5</sup>Lab. di Genetica Medica Osp. Pediatrico Bambino Gesù - Roma

L'acronimo CLOVES (OMIM # 612918) si riferisce ad una raro complesso disordine caratterizzato da overgrowth con malformazioni vascolari, cutanee e scheletriche (Congenital Lipomatous Overgrowth, Vascular malformations, Epidermal nevi, and Skeletal/scoliosis and spinal abnormalities). Possono inoltre essere presenti complicanze neurologiche o da compressione della colonna, renali, tromboembolismi, cisti ovaio, e come in tutti i casi di overgrowth, il rischio di neoplasie embrionarie. Gli affetti presentano mosaicismi somatici di varianti patogenetiche del gene PIK3CA, uno dei regolatori della cascata molecolare PI3K/AKT. Varianti in questo gene possono essere associate anche a megaencefalia o emimegaencefalia. La nostra paziente è secondogenita di genitori non consanguinei; albero genealogico negativo. Segnalata in gravidanza ascite addominale. Il parto è stato cesareo alle 38 settimane con peso di 4800g (>97), L 58 cm, OCF 36.5cm, IA 9. Si evidenziavano lesioni cutanee tipo "malformazione vascolare piana", simmetriche e speculari a livello addominale, vulvari e degli arti inferiori. Il dito del piede più lungo bilateralmente. L'ecoaddome confermava l'ascite ed evidenziava una immagine cistica di 18mm di verosimile origine annessiale. L'esame mediante SNP-array su sangue era negativo. Dopo riunione multidisciplinare, è stata posta indicazione all'analisi molecolare su DNA estratto da biopsia cutanea che individuava la variante c.353G>A (p.Gly118Asp) nell'esone 3 del gene PIK3CA, in mosaico, con frequenza dell'allele mutato del 12% circa. Questa stessa variante è stata riportata in letteratura associata ad un quadro di sindrome di Cowden 5, con predisposizione a tumori. Questo ha permesso di iniziare subito il programma di sorveglianza e management.







**P043**  
**Our experience in multiple congenital contractures: amyoplasia and distal arthrogyposis**

M. Pollazzon<sup>1</sup>, H. Fodstad<sup>2</sup>, S. Rosato<sup>1</sup>, I. Ivanovski<sup>1,3</sup>, G. Comitini<sup>1</sup>, G. Gargano<sup>5</sup>, S. Unger<sup>2</sup>, A. Superti-Furga<sup>2</sup>, L. Garavelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinical Genetics Unit, Maternal and Pediatric Dep., IRCCS-Arcispedale S.Maria Nuova, Reggio Emilia, Italy

<sup>2</sup>Division of Genetic Medicine, Lausanne University Hospital (CHUV), Lausanne, Switzerland

<sup>3</sup>Dep. of Surgical, Medical, Dental and Morphological Sciences with interest in Transplant, Oncology and Regenerative Medicine, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

<sup>4</sup>Unit of Obstetrics and Gynecology, Maternal and Pediatric Dep., IRCCS-Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia, Italy

<sup>5</sup>Unit of Neonatology, Maternal and Pediatric Dep., IRCCS-Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia, Italy

Introduction: Congenital contractures can be divided into two groups: isolated and multiple. Isolated congenital contractures affect only a single area of the body, while multiple congenital contractures, which include amyoplasia, distal arthrogyposis (DA) and syndromic forms, are characterized by the involvement of two or more different areas of the body. Amyoplasia shows characteristic clinical features and is almost exclusively sporadic. DAs involve the distal parts of the limbs and represent a group of autosomal dominant disorders. Syndromic forms may have an etiology on the Central Nervous System or can be neurologically progressive.

Aim of the study: We report 9 familial and 5 sporadic patients with DA. We also discuss 3 cases of amyoplasia. We consider the results of molecular analysis in these cases and their impact on genetic counselling.

Materials and methods: Next Generation Sequencing (NGS) panel of 9 genes responsible for DA and, in addition, molecular analysis of the CHRNG gene with NGS, in cases with clinical suspicion of multiple pterygium syndrome, was performed. Whole Exome Sequencing (WES) is ongoing in one patient.

Results: Among the cases of DA, 3 patients of a single family present a known heterozygous mutation in the TNNT3 gene, with phenotype more compatible with DA2B. In another family, a new heterozygous mutation in the TPM2 gene was found in 3 patients. In a sporadic case of DA1 a known heterozygous mutation in the TNNT3 gene was found. In a girl, born to non-consanguineous parents, a homozygous mutation in the CHRNG gene confirmed the diagnosis of multiple pterygium syndrome (Escobar variant). Patient 9 is a boy with the clinical diagnosis of multiple pterygium syndrome (Escobar variant) (all previous analyses were normal - 9 genes panel and CHRNG). In 5 patients we could only speculate the following clinical diagnoses: a familial DA1/DA2B (3 patients), multiple pterygium syndrome (Escobar variant) and DA5D. In 3 patients we considered the clinical diagnosis of amyoplasia.

Conclusions: Molecular diagnosis was possible in 8 out of 12 patients with DA, resulting in definition of recurrence risk and suggestions for future pregnancies. Incomplete penetrance should be considered in patients with the mutations in TNNT3 gene. WES analysis in patient 9 could potentially bring to the discovery of a new gene. New insights in the molecular field could help the molecular diagnosis of amyoplasia.

**P044**  
**Identificazione di una nuova mutazione nel gene LMX1B in un paziente con sindrome di Nail-Patella**

V. Cinquina<sup>1</sup>, C. Dordoni<sup>1</sup>, M. Massimello<sup>1</sup>, M. Venturini<sup>2</sup>, M. Ritelli<sup>1</sup>, M. Colombi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sez. di Biologia e Genetica, Dip. di Medicina Molecolare e Traslazionale, Universit degli Studi di Brescia, Brescia

<sup>2</sup>U. O. di Dermatologia, Dip. di Scienze Cliniche e Sperimentali, Spedali Civili, Brescia

La sindrome Nail-Patella (NPS) è una osteo-onicodisplasia ereditaria (frequenza 1:45.000-50.000) dovuta a mutazioni dominanti nel gene LMX1B, che codifica per un fattore di trascrizione appartenente alla famiglia LIM ed è importante per lo sviluppo di arti, occhi e reni. La diagnosi della malattia è posta in presenza di displasia ungueale congenita, rotule assenti o ipoplasiche, displasia dei gomiti ed esostosi iliache. Oltre agli annessi e al sistema scheletrico possono essere coinvolti il sistema oculare e renale con possibile glaucoma e proteinuria. La proteinuria pu regredire spontaneamente o, raramente, evolvere in insufficienza renale terminale. Mutazioni in LMX1B sono state identificate anche in alcuni pazienti con nefropatia isolata. Qui riportiamo un paziente con un sospetto dalla nascita di Sindrome di Ehlers-Danlos (EDS) o di osteo-onicodisplasia ereditaria. Alla valutazione, a 24 anni, il paziente presentava la triade della NPS con agenesia ungueale congenita, displasia di gomiti con limitazione funzionale, agenesia di rotule con lussazioni reiterate e corni iliaci. La valutazione nefrologica aveva escluso l'interessamento renale. Una forma di EDS era stata ipotizzata per le lussazioni reiterate delle rotule e la cute setosa descritta nell'infanzia. In et adulta sono assenti segni suggestivi di EDS come lassit legamentosa generalizzata, cicatrici atrofiche e cute marcatamente setosa e/o iperestensibile. L'analisi del gene LMX1B ha confermato l'ipotesi di NPS, evidenziando la mutazione c.710\_712dup (p.Ser237dup) mai descritta, che cade nell'omeodominio della proteina. Questo caso amplia lo spettro mutazionale della NPS ed evidenzia come le alterazioni del trofismo cutaneo e le lussazioni reiterate, soprattutto monoarticolari, non siano sufficienti per porre sospetto di EDS. Questi segni sono infatti comuni in diverse patologie ereditarie dei tessuti connettivi, oppure sono caratteristiche fisiologiche legate a sesso/et / etnia/stile di vita. La presenza di alterazioni scheletriche congenite e l'utilizzo di un approccio multidisciplinare è utile per indirizzare il sospetto diagnostico verso una specifica malattia/gruppo nosologico, ma il test genetico è indispensabile per porre diagnosi certa e impostare il follow-up.

**P045**  
**Profili di neurosviluppo in pazienti pediatriche con connettivopatia ereditaria e ruolo dell'ipermobilità articolare nel disturbo di coordinazione motoria**

C. Piedimonte<sup>1</sup>, S. Morlino<sup>2</sup>, I. Sperduti<sup>3</sup>, M.T. Giannini<sup>1</sup>, A. Terzani<sup>1</sup>, P. Grammatico<sup>2</sup>, R. Penge<sup>1</sup>, M. Castori<sup>4</sup>, F. Cardona<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UOC Neuropsichiatria Infantile, Dip. Pediatria e Neuropsichiatria Infantile, Policlinico Umberto I, "Sapienza" Università di Roma

<sup>2</sup>UOC Lab. di Genetica Medica, Dip. di Medicina Molecolare, AO San Camillo-Forlanini, "Sapienza" Università di Roma

<sup>3</sup>UO Biostatistica, IRCCS Ist. Nazionale Tumori Regina Elena, Roma

<sup>4</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (Foggia)

Le connettivopatie ereditarie (CE) sono un gruppo eterogeneo di patologie sistemiche, dominate dalla fragilità costituzionale dei tessuti connettivi e comunemente caratterizzate dall'ipermobilità articolare generalizzata (IAG). Le sindromi di Ehlers-Danlos (SED), la sindrome di Marfan e le sindromi di Loeys-Dietz (SLD) sono le CE più note. Studi preliminari hanno rilevato un'associazione tra SED ipermobile, IAG e disturbi del neurosviluppo (DNS), in particolare il disturbo di coordinazione motoria (DCD). Lo scopo di questo lavoro è indagare le correlazioni tra CE, IAG, DCD ed altri DNS per una definizione più precisa della storia naturale della SED, per il corretto inquadramento del paziente con DNS e per un adeguato management multispecialistico di queste condizioni. È stato somministrato un protocollo di test per caratterizzare il profilo cognitivo, motorio, attentivo-esecutivo ed emotivo-comportamentale di 46 individui divisi in due gruppi di 23 con et tra 4 e 13 anni. Il gruppo 1 comprendeva 19 soggetti con SED ipermobile, 3 con SED classica e 1 soggetto con SLD, reclutati presso un centro specializzato in CE. Il gruppo 2 era formato da 23 bambini con DCD diagnosticato in un servizio specializzato in DNS. Nel gruppo 1, i DNS erano presenti nel 61% (14/23) del campione, con una prevalenza di DCD nel 31% (7/23). Le diagnosi di DNS erano spesso miste (27%) e l'associazione più rappresentata era quella tra DCD e Disgrafia (13%). Nel gruppo 2 l'IAG era presente nel 17% dei casi (4/23) e nessun paziente era affetto da CE. Dal confronto tra i profili dei due gruppi emergono differenze nelle abilità motorie e grafiche con punteggi significativamente più bassi nel gruppo 2 (DCD), ma è possibile identificare un sottogruppo di pazienti con CE (gruppo 1) con profili quasi sovrapponibili a quelli del gruppo 2. Nel gruppo 1 è emersa una qualità della vita nettamente inferiore e punteggi più alti nelle scale che evidenziano le componenti somatiche dell'ansia. Questo studio conferma e quantifica, per la prima volta, l'impatto dei DNS nella fenomenologia clinica dei bambini con CE. Le differenze tra i due gruppi sottolineano quanto la fisiopatologia del disturbo di coordinazione nei CE sia peculiare e verosimilmente distinguibile nell'ambito dei soggetti accertati per DCD.



**P046**  
**Identificazione di nuovi geni candidati in casi sporadici e familiari di Malformazione di Chiari di tipo I**

A. La Barbera<sup>1</sup>, A. Provenzano<sup>1</sup>, L. Tiberi<sup>1</sup>, R. Artuso<sup>2</sup>, A. Pagliuzzi<sup>1</sup>, I. Sani<sup>2</sup>, L. Giunti<sup>2</sup>, S. Guarducci<sup>2</sup>, M. Pantaleo<sup>2</sup>, L. Xumerle<sup>3</sup>, M. Scagnet<sup>4</sup>, L. Genitori<sup>4</sup>, M. Delledonne<sup>5</sup>, S. Giglio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unit Genetica Medica, Dip. Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche "Mario Serio", Firenze, Italy

<sup>2</sup>SOC Genetica Medica AOU Meyer, Firenze, Italy

<sup>3</sup>Dip di Biotecnologie, Universit degli Studi di Verona, Verona, Italy

<sup>4</sup>Dip di Neurochirurgia, AOU Meyer, Firenze, Italy

La Malformazione di Chiari di tipo 1 (MC1) è un'anomalia congenita del cranio dovuta ad un difetto di sviluppo dell'osso occipitale e della fossa cranica posteriore con successivo restringimento ed erniazione delle tonsille cerebellari nel forame magno. Ci compromette il normale flusso del liquido cefalorachidiano che si accompagna spesso alla comparsa di siringo-idromielia. La MC1 finora è stata descritta in associazione a sindromi note (soprattutto craniostenosi), ma ad oggi esistono pochissimi dati sulle sue possibili basi genetiche. Mentre in letteratura è spesso riportato come segno clinico in quadri fenotipici più complessi, non sono ancora noti i meccanismi molecolari che ne determinano le forme isolate. Presentiamo i risultati di WES (35 trios) su soggetti affetti da MC1, isolata e sindromica senza craniostenosi, tre dei quali con MC1 familiare. Per i casi sindromici, per i quali sono stati identificati i geni responsabili del fenotipo, osserviamo caratteristiche comuni che sono displasia ossea (non solo della fossa cranica posteriore), ritardo di crescita o resistenza alle gonadotropine. In uno dei casi familiari (affetti sia il probando che il padre) abbiamo identificato una variante in eterozigosi in un gene che codifica per un istone metiltransferasi e che regola il pattern di splicing del gene FGFR2, associato a sindrome di Crouzon, in cui ricordiamo che la MC1 è presente nel 70% dei casi. In un altro caso familiare (due fratelli affetti) abbiamo identificato una variante in omozigosi ereditata da entrambi i genitori, in un altro nuovo gene che codifica, anch'esso, per una metiltransferasi coinvolta nella regolazione genica. Varianti in questi geni sono ricorrenti e condivise sia dai casi con MC1 isolata e sporadica che da alcuni casi sindromici. Sono in corso le prove funzionali su biopsie ossee di pazienti affetti per definire la patogenicità di questi nuovi possibili geni causativi.





P047

### Una nuova mutazione a carico del gene TNNT3 in un caso di Artrogriposi distale

M. Gnoli<sup>1</sup>, M. Ritelli<sup>2</sup>, M. Colombi<sup>2</sup>, L. Sangiorgi<sup>1</sup><sup>1</sup>SSD Genetica Medica e Malattie Rare Ortopediche Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna<sup>2</sup>Sezione di Biologia e Genetica, Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università degli Studi di Brescia, Brescia

Le Artrogriposi distali sono un gruppo di patologie a trasmissione autosomica dominante caratterizzate dal coinvolgimento di due o più segmenti in assenza di patologia muscolare o neurologica primitiva. Nell'Artrogriposi distale di tipo 1 (DA1) sono presenti camptodattilia e piede torto congenito, meno frequentemente sono coinvolte spalle e bacino. L'Artrogriposi distale di tipo 2A (DA2A, Sindrome di Freeman-Sheldon) è caratterizzata da contratture di mani e piedi, scoliosi, facies caratteristica ed è determinata (nella maggioranza dei casi) da mutazioni nel gene MYH3, mentre l'Artrogriposi distale di tipo 2B (DA2B, Sindrome di Sheldon-Hall), caratterizzata, oltre che da contratture, da linee nasolabiali prominenti, rime palpebrali rivolte verso il basso, bocca piccola, è dovuta a mutazioni nei geni MYH3, TNNT2, TNNT3 e TPM2. Le forme di tipo 1, tipo 2A e 2B, quindi, sono state correlate a mutazioni a carico di diversi geni, tuttavia la stessa mutazione può causare forme diverse di Artrogriposi distale. Mutazioni a carico del gene TNNT3 sono state descritte in un numero limitato di casi in letteratura, con variabilità di espressione clinica tra individuo e individuo. In particolare mutazioni nel gene TNNT3 sono state riportate sia in pazienti affetti da Artrogriposi distale di tipo 1 che di tipo 2B. Inoltre, sebbene in letteratura medica il numero di casi correlati a mutazioni in TNNT3 sia molto limitato, si osserva variabilità clinica tra gli individui che presentano una stessa mutazione. In particolare le mutazioni finora descritte in TNNT3 sono tutte a carico di uno stesso residuo amminoacidico (p.Arg63). Riportiamo un caso di Artrogriposi distale in cui è stata riscontrata una mutazione nel gene TNNT3, non descritta in letteratura medica, verosimilmente patogenetica. Questa mutazione interessa infatti un altro residuo amminoacidico altamente conservato (p.Lys66), localizzato in una regione con un ruolo critico per la funzione della proteina.

P048

### La sindrome Blue Rubber Bleb Nevus pu essere causata da mutazioni della glomulina?

G. Severi<sup>1</sup>, E. Pisaneschi<sup>2</sup>, E. Micaglio<sup>1</sup>, A. Wischmeijer<sup>3</sup>, M. Seri<sup>1</sup>, A. Novelli<sup>2</sup>, C. Graziano<sup>1</sup><sup>1</sup>U.O. Genetica Medica, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Università di Bologna, Bologna.<sup>2</sup>U.O.C. Lab. Genetica Medica, IRCCS Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", Roma.<sup>3</sup>Servizio di Genetica Clinica, Dip. Pediatria, Osp. Regionale del Sud Tirolo, Bolzano.

Le malformazioni glomovenose (GVM) sono tipiche lesioni blu-viola rilevate, nodulari ed ipercheratosiche, dolenti alla palpazione, localizzate prevalentemente alle estremità. Si riscontrano a livello cutaneo e sottocutaneo, raramente nelle mucose o nei muscoli. La sindrome Blue Rubber Bleb Nevus (BRBNS), generalmente sporadica, è simile alle GVM ma si differenzia principalmente per la presenza di lesioni a carico del tratto gastrointestinale. Descriviamo una famiglia con mutazione del gene GLMN in cui più individui affetti presentano caratteristiche atipiche, non descritte in precedenza. Il probando, di 8 anni, ha una vasta malformazione venosa cutanea dello scalpo a livello parietale e fronto-orbitario di destra, con dilatazione venosa anche a livello delle pareti del ventricolo laterale. Presenta lieve emiparesi sinistra attribuita al sanguinamento della lesione vascolare intracranica e coartazione istmica aortica. Nel padre, deceduto per melanoma, vengono riferite vaste lesioni venose all'arto inferiore e al volto. La zia, con voluminose malformazioni venose ad un arto ad interessamento cutaneo e muscolare, è stata ospedalizzata per emorragia da verosimile angiomaso intestinale del tenue. La nonna, che a livello cutaneo presenta una singola lesione subungueale, ha avuto numerosi episodi di sanguinamento intestinale e subocclusioni, con necessità di interventi chirurgici; è stato inoltre riscontrato groviglio venoso nel tessuto mammario. Dal punto di vista dermatologico, le lesioni erano state inquadrare come verosimili BRBN. In tutti gli affetti della famiglia è stata identificata una mutazione di splicing a carico del gene GLMN, già descritta in altre famiglie con tipiche manifestazioni cliniche. Pertanto, il coinvolgimento gastrointestinale non sembra secondario ad una associazione genotipo-fenotipo. Erano precedentemente state escluse mutazioni del gene TEK (TIE2). La presentazione clinica in questa famiglia suggerisce che lo spettro fenotipico dovuto ad alterazioni della glomulina possa essere più ampio rispetto a quello descritto fino ad ora, e che la distinzione tra GVM e BRBNS non sia così netta. Il rischio di sanguinamenti gastrointestinali e intracranici, anche in età pediatrica, andrebbe considerato nell'organizzazione del monitoraggio clinico dei pazienti con mutazioni di GLMN.

P049

### Mutazione intronica nel gene FBN2 associata a sindrome di Beals

P. Prontera<sup>1</sup>, A. Mencarelli<sup>1</sup>, M. Magliozzi<sup>2</sup>, D. Roggia<sup>1</sup>, R. Romani<sup>1</sup>, E. Sallicandro<sup>1</sup>, E. Agolini<sup>2</sup>, A. Novelli<sup>2</sup>, S. Troiani<sup>3</sup>, G. Stangoni<sup>1</sup><sup>1</sup>SSD Neonatologia e Diagnostica Prenatale/CRR Genetica Medica, Azienda Ospedaliera di Perugia, Perugia, Italia<sup>2</sup>UOC Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia<sup>3</sup>SC Neonatologia, Azienda Ospedaliera di Perugia, Perugia, Italia

Premessa: La sindrome di Beals, o aracnodattilia contratturale congenita (CCA) è una malattia genetica a trasmissione autosomica dominante dovuta a mutazioni del gene FBN2. La CCA è una malattia del tessuto connettivo, caratterizzata da contratture multiple in flessione, aracnodattilia, cifoscoliosi grave, padiglioni auricolari abnormi e ipoplasia muscolare. Mutazioni patogenetiche in FBN2 vengono identificate in non più del 50% dei pazienti con presunta CCA e questo suggerisce la presenza di eterogeneità di locus e/o allelica.

Scopo: Identificare le possibili cause genetiche di CCA in una neonata, già negativa all'analisi di sequenza delle regioni esoniche ed introniche fiancheggianti del gene FBN2.

Materiali e Metodi: È stata condotta una visita genetica-dismorfologica di una neonata con contratture multiple in flessione, aracnodattilia, dismorfismi minori al volto. L'analisi dell'esoma clinico mediante NGS (Illumina) del trio è stata condotta su DNA estratto da sangue periferico del probando e dei genitori. L'analisi bioinformatica è stata finalizzata in primis alla analisi del gene FBN2. Le conferme sono state eseguite in Sanger.

Risultati: La visita dismorfologica ha portato alla diagnosi clinica di Sindrome di Beals. L'analisi NGS ha identificato la mutazione c.3974-10A>G intronica profonda de novo. Le analisi bioinformatiche in silico mediante software predittivi suggeriscono un possibile ruolo deleterio sul normale meccanismo di splicing.

Conclusioni: Pur non essendo riportata in letteratura, la variante intronica può ritenersi verosimilmente responsabile del quadro clinico in quanto: 1) è de novo, 2) è assente dai database di polimorfismi, 3) le predizioni bioinformatiche ne suggeriscono una patogenicità, 4) si associa ad un fenotipo peculiare. Futuri studi di espressione stabiliranno l'effettivo ruolo patogenetico della variante intronica. Questo primo caso di mutazione intronica in un paziente con sindrome di Beals suggerisce di sequenziare regioni introniche profonde nei casi di CCA negativi all'analisi delle regioni esoniche-introniche fiancheggianti, dato che la bassa sensibilità diagnostica potrebbe essere dovuta ad eterogeneità allelica. Appare evidente inoltre come la diagnosi clinica sia fondamentale per il filtraggio e l'interpretazione dei dati esomici.



P050

### Un percorso integrato per pazienti affetti da Sindrome di Ehlers Danlos

L. Sangiorgi<sup>1</sup>, F. Ponti<sup>1</sup>, M. Tremosini<sup>1</sup>, M. Mordenti<sup>1</sup>, M. Locatelli<sup>1</sup>, E. Pedrini<sup>1</sup>, M. Gnoli<sup>1</sup><sup>1</sup>SSD Genetica Medica e Malattie Rare Ortopediche Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

La sindrome di Ehlers-Danlos (EDS) rappresenta un gruppo di patologie ereditarie del tessuto connettivo, clinicamente e geneticamente eterogeneo, caratterizzate da iperlassità articolare, iperlascità cutanea e fragilità tissutale. La nuova classificazione della EDS distingue 13 sottotipi, che presentano overlap dei quadri clinici, ampia variabilità di espressione clinica ed eterogeneità genetica. Nonostante le nuove acquisizioni e l'identificazione di nuove forme e geni correlati, attualmente non in tutti i casi che presentano clinica suggestiva è possibile identificare il difetto molecolare ed in particolare la patogenesi della EDS ipermobile non è tuttora ben chiarita. Per poter procedere alla ricerca di nuovi geni candidati, risulta utile la raccolta di dati clinici per identificare gruppi clinicamente omogenei di pazienti. Per il carattere multisistemico della patologia, i pazienti necessitano di un follow-up multidisciplinare. La caratterizzazione clinica è alla base della definizione diagnostica e permette di porre indicazione ad accertamenti molecolari a conferma della diagnosi, quando disponibili. Presso la SSD Genetica Medica e Malattie Rare Ortopediche dell'Istituto ortopedico Rizzoli, più di 350 pazienti sono stati valutati nel sospetto di EDS, dal punto di vista clinico per inquadramento diagnostico o per una presa in carico clinica e/o sono stati sottoposti ad indagini molecolari inerenti alla patologia. Presso l'ambulatorio è possibile effettuare consulenza genetica, visita ortopedica e visita fisiatrica, per una presa in carico multispecialistica della malattia. La SSD di Genetica Medica dispone inoltre di una serie di strumenti finalizzati a implementare lo studio della patologia: dal 2014 è infatti attivo un Registro di Patologia per EDS (R.E.D.), strumento essenziale per ottenere informazioni epidemiologiche, sul decorso della patologia e per definire correlazioni genotipo-fenotipo. Analogamente, l'istituzione di una Biobanca genetica rappresenta uno strumento indispensabile per la raccolta e la conservazione di materiale biologico di qualità certificata a fini diagnostici e di ricerca. Presso la Biobanca della SSD Genetica Medica, attiva dal 2013, sono attualmente conservati più di 170 campioni di materiale biologico di pazienti con sospetto clinico di EDS. La SSD Genetica Medica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli propone un percorso integrato per lo studio della sindrome di Ehlers-Danlos nel quale l'attività assistenziale (consulenza genetica, visita ortopedica e fisiatrica) e diagnostica (Laboratorio) sono coadiuvate, e sono al tempo stesso indispensabili per quella di ricerca (Registro di Patologia, Biobanca).







**P051**  
**Co-occurrence of SHOX region (Xp22.3) rearrangements and 15q25.2 duplication in a girl with short stature, genital defects and bone anomalies**

**D. Babu<sup>1</sup>, A. Fanelli<sup>1</sup>, A. Monzani<sup>2</sup>, S. Mellone<sup>1</sup>, G. Genoni<sup>2</sup>, S. Bellone<sup>2</sup>, F. Prodram<sup>2</sup>, M. Giordano<sup>1</sup>**  
<sup>1</sup>Laboratory of Human Genetics, Dept of Health Sciences, Universit del Piemonte Orientale, Novara, Italy  
<sup>2</sup>Division of Pediatrics, Dept of Health Sciences, Universit del Piemonte Orientale, Novara, Italy

The presence of multiple genomic unbalances in the same patients cooperate to cause complex phenotypes. Here we describe a 9-year old girl, referred to the Pediatric Endocrinology Unit for short stature and precocious puberty. Growth hormone deficiency was diagnosed. She was born with agenesis of right tibia and fibula, and with a supernumerary digit of the left foot. She had dorsal scoliosis, short neck, upturned nose, hypotelorism and the abdomen magnetic resonance showed uterus didelphys with double vagina. She was affected by arterial hypertension. At the age of 17 years array comparative genomic hybridization (aCGH) analysis was performed revealing the presence of two distinct duplications flanking the SHOX gene within the PAR1 region at Xp22.1 and an additional duplication of 1.6-2.5 Mb at 15q25.2. For the SHOX region a customized high resolution aCGH (Agilent) was used to confirm and better characterize the unbalances in this area. This analysis revealed two apparently distinct duplications of 302 Kb and 767 Kb including the upstream and downstream enhancers respectively, whereas the SHOX gene was present in two copies. The duplicated region on 15q25.2 contains 13 genes, some of them with a known function. Among these, 3 genes (RPS17, CPEB1, HOMER) have been previously associated to well defined disorders. However, none of these was apparently related to the clinical features observed in our patient. Unfortunately, the biological parents were not available to establish the origin of the duplications as she was adopted.

The extreme short stature observed in the girl might be the result of the co-occurrence of growth hormone deficiency and the rearrangements in the SHOX region. In fact, molecular defects involving SHOX and/or its upstream and downstream regulatory region explain 60-80% of cases with Leri-Weill dyschondrosteosis (MIM 127300) and 2-5% of cases with idiopathic short stature (MIM 300582). Moreover, defects of SHOX are reported to be associated to hypoplasia/aplasia of the ulna and fibula. Precocious puberty may be explained by duplication of CPEB1, a gene included in 15q25.2 region. Few previously described patients carrying duplication at 15q25.2 presented some clinical features resembling those observed in our patient such as anomalies of the foot digits, hypertension, and short neck. In conclusion, the complex phenotype of our patient is likely to represent the result of a never previously described co-occurrence of unbalances in the SHOX region and on 15q25.2.

**P052**  
**Sindrome di Loeys Dietz: primo caso di mosaicismo materno**

**M. Magliozzi<sup>1</sup>, A. Baban<sup>2</sup>, R. Adorisio<sup>2</sup>, A. Secinario<sup>4</sup>, C.H. Dietz<sup>5</sup>, F. Drago<sup>2</sup>, A. Novelli<sup>1</sup>, A. Amodeo<sup>5</sup>**  
<sup>1</sup>U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico del Bambino Gesù, Roma  
<sup>2</sup>Cardiologia e Aritmologia Pediatrica, Ospedale Pediatrico del Bambino Gesù, Roma  
<sup>3</sup>Radiologia e Bioimaging, Ospedale Pediatrico del Bambino Gesù, Roma  
<sup>4</sup>Dip. di Medicina, Istituto di Genetica Medica The McKusick-Nathans, Univerist di Medicina Johns Hopkins, Baltimore USA  
<sup>5</sup>ECMO e Assistenza Meccanica Cardiorespiratoria e Trapianto di Cuore Artificiale, Ospedale Pediatrico del Bambino Gesù, Roma

La sindrome di Loeys-Dietz (LDS) è una malattia autosomica dominante multisistemica a penetranza completa ed elevata variabilità fenotipica caratterizzata da anomalie vascolari (aneurisma e/o dissezione cerebrale, toracica e addominale) ed anomalie scheletriche (scoliosi, iperlissita legamentosa e aracnodattilia). In questo report si descrive il caso di un bambino di 8 anni con un quadro clinico complesso. Il paziente ha una forma di LDS non classica caratterizzata da macrosomia, urola bifida, ernie inguinali bilaterali, iperlissita legamentosa e nessun dismorfismo del volto. A livello cardiaco mostra una grave dilatazione della radice (z +5.84) e dell'aorta ascendente (z +10.18) con la completa perdita della giunzione sinotubolare ed una elevata tortuosità dei vasi intracranici. Inoltre, il paziente ha una forma classica di albinismo oculocutaneo. L'analisi genetica molecolare eseguita con sequenziamento NGS ha identificato la mutazione c.1460G>A (p.Arg487Gln) nel gene TGFBR1 precedentemente riportata in letteratura scientifica (Matyas et al., 2006) compatibile con il sospetto clinico di sindrome di Loeys-Dietz. Durante la consulenza genetica, emerge che nella storia familiare materna sono presenti frequenti emorragie delle arterie buccali corrette chirurgicamente, questi episodi suscitano il sospetto di un fenotipo più lieve di LDS. Gli studi molecolari eseguiti sui familiari del probando hanno confermato un mosaicismo materno, del 18% nel sangue periferico e da cellule della mucosa buccale e del 10% nei bulbi piliferi. Successivamente alla diagnosi molecolare, sulla madre sono state eseguite delle indagini cardiologiche che hanno mostrato particolari anomalie cardiovascolari associate alla condizione. Ad oggi, non sono mai stati riportati in letteratura scientifica casi di mosaicismo del gene TGFBR1. Questo studio mostra che tali individui sono a rischio di una forma più lieve ed atipica di LDS, incluse anomalie vascolari periferiche e lievi cambiamenti del miocardio potenzialmente progressivi

**P053**  
**Expanding the spectrum of SHOX mutations in Idiopathic Short Stature patients through a custom array CGH**

**A. Fanelli<sup>1</sup>, D. Babu<sup>1</sup>, S. Mellone<sup>1</sup>, G. Stress<sup>1</sup>, S. Bellone<sup>2</sup>, F. Prodram<sup>2</sup>, G. Bona<sup>2</sup>, S. Vannelli<sup>3</sup>, M. Giordano<sup>1</sup>**  
<sup>1</sup>Laboratory of Human Genetics, Dept of Health Sciences, Universit del Piemonte Orientale, Novara, Italy  
<sup>2</sup>Division of Pediatrics, Dept of Health Sciences, Universit del Piemonte Orientale, Novara, Italy  
<sup>3</sup>Ospedale Regina Margherita, Turin, Italy

The Short Stature Homeobox-containing gene (SHOX) is located at the tip of the short-arm of both X and Y chromosomes within the pseudoautosomal region 1 (PAR1). Haploinsufficiency of SHOX is responsible for 2-15% of Idiopathic Short Stature (ISS) cases and 60-70% of Leri-Weill dyschondrosteosis cases. Deletions or duplications of the enhancers downstream and upstream or the coding region have been reported as cause of ISS. These regulatory regions include seven CNEs (Conserved Non-coding Elements) of which the enhancer activity has been demonstrated. Currently molecular diagnosis for SHOX deficiency is carried out by sequencing the coding exons and by performing MLPA for the identification of deletions/duplications both in the coding and enhancer regions. We screened 596 ISS patients for SHOX defects for diagnostic purposes. Forty-three patients (7.2%) were identified with mutations involving coding region or its enhancers (9 point mutations and 34 deletions/duplications). However, MLPA probes are enriched in the exons and in the recognised CNEs, but the entire SHOX area spreads for about 500 kb and then is possible that they might be other regulatory elements with potential enhancer activity not yet described. In order to identify if there were some patients that remained undiagnosed, 50 individuals tested negative with the standard methods and presenting the most severe phenotype were analysed using a high resolution custom oligo array-CGH platform with a coverage of 8000 probes within the PAR1 region (compared to the 26 probes of MLPA) and additional widely spaced backbone probes. Two small deletions of 12.3 kb (1 patient) and 7 kb (2 patients) downstream SHOX not present in a panel of 300 healthy controls and not reported in the public databases were identified. These rearrangements share a common region of 1.8 kb. The 12.3 kb deletion also included a 1kb region conserved among different species. In order to investigate the role of these sequences, a functional assay was carried out by cloning the two sequences along with the SHOX promoter in an expression vector to test if they affect the gene expression. Luciferase assay performed in human U2OS cells, demonstrated regulatory enhancer activity in the construct carrying the sequence shared by the two deletions, with an increase of luciferase activity of 45% compared to the promoter vector. In conclusion, we identified a novel region downstream of SHOX with potential regulatory activity that might be responsible for cases of ISS that remain undiagnosed with standard diagnostic methods.



**P054**  
**Il dominio C-terminale del gene COL2A1: correlazioni genotipo-fenotipo in una casistica di pazienti e confronto con la letteratura**

**S. Bargiacchi<sup>1</sup>, E. Andreucci<sup>1</sup>, M. Della Monica<sup>1</sup>, L. Dosa<sup>1</sup>, G. Traficante<sup>1</sup>, A. La Barbera<sup>1</sup>, M. Castori<sup>2</sup>, F. Bedeschi<sup>3</sup>, D. Milani<sup>4</sup>, L. Salvati<sup>5</sup>, M. Gnoli<sup>6</sup>, L. Sangiorgi<sup>6</sup>, S. Giglio<sup>1,7</sup>**  
<sup>1</sup>SOC Genetica Medica, AOU A. Meyer, Firenze  
<sup>2</sup>Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo  
<sup>3</sup>U.O.S.D. di Genetica Medica, Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico, Milano  
<sup>4</sup>Ambulatorio di Malattie Metaboliche e Genetica Pediatrica, Ospedale Maggiore Policlinico - Clinica Pediatrica De Marchi, Milano  
<sup>5</sup>U.O.C. Genetica Clinica ed Epidemiologica, Azienda Ospedaliera di Padova, Padova  
<sup>6</sup>SSD Genetica medica e malattie rare ortopediche, IOR, Bologna  
<sup>7</sup>SOC Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche Mario Serio, Universit degli Studi di Firenze, Firenze

Mutazioni a carico del gene COL2A1 possono determinare un ampio spettro di condizioni, con variabile espressione clinica, che comprendono ad es. sindrome di Stickler (STL), displasia di Kniest, Displasia Spondiloeipifisaria/epimetafisaria Congenita (SEDC/SEMDC), fino a forme severe di displasia scheletrica ad esordio neonatale. Alcuni quadri clinici, oltre all'interessamento scheletrico, presentano manifestazioni extrascheletriche (a livello oculare e uditivo). La correlazione genotipo-fenotipo è complessa e coinvolge diversi meccanismi. In generale, le mutazioni missenso all'interno della tripla elica sono associate allo spettro della SEDC, le mutazioni troncanti sono responsabili di STL, mentre la displasia di Kniest è associata da alcuni autori a mutazioni missenso e da altri a delezioni inframe o mutazioni dei siti di splicing. Una delle regioni del gene che maggiormente sfugge alla correlazione è quella del peptide C-terminale, che spesso si associa a forme atipiche di collagenopatia. Presso il laboratorio della SOC Genetica Medica dell'AOU Meyer nel periodo 2007-2016 sono stati analizzati a fini diagnostici 244 probandi e in 100 di essi è stata riscontrata una mutazione patogenetica in COL2A1. Una parte di queste riguarda il dominio C-terminale e sono associate a fenotipi diversi fra loro (STL, SEDC, SEMDC, Displasia Spondiloperiferica, SED tarda). La maggior parte di queste mutazioni non è ancora stata descritta in letteratura ed inoltre alcuni tipi di mutazione missenso, come Asp>Glu e Trp>Arg, non sono finora mai state descritte per il gene COL2A1. Ad esempio, in un probando, con diagnosi di Displasia Spondiloeipifisaria posta nell'infanzia, è stata riscontrata la mutazione p.Cys1323Phe in eterozigosi. Le mutazioni p.Asp1234Glu e p.Asp1301Glu sono state rispettivamente riscontrate in un caso di sindrome di Stickler e in uno di SEMDC. La mutazione p.Trp1445Arg è stata descritta in un paziente con SED tarda, un'associazione sospettata per lungo tempo ma finora non dimostrata. Presentiamo il confronto fra il fenotipo dei pazienti della nostra casistica e quelli descritti in letteratura.





**P055**  
**Distrofia Muscolare dei Cingoli: analisi NGS**

F. Madia<sup>1</sup>, F. Zara<sup>1</sup>, C. Bruno<sup>2</sup>, C. Minetti<sup>2</sup>, P. Broda<sup>2</sup>, C. Fiorillo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>U.O.S.D. Neurogenetica e Neuroscienze

<sup>2</sup>U.O.C. Neurologia Pediatrica e Malattie Muscolari

La Distrofia Muscolare dei Cingoli, LGMD (Limb Girdle Muscular Dystrophy), rappresenta un gruppo eterogeneo di patologie che coinvolgono in maniera primitiva la muscolatura dei cingoli pelvica e scapolare.

Il decorso clinico è variabile, con forme gravi ad insorgenza precoce e forme più lievi. Il quadro clinico è caratterizzato da debolezza dei muscoli del cingolo pelvico e più tardivamente degli arti superiori. Si osserva un aumento dei valori della creatinasi (CK) da 3-5 fino a 100 volte il valore normale. La diagnosi clinica può essere confermata sia con la ricerca del deficit proteico su biopsia muscolare sia mediante l'analisi mutazionale dei geni implicati (nel 60-65% dei casi). Le LGMD possono essere trasmesse con meccanismo autosomico Dominante o Recessivo. Le forme Dominanti (LGMD1A-LGMD1G) sono più benigne e rare e rappresentano meno del 10% di tutte le LGMD; le forme Recessive (LGMD2A-LGMD2Z) sono più frequenti (1/15.000 nella popolazione generale). Alcuni geni sono responsabili sia di forme Recessive che Dominanti, a seconda della mutazione implicata. La più recente classificazione si basa sul difetto genico; solo talvolta esistono correlazioni genotipo-fenotipo. Lo scopo del lavoro è quello di verificare l'efficacia diagnostica di un pannello genico per LGMD mediante targeted resequencing (TS). Il pannello elaborato presso il nostro laboratorio permette lo screening simultaneo dei seguenti 44 geni: ANO5, BAG3, CAPN3, CAV3, COL6A1, COL6A2, COL6A3, CRYAB, DAG1, DES, DMD, DNAJB6, DYSF, EMD, FHL1, FKRP, FKTN, FLNC, GMPFB, GNE, HNRPDL, ISPD, ITGA7, LAMA2, LIMS2, LMNA, MYOT, PLEC, POGUT1, POMGNT1, POMT1, POMT2, SGCA, SGCB, SGCD, SGCG, SYNE1, SYNE2, TAZ, TCAP, TNPO3, TRAPPC11, TRIM32, ZASP/LDB3. Il test ha una sensibilità variabile tra l'80% ed il 95% a seconda dei geni. Al fine di raggiungere una sensibilità superiore al 95% sui geni particolarmente rilevanti, l'analisi NGS è completata dal sequenziamento Sanger sulle eventuali regioni low coverage. La segregazione è validata con l'analisi dei genitori. Ad oggi sono stati analizzati i primi 10 pazienti, i cui dati verranno presentati e discussi nel poster. Il pannello genico ideato si è dimostrato efficace ed affidabile per individuare la causa genetica dei pazienti LGMD.

**P056**  
**Unstability of larger alleles of the DMPK gene within the normal range in a myotonic dystrophy type 1 (DM1) Italian family**

G. Gori<sup>1</sup>, L. Fontana<sup>1</sup>, S. Lanciotti<sup>1</sup>, M. Bengala<sup>2</sup>, G. Novelli<sup>1,2</sup>, A. Botta<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biomedicine and Prevention, Medical Genetics Section, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy

<sup>2</sup>Lab. Medicine Department, Medical Genetics Section, Tor Vergata Hospital, Rome, Italy

**INTRODUCTION:** Myotonic dystrophy type 1 (DM1), the most common form of adult muscular dystrophy, is an autosomal dominant disorder, affecting about 1 in 8000 people worldwide. DM1 is caused by the expansion of an unstable CTG repeat located in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the DMPK gene. The number of CTG repeats ranging from 4 to approximately 50 in the normal population with a premutation range from 37 to 49 repetitions.

**AIM OF THE STUDY:** In our study we describe an Italian family with a very particular disease transmission pattern, concerning the behavior of rare alleles of the DMPK gene localized in the high end of the normal size range (25-36 CTG). The importance of this work is related to the fact that these alleles are rare in the general population and there are few data regarding their stability and their pattern of transmission.

**MATERIALS AND METHODS:** We measured the size of CTG repeats in blood DNA from five (n=3 affected and n=2 healthy) family members of a three-generations DM1 Italian family. We used conventional DM1 molecular diagnostic protocol (short range PCR, TP PCR, long range PCR) to determine the CTG repetitions number, associated to sequencing of the DMPK alleles, microsatellites and linkage disequilibrium (LD) analysis.

**RESULTS:** We were able to identify a large number of SNPs in complete LD with each other and with the CTG repeats, allowing us to distinguish 10 to 15 CTG repeats chromosomes from the pool of the 5 and >20 CTG repeats chromosomes. In this family we found the cosegregation of normal allele (CTG<sub>36</sub>) and premutated allele (CTG<sub>46</sub>) and fully expanded DMPK allele (CTG<sub>55</sub>). Interestingly, the (CTG)<sub>36</sub> DMPK normal allele, supposed to be stably transmitted, maintains its length when maternally inherited, while it is unstable when inherited by father, in accordance with literature data.

**CONCLUSIONS:** Our data support the hypothesis that multiple mutations of DMPK alleles within the normal range could lead to a gradually increase in CTG repeats, eventually causing new premutation-size alleles, especially when paternally inherited. Such data indicate that new DM1 families can arise from mutation of these alleles and underline the importance of further works on this topic.

**P057**  
**Analisi mutazionale del gene SMCHD1 e valutazione varianti di sequenza**

L. Colantoni<sup>1</sup>, S. Zampatti<sup>1</sup>, S. Carboni<sup>1</sup>, G. Pagliaroli<sup>1</sup>, M.R. Galota<sup>1</sup>, C. Peconi<sup>1</sup>, J. Mela<sup>1</sup>, R. Cascella<sup>2</sup>, G. Novelli<sup>2</sup>, E. Ricci<sup>3</sup>, C. Caltagirone<sup>4</sup>, E. Giardina<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Lab. Medicina Genomica UILDM, Fondazione Santa Lucia, Roma

<sup>2</sup>Dip. di Biomedicina e Prevenzione, Univ. di Roma Tor Vergata, Roma

<sup>3</sup>Ist. di Neurologia, Univ. Cattolica Scuola di Medicina, Roma

<sup>4</sup>IRCCS Fond. Santa Lucia, Roma

<sup>5</sup>IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma, Italia; Dip. di Biomedicina e Prevenzione, Univ. di Roma Tor Vergata, Roma

La distrofia FacioScapoloOmerale (FSO, OMIM#158900) è una malattia neuromuscolare ad eredità autosomica dominante con prevalenza di 1:20.000. Il 95% di soggetti affetti da FSO di tipo 1 (FSO1) presenta dimensioni variabili della regione subtelomeric del braccio lungo del cromosoma 4(4q35.D4Z4) caratterizzata da unit ripetute. La sonda p13E-11(D4F104S1), in grado di identificare il sito polimorfico di EcoRI con una dimensione che varia da 35 a 300kb in soggetti sani; al contrario i soggetti affetti presentano riarrangiamenti che risultano minori di 35kb. La dimensione del locus D4Z4 viene stabilita mediante LGE e PFGE con lo scopo di stabilire la delezione delle single unit ripetute. L'analisi genetica del restante 5% dei pazienti, con fenotipo tipico della FSO, ha rilevato che il locus D4Z4 mostra cambiamenti nella struttura della cromatina e la repressione del gene DUX4(4q35.2) anche in assenza di un frammento corto. I pazienti con FSO di tipo 2 (FSO2) invece, hanno almeno un allele 4qA causativo e sono clinicamente identici a quelli con FSO1. La FSO2 ha eredità digenica e i geni potenzialmente coinvolti sono DUX4 e SMCHD1(18p11.32). Il gene SMCHD1 è un modificatore della cromatina implicato nella metilazione delle isole CpG. Per comprendere il ruolo di SMCHD1 sono stati selezionati pazienti con chiara clinica FSO ma con un frammento di normali dimensioni. L'analisi genetica è stata condotta su 7 pazienti, tramite sequenziamento diretto della regione codificante, per rilevare la presenza di eventuali mutazioni. Nei pazienti analizzati, 6 hanno presentato mutazioni del DNA (missenso, stop e frameshift) suggerendo una possibile correlazione con l'insorgenza della malattia. Inoltre, al fine di valutare varianti di sequenza di significato incerto e potenzialmente benigne, sono stati valutati 30 soggetti non affetti da FSO. Il sequenziamento dell'intera regione codificante del gene SMCHD1 ha permesso di evidenziare la presenza di numerose varianti di sequenza ad elevata frequenza nella popolazione italiana e non associate al fenotipo. Al fine di supportare la corretta interpretazione del dato analitico è opportuno, come previsto dalle linee guida, tenere in considerazione tali varianti.



**P058**  
**A new mutation in RAB7A causes predominantly motor Charcot-Marie-Tooth type 2B**

P. Saveri<sup>1</sup>, M. De Luca<sup>2</sup>, V. Nisi<sup>2</sup>, C. Pisciotto<sup>1</sup>, G. Piscoquito<sup>1</sup>, M.M. Reilly<sup>3</sup>, J.M. Polke<sup>4</sup>, T. Cavallaro<sup>5</sup>, G.M. Fabrizi<sup>5</sup>, S. Magni<sup>6</sup>, F. Taroni<sup>6</sup>, C. Buccì<sup>2</sup>, D. Pareyson<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Clinical Neurosciences, IRCCS Foundation, C. Besta Neurological Institute, Milan, Italy

<sup>2</sup>Dept. of Biological and Environmental Sciences and Technologies, Univ. of Salento, Lecce, Italy

<sup>3</sup>MRC Centre for Neuromuscular Diseases and National Hospital for Neurology and Neurosurgery, UCL Institute of Neurology, London, UK

<sup>4</sup>Dept. of Neurogenetics, The National Hospital for Neurology and Neurosurgery, UCL Institute of Neurology, London, UK

<sup>5</sup>Dept. of Neurosciences, Biomedicine and Movement Sciences, Univ. of Verona, Verona, Italy

<sup>6</sup>Dept. of Diagnostics and Applied Technology, IRCCS Foundation, C. Besta Neurological Institute, Milan, Italy

Charcot-Marie-Tooth type 2B (CMT2B) is a rare autosomal dominant disease associated with missense mutations in the RAB7A gene encoding a small GTPase protein, which is ubiquitously expressed and involved in late endosomal/lysosomal pathways. CMT2B is characterized by predominant sensory loss, ulcer formations and amputations, with minor or absent motor deficits. We report a novel pathogenic RAB7A mutation in predominantly motor CMT2B. A 36-year-old woman had onset at age 14, with walking difficulties, progressive distal muscle wasting and weakness. She needed surgery for pes cavus and wore ankle foot orthosis. Her deceased father had progressive motor deficit with onset during his teens, severe distal limb weakness in his fifties, hand tremor, foot sensory loss with neither ulcers nor amputations. Proband's nerve biopsy showed a chronic axonal neuropathy with moderate loss of all myelinated fibres. NGS with a customized panel for CMT and related disorders revealed the novel p.Lys126Arg (c.377A>G) heterozygous mutation (confirmed by Sanger sequencing in both patients) in a highly conserved amino acid in the GTPase domain, predicted to be deleterious by in silico analysis. To carry out biochemical and functional studies, we cloned the cDNA encoding the RAB7A mutant protein into vectors for expression in mammalian or bacterial cells. Studies on the bacterially purified protein showed that the mutation affects the biochemical properties of RAB7 GTPase, while data on mammalian cells demonstrated that expression of the mutant protein alters late endocytic trafficking, affecting receptor degradation, and neurite outgrowth. In addition, this mutant protein bound more strongly to peripherin, an intermediate filament protein expressed mainly in peripheral neurons and involved in neurite outgrowth during development and in axonal regeneration after injury. These data widen the phenotypic spectrum of CMT2B to include predominantly motor CMT2. Future experiments on proband's fibroblasts will be useful to further understand disease pathomechanisms.







P059

**International-DMD (IDMD): un progetto diagnostico supportato da PTC Therapeutics per identificare le mutazioni del gene Distrofina mediante tecnologia NGS in pazienti selezionati provenienti da paesi europei**

R. Selvatici<sup>1</sup>, F. Gualandi<sup>1</sup>, R. Rossi<sup>1</sup>, C. Trabanelli<sup>1</sup>, P. Rimessi<sup>1</sup>, A. Venturoli<sup>1</sup>, S. Fini<sup>1</sup>, S. Neri<sup>1</sup>, M. Fabris<sup>1</sup>, A. Ferlini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Mediche e Dipartimento di Riproduzione e Accrescimento, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Italia

Premessa: La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia neuromuscolare genetica rara causata da diverse mutazioni nel gene della distrofina. I primi segni di patologia includono difficoltà a camminare, correre e salire le scale, ipertrofia dei polpacci. Dato che la perdita muscolare progressiva è irreversibile, è importante avere la conferma della diagnosi molecolare precoce per considerare tutti i trattamenti potenzialmente efficaci all'inizio della malattia. PTC Therapeutics International Ltd. e l'Università di Ferrara hanno istituito una collaborazione finalizzata all'esecuzione di test genetici per l'identificazione di pazienti affetti da malattie genetiche rare. I test genetici sono disponibili per i pazienti di tutti i paesi europei, e potenzialmente espandibili in altre regioni, con un focus iniziale sulla distrofia muscolare di Duchenne. Scopo dello studio: L'identificazione precoce della mutazione genetica è fondamentale per la scelta del trattamento adeguato e di follow-up, nonché l'ammissibilità a studi clinici. Materiali e metodi: Il protocollo diagnostico include analisi MLPA (MRC Holland) e sequenza NGS (Multiplicom) del gene distrofina. Risultati: Attualmente sono stati raccolti i DNA di 116 ragazzi DMD e sono state studiate anche 6 femmine. I pazienti provenivano da: Polonia (42), Ungheria (17), Lituania (6), Romania (3), Russia (1), Bosnia (4), Bulgaria (9) e sono stati analizzati anche 40 campioni provenienti dall'Algeria. Sono state individuate 16 mutazioni nonsense, 24 piccole mutazioni, 31 grosse delezioni/duplicazioni, 10 campioni sono risultati negativi e 25 campioni sono in corso di analisi. Per 16 campioni è stato richiesto un nuovo invio di DNA poiché non era adeguato per l'analisi diagnostica. Conclusioni: L'identificazione precoce della mutazione genetica è fondamentale per potenzialmente influenzare il corso di una malattia come la DMD, la scelta del trattamento e degli aiuti nella messa a punto di cure adeguate ed efficaci e di follow-up, nonché l'ammissibilità a studi clinici. La consulenza genetica può essere offerta anche ai pazienti e alle famiglie con importanti ripercussioni sulle scelte riproduttive e sulla pianificazione dello stile di vita (dettagli e contatti completi [www.ospfe.it/medicalgenetics](http://www.ospfe.it/medicalgenetics)).

P060

**HAX-1 is a potential molecular biomarker for an early diagnosis of cardiomyopathies in Friedreich s Ataxia**

S. Maletta<sup>1</sup>, F. Cherubini<sup>2,3</sup>, S. Fortuni<sup>2</sup>, F. Tiano<sup>2</sup>, A. Rufini<sup>2,3</sup>, N. Toschi<sup>4</sup>, I. Cond<sup>2</sup>, G.P. Ussia<sup>5</sup>, M. Frontali<sup>6</sup>, S. Romano<sup>7</sup>, C. Marcotulli<sup>8</sup>, C. Casali<sup>8</sup>, G. Chillemi<sup>9</sup>, G. Novelli<sup>1</sup>, R. Testi<sup>2,3</sup>, F. Malisan<sup>2</sup>, F. Amati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sect. of Medical Genetics, Dept. of Biomedicine and Prevention, Univ. of Rome Tor Vergata

<sup>2</sup>Lab. of Signal Transduction, Dept. of Biomedicine and Prevention, Univ. of Rome Tor Vergata

<sup>3</sup>Fratagene Therapeutics Srl, Rome

<sup>4</sup>Medical Physics Sect., Dept. of Biomedicine and Prevention, Univ. of Rome Tor Vergata

<sup>5</sup>Cardiovascular Disease Unit, Dept. of Systems Medicine, Univ. of Rome Tor Vergata

<sup>6</sup>CNR Institute of Translational Pharmacology, Rome

<sup>7</sup>Sant'Andrea Hosp., Univ. of Rome La Sapienza

<sup>8</sup>Dept. of Medical Surgical Sciences and Biotechnologies, Polo Pontino- Univ. of Rome "La Sapienza"

<sup>9</sup>SCAI (Super Computing Applications and Innovations) CINECA, Rome

Friedreich s Ataxia (FRDA), a rare, inherited, progressive degenerative disease, is caused by a defective expression of mitochondrial protein frataxin (FXN), due to homozygous hyper-expansion of GAA triplets in the gene which severely reduce its transcription. FXN is crucial for cell survival and its deficiency in humans critically affects viability of neurons, cardiomyocytes and pancreatic beta cells. Around two thirds of individuals with FRDA show typical manifestation of hypertrophic cardiomyopathy, that can progress in heart failure and death. Except for FXN, very few genes have been correlated with ataxia and cardiac disease in FRDA. To identify other genes involved in pathogenesis of FRDA, a microarray analysis on FRDA patient's lymphoblastoid cells stably reconstituted with FXN was performed. HS-1 associated protein X-1 (HAX-1), a family of proteins playing important roles in the protection of cardiomyocytes from apoptosis, is the highest up-regulated transcript (FC=+2, p<0.05). HAX-1 is highly expressed in heart and HAX-1 heterozygous-deficient hearts exhibit increases in infarct size. The microarray result was further assessed with qRT-PCR and western blot analysis performed on HEK293 stably transfected with empty vector or FXN-vector and lymphoblasts from FRDA patients compared to clinically unaffected heterozygous parents, confirming a strong co-expression of HAX-1 and FXN both at mRNA and protein level. Moreover, analysis of FXN and HAX-1 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of FRDA patients (n=10), heterozygous parents (n=6) and non-correlated healthy controls (n=10) revealed that their expressions are correlated. The positive correlation is more significant in FRDA patients showing a cardiac disease (7/10). The positive correlation between frataxin and HAX-1 expression level suggests a potential link of HAX-1 expression to pro-survival or protective cellular pathways related to frataxin. Thus, HAX-1 may be considered a specific biomarker of cardiomyopathy in FRDA and may represent a prognostic implement in these patients. Moreover, the discovery of novel genetic risk or protective factors in cardiomyopathy is crucial to improve risk stratification strategies and to identify new therapeutic targets.

P061

**A nuovi approcci di analisi molecolare nelle miopatie da Collagene VI**

R. Rossi<sup>1</sup>, C. Trabanelli<sup>2</sup>, S. Neri<sup>2</sup>, R. Selvatici<sup>1,2</sup>, M. Fabris<sup>1,2</sup>, A. Venturoli<sup>2</sup>, S. Fini<sup>2</sup>, A. Ferlini<sup>1,2</sup>, F. Gualandi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche, Sezione di Microbiologia e Genetica Medica, Università degli Studi di Ferrara

<sup>2</sup>U.O. Genetica Medica - Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Arcispedale S. Anna, Ferrara.

Mutazioni nei geni per il collagene VI (COL6A1, COL6A2, COL6A3) si associano ad uno spettro fenotipico che include la miopia di Bethlem (BM), la distrofia muscolare congenita di Ullrich (UCMD) e quadri clinici di severità intermedia. I fenotipi associati a difetto di collagene VI sono identificabili per distintive caratteristiche cliniche, immunostopatologiche su tessuto muscolare e di neuroimaging. Ci giustifica l'appropriatezza di una diagnostica molecolare mirata dei geni per il collagene VI. L'analisi molecolare di tali geni richiede l'implementazione di tecnologie ad alta processività, sia per l'analisi genomica che trascrizionale, in relazione all'ampia estensione della regione codificante (107 esoni) e alla notevole eterogeneità nella tipologia e localizzazione delle mutazioni patogene. Abbiamo sviluppato due approcci innovativi per lo studio dei geni COL6, a livello di DNA genomico e di RNA. L'analisi genomica si avvale di un pannello NGS, basato su tecnologia Illumina (TruSeq Custom Amplicon Low Input kit), che copre l'intera regione codificante e le regioni fiancheggiatrici introniche dei tre geni. Il pannello include la regione genomica relativa ad una mutazione intronica profonda del gene COL6A1, di recente descritta come frequente in pazienti UCMD. La tecnica, il design e l'accuratezza diagnostica sono stati testati mediante analisi di campioni con mutazioni e polimorfismi noti. Il pannello è stato utilizzato su 4 pazienti con miopia da collagene VI, consentendo di caratterizzare due pazienti UCMD. Per l'analisi su RNA, mirata all'individuazione di mutazioni introniche con effetto sullo splicing e allo studio della patogenicità di mutazioni identificate a livello genomico, abbiamo disegnato un array basato su tecnologia TaqManfi (Micro Fluidic Cards), rappresentativo di tutte le giunzioni esoniche dei tre geni e delle diverse isoforme al 5' del gene COL6A3 e al 3' del gene COL6A2. L'array è stato testato su tessuti di controllo che esprimono il collagene VI (biopsia muscolare, fibroblasti da biopsia cutanea). I trascritti dei tre geni sono risultati identificabili e interamente valutabili per la composizione esonica in entrambi i tessuti esaminati, suggerendo la possibile implementazione ad uso diagnostico di tale nuovo strumento di analisi.



P062

**A novel Mutation in the SIL1 gene in a Sicilian pedigree with the Marinesco Sj gren syndrome**

F. Guarnaccia<sup>1</sup>, E. Candura<sup>1</sup>, B.M. Giunta<sup>2</sup>, E. Sedita<sup>2</sup>, I. Camponeschi<sup>3</sup>, M. Nardella<sup>3</sup>, G. Zanni<sup>3</sup>, G. Garofalo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro di Genetica Medica, Ass. Casa Famiglia Rosetta ONLUS, Caltanissetta

<sup>2</sup>Centro di Riabilitazione Neuropsicomotoria, Ass. Casa Famiglia Rosetta ONLUS, Caltanissetta

<sup>3</sup>Dip. di Neuroscienze, U.O. Malattie Neuromuscolari e Neurodegenerative, Osp. Ped. B. Geso, IRCCS, Roma

The Marinesco-Sj gren syndrome (MSS, #248800) is a rare autosomal recessive multisystem disorder with infantile onset characterized by cerebellar atrophy, ataxia, cataract, mild to severe intellectual disability, progressive hypotonia and muscle weakness. Homozygous or compound heterozygous mutations in SIL1 on chromosome 5q31.2 as well as larger genomic deletions leading to a loss of protein, were reported to be causative for MSS. The ubiquitously expressed SIL1 protein functions as a nucleotide exchange factor (NEF) for the endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP, also known as GRP78. Loss of SIL1 function results in the accumulation of unfolded proteins due to impaired BiP function. We report a consanguineous family, second cousin healthy parents with two sibs with suspected hereditary ataxia syndrome. The oldest child was a 7-year-old female; she had congenital cerebellar atrophy, ataxia, bilateral cataracts, strabismus, nystagmus, scoliosis and episodic high values of serum CK concentrations. She succeeded to walk independently with a medical walker and improve her speech by a long life early rehabilitation plan in our rehabilitation centre. Ataxia, dysidiadochokinesia and muscle weakness persist. The youngest child was a 4-year-old male with similar neurologic and clinical signs. He was able to walk with the assistance of a medical walker, but truncal ataxia, loss of balance and coordination persist. We identified a homozygous mutation in the SIL1 gene in both affected sibs. After Sanger sequencing of all family members, we established that the mutation c.1007 T>C p.Leu336Pro was transmitted by the healthy parents. A damaging effect was predicted by all algorithms used (PolyPhen2, HumMut, and SIFT). The L336 residue is highly conserved among species and the mutation is absent in public databases. In conclusion, we report a novel SIL1 homozygous mutation in a Sicilian family with two sibs affected by MSS. A specific early rehabilitation plan is important to improve speech delay and stabilize cerebellar manifestations. Further study on mutations in the SIL1 gene together with genotype-phenotype correlation and protein function study could help to reach a more comprehensive evaluation and treatment of MSS syndrome.





**P063**  
**The association between Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase polymorphisms in Multiple Sclerosis patients and peripheral inflammation**

M. D'Aurora<sup>1,2</sup>, S. Franchi<sup>1,2</sup>, M. Di Nicola<sup>3</sup>, C. D'Angelo<sup>3</sup>, C. Gasperini<sup>4</sup>, A.M. Tata<sup>5</sup>, M. Reale<sup>3</sup>, G. Palka<sup>3</sup>, L. Stuppia<sup>1,2</sup>, V. Gatta<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Psychological, Health and Territorial Sciences, School of Medicine and Health Sciences, G.d Annunzio University, Chieti

<sup>2</sup>Molecular Genetics, Unit, CeSI-Met, Chieti

<sup>3</sup>Department of Medical, Oral and Biotechnological Science, G.d Annunzio University, Chieti

<sup>4</sup>Department of Neurosciences, San Camillo Forlanini Hospital, Rome

<sup>5</sup>Department of Biology and Biotechnologies Charles Darwin, Research, Center of Neurobiology Daniel Bovet, Sapienza University of Rome, Rome

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune disease, having not fully understood aetiology, and both genetic and environmental factors contribute to the pathogenesis of the disease. The cholinergic system has been indicated as a mediator of neuro-immune interactions, as well as an internal regulator of immune responses. The aim of the present research was to assess the associations between BChE and AChE genetic variations and serum cholinergic and inflammatory profiles in 102 Relapsing Remitting-MS patients and 117 healthy controls. ACh was measured by commercial fluorimetric kit, cholinesterases activity were measured in sera of RR-MS patients and HD by Ellman assay. Genomic DNA was extracted from whole blood and genotyping was performed with being blind to case control status. Human cytokine levels in serum were measured by ELISA assay. Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed to test the effect of different AChE and BChE genotypes, group (RR-MS or HD) and their interaction on levels of BChE, Ach and cytokines with group as a fixed effect and genotype as a random effect. Results showed in both patients and controls the reduction of BChE enzymatic activity in subjects carrying the BChE polymorphic allele. Serum levels of BChE were higher in RR-MS patients compared to HD subjects, resulting in reduced amounts of circulating ACh. An increased frequency of the BChE K-allele in MS patients as compared to controls was found. The BChE-K-allele seems a promising marker to assess the role of non-neuronal cholinergic system in regulating peripheral inflammation via ACh regulation. This study shed light on the role of the non-neuronal cholinergic system in immune cells to better understand MS aetiology and progression. The cross-talk between the periphery and the CNS could have a new undescribed crucial role for MS, regarded as a systemic disease.

**P064**  
**Identification of non-invasive molecular biomarkers in peripheral blood leukocytes from myotonic dystrophy patients**

F. Maiorca<sup>1</sup>, E. Centofanti<sup>1</sup>, S. Nappo<sup>1</sup>, L. Fontana<sup>1</sup>, G. Novelli<sup>1</sup>, A. Botta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biomedicine and Prevention, Medical Genetics Section, University of Rome Tor Vergata, Italy

Myotonic dystrophies type 1 (DM1) and type 2 (DM2) are autosomal dominant diseases that mostly affect skeletal muscle. DM1 is caused by expansion of [CTG]<sub>n</sub> triplet repeats in 3 untranslated region (UTR) of dystrophia myotonica protein kinase gene (DMPK), whereas DM2 phenotype depends to the expansion of [CCTG]<sub>n</sub> tetranucleotide repeats in intron 1 of the zinc finger protein-9 gene (CNBP). In DM pathogenesis, untranslated CUG/CCUG-RNAs interfere with the normal activity of RNA-binding proteins, as MBNL1 and CUGBP1. These proteins are antagonists regulators of splicing during skeletal muscle and heart development and their alteration leads to spliceopathy in DM cells and tissues. Skeletal muscle from DM patients shows aberrant splicing of numerous pre-mRNA, included insulin receptor (INSR), bridging integrator 1 (BIN1), SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1 (SOS1) and MBNL1 itself. The aim of our work was to analyze the splicing isoforms of mRNA involved in DM-spliceopathy in leukocytes of DM patients to identify possible non-invasive molecular biomarkers sensitive to the diseases progression and useful for ongoing clinical trials. RT-PCR was performed to determine the expressions of INSR, BIN1, APP, SOS1 and MBNL1 alternative transcript isoforms in leukocytes from DM1, DM2 patients (n= 30 and n= 20 respectively) and controls (n= 20). Moreover, relative mRNA transcript levels of MBNL1 ex7+ and MBNL1 ex7- isoforms have been evaluated by SYBR Green-based analysis. In leukocytes from DM patients, RT-PCR did not reveal splicing defects of the INSR, BIN1, APP, and SOS1 genes compared to CTR samples. However, we found an aberrant expression of MBNL1ex7-containing isoform in DM2 patients, not detected in both DM1 and CTR samples. qRT-PCR SYBR Green semi-quantitative analysis has confirmed this result with a statistically significant difference between the levels of MBNL1 ex7-containing transcript between DM2 and CTR/DM1 samples (p= 0.003 and p= 0.001 respectively). Our data indicate that [CCTG]<sub>n</sub> repeats expansion, differently from the DM1 mutation, influences the splicing isoforms expression of MBNL1 gene in leukocytes, suggesting that MBNL1 ex7-containing transcript could represent a non-invasive biomarker for DM2 disease.

**P065**  
**Abnormal Base Excision Repair (BER) and Mismatch DNA Repair (MMR) mechanisms are associated with myotonic dystrophy type 1**

S. Turturro<sup>1</sup>, F. Maiorca<sup>2</sup>, A. Sgura<sup>1</sup>, A. Botta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Science, University of Roma Tre, Italy

<sup>2</sup>Dept. of Biomedicine and Prevention, Medical Genetics Section, University of Rome Tor Vergata, Italy

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is the most common muscular dystrophy in adults caused by a (CTG)<sub>n</sub> expansion in Dystrophia Myotonica Protein Kinase (DMPK) gene. DNA repair mechanisms, especially Mismatch repair (MMR) and Base Excision Repair (BER), have been hypothesized to notably contribute to this phenomenon. Moreover, DM1 patients may be at increased risk of cancer development as well as Lhync syndrome, where mutations in MMR genes have been found. To investigate the role of the repair systems, we treated DM1 cells with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to test MMR and BER mechanisms and testing Non Homologous End-Joining (NHEJ) after X-rays irradiation. We demonstrated that DM1 cells show a baseline high number of Abnormal Nuclear Morphology (ANMs) and we observed a significant increase of ANMs frequency after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (48h and 72h), greater than that observed in normal treated fibroblasts. These knowledges suggest a dysfunctional MMR and/or BER mechanisms in DM1 samples. On the other hand, the similar increase of chromosome breaks and translocation frequencies 24h after X-rays treatment in both DM1 and normal cells suggests NHEJ is not involved in this pathology. Furthermore, since literature proposes DM1 as a disease due to premature aging with an increased endogenous oxidative stress (OS), also OS levels were measured in DM1 cells, in order to evaluate its contribute to disease progression.



**P066**  
**Mutazioni concomitanti nel gene DMD e nel gene per il recettore dell androgeno, rara causa di distrofinopatia ad evoluzione rapida in una bimba**

B. Petillo<sup>1</sup>, P. D'Ambrosio<sup>1</sup>, F. Lonardo<sup>2</sup>, A. D'Amico<sup>3</sup>, C. De Bernardo<sup>4</sup>, S. Gioacchino<sup>2</sup>, E. Bertini<sup>3</sup>, P. Grammatico<sup>4</sup>, L. Politano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cardiologia e Genetica Medica, Dip. Di medicina Sperimentale - Universit della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli

<sup>2</sup>UOSD Genetica Medica, AORN Rummo, Benevento

<sup>3</sup>Unit Malattie Neuromuscolari, Ospedale Pediatrico Bambin Gesù, Roma

<sup>4</sup>UOC Laboratorio di Genetica Medica, Universit di Roma La Sapienza - AO S.Camillo Forlanini, Roma

La Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) è la forma infantile più grave di distrofia muscolare causata da mutazioni nel gene della Distrofina. Trasmessa con modalità X-linked, di solito colpisce solo i maschi, mentre le donne sono portatrici non sintomatiche del difetto. Una donna può manifestare la malattia in caso di aberrazioni cromosomiche (S. di Turner, traslocazione X-autosoma), inattivazione sfavorevole dell'X, o sindrome da insensibilità agli androgeni. In quest'ultimo caso, noto anche come Sindrome di Morris, l'affetto, fenotipicamente femmina, presenta un assetto cromosomico XY, per mutazioni nel gene del recettore degli androgeni (AR), e conseguente insensibilità degli organi sessuali all'effetto androgenico. Descriviamo il caso di una piccola paziente giunta alla nostra osservazione all'età di 5 anni, per una sintomatologia caratterizzata da andatura anserina e tendenzialmente sulle punte, pseudoipertrofia dei gastrocnemi, difficoltà a rialzarsi da terra e notevole iperCKemia (40x). La biopsia muscolare, effettuata presso altra struttura, evidenziava marcata riduzione/assenza del segnale della distrofina, suggerendo la diagnosi di distrofinopatia, confermata dall'indagine molecolare che ha evidenziato una doppia copia degli esoni 46-51 del gene DMD. Il cariotipo, effettuato in contemporanea, ha evidenziato un assetto cromosomico XY, confermato dalla presenza del locus SRY mediante FISH. È stata quindi ipotizzata una S. di Morris, e richiesta a conferma - analisi molecolare del gene AR che ha evidenziato la variante c.2068C>G (p.His690Asp), mai descritta in letteratura ed a significato verosimilmente patogenetico. La concomitanza dei due difetti genetici, entrambi ereditati dalla madre e presenti in cis sullo stesso cromosoma X, è un'evenienza estremamente rara e spiega la sintomatologia della piccola, che pur fenotipicamente donna, manifesta un quadro clinico di distrofia muscolare sovrapponibile a quello di solito presente nei maschi.







**P067**  
**Mutazioni private nel gene CLCN1 nei pazienti con Miotonia Congenita provenienti dalla Campania**

P. D'Ambrosio<sup>1</sup>, R. Petillo<sup>1</sup>, M. Scutifero<sup>1</sup>, C. De Luca<sup>1</sup>, E. Picillo<sup>1</sup>, M. Ergoli<sup>1</sup>, L. Passamano<sup>1</sup>, A. De Luca<sup>2</sup>, L. Politano<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Cardiologia e Genetica Medica, Dipartimento di Medicina Sperimentale - Università della Campania, Napoli  
<sup>2</sup>Laboratorio di Genetica Medica, Fondazione Casa Sollievo della Sofferenza, Istituto Mendel, Roma, Italy

La miotonia congenita (MC) o miotonia non distrofica è una malattia rara caratterizzata da rigidità dei muscoli striati, compresi i muscoli estrinseci dell'occhio e la lingua. La muscolatura ha nel suo complesso un aspetto ipertrofico. La sintomatologia è di solito alleviata da contrazioni ripetute del muscolo (fenomeno del "warm-up").

In base alla modalità di trasmissione ereditaria, si distinguono due forme: la forma autosomica recessiva, tipo Becker, spesso associata a sintomi più gravi e la forma dominante autosomica, tipo Thomsen.

L'età di insorgenza è variabile dall'infanzia più frequente nelle forme dominanti ad un'età lievemente più avanzata nelle forme recessive. La diagnosi clinica si basa sulla storia familiare, la presenza dei sintomi tipici e dei dati strumentali elettromiografici che evidenziano scariche miotoniche, associati al rilievo di aumentati valori di creatinasi (CK). La malattia è dovuta a mutazioni nel gene CLCN1, che codifica per il canale cloridrico CIC-1, responsabile in più del 95% dei casi sia delle forme recessive che dominanti.

Descriviamo la nostra casistica di 25 pazienti affetti da MC - 11 casi sporadici e 14 familiari - in cui il sequenziamento del gene CLCN1 ha identificato le seguenti varianti: c. 86A>C; C.180 + 3A>T; c.302-1G>A; c.313C>T; F468S; c.501C>G; c.817G>A; c.826G>A; c.899G>A; c.1167-10T>C; c.1403T>C; c.1785G>A; c.2551G>A - isolate o più spesso in eterozigosi composta - mai riportate a nostra conoscenza nei pazienti di origine italiana. In due grandi famiglie, sono state trovate 3 mutazioni, 2 delle quali in cis sullo stesso cromosoma (c.86A>C + c.2551G>A e c.313C>T + 501C>G), il cui significato patogenetico è in corso di studio.

**P068**  
**Diagnosi prenatale del gene CAPN3: gestione di un caso complesso**

S. Zampatti<sup>1</sup>, S. Carboni<sup>2</sup>, J. Mela<sup>2</sup>, G. Pagliaroli<sup>2</sup>, C. Peconi<sup>2</sup>, R. Galota<sup>2</sup>, L. Colantoni<sup>2</sup>, C. Caltagirone<sup>3</sup>, E. Giardina<sup>4</sup>  
<sup>1</sup>IRCCS Fond. Santa Lucia, Roma, Italia; Ambulatorio di Genetica Clinica, IRCCS INM Neuromed, Pozzilli (IS)  
<sup>2</sup>Lab. Medicina Genomica UILDM sez. Laziale, IRCCS Fond. Santa Lucia, Roma, Italia  
<sup>3</sup>IRCCS Fond. Santa Lucia, Roma, Italia  
<sup>4</sup>IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma, Italia; Dip. di Biomedicina e Prevenzione, Univ. di Roma Tor Vergata, Roma, Italia

Le distrofie muscolari dei cingoli (LGMD) sono un gruppo di malattie caratterizzate da debolezza muscolare progressiva, con coinvolgimento della muscolatura del cingolo pelvico o della spalla. Si distinguono diversi sottotipi di LGMD, a seconda del quadro clinico, del gene coinvolto nella patogenesi della malattia e della modalità di trasmissione della stessa. La LGMD2A si trasmette in maniera autosomica recessiva ed è causata da mutazioni nel gene che codifica per l'enzima proteolitico calpaina-3 (CAPN3), localizzato sul cromosoma 15q15. Clinicamente si manifesta con distrofia muscolare atrofica, prevalentemente simmetrica, ad esordio compreso tra i 2 e i 40 anni. Il quadro clinico è progressivo con una limitata variabilità intrafamiliare. Possono essere presenti complicazioni respiratorie, ma non cardiache. L'uso della sedia a rotelle generalmente non avviene prima di 11-18 anni dall'esordio dei sintomi. La prevalenza dei casi di LGMD a trasmissione autosomica recessiva e sporadici è stata stimata in 1/200.000. Tra i casi di LGMD autosomica recessiva, il 33% è causato da mutazioni di CAPN3. Presso il nostro centro ha fatto riferimento una signora con familiarità per distrofia dei cingoli di tipo LGMD2A ed in gravidanza (10 s.g.). Sulla base della valutazione dell'albero familiare abbiamo verificato la presenza di due zii materni della probanda con distrofia muscolare dei cingoli di tipo LGMD2A, confermata attraverso analisi molecolare del gene CAPN3 positiva per mutazioni di tipo frameshift negli esoni 4 e 15 del gene CAPN3. In consulenza genetica, la probanda riferisce di aver già prenotato la villocentesi (14 giorni dopo il primo accesso presso la ns. struttura) e richiede la possibilità di eseguire indagini per distrofia muscolare dei cingoli di tipo LGMD2A su DNA fetale. Il presente lavoro riporta le strategie analitiche selezionate ed applicate dal laboratorio in virtù dell'urgenza richiesta dal caso, le peculiari esigenze informative richieste in sede di consulenza genetica pre e post-test ed il calcolo del rischio residuo in considerazione della storia familiare, della sensibilità analitica delle tecnologie applicate e della frequenza mutazionale nella popolazione di riferimento.

**P069**  
**Espansioni intermedie nel gene ATXN1 sono associate a sclerosi laterale amiotrofica**

S. Lattante<sup>1</sup>, M.G. Pomponi<sup>1</sup>, A. Conte<sup>2</sup>, G. Marangi<sup>1</sup>, G. Bisogni<sup>2</sup>, A.K. Patanella<sup>2</sup>, E. Meleo<sup>2</sup>, C. Lunetta<sup>3</sup>, N. Riva<sup>4</sup>, L. Mosca<sup>5</sup>, P. Carrera<sup>6</sup>, M. Bee<sup>7</sup>, M. Zollino<sup>1</sup>, M. Sabatelli<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Istituto di Medicina Genomica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma  
<sup>2</sup>Centro Clinico NEMO-Roma, Istituto di Neurologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma  
<sup>3</sup>NeuroMuscular Omnicentre, Fondazione Serena Onlus, Milano  
<sup>4</sup>Dipartimento di Neurologia, Istituto di Neurologia Sperimentale (INSPE), Divisione di Neuroscienze, Istituto San Raffaele Scientifico, Milano  
<sup>5</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Genetica Medica, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano  
<sup>6</sup>Divisione di Genetica e Biologia Cellulare, Unit di Genomica per la diagnosi delle patologie umane, Ospedale San Raffaele, Milano  
<sup>7</sup>Dipartimento di Economia e Management, Università di Trento, Trento

Il gene ATXN1 contiene un tratto di CAG che può essere ripetuto da 6 a 42 volte. Alleli espansi, contenenti un numero di CAG compreso tra 39 e 82 unit, sono associati ad atassia spinocerebellare di tipo 1. Due diversi studi hanno valutato il possibile ruolo del gene ATXN1 nella sclerosi laterale amiotrofica (SLA) con risultati contrastanti. Obiettivo di questo lavoro è stato chiarire il possibile ruolo di alleli intermedi di ATXN1 come fattori di rischio per la SLA. Sono stati esaminati una coorte di 1146 pazienti italiani con SLA (112 con SLA familiare e 1034 con SLA sporadica) e un gruppo di 529 individui di controllo. I pazienti, seguiti presso il Centro Clinico NEMO di Roma, sono stati preliminarmente testati per varianti in altri geni associati a SLA (C9orf72, SOD1, TARDBP e FUS). Alleli con ≥33 poliglutamine sono stati individuati in 105/1146 pazienti (9.16%) e in 29/529 individui di controllo (5.48%) (p= 0.003). Questo dato risulta ancora più significativo se si considera esclusivamente il gruppo di pazienti portatori dell'espansione patogenetica nel gene C9orf72. In questi, infatti, l'espansione in ATXN1 è presente nel 20.3% dei casi (12/59). Tale dato è stato replicato su una seconda coorte di pazienti con espansione in C9orf72, seguiti presso l'Ospedale San Raffaele e il Centro Clinico NEMO di Milano, in cui i casi con espansione sono risultati il 12.5% (10/80). Complessivamente, espansioni in ATXN1 sono presenti nel 15.82% di casi con espansione in C9orf72 (p=2.40E-05). Anche considerando i pazienti senza varianti nei geni C9orf72, SOD1, TARDBP e FUS, la percentuale di casi con ≥33 poliglutamine in ATXN1 risulta aumentata. Non sono state osservate, nei pazienti con espansione in ATXN1, differenze significative in termini di età media d'esordio, prevalenza di demenza frontotemporale e durata di malattia. Questi risultati supportano l'ipotesi che ATXN1 possa avere un ruolo come fattore di rischio nella SLA, soprattutto nei pazienti portatori dell'espansione in C9orf72. È necessario analizzare ulteriori coorti per confermare questi dati e studiare i meccanismi molecolari attraverso cui ATXN1 può contribuire alla degenerazione dei motoneuroni nella SLA.



**P070**  
**The TYMS-TSER polymorphism increases the risk of thymic lymphoid hyperplasia in Myasthenia Gravis**

F. Coppede<sup>1</sup>, A. Lopomo<sup>1</sup>, A. De Rosa<sup>2</sup>, M. Maestri<sup>2</sup>, R. Ricciardi<sup>2</sup>, L. Migliore<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dipartimento di Ricerca Traslationale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa, Pisa  
<sup>2</sup>Ambulatorio Miastenia e Chirurgia del Timo, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa

Introduction: Myasthenia Gravis (MG) is a prototypic antibody-mediated autoimmune disease mediated, in approximately 80% of the patients, by auto-antibodies against the nicotinic acetylcholine receptor (AChR). Moreover, the disease is often associated with pathological changes of the thymus: thymic epithelial tumours are present in about 10-20% of the cases, while up to 80% of the patients with early disease onset have thymic hyperplasia. Folate metabolism is required for the production of DNA precursors and for proper DNA methylation reactions, and impaired folate metabolism has been often associated with hyperplasia and cancer. Aim of the study: To investigate if major polymorphisms of folate-related genes, namely MTHFR 677C>T, MTR 2756A>G, MTRR 66A>G and TYMS-TSER (a 28-bp tandem repeat in the 5' promoter enhancer region of TYMS) increase the risk of pathological changes of the thymus in AChR+ MG patients. Materials and Methods: We collected DNA samples from 526 AChR+ MG patients, including 132 patients with normal involuted thymus, 146 patients with thymic hyperplasia, and 248 patients with a thymoma. Genotyping for MTHFR 677C>T, MTR 2756A>G, MTRR 66A>G and TYMS-TSER polymorphisms was performed in all subjects. Allele and genotype comparisons were performed in the three study groups, after correcting for multiple testing. Results: The frequency of the TYMS-TSER 3R allele was significantly higher in MG patients with thymic hyperplasia than in the other groups (P < 0.01). Furthermore, the TYMS-TSER 3R3R genotype was significantly associated with increased risk of thymic hyperplasia [OR 2.71 (95% CI: 1.34-5.47)]. Conclusion: The 3R allele in the thymidylate synthase promoter enhancer region has been often associated with increased promoter activity leading to an increased production of the TYMS protein, required for the synthesis of DNA precursors. The present study suggests that the TYMS-TSER 3R allele increases the risk of thymic lymphoid hyperplasia in AChR+ MG patients.





**P071**  
**Characterization of two novel intronic SOD1 mutations causing aberrant splicing**

R. Croce<sup>1</sup>, L. Corrado<sup>1</sup>, D. Babu<sup>1</sup>, A. Di Piero<sup>1</sup>, E. Bersano<sup>2</sup>, F. De Marchi<sup>2</sup>, L. Mazzini<sup>2</sup>, S. D'Alfonso<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Lab. Genetica Umana, Dipartimento di Scienze della Salute, UPO, Novara  
<sup>2</sup>ALS Center AOU Maggiore della Carità, Novara

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is an adult-onset, progressive, fatal neurodegenerative disease. Several genes are associated with ALS. Copper-zinc superoxide dismutase 1 (SOD1) is one of the mainly mutated genes in ALS (12-23% of familial ALS, 1-3% of sporadic ALS), and more than 160 mutations have been reported. Most mutations are missense, and only rare intronic variants in the SOD1 gene have been detected in ALS cases. We report here 2 novel intronic mutations of the SOD1 gene localized in introns 4 and carried by two different ALS patients with a family history for amyotrophic lateral sclerosis (FALS). The first mutation is an insertion of T (c.357+1\_357+2insT)(rs747768384) in intron 4 which was predicted to disrupt normal RNA processing causing the suppression of the canonical donor site (NNSPLICE). Besides the normal transcript, at least two aberrant transcripts have been detected in the peripheral blood lymphocytes of the patient carrying the mutation. The first one resulted in the activation of a cryptic donor site located in exon 4, three bases upstream the canonical splice site, leading to an inframe deletion of valine 118. The second one, included a part of intron 4 sequence which resulted in the introduction of four extra aminoacids (V-K-F-S- end) before a premature stop codon at aa 122. Unfortunately, we have no data about the quantitative ratio among the three mRNA isoforms in the analysed blood cells as well as in neuronal cells. We can only hypothesize a main pathogenic role for the transcript with the intron 4 retention since at least two similarly truncated proteins at residues 124 and 121 were reported in two patients with a familial and a sporadic disease respectively. The second mutation is a thymine to guanine substitution 10 bp upstream of exon 5 (c.358-10T>G). Despite the silico prediction analysis was ambiguous (NNSPLICE), we detected an aberrant transcript in the peripheral blood lymphocytes of the patient carrying this mutation which contained an insertion of 9 bases of intron 4 resulting into an in frame insertion of 3 new amino acid residues, Phe-Leu-Gln. Despite we cannot demonstrate by segregation analysis the pathogenicity of these two mutations, our data suggest that these novel intronic mutations are causing the disease and highlights the importance of wide exon-flanking sequencing and transcript analysis.

**P072**  
**Diagnosi concomitante di sindrome di Down e distrofia muscolare congenita: un caso clinico**

S. Briuglia<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dip. Materno-Infantile Universit di Messina

La sindrome di Down o trisomia 21 è caratterizzata da un peculiare fenotipo e conferma citogenetica neonatale. Si tratta di una patologia la cui incidenza sta diminuendo per l'uso sistematico delle indagini prenatali. La prevalenza alla nascita è attualmente stimata in 1/2.000 nati vivi. Le complicanze comuni sono il ritardo mentale e l'ipotonia muscolare. Il floppy infant è segno di allarme di compromissione neurologica e/o muscolare. Descriviamo il caso di un bimbo di 17 mesi affetto da trisomia 21 libera e distrofia muscolare congenita, giunto alla nostra osservazione all'età di 3 mesi con sindrome di Down, CAV di tipo A, con buona correzione anatomica, ridotta motilità spontanea, marcata ipotonia generalizzata, reflusso gastro-esofageo, suzione ipovalida, grave deficit di crescita, criptorchidismo sinistro, alimentazione per via enterale con sondino nasogastrico per gavage e successivamente in pompa. Eseguiti ecografia cerebrale, EEG e Elettromiografia risultati nella norma, in trattamento abilitativo a carattere continuativo. Per la persistenza di grave ipotonia generalizzata, severo ritardo psicomotorio, assenza del controllo del capo dopo circa 6 mesi di terapia, viene eseguito il dosaggio del CK, risultato aumentato di 15-20 volte, con EMG nella norma. All'età di 17 mesi, la biopsia muscolare del vasto laterale ha documentato una distrofia muscolare congenita, non da distrofinopatia e in corso di definizione diagnostica. Il caso clinico descritto è esemplificativo di come un attento follow up permette di individuare i rarissimi casi con doppia patologia genetica rara. Un quadro di compromissione neuro-muscolare severa è raro nella storia naturale della sindrome di Down e deve essere particolarmente attenzionato in quanto può sottendere una seconda patologia genetica. In letteratura sono presenti 3 segnalazioni di pazienti con sindrome di Down e concomitante distrofia muscolare di Duchenne/Becker: il primo del 1971 in Germania, il secondo del 1993 in Giappone, con esordio di sintomi muscolo-scheletrici a 12 anni, e l'ultimo del 2016 in Italia, con esordio a 8 anni. Distrofinopatie sono state riportate in casi di sindrome di Turner, Klinefelter e Noonan. Segnaliamo il primo caso con diagnosi concomitante di sindrome di Down e distrofia muscolare congenita. Il management multidisciplinare, compreso il genetista clinico, è indispensabile per individuare i rarissimi casi di coincidenza di 2 patologie genetiche, permettendo una diagnosi corretta e precoce, al fine di evitare errori e ritardi diagnostici e di migliorare l'approccio terapeutico a lungo termine e preventivo e conseguentemente la prognosi e la qualità di vita dei pazienti con comorbidità rarissime.



**P073**  
**The phenotypic spectrum of Chronic Intestinal Pseudo-Obstruction associated with mutations in ACTG2 (actin, gamma 2, smooth muscle, enteric gene)**

L. Matera<sup>1</sup>, D. Bordo<sup>2</sup>, M. Rusmini<sup>1</sup>, M. Lerone<sup>1</sup>, M. Di Duca<sup>1</sup>, M. Mosconi<sup>3</sup>, G. Mattioli<sup>3,4</sup>, G. Martucciello<sup>3,4</sup>, A. Pini Prato<sup>5</sup>, A. Barabino<sup>6</sup>, P. Gandullia<sup>6</sup>, S. Arrigo<sup>6</sup>, P. Nozza<sup>7</sup>, E. Thai<sup>8</sup>, E.M. Silini<sup>8</sup>, R. Ravazzolo<sup>1,4</sup>, I. Ceccherini<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>U.O.C. Genetica Medica, Ist. G. Gaslini, Genova  
<sup>2</sup>Gene Expression Regulation Laboratory, IRCCS AOU San Martino-IST, Genova  
<sup>3</sup>Paediatric Surgery Unit, Ist. G. Gaslini, Genova  
<sup>4</sup>DiNOGMI, University of Genova, Genova  
<sup>5</sup>Chirurgia Pediatrica, AON SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria  
<sup>6</sup>Gastroenterology and Endoscopy Unit, Ist. G. Gaslini, Genova  
<sup>7</sup>Pathology Unit, Ist. G. Gaslini, Genova  
<sup>8</sup>Pathology Unit, University Hospital of Parma, Parma

Gastrointestinal motility disorders range from common and generally benign to rare and potentially life-threatening diseases. Developmental defects affecting the enteric nervous system (ENS), smooth muscles cells or interstitial cells of Cajal, can underlie these conditions, resulting in compromised peristalsis leading to chronic intestinal pseudo-obstruction (CIPO) syndromes. CIPO can have a profound impact on quality of life, leading the most severely affected individuals to life-long parenteral nutrition and urinary catheterization. By Whole Exome Sequencing and targeted Sanger sequencing, we have found heterozygous missense mutations of the ACTG2 gene, which encodes a protein crucial for correct enteric muscle contraction, in ten pediatric patients with either CIPO or MMIHS (microcolon, megacystic, intestinal hypoperistalsis syndrome). Remarkably, at histopathology assessment some patients had ENS abnormalities, including the presence of giant ganglia, an hallmark of intestinal neuronal dysplasia type B, thus suggesting ENS abnormalities may be secondary consequences of an impaired gut motility caused by ACTG2 variants. Recently, we have identified three new missense variants not yet reported, namely the aminoacid substitutions His41Gln, Thr149Arg, and Glu196Asp. The first variant (H41Q) was detected in a patient affected with severe constipation since the neonatal period and subsequent episodes of intestinal sub-occlusion. Notably, the father, carrying the same variant, has reported severe constipation since infancy and no other symptom. The other two mutations were detected in sporadic patients. The patient with the T149R variant had shown a severe phenotype resembling MMIHS shortly after birth. The latter variant (E196D) was detected in a patient affected with infantile onset of CIPO. To investigate the role of these variants in the function of actin filaments and the possible mechanisms underlying the development of intestinal motility disorders, we have performed a 3-dimensional molecular modeling for ACTG2. The further definition of the phenotypic spectrum associated with ACTG2 will provide evidence for a correlation between the clinical phenotype and genotype at the ACTG2 locus, to improve the diagnosis and prognosis of these severe conditions.

**P074**  
**Challenges in assessing clinical significance of unexpected findings: lesson from two apparently unrelated families with the same duplication in the dystrophin gene**

L. Zito<sup>1</sup>, S. Grotta<sup>1</sup>, G. Iapichino<sup>1</sup>, V. Alesi<sup>2</sup>, M.L. Dentici<sup>2</sup>, M.G. Di Gregorio<sup>1</sup>, M. Canestrelli<sup>1</sup>, G. Di Giacomo<sup>1</sup>, C. Vaccari<sup>1</sup>, G. Barrano<sup>1</sup>, A. Novelli<sup>2,1</sup>  
<sup>1</sup>U.O.S.D. Genetica Medica, Osp. San Pietro Fatebenefratelli, Roma  
<sup>2</sup>U.O.C. Genetica Medica, Ospedale Pediatrico del Bambino Gesù, Roma

Improvement in DNA technology is largely enhancing our knowledge on DNA variation and enabling genotype-phenotype correlation studies. Array-CGH is increasingly being used as a first-tier cytogenetic diagnostic test for rapid detection of CNVs in patients with developmental delay and/or intellectual disability and congenital malformations. This often brings to the detection of CNVs of unknown clinical significance, which can even be unrelated to the indication of referral. Several such so-called incidental findings have been described for the dystrophin gene. This is not surprising, as this gene is one of the largest known, spanning 2.5 Mbases at Xp21, and is prone to large rearrangements of different sizes and type (i.e. deletions/duplications), with different outcomes at the protein level (in-frame/out of frame), hence with different clinical implications (e.g. Duchenne- or Becker- Muscular Dystrophy (DMD/BMD) or non-pathogenic). Carrier screening of severe genetic diseases during or before pregnancy is becoming increasingly available and, in selected cases where a high risk of a known disease is identified, this can lead to an indication to prenatal diagnosis. Most of the available genetic tests rely on the identification of mutations known to be associated to the related disease. Other tests are able to detect several different variants in a particular gene and it is not always possible to predict their clinical significance. This is the case for example with carrier screening of DMD/BMD through MLPA analysis, which enables the detection of deletions/duplications for the 79 exons of the gene. Whichever the method that brings us to the detection of a variant of unknown clinical significance, the genetic counseling and case management that follows, with all potential implications for family members, can be challenging and must be approached with great care. We report on the identification of the same duplication in the DMD gene, spanning exons 64-79, in two apparently unrelated patients who came to our unit for different reasons and were followed through two distinct diagnostic protocols. Genetic counseling implications are discussed. Also, the priority of collecting family information and extending the analysis to key family members is highlighted.







**P075**  
**Un caso di Miopatia Miotubulare X-linked da microdelezione Xq28**

R. Petillo<sup>1,2</sup>, M. Falco<sup>1,3</sup>, S. Amabile<sup>1,3</sup>, A. Novelli<sup>4</sup>, S. Genovese<sup>4</sup>, F. Fattori<sup>5</sup>, C. Calacci<sup>4</sup>, P. Fontana<sup>1</sup>, C. Lombardi<sup>1</sup>, F. Cocca<sup>6</sup>, G. De Luca<sup>6</sup>, A. Scoppa<sup>6</sup>, A. Casani<sup>6</sup>, G. Scarano<sup>1</sup>, F. Lonardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.S.D. di Genetica Medica, A.O.R.N. G. Rummo, Benevento

<sup>2</sup>Servizio di Cardiomiologia e Genetica Medica, Università della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli

<sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II

<sup>4</sup>UOC Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

<sup>5</sup>Unit di Malattie Neuromuscolari e Neurodegenerative, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

<sup>6</sup>Terapia Intensiva Neonatale, A.O.R.N. G. Rummo, Benevento

La Miopatia Miotubulare X-linked, o XLMTM (OMIM #310400), detta anche Miopatia Centronucleare X-linked (CNMX), è una rara patologia muscolare caratterizzata da grave debolezza muscolare ed ipotonia neonatale, oftalmoplegia esterna ed insufficienza respiratoria. Spesso i neonati affetti sono macrosomici, e frequentemente presentano criptorchidismo. La prognosi è generalmente infausta, ed è legata soprattutto alle problematiche respiratorie. La patologia è causata da mutazioni in un gene, MTM1, che mappa in Xq28 e codifica per la miotubularina, una fosfatasi espressa principalmente nel muscolo scheletrico, il cui deficit comporta una disorganizzazione delle fibre muscolari. Sono state descritte diverse mutazioni a carico del gene, in genere mutazioni puntiformi non senso o missenso, ma è stato riportato anche qualche caso di microdelezione. Descriviamo un paziente giunto alla nostra osservazione per marcata ipotonia, criptorchidismo bilaterale e pielectasia renale sinistra. L'esame clinico dimorfologico evidenziava, inoltre, micro-retrognatia ed areflessia. Il piccolo, nato a 41 settimane di gestazione da taglio cesareo, ha presentato sofferenza perinatale ed arresto cardiocircolatorio alla nascita, con Apgar 1 e 4 (a 1 e 5), per cui è stato sottoposto ad ipotermia terapeutica. È stato inoltre fornito un supporto ventilatorio invasivo per circa 3 mesi, seguito da una ventilazione non invasiva. Sono stati avviati vari test genetici, tra i quali un esame mediante CGH-array, che ha evidenziato una microdelezione nella regione Xq28, estesa circa 24 kb, contenente gli esoni 2, 3 e 4 del gene MTM1. La stessa delezione è stata osservata nella madre, mentre non è presente nei genitori e nelle due sorelle della madre. Attualmente il piccolo è stato dimesso ed è seguito a casa con un programma che non prevede supporto respiratorio. Le sue condizioni sono discrete, la crescita nella norma, ma permane l'ipotonia. Necessita inoltre di frequenti aspirazioni dei muchi dalle prime vie aeree. Descriviamo questo caso perché la delezione osservata è la più piccola finora descritta, e potrebbe correlare con il quadro clinico non tra i più severi. Sottolineiamo inoltre l'importanza di ricercare sbilanciamenti genomici nei casi di ipotonia neonatale.

**P076**  
**Comprehensive copy number variant profiling in 234 diagnosis-resistant myopathic patients**

T. Giugliano<sup>1,2</sup>, M. Savarese<sup>1,2,3</sup>, A. Garofalo<sup>1,2</sup>, A. Torella<sup>1,2</sup>, J. De Bleecker<sup>4</sup>, M. Moggi<sup>5</sup>, E. Mercuri<sup>6</sup>, A. Toscano<sup>7</sup>, M. Mora<sup>8</sup>, L. Santoro<sup>9</sup>, T. Mongini<sup>10</sup>, E. Bertini<sup>11</sup>, C. Bruno<sup>12</sup>, C. Minetti<sup>12</sup>, G.P. Comi<sup>13</sup>, F.M. Santorelli<sup>14</sup>, C. Angelini<sup>15</sup>, L. Politano<sup>16</sup>, G. Piluso<sup>1</sup>, V. Nigro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Patologia Generale, Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli

<sup>2</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine, Pozzuoli

<sup>3</sup>Folkhlsan Research Center, Medicum, University of Helsinki, Helsinki, Finland

<sup>4</sup>Department of Neurology, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium

<sup>5</sup>Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

<sup>6</sup>Istituto di Neurologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli, Roma

<sup>7</sup>Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Messina, Messina

<sup>8</sup>Neuromuscular Diseases and Neuroimmunology Unit, Istituto Besta, Milano

<sup>9</sup>Dipartimento di Neuroscienze e Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

<sup>10</sup>S.S. Malattie Neuromuscolari, Università degli Studi di Torino, Torino

<sup>11</sup>Unit of Neuromuscular and Neurodegenerative Disorders, Laboratory of Molecular Medicine, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Roma

<sup>12</sup>U.O.C. Neurologia Pediatrica e Malattie Muscolari, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova

<sup>13</sup>Centro Dino Ferrari, Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

<sup>14</sup>Medicina Molecolare, IRCCS Fondazione Stella Maris, Pisa

<sup>15</sup>Fondazione Hospital S.Camillo IRCCS, Venezia

<sup>16</sup>Cardiomiologia e Genetica Medica, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli

An extensive NGS molecular study of 504 genetically undiagnosed patients with clinical diagnosis of muscular dystrophies, congenital myopathies or other conditions affecting muscles allowed to identify putative causative mutations in 218 out of 504 cases. After this screening, 286 cases remained undiagnosed. Elusive genetic changes, such as deletions, duplications or deep intronic mutations or novel genes may be responsible for these diagnosis-resistant patients.

In this multicenter cohort study, we recruited 234 out of 286 undiagnosed patients to study the impact of copy number variants (CNVs) in skeletal muscle disorders and potentially to improve the diagnostic rate.

All patients were analyzed by Motor Chip, a custom CGH-array for the identification of deletions and duplications in neuromuscular disorders. Motor Chip allowed the identification of non-polymorphic CNVs in twenty-two patients (9.4%). In 12 patients (5.1%), the identified CNVs were considered responsible for the observed phenotype. An additional 10 patients (4.3%) had CNVs of uncertain significance (VUS) not yet proven to be causative. Although these VUS may not act as primary disease drivers, we cannot exclude the possibility that some of them may act as modifiers, contributing to the observed phenotype.

However, functional assays and the comparison with similar cases are necessary for the clinical interpretation of these rearrangements.

Our study confirms that deletions and duplications account for 5-10% of patients affected by a skeletal muscle disorder without a molecular diagnosis, explaining a not exiguous number of unsolved cases.



**P077**  
**Sindrome da microdelezione 16p11.2: caso clinico**

D. Dell'Edera<sup>1</sup>, C. Dilucca<sup>2</sup>, A. Allegritti<sup>1</sup>, F. Simone<sup>1</sup>, M.G. Lupo<sup>1</sup>, A.A. Epifania<sup>1</sup>, R. Davanzo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. Genetica, Osp. Madonna delle Grazie, Matera

<sup>2</sup>UC di Neonatologia e Pediatria, Osp. Madonna delle Grazie, Matera

La piccola C.B. è una bambina di 2 anni, nata alla 39<sup>a</sup> settimana di gestazione con parto cesareo da genitori italiani non-consanguinei. La madre della probanda presenta lieve ritardo mentale (MR) con note dismorfiche minori. I parametri di crescita alla nascita erano nei limiti della norma (3,3 kg di peso e 46 centimetri di lunghezza), ma la bambina presentava note dismorfiche. Per quest'ultimo motivo, all'età di 18 mesi, è stata eseguita una visita genetica che, in base alla valutazione clinica ed ai risultati delle indagini strumentali, aveva indicato l'analisi dei geni del pathway RAS-MAPK (rasopatia). All'età di due anni di vita la piccola veniva ricoverata presso l'Unità Operativa di Neonatologia e Pediatria dell'Ospedale di Matera per scarso accrescimento staturale-ponderale ed anoressia. L'osservazione clinica evidenziava bozze frontali prominenti, capelli fini, radi ed impianto retroposteriore, sopracciglia rade, epicanto, ipertelorismo con distanza interpupillare di 2,9 cm (>97<sup>o</sup>), naso con radice che continua nell'osso frontale (naso ad elmo), piramide nasale lunga, coane anteverse, punta nasale cavernosa, padiglioni auricolari ad impianto basso e retrorotati, micrognazia, bocca a carpa, collo corto, edema duro a carico del dorso dei piedi bilateralmente, a sinistra III dito ipoplasico con IV sovrapposto. Per escludere la presenza di una patologia genomica si è proceduto ad effettuare l'ibridazione Genomica Comparativa (CGH-Array: vetrino CytoSure Oligo arrays OGT 4x180K ISCA v2; software di analisi: CytoSure Interpret Software Version 4.8), la quale ha evidenziato la presenza di una microdelezione di 597,84 kb all'interno del braccio corto del cromosoma 16 (16p11.2). In base alle dimensioni del materiale genetico deletato, la sindrome da microdelezione 16p11.2 rientra nel primo gruppo. Per verificare se la microdelezione rilevata era de novo o segregante si è proceduto ad estendere la CGH-Array ai genitori. L'analisi ha evidenziato che la madre della probanda mostrava la stessa microdelezione. Il caso presentato è interessante in quanto la microdelezione osservata è quasi sempre associata ad un fenotipo clinico che tende al sovrappeso, invece la piccola C.B. è stata ricoverata per scarso accrescimento staturale-ponderale ed anoressia. Inoltre, si nota la natura segregante dell'anomalia genomica riscontrata e anche la variabilità fenotipica fra la madre e la figlia.





**P078**  
**Variabilità fenotipica intrafamiliare nella sindrome da pieghe cutanee circonferenziali, tipo Kunze (OMIM 156610) da mutazione eterozigote N-terminale del gene TUBB**

M.L. Dentici<sup>1</sup>, A. Terracciano<sup>1</sup>, E. Bellacchio<sup>1</sup>, R. Capolino<sup>1</sup>, A. Novelli<sup>1</sup>, M.C. Digilio<sup>1</sup>, B. Dallapiccola<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Area di Ricerca Genetica e Malattie Rare, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Roma

La sindrome da pieghe cutanee circonferenziali simmetriche congenite (PCCSC) è una malattia molto rara caratterizzata dal ripiegamento della cute in eccesso con aspetto ad anello, soprattutto a livello degli arti. Questo quadro clinico è stato definito nel 1969 sindrome dell'omino Michelin (MTBS). Nel 2011, è stata conosciuta la definizione di pieghe cutanee circonferenziali tipo Kunze, CSC-KT, per inquadrare i soggetti che presentano, oltre alle PCCSC della MTBS, dismorfismi facciali, disabilità intellettiva (DI) e anomalie congenite multiple (MCA). Nel 2015, sono state identificate 2 mutazioni di novo nel gene TUBB (nel dominio N-terminale) e 4 mutazioni (omozigoti ed eterozigoti) nel gene MAPRE2 rispettivamente in 3 e 4 pazienti affetti da CSC-KT. Le mutazioni nel dominio C-terminale del gene TUBB si associano a microcefalia e malformazioni cerebrali, in assenza di MCA riconducibili alla CSC-KT. Abbiamo studiato un paziente di 9 anni con una diagnosi clinica di CSC-KT, definita in base alla presenza di PCCSC sul collo e sugli arti, microcefalia, grave DI, bassa statura, dismorfismi facciali (blefarofimosi, epicantero, padiglioni auricolari retrorotati e a basso impianto). La RMN ha documentato una atrofia globale degli emisferi cerebrali. La madre del paziente presentava le caratteristiche PCCSC parzialmente risolte spontaneamente in età adulta, ed era clinicamente inquadrabile nella MTBS, in assenza di MCA associate. L'analisi di sequenziamento diretto dei geni causativi di CSC-KT ha identificato nel probando una nuova mutazione in eterozigosi nel gene TUBB c. 218 T>C (p.Met73Thr) a segregazione materna. Questo studio ha identificato il quarto paziente affetto da CSC-KT ed il primo caso familiare con mutazione N-terminale del gene TUBB; documenta l'estrema variabilità clinica intrafamiliare della malattia e l'impossibilità di differenziare nosologicamente la MSBB dalla CSC-KT; conferma che le mutazioni N-terminali del gene TUBB causano il fenotipo classico della CSC-KT, che può associarsi anche a malformazioni cerebrali, in precedenza osservate solo nei pazienti con mutazioni nel dominio C-terminale. Le neuroimmagini di questo paziente ampliano lo spettro delle malformazioni TUBB-correlate e confermano l'inclusione della CSC-KT nel gruppo delle tubulinopatie.

**P079**  
**Modulating the WNT pathway in Drosophila models of Cornelia de Lange Syndrome**

P. Grazioli<sup>1</sup>, A. Selicorni<sup>2</sup>, C. Gervasini<sup>1</sup>, T. Vaccari<sup>3</sup>, V. Massa<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dip. Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia  
<sup>2</sup>U.O.C. Pediatria, ASST Lariana, Como, Italia  
<sup>3</sup>Dip. Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

Cornelia de Lange syndrome (CdLS) is a rare genetic disorder affecting neurodevelopment and the gastrointestinal, musculoskeletal systems. CdLS is caused by mutations within NIPBL, SMC1A, SMC3, RAD21, and HDAC8 genes. These genes codify for the cohesin complex, a multiprotein structure playing a role in chromatid adhesion, DNA repair and gene expression regulation. It has been demonstrated that a strong correlation exists between cohesin complex function and WNT signalling, an intracellular pathway involved in regulation of expression of several genes controlling cell division and embryonic development. Recently, it has been observed that chemical activation of the WNT pathway in nipbl-loss-of-function zebrafish embryos and in NIPBL-mutated patient fibroblasts rescued the adverse phenotype. Both embryos and fibroblasts present similar patterns of canonical WNT pathway alterations and cyclinD1 downregulation. Drosophila melanogaster is an inexpensive model to study CdLS and to screen in vivo for therapeutic compounds. Therefore, we have used flies strains mutated in Nipped-B and Hdac3 genes (respectively NIPBL and HDAC8 in humans) for assessing the existing correlation between cohesin complex and WNT pathway. Moreover, we have selected D. melanogaster mutants to screen for chemicals that revert the CdLS associated-phenotypes efficiently. In particular, we have tested several WNT activators and differences in modulating CdLS phenotypes will be discussed.

**P080**  
**Sindrome autoinfiammatoria dovuta a una rara mutazione di PSMB8**

S.C. Gorgone<sup>1</sup>, C. Berera<sup>1</sup>, R. Foti<sup>3</sup>, M. Gnazzo<sup>2</sup>, F. Mannino<sup>1</sup>, V. Nicotra<sup>1</sup>, A. Novelli<sup>2</sup>, C. Passarelli<sup>2</sup>, E. Visalli<sup>2</sup>, T. Mattina<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Genetica Medica Università di Catania Centro di Riferimento Regionale per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare HUB, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico- V.E. di Catania  
<sup>2</sup>UOC Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS Ospedale Pediatrico, Bambino Gesù - Roma  
<sup>3</sup>Reumatologia Università di Catania Centro di Riferimento Regionale per la prevenzione, diagnosi e cura delle malattie rare reumatologiche dell'adulto, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico- V.E. di Catania

Riportiamo una paziente, di 42 anni, riferita dal Centro di riferimento regionale per la prevenzione, diagnosi e cura delle malattie rare reumatologiche dell'adulto. Figlia di consanguinei con un quadro clinico caratterizzato da coinvolgimento multisistemico ed evolutivo. Le manifestazioni cliniche comprendono: lipodistrofia generalizzata, polineuropatia demielinizante sensitivo-motoria, piastrinopenia autoimmune, connettivite sistemica, epilessia generalizzata fotosensibile, steatosi epatica e pancreatite autoimmune, ipercolesterolemia ed eritema al volto lupus like. La paziente ha avuto un'importante calo ponderale e assenza di ciclo mestruale negli ultimi due anni. Sulla base del quadro clinico dominato dalla lipodistrofia e della possibile eredità recessiva, la paziente è stata testata con analisi molecolari del gene PSMB8 che ha rilevato le varianti genomiche c.22G>A e c.220A>G, entrambe in omozigosi.

Il gene PSMB8 (#177046) codifica per la subunit 5i dell'immunoproteosoma. Il proteosoma è un complesso proteico implicato in:  
 -Degradazione delle proteine ubiquinate  
 -Regolazione del ciclo cellulare  
 -Riparazione di difetti genetici  
 -Attivazione dei meccanismi anti-infiammatori NF-Kb e IFN-dipendenti.  
 Sotto l'effetto dell'IFNγ il complesso del proteosoma si converte in immunoproteosoma, espresso dalle cellule T del sistema immunitario e coinvolto in attività catalitiche con conseguente degradazione delle proteine. Mutazioni a carico di PSMB8 causano l'impossibilità di incorporare la subunit 5i all'interno dell'immunoproteosoma, e ci determina:  
 -Accumulo di proteine ubiquinate e ossidate  
 -Conseguente attivazione della cascata infiammatoria NF-Kb dipendente  
 -Alterata attività chimotripsinica.

Le mutazioni a carico del gene PSMB8 causano 4 differenti sindromi:  
 1)CANDLE Syndrome  
 2)Nakayo-Nishimura Syndrome (NNS)  
 3)JMP Syndrome  
 4)JASL Syndrome

Si tratta di quadri clinici parzialmente sovrapposti denominati genericamente sindromi autoinfiammatorie proteosoma-associate, caratterizzati da febbre periodica, manifestazioni cutanee, lipodistrofia progressiva, atrofia muscolare/miosite, epatosplenomegalia e patologie autoimmuni.  
 Bibliografia  
 -Kitamura et al., JCI (2011)  
 -McDermott et al., International Journal of Dermatology (2015)  
 -Marzano et al., Medicina (2014)



**P081**  
**BPES da delezione/mutazione del gene FOXL2**

E. Mannino, C. Berera, M. Castori, S.C. Gorgone, V. Nicotra, M.R. Piemontese, G. Trimarchi, M. Fichera, T. Mattina  
<sup>1</sup>Genetica Medica Università di Catania- Centro di Riferimento Regionale HUB per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico-V.E. di Catania  
<sup>2</sup>U.O.C. Genetica Medica I.R.C.C.S - Casa Sollievo della Sofferenza San Giovanni Rotondo - Foggia

La sindrome blefarofimosi-ptosi-epicantero inverso (BPES) è una malattia genetica con prevalenza di 2.0/10000. Esistono due sottotipi di BPES: il tipo 1 si associa a blefarofimosi, ptosi, telecantero, epicantero inverso e infertilità femminile; nel tipo 2, sono presenti solo le anomalie palpebrali. Riportiamo due casi: Caso 1: maschio, 14 anni, diagnosi di ingresso: deficit cognitivo lieve. Nato a termine dopo gravidanza decorsa con minacce d'aborto. Alla visita genetica (14 anni) i parametri auxologici sono al 50 pc, il paziente presenta lieve disabilità, note dismorfiche lievi con ptosi palpebrale sn, e accenno a blefarofimosi. All'analisi array-CGH si è evidenziata una delezione di 0,3 Mb nella regione cromosomica 7q31.1, pat. coinvolgente il gene IMP2L. In letteratura delezioni intrageniche di IMP2L sono state riportate come fattore di suscettibilità per la sindrome di Tourette. Dato l'aspetto dismorfologico evocativo della sindrome BPES, abbiamo richiesto l'analisi molecolare del gene FOXL2 per (BPES), che ha evidenziato, la delezione completa de novo del gene FOXL2 in eterozigosi (alterazione non riconosciuta agli array). Caso 2: femmina, 10 anni, nata a termine da parto eutocico. Alla visita genetica parametri auxologici al 10 pc, dismorfismi facciali con blefarofimosi, epicantero inverso. A 14 anni riscontro ecografico di ovaie con aspetto multi follicolare. Lieve incremento del 17-OH progesterone e dell'androstenedione al test di stimolo con ACTH. L'analisi molecolare del gene FOXL2: mutazione non senso c.246-248dupGTA(p.Y83X) in eterozigosi de novo. FOXL2 è l'unico gene ad oggi noto associato alla patologia. Il 72% delle mutazioni riguardano la sequenza del gene, il 10-15% sono delezioni/duplicazioni del gene; nel 5% dei casi vi è delezione/duplicazione di regioni extrageniche a FOXL2 (GeneReviews, Hannah Verdin, 2015). L'alto tasso di mutazioni/delezioni de novo del gene, suggerisce una ipermutabilità di FOXL2, ed è stata ipotizzata la possibilità di mutazioni somatiche (Anna Krepelova MD CSc, 2016) Alcuni pazienti con delezioni genomiche 3q23 che includono il gene FOXL2, si caratterizzano per un quadro più complesso: ritardo mentale e di crescita, microcefalia e dismorfismi auricolari e nasali.







**P082**  
**Clinical and functional characterization of two novel ZBTB20 mutations causing Primrose syndrome**

E. Stellacci<sup>1</sup>, K. Steindi<sup>2</sup>, L. Mercurio<sup>1</sup>, M. Anselmi<sup>3</sup>, S. Cecchetti<sup>4</sup>, P. Joset<sup>2</sup>, L. Gogoll<sup>2</sup>, M. Zweier<sup>2</sup>, A. Hackenberg<sup>5</sup>, L. Stella<sup>3</sup>, M. Tartaglia<sup>6</sup>, A. Rauch<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanit, Roma, Italy

<sup>2</sup>Institute of Medical Genetics, University of Zurich, Schlieren-Zurich, Switzerland

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Universita' di Roma Tor Vergata Rome, Italy

<sup>4</sup>Servizio grandi strumentazioni e core facilities, Istituto Superiore di Sanit, Rome, Italy

<sup>5</sup>Division of Child Neurology, University Children's Hospital Zurich, Zurich, Switzerland

<sup>6</sup>Genetics and Rare Diseases Research Division, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Rome, Italy

Primrose syndrome (PS) is a rare disorder characterized by macrocephaly, tall stature, intellectual disability, autistic traits, and disturbances of glucose metabolism with insulin-resistant diabetes and distal muscle wasting occurring in adulthood. The disorder is caused by functional dysregulation of ZBTB20, a transcriptional repressor controlling energetic metabolism and developmental programs. ZBTB20 maps in a region that is deleted in the 3q13.31 microdeletion syndrome, which explains the partial clinical overlap with PS. A narrow spectrum of amino acid substitutions in a region of ZBTB20 encompassing the first and second zinc-finger motifs have been reported thus far. Here, we report on the clinical and functional characterization of the first truncating mutation (c.1024delC; p.Gln342Serfs\*42) and missense change affecting the third zinc-finger motif of the protein (c.1931C>T; p.Thr644Ile). Our data document that both mutations have dominant negative impact on wild-type ZBTB20, providing further evidence of the specific behavior of PS-causing mutations on ZBTB20 function.

**P083**  
**Functional dysregulation of CDC42 causes diverse developmental phenotypes**

S. Martinelli<sup>1</sup>, O. Krumbach<sup>2</sup>, F. Pantaleoni<sup>3</sup>, S. Coppola<sup>4</sup>, L. Pannone<sup>5</sup>, L. Farina<sup>4</sup>, F. Lepri<sup>3</sup>, A. Paciorkowski<sup>6</sup>, L. Walsh<sup>6</sup>, M.E. Pierpont<sup>7</sup>, S. Schrier Vergano<sup>8</sup>, K. Langely<sup>9</sup>, D. Larsen<sup>10</sup>, K. Farwell<sup>11</sup>, I. Gallotta<sup>12</sup>, E. Di Schiavi<sup>12</sup>, M. Della Monica<sup>13</sup>, L. Lugli<sup>14</sup>, C. Rossi<sup>15</sup>, M. Seri<sup>16</sup>, M. Alders<sup>17</sup>, D. Nickerson<sup>18</sup>, M. Cho<sup>9</sup>, S. Demuth<sup>19</sup>, M.C. Diglio<sup>3</sup>, M. Bamshad<sup>18</sup>, M. Zenker<sup>20</sup>, M.R. Ahmadian<sup>2</sup>, R. Hennekam<sup>21</sup>, G. Mirzaa<sup>22</sup>, M. Tartaglia<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dep. of Oncology and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanit, Rome, Italy

<sup>2</sup>Inst. of Biochemistry and Molecular Biology II, Heinrich-Heine Univ., D Sseldorf, Germany

<sup>3</sup>Genetics and Rare Diseases Research Div., Osp. Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Rome, Italy

<sup>4</sup>Centro Nazionale Malattie Rare, Istituto Superiore di Sanit, Rome, Italy

<sup>5</sup>Univ. of Rochester Medical Center, Rochester, New York, USA

<sup>6</sup>Riley Hosp. for Children, Indianapolis, Indiana, USA

<sup>7</sup>Dep. of Pediatrics, Univ. of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA

<sup>8</sup>Div. of Medical Genetics and Metabolism, Children's Hosp. of The King's Daughters, Norfolk, Virginia, USA

<sup>9</sup>GeneDX, Gaithersburg, Maryland, USA

<sup>10</sup>Dep. of Neurology, Washington Univ., St. Louis, Missouri, USA

<sup>11</sup>Dep. of Clinical Genomics, Ambray Genetics, Aliso Viejo, California, USA

<sup>12</sup>Inst. of Biosciences and BioResources, National Research Council, Naples, Italy

<sup>13</sup>Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer, Florence, Italy

<sup>14</sup>Struttura Complessa di Neonatologia, Policlinico di Modena, Modena, Italy

<sup>15</sup>Genetica Medica, Policlinico S.Orsola-Malpighi, Bologna, Italy

<sup>16</sup>Dep. of Medical and Surgical Sciences, Univ. of Bologna, Bologna, Italy

<sup>17</sup>Dep. of Clinical Genetics, Academic Medical Centre, Univ. of Amsterdam, Amsterdam, the Netherlands

<sup>18</sup>Dep. of Genome Sciences, Univ. of Washington, Seattle, Washington, USA

<sup>19</sup>Praxis für Humangenetik Erfurt, Erfurt, Germany

<sup>20</sup>Inst. of Human Genetics, Univ. Hospital Magdeburg, Magdeburg, Germany

<sup>21</sup>Dep. of Pediatrics, Academic Medical Center, Univ. of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands

<sup>22</sup>Center for Integrative Brain Research, Seattle Children's Research Inst., Seattle, Washington, USA

Exome sequencing has markedly enhanced the discovery of disease genes implicated in Mendelian disorders, particularly for individuals in whom a known clinical entity could not be assigned. This has led to the recognition that phenotypic heterogeneity resulting from allelic mutations occurs more commonly than previously appreciated. Using exome sequencing or targeted resequencing approaches in subjects with unexplained, multi-systemic features, we identified 14 individuals with missense mutations in CDC42, a gene encoding a small GTPase functioning as an intracellular signaling node. CDC42 mutations were shown to underlie a clinically heterogeneous group of phenotypes characterized by variable growth dysregulation, facial dysmorphism, and neurodevelopmental, immunological and hematological anomalies, including a phenotype resembling Noonan syndrome. Biochemical and cellular studies, and phenotypic characterization of C. elegans

transgenic lines expressing a subset of CDC42 mutants, demonstrated that mutations variably perturb CDC42 function and differentially affect cellular and developmental processes. These findings highlight the extraordinarily variable impact that dominantly acting CDC42 mutations can have on cell function and development, creating challenges in syndrome definition, and exemplify the importance of functional profiling for syndrome recognition and delineation.

**P084**  
**Biliary atresia in a patient with RAD21 mutation: coincidental association or new finding?**

A. Cereda<sup>1</sup>, D. Marchetti<sup>2</sup>, L. Pezzani<sup>2</sup>, L. Pezzoli<sup>2</sup>, A.R. Lincesso<sup>2</sup>, L. Perego<sup>2</sup>, L. D'Antiga<sup>1</sup>, M. Iascone<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pediatrics Department, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

<sup>2</sup>Laboratory of Medical Genetics, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

We report on a girl born to healthy and non-consanguineous Egyptian parents after pregnancy complicated by gestational diabetes, CMV infection, and IUGR. In the newborn period, because of jaundice and acholic stools, she was diagnosed with biliary atresia and treated with a Kasai procedure. During the follow up slight liver function s abnormalities and hepatosplenomegaly persisted; esophageal varices were noticed since she was 4 years old. At the clinical evaluation at 7 years old, her weight and height were below the 3 p.le. She had long face, thick hair, deep set eyes, anteverted ears and long philtrum. Her cognitive development was borderline with learning disability.

Trio-based whole exome sequencing (WES) analysis identified a rare (MAF 0) de novo heterozygous frameshift variant in RAD21 gene.

RAD21 is the most recent gene claimed to be associated with Cornelia de Lange syndrome (CdLS) although several reports have recently showed that patients with heterozygous mutations in RAD21 have just a partial phenotypic overlap with CdLS. Among the few patients with RAD21 mutation reported to date, the main clinical features are growth retardation, minor skeletal anomalies and mild cognitive impairment; RAD21-related condition is considered a mild form of coesinopathy. Biliar atresy has never been reported in patients with RAD21 mutation or other coesinopathies and hepatic involvement is not a typical feature of CdLS patients.

A new evaluation of our patient after WES result didn't notice any additional features related to CdLS, consequently our patient doesn't fulfill the diagnostic criteria for CdLS diagnosis, although growth retardation and mild cognitive impairment are comparable to the phenotype described in other patients with RAD21 mutation. The variant identified by WES analysis was classified as likely pathogenetic.

This is the first report of biliar atresy in a patient with a RAD21 coesinopathy; whether the occurrence of it is coincidental or related to the genetic condition remains unknown. This report highlights the utility of WES unbiased approach in the diagnosis of many genetic conditions with genetic heterogeneity and phenotypic variability in patients with atypical presentations or mild clinical expression of the disease.





**P085**  
**Too big or too small? Utility of molecular test for diagnosis and follow up: a case report**

A. Cereda<sup>1</sup>, S. Tabano<sup>2</sup>, L. Pezzani<sup>3</sup>, M. Marzaroli<sup>4</sup>, L. Fontana<sup>2</sup>, M. Miozzo<sup>2</sup>, M. Iacone<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pediatrics Department, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo  
<sup>2</sup>Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano; Lab. Patologia Molecolare, IRCCS - Fondazione Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano  
<sup>3</sup>Laboratory of Medical Genetics, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo  
<sup>4</sup>Child Neurology and Psychiatry Unit, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

We report on a 7-month-old boy referred to our Clinic because of lower limb asymmetry. He is the first child of healthy non-consanguineous parents from Peru. The family history is negative. The pregnancy was spontaneous and uneventful with normal intrauterine growth. He was born at 41 weeks by vaginal delivery. At birth growth parameters were normal: weight 3-10 p.le, length 10-25 p.le and head circumference 10 p.le. APGAR score was 9/10. He didn't show any medical problem during neonatal period and in the first months of life. At 6 months parents noticed a length difference between lower limbs. At 7 months of age, he was healthy with normal growth for weight, length and head circumference and his psychomotor development was in physiological range. He didn't show any facial dysmorphism nor hands and feet anomalies. A difference in volume (1.5 cm) and length (1 cm) of limbs was evident with left lower limb apparently bigger than the right one.

Because of the suspicion of Isolated Hemihyperplasia, abdominal ultrasound and serum alpha-feto protein dosage was performed with normal results; periodic follow-up according to international protocol of surveillance for risk cancer in Hemihyperplasia/Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) was started.

The methylation analysis of 11p15 chromosomal region by pyrosequencing detects a hypomethylation of IC1 locus (32%, normal range 40-52%) and a normal methylation of IC2 locus (47%, normal range 39-50%), the opposite genetic alteration that we expected in Hemihyperplasia.

The hypomethylation of IC1 locus at 11p15 is identified in 30-50% of patient with Russell-Silver syndrome (RSS). Our patient doesn't fulfill the diagnostic criteria for the diagnosis of RSS, because he only shows lower limb asymmetry. As Isolated Hemihyperplasia is considered one extreme of the spectrum of BWS, so the less frequent Isolated Hemihyperplasia represents a very mild phenotype within the spectrum of RSS. In light of the result of genetic test, in our patient the diagnosis was switched from Isolated Hemihyperplasia to Isolated Hemihypoplasia leading to the suspension of surveillance for cancer risk.

This report highlights the role of genetic test in the correct diagnosis of such ambiguous condition that could have an important effect on patient's follow up.

**P086**  
**Primo caso di microdelezione 20q11.21q12 in mosaico: conferma e ulteriore definizione della sindrome da microdelezione 20q11.2**

S. Loddo<sup>1</sup>, V. Alesi<sup>1</sup>, V. Orlando<sup>1</sup>, C. Calacci<sup>1</sup>, S. Genovese<sup>1</sup>, F. Restaldi<sup>1</sup>, D. Pompili<sup>1</sup>, M.C. Digilio<sup>1</sup>, B. Dallapiccola<sup>1</sup>, A. Novelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetics and Rare Diseases Research Division, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy

Le delezioni interstiziali del braccio lungo del cromosoma 20 sono molto rare. Al momento sono noti solo 11 pazienti con del(20q11.2), che si associano a quadri clinici variabili in rapporto alle dimensioni della regione deleta, caratterizzati da ritardo psicomotorio e della crescita, dismorfismi e brachi-clinodattilia. Riportiamo il primo caso di del(20q11.2q12) in mosaico. La paziente di 5 anni era affetta da lieve ritardo psicomotorio, difficoltà nell'alimentazione, ritardo dello sviluppo prenatale e della crescita postnatale, dismorfismi craniofacciali, brachimesofalangia e clinodattilia del V dito delle mani. Nel primo anno di vita ha sviluppato otiti ricorrenti esitate nella perforazione del timpano. L'analisi mediante SNP-array ha evidenziato una delezione in mosaico nel 20% delle cellule, estesa per 7.6 Mb. La regione deleta comprendente 72 geni OMIM. La minima regione di sovrapposizione (1.6 Mb) nei pazienti con del(20q11.2) è inclusa nella delezione presente nella probanda. Oltre ai tre geni OMIM (GDF5, EPB41L1 e SAMHD1) in precedente candidati al fenotipo ricorrente nei pazienti, proponiamo il ruolo patogenetico di altri geni fiancheggiati la regione critica, in particolare GHRH (Growth Hormone-Releasing Factor), implicato nella produzione dell'ormone della crescita, che potrebbe essere coinvolto nel ritardo della crescita e forse nei problemi uditivi riscontrati in alcuni di questi pazienti. Questo caso conferma l'utilità dell'uso delle piattaforme di CMA (Chromosomal Microarray Analysis) per il riconoscimento dei mosaicismi diluiti e supporta l'esistenza di una sindrome da microdelezione 20q11.2.

**P087**  
**Fenotipo plus nella sindrome di CHARGE: descrizione di un caso con agenesia di utero e ovaie**

F. FORTUNATO<sup>1</sup>, C. AIMONI<sup>2</sup>, C. ROSSI<sup>3</sup>, S. FINI<sup>4</sup>, M. BONAGURO<sup>5</sup>, A. CIORBA<sup>2</sup>, A. FERLINI<sup>1,4</sup>, M. SERI<sup>3,5</sup>, S. BIGONI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche, Sezione di Microbiologia e Genetica Medica, Università degli Studi di Ferrara

<sup>2</sup>Clinica ORL Audiologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara

<sup>3</sup>U.O. Genetica Medica, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna

<sup>4</sup>U.O. Genetica Medica, Dipartimento di Riproduzione e Accrescimento, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara

<sup>5</sup>Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche (DIMEC), Università di Bologna, Bologna

La sindrome CHARGE è una malattia genetica, a trasmissione autosomica dominante, caratterizzata dall'associazione di Coloboma, difetti cardiaci, Agenesia delle coane, Ritardo di crescita, ipoplasia dei Genitali, anomalie dei padiglioni auricolari/ipocusia. Riportiamo una paziente, di 56 anni, con ipocusia neurosensoriale bilaterale, deficit cognitivo di grado medio, anomalie scheletriche (dismorfismi del radio e delle ossa carpali), amenorrea primaria con agenesia di utero ed ovaie, dismorfismi facciali. Anamnesi familiare negativa. Alla valutazione oftalmologica, presenza di coloboma della corioide. Alla TC e RM delle rocce petrose è emerso un quadro caratterizzato da strutture vestibolari ipodisplastiche, aplasia bilaterale dei canali semicirculari del labirinto ed ipotrofia del nervo stato-acustico di destra. Cariotipo costituzionale da sangue periferico e analisi array CGH (risoluzione 100-250 Kb) risultati nella norma. Sulla base dei segni clinici e dei dismorfismi facciali presenti nella paziente è emerso il sospetto clinico di sindrome CHARGE. L'analisi molecolare del gene CHD7, mediante sequenziamento, ha consentito di identificare la presenza della mutazione c.841 C>T (p.Gln281X) in eterozigosi nell'esone 2 del gene CHD7, non descritta in letteratura. Le anomalie dei genitali, segno cardinale della sindrome CHARGE, sono riportate nell'88% dei pazienti di sesso maschile e nel 25% di sesso femminile. Ad oggi l'agenesia di utero e di ovaie è stata descritta in letteratura in una sola paziente CHARGE, di 18 anni, con una delezione in eterozigosi nell'esone 15 del gene CHD7. La severità della mutazione identificata sia nella nostra paziente sia nella paziente segnalata in letteratura, entrambe con fenotipo suggestivo di sindrome CHARGE, consente di supportare l'ipotesi che aploinsufficienza del gene CHD7 possa determinare l'agenesia di utero e di ovaie, espandendo pertanto lo spettro fenotipico associato alla sindrome. Riportando questo caso si vuole enfatizzare l'importanza da un lato di considerare tale malformazione come uno dei segni possibili della sindrome nell'ambito dell'iter diagnostico genetico e, dall'altro, di effettuare, nei soggetti in cui invece la diagnosi CHARGE viene posta sulla base degli altri segni, una valutazione endocrinologica e strumentale dei genitali interni.



**P088**  
**Diagnosi mediante array-CGH di Sindrome di Kleeftstra in una paziente adulta: contributo alla definizione dell'evoluzione del quadro clinico**

S. BIGONI<sup>1</sup>, B. BULDRINI<sup>1</sup>, R. GRUPPIONI<sup>1</sup>, S. NERI<sup>1</sup>, V. AIELLO<sup>1</sup>, M. FABRIS<sup>2,1</sup>, C. TRABANELLI<sup>1</sup>, D. OGNIBENE<sup>2</sup>, S. FINI<sup>1</sup>, A. FERLINI<sup>2,1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Genetica Medica, Dipartimento di Riproduzione e Accrescimento, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Mediche, Sezione di Microbiologia e Genetica Medica, Università degli Studi di Ferrara

La Sindrome di Kleeftstra (OMIM 610253) è una malattia genetica caratterizzata principalmente da ritardo nello sviluppo psicomotorio/disabilità intellettiva (di grado variabile ma per lo più medio-severo), ipotonia nella prima infanzia, brachi/micro-cefalia e dismorfismi peculiari. Altre problematiche che possono essere presenti in una parte dei casi sono malformazioni/anomalie di conduzione cardiache, malformazioni urogenitali, epilessia, malformazioni urogenitali, disturbi comportamentali, obesità.

La SK è causata da aploinsufficienza del gene EHMT1 (euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1) dovuta nel 75% dei casi a delezioni subtelomeriche nel braccio lungo del cromosoma 9 e nel 25% dei casi a mutazioni intrageniche.

Il fenotipo Kleeftstra è stato delineato prevalentemente in soggetti di et. infantile, rari i quadri clinici riportati in pazienti adulti e dallo studio di questi ultimi è emerso che la severità del quadro comportamentale e motorio incrementa con il tempo e diventa evidente dopo l'adolescenza. Riportiamo il caso di una paziente di 41 anni giunta presso il nostro Servizio per un inquadramento diagnostico genetico.

Alla visita dismorfologica sono emersi i seguenti segni: brachicefalia con microcefalia relativa, sinofrio, fessure palpebrali rivolte verso il basso, prognatismo. Da un punto di vista neuropsichiatrico, la paziente presentava un deficit cognitivo di grado medio-severo, problematiche relazionali, stereotipie motorie e skin-picking. A partire dall'adolescenza, riferito significativo peggioramento delle competenze acquisite e delle problematiche comportamentali. Non malformazioni a carico degli organi interni.

L'analisi genomica mediante array CGH ha messo in evidenza una microdelezione di circa 330 Kb nella regione 9q34.3, la delezione coincide con la regione critica per il fenotipo SK e comprende l'intero gene EHMT1 ed altri 3 geni OMIM, CACNA1B, WDR85 e ZMYND19.

Il nostro caso contribuisce sia alla definizione del fenotipo adulto della sindrome di Kleeftstra che alla peculiare evoluzione del quadro clinico che in et. adulta risulta caratterizzato da una graduale perdita delle precedenti acquisizioni motorie, del linguaggio e della comunicazione e ad un peggioramento del quadro comportamentale e neuropsichiatrico.







**P089**  
**Sindrome di Joubert: due fratelli in cerca di un gene**

A. Gambale<sup>1</sup>, C. Tortora<sup>1</sup>, C. De Luca<sup>1</sup>, C. Mandato<sup>2</sup>, P. Siani<sup>2</sup>, D. De Brasi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina molecolare e Biotecnologie mediche, Università Federico II, Napoli

<sup>2</sup>Dip. di Pediatria, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli

La sindrome di Joubert è una ciliopatia AR caratterizzata da malformazioni del SNC, pattern respiratorio caratteristico e ritardo psicomotorio. Patognomonicamente è il segno RM del dente molare, dovuto alle malformazioni della fossa cranica posteriore. La presa in carico è sintomatica e multidisciplinare. Descriviamo due fratelli affetti da sindrome di Joubert, caratterizzati da un quadro clinico complesso e assenza di mutazioni nei geni ad oggi associati alla sindrome. Nel fratello maggiore è stato riscontrato alla nascita un encefalocele e successivamente questi ha presentato crisi di apnea e tachipnea. La RM encefalo ha mostrato anomalie del SNC con segno del dente molare, suggerendo la diagnosi e ponendo indicazione al test genetico. L'analisi dei geni attualmente associati, eseguita attraverso tecnologia NGS non ha mostrato mutazioni causative. Nel corso del follow-up clinico sono stati riscontrati: grave ritardo psicomotorio, scoliosi rilevante e ipertransaminasemia con iniziale fibrosi epatica. La crescita è stentata e la condizione neurologica grave ma stabile. Il fratello minore ha presentato idrocefalia severa alla nascita con necessità di derivazione ventricolo-peritoneale, ipoplasia cerebrale massiva e meningocele evidente già alla 15<sup>a</sup> settimana di gestazione, consentendo la diagnosi clinica già in epoca prenatale. Nel tempo il piccolo ha sviluppato gravissimo ritardo psicomotorio, pattern respiratorio caratteristico (con necessità di O2-terapia), frequenti infezioni respiratorie e ha necessitato di gastrostomia per l'alimentazione. I due fratelli descritti presentano un caratteristico fenotipo plurimalformativo con anomalo pattern respiratorio e notevole ritardo psicomotorio, compatibile con la diagnosi clinica della sindrome. Tra gli elementi caratteristici, il segno del dente molare riscontrato nel fratello maggiore, non è osservabile nel minore a causa dell'idrocefalia severa e del più complesso coinvolgimento della fossa cranica posteriore. L'assenza di varianti patogenetiche nei geni testati usualmente associati alla sindrome, non esclude la diagnosi clinica, essendo il detection rate variabile dal 62 al 94%, facendo ipotizzare la presenza di un'ulteriore gen malattia per cui è in programma l'esecuzione dell'esoma.

**P090**  
**Sindrome di Alagille: anomalie vascolari cerebrali in una bambina con nuova mutazione del gene JAG1**

C. Tortora<sup>1</sup>, A. Gambale<sup>1</sup>, M. Falco<sup>1</sup>, C. Mandato<sup>2</sup>, P. Siani<sup>2</sup>, D. De Brasi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina molecolare e Biotecnologie mediche, Università Federico II, Napoli

<sup>2</sup>Dip. di Pediatria, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli

La sindrome di Alagille è una patologia a trasmissione autosomica-dominante, dovuta a mutazioni con perdita di funzione del gene JAG1. Classicamente presenta disturbi a carico di fegato, cuore, occhio, viso e scheletro. Altro apparato che può essere interessato in tale sindrome è il sistema circolatorio, con segnalazione in letteratura di casi con malformazioni cerebrali, diagnosticati solo dopo eventi infausti. Si descrive il caso di una paziente di 3 anni, giunta in consulenza per facies peculiare con aspetto macrocranico, alterazione degli enzimi epatici, ritardo di crescita ponderale, stenosi periferica dei rami della polmonare, minimo cleft vertebrale in D12, embriotoxon OS e doppio distretto renale a sx. Sulla base del quadro clinico e dei dismorfismi facciali è stata ipotizzata la diagnosi di sindrome di Alagille e richiesto test molecolare del gene JAG1 con riscontro di mutazione de novo nonsense Ala583fs in eterozigosi, non descritta in letteratura. La piccola ha quindi iniziato un follow-up specifico nel corso del quale ha praticato una valutazione vascolare del SNC, con evidenza di anomalie multiple e complesse sia di tipo venoso che arterioso, in particolare agenesia della carotide interna e dell'arteria cerebrale anteriore nel tratto precomunicante di destra e ipoplasia del seno trasverso di destra. Nel caso descritto è stata riscontrata una nuova mutazione nonsense del gene JAG1. La presenza di altre mutazioni nonsense, già definite come causative in regioni poste al 3' rispetto alla mutazione osservata, confermano la verosimile patogenicità della mutazione riscontrata nella probanda, che presenta un quadro clinico tipico della malattia. Anomalie vascolari a carico dei grossi vasi e dei distretti epatico, renale e del SNC sono variamente descritte in letteratura. La paziente qui descritta presenta una agenesia della carotide interna e dell'arteria cerebrale anteriore nel tratto precomunicante di destra, malformazioni descritte raramente in altri pazienti della letteratura. Tale quadro radiologico impone un livello di attenzione particolarmente elevato in tale paziente per le possibili sequelle emorragiche.

**P091**  
**Sindrome Floating-Harbor: diagnosi difficile per una sindrome rara**

M. Falco<sup>1</sup>, S. Amabile<sup>1</sup>, C. Tortora<sup>1</sup>, A. Gambale<sup>1</sup>, P. Siani<sup>2</sup>, D. De Brasi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina molecolare e Biotecnologie mediche, Università Federico II, Napoli

<sup>2</sup>Dip. di Pediatria, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli

La sindrome Floating-Harbor (FHS-OMIM#136140) è una rara patologia autosomica dominante, legata a mutazioni del gene SRCAP, quasi sempre nonsense (mutazioni di stop e delezioni). Si caratterizza per facies peculiare con segni meno evidenti in età adulta, bassa statura, ritardo del linguaggio e talora malattia celiaca e deficit di GH. La probanda, attualmente di 4 anni, presenta ritardo severo di crescita staturale-ponderale (ad insorgenza post-natale), con et scheletrica ritardata, ritardo neuromotorio e del linguaggio, dismorfismi facciali con microcefalia, ponte nasale pronunciato e padiglioni auricolari sporgenti, ipoplasia della falange distale del 1° dito della mano. Nel sospetto di cromosomopatia ha praticato cariotipo e array CGH, risultati nella norma. In seguito, nell'ipotesi di una patologia metabolica, ha praticato dosaggio degli acidi organici urinari che ha mostrato alterazioni non specifiche, oltre a indagini biochimiche, incluso test screening per malattia celiaca, e consulti clinici senza inquadramento del caso. Per l'aspetto fisico e per la presenza di peculiarità agli arti e al volto ha eseguito analisi molecolare del gene LMNA (s. Hutchinson-Gilford) e successivamente test di fragilità cromosomica per microcefalia, entrambi risultati negativi. È stata infine presa in considerazione la sindrome Floating-Harbor per cui è stato eseguito il test genetico che ha individuato la mutazione c.7330C>T (p.Arg2444\*) del gene SRCAP in eterozigosi, de novo. La FHS è una patologia estremamente rara, di cui attualmente sono descritti circa 50 casi. La paziente descritta presenta una facies compatibile (ma non immediatamente riconoscibile), grave ritardo staturale-ponderale e ritardo neuro-motorio (linguaggio). La difficoltà nel raggiungere la diagnosi è dovuta alla rarità della patologia oltre al fenotipo non immediatamente riconoscibile nei primi anni di vita. Attualmente la paziente pratica una riabilitazione neuromotoria e del linguaggio ed è in follow-up auxologico con in programma test per la riserva di GH, anche per valutarne gli aspetti terapeutici.

**P092**  
**Gestione clinica del bambino raro affetto da Sindrome di Barth: follow-up e prevenzione delle complicanze**

S. Amabile<sup>1</sup>, M. Falco<sup>1</sup>, A. Guida<sup>2</sup>, P. Siani<sup>2</sup>, D. De Brasi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina molecolare e Biotecnologie mediche, Università Federico II, Napoli

<sup>2</sup>Dip. di Pediatria, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli

La sindrome di Barth (BTHS, OMIM#302060) è un difetto congenito del metabolismo dei fosfolipidi, caratterizzato da cardiomiopatia (dilatativa o ventricolo sinistro non compatto), miopatia, ritardo di crescita e sviluppo, neutropenia. È dovuta a mutazioni del gene TAZ (OMIM #300394) in Xq28, codificante per tafazzina, a trasmissione X-L recessiva. Riportiamo il caso di maschio unicogenito di genitori non consanguinei. Patologie cardiache non meglio specificate nel ramo materno. Ad una prima visita cardiologica si evidenziavano alterazioni ECG suggestive di cardiomiopatia ipertrofica del VS, con lieve deficit del VS di aspetto globoso e dimensioni ai limiti alti, con aspetto del miocardio di tipo non compatto, quadro confermato alla RM cardiaca (presenza di un'accentuata trabecolatura a livello della parete laterale e dell'apice con quadro suggestivo di non-compaction e conservata funzione globale; rapporto miocardio non compatto/compatto: 2,3. Veniva instaurato piano terapeutico con captopril, sospeso successivamente. L'esame neurologico evidenziava ipotonia assiale, ritardata acquisizione neuromotoria. EMG e RM encefalo nella norma. Esami di laboratorio: neutropenia moderata, acidosi lattica, modesta ipertransaminasemia, ipocolesterolemia, rialzo dell'acido 3-metil-glutaconico all'esame degli acidi organici urinari. Quadro compatibile con sospetto clinico di BTHS, confermato mediante identificazione della mutazione c.281C>A (p.Arg94His), mat, del gene TAZ. Il paziente è seguito da circa 5 anni. Al follow-up, valori fluttuanti di neutrofili (600-1100/mm<sup>3</sup>) (mai infezioni severe e/o somministrazione di fattori di crescita specifici), stabilità del quadro cardiaco, sviluppo in lieve ritardo sia per gli aspetti motori che cognitivi, crescita stentata in peso (<5 ct) con statura normale. In valutazione supplementare con polivitaminici, L-carnitina e maizena nella dieta. Ad oggi sono noti circa 150 pazienti maschi affetti da BTHS. La gestione clinica prevede un percorso multidisciplinare di follow-up che si avvale di controlli ematologici mensili, cardiologici semestrali-annuali, oltre che metabolici, fisiatrici ed oculistici, volti alla prevenzione di infezioni, scarsa crescita, aritmie e scompenso cardiaco, responsabili nei casi più gravi di morte improvvisa.





**P093**  
**Identificazione di una nuova mutazione nel gene ACTB: un nuovo caso di Sindrome Baraitser-Winter**

C. Orsini<sup>1</sup>, P. Caforio<sup>1</sup>, S. Amabile<sup>1</sup>, A. Guida<sup>2</sup>, P. Siani<sup>2</sup>, D. De Brasi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina molecolare e Biotecnologie mediche, Università Federico II, Napoli

<sup>2</sup>Dip. di Pediatria, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli

La Sindrome Baraitser-Winter (BWS), rara malattia AD dovuta a mutazioni nei geni per le actine ACTB o ACTG1, è caratterizzata da facies dismorfica (sutura metopica a cresta, sopracciglia arcuate, naso largo, ipertelorismo, ptosi, rime palpebrali lunghe, larghe e oblique verso il basso), microcefalia, deficit cognitivo, anomalie cerebrali (pachigiria), epilessia, coloboma oculare, ritardo di crescita, bassa statura, irrigidimento articolare, anomalie della deambulazione, idronefrosi. La prevalenza è <1:1.000.000. Si descrive un paziente di 3 mesi di vita giunto in consulenza per note dismorfiche. Presentava anomalie facciali e del cranio (microcefalia, occipite piatto, sospetta fusione della sutura lambdoidea, collo tozzo, ponte nasale prominente con radice del naso slargata, orecchie a basso impianto e retrorototate) e pliche palmari accessorie del tenar. Anamnesi non contributiva. L'esame del cariotipo, l'Array CGH e il test genetico per le mutazioni più frequenti nei geni della Sindrome di Noonan (PTPN11, SOS1, RAF1, RIT1) risultavano nella norma. In corso di rivalutazione clinica si riscontrava ipertelorismo, ptosi palpebrale, aspetto tipo displasia fronto-nasale, brachicefalia, appiattimento occipitale ed infossamento del lambdaoide con sutura metopica pronunciata, anomalie ai PEV. La TAC e la RM encefalo mostravano aspetto trigonocefalico, sulcazione grossolana fronto-opercolare, riduzione della sostanza bianca, ampi spazi liquorali, anomalie ai ventricoli cerebrali. Nel sospetto di BWS è stato effettuato test molecolare dei geni ACTB e ACTG1 mediante metodica NGS che ha evidenziato la mutazione de novo c.351G>C (p.Glu117Asp) in eterozigosi nel gene ACTB. Tale variante, finora non riportata in letteratura, è data dannosa dalle predizioni bioinformatiche, confermando la diagnosi. Il caso descritto mostra l'utilità diagnostica delle nuove metodiche NGS nel definire geneticamente quadri clinici sindromici complessi, consentendo una migliore gestione e follow-up dei pazienti e permettendo di valutare con maggiore precisione il rischio di ricorrenza nei loro familiari. Tuttavia, sottolinea anche l'importanza di un corretto inquadramento clinico, ai fini di indirizzare in modo mirato la diagnosi.

**P094**  
**Caso clinico di un paziente con malformazioni congenite multiple ad ereditarietà complessa, non mendeliana**

G. Carignani<sup>1</sup>, F. Peluso<sup>1</sup>, A. Pagliuzzi<sup>1</sup>, S. Bargiacchi<sup>2</sup>, G. Traficante<sup>2</sup>, L. Dosa<sup>2</sup>, M. Pantaleo<sup>2</sup>, A. Provenzano<sup>1</sup>, E. Agostini<sup>3</sup>, M. Della Monica<sup>2</sup>, P. Fiorini<sup>3</sup>, S. Giglio<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>SOC Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche Mario Serio, Università degli Studi di Firenze

<sup>2</sup>SOC Genetica Medica, Azienda Ospedaliero - Universitaria A. Meyer, Firenze

<sup>3</sup>SOC Terapia Intensiva Neonatale, Azienda Ospedaliero-Universitaria "A. Meyer", Firenze

Si descrive una bambina unicogenita di genitori non consanguinei con atresia esofagea (AE), stenosi tracheale e del bronco principale di destra da anelli cartilaginei completi, incontinenza glottica e malformazione cistica settata dell'arto inferiore sinistro: biforcazione femorale, emimelia tibiale, agenesia rotulea. La gravidanza è decorsa con diabete gestazionale. L'RMN fetale eseguita a 33 s.g. ha mostrato banda amniotica e formazione cistica settata in fossa iliaca sinistra, ipertrofia clitoridea e piede torto sinistro. Per IUER e polidramnios è nata con TC a 38<sup>se</sup>. Alla nascita diagnosi di AE, incontinenza glottica e riscontro di biforcazione del femore sinistro. RX della gamba: duplicazione femorale associata ad ectromelia longitudinale con aplasia della tibia, femore corto, perone clavearizzato, raggi metatarso-digitali del piede conservati numericamente, in piede torto secondario. Parametri auxologici: COF 50 centile, peso 3 centile, lunghezza 25-50 centile, mano 25-50 centile, dito medio 50 centile, piede destro 3 centile. L'analisi CGH-SNP array ha mostrato due duplicazioni interstiziali in 17p, ereditate dal padre, che coinvolgono i geni malattia VPS53 e BHLHA9. BHLHA9 è implicato nella regolazione embrionale dello sviluppo degli arti, ed è ritenuto un forte fattore di suscettibilità per lo sviluppo di malformazioni degli arti, sensibile al sovradosaggio. L'associazione di questa duplicazione con split-hand/foot malformation ha suggerito BHLHA9 duplicato come miglior candidato. Il pattern di trasmissione è di tipo non mendeliano classico, con alto grado di non penetranza e variabilità legata al sesso. La variabilità non è da imputare ad imprinting, può essere ereditata da entrambi i genitori. Si ipotizza la presenza di fattori modificatori ed è in corso WES. Possiamo supporre altre varianti patogenetiche associate a questo fenotipo complesso, ma non possiamo escludere un meccanismo simile a quello descritto per TBX6, dove circa il 10% dei pazienti cinesi con scoliosi congenita erano eterozigoti composti per rare null mutations e un comune aplotipo definito da tre SNP in TBX6. Questo sempre più noto meccanismo patogenetico potrebbe contribuire al complesso quadro clinico malformativo presentato dalla paziente.

**P095**  
**Biallelic mutations in DYNC2L1 are a rare cause of Ellis-van Creveld syndrome**

M. Niceta<sup>1</sup>, K. Margiotti<sup>2,3</sup>, M.C. Digilio<sup>1</sup>, V. Guida<sup>3</sup>, A. Bruselles<sup>4</sup>, S. Pizzi<sup>1</sup>, A. Ferraris<sup>3</sup>, L. Memo<sup>5</sup>, N. Laforgia<sup>6</sup>, M.L. Dentici<sup>1</sup>, F. Consoli<sup>3</sup>, I. Torrente<sup>3</sup>, V.L. Ruiz-Perez<sup>7,8,9</sup>, B. Dallapiccola<sup>1</sup>, B. Marino<sup>10</sup>, A. De Luca<sup>3</sup>, M. Tartaglia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetics and Rare Diseases Research Division, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Rome, Italy

<sup>2</sup>Dept. of Experimental Medicine, Policlinico Umberto 1, Univ. Sapienza, Rome, Italy

<sup>3</sup>Molecular Genetics Unit, Osp. Casa Sollievo della Sofferenza, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy

<sup>4</sup>Dept. of Oncology and Molecular Medicine, Ist. Superiore di Sanità, Rome, Italy

<sup>5</sup>Pediatric Unit, Ospedale San Martino, Belluno, Italy

<sup>6</sup>Dept. of Biomedical Science and Human Oncology, Univ. di Bari, Bari, Italy

<sup>7</sup>Inst. de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC-UAM, Madrid, Spain

<sup>8</sup>CIBER de enfermedades Raras (CIBERER), ISCIII, Spain

<sup>9</sup>Inst. de Genética Mòdica y Molecular (INGEMM), Hosp. Univ. La Paz, Madrid, Spain

<sup>10</sup>Dept. of Pediatrics, Univ. Sapienza, Rome, Italy

Ellis van Creveld syndrome (EvC) is a chondral and ectodermal dysplasia caused by biallelic mutations in the EVC, EVC2 and WDR35 genes. A proportion of cases with clinical diagnosis of EvC, however, do not carry mutations in these genes. To identify the genetic cause of EvC in a cohort of mutation-negative patients, exome sequencing was undertaken in a family with three affected members, and mutation scanning of a panel of clinically and functionally relevant genes was performed in 24 additional subjects with features fitting/overlapping EvC. Compound heterozygosity for the c.2T>C (p.Met1?) and c.662C>T (p.Thr221Ile) variants in DYNC2L1, which encodes a component of the intraflagellar transport-related dynein-2 complex previously found mutated in other short-rib thoracic dysplasias, was identified in the three affected members of the first family. Targeted resequencing detected compound heterozygosity for the same missense variant and a truncating change (p.Val141\*) in two siblings with EvC from a second family, while a newborn with a more severe phenotype carried two DYNC2L1 truncating variants. Our findings indicate that DYNC2L1 mutations are associated with a wider clinical spectrum than previously appreciated, including EvC, with the severity of the phenotype likely depending on the extent of defective DYNC2L1 function.



**P096**  
**Primo caso italiano di Female-restricted X-linked Syndromic Mental Retardation-99 (MRXS99F) causato da una nuova mutazione del gene USP9X. Espansione del fenotipo clinico**

E. Benedicenti<sup>1</sup>, M. Ritelli<sup>2</sup>, E. Giacopuzzi<sup>2</sup>, F. Stanzial<sup>1</sup>, F. Inzana<sup>1</sup>, A. Wischmeijer<sup>1</sup>, M. Colombi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Serv. di Consulenza Genetica dell'Azienda Sanitaria dell'Alto Adige, Dip. di Pediatria, Osp. S. Maurizio, Bolzano

<sup>2</sup>Sez. di Biologia e Genetica, Dip. di Medicina Molecolare e Traslationale, Università di Brescia

USP9X è un gene localizzato sul cromosoma X, che codifica per un enzima deubiquitinante molto conservato, altamente espresso durante la vita embrionale e con un ruolo importante nello sviluppo neuronale. Mutazioni loss-of-function (LoF) de novo di USP9X sono state recentemente associate a un fenotipo riconoscibile clinicamente e ristretto al sesso femminile (MRXS99F), che è caratterizzato da ritardo motorio e del linguaggio, disabilità intellettiva, bassa statura, anomalie della pigmentazione cutanea, dismetria degli arti inferiori, dismorfismi facciali e malformazioni congenite multiple (anomalie cerebrali, atresia delle coane, ipomastia asimmetrica, palatoschisi/ugola bifida, difetti cardiaci, scoliosi progressiva, polidattilia postassiale e atresia anale). A oggi sono note solo 17 pazienti con MRXS99F. Si ritiene che mutazioni LoF di USP9X siano letali nei maschi.

Presentiamo il caso di una ragazza di 15 anni con un quadro clinico compatibile con MRXS99F, nella quale, mediante sequenziamento dell'intero esoma, è stata identificata eterozigosi per una mutazione de novo e novel in USP9X (c.2636G>C). L'analisi in silico suggerisce che tale variante sia una mutazione di splicing, che causa LoF dell'allele mutato. Alcuni segni clinici presenti nella paziente non sono descritti in nessuno dei 17 casi gi notati e potrebbero rappresentare ulteriori caratteristiche del fenotipo MRXS99F: capelli fini e secchi, minimal change myopathy associata a marcata ipotrofia muscolare, osteoporosi e insufficienza respiratoria cronica ipercapnica, associata ad apnee ostruttive del sonno e a un grave quadro di deficit restrittivo. Inoltre a 7 anni la paziente ha sviluppato un osteoblastoma dell'astragalo dx. È noto che USP9X agisce sia come oncogene che come oncosoppressore e la sua regolazione risulta frequentemente alterata nei tumori umani. Due delle 17 pazienti note hanno sviluppato una patologia neoplastica in giovane età. Il nostro caso quindi conferma il rischio di sviluppo di tumori in questa condizione. Presentiamo infine la prima serie di foto di una stessa paziente con MRXS99F, che permette di documentare l'evoluzione nel tempo del fenotipo fisico dal 5 giorno di vita ai 13 anni.





**P097**  
**Clinical and molecular characterization of an emerging chromosome 22q13.31 microdeletion syndrome**

P. Palumbo<sup>1</sup>, M. Accadia<sup>2</sup>, M.P. Leone<sup>1,3</sup>, T. Palladino<sup>1</sup>, R. Stallone<sup>1</sup>, M. Carella<sup>1</sup>, O. Palumbo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

<sup>2</sup>Servizio di Genetica Medica, Ospedale Cardinale G. Panico, Tricase (LE)

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze del suolo, della pianta e degli alimenti, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari

Microdeletion of chromosome 22q13.31 is a very rare condition, and the associated clinical phenotype has not been characterized yet. We describe a patient showing neurodevelopmental disorders, dysmorphic features and multiple congenital anomalies in which SNP array analysis revealed an interstitial 3.15 Mb de novo microdeletion in the 22q13.31 region encompassing twenty-one RefSeq genes and seven non-coding microRNAs. To the best of our knowledge, this is the first patient carrying a 22q13.31 microdeletion with a detailed clinical description reported in medical literature so far. To perform an accurate phenotype characterization, we compared the clinical features observed in our patient with those of 14 clinically well-defined cases available in public databases with similar rearrangements. This comparison allowed us to identify a distinct although variable spectrum of clinical manifestations suggesting that patients with a de novo interstitial microdeletion involving 22q13.31 may have an emerging syndrome characterized by developmental delay/intellectual disability, speech delay/language disorders, behavioral problems, hypotonia, urogenital and hands/feet anomalies. From a molecular point of view, the microdeletion identified in our patient is the smallest reported so far and, for this reason, useful to perform for the first time a detailed genotype-phenotype correlation. In particular, we propose the CELSR1, ATXN10, FBLN1 and UPK3A as candidate genes in the onset of the main clinical features of this syndrome. Thus, the patient reported here broadens our knowledge of the phenotypic consequences of 22q13.31 microdeletions facilitating genotype-phenotype correlations. Additional cases are needed to corroborate our hypothesis and confirm genotype-phenotype correlations of this emerging genomic disorder.

**P098**  
**Analisi di geni implicati nel pathway PI3K-AKT-mTOR in una coorte di pazienti affetti da sindromi caratterizzate da iperaccrescimento segmentale**

C. Ranieri<sup>1</sup>, D.C. Loconte<sup>1</sup>, S. Di Tommaso<sup>1</sup>, R. Bagnulo<sup>1</sup>, A. De Luisi<sup>1</sup>, F. Mercadante<sup>1</sup>, F. Cortellesa<sup>1</sup>, V. Leotta<sup>1</sup>, F.C. Susca<sup>1</sup>, V.P. Logrillo<sup>1</sup>, N. Bukvic<sup>1</sup>, N. Resta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Divisione di Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana (DIMO) Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

Le sindromi caratterizzate da iperaccrescimento segmentale includono una serie di disordini la cui sintomatologia è variabile: nel complesso comportano una crescita sproporzionata e progressiva che può riguardare la parte terminale degli arti e/o determinare anomalie quali megalencefalia e malformazioni vascolari.

Tra queste si distinguono le PROS (PIK3CA-Related Overgrowth Spectrum) causate da mutazioni post-zigotiche nel gene PIK3CA e forme legate a varianti in altri geni del pathway PIK3CA-AKT-mTOR. Il DNA estratto da biopsie/culture di fibroblasti/saliva/sangue periferico di una coorte di 61 pazienti affetti da sindromi caratterizzate da iperaccrescimento segmentale è stata sottoposta ad indagine molecolare mediante NGS su piattaforma Ion Torrent utilizzando un Panel Custom di 21 geni implicati nel pathway summenzionato. Di questi, 31 casi sono stati inquadrati come PROS in quanto presentavano una variante patogenetica o probabilmente patogenetica in mosaico nel gene PIK3CA: tra questi 9 pazienti con MCAP (Megalencephaly-Capillary Malformation Polymicrogyria), un caso CLOVES (Congenital Lipomatous Overgrowth, Vascular Malformations, Epidermal Nevi, Scoliosis/Skeletal and Spinal), un caso di HHML (Hemihyperplasia Multiple Lipomatosis), 2 pazienti con malformazioni capillari/venose isolate, 17 pazienti con macrodattilia e/o emipertrofia e un paziente con lipomatosi. Sono state identificate varianti in altri geni del pathway in 10 pazienti: un paziente con MPPH (megalencephaly-polymicrogyria-polydactylyhydrocephalus) in cui è stata identificata una variante patogenetica germinale in PIK3R2, due pazienti con Sindrome di Proteus che presentavano la variante patogenetica in mosaico nel gene AKT1 E17K e 7 pazienti con fenotipo clinico poco suggestivo di PROS in cui sono state identificate varianti di significato incerto (VUS) germinali in altri geni del pathway. Mentre le 32 varianti patogenetiche o di probabile significato patogenetico in PIK3CA e PIK3R2, sono descritte in letteratura e presenti con frequenze diverse nei diversi tessuti, le 7 VUS germinali identificate risultano ad oggi non descritte e pertanto sono oggetto di studi funzionali al fine di valutarne il ruolo patogenetico.



**P099**  
**Refinement of the critical 7p22.1 deletion region: haploinsufficiency of ACTB is the cause of the 7p22.1 microdeletion-related developmental disorders**

O. Palumbo<sup>1</sup>, P. Palumbo<sup>1</sup>, M. Accadia<sup>1,2</sup>, M.P. Leone<sup>1,3</sup>, T. Palladino<sup>1</sup>, R. Stallone<sup>1</sup>, C. Bonaglia<sup>4</sup>, M. Carella<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

<sup>2</sup>Servizio di Genetica Medica, Ospedale Cardinale G. Panico, Tricase (LE)

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze del suolo, della pianta e degli alimenti, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari

<sup>4</sup>Laboratorio di Citogenetica, IRCCS Eugenio Medea, Bosisio Parini (LC)

Non-recurrent microdeletions (~2 Mb in size) in 7p22.1 is a rarely described cytogenetic aberration, only recently reported in patients with developmental delay/intellectual disability, short stature and microcephaly. The size of the deletions ranged from 0.37 to 1.5 Mb, and reported genotype-phenotype correlations identified a minimum deleted region of 0.37 Mb involving the FBLX18, ACTB, FSCN1, RNF216 and ZNF815P genes. The authors suggested that deletion of ACTB, which encodes  $\beta$ -actin, an essential component of the cytoskeleton, could be responsible for the clinical features observed in the patients with a 7p22.1 microdeletion. Here, we describe a 23-month-old child displaying developmental delay, short stature, microcephaly and distinctive facial features including frontal bossing, high anterior hairline, lateral sparse eyebrows, long eyelashes, mild hypertelorism, long philtrum, thin lips, pointed chin. In addition, she shows bilateral clinodactyly of the fifth finger. Chromosomal microarray analysis performed using high-resolution SNP-array platform revealed a de novo interstitial 60 Kb microdeletion in the 7p22.1 region, encompassing only two genes: FBXL18 and ACTB. To the best of our knowledge, this is the smallest deletion at 7p22.1 to date reported in medical literature. Combining our data with phenotypic and genotypic data of cases from literature, we were able to narrow the minimal region of overlap, which contained only two genes, i.e., FBXL18 and ACTB. Our finding is useful to perform a more accurate genotype-phenotype correlation and strongly strengthen the hypothesis that haploinsufficiency of ACTB is the main cause of the clinical phenotype observed in the patients with 7p22.1 microdeletions.

**P100**  
**Una bambina con sindrome di Myhre con corectopia e tetralogia di Fallot**

M. Pinelli<sup>2,1</sup>, M. Alagia<sup>2</sup>, G. Cappuccio<sup>2,1</sup>, A. Torella<sup>1,3</sup>, R. Brunetti-Pierri<sup>4</sup>, F. Simonelli<sup>4</sup>, G. Limongelli<sup>5,6</sup>, G. Oppido<sup>6</sup>, V. Nigro<sup>1,3</sup>, N. Brunetti-Pierri<sup>2,1</sup>

<sup>1</sup>Dip di Scienze Mediche Traslocazionali, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia

<sup>2</sup>Telethon Institute of Genetics and Medicine, Pozzuoli, Napoli, Italia

<sup>3</sup>Dip di Biochimica Biofisica e Patologia Generale, Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia

<sup>4</sup>Dip Multidisciplinare Di Specialità Medico-Chirurgiche E Odontoiatriche, Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia

<sup>5</sup>Dip di Scienze Cardio-Toraciche e Respiratorie, Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia

<sup>6</sup>Ospedale Monaldi, AO Colli, Napoli, Italia

La sindrome di Myhre è una rara condizione autosomica dominante che è stata descritta in circa 60 individui di cui la maggior parte ha ricevuto la diagnosi in età adolescenziale. Le caratteristiche cliniche di questa condizione comprendono bassa statura, brachidattilia, dismorfismi facciali, sordità, disabilità intellettiva, aspetto generale tozzo, anomalie cardiache e scheletriche. Alcune caratteristiche di questa condizione sono peculiari, come la riduzione della mobilità articolare e le anomalie della cicatrizzazione. Solitamente le manifestazioni cliniche compaiono durante l'infanzia e diventano maggiormente evidenti con l'avanzare dell'età, rendendo quindi difficile la diagnosi nei primi anni di vita. Dal punto di vista cardiologico sono state descritte cardiomiopatia restrittiva e pericardite potenzialmente fatali e malformazioni cardiache. La sindrome di Myhre è causata da mutazioni ricorrenti che colpiscono il residuo Ile500 del gene SMAD4 che codifica per una proteina tumor suppressor che agisce sul signaling del Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Presentiamo il caso di una bambina di 2 anni con esotropia, corectopia, fessure palpebrali corte, ipertelorismo, brachidattilia ed una forma classica di Tetralogia di Fallot (TOF) diagnosticata in epoca prenatale, confermata all'eco-cardiografia post-natale e sottoposta a correzione chirurgica. La bambina è stata arruolata nel Telethon Undiagnosed Disease Program ed ha effettuato il sequenziamento dell'esoma che ha evidenziato la mutazione ricorrente della sindrome di Myhre p.Ile500Val nel gene SMAD4. Il caso presentato estende il fenotipo della sindrome di Myhre alla corectopia e alla tetralogia di Fallot, che finora non sono state riportate nei pazienti affetti da questa condizione.







**P101**  
**Una nuova mutazione nel gene SPRED1 in un paziente di due anni con macchie caffelatte**

P. Fontana<sup>1</sup>, M. Falco<sup>1</sup>, G. Scarano<sup>1</sup>, A. De Luca<sup>2</sup>, F. Lonardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.S.D. di Genetica Medica, A.O.R.N. G. Rummo, Benevento  
<sup>2</sup>Laboratorio Specializzato di Genetica Medica, Istituto CSS-Mendel, Roma

La s. di Legius (OMIM # 611431) è una rara condizione autosomica dominante, caratterizzata da un pattern di discromie cutanee (macchie caffelatte e lentiginosi in regione ascellare e/o inguinale) del tutto sovrapponibile con quanto si osserva abitualmente nei pazienti con Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1). La prevalenza non è nota ed i casi descritti in letteratura sono meno di 200. L'unico gene associato a questa condizione, SPRED1, è localizzato in 15q14 e codifica per una proteina che regola la proliferazione cellulare modulando negativamente il signaling Ras/MAPK, lo stesso pathway molecolare in cui è coinvolta la Neurofibromina 1. Alcuni recenti lavori hanno inoltre dimostrato un'interazione diretta tra le due proteine. Descriviamo un paziente di due anni giunto alla nostra attenzione per macchie caffelatte. Dall'anamnesi familiare non emergono parenti con discromie cutanee. Nella storia personale non si rilevano problematiche cliniche rilevanti, fuorché sporadici episodi di laringospasmo. I parametri auxologici sono nella norma e lo sviluppo psicomotorio è adeguato per l'età. All'esame clinico il bambino presenta: elice ripiegato, radice nasale depressa, un accenno ad epicanto, ed una decina di macchie caffelatte, presenti sia a livello del tronco che degli arti. È stato dunque richiesto il sequenziamento dei geni NF1 e SPRED1, che ha evidenziato la mutazione c.1166\_1172del nel gene SPRED1. La variante è in eterozigosi ed è in corso la ricerca nei genitori per verificare se si tratti di una variante ereditata o de novo. La diagnosi differenziale tra Legius e NF1 è di particolare rilevanza per la prognosi, dal momento che la prima condizione differisce dalla seconda per l'assenza delle manifestazioni neoplastiche tipiche della NF1, come i neurofibromi, i tumori del sistema nervoso centrale, i noduli di Lisch. Anche la prognosi intellettiva sembra essere migliore, poiché la prevalenza della disabilità intellettiva sembra essere significativamente più bassa nei pazienti con s. di Legius, sebbene siano stati descritti pazienti con ritardo del linguaggio, iperattività e deficit dell'attenzione. Una diagnosi precoce può dunque migliorare la gestione del paziente e la pianificazione del programma di follow-up.

**P102**  
**Paziente con un fenotipo estermamente grave da mutazioni non-senso nel gene WDR81**

G. Vitiello<sup>1</sup>, G. Cappuccio<sup>1,2</sup>, M. Pinelli<sup>1,2</sup>, A. Torella<sup>2,3</sup>, A. D'Amico<sup>4</sup>, M. Alagia<sup>1,2</sup>, E. Del Giudice<sup>1</sup>, V. Nigro<sup>2,3</sup>, N. Brunetti-Pierri<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina Traslazionale, Sezione di Pediatria, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli  
<sup>2</sup>Istituto Telethon di Genetica e Medicina, Pozzuoli, Napoli  
<sup>3</sup>Dip. di Biochimica, Biofisica, e Patologia Generale, Università della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli  
<sup>4</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche Avanzate, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

Mutazioni nel gene WDR81 (OMIM# 614218) sono state descritte come responsabili di una sindrome caratterizzata da atassia cerebellare, disabilità intellettiva e deambulazione quadripedica (OMIM# 610185) ed in casi più gravi con malformazioni cerebellari, idrocefalo severo, disabilità intellettiva e sordità. Sottoponendo all'analisi di sequenziamento dell'esoma una coorte di pazienti affetti da malattie senza diagnosi, abbiamo identificato mutazioni nel gene WDR81 in una paziente di 17 anni con un quadro clinico molto più grave rispetto a quello finora descritto. La paziente presentava grave microcefalia, proptosi oculare bilaterale secondaria a glaucoma congenito e dismorfismi cranio-facciali. La paziente non ha mai acquisito alcuna tappa dello sviluppo psicomotorio. La RM encefalo evidenziava grave microcefalia, lobi frontali estremamente assottigliati con un pattern girale semplificato con quasi completa assenza di tessuto cerebrale nelle restanti porzioni fino ai corni temporali dilatati, ipoplasia ponto-cerebellare, agenesia del corpo calloso ed un'unica singola cavità ventricolare. L'EEG mostrava attività elettrica cerebrale a bassissimo voltaggio. Il quadro clinico era inoltre complicato da malrotazione intestinale, vomito ciclico e pancreatite cronica. La paziente presentava inoltre milza accessoria e anomalie scheletriche che comprendevano deviazione ulnare e radiale, lussazione bilaterale delle anche e agenesia del coccige. Il sequenziamento dell'esoma eseguito nella paziente e in entrambi i genitori ha identificato due mutazioni non-senso in eterozigosi composta nel gene WDR81: c.84G>A (p.Trp28\*) nell'esone 2 e c.1885C>T (p.Arg619\*) a carico dell'esone 9. In conclusione, presentiamo una paziente con un quadro malformativo cerebrale e neurologico estremamente grave dovuto a mutazioni non-senso nel gene WDR81. Le malformazioni cerebrali riscontrate probabilmente rappresentano la forma più grave dello spettro di malformazioni cerebrali finora descritte in associazione a mutazioni del gene WDR81, che per la prima volta sono associate a manifestazioni extra-cerebrali quali glaucoma, malrotazione intestinale, pancreatiti e anomalie scheletriche, a sostegno della funzione pleiotropica del gene.

**P103**  
**Nuova mutazione nel gene MYCN in una coppia padre-figlio con Sindrome di Feingold**

P. Prontera<sup>1</sup>, D. Rogaia<sup>1</sup>, A. Mencarelli<sup>1</sup>, C. Ardisia<sup>1</sup>, C. Gradassi<sup>1</sup>, M. Schippa<sup>1</sup>, E. Sallicandro<sup>1</sup>, M. Rinelli<sup>2</sup>, E. Agolini<sup>2</sup>, A. Novelli<sup>2</sup>, G. Stangoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SSD Neonatologia e Diagnostica Prenatale/CRR Genetica Medica, Azienda Ospedaliera di Perugia, Perugia, Italia  
<sup>2</sup>UOC Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia

Premessa: La sindrome di Feingold tipo 1 (FS1) è una rara malattia genetica, autosomica dominante, dovuta a mutazioni del gene MYCN. La FS1 si caratterizza clinicamente per la presenza di microcefalia variabile con o senza difficoltà di apprendimento, rime palpebrali corte, radice del naso infossata con narici anteverse, anomalie delle orecchie e micrognazia, anomalie delle mani e dei piedi e atresia esofagea/duodenale. I difetti della mano comprendono deformità in flessione del dito medio e clinodattilia del II e V dito, invariabilmente (100% dei pazienti) associate a ipoplasia delle falangi intermedie (brachimesofalangismo).

Scopo: Analizzare il gene MYCN in una coppia padre-figlio con caratteristiche cliniche fortemente suggestive di FS1. Materiali e Metodi: È stata condotta una visita genetica-dismorfologica di un bambino di 8 anni con microcefalia e ritardo cognitivo. L'analisi dell'esoma clinico mediante NGS (Illumina) è stata condotta su DNA estratto da sangue periferico del padre. L'analisi bioinformatica è stata finalizzata in primis alla analisi del gene MYCN. Le conferme nel padre e nel figlio sono state eseguite in Sanger.

Risultati: La visita dismorfologica del probando e dei genitori ha messo in evidenza le caratteristiche cliniche tipiche della FS1 nel probando e nel padre, il quale pure presentava microcefalia ed ha riferito avere avuto difficoltà scolastiche, pur conducendo oggi una vita completamente autonoma. L'analisi mediante NGS finalizzata all'analisi del gene MYCN ha portato all'identificazione della mutazione c.503\_543del (p.Ala171ArgfsTer81).

Conclusioni: La mutazione identificata in questa famiglia non è descritta in letteratura, ma certamente patogena in quanto: 1) non è presente nei databases di polimorfismi, 2) introduce un codone di stop, 3) segrega con la malattia nella famiglia, 4) si associa ad un fenotipo peculiare. Questo studio evidenzia come la FS1 sia una sindrome con variabile espressività clinica, anche intrafamiliare, in grado per questo di interessare più generazioni, e porta ad ipotizzare che la FS1 sia realmente sottostimata. Per questo la presenza di microcefalia in un paziente dovrebbe portare ad un esame attento delle mani e dei piedi e in caso di brachimesofalangismo indirizzare all'analisi dei geni MYCN e MIR17HG (responsabile di sindrome di Feingold tipo 2).



**P104**  
**Diagnosi di Sindrome PURA identificata mediante WES in un neonato in condizione critiche**

D. Ognibene<sup>1</sup>, G. Garani<sup>2</sup>, G. Santen<sup>3</sup>, M. Della Monica<sup>4</sup>, M.P. Gentile<sup>2</sup>, E. Procopio<sup>3</sup>, P. Fiorini<sup>6</sup>, M. Neri<sup>7</sup>, M. Hoffer<sup>3</sup>, C. Ruivenkamp<sup>3</sup>, A. Ferlini<sup>1,7</sup>, S. Bigoni<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Sezione di Microbiologia e Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Ferrara, Ferrara, Italia  
<sup>2</sup>U.O. di Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale, Dipartimento di Riproduzione e Accrescimento, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Ferrara, Italia  
<sup>3</sup>LDGA, Leiden, The Netherlands  
<sup>4</sup>S.O.D. Genetica Medica, Dipartimento di Pediatria Internistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Anna Meyer, Firenze, Italia  
<sup>5</sup>SOC Malattie Metaboliche e Muscolari Ereditarie-Centro di Eccellenza di Neuroscienze- AO.U. Meyer-Firenze, Italia  
<sup>6</sup>Terapia Intensiva Neonatale, Azienda Ospedaliera Universitaria Anna Meyer, Firenze, Italia  
<sup>7</sup>U.O. Genetica Medica, Dipartimento di Riproduzione e Accrescimento, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Ferrara, Italia

Riportiamo il caso di un neonato con un quadro clinico caratterizzato da marcata ipotonia centrale, respiro irregolare (in particolare apnee respiratorie con desaturazione), pianto flebile, dimorfismi, difficoltà di alimentazione. Parametri auxologici nella norma. Screening metabolico neonatale negativo. Analisi di metilazione della regione PW/Angelman, nella norma. L'aggravarsi delle condizioni di salute del piccolo con episodio di arresto respiratorio, che ha necessitato successivo supporto in ventilazione meccanica, ci ha imposto, nel sospetto di una malattia metabolica, di velocizzare i iter diagnostici. Si è pertanto deciso di procedere mediante WES, che ha consentito di identificare un genotipo eterozigote per la mutazione missenso c.470T>G (p.Met157Arg), a carico del gene PURA. Tale mutazione, di origine de novo, coinvolge un residuo amino acidico altamente conservato, viene ritenuta patogenetica dalla maggior parte dei sistemi di predizione in silico ma non è mai stata descritta in letteratura. È noto solo un altro caso in cui, a livello dello stesso residuo, è stata identificata una variazione differente (c.470T>A, p.Met157Lys), che presentava un fenotipo clinico simile.

La Sindrome PURA è caratterizzata da deficit cognitivo moderato/severo a cui si associa deficit di linguaggio e difficoltà nella deambulazione. Alla nascita sono presenti ipotonia assiale, ipotermia, difficoltà ad alimentarsi ed apnee/ipoventilazione.

Nel 90% degli affetti è presente una mutazione in eterozigosi nel gene PURA. Finora sono stati descritti 71 casi di soggetti affetti, la pressoché totalità è stata identificata mediante WES.

Nel nostro caso la diagnosi di Sindrome Pura, seppur non abbia consentito di instaurare una terapia mirata efficace, ha consentito tuttavia di gestire in maniera diversa le condizioni cliniche nel neonato, di fornire una prognosi specifica ed evitare il ricorso ad ulteriori innumerevoli indagini invasive (rachicentesi, biopsia muscolare, ecc) e genetiche.

Scopo di questo report è di segnalare il primo caso italiano di Sindrome PURA e di enfatizzare l'importanza, nell'iter diagnostico genetico, soprattutto nei casi di neonati in condizioni critiche, il ricorso a metodiche di WES.





**P105**  
**Diagnosi di Microcefalia Primitiva Autosomica Recessiva (MCPH) in una coorte di pazienti selezionati attraverso tecnologia Next Generation Sequencing**

A. Moncada<sup>1,2</sup>, D. Vecchio<sup>1</sup>, E. Salzano<sup>1</sup>, M. Busti<sup>3</sup>, C. Passarello<sup>1,2</sup>, A. Giambona<sup>2</sup>, A. Maggio<sup>2</sup>, M. Piccione<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Centro di Riferimento Regionale per il controllo e la cura della Sindrome di Down e delle patologie cromosomiche e genetiche - A.O.Ospedali Riuniti Villa Sofia-Cervello - Palermo, Italia.

<sup>2</sup>U.O.C. di Ematologia per le Malattie Rare del Sangue e degli Organi Ematopoietici, Laboratorio di Diagnosi Molecolare delle Malattie Rare, Villa Sofia Cervello\_Palermo

<sup>3</sup>Dipartimento di scienze per la promozione della salute e Materno-Infantile. Università degli Studi di Palermo.

La microcefalia è definita da una circonferenza occipitofrontale (OFC) inferiore alle 2 D.S per sesso ed et. Tra le forme di microcefalia di origine genetica, più frequentemente viene annoverata la Microcefalia Primitiva Autosomica Recessiva (MCPH) o vera. Essa costituisce un difetto eterogeneo dello sviluppo neurogenico cerebrale che si caratterizza per la riduzione della c.c. alla nascita in assenza di anomalie macroscopiche dell'architettura cerebrale. Associato alla MCPH è il ritardo dello sviluppo psicomotorio in et prescolare e/o la disabilità intellettiva con deficit cognitivo di grado variabile nelle epoche di vita successive. La prevalenza della MCPH è di 1:30.000 e 1:250.000 nati vivi. In letteratura si identificano 12 sottotipi della MCPH. Tuttavia, il fenotipo dei pazienti non è sostanzialmente differenziabile. Nella MCPH sono riportate mutazioni causative nei seguenti geni: MCPH1, WDR62, CDK5RAP2, CASC5, ASPM, CENPJ, STIL, CEP135, CEP152, ZNF335, PHC1 e CDK6. Queste mutazioni sembrano provocare una riduzione nello sviluppo dei neuroni corticali cerebrali durante la neurogenesi embrionale. A causa della complessità diagnostica della MCPH e dalla necessità di avere una diagnosi sempre più precoce, abbiamo proposto un approccio diagnostico basato sulla Next Generation Sequencing su piattaforma Ion Torrent PGM. Abbiamo realizzato un pannello che comprende le regioni esoniche codificanti ed introniche adiacenti ai siti di splicing dei geni precedentemente elencati. È stata selezionata una coorte di 38 pazienti, in 23 dei quali (60.5%) sono state individuate 32 varianti che ricadono in 8 geni. Tutte le varianti sono state classificate come VUS e l'analisi in silico ha mostrato una predizione deleteria /patogenetica in 30 di queste (93.7%). In 25 pazienti (78.1%), le VUS sono state identificate in uno stato di eterozigosi, mentre eterozigoti multipli ed eterozigoti composti sono stati identificati rispettivamente in 4 (12.5%) e 3 (9.4%) pazienti della coorte in esame. Inoltre sono state identificate 6 nuove varianti missenso. A completamento dell'analisi saranno indagati gli effetti funzionali delle mutazioni riscontrate ed analizzati eventuali riarrangiamenti dei loci genici mediante MLPA.

**P106**  
**Mutazioni Nel Gene PTEN In Soggetti Con Macrocefalia E Disordini Neurologici**

C. Passarello<sup>1,2</sup>, A. Moncada<sup>1,2</sup>, D. Palazzo<sup>1</sup>, A. Giambona<sup>2</sup>, A. Maggio<sup>2</sup>, M. Piccione<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Centro di Riferimento Regionale per la prevenzione, la diagnosi e la cura delle malattie genetiche rare cromosomiche e della sindrome di Down - A.O.O.R. Villa Sofia - Cervello, Palermo.

<sup>2</sup>U.O.C. Ematologia per le Malattie Rare del sangue e degli organi Ematopoietici Laboratorio di Diagnosi Molecolare delle Malattie Rare - A.O.O.R. Villa Sofia - Cervello, Palermo;

<sup>3</sup>Dipartimento di scienze per la promozione della salute e Materno-Infantile. Università degli Studi di Palermo.

**Premessa:**  
 Mutazioni germinali nel gene PTEN sono associate con un ampio spettro di disordini quali la Sindrome di Cowden, la Sindrome di Bannayan-Riley-Ruvalcaba, la Sindrome di Proteus e la Malattia di Lhermitte-Duclos. In aggiunta, mutazioni sono state anche descritte in pazienti con Disordini dello Spettro Autistico e macrocefalia.

**Scopo dello studio:**  
 In questo lavoro riportiamo l'analisi del gene PTEN in famiglie di due probandi (MG di 3 anni e GR di 1 anno e 6 mesi), entrambi con macrocefalia ed in uno (MG) associati Disordini dello Spettro Autistico e ritardo nel linguaggio, e nell'altro (GR) ritardo neuromotorio, al fine di correlare eventuali mutazioni nel gene con tali disordini.

**Materiali e Metodi:**  
 Per la diagnosi genetica è stato estratto il DNA, usando protocolli standard, da campioni di sangue ottenuti dai probandi e dai genitori, previo consenso informato scritto. Tutti e nove gli esoni e le giunzioni esone-introne del gene PTEN sono stati amplificati usando primers homemade e successivamente, entrambi i filamenti di DNA, sono stati sequenziati su sequenziatore automatico Applied Biosystems 3130xl con primers Forward e Reverse. Per le varianti missenso riscontrate sono stati consultati i databases di popolazione GnomAD, Exome Variant, 1000G, i databases di malattia ClinVar, Omim, HGMD e per l'impatto della variante i siti di predizione in silico: Sift, Polyphen, Mutation Taster e UMD Predictor.

**Risultati:**  
 In entrambi i probandi sono state riscontrate due mutazioni missenso nel gene PTEN non descritte nei databases internazionali. Nel probando MG è stata riscontrata una mutazione de novo al codone 132 nell'esone 5 con cambio amminoacidico Glicina in Asparagina per la quale i siti di predizione in silico consultati forniscono uno score patogenetico. Nel probando GR è stata riscontrata una mutazione ereditata dalla madre al codone 175 nell'esone 6 con cambio amminoacidico Valina in Metionina per la quale i siti di predizione in silico consultati forniscono uno score patogenetico. La madre del soggetto GR presenta anch'essa macrocefalia. **Conclusioni:**  
 I nostri dati confermano l'utilità dello studio molecolare del gene PTEN in soggetti con macrocefalia e disordini neurologici.



**P107**  
**Duplicazione 5q35.2-q35.3 che include il gene NSD1: descrizione di un nuovo caso. Controtipo della Sindrome di Sotos?**

G. Cavarretta<sup>1,2</sup>, A.M. Crivello<sup>2</sup>, M. Malacarne<sup>3</sup>, V. Consiglio<sup>1</sup>, V. Pisciotta<sup>4</sup>, A. Giambona<sup>2</sup>, A. Maggio<sup>2</sup>, M. Piccione<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Centro di Riferimento Regionale per il controllo e la cura della Sindrome di Down e delle patologie cromosomiche e genetiche - A.O.Ospedali Riuniti Villa Sofia-Cervello - Palermo, Italia.

<sup>2</sup>U.O.C. di Ematologia per le Malattie Rare del Sangue e degli Organi Ematopoietici, Laboratorio di Diagnosi Molecolare delle Malattie Rare, Villa Sofia Cervello\_Palermo

<sup>3</sup>Lab.di Genetica Umana-Ospedale Galliera, Genova.

<sup>4</sup>Dipartimento di scienze per la promozione della salute e Materno-Infantile. Università degli Studi di Palermo.

Negli ultimi anni, l'introduzione della tecnica di Array-CGH ha consentito di individuare numerosi riarrangiamenti genomici alcuni dei quali complementari a specifiche regioni coinvolte in sindromi gi note. Tra queste sono state finora ampiamente descritte quelle a carico delle seguenti regioni cromosomiche: 1q21.1, 7q11.23, 16p11.2, 17p11.2, 17q21.31, 22q11.2 e più recentemente della regione 3q29. Riportiamo il caso di una paziente che presenta alla nascita peso di 2.650 gr, lunghezza di 45 cm, C.C. di 32 cm. Giunge alla nostra osservazione all'età di 2 anni e 5 mesi per ritardo di crescita. L'esame obiettivo evidenzia: peso di 7.900 gr (~3 C), altezza di 76 cm (~3 C), C.C. di 43.8 cm (~3 C), ponte nasale prominente, modesto ipertelorismo, filtro nasale lungo ed ipoplastico, labbra sottili, modesta micrognatia, accenno a clinodattilia del V dito delle mani, ritardo dell'età ossea. L'analisi di Array-CGH ha evidenziato la presenza di una duplicazione parziale del braccio lungo di un cromosoma 5, di circa 1,8 Mb, che si estende dalla posizione 175,576,602 (5q35.2) alla posizione 177,422,760 (5q35.3). Tale riarrangiamento risulta essere de novo ed include numerosi geni tra i quali NSD1 la cui aploinsufficienza è descritta in letteratura come maggiore causa della sindrome di Sotos. La microduplicazione 5q35 è una condizione recentemente descritta che si associa a microcefalia, bassa statura, ritardo dello sviluppo e della maturazione scheletrica. Il fenotipo appare opposto a quello dei pazienti affetti dalla sindrome di Sotos ed è stato ipotizzato che un effetto dose del gene NSD1 possa esserne la causa principale. Poiché ad oggi sono stati descritti pochi casi, la nostra paziente fornisce un ulteriore contributo alla definizione del fenotipo ed all'ampliamento della casistica in questa nuova sindrome emergente.

**P108**  
**Coesinopatia: la sindrome di Warsaw**

F. Faletta<sup>1</sup>, F. Sirchia<sup>1</sup>, E. Colombo<sup>3</sup>, F. Guidolin<sup>2</sup>, A. Spinelli<sup>2</sup>, A. Carbone<sup>3</sup>, G. D'Alessandro<sup>3</sup>, F. Fiocchi<sup>3</sup>, v. Pecile<sup>1</sup>, P. Gasparini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Maternal and Child Health IRCCS Burlo Garofolo

<sup>2</sup>Università degli studi di Padova

<sup>3</sup>A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino

La sindrome di Warsaw è una coesinopatia autosomica recessiva dovuta a mutazioni bialleliche del gene DDX11. Sono stati finora descritti 5 pazienti di 3 diverse famiglie affetti da questa sindrome con una clinica caratterizzata dalla presenza di: grave microcefalia, ritardo di crescita pre e postnatale, disabilità intellettiva, ipoacusia neurosensoriale grave, dismorfismi facciali e anomalie della pigmentazione cutanea. Riportiamo qui il caso di due sorelle, una di 4 anni e una di 3 anni, nate da genitori sani e non consanguinei e giunte nel nostro Istituto per un'ipoacusia neurosensoriale bilaterale. Alla visita si evidenzia la presenza di un'iposomia con parametri tutti inferiori al 3° percentile sin dall'epoca prenatale e nello specifico una grave microcefalia progressiva. Dal punto di vista cutaneo presentavano delle strie ipercromiche e macchie ipocromiche che sono aumentate nel tempo. Fenotipicamente erano presenti caratteristiche dismorfiche: lieve epicanto bilaterale, upslanting palpebrale, occhi prominenti, ponte nasale alto e naso globoso, orecchie a coppa, retro/micrognazia, clinodattilia del V dito delle mani bilateralmente. Le tappe dello sviluppo psicomotorio erano inizialmente state raggiunte nei tempi e secondo modalità fisiologiche anche se le bambine presentavano un ritardo del linguaggio attribuito all'assenza di udito. La RMN e la TC encefalica avevano evidenziato ipoplasie cocleari con ridotta girazione in assenza di malformazioni encefaliche. Non erano presenti malformazioni cardiache o degli organi addominali come confermato dagli esami ecografici. Era già stata eseguita analisi arrayCGH per la presenza della microcefalia e ricerca di mutazioni nei geni GJB2 e GJB6 per ipoacusia risultate tutte negative. Successivamente alla visita è stato eseguito un test per rotture cromosomiche su culture cellulari in presenza di mitomicina C che ha dimostrato nelle probande un elevato numero di aberrazioni specifiche (railroad chromosomes and premature chromatid separation) rispetto ai controlli. Alla luce della positività del test è stata avviata l'analisi molecolare del gene DDX11.





**P109**  
**Caratterizzazione molecolare di pazienti con sindrome KGB: la nostra esperienza**

M. Gnazzo<sup>1</sup>, M.C. Digilio<sup>2</sup>, F.R. Lepri<sup>1</sup>, M.L. Dentici<sup>2</sup>, C. Passarelli<sup>1</sup>, V. Lanari<sup>1</sup>, S. Petrocchi<sup>1</sup>, A. Novelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UOC Lab. di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

<sup>2</sup>Unit di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

La sindrome KGB (OMIM # 148050) è un rara condizione genetica caratterizzata da tipici dismorfismi craniofacciali, macrodontia degli incisivi centrali superiori nei denti permanenti, anomalie scheletriche, principalmente brachidattilia e/o clinodattilia del quinto dito e lievi anomalie costovertebrali, bassa statura e coinvolgimento neurologico specifico. Presenta una trasmissione autosomica dominante ed è causata da varianti loss of function o microdelezioni a carico del gene ANKRD11 (ankyrin repeat domain 11) localizzato sul cromosoma 16q24.3. Tra il 2013 e il 2017, sono stati reclutati pazienti afferenti al servizio di Genetica Clinica del nostro Ospedale con sospetto clinico di sindrome KGB, soddisfacendo i criteri proposti da Skjei et al (2007). La diagnosi genetica-molecolare è stata eseguita analizzando, mediante Next-Generation Sequencing (NGS) su piattaforma Illumina, le regioni codificanti e le giunzioni esone-introne del gene ANKRD11 (NM\_013275.5, 9301bp). L'analisi del gene ANKRD11 ha portato all'identificazione di 31 distinte varianti in 35 pazienti positivi. Trenta di queste 31 varianti non sono state precedentemente descritte. Quasi tutte le varianti sono a carico della regione C-terminale e sono suddivise in 10 mutazioni frameshift, 10 nonsense, 2 delins-in-frame e 11 varianti missenso. L'analisi di segregazione ha mostrato che 12 varianti di ANKRD11 sono de novo e 6 private. Se si considera la natura della mutazione, si nota un'alta prevalenza di mutazioni che comportano un codone di stop precoce: mutazioni frameshift/nonsense (61%), missenso (33%) e delins-in-frame (6%). Le varianti missenso sono state analizzate con metodi in silico. La caratterizzazione genetica ha permesso un ampliamento della casistica nota fino ad oggi, ha fornito un supporto al sospetto clinico consentendo di offrire consulenze genetiche mirate e ha consentito di chiarire correlazioni genotipo-fenotipo soprattutto in presenza di fenotipi complessi.

**P110**  
**Alto rischio eredo-familiare e neoplasia mammaria: quando e quale chirurgia?**

S. Mirandola<sup>1</sup>, F. Pellini<sup>1</sup>, A. Invento<sup>1</sup>, A. Turco<sup>2</sup>, M.L. Nadalini<sup>3</sup>, S. De Sanso<sup>3</sup>, G.P. Pollini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UOC Breast Unit AOUI Verona

<sup>2</sup>Genetica Medica AOUI Verona

<sup>3</sup>USD Psicologia Clinica AOUI Verona

Premessa: Da gennaio 2016 presso la Breast Unit dell'AOUI di Verona è disponibile un Ambulatorio di Oncogenetica per l'identificazione degli individui ad alto rischio eredo-familiare per il carcinoma della mammella e dell'ovaio. Scopo dello studio: Questo studio si propone, dopo un'attenta revisione della letteratura più recente, di classificare i soggetti ad alto rischio, portatori di mutazione BRCA 1 o 2 e non, così da offrire loro le migliori opportunità diagnostiche-terapeutiche e di sorveglianza a lungo termine. Materiali e Metodi: Tra tutti coloro che sono stati sottoposti a valutazione oncogenetica, sono stati considerati i soggetti che hanno effettuato il test genetico per la determinazione dello stato dei geni BRCA1 e 2 da gennaio 2016 a giugno 2017. I dati raccolti sono stati inseriti in un database ed analizzati con software SPSS. Per tutti i pazienti con carcinoma della mammella sono state valutate inoltre le caratteristiche biologiche della neoplasia.

Risultati: Da gennaio 2016 sono state eseguite 263 visite oncogenetiche: 159 soggetti sono state candidati al prelievo, di cui il 25,8% è risultato avere mutazione, 17% BRCA1 e 8,8% BRCA2. Il 70,2% aveva anamnesi familiare per tumore alla mammella e il 16,4% per l'ovaio. La scelta chirurgica è stata influenzata dal timing del prelievo. Tra le pazienti mutate infatti l'approccio chirurgico è stato demolitivo per il 79,2% rispetto alle non mutate dove invece è risultato essere del 63,3%. L'intervento chirurgico di scelta è stata la mastectomia nipple sparing.

Conclusioni: L'analisi retrospettiva condotta ha valutato l'attività oncogenetica, le caratteristiche biologiche del carcinoma mammario nelle pazienti con mutazione BRCA e l'impatto che il timing di esecuzione del test ha avuto sulla scelta chirurgica. Si è visto che le pazienti con mutazione BRCA1/2 affette da neoplasia mammaria, e non ancora sottoposte a chirurgia al momento del test, hanno optato per un intervento demolitivo in una percentuale maggiore rispetto alle non mutate. L'ultima versione delle linee guida NCCN 2.2017 (Genetic / Familias Risk Assessment: Breast and Ovarian Guidelines) prevede di inserire come criterio di selezione per il test anche le pazienti con carcinoma mammario ad istotipo Triple Negative. Alla luce di quanto emerso, è indispensabile per questa categoria di pazienti una valutazione multidisciplinare così da poter offrire un team di esperti dedicati che pianifichino il percorso di sorveglianza nel rispetto della volontà del singolo individuo.

**P111**  
**Evaluation of multiple-gene panel in women BRCA 1/2 negative but with hereditary breast and ovarian cancer highlights the need of its routinely application**

C. Cafiero<sup>1</sup>, F. Biamonte<sup>2</sup>, A. Re<sup>1</sup>, E. Stigliano<sup>3</sup>, E. Cione<sup>4</sup>, M.L. Riitano<sup>1</sup>, M.L. Santoro<sup>1</sup>, G. Sozzi<sup>6</sup>, M. Gazzabin<sup>6</sup>, S. Burlizzi<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Lab. Genetica Medica Alessandria Artemisia, Roma

<sup>2</sup> Istituto di Istologia ed Embriologia, "A. Gemelli" Facoltà di Medicina, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

<sup>3</sup> Istituto di Anatomia Patologica, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

<sup>4</sup> Dipartimento di Farmacia e Scienze della Salute e della Nutrizione, Università della Calabria, Arcavacata di Rende, Cosenza.

<sup>5</sup> U.O.C. Senologia Ospedale "A Perrino" di Brindisi.

**INTRODUCTION:** BRCA1 and BRCA2 mutation analysis among high-risk breast (BC) and ovarian cancer (OC) patients has become a routine clinical geneticists practice. However, the genetic background of a majority of the cases coming to the clinics remains currently unexplained, making genetic counseling rather challenging. To date, many other mutated genes have been associated to BC and OC risk such as PALB2, RAD51C, TP53, PTEN, CHEK2, BRIP1, CDH1, MRE11A, BARD1, NBN, and ATM. The aim of this study was to analyze whether female index individuals of BC and OC families who had tested negative for germline mutations in BRCA1/2 should be offered mutation testing for multiple-gene panel, estimating also the proportion of mutated patients in other cancer associated genes in a small cohort of women. **MATERIALS AND METHODS:** Patients from U.O.C of Senology (A. Perrino Hospital Brindisi-Italy) recruited by our genetic counseling in the years 2012-2017 were included in the present study. These patients had a familial history of BC and/or OC but resulted negative for BRCA1/2 mutations. Genomic DNA was extracted from blood and subjected to massive parallel and next-generation sequencing (MiSeq platform, Illumina) to analyze a panel of 12 genes associated to BC and OC risk (according to Clinical Practice Guidelines). All the mutations identified were then confirmed by Sanger sequencing analysis. **RESULTS:** A total of 19 women were analyzed (mean age: 40-50) 5 of them (26%) had pathogenic mutations in other genes Gene Database annotated. Specifically we observe 5 heterozygous alterations in: PALB2 (c.3494 C>T, p.S1165L); RAD51C (c.797C>T, p.A226V); TP53 (c.305\_308del CCT, p.Y102NdelY103); BARD1 (c.1670G>C, p.Cys557Ser); CHEK2 (c. 470T>C, p. L157T). **CONCLUSIONS:** This study of real-world data analysis provides an estimate of the number of BC and OC patients with who have not received positive genetic test results for BRCA1/2 but were positive for other BC and OC associated genes. The multi-genic approach for identify the genetic cause of both type of cancers for sure better compared to the actual targeted analysis only for BRCA1/2 genes. Therefore, the application of a multi-genic panel allows accurate patient monitoring for developing surveillance programs, target therapy and prevention customized to their genetic characteristics.



**P112**  
**Primo riscontro di una mutazione germline in WTX in una forma familiare di nefroblastoma**

A. Gambale<sup>1,2</sup>, L. Quaglietta<sup>3</sup>, A. Provenzano<sup>4</sup>, A. La Barbera<sup>4</sup>, A. Iolascon<sup>1,2</sup>, S. Giglio<sup>4</sup>

<sup>1</sup>U.O.C. Genetica Medica, Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie mediche, A.O.U. Federico II, Napoli

<sup>2</sup>CEINGE - Biotecnologie Avanzate, Napoli

<sup>3</sup>S.C. Pediatria Oncologia, Dip. di Oncematologia Pediatrica, A.O.RN. Santobono Pausilipon, Napoli

<sup>4</sup>Unit di Genetica Medica, Dip. di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche Mario Serio, Università di Firenze, Firenze

Premessa Il tumore di Wilms si associa a mutazioni somatiche a carico di geni del pathway WNT, in particolare WT1, WTX e CTNBN1. Le forme familiari sono molto rare e sono associate in primis a mutazioni germinali nel gene WT1. Mutazioni germinali nel gene WTX invece, sono state associate a Osteopatia striata con sclerosi cranica (OSCS), patologia X-linked dominante in cui non è stata osservata predisposizione oncologica, ma residui nefrogenici multipli e bilaterali sono stati osservati in un soggetto maschio deceduto a nove giorni di vita (R. Fukuzawa et al). Scopo dello studio: Descriviamo una famiglia con due soggetti affetti da tumore di Wilms in cui l'esoma (WES) ha mostrato una variante nel gene WTX.

**Metodi** L'analisi molecolare del gene WT1 è stata eseguita tramite sequenziamento Sanger delle regioni codificanti, mentre per WES abbiamo utilizzato una strategia basata sulla frammentazione enzimatica per produrre frammenti dsDNA seguiti da riparazione finale, A-tailing, ligation dell'adattatore e amplificazione della libreria. Le librerie sono state ibridate con il protocollo SeqCap EZ Exome v3 e sequenziate con la piattaforma NextSeq 500.

**Risultati** Il probando è un maschio di 7 anni con nefroblastoma unicentrico trifasico senza anaplasia, senza note dismorfiche/malformative, la cui sorella è deceduta per nefroblastoma bilaterale. È stata posta quindi diagnosi di nefroblastoma familiare. Dopo l'analisi negativa, di WT1, l'esoma sul DNA germinale del probando ha individuato la variante p.F159L in emizigosi nel gene WTX. Tale variante, già osservata in nel DNA somatico e germinale di un soggetto con nefroblastoma isolato, è stato riscontrato anche nel DNA, estratto da tessuto neoplastico, della sorella.

**Conclusioni** Per la prima volta in un caso francamente familiare di nefroblastoma il WES ha mostrato una variante nel gene WTX, le cui mutazioni somatiche sono state associate alla lesione. Precedentemente la stessa mutazione è stata osservata nel DNA germinale e somatico di un altro soggetto, tuttavia per la prima volta si osserva una mutazione in tale gene in un quadro classicamente familiare. L'assenza di varianti in altri oncogeni/oncosoppressori osservata tramite WES avalla l'ipotesi che mutazioni in WTX possano predisporre all'insorgenza di nefroblastoma.







P113

**Jay Amin Hydroxamic Acid (JAHA), a histone deacetylase inhibitor with cytotoxic activity and the property to increase DNA repair of triple-negative MDA-MB231 breast cancer cells**

L. Cruciat<sup>1</sup>, M. Librizzi<sup>1</sup>, F. Caradonna<sup>1</sup>, J. Debski<sup>2</sup>, S. Sansook<sup>3</sup>, M. Dadlez<sup>2</sup>, J. Spencer<sup>3</sup>, C. Luparello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF, Sez. di biologia cellulare) Università di Palermo, Italia

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

<sup>3</sup>Department of Chemistry, School of Life Sciences, University of Sussex, United Kingdom

Jay Amin Hydroxamic Acid (JAHA; N8-ferrocenylN1-hydroxy-octanediamide) is a ferrocene-containing analogue of the histone deacetylase inhibitor (HDACi) suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). JAHA's cytotoxic activity on MDA-MB231 triple negative breast cancer (TNBC) cells at 72 h has been previously demonstrated with an IC<sub>50</sub> of 8.45 μM. JAHA's lethal effect was found linked to perturbations of cell cycle, mitochondrial activity, signal transduction and autophagy mechanisms. In order to glean novel insights on how MDA-MB231 breast cancer cells respond to the cytotoxic effect induced by JAHA, and to compare the biological effect with the related compound SAHA, we have employed a combination of differential display-PCR, proteome analysis and COMET assay techniques and shown some differences in the molecular signature profiles induced by exposure to either HDACis. In particular, in contrast to the more numerous and diversified changes induced by SAHA, JAHA has shown a more selective impact on expression of molecular signatures involved in anti-oxidant activity and DNA repair. Besides expanding the biological knowledge of the effect exerted by the modifications in compound structures on cell phenotype, the molecular elements put in evidence in our study may provide promising targets for therapeutic interventions on TNBCs.

P114

**NIPBL, a new player with NPMc+ in the onset of Acute Myeloid Leukemia**

M. Mazzola<sup>1</sup>, G. Fazio<sup>2</sup>, G. Defflorian<sup>3</sup>, L. Ferrari<sup>3</sup>, C. Saitta<sup>2</sup>, L. Ferrari<sup>1</sup>, E. Bresciani<sup>4</sup>, A. Biondi<sup>2</sup>, F. Cotelli<sup>5</sup>, M. Fumagalli<sup>6</sup>, M. Parma<sup>6</sup>, P. Riva<sup>1</sup>, A. Marozzi<sup>1</sup>, G. Cazzaniga<sup>2</sup>, A. Pistocchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Univ. degli Studi di Milano, Milano

<sup>2</sup>Centro Ricerca Tettamanti, Clinica Pediatrica Univ. di Milano-Bicocca, Centro Maria Letizia Verga, Monza

<sup>3</sup>I'FOM, Milano

<sup>4</sup>Oncogenesis and Development Section, National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda

<sup>5</sup>Dip. di Bioscienze, Univ. degli Studi di Milano

<sup>6</sup>Div. di Ematologia e Unit BMT, Osp. San Gerardo, Monza

**BACKGROUND:** cohesins form a multimeric protein complex (SMC1A, SMC3, RAD21, STAG and additional proteins NIPBL, MAU2, ESCO1, HDAC8) involved in the cohesion of sister chromatids, post-replicative DNA repair and transcriptional regulation. Recently, recurrent somatic mutations and deletions of cohesins have been reported in the 9% of patients affected by Acute Myeloid Leukemia (AML) and other myeloid neoplasms, suggesting a role for the cohesin-complex in the pathogenesis of AML. Frequently, mutations in cohesin genes co-occurred with the known AML-associated gene nucleophosmin (NPM1) that, when mutated, aberrantly relocates to the cytoplasm (NPMc+). Forced NPMc+ expression in zebrafish causes an expansion of hematopoietic stem cells (HSCs) in line with AML patient features. **METHODS:** Whole-Mount In Situ Hybridization (WISH) and quantitative real time PCR (qRT-PCR) techniques have been used to analyze the expression of markers of different hematopoietic populations (tal1, lmo2, spi1b and mpx) in nipblb-loss-of-function zebrafish embryos. The functional interaction of the genes has been demonstrated with rescue experiment by means of the injection of different zebrafish transcripts. **RESULTS:** in our cohort of adult AML patients we observed a specific reduction in the expression of NIPBL when NPM1 is mutated. Therefore, we generated a zebrafish model with nipblb haploinsufficiency to investigate the hematopoietic phenotype and the interaction between NPMc+ and nipblb. **CONCLUSIONS:** in nipblb-loss-of-function zebrafish embryos, we observed an increase in undifferentiated myeloid cells, a phenotype resembling the NPMc+ zebrafish model. Therefore, we investigated a functional interaction between NPMc+ and NIPBL in the onset of the aberrant hematopoietic phenotype in zebrafish and the involvement of the canonical Wnt pathway in this process. **CONCLUSIONS:** we showed for the first time a role for NIPBL during zebrafish hematopoiesis. Our data suggest that its altered expression observed in AML patients and the co-occurrence with NPM1 mutations, might play a role in leukemia onset.

P115

**Nuova mutazione di NIPBL nel primo caso di un paziente pediatrico affetto da sindrome di Cornelia De Lange e Leucemia Linfoblastica Acuta**

G. Cazzaniga<sup>1</sup>, G. Fazio<sup>1</sup>, V. Massa<sup>2</sup>, A. Grioni<sup>1,3</sup>, V. Bystry<sup>2</sup>, S. Rigamonti<sup>2</sup>, C. Saitta<sup>1</sup>, C. Rizzari<sup>4</sup>, C. Consarino<sup>5</sup>, A. Biondi<sup>4</sup>, A. Selicomi<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Centro Ricerca Tettamanti, Centro Maria Letizia Verga, Clinica Pediatrica Univ. Milano-Bicocca/Fondazione MBBM, Monza, Italia

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli studi di Milano, Milano, Italia

<sup>3</sup>Central European Institute of Technology (CEITEC), Brno, Czech Rep

<sup>4</sup>Centro Maria Letizia Verga, Clinica Pediatrica Univ. Milano-Bicocca/Fondazione MBBM, Monza, Italia

<sup>5</sup>SOC di Onco-Ematologia Pediatrica, AO Pugliese Ciaccio, Catanzaro, Italia

<sup>6</sup>UOC Pediatria, Presidio S. Fermo, ASST Lariana, Como, Italia

La Sindrome di Cornelia de Lange (CdLS) è una malattia genetica rara caratterizzata da ritardo di crescita pre- e post-natale, ritardo mentale, dismorfismi del volto e anomalie degli arti superiori. Principali responsabili della malattia sono mutazioni nei geni NIPBL, SMC1A, SMC3, HDAC8 e RAD21, che codificano proteine del complesso delle coesine o associate ad esso. NIPBL è coinvolto in circa il 55% dei casi di CdLS, mentre le altre coesine nel 5%. Mutazioni nei geni delle coesine sono state recentemente identificate in AML, CML e sindromi mielodisplastiche. Nel presente studio riportiamo la descrizione del primo caso di paziente pediatrico affetto da CdLS che ha sviluppato leucemia linfoblastica acuta a precursori B (BCP-ALL). Tramite analisi NGS (RNA TruSight PanCancer, Illumina) su campione di RNA derivato da cellule mononucleate di midollo osseo all'esordio di leucemia, abbiamo identificato due varianti in geni delle coesine, in particolare nel 5' UTR di SMC1A (cromosoma X in paziente maschio) e nell'esone 46 di NIPBL (cromosoma 5, in eterozigosi). La variante di SMC1A rs1264011 non è patogenetica ed è stata confermata sul DNA del paziente sia in remissione di malattia che in campione di mucosa buccale, della madre e del fratello. La variante di NIPBL è una nuova mutazione che causa frameshift. Tale anomalia è stata confermata sul DNA di midollo osseo del paziente sia alla diagnosi che in remissione di leucemia che in campione di mucosa buccale. Entrambi i genitori ed il fratello sono negativi, fenotipicamente normali e non affetti da patologie ematologiche. Mediante NGS è stata identificata una mutazione germinale di TP53 exon4, rs1042522, nota come benigna e coinvolta in meccanismi di resistenza a chemioterapici. Tale mutazione è presente in omozigosi anche nella madre. Inoltre abbiamo identificato due mutazioni in eterozigosi di JAK3 nell'esone 1 (condivisa esclusivamente con il padre) e nell'esone 16 (condivisa con tutta famiglia in eterozigosi), rispettivamente annotate come rs7254346 (benigna) e rs3213409 (nota come benigna se germinale e somatica in ALL e AML). Il ruolo nella leucemogenesi della nuova mutazione del gene NIPBL, identificata nel primo paziente pediatrico CdLS con BCP-ALL, merita ulteriori indagini.



P116

**Constitutional loss of function variants in breast cancer patients with a very early age at diagnosis or a previous childhood/juvenile cancer**

M. Colombo<sup>1</sup>, J. Azzolini<sup>2</sup>, B. Peissel<sup>2</sup>, S. Manoukian<sup>2</sup>, P. Radice<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unità di "Medicina Predittiva: Basi Molecolari del Rischio Genetico e Test Genetici", Dipartimento di Ricerca, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

<sup>2</sup>Unit di Consulenza Genetica Oncologica, Dipartimento di Oncologia Medica ed Ematologia, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori

Occurrence of neoplastic diseases at very early age is an indicator of genetic predisposition to cancer, even in the absence of a positive family history. To investigate the role of genetic factors in cancers diagnosed at a very early age (<22 yrs), a total of 25 patients were selected from the registry of the Unit of Medical Genetics of the Istituto Nazionale dei Tumori. These included six patients with a diagnosis of breast cancer (BC) in juvenile age (mean, 20.2 yrs; range 19-21 yrs) and 19 BC patients (mean, 36.9 yrs; range 24-46 yrs) with a previous diagnosis of childhood/juvenile cancer (mean, 13.9 yrs; range, 1-20 yrs). All cases were negative for BRCA gene mutations and displayed no syndromic features. Patients constitutional DNAs were submitted to whole exome sequencing on an Illumina HiSeq platform. After quality check, identified variants were selected using the Ingenuity Variant Analysis software. Only likely loss of function (LOF) variants (frameshift, stop gain, start loss and bioinformatically ascertained spliceogenic variants) with a read depth ≥40, an allelic fraction between 0.4 and 0.6 and a frequency <10<sup>-3</sup> or not reported, were considered. Overall, LOF variants in genes associated with high or moderate risk of BC, including ATM, BARD1, PALB2, POLB, POLD1 and RAD50, were observed in six cases (24%). Subsequently, based on the notion that all the above genes are, directly or indirectly, involved in DNA repair, we looked at genes whose activity mediates DNA metabolism and found two additional LOF variants in LIG4, coding for the DNA ligase IV enzyme, and ADA, coding for adenosine deaminase (the latter variant was detected in the same patients carrying the POLB variant). Our results provide direct support to the hypothesis that different BC predisposition and DNA repair genes may also be involved in the development of cancers at very early age. Larger genetic investigations and functional studies are necessary to validate this possibility. In addition, these studies might provide clues on the possible interactions between LOF variants in DNA repair genes and DNA damaging therapies for cancer treatment that might lead to the onset of secondary oncologic diseases. Supported by grants from AIRC and Associazione Bianca Garavaglia.





**P117**  
**Gruppo di studio Italiano del Cancro Ereditario (GRACE): presentazione di una casistica preliminare di pazienti HBOC**

A. Moncada<sup>1</sup>, I. Antonucci<sup>2</sup>, C. Barone<sup>3</sup>, S. Bianca<sup>4</sup>, M. Caloro<sup>5</sup>, A. De Simone<sup>6</sup>, M. Di Natale<sup>7</sup>, F. Di Toma<sup>8</sup>, V. Filippi<sup>9</sup>, L. Fortunato<sup>9</sup>, G. Gelli<sup>7</sup>, R. Lecce<sup>7</sup>, B. Raso<sup>7</sup>, B. Spaliviero<sup>8</sup>, L. Stuppia<sup>2</sup>, G. Virzi<sup>11</sup>, D. Zuccarello<sup>10</sup>

<sup>1</sup>Casa di Cura Regina Pacis, San Cataldo (CL)

<sup>2</sup>Universit degli Studi "G. D'Annunzio", Chieti

<sup>3</sup>Genetica Medica - ASP 8, Siracusa

<sup>4</sup>Genetica Medica - ARNAS Garibaldi Nesima, Catania

<sup>5</sup>Ospedale A. Perrino, Brindisi

<sup>6</sup>ICS Maugeri, Pavia

<sup>7</sup>Centro S. Anna - Asl Roma1, Roma

<sup>8</sup>Casa di Cura Giovanni XXXIII, Monastier (TV)

<sup>9</sup>Azienda Ospedaliera S. Giovanni Addolorata, Roma

<sup>10</sup>IDA-AFFIDEA, Padova

Nel Novembre 2016 è stato fondato il GRACE (Gruppo di studio Italiano del Cancro Ereditario) composto da medici, biologi e psicologi (specializzati in oncologia, genetica medica, chirurgia senologica) di 8 Centri Italiani con l'obiettivo di raccogliere la casistica relativa a pazienti e famiglie con cancro ereditario della mammella/ovaio (HBOC). Nel primo anno di attivit il GRACE ha raccolto un totale di 314 pazienti (290 F e 24 M) che sono stati sottoposti a test molecolare per i geni BRCA1/2 mediante sequenziamento Sanger e analisi MLPA. Nella casistica è presente familiarit oncologica in 128 casi, mentre altri 108 sono casi sporadici. La sede del primo tumore riscontrato è per il 94% mammella (267 casi), 5% (14) ovaio, 1% (3) mammella/ovaio. Il second hit pi frequente (27%) nella nostra casistica è il melanoma (8/29). L'età media alla diagnosi è di 46,05 anni; 61,6 anni nei maschi e 45,02 anni nelle femmine (p<0,001). Sia nei casi con familiarit che senza, l'età alla diagnosi è identica (45,92 anni vs 45,81 anni; p=n.s.). Per quanto riguarda la classificazione istologica, la maggior parte (76%) dei tumori mammari sono di tipo duttale infiltrante (203/267), mentre il tumore ovarico pi rappresentato (64%) è il sieroso di alto grado (9/14). È disponibile l'immunoistochimica di 221 tumori mammari, e di questi 51 (23%) erano tripli negativi. Lo stadio FIGO è segnalato per 145 pz, di cui 11 in G1, 62 G2 e 71 in G3. Lo stato menopausale era disponibile per 162 pz, di cui 40 erano in menopausa e 122 no. In merito all'analisi molecolare eseguita su questi pazienti, sono state riscontrate 47 mutazioni (15%) nel gene BRCA1 e 37 mutazioni (12%) in BRCA2. L'elevata percentuale di positivi al test molecolare (27%) indica un'ottima selezione dei pazienti sottoposti al test. Sono inoltre state riportate 10 VUS. Tre delle 47 mutazioni di BRCA1 (7%) erano delezioni multiesoniche, riscontrate con tecnica MLPA, sottolineando l'importanza dell'integrazione di tale metodica per un'efficace copertura diagnostica. Infine, in tutti i 314 pazienti è stata eseguita consulenza genetica pre-test e post-test (in 41 da uno specialista non genetista), mentre solo 133 pazienti pre-test e 82 post-test hanno ricevuto una consulenza psicologica, sottolineando l'importanza della presenza nel team multidisciplinare della presenza dello psicologo. Il GRACE si propone di implementare la raccolta dati al fine di condividere informazioni utili al miglioramento della diagnostica e assistenza dei pazienti oncologici, e consentire una terapia di precisione.

**P118**  
**A novel DICER1 pathogenic variant in a patient with early onset rare multiple primary tumors**

F. Brugnoletti<sup>1</sup>, M.G. Pomponi<sup>2</sup>, L. Remondini<sup>2</sup>, E. Lucci Cordisco<sup>1</sup>, M. Genuardi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Medicina Genomica, Universit Cattolica del Sacro Cuore, Roma

<sup>2</sup>U.O.C. Genetica Medica, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli, Roma

DICER1 is a member of the ribonuclease III family involved in the generation of microRNAs, which modulate gene expression at the post-transcriptional level. Germline mutations of this gene are associated with a tumor susceptibility syndrome that confers increased risk for a broad spectrum of neoplasms, including pleuropulmonary blastoma, ovarian sex cord-stromal tumors, cystic nephroma and thyroid multinodular goiter (rarely differentiated thyroid cancer). Botryoid-type embryonal rhabdomyosarcoma of the cervix is a rare tumor usually diagnosed during childhood or adolescence. It has been described as a rare manifestation of DICER1 syndrome. We report the case of a 25 years old woman referred to our Service for personal history of multiple tumors. She was diagnosed with multifocal follicular thyroid carcinoma at the age of 12 years and botryoid-type embryonal rhabdomyosarcoma of the cervix at the age of 24 years. Family history included thyroidectomy for her mother and maternal uncle, both at the age of 15 for multinodular goiter. Due to the uncommon association between botryoid rhabdomyosarcoma and thyroid cancer molecular analysis of DICER1 was performed, and a heterozygous deleterious variant c.4844delA in exon 23 was identified. This variant causes a frameshift p.(Lys1615Argfs\*5) with the predicted production of a stop codon and a truncated protein. The alteration has never been reported in literature and is absent in online population databases. Subsequently the mother was tested and was found to be positive for the same DICER1 variant. After surgical resection of the tumor, the patient has undergone chest x-ray and laboratory tests and no other signs of DICER1-related disorders were found. Our case highlights the importance of genetic evaluation in patients presenting with rare multiple neoplasms and suggest that screening for DICER1 mutations should be considered in all patients presenting with botryoid-type embryonal rhabdomyosarcoma or juvenile thyroid carcinoma.

**P119**  
**Identificazione di sbilanciamenti genomici somatici mediante CGH-array in pazienti affetti da carcinoma orale a cellule squamose**

E. Baldan<sup>1</sup>, C. Gnan<sup>2</sup>, C. Mio<sup>2</sup>, L. Allegri<sup>2</sup>, J. Milasin<sup>3</sup>, M. Lazić<sup>3</sup>, G. Damante<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina Interna e Specialit Mediche, Universit Sapienza di Roma, Roma

<sup>2</sup>Dip. di Area Medica, Universit di Udine, Udine

<sup>3</sup>Dip. di Genetica Umana, Universit di Belgrado, Belgrado, Serbia

<sup>4</sup>Azienda Sanitaria Universitaria Integrata di Udine, Udine

Il carcinoma orale a cellule squamose (OSCC) rappresenta il tumore della regione testa-collo pi comune, con pi di 300.000 nuovi casi all'anno. Gli OSCC sono un sottotipo tumorale molto aggressivo, con un tasso di morbilit del 40% a 5 anni dalla diagnosi, e resistente alle terapie farmacologiche attualmente disponibili. Pertanto, la ricerca di nuovi marcatori diagnostici e prognostici risulta essere di fondamentale importanza. Nell'ambito dei Progetti di grande rilevanza del Ministero degli Affari esteri (MAECI), l'Istituto di Genetica Medica dell'Universit di Udine ha instaurato una collaborazione con l'Istituto di Genetica Umana dell'Universit di Belgrado. Attraverso questa cooperazione, i due gruppi si stanno concentrando sull'identificazione di alterazioni genetiche (duplicazioni o delezioni) comuni al tessuto del margine tumorale (sano) e al tessuto tumorale di pazienti affetti da OSCC, al fine di individuare alterazioni somatiche pro-tumorali. A tale scopo, ad oggi sono stati analizzati tessuti derivanti da 9 pazienti mediante Comparative Genomic Hybridization array (aCGH). In questo modo, in 5 pazienti è stata identificata una duplicazione a carico del braccio corto del cromosoma 8 (8p11.22) presente sia a livello tumorale che del margine dello stesso. L'instabilit genomica di questa regione è gi stata associata allo sviluppo e alla crescita del carcinoma squamoso della congiuntiva. L'instaurazione di questa collaborazione ha permesso mettere in luce il possibile coinvolgimento della regione p11.22 del cromosoma 8 nello sviluppo e nella tumorigenesi degli OSCC. Ulteriori analisi, unite all'ampliamento della casistica in esame, permetteranno di convalidare l'importanza di questa alterazione genetica come nuovo marcatore diagnostico per il carcinoma orale a cellule squamose.



**P120**  
**Low-level TP53 mutational load antecedes clonal expansion in Chronic Lymphocytic Leukemia**

F.T. Papa<sup>1</sup>, A.M. Pinto<sup>2</sup>, E. Frullanti<sup>1</sup>, I. Meloni<sup>1</sup>, R. Tita<sup>2</sup>, R. Caselli<sup>2</sup>, C. Fallerini<sup>1</sup>, D. Lopercolo<sup>1,2</sup>, M.A. Mencarelli<sup>2</sup>, M. Bocchia<sup>3</sup>, A. Gozzetti<sup>3</sup>, A. Renieri<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Medical Genetics, University of Siena, Italy

<sup>2</sup>Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italy

<sup>3</sup>Department of Medicine and Immunological Sciences, Hematology Unit, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese and University of Siena, Italy

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL; MIM151400) is a chronic lymphoproliferative disorder characterized by an accumulation of mature B cells with slow proliferation and unable capability of apoptosis. It has been shown that TP53 gene mutations, seen in about 10% of patients at the time of initial diagnosis, lead to an aggressive and often refractory disease course, poor response to both standard and last generation chemoimmunotherapies, probably due to a selection of TP53-mutated chemotherapy-refractory clones. In order to check the clonal/subclonal origin of TP53 mutation and to assess the timing of its somatic acquisition, we performed a longitudinal deep next generation sequencing (NGS) in a patient with familial occurrence of CLL. A clone bearing deletion on chromosome 11 and its subclone bearing deletion 13 switched from 80% and 45% of the analyzed nuclei, at the time of CLL diagnosis to undetectable, 30 days after chemotherapy. FISH analysis also showed normal configurations of chromosome 12 and 17. A TP53 gene mutation (c.548C>G; p.Ser1883\*), previously reported as pathogenic, was detected in a sample of 1,4 year before the clinical and laboratory manifestation of the disease with a switch from a 15% of mutation-positive DNA fragments in the pre-diagnosis sample to a 93,8% of mutation-positive DNA fragments in post-chemotherapy sample. The identified mutation could likely be the expression of a pre-existing monoclonal B-cell lymphocytosis and it accounts for the aggressive clinical course of the disease. We demonstrated, for the first time, that low-level clonal TP53 mutation precedes the clinical/laboratory sign of CLL and acts as a driver of tumor development and progression. We also highlight that genotoxic therapy have to be avoided in patients bearing TP53 mutation even at very low mutational load. Introducing early TP53 NGS analysis in clinical practice of a distinct category of CLL patients would lead to opt for last generation targeted therapies. Personalized gene therapy tailored on snipping out the patient's specific TP53 mutation and replacing it with the wild type allele or a killer gene, can be envisaged in a near future for the cure of these patients whose treatment remains otherwise challenging.





**P121**  
**Novel frameshift mutation of BRCA2 gene in an Italian family with breast cancer history discovered in genetic counselling**

B. Testa<sup>1</sup>, L. Baghemajad Salehi<sup>2</sup>, G. Mastrogiorgio<sup>1</sup>, J. Farro<sup>1</sup>, G. Novelli<sup>1,2</sup>, F.C. Sanguolo<sup>1,2</sup>, M. Biancolella<sup>1</sup>, M.R. D'Apice<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Genetics Section, Department of Biomedicine and Prevention, Tor Vergata University of Rome, Rome, Italy

<sup>2</sup>Lab. Medicine Department, Medical Genetics Section, Tor Vergata Hospital, Rome, Italy

Background: Breast cancer (BC) is the most frequent female malignancy worldwide. The estimated proportion of hereditary breast and ovarian cancers among all breast and ovarian cancer cases is 5-10%. Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 genes, that play critical roles in DNA repair, cell cycle checkpoint control and maintenance of genomic stability, account for the majority of hereditary breast and ovarian cancer cases. Case report: Our proband is a 44 years old Italian woman with infiltrating lobular and ductal type breast carcinoma. Estrogen and progesterone receptors were positive in 100% of the neoplastic cells. The patient's mother developed breast ductal cancer at the age of 47 years and a papillary serous ovarian adenocarcinoma at the age of 62 years. In the family there are five other cases with breast cancer and another case of ovarian cancer. We identified a novel heterozygous nucleotide variant c.8786\_8787insT, p. Leu2929fs in exon 22 of BRCA2 gene by NGS analysis. The same variant has been identified in proband's mother and sister by Sanger sequencing. The microdeletion causes a substitution at amino acid 2929 from leucine to phenylalanine and introduces a stop codon 3 amino acids downstream, resulting in premature translation termination. This variant is predicted to be pathogenic through several bioinformatics tools, is not reported in BRCA mutation databases and, as far as we know, has not been published. The resulting BRCA2-truncated protein loses the OB (oligonucleotide binding) 2 and OB3 domains, and the two putative NLSs (Nuclear Localization Signal) and the extreme C-terminal region containing an additional Rad51-binding motif. These domains are the most conserved portion of BRCA2 protein across different species and contain a high number of mutations associated to an increase of cancer risk in the carrier families, strengthening the potential deleterious role of our novel frameshift variant in this family. In conclusion, genetic counselling with molecular testing allowed to better define family oncological risk with surveillance protocol customized to the family genetic characteristics; surveillance protocol including prophylactic surgery.

**P122**  
**Nuova variante del gene KIT associata a tumore stromale gastrointestinale metastatico: descrizione di un caso e revisione della letteratura**

V. Disciglio<sup>1</sup>, C. Fasano<sup>1</sup>, L. Russo<sup>1</sup>, G. Forte<sup>1</sup>, P. Sanese<sup>2</sup>, V. Celestini<sup>1,3</sup>, A. Peserico<sup>2</sup>, M. Lepore Signorile<sup>2,4</sup>, V. Grossi<sup>2</sup>, L. Troiani<sup>5</sup>, I. Lolli<sup>5</sup>, C. Simone<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica, Istituto Nazionale di Gastroenterologia, IRCCS Saverio De Bellis, Castellana Grotte (Bari), Italia.

<sup>2</sup>Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana (DIMO), Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Italia.

<sup>3</sup>Dipartimento di Biochimica e Farmacologia Molecolare/Laboratorio di Biologia Molecolare; IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milano; Italia.

<sup>4</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Roma La Sapienza, Roma, Italia.

<sup>5</sup>Dipartimento di Oncologia, Istituto Nazionale di Gastroenterologia, IRCCS Saverio De Bellis, Castellana Grotte (Bari), Italia.

I tumori stromali gastrointestinali (GIST) sono neoplasie rare e rappresentano la forma più comune dei tumori mesenchimali gastroenterici. La maggior parte (85%) dei GIST presenta alterazioni che causano attivazione costitutiva dei recettori tirosinchinasici KIT e PDGFRA. Sebbene circa il 50% dei pazienti GIST sviluppa metastasi nel fegato o peritoneo dopo 2 anni dalla diagnosi, la formazione di metastasi ossee occorre in meno del 5% dei casi. Si descrive il caso di un uomo di 50 anni (et alla diagnosi) affetto da GIST sporadico dello stomaco con metastatizzazione epatica e successivamente ossea. Il primo esame di tomografia computerizzata mostra grossolano espanso, coinvolgente la cavità gastrica, e multiple metastasi epatiche. La diagnosi di GIST viene confermata su biopsia epatica mediante esame immunohistochimico. L'analisi molecolare dei geni KIT e PDGFRA, sullo stesso campione biotipico, evidenzia la presenza dell'alterazione p.Q575\_W582delinsL nel dominio proteico iuxtamembrana codificato dall'esone 11 del gene KIT. Il paziente viene quindi indirizzato a terapia con Imatinib (400mg/die) con iniziale risposta attiva al farmaco. Successivamente a seguito delle progressioni di malattia vengono impiegati diversi farmaci attivi (Imatinib, 800mg/die; Sunitinib; Regorafenib), con sviluppo, dopo circa due anni dalla diagnosi, di metastasi ossee con rapida e fatale progressione tumorale. Diversi lavori scientifici associano le mutazioni dell'esone 11 del gene KIT ad eterogeneità fenotipica del tumore (prognosi, risposta al trattamento) e ad una maggiore suscettibilità allo sviluppo di metastasi epatiche. La variante p.Q575\_W582delinsL non è mai stata riportata in casi GIST sino ad ora pubblicati in letteratura. Tale variante è stata identificata nei datasets (TCGA, COSMIC), che raccolgono dati genomici in diversi tipi di tumore, in un solo altro caso di adenocarcinoma del colon. Sebbene non possa essere esclusa la presenza di ulteriori alterazioni genomiche somatiche responsabili del fenotipo aggressivo manifestato dal paziente, è possibile ipotizzare che la variante p.Q575\_W582delinsL abbia un valore prognostico negativo nei pazienti GIST. Uno studio approfondito della letteratura sullo stato mutazionale del gene KIT nei casi GIST metastatici verrà descritto.



**P123**  
**Identificazione di una nuova variante del gene TERC (Telomerase RNA Component) in una paziente con anemia aplastica e mielodisplasia**

M. Rinelli<sup>1</sup>, E. Agolini<sup>1</sup>, G. Pascolini<sup>2</sup>, M. Mucciolo<sup>1</sup>, E. Pisaneschi<sup>1</sup>, P. Grammatico<sup>2</sup>, A. Novelli<sup>1</sup>, A.P. Iori<sup>3</sup>, L. Quattrocchi<sup>3</sup>, S. Majore<sup>2</sup>

<sup>1</sup>U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

<sup>2</sup>U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, "Sapienza" Università di Roma, A.O. San Camillo-Forlanini

<sup>3</sup>Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, "Sapienza" Università di Roma

Le sindromi da insufficienza midollare acquisita sono un gruppo di patologie di cui fanno parte l'Anemia Aplastica (AA) e la Sindrome Mielodisplastica (SMD). Alcuni pazienti affetti da queste malattie presentano telomeri più corti a livello delle cellule nucleate del sangue periferico. In particolare, l'AA congenita è una condizione autosomica dominante, caratterizzata da pancitopenia, insufficienza midollare ed aumentato rischio di mielodisplasia e neoplasie ematiche, soprattutto leucemia mieloide acuta (LAM). Presentiamo il caso di una paziente, giunta alla nostra attenzione per insufficienza midollare, pancitopenia e mielodisplasia. L'analisi di un ampio pannello di geni associati ad anemia, mediante tecnica NGS, eseguita su un campione di DNA estratto dal sangue periferico della probanda, ha permesso l'identificazione di una nuova variante in eterozigosi nel gene TERC. La variante, confermata mediante sequenziamento Sanger, è stata esclusa nel padre e nel fratello sani della probanda, mentre non è stato possibile analizzare il DNA della madre, deceduta a causa di un linfoma, a cui era stata diagnosticata una forma di anemia all'età di 20 anni. L'anamnesi familiare ha inoltre evidenziato la presenza nel ramo materno di patologie ematologiche giovanili. Il gene TERC codifica per la componente ad RNA dell'enzima telomerasi. Varianti patogenetiche di questo gene sono associate a diverse condizioni, quali la discheratosi congenita di tipo 1, la fibrosi polmonare idiopatica e l'anemia aplastica. Tale variabilità fenotipica è strettamente correlata alla posizione della mutazione nel gene. Nella nostra paziente, la variante, ad oggi non descritta in letteratura scientifica, è localizzata tra due nucleotidi già noti per essere mutati in pazienti affetti da anemia aplastica. In particolare, la variante cade in prossimità del dominio a tripla elica di TERC. L'identificazione di questa nuova variante amplia lo spettro mutazionale di TERC, confermando l'importanza ed il ruolo di questo gene nell'insorgenza dell'AA e delle altre condizioni associate.

**P124**  
**The use of extended genes panel for a deep genetic characterization in women with breast and ovarian cancer history**

L. Costantino<sup>1</sup>, S. Salardi<sup>1</sup>, B. Gentilin<sup>1</sup>, V. Prina<sup>1</sup>, N. Yazdi<sup>1</sup>, M. Albanese<sup>1</sup>, G. Miano<sup>1</sup>, F. Mignone<sup>2</sup>, F. Grandi<sup>3</sup>, G. Fellegara<sup>4</sup>, F.E. Ferrara<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Molecular Genetics Lab Centro Diagnostico Italiano (CDI) Milan, Italy

<sup>2</sup>Dept of Science and Innovation Technology (DISIT), University of Piemonte Orientale - Alessandria, Italy

<sup>3</sup>4bases SA Lugano, Swiss

<sup>4</sup>Dept of Pathology, Centro Diagnostico Italiano (CDI), Milano, Italy

Breast cancer (BC) is the most common cancer and cause of deaths from cancer in women worldwide. It is a multifactorial disease due to a combination of environmental and genetic factors. In an estimated 10% of BC, genetic factor is contributed primarily by mutations in BRCA genes. Guidelines to testing patients with suggestive personal or family history are frequently updated and they also address high- and moderate-risk genes such as TP53 and PTEN. Although medical management guidelines exist for many other genes (i.e. PALB2, CHEK2, ATM) no defined testing criteria have been established. The advent of next-generation sequencing (NGS) has allowed for the efficient, cost-effective analysis of many genes simultaneously. Multiple studies have demonstrated that compared with multi-gene NGS panels, testing only BRCA1/2 genes can cause loss of potential findings in a subset of cases. The National Comprehensive Cancer Network and the American Society of Breast Surgeons address the benefits and limitations of multi-gene panels, but they do not explicitly advocate for or against the use of this testing method. Benefits include increased yield of positive findings, limitations include higher rates for variants of unknown significance and findings with no established management guidelines. In our cohort we selected 12 patients BRCA-negative with a consistent history for cancer predisposition. We performed analysis with hereditary cancer panel consisting of 26 genes associated primarily with BC plus genes associated with other commonly assessed cancer types (i.e. gynecologic or gastrointestinal). Two out of 12 patients carried a pathogenic variant in two different genes. One was a woman with ovarian cancer resistant to cisplatin chemotherapy. Analysis on ovarian tissue has identified a pathological mutation in TP53 associated to chemioresistance. Confirmation on blood has allowed us to make a diagnosis to the family of Li-Fraumeni syndrome. The second one was a woman with three BC during her life (first when she was 31). Analysis showed a pathogenic variant on ATM gene. Limited to a few cases, our data support previous studies showing that extended panel testing improves the identification of hereditary cancer risk for patients allowing a correct diagnosis.







**P125**  
**Effetto sinergico di varianti dei geni POLE e PMS2 nella predisposizione al carcinoma coloretale**

M. Calicchia<sup>1</sup>, N. Musso<sup>2</sup>, G. Cinnirella<sup>2</sup>, L. Reggiani Bonetti<sup>3</sup>, M. Ciavarella<sup>4</sup>, V. Barresi<sup>2</sup>, D.F. Condorelli<sup>2</sup>, M. Genuardi<sup>1,5</sup>, E. Lucci Cordisco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Medicina Genomica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche, Sezione di Biochimica Medica, Università di Catania

<sup>3</sup>Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica, Università di Modena e Reggio Emilia, sezione di Anatomia e Istologia Patologica

<sup>4</sup>SSD Unit Tumori Ereditari e Endocrinologia Oncologica, Istituto Oncologico Veneto I.R.C.C.S. Padova

<sup>5</sup>UOC Genetica Medica, Fondazione Policlinico Agostino Gemelli, Roma

I geni POLE e PMS2 codificano rispettivamente la subunità catalitica della Pol $\epsilon$  e la proteina PMS2, afferente al sistema del mismatch repair (MMR). È noto da tempo che varianti patogenetiche nel gene PMS2 e negli altri geni MMR MLH1, MSH2, MSH6, sono responsabili della sindrome di Lynch, la più frequente condizione genetica di predisposizione ereditaria a carcinoma coloretale (CCR). Più recentemente è stato dimostrato che anche POLE è implicato in tumori coloretali ereditari. Mediante Next Generation Sequencing (NGS), alterazioni nel dominio esonucleasico della Pol $\epsilon$  (aa278-471) e della Pol $\delta$  (aa304-517), codificata dal gene POLD1, sono state identificate in pazienti con CCR e adenomi multipli del colon (AMC). Questo ha permesso la definizione della Poliposi Associata a difetti nel dominio Proofreading delle Polimerasi (PPAP), come nuova condizione predisponente a CCR.

Analizzando una casistica di pazienti con sospetto CCR su base ereditaria mediante NGS su DNA costituzionale, abbiamo identificato in uno stesso paziente due varianti POLE (c.1175A>G - p.Asp392Gly e c.1274A>G - p.Lys425Arg) e una PMS2 (c.861\_864delACAG - p.Arg287fs), tutte in eterozigosi. Il probando in cui sono state identificate le varianti sopra riportate presentava storia personale di CCR giovanile (CCRG), CCR multipli metacroni e storia familiare positiva per CCR nella madre, con diagnosi a 66 anni. È stata eseguita analisi di segregazione delle varianti nella famiglia, che ha evidenziato la posizione in trans delle due varianti POLE e l'assenza di CCRG, CCR multipli o adenomi multipli in soggetti che avevano varianti a carico di uno solo dei 2 geni.

Sulla base dei risultati ottenuti, ipotizziamo che le varianti POLE p.Lys425Arg e PMS2 p.Arg287fs possano avere un effetto sinergico, in grado di giustificare il fenotipo del paziente. I dati ottenuti avvalorano l'ipotesi secondo cui l'insorgenza di CCRG in pazienti con varianti monoalleliche in geni a bassa penetranza, come PMS2, possa essere influenzata dalla presenza di alterazioni costituzionali in altri geni predisponenti a tale neoplasia.

**P126**  
**Poliposi intestinali: approccio multigenico e nuove evidenze**

S. Di Tommaso<sup>1</sup>, C. Ranieri<sup>1</sup>, D.C. Loconte<sup>1</sup>, R. Bagnulo<sup>1</sup>, A. De Luisi<sup>1</sup>, M. Patruno<sup>1</sup>, F. Mercadante<sup>1</sup>, F. Cortellessa<sup>1</sup>, V. Leotta<sup>1</sup>, D. Varvara<sup>1</sup>, P. Lastella<sup>1</sup>, V.P. Lognillo<sup>1</sup>, F.C. Susca<sup>1</sup>, A. Stella<sup>1</sup>, N. Bukvic<sup>1</sup>, N. Resta<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Divisione di Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana (DIMO) Università degli Studi di Bari "Aldo Moro"

Le sindromi poliposiche sono classificate, sulla base della localizzazione, numero ed istologia delle neoformazioni e delle eventuali manifestazioni extra-intestinali, in: Familiar Adenomatous Polyposis (FAP), Attenuated Familiar Adenomatous Polyposis (AFAP), MUTYH associated polyposis (MAP) Juvvenile Polyposis Syndrome (JPS), Peutz Jeghers Syndrome (PJS), PTEN Hamartoma Tumor Syndrome (PHTS) e poliposi serrate e miste. L'identificazione di varianti in geni classicamente associati a sindromi poliposiche (APC, MUTYH, STK11, SMAD9, BMPR1A, PTEN) riesce a spiegare la maggior parte dei casi con diagnosi clinica accertata; esiste tuttavia un'ampia percentuale di casi non inequivocabilmente inquadrabili.

La revisione della letteratura ha permesso di selezionare 12 geni (MCM9, XRCC4, ENG, NTHL1, FAN1, POLE e POLD1, SMARCA4/BRG1, SMAD9, BARD1, AKR1C4, CHECK2) per i quali è stato recentemente riconosciuto un ruolo nella predisposizione tumorale intestinale. 46 pazienti con storia familiare e/o personale di poliposi e/o neoplasia intestinale, per i quali l'indagine sui geni classici ha dato esito negativo, sono stati analizzati mediante l'utilizzo di un Custom Panel comprendente i 12 geni summenzionati sfruttando la piattaforma PGM-IonTorrent. In tre soggetti con poliposi intestinale, adenocarcinoma del colon e forte familiarità per poliposi sono state identificate 2 varianti di probabile significato patogenetico e una VUS nel gene CHEK2; in un soggetto con poliposi intestinale e neoplasie multiple è stata identificata una variante in BARD1 non descritta in ClinVar ma rarissima nella popolazione generale; in un soggetto con adenocarcinoma del retto è stata trovata una VUS in POLE che ricade nel dominio esonucleasico all'interno del quale sono gi descritte numerose varianti patogenetiche associate a carcinoma coloretale. L'utilizzo di un nuovo panel di geni associati a poliposi intestinale e familiarità neoplastica ci ha consentito di identificare nuove varianti il cui ruolo sarà anche indagato attraverso uno studio di segregazione familiare. Ci, unitamente all'ampliamento della casistica di pazienti, potrà rivelare nuove correlazioni genotipo-fenotipo, utili ai fini di una migliore gestione clinica dei pazienti e dei loro familiari.

**P127**  
**Chromosomal instability in Glioma Stem Cell lines from glioblastoma multiforme: implications for new therapeutic strategies**

C. Cilibrasi<sup>1,2,3</sup>, M. Cadamuro<sup>1,4</sup>, N. Villa<sup>5</sup>, G. Riva<sup>1,6</sup>, M. Strazabosco<sup>1,4,7</sup>, H. Hoehegger<sup>8</sup>, A. Bentivegna<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>School of Medicine and Surgery, University of Milan-Bicocca, Monza, Italy

<sup>2</sup>NeuroMI, Milan Center for Neuroscience, Milan, Italy

<sup>3</sup>PhD program in Neuroscience, University of Milan-Bicocca, Monza, Italy

<sup>4</sup>International Center for Digestive Health (ICDH), University of Milano-Bicocca, Milan, Italy

<sup>5</sup>Medical Genetics Laboratory, San Gerardo Hospital, Monza, Italy

<sup>6</sup>Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

<sup>7</sup>Liver Center, Section of Digestive Diseases, Yale University School of Medicine, New Haven, USA

<sup>8</sup>Genome Damage and Stability Center, School of Life Sciences, University of Sussex, Falmer, Brighton, UK

Glioblastoma multiforme (GBM) is a grade IV astrocytoma and despite multimodal therapies the median survival of patients is 12 months. Cancer stem cells (CSCs) are a small subpopulation of cells with stem-like properties responsible for tumor initiation, growth and relapse. Glioma stem cells (GSC) are characterized by enhanced chromosomal instability, which might be due to alterations in mitotic checkpoint genes. Aurora kinases (AKs), a subgroup of serine/threonine protein kinases, play a key role in protein phosphorylation in mitosis and have been shown to contribute in the development and progression of cancer. AKs are overexpressed in human cancers, and elevated expression has been correlated, also in GBM, with chromosomal instability, tumor aggressiveness and poor prognosis. Danuserib (Dan) is a small molecule with strong activity against AKs.

In this study we investigated the efficacy of Dan on 5 established GSC lines isolated from GBM patients providing new important approach to eradicate the GSC compartment.

Results showed that response to Dan exposure was heterogeneous among GSC lines. Some of them were more sensitive to subtle changes in AKs activity, which resulted in huge morphological alterations, a rapid increase in ploidy and subsequently in senescence/autophagy activation, with a consistent reduction in clonogenic survival and proliferation. We assessed that this senescence response did not correlate with TP53 mutation status. Interestingly, we also observed that the sensitive cell lines were characterized by a higher ploidy compared to the other ones, suggesting the presence of a ploidy threshold that is intolerable even for p53 negative cell lines. A consequence of this is that repeated rounds of AKs inhibition sensitized the resistant cell lines to the drug, leading to steady increases in ploidy.

The correlation between ploidy and AKs inhibitor sensitivity we found is particularly appealing and encouraging, not only because it highlighted the presence of a sort of ploidy threshold, but also because it suggests that the chromosome content could be used in the future as a marker to classify patients for a more personalized therapy.



**P128**  
**Identification of biological features in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL): molecular analysis, clinical integration and prognostic implications**

R. Murru<sup>1</sup>, S. Uda<sup>1</sup>, F. Culurgioni<sup>1</sup>, R. Asproni<sup>2</sup>, G. Piras<sup>2</sup>, M. Monne<sup>2</sup>, G. Latte<sup>2</sup>, M.G. Cabras<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SC Ematologia e CTMO, Osp. Oncologico A.Busino AO Brotzu, Cagliari

<sup>2</sup>UOC Ematologia Osp. San Francesco, ASL Nuoro, Azienda Tutela Salute - ATS - Sardegna

Background. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by progressive expansion of a mature B lymphocytes clonal population. Recent studies have revealed new recurrent genetic clonal lesions and, among them, NOTCH1 is frequently correlated with aggressive disease and poor outcome.

Aim of work. Integration between potential prognostic and predictive markers (ie: NOTCH1) and traditional biological and clinical findings to investigate a risk stratification tool, useful for predicting disease outcome.

Material and methods. A monocentric real life cohort of 160 unselected CLL patients in different clinical Binet stage were analyzed for NOTCH1 mutation (mut), IGVH status, CD38 expression, FISH (de13p, tris12, del11q, del17p), TP53 sequencing. All patient, 65 untreated (40%) and 95 (60%) treated patients, have been diagnosed at our institution from 01/1988 to 07/2017. Collection and analysis of samples for NOTCH1 was carried out from april 2016 and march 2017.

Results. NOTCH1 mut was observed in 18/160 (11%) and correlated with tris12, IGVH status and LDH, analyzing impact on overall survival (OS). Significant statistical differences in OS were observed between patient with NOTCH1 mut versus NOTCH1 wt (p<0.05, T test), confirming a prognostic negative impact. Moreover, a worse outcome was observed when associated with IGVH unmutated status. Coexistence of NOTCH1 mut and tris12 was found in 50% of patient, significantly correlated with LDH increase evaluated both at diagnosis and pre-treatment. 8 patients (44%), harboring NOTCH1 mut, developed Richter syndrome with fatal outcome, confirming a worse prognostic role characterized by chemoresistance and rapid disease kinetics.

Conclusions. Introduction and validation of new CLL prognostic and predictive markers of outcome is a future challenge, strongly required for selecting high risk versus low risk patients and to plan targeted therapeutic programs.





**P129  
Famiglia con mutazione nel gene APC e BRCA1**

M.T. Vietri<sup>1,2</sup>, G. D'Elia<sup>1</sup>, G. Caliendo<sup>1</sup>, R. Pepe<sup>1</sup>, F. Pisano<sup>1</sup>, A. Gallo<sup>1</sup>, M. Cioffi<sup>1,2</sup>, A.M. Molinari<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Patologia clinica, Dip. di Biochimica, Biofisica e Patologia generale, Università degli Studi della Campania L. Vanvitelli

<sup>2</sup>U.O.C. Patologia clinica e molecolare Diagnostica molecolare - Tumori ereditari, Università degli Studi della Campania L. Vanvitelli

È noto che una bassa percentuale di malattie tumorali riconosca una base di predisposizione ereditaria. La disponibilità di test genetici specifici ha determinato un aumento sia della domanda che dell'offerta della consulenza genetica in oncologia per i casi di tumori eredo-familiari, allo scopo di sviluppare misure diagnostiche, terapeutiche e preventive per i soggetti a rischio. Una paziente di 46 anni è stata sottoposta a counselling oncogenetico. La paziente era affetta da Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP), diagnosticata a 18 anni e da carcinoma ovarico, diagnosticato a 45 anni. La paziente riporta diversi casi, in famiglia dal lato materno, di FAP ed uno di carcinoma della mammella. In seguito alla consulenza, la paziente è stata sottoposta a prelievo di sangue periferico per analisi mutazionale dei geni APC, BRCA1 e BRCA2. APC è il principale gene di suscettibilità per la FAP, mentre BRCA1/2 per il carcinoma mammario ed ovarico. L'analisi mutazionale è stata estesa ai familiari della paziente. I risultati hanno mostrato la presenza di 2 mutazioni frameshift, una nel gene APC, c.3927\_3931delAAAGA (p.Glu1309AspfsX4), e una nel gene BRCA1, c.3756\_3759delGTCT (p.Ser1253Argfs). L'analisi mutazionale è stata estesa alla sorella di 48 anni affetta da FAP, diagnosticata all'età di 20 anni, che ha riportato sia la mutazione nel gene APC che quella in BRCA1. Le sorelle sane di 54 e 52 anni, sottoposte all'analisi molecolare, risultano non mutate. Le figlie della paziente, di 20 e 19, hanno ereditato solo la mutazione in APC. La presenza delle mutazioni nei geni APC e BRCA1, riscontrate nella paziente e nella sorella, è un evento casuale. Le mutazioni dei due geni, infatti, non sono correlate tra loro, ma sono riconducibili rispettivamente alla presenza della FAP e del carcinoma ovarico nella paziente. Una corretta consulenza genetica che tenga conto non solo della storia personale, ma anche della storia familiare del paziente, permette di indirizzare i test clinici verso una corretta diagnosi genica. L'identificazione di mutazioni nei geni di predisposizione ai tumori eredo-familiari consente interventi terapeutici mirati nei pazienti affetti e permette di attuare piani di sorveglianza clinica e strumentale per la gestione dei soggetti sani portatori di mutazioni.

**P130  
Studio citogenetico e FISH di un cariotipo complesso in un paziente con Linfoma di Burkitt**

L. Bellini<sup>2</sup>, V. Margiani<sup>2</sup>, R. Murrù<sup>1</sup>, A. Azzena<sup>1</sup>, S. Deidda<sup>1</sup>, V.M. Licheri<sup>1</sup>, C. Romani<sup>3</sup>, M.G. Cabras<sup>3</sup>, S. Orro<sup>2</sup>, C. Carcassi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. Citogenetica, SC Genetica Medica, P.O. Binaghi, ATS Sardegna, ASSL Cagliari

<sup>2</sup>Sez. Genetica Medica, Dip. Scienze Mediche, Università degli Studi di Cagliari

<sup>3</sup>U.O. Ematologia e CTMO, P.O. Businco, AO Brotzu Cagliari

Nel presente lavoro riportiamo il caso di un paziente di 53 anni giunto alla nostra attenzione con diagnosi di Linfoma di Burkitt all'esordio. L'analisi citogenetica standard su sangue midollare (colorazione GTG) ha evidenziato un clone (18 metafasi su 20) con cariotipo complesso costituito da 47 cromosomi e caratterizzato dalla presenza di un derivativo del cromosoma 3 originatosi dalla traslocazione tra il braccio lungo del cromosoma 3 e il braccio lungo del cromosoma 13 t(3;13)(q27;q14), con conseguente monosomia parziale del braccio lungo del cromosoma 3 e trisomia parziale del braccio lungo del cromosoma 13, dalla presenza di un cromosoma 8 aberrante e da un cromosoma 12 sovranumerario. Una più approfondita caratterizzazione dei cromosomi coinvolti è stata effettuata mediante l'analisi FISH con sonde painting per i cromosomi 3, 8 e 13 (WCP3, WCP8, WCP13) e locus specifiche per la traslocazione t(8;14)(q24;q32) (LSI IGH/MYC, CEP8). Tale analisi ha permesso di confermare che il derivativo del cromosoma 3 origina da una traslocazione t(3;13), l'assenza del reciproco di tale traslocazione e l'assenza della traslocazione t(8;14). L'esame FISH per la regione MYC ha inoltre evidenziato un terzo segnale di tale regione su un altro cromosoma e l'esame con sonde WCP 3 e 8 ha evidenziato la traslocazione tra il cromosoma 8 e il cromosoma 3 non coinvolto nella traslocazione t(3;13). Il linfoma di Burkitt è un tumore del sistema linfatico a cellule B mature dall'aspetto molto caratteristico. In oltre il 75% dei casi esiste una traslocazione patognomica t(8;14)(q24;q32) che giustappone l'oncogene c-myc (localizzato in 8q24) al gene per le catene pesanti delle immunoglobuline (localizzato in 14q32). In letteratura le traslocazioni osservate sono descritte raramente e sempre come eventi secondari alla traslocazione t(8;14) che per nel nostro caso non è stata riscontrata neanche nelle sue varianti t(8;22)(q24;q11) o t(2;8)(p11;q24). Sono ancora in corso gli esami molecolari. Il caso descritto risulta di particolare interesse vista la complessità del quadro citogenetico atipico che dovrebbe essere approfondito per valutare le eventuali implicazioni cliniche e il valore prognostico.

**P131  
Development and validation of detection workflow for BRCA1/2 genes using NGS: our experience**

L. Costantino<sup>1</sup>, F. Mignone<sup>2</sup>, S. Salardi<sup>1</sup>, F. Grandi<sup>3</sup>, V. Prina<sup>1</sup>, M. Albanese<sup>1</sup>, G. Miano<sup>1</sup>, N. Yazdi<sup>1</sup>, B. Gentili<sup>1</sup>, F.E. Ferrara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Genetics Lab Centro Diagnostico Italiano (CDI) Milan, Italy

<sup>2</sup>Dept of Science and Innovation Technology (DISIT), University of Piemonte Orientale - Alessandria, Italy

<sup>3</sup>4bases SA Lugano, Swiss

**INTRODUCTION:** Next generation sequencing (NGS) is being increasingly applied for assisting cancer molecular diagnosis. Genetic testing of BRCA1/2 includes screening for single nucleotide variants and number variations (CNVs), primarily done by Sanger sequencing and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). However, it is still needed to validate NGS accuracy in detecting DNA alterations especially based on DNA rearrangements and CNVs.

**MATERIAL AND METHODS:** Twenty-six ovarian tissue samples and 319 blood samples for germline mutations have been tested to set up basic parameters and to validate NGS accuracy on detection of CNV. For library preparation we used the HR1 BRCA 1/2 CE-IVD kit (4bases SA) and libraries have been sequenced using a MiSeq NGS platform (Illumina). Data have been analyzed using the AmpliconSuite software (SmartSeq s.r.l.).

**RESULTS:** Among the 319 patients tested for germline mutations, 22 are relatives. Out of 295 patients, 34 were found with pathogenic mutations (11.5%), 1 carried a probably pathogenic mutation (0.3%), 38 carried VUS (variant of uncertain significance) (12.9%), 45 had a likely benign variant (15.3%), and 177 were negative patients (60%). Regarding the 26 samples tested for somatic mutations, 4 pathogenic mutations (15%) were found. We confirmed all positive samples reported by AmpliconSuite software with orthogonal techniques (Sanger sequencing), finding 100% of concordance. CNV NGS data compared to MLPA revealed a 100% of sensitivity whereas other analysis are necessary to establish a correct specificity.

**CONCLUSIONS:** Our study demonstrated that the workflow for the complete analysis of BRCA1 and BRCA2 genes has proved to be highly efficient and accurate for the detection of point mutations and indels by NGS. In addition the 100% of sensitivity method can significantly reduce the number of CNV negative samples avoiding MLPA. The correct pre-analytical phase, a robust methodology for sample preparation and sequencing, together with state of the art bioinformatics tools optimized for the data analysis, enabled the development of a very sensitive, highly reproducible, cost effective and time saving NGS testing procedure for routinely BRCA analysis.



**P132  
La sindrome di Li-Fraumeni: variabilità clinica e genetica in una coorte italiana**

E. Lucci Cordisco<sup>1</sup>, F. Brugnoletti<sup>1</sup>, S. Amenta<sup>1</sup>, A. Vaisfeld<sup>1</sup>, M. Calicchia<sup>1</sup>, M.G. Pomponi<sup>2</sup>, R. Pietrobono<sup>1</sup>, M. Genuardi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Medicina Genomica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

<sup>2</sup>UOC Genetica Medica, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Roma

La Sindrome di Li-Fraumeni (LFS), associata a varianti patogenetiche del gene TP53, è una condizione a trasmissione autosomica dominante caratterizzata da predisposizione allo sviluppo in età precoce di tumori. La sindrome può essere sospettata in presenza dei criteri di Chompret (CC): carcinoma mammario (CM) <31 anni; tumori multipli (TM) di cui 2, esclusi CM multipli, LFS-relati (sarcomi dei tessuti molli, osteosarcomi, tumore cerebrale, carcinoma polmonare, CM in pre-menopausa, leucemie) di cui uno in età <46 anni; carcinoma corticosurrenalico; tumore del plesso coroidale; rhabdomyosarcoma embrionale anaplastico; tumore LFS-relato diagnosticato <46 anni e storia familiare positiva per tumore LFS (eccetto CM se il probando ha CM) in età <56 anni o per tumori multipli (Bougeard et al. 2015). L'avvento di tecniche di NGS con utilizzo di pannelli multigenici ha ampliato lo spettro di pazienti sottoposti ad analisi del gene TP53 includendo anche soggetti non rispondenti ai criteri menzionati. Presso il nostro laboratorio abbiamo analizzato 109 probandi: 5 rispondenti ai CC, 14 con CM familiare, 18 con CM giovanile (<36 anni) (CMG), 37 con storia personale/familiare di TM e/o tumori rari (TR), 35 con sospetto cancro del colon-retto (CCR) ereditario. L'analisi di sequenza è stata condotta con metodo Sanger (64 campioni) o con tecnica NGS (45 campioni) su piattaforma Ion Torrent con un pannello custom che include altri geni di predisposizione a neoplasie. Le varianti sono state classificate secondo raccomandazioni ACMG-AMP, con l'aggiunta di un criterio basato sul riscontro come mutazioni puramente somatiche in tessuti neoplastici. Nei casi negativi, l'analisi è stata integrata con ricerca di riarrangiamenti sbilanciati mediante MLPA. Sono state identificate 5 varianti patogenetiche. Sono state inoltre identificate 2 varianti di incerto significato, 1 in una paziente con CMG e 1 in paziente con TM non LFS-relati (basaliomi, cancro della prostata e del pancreas). Lo spettro fenotipico è risultato eterogeneo, con riscontro anche di neoplasie finora non associate a varianti costituzionali di TP53. I dati presentati mostrano l'ampia variabilità fenotipica della sindrome di Li-Fraumeni e la necessità di rivedere ulteriormente i criteri di accesso al test genetico e di definire ulteriormente il fenotipo clinico associato al fine di applicare adeguati protocolli di sorveglianza.

Bibliografia: Bougeard et al. J Clin Oncol. 2015; 33:2345-52.





**P133**  
**Large genomic duplication in BRCA2 gene: a case report using fast detection with a sole NGS approach**

F. Stamone<sup>1,2,7</sup>, M. Nunziato<sup>1,3,7</sup>, B. Lombardo<sup>1,2</sup>, M. Pensabene<sup>4</sup>, C. Condello<sup>4</sup>, F. Verdesca<sup>1,2</sup>, C. Carlomagno<sup>5</sup>, S. De Placido<sup>5</sup>, L. Pastore<sup>1,2</sup>, V. D'Argenio<sup>1,2,8</sup>, F. Salvatore<sup>1,2,6,8</sup>

<sup>1</sup>CEINGE-Biotecnologie Avanzate, via Gaetano Salvatore 486, 80145 Naples, Italy.

<sup>2</sup>Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University of Naples "Federico II", via Sergio Pansini 5, 80131 Naples, Italy.

<sup>3</sup>Department of Movement Sciences and Wellness (DiSMEB), University of Naples Parthenope, via Medina 40, 80133 Naples, Italy.

<sup>4</sup>Oncology Division, Department of Clinical Medicine and Surgery, University of Naples "Federico II", Naples, Italy.

<sup>5</sup>Department of Clinical Medicine and Surgery, University of Naples "Federico II", Naples - Italy.

<sup>6</sup>IRCCS-Fondazione SDN, via Emanuele Gianturco 113, 80143 Naples, Italy.

<sup>7</sup>Co-first authors

<sup>8</sup>\*\*Co-corresponding authors

Large genomic rearrangements (LGRs), including deletions, duplications or insertions larger than 500kb, have been identified in the BRCA genes, with an epidemiological frequency between 0 and 28% depending on the population analyzed [1,2]. These mutations appear to be more frequent in the BRCA1 gene, but still underestimated. The case report described aims to evaluate the effectiveness of a next generation sequencing (NGS)-based unique approach to detect all possible BRCA mutations, including large genomic rearrangements (LGRs). Genomic DNA was obtained from a peripheral blood sample provided by a patient from Southern Italy with early onset breast cancer and a family history of different cancers attending the Oncology Division (3rd level center), University of Naples, Federico II. BRCA molecular screening analysis was performed by our approach to use Multiplicom NGS assay sequenced by Illumina MiSeq platform. Sequence data was then analyzed using two software packages JSI SeqPilot and Sophia Genetics. Comparative genomic hybridization (CGH) array was also used to because of the large rearrangement found. A novel large duplication, including exons 4-26, of BRCA2 gene was directly detected in the patient by NGS sole approach including quantitative analysis of copy number variants. The duplication observed was also found by CGH array, thus confirming its large extent. Large genomic rearrangements can affect the BRCA1/2 genes, and thus contribute to germline predisposition to familial breast and ovarian cancers. Because of technical limitations the frequency of these mutations could be underestimated, while their evaluation should be included in the molecular testing. The NGS-based strategy described and constituted by the association of NGS procedure and a new software package more appropriate for quantitative gene analysis, is an effective procedure to screen the different kinds of BRCA genes mutations.

Reference:  
 1. Kwong A., et al. The importance of analysis of long-range rearrangement of BRCA1 and BRCA2 in genetic diagnosis of familial breast cancer. *Cancer Genet.* 2015;208:448-454.  
 2. Sluiter MD, et al. Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125:325-349.

**P134**  
**Alterazioni monoalleliche del gene PMS2 in una casistica di pazienti con sospetto clinico di tumori ereditari**

L. Leccese<sup>1</sup>, M.G. Pomponi<sup>2</sup>, R. Pietrobono<sup>1</sup>, L. Remondini<sup>2</sup>, M. Calicchia<sup>1</sup>, E. Lucci Cordisco<sup>1</sup>, M. Genuardi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Medicina Genomica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma.

<sup>2</sup>UOC Genetica Medica, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Roma

PMS2, codificante una proteina del sistema del mismatch repair, è uno dei geni responsabili della Sindrome di Lynch. Nel genoma umano è presente un elevato numero di pseudogeni (14), che rende difficoltosa la sua analisi. Attualmente, il fenotipo associato a varianti monoalleliche appare caratterizzato da insorgenza di tumori dell'endometrio e/o carcinoma coloretale (CCR) in età avanzata e bassa penetranza. L'avvento di tecniche di NGS utilizzando pannelli multigenici ha ampliato lo spettro di pazienti sottoposti ad analisi del gene includendo anche soggetti con quadro clinico non suggestivo. Nel nostro studio sono stati analizzati 74 pazienti: 71 mediante piattaforma Ion Torrent PGM con un pannello comprendente i geni MUTYH, MSH2, MSH6, MLH1, APC, BMPRI1A, PTEN, POLE, CDH1, TP53, SMAD4, STK11, e POLD1; e 3 mediante sequenziamento diretto dopo amplificazione con PCR Long-Range gene-specifica in seguito al riscontro di mancata espressione della proteina nel tumore. Le varianti identificate sono state classificate dal punto di vista clinico secondo le linee guida InSiGHT. Nei casi negativi, l'analisi è stata integrata con ricerca di riarrangiamenti sbilanciati mediante MLPA. In 4 pazienti sono state identificate alterazioni costituzionali nel solo gene PMS2, di cui 2 patogenetiche e 2 di significato clinico incerto; 3 individui presentavano CCR giovanile o cancro dell'endometrio e 1 CCR diagnosticato a 69 anni. In 6 pazienti, le varianti PMS2, 1 patogenetica e 5 di incerto significato, sono risultate in associazione ad alterazioni probabilmente patogenetiche o di significato incerto nei geni POLE, TP53, MLH1 e PTEN. I pazienti presentavano tumori giovanili, anche multipli, con età media d'insorgenza a 43 anni, escluso il caso con variante nel gene PTEN. Dall'analisi della nostra casistica il fenotipo correlato a varianti patogenetiche del gene PMS2 sembra essere caratterizzato da insorgenza precoce della neoplasia, suggerendo la necessità di programmi di prevenzione in giovane età. Inoltre il nostro studio suggerisce che tale caratteristica potrebbe non essere associata ad alterazioni del solo gene PMS2, ma essere in parte spiegata dalla presenza di varianti in altri geni di predisposizione a tumori.

Bibliografia: Thompson et al. *Nat. Genetics* 2014, 46(2):107-115

**P135**  
**Deep RNAs Profiling in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Spinal Cord from Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients**

S. Gagliardi<sup>1</sup>, S. Zucca<sup>1</sup>, C. Pandini<sup>1,2</sup>, L. Diamanti<sup>2,3</sup>, M. Bordoni<sup>1,2</sup>, D. Sproviero<sup>1</sup>, M. Arigoni<sup>4</sup>, O. Pansarasa<sup>1</sup>, M. Ceroni<sup>2,3</sup>, R. Calogero<sup>4</sup>, C. Cereda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genomic and post-Genomic Center, C. Mondino National Neurological Institute, Pavia, Italy.

<sup>2</sup>Department of Brain and Behavioral Science, University of Pavia

<sup>3</sup>General Neurology, C. Mondino National Neurological Institute, Pavia, Italy

<sup>4</sup>Department of Molecular Biotechnology and Health Sciences, Bioinformatic and Genomic Unit, University of Turin

Background. Alteration in RNA metabolism, concerning both coding and long non coding RNAs (lncRNAs), may play an important role in Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) pathogenesis, an adult-onset, progressive and fatal neurodegenerative disease. Aims. In this work, we have first analyzed the regulation of lncRNAs in Sporadic ALS patients (SALS) and in matched controls in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and spinal cord tissues. Secondary, we have also analyzed the mRNA genes expression to have a large overview of RNAs deregulation regarding lnc and coding RNAs. Materials and Methods. RNAs have been extracted from PBMC of SALS and matched controls. RNA analysis has been performed by RNA-seq (TruSeq Stranded RNA Library Prep, Illumina) and differential expression analysis for mRNAs was performed using R package EBSeq. RNA-seq data has been validated in a large cohort of PBMC and in spinal cord samples by Real time PCR. Results. A total of 293 DE lncRNAs was found. 62,5 % of DE lncRNAs is up-regulated (N=183). 84 of these are reported as antisense, 81 as lncRNAs, while remaining 28 RNAs are classified as processed transcripts or intronic sense RNAs. Only 23 out of the 293 DE lncRNAs are described as known transcripts, already described in databases (eg: RefSeq), while remaining 270 transcripts are reported as novel (i.e.: transcripts that contain four or more exons and / or are supported by at least one). About mRNAs, the top 10 of DEG mRNAs showed a general trend of down-regulation related to transcription regulation, immunity and apoptosis pathways. Conclusions. This investigation has confirmed the importance of extending our knowledge on molecular alterations of transcriptome and, also, the significance of the classes of regulatory lncRNAs, especially antisense RNA, in ALS disease. Moreover, our data has evidenced the involvement of non-canonical pathways, such as cancer. Our data has brought the light on the importance of lncRNAs and mRNAs regulation in central and peripheral system, offering numerous starting points for new investigations about pathogenic mechanism involved in ALS disease.

**P136**  
**Genome-wide analysis of RNA-editing levels in human blood identified interactions with mRNA processing genes and suggested correlation with biological and drug-related variables**

E. Giacomuzzi<sup>1</sup>, M. Gennarelli<sup>1</sup>, A. Barbon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Medicina Molecolare e Traslazionale, Unit di genetica, Università degli Studi di Brescia, Brescia

RNA editing is a post-transcriptional modification catalyzed by ADARs, that deaminate specific Adenosines (A) into Inosine (I) on RNA. Most of known editing sites are located within inverted ALU repeats, but they also occur in coding sequences, where nucleotide change might result in missense substitutions, thus altering the function of encoded protein. RNA editing is now considered an important mechanism to generate transcriptomic diversity and editing alterations have been involved in cancer, autoimmune and neurological disorders. In order to investigate population variability in editing levels and the influence of genetic variations and gene expression on RNA editing process, we analyze RNA-seq data from 459 blood samples. Based on the RADAR database, we selected 2 million A-to-I sites in RefSeq genes, excluding positions showing variants in 1000G or ExAc 0.3 datasets, and obtained editing levels for 709,184 sites.

Only 2,078 sites had detectable editing levels in ≥ 100 subjects, suggesting that most sites are very low edited in blood and that RNA editing events may be tissue- or development-specific. Correlation between editing levels of the 2,078 sites showed that only close sites are co-regulated. Correlating editing data with gene expression levels revealed significant associations for 46 genes with per-subject global editing levels and 1,279 genes with single editing sites. Gene set enrichment analysis indicated that RNA processing and splicing could interact with RNA editing process. We investigated how genes associated with per-subject global editing may interact with ADAR enzymes by analysis of PPI networks. We found that identified genes were significantly enriched in interactions with ADARs, identifying 31 potential ADAR interactors. We also analyzed association between 82 biological and drug intake variables and editing levels principal components, revealing 11 external factors potentially influencing RNA editing in blood. Finally, we integrated genotyping array data with estimated editing levels to identify sites associated with editing level (editing QTLs, edQTLs). Our data provides a detailed picture of RNA editing and its variability in human blood, giving interesting insights on the mechanisms behind this post-transcriptional modification.







**P137**  
**Characterization of splicing mutations in urine derived podocytes-lineage cells: a new tool for investigate spliceogenic variations in COLIV genes**

A.M. Pinto<sup>1,2</sup>, S. Daga<sup>1</sup>, M. Baldassarri<sup>1,2</sup>, C. Lo Rizzo<sup>1,2</sup>, C. Fallerini<sup>1</sup>, E. Landucci<sup>1</sup>, V. Imperatore<sup>1</sup>, I. Longo<sup>1,2</sup>, E. Frullanti<sup>1</sup>, L. Massella<sup>3</sup>, C. Pecoraro<sup>4</sup>, G. Garosi<sup>5</sup>, F. Ariani<sup>1,2</sup>, M.A. Mencarelli<sup>1,2</sup>, F. Mari<sup>1,2</sup>, A. Renieri<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica, Universit degli Studi di Siena, Siena, Italia  
<sup>2</sup>Genetica Medica, A.O.U.S., Siena, Italia  
<sup>3</sup>Divisione di Nefrologia e Dialisi, Osp. Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Roma, Italia  
<sup>4</sup>U.O. di Nefrologia Pediatrica, Osp. Santobono-Pausilipon, Napoli, Italia  
<sup>5</sup>U.O. di Nefrologia, Dialisi e Trapianti, A.O.U.S., Siena, Italia

Alport syndrome (ATS) is a rare genetic disorder caused by mutations in COLIV genes, leading to ultrastructural lesions of the GBM up to end-stage renal disease. Podocytes, the main cellular component of the glomerulus, are the only cells able to produce the three collagens IV alpha chains and thus they are key-players in ATS pathogenesis; unfortunately, their anatomic localization makes isolation clinically invasive. In a totally non-invasive way we are able to isolate and grow podocytes-lineage cells from ATS patients urines. Expression analysis revealed, in all isolated cell lines, the COL4A3/A4/A5 expression, associated with the expression of Podoplanin, a marker involved in shaping of podocytes membrane. A further characterization has allowed us to observe PAX2, PAX8 transcription factors and Occludin (OCLN), indicating their early differentiation state. Among the possible mutations that cause ATS, splicing mutations are currently challenging to be interpreted from a prognostic point of view despite the support of NGS analysis. Canonically, splicing mutations +2/-2 give a definitely pathogenetic effect by altering the normal splicing process, although it's not possible to properly predict the final effect on protein. Moreover, other intronic mutations (e.g. +5 mutation) are even more challenging. By extracting mRNA from these innovative cells, we were able to define the effect of splicing mutations on protein s production. For example, analyzing a +2 mutation (c.1623+2T>A in COL4A4) in one of our families, we noticed that two splicing processes coexist resulting in two distinct truncated products. Vice-versa, an 8bp deletion covering the splicing site on COL4A4 (c.3699\_3706+1del) turned to be an in-frame mutation. Taking it into account our results, we strongly believe that the isolation of podocytes-lineage cells and consequent mRNA splicing analysis is a fundamental step forward in a better definition of the effect on protein. We highly suggest to routinely apply this analysis in addition to the NGS, aiming also to provide the family with a proper recurrence risk and prognosis.

**P138**  
**The role of KMT2C in osteosarcoma carcinogenesis**

C. Chiappetta<sup>1</sup>, C. Puggioni<sup>1</sup>, R. Carletti<sup>1</sup>, V. Petrozza<sup>1</sup>, C. Della Rocca<sup>1</sup>, C. Di Cristofano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sapienza, Universit di Roma, Dip. Scienze e biotecnologie medico-chirurgiche

Background: osteosarcoma (OS) is the most common paediatric primary non-hematopoietic bone tumor. Although the survival rate has improved considerably with neoadjuvant chemotherapy, metastatic disease still occurs in patients not responding to treatment. Indeed, the survival of these young patients is related to the response to chemotherapy and eventual development of metastases. OS has a complex karyotype and it is a so-called "orphan cancer" with no known driver oncogenes, so finding an effective targeted therapy is a tall order. In a previous WES analysis we found that most of the analysed samples showed alteration of KMT2C gene. It is an important component of a histone H3 lysine 4 methyltransferase complex and it is one of the histone modifiers previously implicated in other cancers. Alterations of KMT2C have never been studied in OS and this gene is implicated in the regulation of the p53 gene, which is frequently altered in OS. Objective of study was to understand the role of KMT2C in osteosarcoma carcinogenesis and progression to identify possible new strategies for early diagnosis and new therapeutic approaches.

Materials and methods: the population of this study included 57 diagnostic biopsies of patients with conventional high-grade OS with known clinic-pathological data. We performed the gene expression and immunohistochemically analysis of KMT2C. Moreover, we analysed the expression of genes involved in the metastatic pathway that they could be modulated by KMT2C using siRNA in four OS cell lines. Results: we found that KMT2C showed a nuclear and cytoplasmic localization and the KMT2C mRNA expression was correlated only with the nuclear localization (p<0,0001). Moreover, we found that some genes involved in the metastatic pathway were modulated after the KMT2C mRNA silencing in OS cell lines.

Conclusion: Our data suggest a possible role of KMT2C in carcinogenesis and progression of osteosarcoma. These data may be useful to identify new strategies for early diagnosis and new therapeutic approaches and to provide a tailored treatment for each patient based on their genetic profile.

**P139**  
**Target resequencing per la diagnosi di Discinesia Ciliare Primaria**

A. Michelucci<sup>1</sup>, A. Fogli<sup>1</sup>, F. Baldinotti<sup>1</sup>, C. Cosini<sup>1</sup>, F. Lembo<sup>1</sup>, R. Maltomini<sup>1</sup>, M. Piras<sup>2</sup>, M.E. Di Cicco<sup>2</sup>, M. Rizzo<sup>2</sup>, M.A. Caligo<sup>1</sup>, M. Pifferi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>S.D. Genetica Molecolare, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa  
<sup>2</sup>U.O. Pediatria, Sez. Pneumologia e Allergologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa

La Discinesia Ciliare Primaria (DCP) è una malattia respiratoria rara, eterogenea sia dal punto di vista clinico che genetico, caratterizzata da un deficit del trasporto muco-ciliare che è alla base delle manifestazioni respiratorie che la caratterizzano. Gli esami genetici non sono raccomandati come parte dei test diagnostici iniziali, ma devono essere eseguiti sulla base delle indicazioni fornite dall'esame ultrastrutturale e dall'analisi del movimento ciliare. La DCP è ereditata come carattere autosomico recessivo, ma non tutti i pazienti trovano conferma a livello molecolare anche se, ad oggi, sono descritti oltre 30 geni in cui sono state identificate mutazioni responsabili. Nel nostro laboratorio l'esame genetico veniva eseguito mediante sequenziamento Sanger su un numero ristretto di geni, con tempi lunghi e costi elevati. Per migliorare l'outcome diagnostico ed espandere lo spettro fenotipico dei geni noti, è stato messo a punto un pannello per l'analisi simultanea di 30 geni mediante tecnologia TruSeq Custom Amplicon su piattaforma Miseq Illumina, composto da 814 ampliconi e 185 kb di DNA target. Sono stati analizzati 73 pazienti con segni clinici di DCP e la conferma molecolare è stata raggiunta nel 74% dei casi. Le varianti sono distribuite in 18 geni diversi. I geni più frequentemente coinvolti sono: DNAH5 (33%), CCDC40 (17%), CCDC39 (7%), DNAI1 (6%), DNAAF3 (6%). Le varianti sono state identificate sia in eterozigosi (63%) che in omozigosi (37%). In totale sono state identificate 88 varianti, di cui 14 gi descritte e 74 nuove, così distribuite: 25 mutazioni di splicing, 21 nonsense, 20 missenso, 11 piccole delezioni, 9 piccole inserzioni e 2 grosse delezioni. In 12 pazienti è stata identificata una sola variante oppure le stesse varianti erano presenti in un genitore sano, per cui saranno necessari ulteriori approfondimenti per l'eventuale identificazione di altri tipi di varianti non identificabili con la tecnologia di sequenziamento (ampie delezioni e duplicazioni, mutazioni introniche profonde). Tali risultati preliminari confermano l'importanza della tecnologia NGS per implementare l'analisi mutazionale dei geni noti e determinare nuove correlazioni genotipo-fenotipo, con miglioramento della diagnosi e della consulenza genetica.



**P140**  
**Next Generation Sequencing e Sindrome di Legius**

E. Cali<sup>1</sup>, P. Failla<sup>2</sup>, M. Piccione<sup>3</sup>, D. Palazzo<sup>3</sup>, G. Ruggeri<sup>1</sup>, V. Chiavetta<sup>1</sup>, A. Ragalmuto<sup>1</sup>, R. Salluzzo<sup>1</sup>, R. Galati Rando<sup>1</sup>, M. Vinci<sup>1</sup>, C. Schepis<sup>4</sup>, C. Romano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UOS di Genetica Molecolare, UOC Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS Associazione Oasi Maria SS, Troina (EN)  
<sup>2</sup>UOC di Pediatria e Genetica Medica, IRCCS Associazione Oasi Maria SS, Troina (EN)  
<sup>3</sup>Azienda Ospedali Riuniti Villa Sofia-Cervello, Universit degli Studi di Palermo, Palermo  
<sup>4</sup>UOS di Dermatologia, IRCCS Associazione Oasi Maria SS, Troina (EN)

**Premessa**  
 I pazienti affetti da sindrome di Legius (SL) e da Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) si caratterizzano tipicamente per la presenza di macchie caffè-latte multiple; tuttavia, i primi non presentano noduli di Lisch, e altre anomalie quali gliomi dei nervi ottici, neurofibromi o altri tumori, che sono invece caratteristiche della NF1, e che appaiono solo durante l'adolescenza. La concomitante presenza di macchie caffè-latte e l'assenza di neurofibromi pu quindi creare difficoltà per una corretta diagnosi clinica soprattutto nella prima infanzia quando la sintomatologia della NF1 non è completamente espressa. L'analisi molecolare è quindi utile per escludere l'una o l'altra patologia ed una corretta diagnosi è essenziale a causa delle differenze nella prognosi e nel follow-up tra la SL e la NF1.

**Scopo dello Studio**  
 Valutare l'efficacia del test genetico in Next Generation Sequencing di analisi dei geni NF1 e SPRED1 nella diagnosi differenziale di pazienti con segni clinici compatibili sia con la diagnosi clinica di NF1 che di SL.

**Materiali e Metodi**  
 Il pannello dei geni analizzati (NF1, SPRED1) è stato disegnato utilizzando il software "Ion AmpliSeq Designer". L'analisi di sequenza è stata effettuata mediante tecnologia Ion Torrent PGM. Le varianti identificate sono state verificate mediante Sanger. Tale approccio è stato condotto su 97 pazienti italiani con segni clinici compatibili con entrambe le diagnosi (NF1 e SL).

**Risultati**  
 Nel campione di pazienti studiati, due sono risultati affetti da varianti di SPRED1 che conducono ad una proteina tronca non funzionale. I rimanenti 95 presentavano varianti patogenetiche di NF1.

**Conclusioni**  
 La metodica utilizzata nel presente studio ha consentito di identificare due pazienti con SL che sarebbero sfuggiti alla diagnosi con un approccio limitato all'analisi del gene NF1.





**P141**  
**Impatto diagnostico della analisi Whole Exome Sequencing in pazienti con malattie neuromuscolari: risultati di Unife nell'ambito del progetto europeo Neuromics**

M. Neri<sup>1</sup>, C. Scotton<sup>1</sup>, R. Selvatici<sup>1</sup>, F. Gualandini<sup>1</sup>, B. Wirth<sup>2</sup>, L. Schols<sup>3</sup>, T. Klockgether<sup>4</sup>, H. Lochmuller<sup>5</sup>, F. Muntoni<sup>6</sup>, A. D'Amico<sup>7</sup>, E. Bertini<sup>7</sup>, M. Pane<sup>8</sup>, E. Mercunì<sup>9</sup>, A. Ferlini<sup>1</sup>

- <sup>1</sup>Medical Genetics Unit, Department of Medical Sciences, University of Ferrara
- <sup>2</sup>Institute of Human Genetics, Institute for Genetics and Center for Molecular Medicine of The University of Cologne
- <sup>3</sup>Department of Diagnostic and Interventional Neuroradiology, University Hospital Tbingen
- <sup>4</sup>Department of Neurology, University of Bonn, and German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE), Bonn
- <sup>5</sup>MRC Centre for Neuromuscular Diseases, Institute of Genetic Medicine, Newcastle University
- <sup>6</sup>Dubowitz Neuromuscular Centre, University College London, Institute of Child Health, London
- <sup>7</sup>Unit of Neuromuscular and Neurodegenerative Diseases, Department of Neurosciences, Bambino Gesù Children's Hospital, Rome
- <sup>8</sup>Neuropsychiatry Unit, Catholic University, Policlinico Gemelli, Rome, Italy

**PREMESSA:** L'eterogeneità genetica delle patologie neuromuscolari rende la caratterizzazione molecolare di questi pazienti difficile e laboriosa e alla fine di un iter diagnostico lungo e dispendioso una elevata percentuale rimane orfana di un inquadramento clinico-genetico. **SCOPO DELLO STUDIO:** Per incrementare la definizione diagnostica di pazienti con patologie neuromuscolari rare abbiamo utilizzato un approccio mediante sequenziamento massivo dell'esoma (WES). Le analisi sono state effettuate nell'ambito del progetto europeo Neuromics. **MATERIALI E METODI:** Analisi WES è stata effettuata su DNA estratto da sangue in 6 famiglie di quattro e 2 trios. Il fenotipo clinico dei pazienti era: miopatia congenita/distrofia muscolare (n.3), paraparesi spastica (n.1), atassia (n.2), miopatia miofibrillare (n.1) e distrofia dei cingoli associata a difetto di conduzione cardiaca (n.1). I dati sono stati filtrati in base alla frequenza allelica, al tipo di mutazione e a diverse modalità di trasmissione in base all'albero familiare. **RISULTATI:** In 3 famiglie abbiamo identificato mutazioni in 3 geni noti (RYR1, ISPD e STIM1) causativi della patologia; in due pazienti sono stati individuate mutazioni in 2 nuovi geni malattia, POPDC1 e MSTO1, già validati funzionalmente. Nelle rimanenti tre famiglie sono stati selezionati 2 geni candidati SARS2 e MMP8 e sono in corso di studio le validazioni cliniche. Infine in una famiglia l'analisi ha evidenziato una eterozigosi composta in un gene nuovo, non descritto come associato alla patologia ed è in corso la validazione funzionale delle mutazioni. **CONCLUSIONI** L'analisi WES ha permesso di definire la causa molecolare della patologia in 5 pazienti su 8 cioè in più del 60% dei casi studiati. In due famiglie è stato identificato un nuovo gene malattia, validato da studi funzionali e in una famiglia è in corso lo studio del gene candidato.

**P142**  
**Identification of novel and hotspot mutations in the channel domain of ITPR1 in two patients with Gillespie syndrome**

S. BARRESI<sup>1</sup>, M.L. DENTICI<sup>2</sup>, M. NARDELLA<sup>3</sup>, E. BELLACCHIO<sup>4</sup>, P. ALFIERI<sup>5</sup>, A. BRUSSELLES<sup>6</sup>, F. PANTALEONI<sup>1</sup>, A. DANIELI<sup>7</sup>, G. IAROSSE<sup>8</sup>, M. CAPPA<sup>9</sup>, E. BERTINI<sup>5</sup>, M. TARTAGLIA<sup>1</sup>, G. ZANNI<sup>3</sup>

- <sup>1</sup>Molecular Genetics and Functional Genomics, Genetics and Rare Diseases Research Division, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy
- <sup>2</sup>Medical Genetics, Genetics and Rare Diseases Research Division, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy
- <sup>3</sup>Unit of Neuromuscular and Neurodegenerative Disorders, Dep. of Neurosciences, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy
- <sup>4</sup>Research Laboratories, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy
- <sup>5</sup>Child Neuropsychiatry, Dep. of Neurosciences, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy
- <sup>6</sup>Dep. of Hematology, Oncology and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy
- <sup>7</sup>Unit of Epilepsy and Clinical Neurophysiology, IRCCS E. Medea-Conegliano, Italy
- <sup>8</sup>Dep. of Ophthalmology, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy
- <sup>9</sup>Endocrinology, Dep. of Pediatrics, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy

ITPR1 encodes an intracellular receptor for inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP<sub>3</sub>) which is highly expressed in the cerebellum and is involved in the regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis. Missense mutations in the InsP<sub>3</sub>-binding domain (IRBIT) of ITPR1 are frequently associated with early onset cerebellar atrophy. Gillespie syndrome is characterized by congenital ataxia, mild to moderate intellectual disability and iris hypoplasia. Dominant or recessive ITPR1 mutations have been recently associated with this form of syndromic ataxia. We used trio-based whole-genome sequencing (WES) or targeted re-sequencing, in two patients with congenital ataxia, psychomotor delay and iris hypoplasia in which aniridia causing PAX6 and FOXC1 genes were excluded by previous screening. We identified de novo pathological mutations localized in the C-terminal channel domain of ITPR1 in both patients: a recurrent deletion (p.Lys2596del) and a novel missense mutation (p.Asn2576Ile) close to a point of constriction in the Ca<sup>2+</sup> pore. Our study expands the mutational and clinical spectrum of ITPR1-related congenital ataxia and confirms that screening of ITPR1 and other genes involved in Ca<sup>2+</sup> homeostasis should be implemented in patients with early-onset ataxia with or without iris hypoplasia.



**P143**  
**Identificazione di nuove varianti in pazienti affetti da sindrome di Noonan negativi all'analisi genetica convenzionale**

I. Monterosso<sup>1</sup>, L. Ferrari<sup>1</sup>, E. Mangano<sup>2</sup>, M.T. Bonati<sup>3</sup>, I. Brambilla<sup>4</sup>, C. Battaglia<sup>1</sup>, R. Bordoni<sup>2</sup>, P. Riva<sup>1</sup>

- <sup>1</sup>Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milano
- <sup>2</sup>Istituto di Tecnologie Biomediche, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Segrate (Milano)
- <sup>3</sup>Clinica di Genetica Medica, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano
- <sup>4</sup>Dipartimento di Pediatria, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

La Sindrome di Noonan (SN) ha un'incidenza di 1:1000-2500 e presenta espressività variabile di specifici segni clinici fra cui facies tipica, bassa statura, difetti cardiaci congeniti, ritardo dello sviluppo. È una RASopatia caratterizzata da trasmissione autosomica-dominante di mutazioni in più geni del pathway di RAS. Nonostante siano noti diversi geni implicati nella SN, il 30% dei pazienti affetti resta senza diagnosi molecolare. Inoltre l'elevata eterogeneità allelica e di locus non spiegano l'espressività variabile che si manifesta anche nei casi familiari. Pertanto sia nuovi geni SN che nuovi meccanismi patogenetici sono attesi e quindi da identificare. A tale scopo è stata condotta un'analisi mediante NGS in seguito al disegno di un pannello custom che include 26 geni, fra cui quelli associati alle RASopatie, compresi i più recentemente associati a SN (RIT1, RRAS, RASA2, A2ML1, SOS2 e LZTR1) e geni appartenenti al pathway RAS, ma finora mai associati a RASopatie. Sono stati studiati i campioni di nove pazienti NS negativi allo screening genetico convenzionale. In quattro pazienti sono state identificate nuove varianti a probabile significato patogenetico: c.T355C (p.Y119H) in LZTR1 (ex.4) osservata de novo nel probando pz43, c.A2882G (p.D961G) in A2ML1 (ex.24) in pz56, ma riscontrata anche in entrambi i genitori consanguinei e nella sorella non affetti. Le mutazioni c.A329C (p.K110T) in A2ML1 (ex.3) e c.C2224T (p.Q742X) in SOS2 (ex.14) rilevate nel probando pz63, entrambe in eterozigosi, sono state osservate anche nella madre e in una sorella non affette. Due pazienti presentano una mutazione a probabile significato patogenetico in un nuovo gene appartenente al pathway di RAS candidato per SN. I restanti tre pazienti negativi allo screening NGS non hanno mostrato CNVs in seguito ad analisi mediante a-CGH. Nei casi con SN familiare e fenotipo clinico con diversa gravità, nei casi di ereditarietà della mutazione da familiari non affetti e nei pazienti portatori di varianti nel nuovo gene candidato SN verranno studiate l'espressione differenziale allelica del gene mutato e sarà effettuata l'analisi dell'esoma al fine di verificare la presenza di varianti in più geni del pathway di RAS o di altri pathway correlati.

**P144**  
**Design and MinION testing of a nanopore sequencing specific gene panel for chronic lymphocytic leukemia**

P. Orsini<sup>1</sup>, C.F. Minervini<sup>1</sup>, C. Cumbo<sup>1</sup>, L. Anelli<sup>1</sup>, A. Zagaria<sup>1</sup>, A. Minervini<sup>1</sup>, N. Cocco<sup>1</sup>, G. Tota<sup>1</sup>, P. Casieri<sup>1</sup>, L. Impera<sup>1</sup>, C. Brunetti<sup>1</sup>, E. Parciante<sup>1</sup>, A.M. Giordano<sup>1</sup>, G. Specchia<sup>1</sup>, F. Albano<sup>1</sup>

- <sup>1</sup>Sez. di Ematologia con Trapianto Dip. dell'Emergenza e dei Trapianti di Organi Università degli studi di Bari A. Moro

MinION is a single-molecule nanopore sequencer from Oxford Nanopore Technologies connected to a laptop through a USB 3.0 interface. Sequencing is performed by the moving of individual DNA strands through biologic nanopores on a chip, where an electric field is applied and electrical signal variations are recorded. In this study, we used multiplex long PCR-based strategy followed by MinION sequencing to identify single nucleotide variations (SNV) and insertions/deletions (indels) in 5 frequently mutated genes in Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): TP53, NOTCH1, BIRC3, SF3B1 and MYD88. For this purpose, we designed a custom gene panel consisting of 7 primers pairs in 2 pools, with a total panel size of 15kb. We selected 10 CLL patients according to the presence of the most frequent cytogenetic and molecular features, which are clinical parameters significantly associated with the mutational status of the genes of our panel. Two healthy donors were also analyzed and used as background to filter out sequencing artifacts in CLL samples. Data analysis included mapping to GRCh37 human reference genome, variant calling, removal of the SNV and indels shared by at least one healthy donor, and variant filtering/prioritization. The sequencing depth was always above 50X, with a coverage of 100% for all the targets. The error rate was on average 6% and 2% for indels and SNV respectively. Overall, 8 pathogenic mutations were detected in 6 patients, with 2 patients harboring concurrently 2 mutations: 6 SNV and 2 indels. The lowest mutation allelic ratio was around 10%. All variants were validated by Sanger Sequencing (SS) or Allele-Specific Oligonucleotide PCR assay. In summary, our gene panel allows a rapid analysis of the prognostically relevant genes in CLL, with just 2 PCRs per patient. Amplification strategy followed by MinION sequencing offers a rapid, easy and affordable workflow of analysis compared to SS or the common Next Generation Sequencing (NGS) platforms, even if it is still not ready to substitute the other NGS technologies because of its error proneness. Anyway, the rapid and constant improvements of nanopore technology promise an exclusive and convenient use of MinION in the next future.





**P145**  
**L'High throughput sequencing si dimostra un metodo efficace per la diagnosi differenziale delle tubulopatie con perdita di sale**

V. Palazzo<sup>1</sup>, A. Provenzano<sup>1</sup>, S. Landini<sup>1</sup>, P. Reho<sup>1</sup>, R. Artuso<sup>2</sup>, L. Giunti<sup>2</sup>, M. Pantaleo<sup>2</sup>, S. Guarducci<sup>2</sup>, B. Mazzinghi<sup>3</sup>, F. Becherucci<sup>3</sup>, G. Sansavini<sup>3</sup>, S. Bargiacchi<sup>2</sup>, F. Peluso<sup>1</sup>, S. Ciabattoni<sup>1</sup>, A. Pagliuzzi<sup>1</sup>, D. Laura<sup>2</sup>, G. Traficante<sup>2</sup>, M. Della Monica<sup>2</sup>, E. Andreucci<sup>2</sup>, P. Romagnani<sup>1,3</sup>, S. Giglio<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Università degli Studi di Firenze, Firenze

<sup>2</sup>SOC Genetica Media AOU Meyer, Firenze

<sup>3</sup>SOC Nefrologia AOU Meyer, Firenze

Abbiamo studiato una coorte composta da 31 soggetti con diagnosi clinica di sindrome di Bartter (SB), sindrome di Gitelman (SG) o con fenotipo Bartter-like. Questi disordini rappresentano rare tubulopatie, determinate da difetti nel riassorbimento dei soluti nel tratto spesso dell'ansa di Henle (TAL) e/o nel tubulo contorto distale (TDC). Seppur caratterizzate da disfunzioni localizzate in compartimenti differenti del tubulo, queste sindromi presentano manifestazioni cliniche sovrapponibili, che rendono difficile la diagnosi differenziale. Da un punto di vista genetico sono state identificate cinque distinti tipi di SB, associate alla presenza di varianti nei geni SLC12A1, KCNJ1, CLCNKB, BSND e MAGED2, codificanti per proteine coinvolte nel riassorbimento dei soluti a livello del TAL. Una forma digenica della SB è inoltre dovuta alla presenza di mutazioni da perdita di funzione nei geni CLCNKA e CLCNKB. Infine, anche mutazioni attivanti nel gene CASR sono state descritte in associazione a un quadro clinico Bartter-like. Al contrario, la SG è dovuta alla presenza di mutazioni inattivanti nel gene SLC12A3, espresso TDC. Dato il complesso network molecolare alla base del riassorbimento tubulare, è evidente come l'uso di tecniche di sequenziamento Next Generation Sequencing (NSG) rappresenti un approccio fondamentale sia in ambito diagnostico che di ricerca. Nel nostro studio abbiamo anche analizzato i pazienti mediante array-CGH, al fine di identificare la presenza di riarrangiamenti genomici. In questo modo siamo stati in grado di diagnosticare in modo esatto e veloce la specifica proteina coinvolta nel fenotipo perdita di sali anche nei casi in cui la diagnosi clinica tra i diversi tipi di disordini non era immediata. Infatti i sintomi della SB e SG spesso si sovrappongono, rendendo vani i primi tentativi di terapia. Questo studio ha inoltre permesso di identificare nuove mutazioni patogenetiche, tra cui una nuova variante associata alla sindrome di Bartter di tipo IVb in un soggetto con quadro clinico che differiva dai casi precedentemente descritti. Inoltre rari casi di eredità digenica, al momento non sospettati e non riportati in letteratura, possono mascherare altri tipi di tubulopatie rendendo completamente inefficaci i classici trattamenti terapeutici.

**P146**  
**Whole Genome Sequencing in malattie neuromuscolari: l'esperienza UNIFE all'interno del progetto Neuromics**

R. Selvatici<sup>1</sup>, M. Neri<sup>1</sup>, C. Scotton<sup>1</sup>, P. Rimessi<sup>1</sup>, A. Venturoli<sup>1</sup>, M. Taddei Masieri<sup>1</sup>, B. Dolcini<sup>1</sup>, M.S. Falzarano<sup>1</sup>, A. Armadori<sup>1</sup>, R. Rossi<sup>1</sup>, F. Gualandi<sup>1</sup>, S. Fini<sup>1</sup>, A. Ferlini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O. Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Mediche, Università degli Studi di Ferrara, Italia

Le malattie neuromuscolari (NMD) sono un gruppo di malattie rare causate da difetti nei muscoli, nei motoneuroni, nella giunzione neuromuscolare e nei nervi, caratterizzate da eterogeneità genetica e clinica. Una grande percentuale di pazienti con NMD rimane orfana di una diagnosi genetica. Nell'ambito del progetto europeo Neuromics abbiamo studiato pazienti con fenotipi neuromuscolari complessi utilizzando il sequenziamento massivo del genoma (WGS) per identificare il difetto genetico e migliorare la correlazione genotipo-fenotipo. In una paziente con distrofia muscolare l'analisi ha identificato una eterozigosi composta per due mutazioni missenso nel gene PLEC, portando alla diagnosi di distrofia dei cingoli LGMD2Q. In due fratelli con distrofia muscolare dei cingoli l'analisi ha rivelato una eterozigosi composta nel gene CAPN3 portando alla diagnosi di distrofia dei cingoli LGMD2A. In due pazienti con artrogriposi congenita l'analisi ha identificato una piccola delezione nel gene PRG4. Mutazioni PRG4 sono causative della sindrome Camptodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis (CACP). Sono in corso studi di validazione. In una paziente con atassia complicata da paraparesi spastica l'analisi ha identificato due mutazioni missenso nei geni SPG7 e KIF5A. I genitori sani sono risultati portatori pertanto l'eterozigosi composta nella paziente è predetta essere causa della patologia. In una paziente con atassia e distonia l'analisi ha individuato variazioni in pochi geni candidati; le variazioni sono state filtrate in base all'eredità della malattia, alla classe di patogenicità e alle loro funzioni e le variazioni identificate sono in corso di validazione. **CONCLUSIONI:** L'approccio WGS ha permesso la caratterizzazione molecolare in pazienti orfani di diagnosi ampliando lo spettro fenotipico di patologie complesse.

**P147**  
**La conoscenza genomica come principale arma nella lotta contro l'obesità**

R. Artuso<sup>1</sup>, V. Palazzo<sup>2</sup>, L. Giunti<sup>1</sup>, S. Landini<sup>2</sup>, A. Provenzano<sup>2</sup>, A. La Barbera<sup>1</sup>, S. Guarducci<sup>1</sup>, M. Pantaleo<sup>1</sup>, B. Lucherini<sup>1</sup>, S. Bargiacchi<sup>1</sup>, F. Peluso<sup>2</sup>, S. Ciabattoni<sup>2</sup>, A. Pagliuzzi<sup>2</sup>, L. Dosa<sup>1</sup>, G. Traficante<sup>1</sup>, L. Xumerle<sup>3</sup>, S. Stagi<sup>4</sup>, S. Giglio<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>SOC Genetica Media AOU Meyer, Firenze

<sup>2</sup>Dip. di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Università degli Studi di Firenze, Firenze

<sup>3</sup>Dip. di Biotecnologie, Università degli Studi di Verona

<sup>4</sup>Auxoendocrinologia, AOU Meyer, Firenze

L'obesità, patologia multifattoriale con estrema eterogeneità genetica, caratterizzata da un eccessivo accumulo di grasso corporeo, è il risultato dello squilibrio tra l'energia immagazzinata e quella spesa, e dipende dall'interazione di fattori biologici, ambientali e comportamentali. Rappresenta un grave problema di salute pubblica essendo associata allo sviluppo di malattie croniche come DT2, ipertensione, dislipidemie e iperinsulinemia. Nonostante siano state identificate rare forme monogeniche e diversi geni e regioni di suscettibilità, le cause genetiche sono ancora largamente sconosciute, sebbene sia indiscutibile il ruolo del background genetico. Al fine di espandere le conoscenze sulla eziopatogenesi, abbiamo analizzato 20 pazienti con obesità ad insorgenza precoce e clinicamente ben caratterizzati. Sono stati analizzati un set di 80 geni selezionati tra quelli responsabili di forme sindromiche e monogeniche, quelli di suscettibilità e presenti nei pathways molecolari noti per lo sviluppo della patologia. In questo studio pilota abbiamo identificato varianti potenzialmente patogenetiche nell'80% dei casi. In particolare 5 presentavano 1 variante in geni non precedentemente associati strettamente a obesità, ma correlati all'aumento del BMI e waist to hip ratio. Negli altri casi sono presenti mutazioni in 2 o più geni e in 3 pazienti una delle varianti interessava geni del pathway ipotalamico leptina-melancortina. Questo approccio ha avuto importanti ricadute terapeutiche in una paziente con storia familiare di diabete, steatosi epatica e grave obesità in cui, in seguito all'identificazione di una variante potenzialmente patogenetica in SH2B1, il cambiamento del piano terapeutico mirato ha portato a significativa perdita di peso. I risultati di questo studio hanno permesso di aumentare le conoscenze dei meccanismi molecolari coinvolti nella regolazione del peso corporeo e di pianificare trattamenti personalizzati alla luce del background genetico. La scoperta sistematica di varianti genetiche associate a malattie complesse, sta avanzando a tal punto che la reverse strategy si dimostra essere fruttuosa nell'assegnare gli effetti patogenetici di diversi geni simultaneamente: l'approccio genotype-first potrà identificare fenotipi clinicamente riconoscibili.



**P148**  
**A rare case of pediatric cardiomyopathy: gene panel or whole exome?**

L. Pezzoli<sup>1</sup>, D. Marchetti<sup>1</sup>, A. Cereda<sup>2</sup>, A. Scatigno<sup>3</sup>, L. Perego<sup>1</sup>, A.R. Lincosso<sup>1</sup>, L. Pezzani<sup>1</sup>, C. Marrone<sup>4</sup>, M. Iascone<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab. di Genetica Medica, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

<sup>2</sup>Pediatria, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

<sup>3</sup>Centro per la diagnosi e il trattamento della cardiomiopatia ipertrofica, Policlinico di Monza

<sup>4</sup>Cardiologia Pediatrica, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

We report on a 3-months-old female patient referred to our laboratory from pediatric cardiology unit for genetic testing of cardiomyopathy genes. She presented at birth a mild left ventricular hypertrophy and dilation with apical non-compaction and mild mitral valve insufficiency. Right ventricular function and volumetry were normal. No other anomalies were reported and metabolic diseases were excluded. Family history was silent for cardiac and genetic diseases. No pathogenic mutations were identified in a panel of 174 cardiovascular genes. At 6 months of life clinical condition worsened to severe left ventricular dysfunction with a foamy appearance of the myocardium. After clinical genetic evaluation, monolateral anterior segment dysgenesis, microphthalmia and aplasia cutis were noticed and a trio-based whole exome analysis (WES) was requested. Anterior segment dysgenesis, microphthalmia, oncocytic cardiomyopathy were the Human Phenotype Ontology terms used for variant filtering. Only variants with a minor allele frequency <0.001% and with an effect on transcript and protein were retained for further investigation, based on de novo and autosomal recessive inheritance models. With this strategy, a de novo variant (NM\_005333.4:c.522-12G>A) in HCCS gene was identified, predicted to create a new splice-site 12 bases upstream of the canonical acceptor site of exon 6. RNA was extracted from peripheral blood lymphocytes and cDNA sequencing confirmed that the mutation creates a new reading frame which ends in a stop codon 3 positions downstream (p.Ala174fs). HCCS gene is associated to Microphthalmia with Linear Skin Defects Syndrome, a rare dominant X-linked disease with only 14 cases reported. Typical findings are ocular and skin abnormalities; other malformations and developmental delay can be present. Cardiomyopathy is a minor diagnostic criteria for this syndrome, observed in less than 24% of patients with a wide spectrum of severity. Our patient is now 4-years-old and is waiting for heart transplant with an implanted ventricular assist device. In our experience, pediatric cardiomyopathies are extremely heterogeneous conditions, quite different from adult-onset forms, that require an unbiased WES approach and a careful clinical evaluation for prompt diagnosis.







**P149**  
**Stroke cerebrale pediatrico: ricerca di cause genetiche tramite Next Generation Sequencing e studio della correlazione genotipo-fenotipo**

A. Grossi<sup>1</sup>, M. Bertamino<sup>2</sup>, M. Severino<sup>3</sup>, M. Rusmini<sup>1</sup>, F. Caroli<sup>1</sup>, R. Ravazzolo<sup>1</sup>, M. Di Rocco<sup>4</sup>, I. Ceccherini<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>U.O.C. Genetica Medica, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova  
<sup>2</sup>U.O.S.D. Centro Ematologia e Patologie della coagulazione, emostasi clinica e di laboratorio, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova  
<sup>3</sup>U.O.C. Neuroradiologia, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova  
<sup>4</sup>U.O.S.D. Malattie Rare, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova

L'Arterial Ischemic Stroke (AIS) è una sindrome clinica caratterizzata dalla presenza di un deficit neurologico riferibile all'evidenza neuroradiologica di una lesione ischemica. Data l'incidenza di 2-13 casi su 100.000 bambini/anno, AIS è causa di importante morbidità e mortalità, con rischio di recidiva fino al 20%. Fra i fattori di rischio dell'AIS pediatrico si conoscono alcuni disordini genetici ad ereditarietà mendeliana, con bassa prevalenza ma alto rischio di ictus.

Lo scopo dello studio è valutare l'incidenza di specifiche sindromi genetiche in pazienti pediatrici affetti da AIS e determinare la correlazione genotipo-fenotipo.

Mediante l'approccio del Next Generation Sequencing abbiamo sviluppato un pannello di geni responsabili per disordini mendeliani che possono presentare stroke cerebrale e che comprende ABCC6, ELN, COL4A1 (costituenti la tonaca intima), ACTA2, PCNT (la tonaca media), GLA (la avventizia); SAMHD1, GLUT10, ATP7A, NF1 (causa di risposta aberrante a un danno di parete); NOTCH3, JAG1, HTRA1, SLC2A10 (responsabili di un'alterata omeostasi vascolare); CECR1 (associato a un meccanismo autoinfiammatorio). Le librerie per il target selezionato sono state processate tramite Ion Torrent PGM™ (ThermoFisher) e i dati FastQ analizzati con Ion Reporter 5.0.

Il pannello include la regione codificante dei 15 geni selezionati, divisi in 441 ampliconi per un target totale di 140.63Kb (corrispondente al 97,6% dell'input). Le varianti chiamate da 34 pazienti sono state filtrate (MAF ≤ 5% in 1000Genomes, dbSNP; predizione di impatto sulla funzionalità della proteina tramite i software Sift e Polyphen; coverage della variante) e validate tramite sequenziamento Sanger. Due pazienti sono risultati portatori di varianti sicuramente patogenetiche: una de novo nel gene COL4A1 (c.2132G>A; p.Gly711Glu) e una eterozigosi composta nel gene ABCC6 (c.2900G>A; p.Trp967Ter + c.4182\_4182delG; p.Lys1394fs).

Allo scopo di aumentare il tasso di identificazione di mutazioni causative, il suddetto pannello è stato ampliato a circa 100 geni. Inoltre, alcuni dei pazienti rimasti senza diagnosi molecolare sono stati sottoposti a Whole Exome Sequencing. Questo ha consentito di identificare nuovi geni e pathways responsabili dello stroke pediatrico.

**P150**  
**Gene panel mutation screening for a better molecular stratification of colorectal cancer patients**

F. Belardinelli<sup>1</sup>, C. Capalbo<sup>1</sup>, P. Pisapia<sup>2</sup>, U. Malapelle<sup>2</sup>, D. Raimondo<sup>1</sup>, M. Colella<sup>1</sup>, M. Petroni<sup>1</sup>, V. Colicchia<sup>1</sup>, A. Nicolussi<sup>3</sup>, V. Valentini<sup>1</sup>, V. Magri<sup>4</sup>, S. Verkhovskaia<sup>4</sup>, S. Mezi<sup>4</sup>, F. Longo<sup>4</sup>, A. Prete<sup>4</sup>, E. Cortesi<sup>4</sup>, G. Troncone<sup>2</sup>, A. Coppa<sup>3</sup>, G. Giannini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Medicine, University La Sapienza, Rome, Italy

<sup>2</sup>Department of Public Health, University of Naples Federico II, Naples, Italy

<sup>3</sup>Department of Experimental Medicine, University La Sapienza, Rome, Italy

<sup>4</sup>Department of Medical Oncology, Policlinico Umberto I "Sapienza" University of Rome, Italy

Colorectal carcinoma (CRC) is one of the most commonly diagnosed cancers worldwide. The metastatic disease contributes to the high mortality rate reported for such tumors. Significant benefit on overall survival was brought about the introduction of monoclonal antibodies anti-EGFR and anti-VEGF used in combination with chemotherapy in metastatic CRC (mCRC). While anti-VEGF treatment does not require biomarker-based selection criteria, the potential efficacy of anti-EGFR antibodies is neglected to patients with activating mutations in KRAS and NRAS (RAS) genes, whose molecular analysis became a clinical routine.

The advent of Next Generation Sequencing (NGS) instruments, able to reach quick testing of multiple clinically-relevant hotspots, yet maintaining precision and low costs, allows the simultaneous determination of the mutation status of an expanding number of genes. Despite only few of these molecular biomarkers have gained clinical utility in the routine oncological practice, the acquisition of more complex cancer mutational patterns may provide more efficient tumor characterization for prognostic and predictive purposes and highlight actionable targets.

We sequenced 639 mCRC samples by IT-PGM platform using a panel of hotspots and targeted regions of 22 genes (including RAS) commonly involved in CRCs. MSI analyses on 89 patients have been performed with a single fluorescent system comprising BAT25 and BAT26 mononucleotide repeats. We identified recurrent mutations (≥1%) in 12/22 genes, being KRAS, TP53 and PIK3CA the most frequently mutated ones. Statistical analysis, indicated that the mutation associations follow a non-random distribution. Categorization of the cases on the base of KRAS and p53 mutation status led us the definition of 4 Mutation Association Patterns (MAP1-4) characterized by specific mutation associations. Analysis of the clinicopathological data available for 89 out of 639 cases indicates interesting trends for the associations of MAP1-4 with specific parameters, some of which reached statistical significance.

Application of NGS gene panel as a routine for the characterization of RAS/BRAF status required for predictive purposes in CRC patients, may provide additional prognostic/predictive information, with no significant extra-costs.

**P151**  
**TP53 gene mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia: single laboratory experience**

R. Asproni<sup>1</sup>, G. Piras<sup>1</sup>, A. Uras<sup>1</sup>, N. Marziliano<sup>2</sup>, A.D. Palmas<sup>1</sup>, R. Murru<sup>3</sup>, S. Bonfigli<sup>4</sup>, G. Latte<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio specialistico di Ematologia, UOC Ematologia, Ospedale San Francesco, ASSL Nuoro, Azienda Tutela della Salute Sardegna

<sup>2</sup>UOC Cardiologia, Ospedale San Francesco, ASSL Nuoro, Azienda Tutela della Salute Sardegna

<sup>3</sup>SC Ematologia e CTMO, Ospedale Oncologico A. Businco, AO Brotzu, Cagliari

<sup>4</sup>Istituto Ematologia, Azienda Ospedaliera Universitaria di Sassari

Background. Deletions of the short arm of chromosome 17 and/or mutations of the TP53 gene represent a strong adverse prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia (CLL) for patient survival and predict resistance to conventional treatments. Integrated diagnostic CLL workflow in our laboratory includes morphology, cytometry analysis, cytogenetic workup, IGHV and TP53 mutational status analysis. Here we presented the results of the consecutive analysis of the TP53 mutational status in a real-life cohort of sardinian patients according to the European Research Initiative on CLL (ERIC) recommendations.

Material and Methods: A total of 96 DNA extracted from peripheral blood of CLL patients has been analyzed for TP53 gene mutations. Sixty-eight DNAs were Sanger sequenced according to IARC TP53 protocol. Exons 4-11, including splicing sites, has been covered in the analysis. The remaining 28 DNAs were massive parallel sequenced on in-house Ion PGM platform using an amplicon community TP53 gene panel for (1.28kb-24 amplicons). Genomic variants were identified by Variant Caller V5.0.4.0 and further filtered and analysed with a validated pipeline within Ion Reporter 5.2.

Results: Twenty out of 96 DNA resulted harboring TP53 mutation (20,8%). Missense mutations predominated in 71% (15/20) of cases compared with deletions and insertions (2/20), nonsense (1/20) and splice site (2/20) mutations. Considered the hotspot regions of TP53 in CLL, exons 5-8 harbored the detected mutations. TP53 mutations were detected in 5 CLL with a known del(17p), 8 patients with 13q14 deletion and in 6 cases that resulted negative at 4-probe prognostic factor FISH panel analysis. Three patients had solely subclonal mutations below 10% allelic burden.

Conclusions: Mutational analysis of the TP53 status at the moment of (or after the) first line treatment or at CLL relapse is of considerable importance in order to plan the best treatment option for the patient with the novel inhibitors. NGS analysis allows to identify cases of CLL that carry a low frequency TP53 subclones as these patients represent the greatest challenge to clinicians to decide the most appropriate course of treatment.



**P152**  
**An automated guidelines-based approach for variants pathogenicity assessment in the diagnosis of genetic cardiovascular diseases**

I. Limongelli<sup>1</sup>, G. Nicora<sup>2</sup>, P. Gambelli<sup>4</sup>, M. Memmi<sup>4</sup>, C. Napolitano<sup>4</sup>, A. Malovini<sup>3</sup>, A. Mazzanti<sup>4</sup>, S. Priori<sup>4</sup>, R. Bellazzi<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>enGenome srl, via Ferrara 5, Pavia, Italy

<sup>2</sup>Department of Electrical, Computer and Biomedical Engineering, University of Pavia, Pavia, Italy

<sup>3</sup>Laboratory of Informatics and Systems Engineering for Clinical Research, Istituti Clinici Scientifici Maugeri, 27100, Pavia, Italy

<sup>4</sup>Molecular Cardiology, IRCCS Istituti Clinici Scientifici Maugeri, Pavia, Italy

Background  
 ACMG/AMP guidelines establish a set of rules to reduce the number of uncertain genomic variants (VUS) in clinical routine. However, these criteria need to be interpreted or adjusted accordingly to specific diseases of interest, such as cardiovascular diseases (CVDs).

Aim of the Study  
 An assessment of these guidelines has not yet been conducted for CVDs and neither exists a specialized tool that can easily support their fast implementation.

Materials and Methods  
 We designed a systematic approach to classify variants according to ACMG/AMP guidelines, developing the Variant Interpreter software (eVAI). ACMG/AMP criteria were implemented based on data integration of different omics-resources such as ClinVar, MedGen, ExAC, PaPI. Other criteria were tailored to CVDs: an example is the determination of specific genomic hotspot regions such as the amino-terminal propeptide domain of DSG2 gene, where an overrepresentation of missense mutations has been observed in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (PID 21636032). We then collected two benchmark datasets: CardioDB (<http://cardiodb.org/>) with well-assessed CVDs-pathogenic variants and CLINVITAE (<http://clinvitae.invitae.com>) that gathers clinically-observed benign/pathogenic variants related to a broader set of genetic diseases.

Results  
 In CardioDB we report a concordance of about 84.9%(79/93) for pathogenic variants. On the same data, we ran another tool, InterVar, showing a variants pathogenicity concordance of about 24.7%(23/93). In CLINVITAE, eVAI achieves a concordance of about 76.2%(4310/5651) for pathogenic variants and 88.5%(7499/8472) for benign ones, while InterVar shows a pathogenicity and benign concordance of about 35.4%(2004/5651) and 85.9%(7281/8472) respectively.

Conclusions  
 We implemented an automated approach (eVAI) to evaluate genomic variants and further specialized it for CVDs diagnosis. We tested eVAI on benchmark datasets reporting an high concordance both for pathogenic and benign variants. We compared eVAI to InterVar reporting a VUS reduction of about 80% and 45.3% in CardioDB and CLINVITAE respectively. Finally, we ran eVAI on 72 CVDs-related genes and created CardioVAI (<http://cardiovai.engenome.com>), a freely-accessible web-application to interpret every possible missense variants in CVDs genes.





**P153  
Ricerca della variante genetica responsabile di una forma familiare di nefropatia a IgA**

C. Molinaro<sup>1</sup>, V. Consalvi<sup>1</sup>, A. Miullo<sup>1</sup>, C. Cesario<sup>2</sup>, S. Costanzi<sup>3</sup>, G. Vischini<sup>3</sup>, L. Bernardini<sup>2</sup>, G. Garbaro<sup>3</sup>, M. Genuardi<sup>1</sup>, F. Gurrieri<sup>1</sup>, E. Sangiorgi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Medicina Genomica, Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma, Italia.

<sup>2</sup>Istituto CSS-Mendel, Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Foggia, Italia.

<sup>3</sup>Divisione di Nefrologia e Dialisi, Ospedale Universitario Columbus-Gemelli, Roma, Italia.

La nefropatia a depositi di IgA (IgAN) è la forma di glomerulonefrite più diffusa al mondo con un'incidenza di 1/4.000 individui. È caratterizzata dall'associazione di episodi ricorrenti di proteinuria e di ematuria con la presenza di depositi di IgA nel mesangio dei glomeruli renali. La maggior parte dei casi sono sporadici mentre circa il 10% sono familiari a trasmissione autosomica dominante e penetranza incompleta. Finora sono stati descritti diversi loci di predisposizione all'IgAN, alcuni identificati da studi di associazione su pazienti sporadici, localizzati sui cromosomi 1, 6, 8, 16, 17 e 22, altri da studi familiari sui cromosomi 2, 4, 6, 13, 17. Questa estrema eterogeneità sottolinea come l'IgAN sia una malattia con un'architettura genetica complessa ed eterogenea che interagisce con una componente ambientale. In questo lavoro è stata studiata una grande famiglia italiana affetta da IgAN, in cui la malattia segrega con modalità autosomica dominante e penetranza incompleta. L'analisi è stata eseguita tramite studio di linkage mediante SNP-array e analisi esomica con lo scopo di individuare la regione genomica e la variante genica responsabile della patologia. Le uniche regioni che segregano in tutti gli affetti della famiglia sono localizzate sul cromosoma 4 e precisamente negli intervalli dalla posizione nucleotidica 112.265.274 a 121.774.765 e dalla posizione 145.260.245 a 177.797.227. Questo risultato conferma il coinvolgimento del cromosoma 4 nell'IgAN, già identificato nel 2006 in uno studio di linkage condotto su 22 famiglie italiane. Interessante è sottolineare come in queste regioni siano presenti diversi geni potenzialmente coinvolti nella patogenesi dell'IgAN tra cui il TLR2, che codifica una proteina fondamentale per il riconoscimento dei patogeni e per l'attivazione dell'immunità innata, già implicata nella patogenesi di diverse malattie autoimmuni sistemiche. L'analisi bioinformatica delle varianti in questi geni è tuttora in corso. Questi dati pongono le basi per l'identificazione della variante patogenetica causativa dell'IgAN in questa famiglia.

**P154  
CEP57 Mosaic Variegated Aneuploidy: expanding the phenotypic spectrum**

L. Pezzani<sup>1</sup>, A. Cereda<sup>2</sup>, L. Pezzoli<sup>1</sup>, B. Facchinetti<sup>1</sup>, D. Marchetti<sup>1</sup>, A.R. Lincesso<sup>1</sup>, L. Perego<sup>1</sup>, I. Pelliccioli<sup>4</sup>, G. Mangili<sup>3</sup>, U. Giussani<sup>1</sup>, E. Bonanomi<sup>4</sup>, M. Iacone<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Medical Genetics, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy

<sup>3</sup> Neonatal Intensive Care Unit, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy

<sup>4</sup>Pediatric Intensive Care Unit, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy

We report on a 3 month old male patient with prenatal detection of IUGR, congenital heart malformation and short limbs born to a healthy and consanguineous Moroccan couple. At birth atrioventricular canal and aortic coarctation were confirmed. The boy showed high forehead with frontal bossing, hypertelorism, short neck, macrocephaly, rhizomelic shortening of the limbs, brachydactyly of hands and feet, rudimentary supernumerary preaxial right toe, one dorsal butterfly-shaped vertebra, supernumerary right rib, thinned corpus callosum, congenital hypothyroidism and recurrent respiratory infections; a diagnosis of skeletal dysplasia was suggested. Trio-based whole exome sequencing (WES) analysis identified a rare (MAF 0) homozygous nonsense mutation in CEP57 gene in the patient, while both parents resulted heterozygous carriers. Since CEP57 biallelic mutations are associated to Mosaic Variegated Aneuploidy (MVA), to confirm the diagnosis, cytogenetic analysis on blood cells was performed highlighting the presence of mosaicism for different aneuploidies (monosomies, trisomies, and tetraploidies). MVA is a genetically heterogeneous autosomal recessive disease caused by mutations of BUB1B, CEP57, and TRIP13 genes, all involved in the activation of spindle assembly checkpoint, that ensures accurate chromosome segregation and genomic stability. The presence of constitutional mosaic aneuploidies is the hallmark of the condition, while the related clinical phenotype varies according to the involved causal gene with childhood cancer predisposition reported for BUB1B and TRIP13 related MVA, but not for CEP57 variant. To date only 5 cases of CEP57-mutated MVA have been described, so our report allows to better outline the phenotype of a so rare condition, confirming that major clinical features are IUGR, growth delay, rhizomelic shortening of limbs, hypothyroidism, and heart anomalies. In addition our case shows some clinical features unreported previously (polydactyly and recurrent infections), then expanding the phenotypic spectrum of the syndrome. This report exemplifies the well-known role of WES as an unavoidable tool for the precocious diagnosis of very rare pediatric genetic disease when supported by deep clinical evaluation and complementary diagnostic analysis.



**P155  
NGS nella pratica clinica delle malattie genetiche renali**

S. Diella<sup>1</sup>, F. Lugani<sup>2</sup>, L. Santangelo<sup>3</sup>, F. Spadaccino<sup>1</sup>, C. Pecoraro<sup>4</sup>, D. Molino<sup>4</sup>, S. Chicca<sup>5</sup>, A. Iolascon<sup>6</sup>, G.M. Ghiggeni<sup>2</sup>, L. Massella<sup>7</sup>, L. Gesualdo<sup>3</sup>, G. Caridi<sup>2</sup>, M. Gigante<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical and Surgical Sciences, University of Foggia, Italy

<sup>2</sup>Laboratory of Nephrology Science, G. Gaslini Institute, Genoa, Italy

<sup>3</sup>Nephrology, Dialysis and Transplantation Unit, Dept. of Emergency and Organ Transplantation, University of Bari Aldo Moro, Italy

<sup>4</sup>Santobono Children's Hospital, Naples, Italy

<sup>5</sup>Nephrology and Dialysis, Sandro Pertini Hospital, Roma, Italy

<sup>6</sup>Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, "Federico II" University of Naples- CEINGE, Biotechnologie Avanzate, Naples, Italy

<sup>7</sup>Nephrology and Dialysis Unit, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy

**Premessa:**

I registri di Dialisi e Trapianto di tutti i Paesi riportano un'alta prevalenza di malattia renale terminale da cause non diagnosticate (dal 15 al 50%) ed è verosimile che diversi tipi di insufficienza renale cronica su base genetica rendano in parte ragione di tali percentuali.

**Scopo dello studio:**

Sviluppo di 3 differenti protocolli di Targeted NGS per l'analisi di geni associati a due gruppi di patologie renali geneticamente eterogenee: le glomerulopatie e le malattie cistiche ereditarie.

**Materiali e metodi:**

150 pazienti con glomerulopatia non responsiva ai trattamenti farmacologici, con età di esordio compresa tra 0 e 25 anni, sono stati analizzati con un pannello di 30 geni candidati; 212 pazienti pediatrici e adulti con sospetta malattia cistica (ADPKD, TSC, MCKD, ARPKD, Nefronoftisi) sono stati analizzati con due differenti protocolli, a seconda del sospetto clinico: i) Targeted NGS di un pannello custom di 20 geni candidati; ii) Long-Range PCR e Nextera XT (Illumina) della regione codificante dei geni PKD1 e PKD2 associati alla Malattia del Rene Policistico AD (ADPKD). Tutte le analisi sono state effettuate utilizzando MiSeq e vari tool bioinformatici (IGV Browser, SureCall, VariantStudio). Le varianti patogenetiche sono state confermate con Sanger, valutate in silico e dove possibile verificate per segregazione.

**Risultati:**

**GLOMERULOPATIE:** In 105/150 (70%) pazienti con sospetta glomerulopatia genetica non responsiva ai trattamenti farmacologici è stata identificata la causa genetica, nei restanti 45/150 (30%) non è stata identificata alcuna variante causativa. **MALATTIE CISTICHE:** In 153/196 (78%) probandi con sospetta ADPKD e in 12/16 (75%) pazienti con TSC, MCKD, ARPKD o nefronoftisi è stata confermata l'origine genetica; nei restanti casi di malattia cistica (47/212; 22%) non è stata identificata alcuna variante causativa.

**Conclusioni:**

L'utilizzo di differenti pannelli di Target NGS con un numero non elevato di geni ha garantito un coverage di almeno 100X delle regioni analizzate, consentendo di ottenere una detection rate del 70% nei casi di glomerulopatie e del 78%

nei pazienti con malattia cistica (le più alte ad oggi riportate), e di migliorare diagnosi, prognosi e counseling genetico di queste gravi patologie, in gran parte progressive fino all'insufficienza renale terminale.





**P156**  
**SLC9A3R1: a new gene involved in human age-related hearing loss (ARHL)**

A. Morgan<sup>1,2</sup>, M. Distazio<sup>1,2</sup>, M. La Bianca<sup>2</sup>, A. D'Eustacchio<sup>2</sup>, M. Brumat<sup>1,2</sup>, U. Ambrosetti<sup>3</sup>, P. Gasparini<sup>1,2</sup>, G. Giroto<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Università degli Studi di Trieste, Trieste

<sup>2</sup>IRCCS Burlo Garofolo, Trieste

<sup>3</sup>Università di Milano, U.O.C. Audiologia, Fondazione IRCCS C. Grandi Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

ARHL is the most common sensory disorder in the elderly due to the interplay of several environmental and genetic risk factors. In order to shed light on the genetics of ARHL, GWA studies in a large cohort of cases and controls (~2400) have been carried out, and Targeted Re-Sequencing (TRS) of 46 candidate genes was applied to 500 ARHL selected patients. TRS data were filtered according to quality value, allele frequency, pathogenicity, and conservation score. The most promising molecular results were then validated by either in vitro (expression vectors containing either the wild-type (wt) or the mutant cDNA) or in vivo studies (generation of zebrafish KI models). We identified several strong ARHL candidates and here we report a new ARHL gene named SLC9A3R1. An ultra-rare (MAF: 7,70E-05) missense variant in SLC9A3R1 was identified (c.539G>A, p.R180Q) in a 79 years old male patient. The variant was predicted as damaging by all the in silico predictor tools and not detected in 1071 controls. In vitro studies demonstrated that the variant does not affect protein stability, but, while the wt protein was detected only in the cytoplasm, the mutated one localized both in the cytoplasm and the nucleus. Gene expression was confirmed in both mouse and zebrafish inner ear, and a zebrafish KI model, using CRISPR-Cas9 technology, was generated. Startle response was used to measure the auditory function and Slc9a3r1<sup>-/-</sup> animals displayed a reduced auditory response along all frequencies compared to the Slc9a3r1<sup>+/+</sup> and Slc9a3r1<sup>+/+</sup>. Further phenotypic analysis demonstrated no gross anatomical abnormalities in the hair cells in terms of morphology, number of functional cells and planar orientation. Similarly, there were no differences in the amount of cells in the stato-acoustic ganglion between wt and mutant. However, a significant variation in the total volume of the otolith, a structure needed for the sensation of gravity, linear acceleration and sound, was observed in Slc9a3r1<sup>-/-</sup> compared to the wt. All these findings strongly support the role of SLC9A3R1 in the pathogenesis of ARHL in both humans and animal model. Other ARHL cases, coming from different populations, will be tested to understand the overall contribution of SLC9A3R1 to ARHL etiology.

**P157**  
**Rapid identification of pathogenic variants in neurofibromatosis disease by high throughput gene-panel sequencing**

L. Citrigno<sup>1</sup>, G. Gentile<sup>1</sup>, A. Pratic<sup>2</sup>, F.L. Conforti<sup>1</sup>, A. Magariello<sup>1</sup>, A. Patitucci<sup>1</sup>, S. Cavallaro<sup>1</sup>, M. Ruggieri<sup>2</sup>, M. Muglia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Neurological Sciences, CNR, Mangone (CS), Italy

<sup>2</sup>Section of Pediatrics and Child Neuropsychiatry, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Catania, Italy

**INTRODUCTION:** Neurofibromatosis (NF) is a group of three conditions characterized by tumors grow in the nervous system: neurofibromatosis type 1 (NF1), neurofibromatosis type 2 (NF2), and schwannomatosis. In NF1 the tumors are neurofibromas, while in NF2 and schwannomatosis tumors of Schwann cells are more common. All types are autosomal dominant disorders. **AIM:** Since the actual methods (Sanger sequencing, DHPLC) to diagnose NF disease is time and money consuming, especially for large genes such as NF1, we have developed a genetic panel to study either the genes responsible for the different types of the disease or genes associated with the disease. **MATERIALS AND METHODS:** We designed a genes panel using the Ion AmpliSeq Designer (Thermo Fisher Scientific) targeting the coding sequence comprising the intron/exon boundaries, of the following genes associated with NF phenotype: NF1, NF2, SMARCB1, LZRT1, COQ6 ad SUZ, reaching a target coverage of 99,8%. We analysed 25 patients, three of whom were NF1 positive controls and two negative controls. The amplicon libraries obtained by the Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific), were subsequently barcoded, pooled together in equimolar concentrations and enriched using the One Touch 2 instrument. Sequencing was performed on an Ion PGM machine using an Ion 318 sequencing chip. The obtained raw data were analysed with the Ion Torrent Suite 5.2 for the alignment. To annotate the variants the variant caller and ANNOVAR tools were used. **RESULTS:** We were able to obtain an output of about 6 million of reads which were aligned to 99,6% with the Human genome 19 (GRCh37/hg19), returning a mean depth of 1500X per samples. In addition to confirming the variants identified in the three controls, 11 variations were identified in the NF1 gene, all confirmed by Sanger sequencing. Interestingly, using such depth, we are also able to identify in a patient a NF1 mosaic variation. **CONCLUSIONS:** Using the NGS sequencing with an AmpliSeq approach, we were able to detect pathogenic variations in the NF1 gene. The NGS sequencing, respect to the standard technology such as Sanger sequencing, is less expensive and faster to analyze multiple genes in different patients at the same time. Furthermore, the NGS can be used to take over mosaic variations, difficult to find out by the standard methods.

**P158**  
**Utilizzo di un Pannello di Next-Generation Sequencing per l'identificazione di alterazioni in geni noti associati alla Sindrome Nefrosica Steroide-Resistente**

C. Mele<sup>1</sup>, A. Cremaschi<sup>1</sup>, M. Breno<sup>1</sup>, E. Bresin<sup>1</sup>, A. Benigni<sup>1</sup>, M. Noris<sup>1</sup>, G. Remuzzi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Bergamo

<sup>2</sup>Unit di Nefrologia e Dialisi, Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII, Bergamo

**Premessa.** La Sindrome Nefrosica (SN) è caratterizzata da un'alterata permeabilità glomerulare che si manifesta con proteinuria, ipoalbuminemia ed edemi. I quadri istologici più frequentemente osservati sono la Nefropatia a Lesioni Minime (NLM) e la Glomerulosclerosi Focale Segmentale (GSFS). I glucocorticoidi, che rappresentano la terapia d'elezione, non sono in grado di indurre remissione nel 10% dei pazienti con NLM e nel 60-80% di quelli con GSFS. Si parla in questo caso di SN steroide-resistente (SNSR). Ad oggi sono state identificate alterazioni in più di 50 geni che codificano per componenti della barriera di filtrazione glomerulare, che tuttavia spiegano l'insorgenza della malattia in una bassa percentuale di pazienti (30%). **Obiettivo.** Analizzare 37 geni noti associati a SNSR mediante un pannello di next-generation sequencing (NGS) per valutare la prevalenza di varianti patogenetiche in una coorte di pazienti reclutati attraverso il Registro per la SNSR coordinato dal Centro di Ricerche Cliniche per le Malattie Rare Aldo e Cele Dacc di Ranica. **Metodi.** Lo screening genetico è stato eseguito mediante sequenziamento massivo parallelo di ampliconi utilizzando la piattaforma NGS Ion Torrent. **Risultati.** Sono state identificate 24 varianti patogenetiche che spiegano l'insorgenza della malattia in 20 pazienti su 66 analizzati (30%), di cui 7 con storia familiare della malattia (su 17, 41%) e 13 sporadici (su 49, 26,5%). I geni coinvolti sono INF2, ARHGAP24, WT1, ANLN, NPHS2, ACTN4, CD2AP, MYO1E, APOL1, NPHS1, COL4A3, COL4A4 e COL4A5. Quindici pazienti sono portatori di varianti in eterozigosi ad eccezione di 4 con 2 varianti in eterozigosi composta e di 1 con una variante in omozigosi. Il 46% (16/35) dei pazienti con esordio giovanile (<18 anni) è portatore di varianti patogenetiche rispetto al 13% (4/31) dei casi ad esordio adulto (P<0.01). **Conclusioni.** I risultati di questo studio sono in linea con i dati pubblicati relativamente alla prevalenza di varianti identificate in pazienti con SNSR e all'età di esordio delle forme genetiche. L'applicazione del sequenziamento dell'esoma in pazienti non mutati permetterà l'identificazione di nuovi geni implicati nella SNSR e l'ampliamento delle conoscenze sulla patogenesi della malattia e la fisiologia del glomerulo.



**P159**  
**Mutazioni nei geni MYH7 e NEXN in una famiglia affetta da Miocardio non compatto**

C. Ciccacci<sup>1</sup>, A. Latini<sup>1</sup>, V. Ferradini<sup>1</sup>, M. Banci<sup>2</sup>, S. Piccirilli<sup>3</sup>, G. Novelli<sup>1</sup>, F. Sanguolo<sup>1</sup>, P. Borgiani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biomedicina e Prevenzione, Genetica Medica, Università degli Studi di Roma Tor Vergata

<sup>2</sup>Unit operativa di Cardiologia, Valmontone Hospital

<sup>3</sup>Uff. medico in SPE della Marina Militare

Il miocardio non compatto (MNC) è una rara forma di cardiomiopatia, determinata verosimilmente dall'arresto dell'evoluzione miocardica durante l'embriogenesi. Si caratterizza, dal punto di vista morfologico, per la presenza di numerose trabecolature e di profondi spazi intertrabecolari comunicanti tra loro e con la cavità ventricolare, prevalentemente nel ventricolo sinistro. Il MNC può esistere in forma isolata oppure essere associato ad altre patologie cardiache congenite. La manifestazione clinica è molto eterogenea. In questo studio descriviamo una famiglia in cui la madre e i due figli, un maschio e una femmina, presentano MNC associato a cardiomiopatia dilatativa secondaria. La diagnosi clinica di MNC è stata effettuata con ecocardiografia e confermata con risonanza magnetica nucleare. L'analisi genetica è stata effettuata tramite NGS con un pannello di 70 geni comunemente coinvolti nelle principali cardiomiopatie. Sono stati analizzati la madre e la figlia, entrambe affette, ed il padre sano. Sono state identificate due mutazioni nella madre e nella figlia: una nel gene MYH7, già associato con MNC e con altre cardiomiopatie, ed una nel gene NEXN. La mutazione in MYH7, consiste in un cambiamento Thr-> Ser, è già nota e descritta come probabilmente patologica. La mutazione nel gene NEXN non è descritta e causa un cambiamento Thr->Ile. Nello stesso codone è nota un'altra mutazione associata a cardiopatia ipertrofica. Non sono state descritte finora mutazioni nel gene NEXN associate con MNC. L'analisi di segregazione ha evidenziato la presenza delle due mutazioni anche nel figlio affetto e successivamente in altri due familiari affetti. Sono stati analizzati altri 5 soggetti sani della famiglia: solo in un soggetto sono state ritrovate entrambe le mutazioni, in 2 soggetti è stata riscontrata solo la mutazione nel gene NEXN e in 2 soggetti non è stata riscontrata alcuna mutazione. La presenza delle due mutazioni in 5 soggetti affetti sembra confermare che sono necessarie entrambe per avere il fenotipo affetto. L'assenza di malattia in un soggetto che presenta entrambe le mutazioni potrebbe indicare una penetranza incompleta. In tale soggetto sarà a breve effettuata una risonanza magnetica per verificare l'effettiva assenza della patologia.







P160

**Morte Cardiaca Improvvisa (MCI): Applicazione di un pannello NGS per la valutazione di pazienti con fenotipo clinico associato**

E. Morini<sup>1</sup>, V. Ferradini<sup>1</sup>, S. Luciano<sup>1</sup>, L. Marsili<sup>1</sup>, C. Conte<sup>2</sup>, I. Bagni<sup>2</sup>, S. Russo<sup>2</sup>, C. Ronci<sup>2</sup>, M. Bengala<sup>2</sup>, F. Brancati<sup>2</sup>, M.R. D'Apice<sup>2</sup>, R. Mango<sup>2</sup>, G. Novelli<sup>1,2</sup>, F. Amati<sup>1</sup>, F. Sangiuolo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dip. Di Biomedicina e Prevenzione, Università degli Studi di Roma Tor Vergata, Roma

<sup>2</sup>Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma

La Morte Cardiaca Improvvisa (MCI) è caratterizzata da una forte eterogeneità clinica e genetica. Diverse patologie genetiche che riguardano sia modificazioni strutturali del cuore come le Cardiomiopatie che alterazioni dei canali ionici cardiaci come le Canalopatie, sono importanti cause di MCI soprattutto nella popolazione di età inferiore ai 35 anni. In questi casi è molto importante individuare velocemente la variante genetica causa della malattia sia per confermare la diagnosi clinica che per la gestione precoce dei familiari a rischio. L'utilizzo della metodica di Next-Generation Sequencing (NGS) permette di analizzare simultaneamente un numero elevato di campioni per diversi geni. Negli ultimi due anni, nell'ambito del nostro ambulatorio di Cardiogenetica (Policlinico Tor Vergata) sono stati reclutati 70 pazienti provenienti da vari centri di Cardiologia. Di questi, 46 pazienti con familiarità e/o una clinica ben caratterizzata sono stati indirizzati verso un test genetico NGS utilizzando un pannello custom che include 70 geni. La piattaforma utilizzata è Ion Torrent S5 e l'analisi delle varianti è stata effettuata con due distinti software: Ion Reporter e Integrative Genome Viewer (IGV). Data la forte eterogeneità sia allelica che fenotipica della MCI, l'analisi viene effettuata sui geni più frequentemente associati alla patologia e, solo se necessario, estesa agli altri geni del pannello. Tale approccio ci permette di individuare la causa genetica anche in casi che in precedenza risultavano negativi. I risultati di questa nostra esperienza sono: 1. circa la metà dei casi (45%) risultano positivi in quanto presentano varianti classificate come patogenetiche o nuove mutazioni confermate tramite segregazione familiare. 2. il riscontro di un elevato numero di varianti classificate ad oggi come VUS (30%) e di polimorfismi descritti in letteratura come modulatori del fenotipo patogenetico. Quest'ultimo dato suggerisce la necessità di sviluppare ed ottimizzare l'utilizzo di banche dati di varianti condivise nonché l'allestimento di modelli cellulari di malattie specifici per definire con più accuratezza la patogenicità di queste varianti e quindi migliorare la precisione diagnostica dei test genetici per NGS.

P161

**From the clinical diagnosis of Baller-Gerold syndrome to the molecular diagnosis of Roberts syndrome using whole exome next generation sequencing**

E.A. Colombo<sup>1</sup>, L. Van Maldergem<sup>2</sup>, H. Mutlu<sup>3</sup>, Y. Shafeghati<sup>4</sup>, M. Balasar<sup>5</sup>, C. Gervasini<sup>1</sup>, D. Gentilini<sup>6</sup>, A.M. Di Blasio<sup>6</sup>, L. Larizza<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica, Dip. di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano, Milano

<sup>2</sup>Centre de génétique humaine CHU, Université de Franche-Comté, Besançon, France

<sup>3</sup>Necmettin Erbakan University, Meram Medical Faculty, Dept. of Pediatrics, Konya, Turkey

<sup>4</sup>Dept Med Genet, Sarem Women Hospital, University of Welfare, Science and Rehabilitation, Teheran, Iran

<sup>5</sup>Necmettin Erbakan University, Meram Medical Faculty, Dept. of Medical Genetics, Konya, Turkey

<sup>6</sup>Center of Research and Biomedical Technology, Istituto Auxologico Italiano IRCCS, Cusano Milanino

<sup>7</sup>Lab. of Cytogenetics and Molecular Genetics, Istituto Auxologico Italiano, Cusano Milanino

#### Introduction

Baller-Gerold (BGS, MIM#218600) and Roberts (RBS, MIM#268300) syndromes are autosomal recessive diseases caused respectively by allelic alterations in RECQL4 (MIM#603780), a guardian of the genome belonging to RecQ helicase family and ESCO2 (MIM#609353), encoding an acetyltransferase essential for sister chromatid cohesion.

In BGS, craniosynostosis and upper limb defects affecting radius and/or thumb represent the main manifestations but additional abnormalities may be present raising differential diagnosis with multi-spectrum developmental syndromes including RBS characterized by severe growth retardation, limbs and craniofacial abnormalities.

#### Aim

Identify the molecular lesions underpinning the BGS-suggestive phenotype of two young unrelated patients, to support clinical diagnosis and optimize follow-up.

#### Methods

Patients and parents DNAs were sequenced by Sanger to search RECQL4 mutations and then sift through whole exome sequencing (WES).

The first patient, a Turkish girl born to related parents, presents with short stature, intellectual disability, microcephaly due to craniosynostosis, facial telangiectasia, bilateral aplasia of radius and thumbs, tibia hypoplasia and pes equinovarus.

The second patient, an Iranian girl born to consanguineous parents, shows craniosynostosis, micrognathism, facial cutaneous alterations, bilateral aplasia of radius and thumbs and foot deformity.

#### Results

Upon negative RECQL4 test, WES analysis led to identify two different ESCO2 homozygous variants, both inherited from heterozygous carrier parents. The c.1131+1G>A transition affecting IVS6 donor splice site of the Turkish girl was demonstrated to cause exon 7 skipping and protein truncation in literature, while the unreported exon 3 c.417delA in the other patient predicts to give rise to a truncated dysfunctional protein. Premature centromere separation shown by C-banding is consistent with RBS diagnosis in the Turkish patient.

#### Conclusion

A proper diagnosis is the basis for optimized patient management/follow-up and family counselling.

The application of contemporary molecular genomics to patients with a phenotype straddling extremely rare syndromes such as BGS and RBS is a powerful tool to

reveal molecular pathogenesis and to yield intervention on patients and families.



P162

**Utilizzo della Next Generation Sequencing per la ricerca di mutazioni nel gene CFTR nella popolazione italiana**

V. Ferradini<sup>1</sup>, A. Luchetti<sup>1</sup>, I. Bagni<sup>2</sup>, C. Conte<sup>2</sup>, A. Botta<sup>1,2</sup>, M. Lucarelli<sup>3</sup>, V. Lucidi<sup>4</sup>, M.R. D'Apice<sup>2</sup>, G. Novelli<sup>1,2</sup>, F. Sangiuolo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biomedicina e Prevenzione, Università di Roma Tor Vergata, Roma

<sup>2</sup>Policlinico Universitario Tor Vergata, Roma

<sup>3</sup>Dip. di Biotecnologie Cellulari e Ematologia, Università Roma Sapienza, Roma

<sup>4</sup>Centro per la Fibrosi Cistica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

La Fibrosi Cistica (FC) è una patologia autosomica recessiva con incidenza alla nascita di 1 su 2500 nati vivi e una frequenza di eterozigoti nella popolazione italiana di 1 su 25-30. Mutazioni nel gene CFTR, responsabile della malattia, sono associate non solo alla forma classica della FC (MIM # 219700) ma anche ad altre patologie quali la Pancreatite Cronica Idiopatica (MIM # 167800), l'Atresia Congenita Bilaterale dei Dotti Deferenti (MIM # 277180), Azoospermia e Bronchiectasia non ostruttiva (MIM # 211400). In questo lavoro abbiamo messo a punto un sistema di sequenziamento NGS per CFTR che ci permette una rapida analisi del gene o soltanto di alcune regioni, in base alla richiesta clinica. Abbiamo analizzato l'intera regione codificante e le giunzioni esone-introne del gene CFTR in 250 campioni, di cui 57 campioni già sequenziati col metodo Sanger (49 positivi a mutazioni CFTR e 8 negativi). I campioni noti sono portatori di diversi tipi di mutazioni: missenso, nonsenso, delezioni più o meno grandi e mutazioni di splicing. L'analisi è stata effettuata mediante Next Generation Sequencing (NGS), su Ion Torrent PGML. L'utilizzo della metodica NGS ci ha permesso di identificare tutte le mutazioni già caratterizzate nei controlli e di ottenere una copertura del 100% del gene CFTR. L'analisi è stata effettuata utilizzando il software IGV (Integrative Genome Viewer) per verificare la copertura di ogni esone e il software Ion Reporter per valutare e classificare le diverse varianti. Per la valutazione delle varianti è stato utilizzato il database CFTR2. Il sistema da noi ottimizzato prevede anche la creazione di un file hotspot per l'identificazione di specifiche mutazioni note e già presenti nel database CFTR2, ma specialmente per grandi delezioni. Questo risulta particolarmente utile quando viene richiesto lo screening di mutazioni FC in partner di soggetti eterozigoti, in caso di fenotipi CFTR-like e in soggetti appartenenti ad etnie specifiche con frequenze alleliche diverse. Considerando la notevole eterogeneità sia allelica che fenotipica del gene CFTR questo metodo messo a punto nel nostro laboratorio ci permette di effettuare rapidamente lo screening del gene utilizzando un sistema versatile ed economico.





**P163**  
**Utilizzo della Next Generation Sequencing nell'analisi dei pazienti con Miotonia Congenita**

V. Ferradini<sup>1</sup>, M. Cassone<sup>1</sup>, S. Nuovo<sup>1</sup>, G. Longo<sup>1</sup>, I. Bagni<sup>2</sup>, A. Botta<sup>1,2</sup>, P. Sarchielli<sup>3</sup>, D. Murasecco<sup>3</sup>, M. Romoli<sup>3</sup>, E. Pasquini<sup>4</sup>, P. Prontera<sup>5</sup>, M.R. D'Apice<sup>2</sup>, G. Novelli<sup>1,2</sup>, F. Sangiuolo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biomedicina e Prevenzione, Università di Roma Tor Vergata, Roma

<sup>2</sup>Poliniclinico Universitario Tor Vergata, Roma

<sup>3</sup>Clinica Neurologica, Azienda Ospedaliera-Università di Perugia, Perugia

<sup>4</sup>Osp. Pediatrico Meyer, Firenze

<sup>5</sup>Centro di Riferimento Regionale di Genetica Medica, Azienda Ospedaliera di Perugia, Perugia

La Miotonia Congenita (MC; MIM #118425) è una rara malattia neuromuscolare caratterizzata dalla difficoltà di rilassare i muscoli dopo averli contratti volontariamente, rigidità muscolare, debolezza e muscolo ipertrofico. La malattia segrega come Miotonia Congenita di Thomsen (THD; MIM # 160800), ereditata come autosomica dominante e Miotonia Congenita di Becker (GM; MIM # 255700), ereditata come autosomica recessiva. Il gene responsabile di entrambe le patologie è CLCN1 in cui sono state identificate ad oggi oltre 130 mutazioni, di cui la maggior parte private a singoli nuclei familiari. La Next Generation Sequencing (NGS) analizza contemporaneamente più pazienti fornendo lo spettro delle varianti dell'intero gene. Ottenendo una risposta molecolare differenziale tra THD e GM, utile non solo per la valutazione clinica ma anche per l'analisi familiare. Abbiamo analizzato la regione codificante e le giunzioni esone-introne del gene CLCN1 in 40 pazienti. Per la validazione, i campioni già sequenziati col Sanger sono stati analizzati su NGS con la piattaforma Ion Torrent PGM. Altri 15 pazienti sono stati sequenziati direttamente su NGS. Inoltre abbiamo studiato 9 pazienti appartenenti a 3 famiglie originarie del Centro Italia (Perugia). La NGS ci ha consentito di identificare tutte le mutazioni in CLCN1 tranne quelle nell'esone 3, dimostrando una sensibilità del 96%. Le varianti sono distribuite lungo il gene ma sono preferenzialmente localizzate nei primi 10 esoni. Sono state identificate 6 nuove mutazioni (1 frameshift, 1 mutazione di splice, 4 mutazioni missenso), mentre 2 varianti localizzate nell'esone 3 non sono rilevate da NGS, a causa di una copertura incompleta. Per questo motivo in ciascun campione l'esone 3 è sequenziato col Sanger. Tutti i pazienti di Perugia hanno la mutazione F484L in eterozigosi. Confermando che F484L è una mutazione dominante con penetranza completa infatti l'età dell'insorgenza sembra essere uniforme nel primo decennio della vita, l'EMG rivela i caratteristici scarichi miotonici. E così emerge un evidente effetto fondatore nella popolazione Umbra per la mutazione F484L, come noto per altre mutazioni. I nostri risultati ampliano lo spettro delle mutazioni del gene CLCN1 e mostrano un nuovo approccio per l'analisi molecolare della MC.

**P164**  
**Identificazione di nuove varianti associate ad ipoacusia mediante l'uso del Targeted Resequencing**

E. Di Muro<sup>1,2</sup>, P. Palumbo<sup>1</sup>, M.P. Leone<sup>1,3</sup>, S. Castellana<sup>4</sup>, S. Melchionda<sup>1</sup>, M. Accadia<sup>1,5</sup>, R. Ortore<sup>6</sup>, T. Mazza<sup>4</sup>, R. Cocchi<sup>6</sup>, M. Castori<sup>1</sup>, M. Carella<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

<sup>2</sup>Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università degli Studi di Roma La Sapienza, Roma

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze del suolo, della pianta e degli alimenti, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari

<sup>4</sup>Unità di Bioinformatica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

<sup>5</sup>Servizio di Genetica Medica, Ospedale Cardinale G. Panico, Tricase (LE)

<sup>6</sup>Otorinolaringoiatria, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

L'ipoacusia (HL) rappresenta una delle più frequenti disabilità nei paesi industrializzati, con una incidenza di circa 1/500. Almeno l'80% di queste forme di perdita della capacità uditiva è attribuita a cause genetiche. La sordità ereditaria si distingue in forme sindromiche (SSHL), caratterizzate dalla presenza di manifestazioni cliniche a carico di altri apparati, e forme non sindromiche (NSHL), tipicamente neurosensoriali, ad esclusiva compromissione dell'apparato uditivo e per le quali la forma di trasmissione autosomica recessiva (ARNSHL) è la più frequente (75-80% dei casi). Si descrive lo studio effettuato su una casistica di 77 pazienti affetti da diversi gradi di sordità, al fine di individuare nuove varianti responsabili della patologia. Lo screening mutazionale dei pazienti è stato effettuato mediante sequenziamento di nuova generazione (NGS) di un pannello composto da 70 geni associati a forme di sordità sindromica e non sindromica, utilizzando un approccio Targeted Resequencing. Le varianti individuate sono state confermate mediante Sanger sequencing. Sono state identificate nuove varianti nei geni CDH23, EYA4, GJB2, LOXHD1, MYH14, MYO1A, MYO7A, MYO1C, SLC26A4, TMC1, TRIOBP ed TMPRSS3. I risultati del nostro studio confermano l'importanza dell'utilizzo di metodiche NGS per l'identificazione di nuove varianti causative in patologie caratterizzate da elevata eterogeneità genetica, come la sordità.



**P165**  
**Risultati di Whole Exome Sequencing per la diagnosi di casi eterogenei in una clinica pediatrica: l'esperienza della Unit di Genetica Medica presso l'AOU Meyer**

A. Provenzano<sup>1</sup>, A. La Barbera<sup>1</sup>, S. Landini<sup>1</sup>, V. Palazzo<sup>1</sup>, R. Artuso<sup>2</sup>, L. Giunti<sup>2</sup>, P. Reho<sup>1</sup>, E. Bosi<sup>1</sup>, L. Xumerle<sup>3</sup>, M. Garonzi<sup>3</sup>, A. Pagliuzzi<sup>2</sup>, F. Peluso<sup>2</sup>, S. Bargiacchi<sup>2</sup>, S. Ciabattini<sup>2</sup>, G. Traficante<sup>2</sup>, L. Dosa<sup>2</sup>, E. Andreucci<sup>2</sup>, B. Rinaldi<sup>2</sup>, S. Guarducci<sup>2</sup>, M. Pantaleo<sup>2</sup>, B. Lucherini<sup>2</sup>, I. Sani<sup>2</sup>, F. Becherucci<sup>4</sup>, P. Romagnani<sup>4</sup>, S. Stagi<sup>5</sup>, B. Giusti<sup>6</sup>, M. Delledonne<sup>3</sup>, A. Iolascon<sup>7</sup>, O. Zuffardi<sup>8</sup>, S. Giglio<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Unit di Genetica Medica, Dip. Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche Mario Serio, Università degli Studi di Firenze, Firenze

<sup>2</sup>SOC di Genetica Medica, AOU Meyer, Firenze

<sup>3</sup>Lab. Genomica Funzionale, Dip. Biotecnologie, Università degli Studi di Verona, Verona

<sup>4</sup>Nefrologia e Dialisi, AOU Meyer, Firenze

<sup>5</sup>Auxoendocrinologia, Dip. Medicina della salute, AOU Meyer, Firenze

<sup>6</sup>Malattie Aterotrombotiche, Dip. Medicina sperimentale clinica, Università di Firenze, Firenze

<sup>7</sup>Genetica Medica, Dip. Medicina molecolare e Biotecnologie mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

<sup>8</sup>Genetica Medica, Dip. Medicina molecolare, Università degli Studi di Pavia, Pavia

Ripetiamo la nostra esperienza e l'esito delle analisi di WES e WGS per la risoluzione di casi di pazienti giunti alla nostra osservazione o come primo accesso o con l'obiettivo, per quelli che avevano avuto più visite genetiche, di determinare la frequenza e le caratteristiche cliniche di casi in cui era stata segnalata più di una diagnosi. Abbiamo eseguito circa 400 analisi WES e 20 analisi di WGS su soggetti con differenti disordini, che abbiamo cercato di interpretare grazie ad un team con competenze multidisciplinari (genetisti clinici e specialisti in varie discipline cliniche, biologi, biotecnologi, bioinformatici). Questo studio prosegue dal 2015. Abbiamo deciso di analizzare in particolare soggetti affetti da patologie renali, inclusi tumori pediatrici, diabete MODY o di tipo 2, obesità familiare e sindromica, malformazioni cerebrali come Chiari tipo 1, tumori cerebrali pediatrici, cardiopatie e varie patologie con disabilità intellettiva isolata e/o sindromica. Considerando questo ultimo gruppo di varie patologie, tutti hanno ricevuto il referto, e nella maggior parte è stata data alla presenza del team multidisciplinare, con anche lo specialista clinico referente per la patologia di cui era principalmente affetto il paziente. Il costo medio per analisi è stato, per WES, 500 €. Dei 54 trios, siamo confidenti di avere raggiunto la diagnosi in più della metà dei casi, con una detection rate del 54%. Dei casi singoli, 15/21 hanno ricevuto la diagnosi. In alcuni casi, per chiarire dubbi e per una migliore interpretazione siamo riusciti ad effettuare prove funzionali. Abbiamo valutato il successo diagnostico in tutti quei casi in cui le varianti erano senza dubbio ascrivibili al fenotipo del paziente. Questa alta resa diagnostica si è raggiunta grazie ad un'accurata valutazione da parte del genetista clinico che, in collaborazione con il laboratorio, è riuscito ad incorporare approfonditi dati clinici e molecolari. Con questo lavoro valutiamo il beneficio clinico del WES come strumento diagnostico efficace, in particolare nei fenotipi non specifici o eterogenei. Raccomandiamo WES come primo approccio diagnostico in tutti i casi senza una diagnosi differenziale chiara, per facilitare l'inquadramento diagnostico e le successive cure personalizzate.

**P166**  
**Null mutations in DNAJC12 cause dopa-responsive non-progressive Parkinsonism**

L. Straniero<sup>1</sup>, I. Guella<sup>2</sup>, R. Cilia<sup>3</sup>, L. Parkkinen<sup>4</sup>, V. Rimoldi<sup>1,5</sup>, D. Facchi<sup>1</sup>, R. Asselta<sup>1,5</sup>, G. Sold<sup>1,5</sup>, A. Priori<sup>6</sup>, A. Rajput<sup>7</sup>, N. Blau<sup>8</sup>, G. Pezzoli<sup>3</sup>, M. Farrer<sup>2</sup>, S. Goldwurm<sup>3</sup>, A. Rajput<sup>1</sup>, S. Duga<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Dept of Biomedical Sciences, Humanitas University, Rozzano, Milan, Italy

<sup>2</sup>Centre for Applied Neurogenetics, University of British Columbia, Vancouver, Canada

<sup>3</sup>Parkinson Institute, ASST Gaetano Pini-CTO, Milan, Italy

<sup>4</sup>Nuffield Department of Clinical Neurosciences, Oxford Parkinson's Disease Centre, University of Oxford, UK

<sup>5</sup>Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano, Milan, Italy

<sup>6</sup>Dept of Health Sciences, Università degli Studi di Milano & Ospedale San Paolo, Milan, Italy

<sup>7</sup>Div of Neurology, Saskatchewan Movement Disorders Program, Univ of Saskatchewan, Royal Univ Hosp, Saskatoon, Canada

<sup>8</sup>Dietmar-Hopp-Metabolic Center, Dept of General Pediatrics, University Hospital, Heidelberg, Germany

Parkinsonisms are a heterogeneous group of neurological syndromes characterized clinically by tremor, hypokinesia, rigidity, and postural instability. Mutations in single genes explain <30% of familial parkinsonism. We looked for novel genes/variants using whole-exome sequencing (WES) in selected families showing early-onset (<45ys) recessive parkinsonism. Null homozygous mutations in DNAJC12, a member of the HSP40/DNAJ family, were identified in 2 unrelated families. In particular, we found a nonsense variant (c.187A>T, p.K63\*) in a Saskatchewan family (Family A) and a splicing variant (c.79-2A>G) in an Italian family (Family B). Both variants are absent in ethnically-matched controls and public databases. Very recently, biallelic mutations in the same gene were shown to cause hyperphenylalaninemia with dystonia and intellectual disability in children. Proband A had mild non-progressive parkinsonism from age 13ys and has since come to autopsy (at 74ys). Proband B (onset at 32ys) had a similar negligible progression of motor symptoms over 30ys, with mild executive and visuo-spatial dysfunction. Non-motor symptoms (sleep disturbances, anxiety/depression) were also present. In addition, blood phenylalanine levels were increased, as expected from defects in DNAJC12. Both probands had similar sustained symptomatic benefit on small dose of levodopa and substantial worsening of symptoms after levodopa discontinuation. Neuropathology (Proband A) revealed no alpha-synuclein pathology and substantia nigra depigmentation with moderate cell loss. RNA analysis demonstrated that c.79-2A>G causes exon-2 skipping, resulting in the frameshift mutation p.V27Wfs\*14. In both patients DNAJC12 mRNA levels were significantly reduced. Our results suggest that null mutations in DNAJC12 can present with dopa-responsive non-progressive parkinsonism in adulthood, thus broadening the clinical spectrum associated with DNAJC12 deficiency. Moreover, our findings led to adjust the Proband B therapy, including BH4 and serotonin precursors to the standard levodopa treatment, with a substantial amelioration of the non-motor symptoms. This study was supported by Fondazione Cariplo (grant#2015-1017).





**P167**  
**Una nuova variante nell'esone 7 del gene KAT6B associata a sindrome di Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson e sindrome genitopatellare: ulteriori evidenze dell'esistenza di un continuum nello spettro clinico dei disordini correlati a KAT6B**

G. Marangi<sup>1</sup>, M.C. Di Giacomo<sup>2</sup>, S. Lattante<sup>1</sup>, D. Orteschi<sup>1</sup>, S. Patrizi<sup>1</sup>, P.N. Doronzio<sup>1</sup>, F.N. Riviello<sup>2</sup>, A. Vaisfeld<sup>1</sup>, S. Frangella<sup>1</sup>, M. Zollino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Medicina Genomica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

<sup>2</sup>U.O.C Anatomia Patologica, AOR Ospedale "San Carlo", Potenza

Varianti nel gene KAT6B sono associate a sindrome di Say-Barber-Biesecker-Young-Simpson (SBBYSS/Ohdo) e a sindrome genitopatellare (GPS). In particolare, le varianti che causano la SBBYSS coinvolgono generalmente gli esoni 16-18 e agiscono mediante un meccanismo di aploinsufficienza; quelle che determinano la GPS sono invece troncanti, e ricorrenti nell'esone 18, associate ad un effetto dominante negativo. Descritte inizialmente come entità nosologicamente distinte, c'è preliminare evidenza che siano espressione di un continuum clinico correlato a KAT6B. Descriviamo una variante troncante nell'esone 7 di KAT6B, mai descritta in precedenza, in una ragazza di 8 anni che presentava caratteristiche cliniche tipiche della SBBYSS/Ohdo, in particolare i tipici dismorfismi facciali con aspetto facciale a maschera, naso a pera e blefarofimosi, oltre a ritardo psicomotorio, che hanno consentito di muovere il sospetto diagnostico su base clinica, ma anche anomalie scheletriche, incluse esostosi, più tipiche della GPS. Dopo sequenziamento Sanger degli esoni 16-18, la variante de novo c.1045\_1049delTTAAA, p.L349Afs\*9 nell'esone 7 del gene KAT6B è stata individuata tramite focused exome sequencing, e confermata in Sanger. Varianti nei primi esoni del gene KAT6B sono state descritte in associazione a fenotipo atipico e sensibilmente più lieve, ma non nella nostra paziente. Il presente caso è presentato anche per sottolineare il ruolo della genetica clinica nei confronti dei seguenti aspetti: 1) tramite array-CGH, si era individuata la delezione dei primi due esoni nel gene KANSL1 in 17q21.31, possibilmente compatibile con sindrome da aploinsufficienza di KANSL1; tale diagnosi è stata esclusa geneticamente (polimorfismo) e clinicamente; 2) si conferma l'esistenza di un continuum tra SBBYSS/Ohdo e GPS, suggerendo la definizione di KAT6B-related disorders contro definizioni sindromiche parcellari e pletoriche di sigle; 3) la diagnosi corretta, e la più efficiente procedura diagnostica, è stata possibile tramite analisi integrata del fenotipo e del genotipo.

**P168**  
**Diagnosi di pazienti con presentazione clinica suggestiva per Cornelia de Lange mediante pannello multigenico che include geni per sindromi da disregolazione della cromatina con fenotipo in parziale sovrapposizione**

S. Russo<sup>1</sup>, D. Milani<sup>2</sup>, E. Mainini<sup>1</sup>, A. Smarrazzo<sup>4</sup>, D. Melis<sup>4</sup>, A. Selicorni<sup>4</sup>, S. Maitz<sup>5</sup>, C. Pantaleone<sup>6</sup>, E. Alfei<sup>7</sup>, M. Masciadri<sup>1</sup>, L. Larizza<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lab di Citogenetica e Genetica Molecolare, Istituto Auxologico Italiano, I.R.C.C.S., Milano

<sup>2</sup>Unità Terapia Pediatrica Intensiva, Fondazione IRCCS Ca Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

<sup>3</sup>Dip di Pediatria, Università degli Studi Federico II, Napoli

<sup>4</sup>Unità Operativa Complessa di Pediatria ASST-Lariana Como

<sup>5</sup>Ambulatorio di Genetica Clinica Pediatrica, Ospedale San Gerardo, Monza

<sup>6</sup>UO Neurologia dello Sviluppo, Istituto Neurologico Carlo Besta, I.R.C.C.S., Milano

<sup>7</sup>U.O. di Neurologia Pediatrica dell'Ospedale dei Bambini V. Buzzi, Milano

Scopo dello studio è stimare la rilevanza diagnostica dell'analisi di mutazioni nei geni implicati nel pathway delle coesine e in pathway interconnessi, per pazienti con cui caratteristiche cliniche includono ritardo cognitivo, ritardo di crescita, peculiari dismorfismi del volto ed irsutismo suggerendo diagnosi clinica di sindrome Cornelia de Lange (CdLS, MIM #122470, 300590, 610759, 300882 e 614701) ed in senso più lato di trascrittomopia. A tal fine è stato disegnato un pannello con metodo di sequenziamento di nuova generazione (NGS) che, oltre ai geni NIPBL, SMC1, SMC3, HDAC8 e RAD21 le cui mutazioni sono responsabili della sindrome, include geni implicati in sindromi che entrano in diagnosi differenziale, quali KMT2A le cui mutazioni sono alla base della sindrome di Wiedemann-Steiner (WDS), ANKRD11 associato sia alla sindrome KGB che a CdLS, ESCO2 e RECQL4, le cui mutazioni bialleliche portano alla sindrome di Roberts e Rothmund-Thomson, rispettivamente e HDAC4, implicato nella sindrome da microdelezione 2q37 Brachidattilia-Ritardo Mentale. La coorte analizzata comprende un totale di 84 individui inviati al laboratorio con la diagnosi di sospetta CdLS. Nell'ambito dei geni CdLS sono stati diagnosticati 11 pazienti con varianti patogenetiche in NIPBL (1 caso di mosaicismo tissutale), 2 con varianti patogenetiche in HDAC8, in un caso con XCI sbilanciato su sangue a favore dell'allele normale ed 1 paziente con variante de novo nel gene RAD21. Nessuna variante patogenetica è stata osservata nei geni SMC1A ed SMC3. Inoltre sono stati identificati 2 pazienti con fenotipo KGB e 2 con fenotipo CdLS con varianti di stop nel gene ANKRD11. Mutazioni nel gene KMT2A sono state riscontrate in 2 pazienti con caratteristiche cliniche WDS ed in due con fenotipo parzialmente sovrapposto. Con l'eccezione di una variante riportata nel LOVD di KMT2A, le varianti di KMT2A e ANKRD11 non sono state finora riportate: la loro frequenza cumulativa in pazienti CdLS risulta dai nostri dati del 2,3%, pari alla frequenza delle varianti in HDAC8, e più elevata includendo varianti associate a sindromi in diagnosi differenziale. I nostri risultati in linea con la letteratura suggeriscono l'espansione dei pannelli diagnostici di CdLS con una crescente serie di geni di cromatinopatie relate



**P169**  
**Genetic characterization of breast cancer in men**

R. Scarpitta<sup>1</sup>, G. Gambino<sup>1</sup>, P. Aretini<sup>2</sup>, B. Mei<sup>1</sup>, M. Farnocchia<sup>1</sup>, K. Zavaglia<sup>1</sup>, E. Falaschi<sup>1</sup>, F. Bonci<sup>3</sup>, E. Landucci<sup>3</sup>, S. Gana<sup>4</sup>, C. Congregati<sup>4</sup>, M. Ghilli<sup>5</sup>, E. Rossetti<sup>5</sup>, G. Allegrini<sup>6</sup>, G. Arrighi<sup>8</sup>, I. Zanna<sup>6</sup>, M. Roncella<sup>5</sup>, D. Palli<sup>6</sup>, A.G. Naccarato<sup>7</sup>, M.A. Caligi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sec. of Molecular Genetics, Dep. of Laboratory Medicine, University Hosp. of Pisa, Pisa, Italy

<sup>2</sup>Lab. of Genomics, Pisa Science Foundation, Pisa, Italy

<sup>3</sup>U.O. Medical Oncology, Dep. of Oncology, University Hosp. of Pisa, Pisa, Italy

<sup>4</sup>Lab. of Medical Genetics, University Hosp. of Pisa, Pisa, Italy

<sup>5</sup>Dep. of Senology, University Hosp. of Pisa, Pisa, Italy

<sup>6</sup>Molecular and Nutritional Epidemiology Unit, Cancer Research and Prevention Institute (ISPO), Florence, Italy

<sup>7</sup>Dep. of Pathology, University Hosp. of Pisa, Pisa, Italy

<sup>8</sup>Dep. Of Oncology, ATNO, Hosp. of Pontedera, Pisa, Italy

Breast cancer in men (MBC) is a rare condition representing the 0.5-1% of all breast cancer cases. Although, the epidemiologic literature regarding breast cancer in female (FBC) is extensive, relatively little is known about MBC. Major genetic factors for men include BRCA1/2, PALB2 and CHEK2 mutations, a positive family history and Klinefelter's or Cowden syndromes, hormonal imbalances and radiation exposure. Due to the rarity of MBC, no large clinical trials have been conducted and so no specific guidelines have been issued. To date, they are treated as FBC in post-menopausal women.

Our main goal is a genetic analysis in men with diagnosis of breast cancer in order to disclose new factor risk that might act specifically in men. Clinical pathological and family history data of 75 men with a diagnosis of breast cancer were collected. The average age of onset was 61 years old and 34 out of 75 men showed a positive family history for breast/ovarian cancer (HBOC). Germline DNAs have been tested by next generation sequencing (NGS) in a custom multi-gene panel focused on 24 genes involved in breast cancer susceptibility and DNA repair mechanisms: BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, ERCC1, MLH1, MRE11, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PARP1, PMS1, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD52, STK11, TP53, TP53BP1.

Our results showed that BRCA2 is the most frequently mutated gene. Pathogenic mutations in BRCA2 were found in 11 men, 8 of them (72%) had family history positive for HBOC. While BRCA2 mutations have a strong impact on family history, they seem not influence the age of diagnosis. The mean age of diagnosis in BRCA2 mutation carriers is approximately the same as calculated among all the cases. Additional pathogenic mutations were found in 4 cases (3 in BRIP1 and 1 in PMS2). 3 out of 4 had no family history of HBOC. Notably, their mean age of onset was drastically lower than all cases (55 years old). Lastly, 3/41 single cases (7.3%) harbor a pathogenic mutation in non BRCA1/2 genes. Our observations suggest that in absence of family history of HBOC, genetic testing of early onset MBC might be addressed to other genes than routinely screened.

**P170**  
**Mutazioni germinali nei geni del DNA repair predispongono i pazienti esposti all'amianto al mesotelioma maligno della pleura**

M. Betti<sup>1</sup>, E. Casalone<sup>2</sup>, D. Ferrante<sup>3</sup>, A. Aspesi<sup>1</sup>, G. Morleo<sup>1</sup>, A. Biasi<sup>1</sup>, M. Sculco<sup>1</sup>, G. Mancuso<sup>4</sup>, S. Guarrera<sup>2</sup>, L. Righi<sup>5</sup>, F. Grosso<sup>6</sup>, R. Libener<sup>7</sup>, M. Pavesi<sup>8</sup>, N. Mariani<sup>9</sup>, C. Casadio<sup>10</sup>, R. Boldorini<sup>4</sup>, D. Mirabelli<sup>11</sup>, B. Pasini<sup>13</sup>, C. Magnani<sup>3</sup>, G. Matullo<sup>14</sup>, I. Dianzani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale, Novara

<sup>2</sup>Italian Institute for Genomic Medicine - IIGM - Torino

<sup>3</sup>CPO-Piemonte e Unit di Statistica Medica ed Epidemiologia, Università del Piemonte Orientale, Novara

<sup>4</sup>Dip. di Scienze della Salute, Divisione di Anatomia Patologica, Università del Piemonte Orientale, Novara

<sup>5</sup>Dip. di Oncologia, Università di Torino, Osp. San Luigi, Orbassano, Torino

<sup>6</sup>Divisione di Oncologia Medica, Osp. SS. Antonio e Biagio, Alessandria

<sup>7</sup>Unit di Patologia, Osp. SS. Antonio e Biagio, Alessandria

<sup>8</sup>Unit di Anatomia Patologica, Osp. Santo Spirito, Casale Monferrato (Alessandria)

<sup>9</sup>Unit di Anatomia Patologica, Osp. SS. Antonio e Biagio, Alessandria

<sup>10</sup>Unit di Chirurgia Toracica, AOU Maggiore della Carità, Novara

<sup>11</sup>Unit di Epidemiologia del Cancro, CPO-Piemonte e Università di Torino

<sup>12</sup>AOU Città della Salute e della Scienza di Torino - SC Genetica Medica U e Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino

<sup>13</sup>AOU Città della Salute e della Scienza di Torino - SC Genetica Medica U e Italian Institute for Genomic Medicine - IIGM - Torino

Il mesotelioma maligno della pleura (MMP) è un tumore raro e aggressivo causato da un unico e ben noto cancerogeno, l'amianto. Solo il 10-17% dei soggetti esposti ad alti livelli di amianto sviluppa il mesotelioma (MM). Tale osservazione, insieme all'esistenza di famiglie in cui il MM si presenta in proporzioni maggiori rispetto alla popolazione generale, avalla il ruolo anche di una predisposizione ereditaria. Mutazioni germinali in un singolo gene oncosoppressore, BAP1, sono state finora riportate come responsabili della predisposizione al MM familiare. Il nostro gruppo ha analizzato BAP1 in 18 famiglie con MM familiare o MM e melanoma e ha identificato mutazioni germinali in solo 2 famiglie. Questi dati suggeriscono il ruolo di altri geni nella predisposizione al MM. A questo scopo abbiamo valutato la prevalenza di mutazioni germinali in 94 geni predisponenti il cancro in 93 pazienti con MPM. Per ogni paziente è stata accuratamente quantificata l'esposizione all'amianto. Abbiamo identificato dieci mutazioni patogenetiche in geni coinvolti nei meccanismi di DNA repair (PALB2, BRCA1, FANCI, ATM, SLX4, BRCA2, FANCC, FANCF, PMS1 e XPC). La maggioranza di questi geni partecipa al restauro per ricombinazione omologa. I pazienti portatori di mutazioni rappresentano il 10% della casistica e mostrano un'esposizione all'amianto significativamente più bassa rispetto ai non portatori (p=0.0015). Ci suggerisce che nei pazienti mutati il danno sul DNA indotto dall'amianto non verrebbe efficientemente riparato, favorendo la cancerogenesi. I nostri dati sono stati recentemente pubblicati (Betti et al. Cancer Letters 2017) e precedono un altro lavoro (Robinson et al. Nature 2017), in cui sono stati analizzati 500 pazienti con diversi tumori metastatici, che riporta la presenza di mutazioni germinali patogenetiche in 12,2% dei pazienti, di cui 75% nei geni del restauro del DNA. In conclusione, il nostro studio sul mesotelioma riflette ciò che accade nei tumori







in generale. Inoltre, i pazienti con mutazioni germinali nei geni coinvolti nel restauro del DNA potrebbero rispondere a farmaci che inducono la letalità sintetica, come già accade per i pazienti con carcinoma ovarico familiare portatori di mutazioni ereditarie in BRCA1 e BRCA2 (Swisher et al. The Lancet Oncology 2017).

P171

**Il deficit di concentrazione urinaria è un predittore precoce e sensibile di patologia renale nei pazienti con Sindrome di Joubert**

S. Nuovo<sup>1,2</sup>, F. Emma<sup>3</sup>, L. Fuiano<sup>3</sup>, E. Bertini<sup>4</sup>, G. Zanni<sup>4</sup>, A. Micalizzi<sup>2,5</sup>, E.M. Valente<sup>2,6</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina e Chirurgia, Sez. di Neuroscienze, Università di Salerno, Salerno, Italia

<sup>2</sup>Unità di Neurogenetica, IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma, Italia

<sup>3</sup>Div. di Nefrologia e Dialisi, IRCCS Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia

<sup>4</sup>Unit di Malattie Neuromuscolari e Neurodegenerative, IRCCS Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia

<sup>5</sup>Dip. di Scienze Biologiche ed Ambientali, Università di Messina, Messina, Italia

<sup>6</sup>Dip. di Medicina Molecolare, Università di Pavia, Pavia, Italia

La sindrome di Joubert (JS) è una ciliopatia autosomica recessiva o X-linked, caratterizzata da una malformazione peculiare del cervelletto e del troncocefalo (nota come segno del dente molare) e da un variabile coinvolgimento multiorgano. La nefropatia, presente in circa il 25% dei pazienti, è la complicanza più grave della JS, e si manifesta tipicamente sotto forma di nefronofisi (NPH) giovanile, una patologia tubulo-interstiziale cronica che evolve in insufficienza renale entro la seconda decade. I pazienti all'esordio possono essere asintomatici o presentare segni subclinici, con un conseguente ritardo nella diagnosi. Ci evidenzia la necessità di esami predittivi sensibili, che consentano l'identificazione precoce della NPH. 99 bambini italiani con JS sono stati sottoposti a dettagliata caratterizzazione della funzionalità renale, comprensiva di test di risposta alla desmopressina (DDAVP) nei casi con ridotta osmolarità urinaria basale, e a studio molecolare mediante analisi NGS di un pannello di 121 geni ciliari. In circa un terzo della coorte sono stati identificati segni di nefropatia, significativamente associata alla presenza di distrofia retinica. In questi soggetti, i geni più frequentemente coinvolti sono CEP290, RPGRIP1L e TMEM216, complessivamente mutati nel 76% dei casi con nefropatia. In circa il 90% dei soggetti evoluti in insufficienza renale, la malattia conclamata è stata preceduta da una ridotta capacità di concentrazione delle urine, mentre solo il 44% presentava ipercapnicità renale. Questo studio indica il deficit di concentrazione urinaria, rilevabile mediante misurazione dell'osmolarità urinaria o test DDAVP, come un precoce e sensibile predittore di evoluzione in insufficienza renale in bambini con JS. Questi risultati espandono la conoscenza del fenotipo renale nella JS e dimostrano per la prima volta il valore prognostico del test di osmolarità urinaria, confermandone l'utilità per la diagnosi precoce di nefropatia.



P172

**Diagnosi genetica in pazienti affetti da distrofia retinica: applicazione della strategia phenotype-driven exome analysis**

D. Colavito<sup>1</sup>, A. Suppiej<sup>2</sup>, V. Maritan<sup>3</sup>, E. Del Giudice<sup>1</sup>, S. Miotto<sup>5</sup>, M. Dalle Carbonare<sup>1</sup>, S. Piermarocchi<sup>4</sup>, A. Leon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>R&I Genetics Srl

<sup>2</sup>Dipartimento di neurologia e neurofisiologia pediatrica Università di Padova

<sup>3</sup>ULSS 6 Euganea, Ospedale di Schiavonia, Padova

<sup>4</sup>Dipartimento di neuroscienze, Università di Padova

<sup>5</sup>ULSS 6 Euganea, Ospedale di Camposampiero, Padova

Premessa: le malattie genetiche rare dell'occhio sono una delle maggiori cause di ipovisione specialmente in età pediatrica. Spesso la diagnosi è complicata dall'eterogeneità fenotipica e genetica propria di tali patologie, ancor più se i sintomi oculari sono parte di una condizione sindromica. Grazie alle tecnologie NGS è possibile effettuare esami genetici comprendenti molteplici geni (pannelli) che possono essere ottenuti mediante sequenziamento mirato (targeted panels) o, in seguito al sequenziamento dell'esoma (WES), dall'analisi delle variazioni in geni selezionati in base al quesito clinico (in silico gene panels o phenotype-driven analysis). Scopo dello Studio: si riporta la nostra esperienza applicando pannelli in silico e, dove negativi, l'analisi fenotipicamente guidata dell'esoma nella diagnosi di 117 soggetti affetti da patologie oculari ereditarie (63,2% pediatriche e 36,8% adulti) riferiti a R&I Genetics per differenti disordini visivi, anche sindromici (5%), di sospetta origine genetica. Risultati: l'analisi delle variazioni riscontrate nel panel in silico di 169 geni selezionati in quanto associati ai diversi tipi di distrofia retinica, oltre che atrofia ottica, sindrome di Usher ed albinismo oculocutaneo, ha portato ad un successo diagnostico del 55,5%: 53,4% nei pazienti adulti ed 56,7% nei pazienti pediatrici. Nei soggetti risultati negativi, la strategia phenotype-driven ha permesso di porre ulteriori 11 diagnosi molecolari nei soggetti pediatrici (14,8%) di cui sei presentavano retinopatia non sindromica al momento della diagnosi molecolare (variazioni nei geni ALMS1, AFG3L2, MITF, PAX6, ADAMTSL4, CSNK2A1). Tra i pazienti adulti 3 casi non sindromici (6,9%) sono risultati positivi all'analisi phenotype-driven (variazioni nei geni TGFBI, KCNJ13 e WDR19). La strategia phenotype-driven mostra una sensibilità diagnostica complessiva pari al 67,5%: 71,6% nei pazienti pediatrici e 63,4% nei pazienti adulti, evidenziando un marcato aumento nella sensibilità diagnostica. Conclusioni: in accordo con le più recenti evidenze (Haer-Wigman L et al, Eur J Hum Genet. 2017), l'analisi WES accoppiata alla strategia phenotype-driven è in grado di aumentare la sensibilità diagnostica in soggetti affetti da patologie genetiche dell'occhio. In particolare, ha permesso la diagnosi molecolare, in alcuni casi precoce, in soggetti pediatrici che mostravano come primo sintomo la distrofia retinica. Nel contesto di sindromi potenzialmente complesse e degenerative, questi soggetti sono stati indirizzati verso percorsi clinici di sorveglianza attiva.

P173

**Atrofia ottica associata al gene AFG3L2 in un paziente non sindromico: report di un caso clinico e nuova associazione genotipo-fenotipo**

D. Colavito<sup>1</sup>, V. Maritan<sup>2</sup>, A. Suppiej<sup>3</sup>, E. Del Giudice<sup>1</sup>, S. Miotto<sup>5</sup>, M. Dalle Carbonare<sup>1</sup>, S. Piermarocchi<sup>4</sup>, A. Leon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>R&I Genetics Srl

<sup>2</sup>ULSS 6 Euganea, Ospedale di Schiavonia, Padova

<sup>3</sup>Dipartimento di neurologia e neurofisiologia pediatrica Università di Padova

<sup>4</sup>Dipartimento di neuroscienze, Università di Padova

<sup>5</sup>ULSS 6 Euganea, Ospedale di Camposampiero, Padova

Introduzione: L'atrofia ottica autosomica dominante (DOA) è la forma più frequente di atrofia del nervo ottico ereditaria con una incidenza stimata di 1/30000. I segni clinici comprendono diminuzione dell'acuità visiva, discromatopsia, deficit del campo visivo e pallore del nervo ottico. Circa l'80% dei casi di DOA sono non sindromici, mentre il restante 20% dei pazienti mostra sintomi extraoculari. I geni generalmente associati a DOA sono OPA1, OPA3, TMEM126 e ACO2. Nonostante l'aumento esponenziale delle conoscenze molecolari concernenti la DOA, quasi la metà dei soggetti affetti non presenta mutazioni nei geni sopraindicati. Paziente e metodi: è stato analizzato l'esoma (Agilent SureSelect Clinical Research Exome. Illumina HiSeq2500) di un paziente in età pediatrica con un sospetto di atrofia ottica dominante, riduzione dell'acuità visiva bilaterale (BCVA=0,4), pallore bilaterale del nervo ottico e ERG e PEV con pattern patologici ed inaggravanti nel tempo. Il paziente è precedentemente risultato negativo per la ricerca di mutazioni nei geni OPA1 e OPA3 effettuata mezzo Sanger. Risultati e Discussione: non sono state riscontrate mutazioni nei geni associati a DOA non sindromica. Si è quindi proceduto con la prioritizzazione delle variazioni riscontrate nell'esoma in accordo con il fenotipo clinico (phenotype driven analysis). È stata riscontrata la variazione p.R468C nel gene AFG3L2, mutazioni in tale gene sono generalmente associate ad atassia 28 (SCA28). La variazione p.R468C nel gene AFG3L2 era già stata riscontrata nel 2015 da Charif et al in una famiglia affetta da DOA con ritardo mentale, al contrario il paziente qui riportato non presenta alcun sintomo neurologico. Essendo il gene AFG3L2 associato a SCA28 non è possibile escludere che la variazione p.R468C abbia un effetto ipomorfico e che il paziente non andrà incontro a sintomatologia neurologica nel corso degli anni. In conclusione viene qui riportato il primo caso italiano di DOA non sindromica associata al gene AFG3L2. Il riscontro di tale variazione dimostra l'efficacia dell'applicazione del sequenziamento dell'esoma seguito dalla prioritizzazione delle variazioni in base al fenotipo clinico in soggetti affetti da DOA non sindromica risultati negativi con i metodi di indagine molecolare convenzionali.





**P174**  
**NGS panel for chromatinopathies: implications for diagnosis, research and therapy care**

B. Augello<sup>1</sup>, C. Gervasini<sup>2</sup>, V. Massa<sup>2</sup>, E.A. Colombo<sup>2</sup>, D. Milani<sup>3</sup>, D. Cocciadiferro<sup>1,4</sup>, G.M. Squeo<sup>1</sup>, I. Adipietro<sup>1</sup>, N. Malerba<sup>1,4</sup>, M. Castori<sup>1</sup>, G. Merla<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical Genetics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, San Giovanni Rotondo, Italy

<sup>2</sup>Genetica medica, Dip. Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano, Italy

<sup>3</sup>UOSD Pediatria ad alta intensità di cura, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico Milano, Italy

<sup>4</sup>PhD Program in Experimental and Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, University of Foggia, Italy

**Background** Epigenetic mechanisms regulating chromatin state plays a central role in gene expression, development, function, and maintenance of cell identity. In many diseases aberrant chromatin regulation involves disruption of the various components of the epigenetic machinery causing widespread downstream epigenetic consequences. Neurological dysfunction and, in particular, intellectual disability appears to be a common phenotype feature, although these disorders can be manifested as multifactorial complexes in which mutations in chromatin regulators are contributing factors. There is an emerging importance recognition of this spectrum of disorders, that we termed chromatinopathies. **Aim** In this study we analysed with NGS techniques a group of patients with a suspicious of chromatinopathies showing overlapping clinical findings in order to identify the molecular cause. **Methods** We generated a targeted next-generation sequencing custom-made gene panel to sequence 66 causative genes of 54 chromatinopathies, frequently considered in differential diagnosis each other, including Kabuki, Au-Kline, Charge, Wiedemann Steiner, Rubinstein-Taybi and Cornelia de Lange syndromes just to cite some. **Results** To date we have enrolled and sequenced 120 patients with different diagnosis, for each case we focus our attention first on variants falling in genes relevant to the clinical diagnostic suspicion and we found mutations in 33% of such patients. The main sub-group is Kabuki syndrome patients for which we have analysed 72 patients finding 21 of them carrying KMT2D and KDM6A pathogenic mutations. Extensive data analysis to search for additional causative genes alteration for overlapping phenotypes is ongoing in so far negative chromatinopathies affected patients with October as period expected to complete this second level of analysis. **Conclusions** The study of chromatinopathies may offer a unique opportunity to learn about the role of epigenetics in health and disease. Notably, the pathogenic sequence is far to be completely known for most of the cases. Moreover an increasing number of studies highlighted the importance and needed to analyse with NGS approaches this group of diseases that show overlap of molecular and clinical findings.

**P175**  
**Genetic screening of 180 Osteogenesis Imperfecta patients with NGS technologies**

M. Mordenti<sup>1</sup>, M. Maioli<sup>1</sup>, E. Pedrini<sup>1</sup>, I. Melandri<sup>1</sup>, F. Ponti<sup>1</sup>, A. Virga<sup>1</sup>, L. Sangiorgi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SSD Genetica Medica e Malattie Rare Ortopediche - Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

The innovative Next Generation Sequencing (NGS) technologies, considering the recognized advantages and the reduced costs compared to Sanger sequencing, has provided new appealing approaches to diagnostic testing. Its use for routine diagnostic purposes requires certification in terms of reliability. To test the feasibility of using the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM, ThermoFisher) for clinical diagnosis, we assessed its performance to detect both point mutations and large rearrangements, obviously evaluating the concordance with traditional genetic screening. 180 patients affected by Osteogenesis Imperfecta (OI) have been enrolled in this project and analyzed through targeted sequencing, performed with Ion PGM System (Thermo Fisher Scientific). 2 custom panels were created through the Ion AmpliSeq Custom Designer. 150 individuals have been tested for the presence of point mutations and complex rearrangements in COL1A1/A2 and IFITM5 genes (OI panel\_1); 30 patients have been screened for CRTAP, LEPRE1, PPIB, SERPINF1, SERPINH1, FKBP10, SP7, WNT1, PLS3, PLOD2, BMP1, CREB3L1, LRP5 and TMEM38B genes (OI panel\_2). All of them have been previously evaluated with gold standard techniques (dHPLC, Sanger sequencing and MLPA). Except for the regions not covered by the designed OI-panels still analyzed by Sanger sequencing the NGS molecular screening showed results mostly in line with the standard techniques in the point mutation detection. 41 pathogenic variants in COL1A1 gene, 43 in COL1A2, 2 in IFITM5, 3 in LEPRE1, 3 in CRTAP, 2 in SERPINF1, 1 in FKBP10 and 1 in WNT1 have been identified by NGS analyses and direct sequencing. Multi-exon deletions analysis is still ongoing. As expected, the potential of the new NGS technologies has been verified also for diagnostic purposes. Since the high accordance in detecting OI-related mutations between NGS and standard techniques, the use of this innovative approach guarantees also a cost and time reduction, so becoming a good option for genetic diagnosis.

**P176**  
**Una nuova mutazione nel gene OTOA associata a delezione dello stesso gene in una famiglia con sordità ad esordio prelinguale**

P. Fontana<sup>1</sup>, M. Morgutti<sup>2</sup>, V. Pecile<sup>2</sup>, S. Lenarduzzi<sup>2</sup>, S. Cappellani<sup>2</sup>, F. Scaranò<sup>1</sup>, M. Falco<sup>1</sup>, F. Lonardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>a) U.O.S.D. di Genetica Medica, A.O.R.N. G. Rummo, Benevento

<sup>2</sup>b) Genetica Medica, IRCCS materno infantile Burlo Garofolo, Trieste

Il gene OTOA è localizzato sul cromosoma 16 (16p12.2) e codifica per l'otoancorina, una proteina di 120 kDa che consente l'adesione della membrana tectoria al solco spirale interno. La perdita di funzione di questa proteina compromette la stabilità cocleare e la sensibilità delle cellule ciliate interne. Le mutazioni ipomorfe di OTOA determinano una forma grave (da severa a profonda) di sordità prelinguale, non progressiva, a trasmissione autosomica recessiva (locus DFNB22). I casi riportati in letteratura sono meno di venti, la maggior parte dei quali associati a delezione in omozigosi dell'intero gene. Mutazioni puntiformi sono state evidenziate soltanto in tre famiglie, provenienti da Pakistan, Algeria e Palestina. La maggiore frequenza delle delezioni rispetto alle mutazioni puntiformi è dovuta presumibilmente al fatto che il gene si trova in una regione altamente soggetta a ricombinazione omologa non allelica (NAHR), insieme al fatto che si è diffuso moltissimo l'utilizzo di tecniche di indagine (CGH-Array e SNP-Array) in grado di identificare questo tipo di difetto molecolare. Descriviamo due fratelli con sordità severa (70-90 dB), bilaterale, ad esordio prelinguale, non sindromica. Al sequenziamento mediante NGS di 61 geni correlati a sordità non sindromica è stata rilevata in entrambi i pazienti la mutazione c.1865T>A (p.L622H) in OTOA (NM\_144672.3), apparentemente in omozigosi. Il padre è risultato anch'egli portatore della stessa mutazione, in eterozigosi, mentre nella madre non sono state evidenziate mutazioni. È stato quindi effettuato un esame mediante SNP-Array, che ha evidenziato nei pazienti e nella madre una delezione della regione contenente il gene. Si tratta del primo caso riportato di sordità associata al locus DFNB22 in cui un riarrangiamento genomico è presente insieme ad una mutazione puntiforme in eterozigosi composta, nonché della prima mutazione puntiforme descritta in pazienti europei. Il caso mette in luce inoltre l'utilità di avere a disposizione nuove tecniche diagnostiche in grado di rilevare contemporaneamente mutazioni puntiformi e CNV.



**P177**  
**A novel HS6ST2 mutation found in two brothers with severe myopia and intellectual disability causes a reduction of enzyme activity**

S. Tabano<sup>1</sup>, E. Bonaparte<sup>2,1</sup>, L. Paganini<sup>1,2</sup>, D. Rovina<sup>3</sup>, D. Milani<sup>4</sup>, S. Esposito<sup>4</sup>, L. Hadi<sup>5</sup>, M. Chetta<sup>6</sup>, L. Riboni<sup>5</sup>, S. Sirchia<sup>3</sup>, M. Miozzo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathophysiology & Transplantation, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy

<sup>2</sup>Division of Pathology, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italy

<sup>3</sup>Medical Genetics, Department of Health Sciences, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy

<sup>4</sup>Pediatric Highly Intensive Care Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italy

<sup>5</sup>Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, LITA-Segrate, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy

<sup>6</sup>Genomix4 Life, Università degli Studi di Salerno, Salerno, Italy

**Introduction:** here we report of two affected brothers, born from healthy and non-consanguineous parents of Italian origin, who had a third not affected son. They have febrile seizure, irregular diffuse spike-wave anomalies at EEG and a severe myopia, facial dysmorphism and developmental delay. We supposed a recessive X-linked pattern of inheritance and performed NGS targeted on the chromosome X. We found a novel mutation in the HS6ST2 gene, the HS6ST2 c.916 G>C (G306R) mutation in the two probands (hemizygous) and in the mother (heterozygous), but not in the healthy brother. The gene, is expressed in brain and eye during development. It maps at Xq26.2, a locus previously associated with X-linked mental retardation and recessive myopia. The gene encodes a member of the heparan sulfate (HS) sulfotransferase gene family, which catalyzes the transfer of sulfate to HS. The mutation affects the substrate binding site. The variant resulted deleterious for the following prediction tools: Mutation Taster, CADD Raw, CADD Sale and GERP. **Material and methods:** site directed mutagenesis was performed on commercial expression vector containing HS6ST2 cDNA to obtain the G306R mutant form. Transient expression of both wt and mutated HS6ST2 was performed in HEK293 cells and HS6ST2 activity assay was evaluated. **Results and conclusion:** the mutant HS6ST2 protein shows a lower activity than the wildtype protein, 36% vs 100% respectively, thus we hypothesized its involvement in the phenotype. Complete WES on the family is ongoing to exclude possible autosomal recessive variants related to this condition.





**P178**  
**Gillespie syndrome: a novel homozygous deletion in the 5' region of ITPR1 gene**

L. Paganini<sup>1</sup>, C. Pesenti<sup>2</sup>, D. Milani<sup>3</sup>, L. Fontana<sup>2</sup>, S. Motta<sup>1</sup>, S.M. Sircchia<sup>4</sup>, G. Scuvera<sup>3</sup>, P. Marchisio<sup>3</sup>, S. Esposito<sup>5</sup>, C. Cinnante<sup>6</sup>, S. Tabano<sup>2</sup>, M. Miozzo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Pathology, Fondazione IRCCS Ca' Granda-Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

<sup>2</sup>Department of Physiopathology and Transplantation, Università degli Studi di Milano, Milano

<sup>3</sup>Intensive Care Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italy

<sup>4</sup>Medical Genetics, Department of Health Sciences, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy

<sup>5</sup>Pediatric Clinic, Department of Surgical and Biomedical Sciences, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italy

<sup>6</sup>Neuroradiology Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italy

**Purpose:** Gillespie syndrome is a rare congenital autosomal disorder characterized by partial aniridia, hypotonia, progressive cerebellar hypoplasia, non-progressive ataxia, and intellectual disability. All causative variants to date affect the central domain or the C-terminus of ITPR1 protein and exhibit autosomal recessive or dominant inheritance. We investigated the cause of Gillespie syndrome in a family comprising consanguineous healthy parents, two affected siblings and one healthy son.

**Methods:** Exome sequencing analysis and ITPR1 transcripts quantification were performed.

**Results:** A novel ITPR1 variant, c.278\_279+2delACGT, was identified, for which the affected siblings were homozygotes and the parents heterozygous carriers; the variant was absent from the healthy son. The deletion, mapping in the 5c region of ITPR1 gene, abolished the splice-donor site at exon 5/intron 5 junction, causing the skipping of the exon 5 and resulting in generation of a premature STOP codon, with production of a 64-amino acids non-functional protein. The mutant transcript comprised > 96% of ITPR1 mRNA in the affected siblings, although a small amount of wild-type transcript was detected.

**Conclusion:** These results extend the spectrum of ITPR1 pathogenetic variants in Gillespie syndrome, identifying a new autosomal recessive mutation, which is the first described in the N-terminal suppressor domain of ITPR1.

**P179**  
**Nuova mutazione nel gene ASXL3 in un paziente con sindrome di Bainbridge-Ropers**

P. Prontera<sup>1</sup>, C. Gradassi<sup>1</sup>, M. Schippa<sup>1</sup>, A. Mencarelli<sup>1</sup>, D. Rogaia<sup>1</sup>, E. Sallicandro<sup>1</sup>, E. Del Giudice<sup>2</sup>, M. Dalle Carbonare<sup>2</sup>, A. Leon<sup>2</sup>, D. Colavito<sup>2</sup>, G. Stangoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SSD Neonatologia e Diagnostica Prenatale/CRR Genetica Medica, Azienda Ospedaliera di Perugia, Perugia, Italia

<sup>2</sup>R&I Genetics Srl, Padova, Italia

**Premessa:** La Sindrome di Bainbridge-Ropers (BRS) è una malattia genetica autosomica dominante, molto rara con meno di 20 pazienti descritti nella letteratura internazionale, dovuta a mutazioni loss-of-function del gene ASXL3. La Sindrome BRS si caratterizza per il ritardo di crescita, la microcefalia, le difficoltà dell'alimentazione, il ritardo generalizzato dello sviluppo, la disabilità intellettiva e il grave ritardo nell'acquisizione del linguaggio.

**Scopo:** Identificare le cause di ritardo generalizzato dello sviluppo e grave ritardo di linguaggio in un bambino di 8 anni, gi negativo all'analisi array-CGH (75 Kb dirisoluzione) e X-Fragile.

**Materiali e Metodi:** Una consulenza genetica ed una visita dismorfologica sono state eseguite per cercare di caratterizzare il modello ereditario ed il fenotipo. L'esame clinico del trio mediante NGS (Illumina HiSeq4500) è stato condotto su DNA estratto da sangue periferico. Le conferme sono state eseguite in Sanger.

**Risultati:** Il probando, nato da genitori non consanguinei con anamnesi familiari negative, alla visita dismorfologica presentava: crescita staturale-ponderale e CC nella norma (25-50 centile), strabismo, orecchie piccole con elice ripiegato, fronte bombata, condizioni nel complesso non suggestive di specifiche sindromi. L'esame clinico ha portato all'identificazione della variante de novo c.3382delC (p.Arg1128GlyfsTer15) in eterozigosi a carico del gene ASXL3.

**Conclusioni:** La mutazione identificata in questa famiglia non è descritta in letteratura, ma verosimilmente patogena in quanto: 1) è de novo 2) introduce un codone di stop 3) non è presente nei databases di polimorfismi 4) la patologia associata correla con il fenotipo del paziente. Le caratteristiche cliniche del bambino, anche rivalutate in seguito alla diagnosi molecolare, non consentono di inquadrarlo nell'ambito della BRS che difficilmente, soprattutto nelle sue forme più lievi, può essere riconoscibile da un punto di vista clinico-dismorfologico. Una delle caratteristiche che possono suggerire il coinvolgimento di ASXL3 è la profonda assenza di linguaggio che spesso non è giustificata dalle migliori performance generali del bambino.

**P180**  
**Eterozigosi composta per varianti missenso nel gene SZT2 in disabilità intellettiva grave in assenza di encefalopatia epilettica.**

S. Frangella<sup>1</sup>, G. Marangi<sup>1</sup>, F. Brugnoletti<sup>3</sup>, P. Doronzio<sup>1</sup>, S. Ricciardi<sup>1</sup>, S. Lattante<sup>1</sup>, M. Zollino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Medicina Genomica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

<sup>2</sup>Fondazione Policlinico Gemelli, Roma

Varianti in omozigosi nel gene SZT2 (seizure threshold 2) sono state recentemente descritte in associazione a disabilità intellettiva (DI) ed epilessia. Il gene SZT2 codifica per una proteina del perossisoma che prende parte al complesso KICSTOR che ha la funzione di mediatore nella risposta allo stress ossidativo. È altamente espressa nel SNC. Ad oggi, in letteratura sono descritti 11 casi di forme autosomica-recessive di encefalopatia epilettica associate al gene, per un totale di 16 varianti. Presentiamo un ulteriore caso di eterozigosi composta per varianti missenso nel gene SZT2, in una bambina di 4 anni riferita per sospetta sindrome di Pitt-Hopkins, con grave DI, microcefalia ad insorgenza post-natale e anomalie del corpo calloso. Il risultato è stato ottenuto tramite sequenziamento esomico selettivo (SureSelect Focused Exome (Agilent Technologies), piattaforma Ion Proton (Life Technologies)). Seguendo criteri standard di analisi, sono state selezionate e validate tramite sequenziamento Sanger, due varianti missenso: c.3340G>T; p.G1114W e c.9511T>C; p.S3171P nel gene SZT2. La prima variante, materna, è riportata su gnomad.broadinstitute.org con una frequenza di 1/5000 nella popolazione europea, mentre la seconda, paterna, non è mai stata descritta. Mediante il software PolyPhen-2 ambedue le varianti sono predette come potenzialmente dannose per la struttura e/o funzione della proteina. Anche se sono programmati ulteriori studi di patogenicità, tale risultato è ritenuto potenzialmente correlato al fenotipo, ma non è trasferito in referto diagnostico. L'analisi comparata dei pochi casi della letteratura è a sostegno dell'ipotesi di patogenicità. Infine, il gene SZT2 sostiene l'eterogeneità genetica di condizioni nello spettro fenotipico della sindrome di Pitt-Hopkins.



**P181**  
**A case report: A Novel Mutation in CDKL5 Gene in West Syndrome**

M. Valente<sup>1</sup>, S. Zucca<sup>1</sup>, C. Varesio<sup>2</sup>, A. Asaro<sup>1</sup>, G.S. Grieco<sup>1</sup>, M. Plumari<sup>1</sup>, F. Morelli<sup>2</sup>, V. De Giorgis<sup>2</sup>, P. Veggiotti<sup>2,3</sup>, C. Cereda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genomic and Post-Genomic Center, "C. Mondino" National Neurological Institute, Pavia, Italy

<sup>2</sup>Unity of infantile neuropsychiatry C. Mondino" National Neurological Institute, Pavia, Italy

<sup>3</sup>Department of Brain and Behavioral Science, University of Pavia, Pavia, Italy.

**Background:** Epileptic encephalopathy early infantile 2 (EIEE2) as (West Syndrome) is an X-linked dominant severe neurologic disorder characterized by onset of seizures in the first months of life and severe global developmental delay resulting in mental retardation and poor motor control. Other features include lack of speech development, subtle dysmorphic facial features, sleep disturbances, gastrointestinal problems, and stereotypic hand movements. Onset of EIEE2 occurs within the first 3 months of life but some present within the first few weeks after birth. Death is often due to pneumonia or other complications of a complex disability. Genetic variants of EIEE2 or West Syndrome have been associated with mutations in CDKL5 (Xp22.13). Boys are more often affected than girls. We reported a baby that was initially hospitalized with the diagnosis of dnd epilepsy and and subsequently as a West Syndrome.

He was transferred to the 4<sup>th</sup> day of life to neonatal pathology for 2 episodes featuring eye fixing, swallowing automation, general hypertension with mild cloning in the upper limbs for about 1 minute; followed by skin pallor, hypotonia and sleeping. **Objectives:** Our purpose is to demonstrate genotype-phenotype correlation for Epileptic encephalopathy early infantile 2 and West Syndrome and to obtain a fast and accurate strategy for genetic diagnosis of Epileptic encephalopathy. **Method:** In this study, DNA extracted from peripheral blood of Proband with EIEE2, mother and father has been sequenced with Next Generation Sequencing (NGS) analysis specifically with Focused Exome (SureSelectQXT Target Enrichment-Agilent Technologies). DNA-seq was performed using an Illumina MiniSeq sequencer and data analysis was performed according to the best-practices described for these applications to identify single nucleotide variants and small insertions/deletions. Pathogenic mutations have been confirmed via Sanger sequencing. **Results:** NGS analysis identified in the proband a novel mutation in CDKL5 gene, never described in the literature. We have observed the deletion of a single nucleotide that determines a premature stop codon and the formation of a much shorter protein (c.567\_568delA, p.Lys190Serfs\*38). Both parents were negative for mutation in CDKL5 gene. **Conclusion:** The use of the Focused Exome panel (Agilent Technologies) represents a gold standard for the identification of known pathogenetic mutations and / or never described in literature in genetically heterogeneous pathologies. Our goal is to prove that this new mutation (p.Lys190Serfs\*38) is really disease-causing.







**P182**  
**Screening genetico dei geni EXT1-EXT2 con la piattaforma NGS ION-PGM System: un'analisi HTA**

E. Pedrini<sup>1</sup>, E. Di Brino<sup>2</sup>, M. Oradei<sup>3</sup>, I. Melandri<sup>1</sup>, F. Ponti<sup>1</sup>, S. Corsini<sup>1</sup>, M. Gnoli<sup>1</sup>, M. Marchetti<sup>4</sup>, L. Sangiorgi<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Ssd di Genetica Medica e Malattie Rare Ortopediche, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna  
<sup>2</sup>Alta Scuola di Economia e Management dei Servizi sanitari, Universit Cattolica del Sacro Cuore, Roma  
<sup>3</sup>Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli, Roma  
<sup>4</sup>Centro Nazionale per l Health Technology Assessment, Istituto Superiore di Sanit, Roma

L'ION PGM System è una piattaforma per il sequenziamento di nuova generazione adatta al targeted sequencing, cioè al sequenziamento di pannelli di geni. Nonostante i documentati vantaggi di questa tecnologia in termini di risparmio di tempo e di spesa (rispetto all'utilizzo delle tecniche di screening tradizionali di cui il sequenziamento Sanger rappresenta il Gold Standard), l'affidabilità di questo strumento per un suo concreto utilizzo in pratica clinica necessita di essere verificata in quanto dipendente dalle caratteristiche dei geni e delle varianti genetiche associate alla patologia di interesse. Scopo del lavoro è stato valutare l'affidabilità, sia in termini di sensibilità diagnostica sia in termini di appropriatezza di utilizzo nella pratica clinica, del nuovo strumento diagnostico rispetto alle tecniche attualmente in uso presso la SSD di Genetica Medica (Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna) in relazione ad un suo utilizzo per lo screening molecolare della patologia delle Esostosi Multiple Ereditarie (EME). L'obiettivo è quello di fornire una panoramica del potenziale impatto che l'utilizzo di questa tecnologia potrebbe avere sul Sistema Sanitario Nazionale. Sono stati presi in esame 250 pazienti affetti da EME ed analizzati per la presenza di mutazioni a carico dei geni EXT1 ed EXT2 utilizzando parallelamente il protocollo di screening attualmente in uso presso la nostra unit (DHPLC + sequenziamento diretto) ed il sequenziamento di nuova generazione. Il pannello messo a punto per l'analisi copre un totale di 12,78kB, ha una coverage del 99,37% e permette di analizzare tutte le regioni codificanti e di splicing dei geni EXT1 ed EXT2, includendo anche le regioni UTR. I dati ottenuti e i costi sostenuti sono stati elaborati tramite analisi HTA (Health Technology Assessment), un processo multidisciplinare di valutazione delle tecnologie sanitarie che si basa, oltre che sulle caratteristiche di efficacia ed affidabilità tecnica, anche sugli aspetti economici (valutazione costo-efficacia) ed organizzativi.

**P183**  
**Disease associated tandem repeat genotyping: NGS versus traditional fragment analysis**

L. Corrado<sup>1</sup>, F. Geraci<sup>3</sup>, M. Severgnini<sup>2</sup>, A. Di Piero<sup>1</sup>, V. Frontini<sup>1</sup>, E. Mangano<sup>2</sup>, M.L. Genovese<sup>3</sup>, N. Barizzone<sup>1</sup>, R. D'Aurizio<sup>3</sup>, R. Croce<sup>1</sup>, F. De Marchi<sup>5</sup>, L. Mazzini<sup>5</sup>, A. Brusco<sup>3</sup>, G. De Bellis<sup>2</sup>, G. Manzini<sup>4,3</sup>, R. Bordoni<sup>2</sup>, M. Pellegrini<sup>3</sup>, S. D'Alfonso<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Human Genetic Lab, Dept of Health Sciences, UPO, Novara, Italy  
<sup>2</sup>Institute for Biomedical Technologies, National Research Council (CNR-ITB), Segrate (MI) Italy  
<sup>3</sup>Institute of Informatics and Telematics of CNR, Pisa, Italy  
<sup>4</sup>UPO, Vercelli, Italy  
<sup>5</sup>ALS Center AOU Maggiore della Carità, Novara, Italy  
<sup>6</sup>Medical Sciences, University of Torino, Torino, Italy

One of the biggest technical challenges associated with NGS technologies are repetitive DNA sequences. The analysis of tandem repeat polymorphisms (TRPs) has been traditionally based on PCR-amplification followed by fluorescence capillary electrophoresis to identify fragment length differences. Theoretically, high-throughput NGS technology could offer several potential advantages for TRPs genotyping: it can provide sequence data, discriminating alleles with the same length but with different repeat structures and it also detect substitutions and single nucleotide polymorphisms in the repeats regions. Lastly, the number of loci to analyze is not limited by the number of fluorescent dyes or non-overlapping size ranges, because sequences generated by NGS can be identified based on the flanking sequences. Here we examined 16 different disease-associated tandem repeat loci from short-read NGS sequencing data and we compared these data to those derived through fluorescence fragment analysis approach. Methods: We sequenced and analyzed 14 DNA samples affected by various neurodegenerative diseases with repeat expansions of different lengths for 16 disease associated tandem repeat loci by Illumina MiSeq sequencing platform (300+300 bp reads). We performed a repeat specific capture probes design (Duitama 2014) which uses the flanking regions of the repeats to design enrichment probes in unique regions. For the target regions enrichment, we used SureSelect XT Kit, (Agilent technologies). Besides a known bioinformatics tool (lobSTR), a new software procedure was successfully implemented to precisely genotype TRPs from NGS data in order to achieve genotype accuracy and efficiency. Overall, we were able to compare 224 genotypes. Locus specific TRP typing has been performed demonstrating a very good correlation (up to 80%) between genotypes derived by fluorescence fragment analysis and those measured by our NGS approach. Even for very large expansions such those in C9ORF72, which are indeed not measurable, we have been able to identify the samples carrying a pathological expansion. This pilot experiment demonstrated the feasibility of the analysis of TRPs in NGS data for a large number of loci.



**P184**  
**Analisi Whole Exome Sequencing (WES) in una coorte di pazienti affetti da disturbi del neurosviluppo**

M.P. Leone<sup>1,2</sup>, P. Palumbo<sup>1</sup>, O. Palumbo<sup>1</sup>, S. Castellana<sup>3</sup>, T. Mazza<sup>3</sup>, T. Palladino<sup>1</sup>, R. Stallone<sup>1</sup>, N. Bukvic<sup>4</sup>, M. Carella<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)  
<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze del suolo, della pianta e degli alimenti, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari  
<sup>3</sup>Unit di Bioinformatica - IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)  
<sup>4</sup>UOC Genetica Medica, Azienda Ospedaliero Universitaria Consorziale Policlinico di Bari, Bari

I disturbi del neurosviluppo (NDDs) sono una classe eterogenea di patologie causate da alterazioni nella crescita e nello sviluppo del sistema nervoso centrale (SNC). Hanno un'incidenza del 2-3% nella popolazione generale e, da un punto di vista clinico, si distinguono in forme sindromiche (S-NDDs) e forme non sindromiche (NS-NDDs). Nonostante vi siano chiare evidenze della presenza di una forte componente genetica nell'insorgenza delle stesse, ad oggi più del 50% dei casi resta ad eziologia sconosciuta. L'analisi delle Copy Number Variations (CNVs) mediante metodiche array-based (array-CGH/SNP-array), rappresenta l'approccio diagnostico più diffuso per i pazienti affetti da NDDs con una detection rate di circa il 15-20%. Tale approccio ha consentito di caratterizzare nuove sindromi genomiche, di identificare nuovi geni malattia ed, infine, effettuare diagnosi su casi sporadici. Il rapido sviluppo delle metodiche di sequenziamento, ed in particolare l'utilizzo in ambito clinico delle metodiche di Whole Exome Sequencing (WES), sta rapidamente aumentando le nostre conoscenze sui meccanismi molecolari alla base degli NDDs consentendo l'identificazione di nuove mutazioni e di nuovi geni che contribuiscono al loro sviluppo. In questo studio sono stati analizzati, mediante WES, 28 pazienti (casi sporadici e casi familiari) affetti da forme sindromiche e non-sindromiche di NDDs, negativi all'analisi delle CNVs. Lo studio ha portato all'identificazione di varianti patogenetiche o verosimilmente patogenetiche in 5 pazienti (~18%). In particolare, in tre di essi sono state identificate varianti, ad insorgenza de novo, nei geni SETBP1 (OMIM 269150), SHANK2 (OMIM 613436) e ZDHHC15 (OMIM 300577), mentre in una coppia di fratelli con diagnosi di disturbo dello spettro autistico (ASD) è stata identificata una variante nel gene DOCK8, ereditata dalla madre apparentemente asintomatica. Infine, in due fratelli entrambi affetti da encefalopatia congenita e disabilità intellettiva, è stata identificata eterozigosi composta per due mutazioni che interessano il gene NRXN3. Il nostro studio conferma l'utilità dell'analisi WES per l'inquadramento diagnostico di pazienti affetti da NDDs ad eziologia sconosciuta.

**P185**  
**VarHunter: a platform to process and analyze data from patients with neurological diseases**

S. Monetti<sup>2</sup>, F. Calimeri<sup>2</sup>, A. Qualtieri<sup>1</sup>, A. Magariello<sup>2</sup>, A. Patitucci<sup>1</sup>, S. Cavallaro<sup>1</sup>, F.L. Conforti<sup>1</sup>, M. Muglia<sup>1</sup>, L. Citrigno<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Institute of Neurological Sciences, CNR, Mangone (CS), Italy  
<sup>2</sup>Department of Mathematics and Informatics, UNICAL, Rende (CS), Italy

Introduction: Next Generation Sequencing (NGS) is a rapid, high-throughput, and cost-effective approach and has been widely used to identify pathogenic variation especially in Mendelian disorders. It generates a huge amount of data that needs to be analyzed quickly and effectively. VarHunter is a web platform that allows users to search easily and faster new gene-disease association. By using its responsive and user friendly interface, this platform is able to help researcher to analyze the data in a clear and easy way  
 Aim: The purpose of the study is the development of a database containing all the results derived from NGS analysis. Using Node.js, we developed VarHunter, a web-platform that parses an analyzed and annotated .CSV file with all the variants found in the sequencing experiments and populates the database hosted on a MySQL server. The goal of VarHunter is to help researchers to easily manage the results in order to have a clear view of the big amount of data generated by NGS experiments.  
 Materials and Methods: The database is hosted on a MySQL 5.7 server and the platform is implemented in Node.js, in particular Node.js is used with the framework Express.js.  
 Results: We compared the results obtained from ten subject affected by a neurological disease. This platform, thanks to its efficiency and reliability, allows the user to have the results well organized and almost instantaneously. Before the advent of VarHunter, the scientist usually employed different tools, such as Excel filtering, that are not specifically built for this kind of analysis. VarHunter is able to reduce the time and the effort respect to the previous analysis, also integrating various data coming from the most important genetic and biological databases.  
 Conclusions: VarHunter is a new platform to process and analyze data from patients with neurological diseases in order to find new variations associated to the pathological phenotype. It simplifies the work of researchers helping them to manage their data through the definition of projects and simplifying the way for searching the genetic variation underlying the disease, providing specifically built tools to help their work.





**P186**  
**New evidence for the involvement of MIR96 gene in dominant non-syndromic hearing loss**

A. Bussini<sup>1,2</sup>, C. Pessina<sup>2</sup>, R. Righi<sup>2</sup>, A.P. Genoni<sup>2,3</sup>, E. Cristofari<sup>4</sup>, R. Casalone<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Università degli Studi dell'Insubria, Dip. Medicina Clinica e Sperimentale, Varese

<sup>2</sup>SSD Lab. Analisi, SMEL Citogenetica e Genetica Medica ASST Sette Laghi, Osp. di Circolo e Fond. Macchi, Varese

<sup>3</sup>Università degli Studi dell'Insubria, Dip. Biotecnologie e Scienze della Vita, Varese

<sup>4</sup>SSD ORL Servizio di Audiologia, ASST Sette Laghi, Osp. di Circolo e Fond. Macchi, Varese

MicroRNAs (miRNAs) are short (20-24 nt) single stranded noncoding RNAs involved in post transcriptional regulation of gene expression. The normal developmental of the inner ear and the complex process of auditory signal transduction result from a coordinated expression of genes and regulator factors. It is widely demonstrated the increasingly role of epigenetics in hearing disorders; the MIR96 gene, located on 7q32, is essential for gene expression regulation in cochlear hair cells and it was associated to autosomal dominant nonsyndromic hearing loss (DFNA50). In two previous papers heterozygous point mutations in the MIR96 gene were reported in families' members with dominant non syndromic sensorineural hearing loss. The +57(T>C) mutation is located within the companion miR-96\* and change the proper maturation of the precursor decreasing the mature form of the miR-96. This mutation was described in patients with hearing loss characterized by a postlingual onset and a slow progression of hearing impairment. Furthermore, the presence of this mutation in healthy young individuals may suggest an incompleteness of penetrance. Here we report two members of a Italian family with non syndromic dominant hearing loss and heterozygous mutation +57(T>C) in the MIR96 gene. Unlike previous paper, patients show early hearing loss. Moreover, the +57(T>C) mutation was identified in a 42-years-old healthy family member. We suppose that the onset of disease involve several factors, not only genetics; the MIR96 mutations could be a contributory cause of hearing loss influencing the penetrance or the expressivity of the disease.

**P187**  
**Aberrant Alternative Splicing as a new player in Huntington s Disease pathogenesis**

M. Biagioli<sup>1</sup>, C. Dieterich<sup>2</sup>, T. Tripathi<sup>1</sup>, A. Monziani<sup>1</sup>, E. Kerschbamer<sup>1</sup>, J. Zasso<sup>3</sup>, L. Conti<sup>3</sup>, V. Mattis<sup>4</sup>

<sup>1</sup> NeuroEpigenetics Laboratory, Centre for Integrative Biology, University of Trento, Trento, Italy.

<sup>2</sup>Section of Bioinformatics and Systems Cardiology, University Hospital Heidelberg, Germany.

<sup>3</sup>Laboratory of Stem Cell Biology, Centre for Integrative Biology, University of Trento, Trento, Italy.

<sup>4</sup>The Board of Governors Regenerative Medicine Institute, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, U.S.A.

Huntington s Disease (HD), is a hereditary monogenic autosomal dominant, fatal neurodegenerative disorder due to CAG trinucleotide expansion in exon 1 of the HD gene (HTT). Recent findings revealed that the process of alternative splicing (AS) might be compromised in HD. AS regulation is crucial not only to the establishment of a repertoire of protein coding isoforms extremely relevant for the proper physiological characteristics of the nervous system, but also to the biogenesis of circular RNAs (circRNAs), unusually stable, highly expressed non-coding RNAs produced by the circularization of exons which, seems to have important roles during neuronal development and functioning. With this project, we aim to investigate the regulatory role of AS process, locally, at the HTT locus where a short, highly pathogenic fragment is produced and globally at genome-wide level. Locally, we identified and characterized the first circular RNA originating from the HTT locus (circHTT, chr4:3088665-3109150). This circRNA is expressed in whole body, but predominantly in the brain and spinal cord. Importantly, in iPS-derived terminally differentiated neurons (TDN), circHTT expression seems to show increased expression level with increasing HTT CAG size, thus representing a possible important biomarker for the disease. At genome-wide level, preliminary data analysis of circRNA-seq on genetically engineered HdH mouse embryonic stem cells and neural progenitors expressing a single copy of mutant huntingtin (Q20, Q50, Q91, Q111) identified a number of circRNAs sensitive to CAG expansion. Most of the CAG-sensitive circRNAs have annotated human orthologues, thus their expression can be further characterized and functionally studied in human cell lines. In conclusion, our results support the idea that AS is responding to HD mutational process and back-splicing events, in particular, can be altered by the presence of mutant alleles, locally at the HTT locus, but also at genome-wide level. This data will set the stage for follow-up, functional studies. Moreover, this knowledge will pave the way to new trials of therapeutic intervention aimed to target spliceosomal-circRNAs alterations through specific drugs or genetic manipulation.

**P188**  
**Studio epigenetico con approccio bioinformatico tra i profili di metilazione e di espressione genica depositati in repository pubblici del gene GNA15 nei tumori**

A. Mori<sup>1</sup>, G. Innamorati<sup>2</sup>, G. Malpeli<sup>2</sup>, M.T. Valenti<sup>3</sup>, L. Dalle Carbonare<sup>3</sup>, M. Deiana<sup>1</sup>, C. Bassi<sup>2</sup>, G. Malerba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Neuroscienze, Biomedicina e Movimento-UNIVR

<sup>2</sup>Dip. Scienze chirurgiche, Odontostomatologiche e Materno-infantili-UNIVR

<sup>3</sup>Dipartimento di Medicina-UNIVR

Il gene GNA15 (19p13.3), esprime la subunit alpha della proteina G15, un eterodimero della sottofamiglia delle Gq/11 dei Recettori accoppiati alle proteine G (GPCR). Questi sono coinvolti nella trasmissione dei segnali cellulari. Il gene mostra un'espressione limitata negli stadi cellulari immaturi (quali, i precursori ematopoietici), e il suo prodotto si lega con la maggior parte delle GPCR. Tali caratteristiche rendono GNA15 un gene potenzialmente capace di promuovere la crescita tumorale se espresso al di fuori del suo contesto cellulare naturale. Attualmente poco è noto sul controllo della sua espressione genica via metilazione del DNA nei tumori. Al fine di indagare la correlazione tra metilazione e espressione genica abbiamo eseguito sul database METHHC (<http://methhc.mbc.nctu.edu.tw>) un'analisi di 11 tumori (numero di campioni indagati per la metilazione: 4137; numero di campioni per l'espressione: 4394), delle seguenti regioni del gene: le isole CpG, le regioni fiancheggianti (Shelf e Shore), il promotore, le regioni presso il sito d'inizio della trascrizione (TSS), la 5'UTR, il primo esone, il corpo del gene e la 3'UTR. METHHC integra i dati di metilazione e di trascrittomica (RNA-seq) di 18 tumori umani, depositati presso il Cancer Genome Atlas (TCGA). Considerando solamente valori <-3 e >3 dell'indice di correlazione di Pearson (p-value<0,05) tra i livelli di metilazione delle diverse regioni e i livelli di espressione del gene, l'analisi ha indicato che il carcinoma papillare renale mostra correlazioni in quasi tutte le regioni; i tumori della prostata, del pancreas, della tiroide, del seno e a cellule chiare del rene presentano correlazioni a livello del promotore, delle TSS, di 5'UTR, del primo esone e della 3'UTR; poche correlazioni sono state riscontrate nei tumori della vescica, del colon e della pelle; nessuna nei tumori del fegato e dello stomaco. A differenza di tutte le altre regioni che mostrano una correlazione negativa, le regioni S-Shelf e 3'UTR hanno una correlazione positiva; le isole CpG non presentano correlazione in alcun tumore. Concludendo, abbiamo osservato che lo stato di metilazione e, di conseguenza, l'espressione di GNA15 varia da tumore a tumore, suggerendo un suo ruolo funzionale solo in alcuni di essi.



**P189**  
**Terapie innovative per tumori aggressivi della regione testa-collo**

C. Mio<sup>1</sup>, L. Allegrini<sup>1</sup>, F. Baldan<sup>2</sup>, J. Milasin<sup>3</sup>, M. Lazic<sup>3</sup>, G. Damante<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Area Medica, Università di Udine, Udine

<sup>2</sup>Dip. Medicina Interna e Specialità Mediche, Università Sapienza di Roma, Roma

<sup>3</sup>Dip. di Genetica Umana, Università di Belgrado, Belgrado, Serbia

<sup>4</sup>Azienda Sanitaria Universitaria Integrata di Udine, Udine

Il carcinoma orale a cellule squamose (OSCC) e il carcinoma tiroideo anaplastico (ATC) rappresentano due tumori della testa e del collo molto aggressivi e che sono resistenti alle terapie farmacologiche attualmente disponibili. Pertanto, la ricerca di nuovi target terapeutici risulta essere di fondamentale importanza. Nell'ambito dei Progetti di grande rilevanza del Ministero degli Affari esteri (MAECI), l'Istituto di Genetica Medica dell'Università di Udine ha instaurato una collaborazione con l'Istituto di Genetica Umana dell'Università di Belgrado. Attraverso questa cooperazione, i due gruppi si sono concentrati sull'utilizzo di inibitori delle proteine BET (BETi), come terapia per questi due tipi di tumori. Questi farmaci agiscono sulla regolazione dell'espressione genica attraverso l'inibizione di particolari epigenetic readers, le proteine BET (Bromodomain and Extra-Terminal proteins), che interagiscono con i gruppi acetilati degli istoni promuovendo la trascrizione. In particolare, il focus di questo progetto è stata la identificazione delle pathways implicate negli effetti biologici derivanti dall'inibizione delle proteine BET, al fine di identificare nuovi target terapeutici per OSCC e per ATC. Il trattamento con 3 BETi (JQ1, I-BET151, I-BET762) riduce significativamente la vitalità di 3 linee cellulari di ATC (FRO, SW1736, 8505C) e 1 di OSCC (SCC-25). Contestualmente si rileva un aumento dei processi apoptotici. Al fine di identificare gli effettori dei BETi, è stata eseguita un'analisi di RNA-seq, che ha permesso di evidenziare come una delle principali pathway coinvolte nell'effetto di questi farmaci fosse la regolazione del ciclo cellulare. Inoltre, attraverso l'analisi dell'espressione dei microRNA, è stato possibile mettere in luce come questi farmaci agiscano anche modulando la componente degli RNA non codificanti. Complessivamente questi dati suggeriscono come gli effetti dei BETi venga esplicati attraverso diversi meccanismi d'azione. Inoltre, suggeriscono il possibile utilizzo di questi inibitori nel trattamento di questi tumori.





**P190**  
**Nuovo marker predittivo della risposta allo stress ossidativo: l'asse HSF1-FoxO3A regola la longevità mediante l'allele G dello SNP rs2802292**

V. Grossi<sup>1</sup>, G. Forte<sup>2</sup>, P. Sanese<sup>1</sup>, A. Peserico<sup>1</sup>, M. Lepore Signorile<sup>1</sup>, T. Tezì<sup>1</sup>, R. Bagnulo<sup>1</sup>, D. Loconte<sup>1</sup>, R. Lovaglio<sup>1</sup>, F. Susca<sup>1</sup>, N. Resta<sup>1</sup>, C. Simone<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana (DIMO), Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Italia

<sup>2</sup>Genetica Medica, Istituto Nazionale di Gastroenterologia, IRCCS S. de Bellis, Castellana Grotte (BA), Italia

Le cellule eucariotiche presentano una sorprendente capacità di resistenza a diverse forme di stress (ossidativo, metabolico, etc) grazie all'attivazione di vie di segnalazione mediate da HSF1 e FoxO3A. Questi due fattori di trascrizione attivano un meccanismo conservato a livello evolutivo nella risposta allo stress e nella longevità. Nell'uomo, l'allele G dello SNP rs2802292 sul locus di FoxO3A è associato alla longevità in diverse popolazioni. Infatti, il suo numero di copie è associato ad una frequenza ridotta di patologie legate all'età nei centenari e al minor rischio di sviluppare il cancro nei pazienti con mutazioni nella linea germinale PTEN e STK11. A livello molecolare, l'allele G dello SNP intronico rs2802292 correla con un aumento dell'espressione di FoxO3A, suggerendo che il secondo introne del locus di FoxO3A può rappresentare una regione regolatrice. In questo lavoro dimostriamo che la regione dello SNP intronico ha funzione di enhancer e che l'allele G dello SNP rs2802292 crea un nuovo sito di legame HSE per il fattore di trascrizione HSF1. Inoltre, l'analisi dei marchi istonici specifici delle regioni regolatrici attive (H3K4me1/H3K27ac) ci ha permesso di individuare un nuovo sito HSE nella regione del 5' UTR del locus di FoxO3A. I nostri dati mostrano che, dopo l'induzione di stress, HSF1 lega con efficienza le regioni del 5' UTR e del rs2802292 del locus di FoxO3A in linee continue (HEK-293), in fibroblasti primari umani omozigoti per l'allele G (GG) e in una linea aploide contenente l'allele con la copia G (generata con la tecnica del CRISPR/Cas9). Per la prima volta si dimostra che differenti tipi di stress cellulare inducono il reclutamento di HSF1 in un unico sito di legame al DNA che si crea in presenza dell'allele G dello SNP intronico rs2802292. Questa regione ha proprietà regolatrici e la sua attivazione induce l'aumento dei livelli di FoxO3A e l'avvio del suo programma trascrizionale incrementando la tolleranza allo stress in colture cellulari di fibroblasti primari a breve, medio e lungo termine. L'allele G dello SNP rs2802292 potrebbe essere utilizzato come marker predittivo nella prognosi e nella risposta alla terapia in diverse condizioni che scatenano la risposta allo stress ossidativo in cellule e tessuti.

**P191**  
**Caratterizzazione molecolare e funzionale di una nuova isoforma mitocondriale del fattore di trascrizione FoxO3A**

L. Russo<sup>1</sup>, V. Celestini<sup>2,7</sup>, T. Tezì<sup>1</sup>, C. Fasano<sup>1</sup>, G. Forte<sup>1</sup>, P. Sanese<sup>2</sup>, A. Peserico<sup>2</sup>, M. Lepore Signorile<sup>2,8</sup>, V. Disciglio<sup>1</sup>, D. De Rasmio<sup>3</sup>, A. Signorile<sup>4</sup>, R. Gadaleta<sup>5,6</sup>, N. Scialpi<sup>6</sup>, M. Terao<sup>7</sup>, E. Garattini<sup>7</sup>, T.M. Cocco<sup>4</sup>, G. Villani<sup>4</sup>, A. Moschetta<sup>6</sup>, V. Grossi<sup>2</sup>, C. Simone<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica, Istituto Nazionale di Gastroenterologia, IRCCS S. De Bellis, Castellana Grotte (Bari), Italia.

<sup>2</sup>Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana (DIMO), Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Italia

<sup>3</sup>Istituto di Biomembrane e Bioenergetica, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Bari, Italia.

<sup>4</sup>Dipartimento di Scienze mediche di base, neuroscienze e organi di senso, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Italia.

<sup>5</sup>Divisione di Malattie Digestive, Dipartimento di Chirurgia ed Oncologia, Imperial College London Queen Elizabeth the Queen Mother Wing (QEQM), Londra, W2 1NY, UK.

<sup>6</sup>Medicina Interna Universitaria Frugoni, Dipartimento di Medicina Interdisciplinare, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Italia.

<sup>7</sup>Dipartimento di Biochimica e Farmacologia Molecolare, Laboratorio di Biologia Molecolare; IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milano, Italia.

<sup>8</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Roma La Sapienza, Roma, Italia.

Il fattore di trascrizione FoxO3A è coinvolto nel controllo del ciclo cellulare, della risposta a stress metabolico, dei meccanismi di riparo del DNA, dell'apoptosi e dell'autofagia. Le sue molteplici funzioni in risposta a vari stimoli extracellulari o metabolici si esplicano grazie ad un codice molecolare che ne regola la sublocalizzazione cellulare. Recentemente abbiamo dimostrato che in cellule di mammifero, in seguito a restrizione glucidica, FoxO3A si accumula nei mitocondri promuovendo l'aumento dell'espressione dei geni mitocondriali, con conseguente aumento della fosforilazione ossidativa, a sostegno del metabolismo cellulare. Questi dati ci hanno spinto a studiare le caratteristiche molecolari di mtFoxO3A, gli eventuali segnali di localizzazione mitocondriale e il suo ruolo nella respirazione cellulare in linee normali e tumorali. L'analisi proteica su linee cellulari sottoposte a riduzione di nutrienti o trattate con inibitori della glicolisi, a seguito di swelling mitocondriale e Proteinase K protection assay, ha dimostrato che mtFoxO3A rappresenta una forma clivata della proteina, mancante della regione N-terminale. Questi dati sono stati confermati dal silenziamento genico. Attraverso l'uso di mutanti per delezione della porzione N-terminale, abbiamo dimostrato che tale regione è indispensabile per la traslocazione di FoxO3A nei mitocondri e che contiene i motivi MPP e MIP (mitochondrial processing/intermediate peptidase), utili per il riconoscimento e il clivaggio di FoxO3A prima del suo ingresso nella matrice mitocondriale. Qui, mtFoxO3A forma un complesso multiproteico (mtFoxO3A/SIRT3/mtRNAPol/TFAM) che agisce sulle regioni regolatorie del mtDNA, portando ad un aumento dell'espressione genica mitocondriale e della respirazione cellulare. La traslocazione mitocondriale di FoxO3A ha dunque un significato nell'adattamento delle cellule normali e tumorali allo stress metabolico. Lo studio delle vie di segnalazione responsabili di questo nuovo asse mitocondriale di FoxO3A (eventuali PMTs nella regione N-terminale e relativi enzimi coinvolti) potrebbe aprire nuove strade per lo sviluppo di molecole efficaci nel contrastare il metabolismo delle cellule tumorali.



**P192**  
**L'oncosoppressore FoxO3A protegge le cellule tumorali da stress metabolico e da chemioterapia grazie alla sua localizzazione mitocondriale**

C. Fasano<sup>1</sup>, V. Celestini<sup>2,7</sup>, T. Tezì<sup>2</sup>, L. Russo<sup>1</sup>, P. Sanese<sup>2</sup>, G. Forte<sup>1</sup>, A. Peserico<sup>2</sup>, M. Lepore Signorile<sup>2,8</sup>, V. Disciglio<sup>1</sup>, D. De Rasmio<sup>3</sup>, A. Signorile<sup>4</sup>, G. Raffaella<sup>5,6</sup>, N. Scialpi<sup>6</sup>, M. Terao<sup>7</sup>, E. Garattini<sup>7</sup>, T.M. Cocco<sup>4</sup>, G. Villani<sup>4</sup>, A. Moschetta<sup>6</sup>, V. Grossi<sup>2</sup>, C. Simone<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica, Istituto Nazionale di Gastroenterologia, IRCCS S. de Bellis, Castellana Grotte, Bari, Italia.

<sup>2</sup>Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Biomediche ed Oncologia Umana (DIMO), Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Italia.

<sup>3</sup>Istituto di Biomembrane and Bioenergetica, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Bari, Italia.

<sup>4</sup>Dipartimento di Scienze mediche di base, Neuroscienze e Organi di Senso, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Italia.

<sup>5</sup>Divisione di Malattie Digestive, Dipartimento di Chirurgia ed Oncologia, Imperial College London Queen Elizabeth the Queen Mother Wing (QEQM), Londra, UK.

<sup>6</sup>Medicina Interna Universitaria Frugoni, Dipartimento di Medicina Interdisciplinare, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Italia.

<sup>7</sup>Dipartimento di Biochimica e Farmacologia Molecolare/Laboratorio di Biologia Molecolare; IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milano, Italia.

<sup>8</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Roma La Sapienza, Roma, Italia.

La riprogrammazione del metabolismo energetico delle cellule tumorali è rilevante nella comprensione dell'omeostasi metabolica cancro-specifica e recentemente, si sta affermando l'idea che il metabolismo mitocondriale sia necessario per la tumorigenesi. In questo studio descriviamo come, in cellule tumorali sottoposte a stress metabolico o chemioterapia (CHT), l'attivazione delle vie di segnalazione MEK/ERK e/o AMPK induca la localizzazione mitocondriale del fattore di trascrizione FoxO3A. Nella matrice mitocondriale, FoxO3A attiva l'espressione genica con conseguente incremento della fosforilazione ossidativa e della sopravvivenza cellulare. La caratterizzazione bioinformatica del dominio N-terminale di FoxO3A ha permesso di identificare nelle serine 12 e 30 gli aminoacidi destinatari del segnale di fosforilazione. Il successivo saggio di fosforilazione in vitro, in accordo con i dati bioinformatici predittivi, ha confermato che la S12 e la S30 sono rispettivamente target di fosforilazione da parte di ERK ed AMPK. L'effetto pro-sopravvivenza di FoxO3A mitocondriale (mtFoxO3A) è stato dimostrato anche in cellule HCT116-FoxO3A<sup>-/-</sup> (generate con la tecnica del CRISPR/Cas9) sottoposte a stress metabolico o trattate con chemioterapici (CDDP, CPT-11, 5-FU, VP-13). Attraverso l'impiego di specifici costrutti (wt o mutanti S/A) abbiamo ricostituito in queste cellule l'espressione di FoxO3A ed abbiamo osservato l'aumento di sopravvivenza cellulare in relazione alla sua funzione mitocondriale. In particolare, utilizzando il mutante FoxO3A-S12A abbiamo dimostrato che l'effetto dei CHT è mediato esclusivamente dalla fosforilazione della S12 dipendente da MEK/ERK, mentre la risposta allo stress metabolico richiede la fosforilazione di entrambe le serine (S12, S30). Diversamente, in cellule tumorali trattate con metformina (attivatore di AMPK) la traslocazione di FoxO3A nel mitocondrio avviene a seguito di fosforilazione della S30 ed induce apoptosi. Il duplice ruolo nucleare e mitocondriale di FoxO3A appare determinante per il destino di sopravvivenza e/o morte della cellula tumorale e fornisce scenari promettenti per

future chemioterapie mirate a disattivare selettivamente la funzione di pro-sopravvivenza mediata dalla da mtFoxO3A.







**P193**  
**Epigenetic modifications and gene expression studies upon human amniotic fluid stem cells treated with chemotherapeutic agents**

P. Upadhyaya<sup>1</sup>, D. Di Tizio<sup>1</sup>, P. Ballerini<sup>1</sup>, I. Antonucci<sup>1,2</sup>, L. Stuppia<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Psychological, Health and Territorial Sciences, Laboratory of Molecular Genetics, School of Medicine and Health Sciences

<sup>2</sup>Stem Tech Group, Center for Aging Studies (CESI)

**BACKGROUND:** Testicular cancer (TC), following the treatment, leads to infertility in some of the patients (30%). In the last years, it has been reported in the literature that human Amniotic Fluid-derived Stem Cells (hAFSCs) show characteristics similar to pluripotent cells of the epiblast and therefore could be considered ideal candidate to generate in vitro germ cells. The purpose of this study was to investigate the epigenetic modifications of hAFSCs during treatment with Bleomycin, Etoposide and Cisplatin (BEP regime).

**METHODS:** hAFSCs were cultured for up to 7 consecutive passages and at 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> passages, Cisplatin, Bleomycin and Etoposide were added into the culture medium. From the dose-response curve, the optimal time of treatment was found to be 48 hours and the IC<sub>50</sub> of Cisplatin, Bleomycin and Etoposide was found to be 5 M, 50 M and 100 M, respectively. Then, the hAFSCs were treated with the respective IC<sub>50</sub> and IC<sub>5</sub> (concentration 10 times dilute than IC<sub>50</sub>) for epigenetics as well as mRNA and protein expression studies.

**RESULTS:** Expression analysis by quantitative PCR and flow cytometry showed the decrease in expression of pluripotency-associated genes (OCT3/4, SOX2, CMYC and KLF4) in the cells treated with the chemotherapeutic drugs as compared to the control. However, Etoposide 100 M showed increased expression of mRNA for these markers, but decreased expression of functional proteins. Epigenetic studies by histone analysis (H3K4me3 and H3K9ac) showed a related pattern of trimethylation and acetylation, i.e. decrease in all treatments, except in Etoposide 100 μM. Global DNA methylation experiments have demonstrated a minute difference in methylation among the treated cells with respect to control, but the demethylation was noticeably higher in Etoposide 100 μM.

**CONCLUSION:** The BEP regime was found to be acting epigenetically on the DNA and histones of hAFSCs. Different drugs, at different concentrations lead to different results. E.g., in Etoposide 100 μM, the hyper-trimethylation of histone-3 is probably correlated with the higher levels of mRNA for pluripotency markers, even if the total mRNAs do not translate into proteins. In future, more detailed study could be used to understand these changes and to investigate male infertility during BEP regime.

**P194**  
**Disregolazione di un panel di miRNA profibrogenici nelle malattie polmonari fibrotiche**

A. DE SILVESTRI<sup>1</sup>, C. CAPITINI<sup>1</sup>, I. CAMPO<sup>2</sup>, F. MELONI<sup>2</sup>, C. REBUFFI<sup>1</sup>, C. TINELLI<sup>1</sup>, M. ZORZETTO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servizio di Epidemiologia clinica e Statistica Medica, Direzione Scientifica, IRCCS Pol. San Matteo, Pavia

<sup>2</sup>Dip. Cardio-toraco-vascolare, IRCCS Pol. San Matteo, Pavia

I microRNA (miRNA) sono molecole endogene di RNA non codificante a singolo filamento (20-22 nucleotidi) attivi nella regolazione dell'espressione genica a livello trascrizionale e post-trascrizionale. Regolano l'espressione genica tramite una parziale similarità di sequenza con il trascritto bersaglio. Il silenziamento dell'espressione genica avviene per inibizione della sintesi proteica. La fibrosi idiopatica polmonare (IPF), la polmonite organizzata criptogenetica (COP) e la sindrome da bronchiolite obliterante (BOS) sono rari disturbi polmonari legati dalla presenza di lesioni fibrotiche. Su BOS sono stati identificati da un precedente studio computazionale un gruppo di miRNA candidati successivamente confermati da ibridazione in situ (ISH) e qRT-PCR, (miR-21 e miR-34). Altri miRNAs sono stati indicati come potenziali candidati in BOS mediante analisi computazionale. Ci si propone di estendere il lavoro precedente analizzando l'espressione di miR-21, miR-34a e tre altri miRNA altamente correlati (miR-145, miR-146b-5p e miR-381) in BOS e in altre malattie polmonari associate all'attivazione/proliferazione dei fibroblasti e alla deposizione di collagene. Abbiamo valutato il profilo dell'espressione di miRNA mediante ISH e RT-PCR in una serie di campioni di tessuto polmonare fissati in paraffina da pazienti con IPF (n=8), COP (n=8), BOS (n=12) e controlli da donatori di organi (n=9). ISH e qRT-PCR sono state eseguite secondo protocolli standard (Exiqon). L'espressione di miRNA è stata confrontata tra i gruppi con analisi non parametrica della varianza (test Kruskal-Wallis) seguito da confronti post-hoc a 2x2 con correzione per test multipli. L'analisi qRT-PCR ha confermato il precedente trend di espressione per la maggior parte dei miRNA analizzati, anche se la significatività statistica non è sempre stata raggiunta. Nessun dato qPCR è stato ottenuto per miR-381. In particolare miR-21 e miR-146b-5p sono risultati in mediana maggiormente espressi in IPF (92 [IQR 54-142]; 0.58 [0.32-1.05]) e COP (113 [65-130]; 0.68 [0.39-1.32]) rispetto ai controlli (5 [3-7]; 0.14 [0.12-0.17]). Questo studio può contribuire ad identificare un profilo specifico di espressione di miRNA correlati alle diverse patologie con implicazione diagnostica e in futuro terapeutica.

**P195**  
**HIF1A dual transcription activity: HIF1A driven response in normoxia and in hypoxia**

F. Cimmino<sup>1,2</sup>, M. Avitabile<sup>1,2</sup>, V.A. Lasorsa<sup>1,2</sup>, L. Pezone<sup>1,2</sup>, A. Iolascon<sup>1,2</sup>, M. Capasso<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Naples, Italy

<sup>2</sup>CEINGE Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy

<sup>3</sup>IRCCS SDN, Istituto di Ricerca Diagnostica e Nucleare, Naples, Italy

High-risk Neuroblastomas (NB) harbor rare and few recurrent mutations and continued investigation is expected to reveal new insights including gene-environment interactions. We have previously reported that high expression levels of HIF1A (Hypoxia Inducible Factor 1A) in both hypoxic as normoxic areas of tumors may stratify NB patients with poorer prognosis. We hypothesize that understanding the interplay between HIF1A driven gene expression (tumor signature) and low oxygen concentrations (environment) may meliorate survival/therapeutic successes in patients with high-risk tumors which lack of precisely genomic causes. In our study we have dissected HIF1A transcription activity in normoxic and hypoxic conditions. The analysis of pathways regulated by HIF1A exclusively in normoxic NB cells shows a role of HIF1A in metabolic process necessary for tumor cells viability. Contrary, in hypoxic NB cells the absence of HIF1A affects the activation of neuronal differentiation pathways. Mostly of HIF1A target genes expressed in both oxygen conditions belonged to MAPK pathways which is frequently mutated in high-risk NB at relapse and diagnosis. Genes regulated by HIF1A in both normoxic and hypoxic areas provide novel targets for a precision therapy aimed to completely eradicate malignant cells. HIF1A driven response in hypoxia is determined by epigenetic control of oxygen levels at DNA methylation status. Gene signatures generated from correlation between gene expression and DNA methylation in hypoxia, HIF1A dependently or HIF1A independently, provide novel risk factors for NB stratification at diagnosis. In conclusion, our study shows HIF1A has a dual transcription activity in solid tumors. Targeting of hypoxia signaling still has limitations in clinics with regard to resistance to therapy. The dissection of HIF1A activity has helped to understand the molecular mechanisms by which hypoxia reshapes tumors and provide new direction for hypoxia tumor treatment.



**P196**  
**Differential DNA methylation in white blood cells from asbestos exposed malignant pleural mesothelioma patients and healthy subjects**

S. Guarrera<sup>1,2,15</sup>, C. Viberti<sup>1,2,15</sup>, G. Cugliari<sup>1,2</sup>, A. Allione<sup>1,2</sup>, E. Casalone<sup>1,2</sup>, M. Betti<sup>3</sup>, D. Ferrante<sup>4,5</sup>, A. Aspesi<sup>3</sup>, F. Grosso<sup>6</sup>, R. Libener<sup>7</sup>, C. Casadio<sup>8</sup>, E. Piccolini<sup>9</sup>, D. Mirabelli<sup>10,11,12</sup>, I. Dianzani<sup>3,12</sup>, C. Magnani<sup>13,5,12</sup>, G. Matullo<sup>2,1,14,12</sup>

<sup>1</sup>Italian Institute for Genomic Medicine, IIGM, Turin, Italy

<sup>2</sup>Dep. of Medical Sciences, Univ. of Turin, Turin, Italy

<sup>3</sup>Dep. of Health Sciences, Univ. of Piemonte Orientale, Novara, Italy

<sup>4</sup>Medical Statistics and Cancer Epidemiology Unit, Dep. of Translational Medicine, Univ. of Piemonte Orientale, Novara, Italy

<sup>5</sup>Cancer Epidemiology Unit, CPO-Piemonte Novara, Italy

<sup>6</sup>Division of Medical Oncology, SS. Antonio e Biagio General Hosp., Alessandria, Italy

<sup>7</sup>Pathology Unit, SS. Antonio e Biagio General Hosp., Alessandria, Italy

<sup>8</sup>Thoracic Surgery Unit, AOU Maggiore Della Carità, Novara, Italy

<sup>9</sup>Pneumology Unit, Santo Spirito Hosp., Casale Monferrato, Italy

<sup>10</sup>Cancer Epidemiology Unit, Department of Medical Sciences, Univ. of Turin

<sup>11</sup>Cancer Epidemiology Unit, CPO Piemonte, Turin, Italy

<sup>12</sup>Interdepartmental Center for Studies on Asbestos and Other Toxic Particulates "G. Scansetti", Univ. of Turin, Turin, Italy

<sup>13</sup>Unit of Medical Statistics and Epidemiology, Dep. of Translational Medicine, Univ. of Piemonte Orientale, Novara, Italy

<sup>14</sup>Medical Genetics Unit, AOU Città della Salute e della Scienza, Turin, Italy

<sup>15</sup>Equally contributed

**Background and Aims**  
 Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an aggressive tumor strongly associated with asbestos exposure. Due to widespread use of asbestos in the past decades, MPM incidence has dramatically increased, posing a major public health challenge. Monitoring of exposed people aiming at an early MPM diagnosis through biomarkers in blood or other easily accessible body fluids might improve life expectancy. Therefore we investigated if white blood cells (WBCs) DNA-methylation profiles are associated with MPM occurrence.

**Methods**  
 Whole genome DNA-methylation was investigated by microarray analysis of 300 subjects exposed to asbestos: 82 MPM cases and 68 healthy controls were initially used as discovery panel (Training Set) and results were replicated in the second set (81 cases and 69 controls, Test Set) sampled from the same areas.

**Results**  
 We found several differentially methylated CpGs between cases and controls, the majority of them hypomethylated in MPM cases. Pathway analysis revealed an enrichment in immune system genes. Seven differentially methylated single-CpGs and 5 genomic regions replicated with similar effect size in the Test Set (p<sub>adj</sub><0.05). The top hypomethylated single-CpG (cases vs ctrs delta Beta-value=-0.15, p<<0.05 in both Training and Test sets) was located in a gene coding for an interactor of BAP1, reported mutated in familial MPM. In the Test set, comparison of receiver operating characteristic (ROC) curves and the area under the curve (AUC) of two models, including/excluding methylation as predictor, showed a significant increase in discrimination between cases and controls when DNA methylation profiles were considered together with





asbestos exposure (AUC=0.81 vs AUC=0.89, DeLong s test  $p=0.0013$ ).

#### Conclusions

Our study identified signatures of differential methylation in DNA from whole blood between asbestos exposed MPM cases and controls, both at single-CpG and at genomic region levels. We suggest that differential methylation patterns of selected CpGs in DNA from WBCs may aid in discriminating MPM cases from asbestos-exposed non MPM subjects. If verified in prospectively collected samples, CpGs methylation may be useful to improve MPM risk estimation for subjects occupationally and/or environmentally exposed to asbestos.

P197

#### Analisi dell'espressione genica e ruolo funzionale degli enzimi DNMT3A e DNMT3B nel rhabdomyosarcoma

F. Megiorni<sup>1</sup>, S. Camero<sup>1,2</sup>, S. Ceccarelli<sup>2</sup>, O. Mannarino<sup>1</sup>, F. Marampon<sup>3</sup>, C. Marchese<sup>2</sup>, A. Clerico<sup>1</sup>, A. Pizzuti<sup>2</sup>, C. Dominici<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Pediatria e Neuropsichiatria Infantile, SAPIENZA - Università di Roma.

<sup>2</sup>Dip. di Medicina Sperimentale, SAPIENZA - Università di Roma.

<sup>3</sup>Dip. di Scienze Cliniche Applicate e Biotecnologiche, Università dell'Aquila.

Il controllo epigenetico è esercitato da tre principali meccanismi: metilazione del DNA, modificazioni istoniche e RNA non codificanti. Numerosi studi hanno evidenziato il coinvolgimento degli enzimi responsabili della metilazione del DNA nello sviluppo e progressione di molte neoplasie umane, ma pochi dati sono presenti nel rhabdomyosarcoma (RMS). L'RMS è il sarcoma dei tessuti molli più comune in età pediatrica, origina dalle cellule mesenchimali del tessuto muscolare striato e presenta due istotipi principali, l'alveolare e l'embrionale, con caratteristiche cliniche e genetiche ben distinte. Obiettivo della ricerca è stato di analizzare i livelli di espressione genica e il ruolo delle DNA metiltransferasi de novo nell'RMS. I livelli di trascritto DNMT3A e DNMT3B sono stati esaminati in biopsie tumorali di RMS e in campioni di muscolo striato sano (NSM) mediante Real Time PCR. Esperimenti di RNA interference sono stati effettuati in linee cellulari di RMS per valutare, mediante saggi cellulari e molecolari, gli effetti del silenziamento di DNMT3A o DNMT3B sul fenotipo cellulare, sulla capacità di crescere, metastatizzare o differenziare. I risultati ottenuti indicano che i geni DNMT3A e DNMT3B sono iperespressi nei campioni di RMS rispetto all'NSM. Le cellule deplete della proteina DNMT3A non mostrano cambiamenti morfologici evidenti rispetto al controllo, pur presentando un blocco in G2 e un'alterata espressione di marcatori del ciclo cellulare. Le cellule silenziate dell'enzima DNMT3B presentano una minore proliferazione, con arresto del ciclo cellulare in G1, nonché una ridotta capacità di migrare e formare colonie rispetto al controllo. Solo il knock-down del gene DNMT3B è in grado di indurre il differenziamento muscolare, con cellule che mostrano un aspetto allungato/multinucleato e una riattivazione di marcatori miogenici, mediata da controllo trascrizionale specifico. In conclusione, le nostre osservazioni aggiungono un tassello alla comprensione del puzzle eziologico dell'RMS e aprono interessanti prospettive per l'identificazione di nuovi marcatori prognostici/diagnostici e l'impiego di terapie epigenetiche adiuvanti -mediante il ripristino dei normali livelli di DNMT3B- in grado di contrastare più efficacemente questo tipo di tumore infantile.

P198

#### Characterization of Histone post-translational modifications using a Top-Down, label-free, LC- MALDI-TOF Mass Spectrometry approach

S. De Benedittis<sup>1,2</sup>, A. Magariello<sup>1</sup>, P. Spadafora<sup>1</sup>, A. Patitucci<sup>1</sup>, N. Romeo<sup>1</sup>, A. Bagal<sup>1</sup>, A. Quattieri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Scienze Neurologiche, CNR, Mangone, Cosenza

<sup>2</sup>Dip. di Farmacia e Scienze della salute e della Nutrizione, Università della Calabria, Rende

**Introduction.** The post-translational (PTMs) modifications of nuclear histones, as well known, play an essential role both in the DNA packaging mechanism in chromosomes that in the regulation of gene expression in different cellular processes, especially in response to molecular agents of environmental origin (epigenetic regulation). **Aim.** The characterization of histone PTMs is traditionally performed by the use of antibodies. However, these methods are often not sufficiently specific and today systems that use mass spectrometry are increasingly used. In this context, our research aims to improve the methodologies based on mass spectrometry mainly in relation to the comprehensivity, simplicity and rapidity of the characterization.

**Methods.** For this purpose, a top-down analysis of MALDI-In Source Decay (MALDI-ISD) analysis, on HPLC fraction of nuclear extracts obtained from immortalized EBV lymphocytic lines, was applied. The cells grown in RPMI 1640 medium were lysed and the collected nuclear fraction was subjected to acid extraction with 0.8M HCl. A preliminary MALDI-TOF profiling analysis was performed on the whole crude extract, and successively this was subjected to HPLC separation from which homogenous fractions of histones (H2A, H2B, H3.1, H3.2, H3.3 and H4) were obtained. Fractions of interest were analyzed using MALDI-ISD using 1.4 DAN as matrix, in order to obtain sequencing and PTMs data. In some cases, a PSD analysis was also performed on fragments generated by the ISD ( $MS^3$ ) to confirm data.

**Results.** The MALDI-TOF profiling of the crude nuclear extract revealed the presence of the principal types of histones, allowing also a relative quantitative evaluation. Subsequently, the MALDI-ISD analysis of the HPLC fractions provided information on both the amino acid sequence and the PTMs present. In particular, we were able to define, in the same experiment the presence in H4 of a dimethylation (above 90%) in the lysine at position 20 (H4K20Me2).

**Conclusions.** In conclusion, the MALDI-ISD methodology allows to obtain global information on histone PTMs with specificity, rapidity and simplicity, effectively contributing to reveal the influence of environmental molecular factors in epigenetic regulation, histone mediated.



P199

#### Epigenetic modifications of nicotine on fetus: human Amniotic Fluid Stem Cells as new model for in vitro studies

D. Di Tizio<sup>1</sup>, P. Upadhyaya<sup>1</sup>, P. Ballerini<sup>1</sup>, L. Stuppia<sup>1,2</sup>, I. Antonucci<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Psychological, Health and Territorial Sciences, Laboratory of Molecular Genetics, School of Medicine and Health Sciences

<sup>2</sup>Stem Tech Group, Center for Aging Studies (CESI)

**BACKGROUND:** Maternal smoking during pregnancy continues to represent a major public health concern. Recently it was discovered that in pregnant smokers, levels of nicotine in amniotic fluid are severely elevated which may affect the developing fetus. In this study, human Amniotic Fluid-derived Stem Cells (hAFSCs) were treated with nicotine to investigate epigenetic modifications in vitro.

**METHODS:** hAFSCs were cultured for up to 7 consecutive passages and in between 5<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> passages, nicotine was added into the culture medium in three different concentrations (0.01  $\mu$ M, 0.1  $\mu$ M and 1  $\mu$ M) for 6 hours, 24 hours and 48 hours for epigenetics and expression studies by real-time PCR.

**RESULTS:** Expression analysis by quantitative PCR showed the increase in expression of pluripotency-associated genes (OCT3/4, SOX2, KLF4) in the cells treated with the nicotine as compared to the control. However, nicotine 1 M showed minute decrease in expression of mRNA for these markers and significant decrease in c-Kit expression. Epigenetic studies by global DNA methylation have demonstrated a reduction of methylation in DNA in the treated cells with respect to control and increased methylation in the samples treated with nicotine 1  $\mu$ M. In this study, mRNA N<sup>6</sup>-methyladenosine ( $m^6A$ ) levels in all the samples were also checked using Elisa quantification. However the data did not show any significant variation among the samples.

**CONCLUSION:** The nicotine was found to be acting epigenetically on the DNA of hAFSCs. Lower concentration (0.01  $\mu$ M - 0.1  $\mu$ M) of nicotine, like in case of moderate smokers, causes increased pluripotency, which may cause hurdle to differentiate the stem cells. Mother's habits, like smoking during pregnancy can cause epigenetic changes in the fetus and hAFSCs are useful model to understand these variations in vitro. In future studies we can elaborate better the effects of tobacco smoking on fetus, on its development and health.





**P200**  
**DNA polymerase gamma gene methylation analysis in Alzheimer s disease and amyotrophic lateral sclerosis patients**

A. Stoccoro<sup>1,2</sup>, R. Gallo<sup>1</sup>, L. Mosca<sup>3</sup>, G. Siciliano<sup>4</sup>, F. CoppedL<sup>1</sup>, L. Migliore<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. of Translational Research and New Technologies in Medicine and Surgery, Section of Medical Genetics, University of Pisa

<sup>2</sup>Doctoral School in Genetics Oncology and Clinical Medicine, Dep. of Medical Biotechnologies, University of Siena, Siena, Italy

<sup>3</sup>Medical Genetics Unit, Dep. of Laboratory Medicine, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milan, Italy

<sup>4</sup>Dep. of Clinical and Experimental Medicine, University of Pisa, Neurological Clinic, Pisa, Italy

Mitochondrial dysfunction occurs early in neurodegenerative diseases, both in affected tissues and in peripheral blood cells. It is well known that altered mitochondrial function is able to induce aberrant epigenetic modifications and several reports have highlighted that DNA methylation deregulation has an important role in the etiology of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer s disease (AD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Recently we have observed that methylation levels of mitochondrial displacement loop (D-loop) region, which regulates mitochondrial DNA (mtDNA) transcription and replication, are decreased in peripheral blood of AD patients, suggesting a role of mtDNA epimutations in AD. In the current study we focused on a nuclear gene that is critical for mtDNA replication and repair, the DNA polymerase gamma (POLG) gene. Analyses of POLG methylation levels were performed by means of the Methylation Sensitive-High Resolution Melting (MS-HRM) technique, in peripheral blood DNA of 25 AD patients, 20 ALS individuals and 30 healthy control subjects. Moreover, by using data on mtDNA methylation levels in these individuals already available, we searched for correlations between POLG and D-loop methylation levels. MS-HRM analyses showed that POLG methylation levels ranged from 60 to 100%, with a mean of 86% in AD patients, 77% in ALS individuals and 85% in control subjects. Multivariate analysis of variance corrected for age and gender showed that POLG methylation was lower in ALS respect to both control subjects and AD patients with a tendency to significance (P= 0.075 and P= 0.055, respectively). Interestingly a negative correlation between D-loop region and POLG methylations was observed (r=-0.26; P= 0.021) suggesting that methylation levels of these genes could be related to each other. In order to confirm the observed results we are currently increasing the sample size with the purpose to enroll at least 50 AD patients, 50 healthy controls and 30 ALS patients. Moreover to better understand the role of D-loop and POLG methylation on mitochondrial metabolism the results will be correlated with mtDNA copy number.

**P201**  
**MiR-96-3p, the neglected miRNA sister of the deafness-associated miR-96-5p, in mouse development**

M. Robusto<sup>1,2,4</sup>, V. Massa<sup>3,4</sup>, C. Chierighin<sup>1,2</sup>, P. Colapietro<sup>3</sup>, E. Di Fede<sup>3</sup>, R. Asselta<sup>1,2</sup>, S. Duga<sup>1,2</sup>, G. Sold<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Biomedical Sciences Department, Humanitas University, Rozzano (Milan), Italy

<sup>2</sup>Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano (Milan), Italy

<sup>3</sup>Department of Health Sciences, Universit degli Studi di Milano, Milan, Italy

<sup>4</sup>These authors equally contributed to this work

We previously reported a deafness-causing mutation within the MIR96 gene, miR-96(+57T>C), which affects the miR-96-3p seed region and alters the correct maturation of the miR-96 precursor. While the function of the major product of MIR96, i.e. miR-96-5p, has been extensively investigated, the biological function of its partner strand still remains unclear. With this as background, we first characterized miR-96-3p expression during mouse development, and compared it with the expression of miR-96-5p in several tissues at different developmental stages by real-time RT-PCR. Surprisingly, although the two miRNAs have a similar expression profile, miR-96-3p is more expressed than its sister miRNA during early embryogenesis, suggesting a possible switch in the pre-miRNA dominant arm. These initial results were further corroborated by in-situ hybridizations on 10.5-17.5 days post-coitum mouse embryos. Indeed, both miR-96-3p and miR-96-5p are co-expressed in several tissues (neural tube, somites, and developing ear) but show a different spatio-temporal distribution. Given the high expression of the miR-96-3p at early embryonic stages, we sought to identify biologically relevant miR-96-3p targets by analyzing the transcriptome of murine ES cells upon miRNA inhibition. A total of 39 significantly differentially expressed genes were found, the majority of which were upregulated. Among them, the most interesting one is Kit, which is now being functionally validated. Finally, to understand which factors may influence miRNA strand selection and favour miR-96-3p/miR-96-5p switch, we performed immunohistochemical analysis of Argonaute (Ago1-4) proteins, involved in miRNA biogenesis. The data did not evidence a specific overlap of Ago 1,2,3 with miR-96 expression, although a regionalized protein distribution, especially in the neural tube and brain, was found. On the contrary, Ago 4 seems to be expressed at very low levels. In conclusion, we report for the first time the highly-specific and regulated pattern of expression of miR-96-3p during mouse development, suggesting both distinct and common roles compared to its partner miRNA. This work is supported by the Fondazione Cariplo, grant no 2013-0825.

**P202**  
**Significato clinico di possibili CNV in MLID (Multilocus Imprinting Disturbances)**

A.V. Gulino<sup>1,2</sup>, S. Guarducci<sup>2</sup>, M. Pantaleo<sup>2</sup>, S. Bargiacchi<sup>2</sup>, G. Traficante<sup>2</sup>, E. Andreucci<sup>2</sup>, S. Romano<sup>2</sup>, M. Della Monica<sup>2</sup>, R. Artuso<sup>2</sup>, V. Palazzo<sup>2</sup>, S. Landini<sup>2</sup>, S. Giglio<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UO Pediatria, Ospedale di Assisi

<sup>2</sup>SOC Genetica Medica, Osp Meyer, Firenze

L Imprinting Genomico (IG) interessa circa l 1% del genoma e potenzialmente accresce la penetranza dei difetti genetici poichØ una singola alterazione L in grado di abolire la funzione del locus imprintato (aploidia funzionale). Alcuni geni imprintati hanno un ruolo emergente nella fisiopatologia placentare, che influenza l outcome fetale e pu essere responsabile del parto pretermine come di effetti a lungo termine sul soggetto IUGR o SGA. Abbiamo analizzato le CNVs presenti sugli autosomi in 1405 pazienti, afferiti alla SOC di genetica Medica dell AOU Meyer di Firenze (2009-2017), focalizzandoci su pazienti portatori di una singola CNV, per un tot di 858 casi: 162 presentavano CNVs de novo, mentre 397 erano ereditate. Abbiamo ricercato quali tra queste CNV interessassero loci imprintati noti, e potenzialmente implicati e abbiamo cercato di effettuare una correlazione genotipo-fenotipo, considerando l eventuale ruolo dell IG. Abbiamo trovato che 54 pazienti potessero presentare le caratteristiche di interesse. Per es, tra i casi riportiamo una paziente con un fenotipo Silver Russel-like, ascrivibile quindi ad un difetto di imprinting, con microcefalia e ridotta crescita sia pre- che postnatale, clinodattilia del V dito, iperlassit ligamentosa, difficolt scolastiche, ritardo del linguaggio, selettivit nel cibo. Durante la gravidanza era emersa alterazione della flussimetria placentare e IUGR. I test di metilazione del 11p15.5 e l isodisomia del 7 sono risultate negative. La paziente presenta una duplicazione di 75Kb in 19q13.42, ereditata dalla madre, che comprende il gene NLRP12, non riportato sino ad ora come imprintato, ma che appartiene alla famiglia di proteine NLRP che regolano l infiammazione, e per alcune delle quali L dimostrato IG. Per NLRP2, che si trova poco pio a valle di NLRP12 L stato dimostrato imprinting paterno, mentre varianti in eterozigosi di NLRP7 influenzano lo stato di metilazione di loci imprintati nella prole di donne con varianti in questo gene che presentano poliabortivit o ripetute moli idatiformi. Questi dati suggeriscono una osservazione clinica pio attenta per quei fenotipi clinici che spesso sembrerebbero non strettamente correlabili con CNV ereditate o de novo, in quanto alterazioni della metilazione, anche in loci non noti, potrebbero associarsi a MLID (Multilocus Imprinting Disturbances).



**P203**  
**Analisi di microarray in un gruppo di 28 pazienti affette da Mayer-Rokitansky-Kuster- Hauser**

E. Vescarelli<sup>1</sup>, F. Megjorni<sup>2</sup>, P. Pontecorvi<sup>1</sup>, L. Bernardini<sup>3</sup>, A. Capalbo<sup>3</sup>, M. Fabbretti<sup>3</sup>, S. Ceccarelli<sup>1</sup>, C. Marchese<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Medicina Sperimentale, Sapienza Universit di Roma

<sup>2</sup>Dip. Pediatria e Neuropsichiatria Infantile, Sapienza Universit di Roma

<sup>3</sup>Unit di Citogenetica - Istituto-Mendel, Fondazione Casa Sollievo della Sofferenza, IRCCS

La sindrome di Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) L una malattia rara con un'incidenza pari a 1/4.500 nate, ad eziologia tuttora sconosciuta nella maggior parte dei casi. È caratterizzata da aplasia congenita dell'utero e della porzione superiore (2/3) della vagina con uno sviluppo normale dei caratteri sessuali secondari e un cariotipo normale (46, XX). La MRKH pu essere isolata (MRKH tipo 1) o associata a difetti renali, vertebrali e, pio raramente, dell'udito e del cuore (MRKH tipo 2). Il primo segno clinico della sindrome MRKH L l'amenorrea primaria in giovani donne che presentano, peraltro, uno sviluppo normale dei caratteri sessuali secondari e dei genitali esterni, con ovaie normali e funzionanti. L'analisi mediante microarray genomici negli ultimi anni ha rilevato la presenza di microdelezioni/microduplicazioni (del/dup) nelle pazienti affette da MRKH, in particolare la del1q21.1, del16p11.2, del17q12, del22q11, permettendo di identificare geni-candidati, tutti espressi durante lo sviluppo del sistema genitourinario. Abbiamo analizzato mediante microarray (Agilent 180K) 28 nuove pazienti affette da MRKH. In due casi, sono state evidenziate rispettivamente la del16p11.2 e la del17q12, confermando come questi due microriarrangiamenti siano relativamente frequenti nelle pazienti MRKH. Inoltre, L stata identificata, in una donna di 50 anni, una microduplicazione del braccio corto di un cromosoma X, della regione Xp22.33, che include il gene PRKX (\*300083), a segregazione non nota, non riportata come variante benigna nei database delle varianti comuni (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>). Diversi studi hanno dimostrato il coinvolgimento di PRKX nella morfogenesi renale. Data la frequente associazione tra agenesia vaginale e renale nelle pazienti MRKH tipo 2, ipotizziamo che questo gene possa contribuire all'eziopatogenesi di questa patologia. L'analisi di CNVs si conferma utile nello screening di pazienti affette da MRKH sia ai fini diagnostici che per l'identificazione di nuovi geni-candidati.







**P204  
Pharmacogenetics prediction of lipid toxicity in HIV-patients treated with efavirenz**

S. Allegra<sup>1</sup>, J. Cusato<sup>1</sup>, A. Calcagno<sup>1</sup>, L. Marinaro<sup>1</sup>, S. Battisti<sup>1</sup>, S. Bonora<sup>1</sup>, G. Di Perri<sup>1</sup>, A. D'Avolio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unit of Infectious Diseases, University of Turin, Department of Medical Sciences, Amedeo di Savoia Hospital, Turin, Italy

**Background:** Efavirenz is a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, related to increased high-density (HDL) and low-density lipoprotein (LDL) and total cholesterol (COLt) concentrations in adults and children. Higher drug plasma concentrations have been associated with raised plasma lipid and glucose concentrations. Single-nucleotide polymorphism CYP2B6 516 G>T is known to be associated with higher drug plasma concentrations. Moreover, CYP2B6 516 TT genotype showed increased HDL levels, compared to GG/GT group, after 48 weeks of treatment. This observation highlight the possible influence of pharmacogenetic in changing cholesterol concentrations in patients on efavirenz treatment. **Aim:** We investigated whether single nucleotide polymorphisms (SNPs) could predict variations in plasma lipid (HDL, LDL, and COLt) at different timings (12/24/48 weeks of therapy), in patients treated with efavirenz. **Materials and methods** Adult HIV-positive patients treated with efavirenz were enrolled. For HDL, LDL, COLt and GLUC levels, a delta ( $\Delta$ ) value was calculated for each interval from baseline: 12/24/48 weeks minus baseline, called  $\Delta 12$ ,  $\Delta 24$  and  $\Delta 48$ , respectively. Allelic discrimination of MDR1 3435C>T, 1236C>T, 2677G>T and 1199G>A, BSEP 258+2777T>C, MRP2 1249G<A, BCRP1 1194+928T>C and 421C>A, HNF4a 97 C>G, PXR 63396C>T, 7635G>A and 44477A>G, CAR 540C>T and VEGFA -2055A>C and -614A>G SNPs was performed by real-time PCR. Results Forty-eight patients (37 males, 43 Caucasians, median age 41 years) were included. CAR 540 TT resulted able to predict reduced values of  $\Delta 12$  COLt ( $p=0.001$ ), HDL ( $p=0.002$ ) and LDL ( $p=0.001$ ) and  $\Delta 24$  HDL ( $p=0.016$ ). VEGFA -2055 AC/CC remained as positive predictor of  $\Delta 12$  COLt ( $p=0.021$ ) and HDL ( $p=0.008$ ). Whereas, VEGFA -614 AG/GG was retained as reduced  $\Delta 12$  HDL ( $p=0.012$ ) values. BCRP1 1194+928 CC genotype significantly predicted higher COLt considering both  $\Delta 12$  ( $p=0.034$ ) and  $\Delta 24$  ( $p=0.008$ ), while C allele predicted raised  $\Delta 24$  HDL ( $p=0.020$ ) and  $\Delta 24/\Delta 48$  LDL ( $p=0.031$ ;  $p=0.029$ ). BSEP 258+2777 CC remained as  $\Delta 24$  COLt ( $p=0.032$ ) positive predictor. **Conclusions** This preliminary analysis focused on the pharmacogenetic role in lipid toxicity prediction and it could have implications for long-term cardiovascular complications of efavirenz-based treatment.

**P205  
Identification of a de novo mutation in PTH1R gene determining Primary Failure of dental Eruption: a case report**

C. Cafiero<sup>1</sup>, A. Re<sup>1</sup>, B. Ricci<sup>2</sup>, D. Isabella<sup>2</sup>, C. Grippaudo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lab. Genetica Medica Alessandria Artemisia, Roma

<sup>2</sup>Istituto Clinica Odontoiatrica, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli Universit Cattolica del Sacro Cuore\*, Roma

**INTRODUCTION:** Primary failure of eruption (PFE) is characterized by non syndromic eruption failure of permanent teeth do not ankylosed, fail in their eruptive process partially or completely, without any systemic disease or mechanical interference identifiable. This condition is different from the mechanical failure eruption (MFE) due to a mechanical obstacle. Recent studies support that this dental phenotype is inherited and that mutations in PTH1R genes explain several familial cases of PFE. However some of them are the de novo familiar cases not yet identified. The objective of our study was to show how genetic analysis must be used with clinical diagnostic information for improved orthodontic management of PFE. **MATERIALS AND METHODS:** A 24 years old man was admitted to the Orthodontic Service of Universit Cattolica del Sacro Cuore in Rome. The clinical analysis and radiological diagnostics were performed for PFE syndrome of upper and lower molars. A saliva sample was collected by buccal swabs for genetic analysis of PTH1R. Extraction and purification of DNA was carried using the automatic machine MagCore Nucleic Acid Extractor. We amplified and sequenced all coding sequence. Primer sets were designed to delineate splice junctions and included a minimum of 50 bases of intron sequence in addition to the exon sequence. The genetic defect was characterized by sequencing analysis of PTH1R gene by Sanger Method using automatic sequencer AB 3500 Genetic Analyzer. **RESULTS:** Sequencing analysis of PTH1R genes revealed a novel heterozygous non sense mutation in exon 7 that introduce a premature stop codon (c.708 G>T, p.169E/\*) causing truncated and non-functional Protein. This variant is de novo, not associated with family history. **CONCLUSIONS:** Our result confirm that genetic analysis of PTH1R gene play a key role in clinical management of PFE patients who are unresponsive to traditional orthodontics treatment. We suggest that the genetic approach should be used also for patient without familial history but with characteristic PFE phenotype.

**P206  
Caratterizzazione delle cellule tumorali circolanti in pazienti con tumore della mammella metastatico endocrino responsivo**

E. Marino<sup>1</sup>, C. Mauro<sup>1</sup>, M. Picozzi<sup>2</sup>, L. Zorzino<sup>2</sup>, M.T. Sandri<sup>2</sup>, L. Bernard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Clinical Genomics, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

<sup>2</sup>Divisione di Medicina di Laboratorio, Istituto Europeo di Oncologia, Milano

**PREMESSA**

Nella metastatizzazione del carcinoma mammario, il sangue rappresenta una fonte di cellule tumorali circolanti (CTC) e la loro analisi ha lo scopo di valutare le possibili modificazioni delle cellule tumorali. Le terapie tradizionali agiscono sul tumore, ma non riescono a distruggere le cellule staminali tumorali. Terapie con lo scopo di eradicare queste cellule potrebbero determinare remissioni più durature.

**SCOPO DELLO STUDIO**

La caratterizzazione di CTC prima dell'evidenza di metastasi potrebbe consentire l'individuazione di target terapeutici non identificabili nel tumore primitivo. Un meccanismo di resistenza ai trattamenti ormonali è l'attivazione del pathway della chinasi PI3K, coinvolta nei processi di sopravvivenza e proliferazione cellulare. Un aumento costitutivo della trasmissione intracellulare del segnale mediato dalla chinasi stessa è determinato da mutazioni attive a livello del gene codificante la subunit catalitica della chinasi PI3K, identificate nel 25% dei tumori mammari primitivi, principalmente nell'esone 9 e 20.

**MATERIALI E METODI**

I pazienti arruolati sono sottoposti a 3 prelievi: basale, 12 e 24 settimane, come valutazione in risposta al trattamento. Il prelievo di sangue verrà detectato per le CTC con il CellSearch (Menarini Silicon Biosystems): i campioni sono arricchiti di CTC tramite colorazione con EpCAM, citocheratine, CD45 e DAPI. Le cellule che verranno considerate CTC sono EpCAM+, CK+, DAPI+, CD45-. Le cellule marcate vengono recuperate tramite DEPARRAY (Menarini Silicon Biosystems) come cellula singola o pool. Si può quindi procedere con l'isolamento e l'amplificazione del DNA tramite Ampli1 WGA kit, con il controllo della qualità del genomico (Ampli1 QC kit) ed l'analisi degli esoni 9 e 20 del gene Ampli1 PIK3CA Sequencing kit (Menarini Silicon Biosystems) con metodologia Sanger (Applied Biosystems).

**RISULTATI**

In base ai nostri studi preliminari, abbiamo ottenuto che 2 pazienti sui 15 analizzati presentavano una mutazione in eterozigosi nelle CTC a livello basale. Entrambe queste mutazioni sono state trovate nell'esone 9 di PIK3CA.

**CONCLUSIONI**

In base a questa prima analisi, si può intuire come si possa effettivamente riuscire in modo semplice e poco invasivo a detectare eventuali CTC nel sangue e a ideare una terapia mirata.



**P207  
Analisi Biomolecolare su tessuto tumorale cerebrale e correlazione sitopatologica/molecolare a fini diagnostici e terapeutici**

L. Pintomalli<sup>1</sup>, L. Musolino<sup>1</sup>, M. Pizzimenti<sup>1</sup>, M.L. Fiorentino<sup>1</sup>, M. Campello<sup>2</sup>, F. Turiano<sup>2</sup>, C. Tusciano<sup>3</sup>, S. Al Sayyad<sup>3</sup>, G. Albonico<sup>4</sup>, M. Maesano<sup>4</sup>, G. Ressa<sup>4</sup>, G. Africa<sup>4</sup>, M. Priolo<sup>1</sup>, C. Mamm<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SSD di Genetica Medica, Grande Ospedale Metropolitan Bianchi-Melacrino-Morelli, Reggio Calabria

<sup>2</sup>UOC Neurochirurgia, Grande Ospedale Metropolitan Bianchi-Melacrino-Morelli, Reggio Calabria,

<sup>3</sup>UOC Radioterapia, Grande Ospedale Metropolitan Bianchi-Melacrino-Morelli, Reggio Calabria,

<sup>4</sup>UOC Anatomia patologica, Grande Ospedale Metropolitan Bianchi-Melacrino-Morelli, Reggio Calabria

Per circa un centinaio di anni la diagnostica ed il grading dei tumori appartenenti alla famiglia dei gliomi è stata esclusivamente di tipo istologico. In base ai criteri del World Health Organization è possibile suddividere i gliomi in numerosi sottotipi istologici comprendenti gli astrocitomi, oligodendrogliomi, oligoastrocitomi (OA) e glioblastomi. In ogni caso la classificazione istologica è spesso difficile, soprattutto nei casi di OA a carattere misto. Nel 2016 è stata stilata la nuova classificazione dei tumori cerebrali da parte della WHO che per la prima volta utilizza dati molecolari (codelezione 1p/19q, stato mutazionale IDH1/IDH2, stato di metilazione del promotore MGMT) in aggiunta ai dati istologici per la definizione di isto/genotipo tumorale suggerendo di affiancare i dati molecolari nella definizione sia diagnostica che prognostica di questo gruppo di neoplasie. Riportiamo una analisi retrospettiva molecolare di tumori cerebrali appartenenti alla famiglia dei gliomi attraverso metodica MLPA ed MS-MLPA per analisi di dose e di metilazione dei principali biomarcatori identificati (codelezione 1p/19q, stato di metilazione del promotore MGMT, presenza di mutazioni IDH1/IDH2) e correliamo con i dati istologici e di risposta radioterapica dei pazienti analizzati.





**P208**  
**Nuove terapie mirate a bersaglio molecolare: vincere la chemioresistenza inibendo la metiltransferasi SMYD3**

**P. Sanese**<sup>1,2</sup>, A. Pesarico<sup>1</sup>, V. Celestini<sup>1,3</sup>, C. Fasano<sup>4</sup>, V. Grossi<sup>1</sup>, M. Lepore Signorile<sup>1</sup>, L. Russo<sup>4</sup>, G. Forte<sup>4</sup>, V. Disciglio<sup>4</sup>, G. Caretti<sup>6</sup>, A. Del Rio<sup>7</sup>, C. Simone<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica, Dip. di Scienze Biomediche e Oncologia Umana (DIMO), Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Italia

<sup>2</sup>Dip. di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Italia

<sup>3</sup>Dip. di Biochimica e Farmacologia Molecolare, Laboratorio di Biologia Molecolare; IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milano, Italia

<sup>4</sup>Genetica Medica, Istituto Nazionale di Gastroenterologia, IRCCS "S. de Bellis", Castellana Grotte (BA), Italia

<sup>5</sup>Dip. di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Roma La Sapienza, Roma, Italia

<sup>6</sup>Dip. di Bioscienze, Università di Milano, Milano, Italia

<sup>7</sup>Istituto per la Sintesi Organica e la Fotoreattività, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Bologna, Italia

SMYD3 è una metiltransferasi overespressa in diversi tipi di cancro, fondamentale nello sviluppo tumorale. Abbiamo recentemente dimostrato in modelli di cancro del colon-retto (CCR) che SMYD3 è fortemente attivata durante la tumorigenesi. La sua ablazione genica, così come la sua inibizione farmacologica mediante l'utilizzo di un composto da noi identificato (BCI-121), sono in grado di ridurre la proliferazione, conferendo a SMYD3 un ruolo chiave nella regolazione del tasso di crescita cellulare. Il composto BCI-121 inibisce l'attività metiltransferasica di SMYD3 ed il suo reclutamento sulla cromatina, con conseguente arresto del ciclo di replicazione nella transizione S/G2. Il suo utilizzo in diversi modelli tumorali ha dimostrato che solo le cellule con alti livelli di SMYD3 risultano sensibili alla sua azione, che ne arresta la crescita. SMYD3 risulta essere un potenziale bersaglio molecolare e l'arresto delle cellule tumorali, dovuto alla sua inibizione, può aumentare la sensibilità ai chemioterapici (CHT) fase-S-specifici, superando la resistenza. I nostri dati dimostrano che il pretrattamento di cellule CCR con BCI-121 aumenta significativamente la citotossicità di CHT fase-S-specifici, con un incremento della morte cellulare e dei marchi apoptotici. Inoltre, in seguito a danno del DNA, SMYD3 si accumula nel nucleo in maniera tempo dipendente, di pari passo all'attivazione dei principali attori dei sistemi di riparo. La possibilità di analizzare l'espressione di SMYD3 in diverse linee di tumore alla mammella ha permesso di focalizzarci su quelle Triple Negative, che non rispondono alle comuni terapie. Linee con alti livelli di SMYD3 hanno confermato l'azione del trattamento combinato con BCI-121 e CHT di fase S, rispetto a quelle che ne esprimono livelli basali. Analizzando la cinetica di riparo del DNA in cellule danneggiate mediante l'uso di agenti specifici, abbiamo osservato che l'ablazione genica di SMYD3 comporta un accumulo dei siti di danno ed una difficoltà nel riparare. I nostri studi sono dunque volti a caratterizzare il ruolo di SMYD3 nel regolare il meccanismo di risposta al danno indotto dai CHT. Inibendo SMYD3, possiamo impedire alla cellula cancerosa di sviluppare resistenza ai CHT, individuando una terapia mirata e di maggiore efficacia.

**P209**  
**L'asse MAPK/c-Myc nel cancro del colon-retto: nuovi meccanismi patogenetici e approcci terapeutici**

**M. Lepore Signorile**<sup>1,2</sup>, V. Grossi<sup>1</sup>, P. Sanese<sup>1</sup>, V. Celestini<sup>1</sup>, C. Fasano<sup>3</sup>, G. Forte<sup>3</sup>, L. Russo<sup>3</sup>, V. Disciglio<sup>3</sup>, C. Simone<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana (DIMO), Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Italia

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Roma La Sapienza, Roma, Italia

<sup>3</sup>Genetica Medica, Istituto Nazionale di Gastroenterologia, IRCCS "S. de Bellis", Castellana Grotte (BA), Italia

La carcinogenesi è caratterizzata dall'alterazione di molteplici pathways molecolari che controllano l'omeostasi cellulare, perdita dei checkpoints anti-proliferativi e pro-apoptotici, acquisita capacità di invadere i tessuti circostanti e migrare. La funzione della proteina c-Myc è fondamentale nella proliferazione cellulare, nel differenziamento e nell'apoptosi. Pertanto la sua deregolazione rappresenta un potente attivatore della tumorigenesi, specialmente nel cancro del colon retto (CCR). Per di più, c-Myc è in grado di attivare il profilo di espressione caratteristico delle cellule staminali cancerose, responsabili della formazione del tumore primario, della disseminazione metastatica e dei meccanismi di chemio-resistenza. In modelli preclinici è stato dimostrato che l'ablazione genetica di c-Myc ripristina il fenotipo dei topi APC<sup>min/+</sup>, modello murino di poliposi adenomatosa familiare. Inoltre, l'attivazione della via di segnalazione di MEK/ERK induce la stabilizzazione di c-Myc in modelli murini di tumorigenesi intestinale e la sua inibizione ne incrementa la sopravvivenza. I nostri studi hanno evidenziato l'importanza di una seconda MAPK, p38α, nella tumorigenesi coloretale. Infatti il blocco di p38α inibisce la crescita del CCR nei topi APC<sup>min/+</sup>. Per valutare il ruolo di p38α e di ERK nella regolazione di c-Myc, abbiamo utilizzato inibitori specifici del meccanismo trascrizionale, di quello traduzionale e del proteasoma. L'impiego di questi composti in combinazione con gli inibitori di queste due chinasi ha rivelato che queste proteine cooperano nella stabilizzazione di c-Myc, impedendone la degradazione dipendente dal proteasoma. L'ablazione genica e l'inibizione farmacologica combinata di p38α e di ERK porta al recupero del programma pro-apoptotico in cellule di CCR. I risultati ottenuti sono stati validati attraverso l'utilizzo di Ralimetinib e Trametinib (inibitori farmacologici di p38α ed ERK) attualmente in sperimentazione clinica per malattie infiammatorie e cancro. L'esito ha confermato l'importante ruolo dell'asse MAPK/c-Myc nella regolazione della tumorigenesi intestinale, indicando la manipolazione delle MAPK come possibile bersaglio molecolare terapeutico per contrastare la carcinogenesi c-Myc dipendente.

**P210**  
**Disparità materno-fetale per gli antigeni minori di istocompatibilità in fratelli HLA identici: dalla tolleranza in gravidanza al trapianto di cellule staminali emopoietiche**

**C. CAPITINI**<sup>1</sup>, A. DE SILVESTRI<sup>1</sup>, M. GUARENE<sup>2</sup>, C. REBUFFI<sup>1</sup>, C. PEROTTI<sup>2</sup>, C. TINELLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinical Epidemiology and Biometry U., IRCCS San Matteo Found., Pavia

<sup>2</sup>Immuno Haematology and Transfusion Medicine Dep., IRCCS San Matteo Found., Pavia

Il trapianto di cellule staminali emopoietiche (CSE) viene eseguito in pazienti affetti da malattie oncoematologiche, genetiche o dismetaboliche. In generale, il minor rischio di sviluppare sequele post-trapianto (graft versus host disease GVHD) si osserva quando il donatore è fratello HLA identico del paziente. Tuttavia, il rischio di GVHD non è nullo neppure tra fratelli gemelli. È emerso che la diversità tra donatore e ricevente per alcuni sistemi genetici, come gli antigeni minori di istocompatibilità (mHAg), può ridurre GVHD e rigetto. Gli mHAg sono sequenze amminoacidiche polimorfiche di proteine che svolgono nell'organismo funzioni diverse da quelle dell'istocompatibilità. L'immunogenicità degli mHAg si manifesta quando essi vengono presentati dalle molecole HLA ai linfociti T. Gli mHAg vengono ereditati mendelianamente in modo indipendente dai geni HLA, cioè i due fratelli HLA identici possono differire per mHAg. Poiché la gravidanza rappresenta l'unico modello di allotrapianto fisiologico, abbiamo verificato la trasmissione preferenziale di 9 mHAg in 65 famiglie composte da madre e due figli HLA-identici. Abbiamo studiato la trasmissione delle varianti polimorfiche di HA-1, HA-2, HA-3, HA-8, HB-1, ACC-1, ACC-2, SP110, PANE-1 (mHA Minitray kit, University of Heigelberg). La trasmissione in omozigosi/eterozigosi degli mHAg è stata studiata a partire da madri omozigoti. Abbiamo osservato che quando il primogenito è eterozigote, il secondo figlio mantiene lo stesso genotipo, in particolare per HA-1 (p<0.013), HA-2 (p<0.001), HA-3 (p<0.023), HA-8 (p<0.001), HB-1 (p<0.028) e SP-110 (p<0.0001). Nessuno conosce il numero esatto degli mHAg implicati nel trapianto, ma è certo che fra questi deve esserci una gerarchia, poiché alcuni mHAg sono più immunogeni di altri nell'indurre GVHD. Se consideriamo il primo figlio come primo allotrapianto e il secondo figlio come secondo allotrapianto, questo tipo di studio ci permette di capire il meccanismo di tolleranza indotto tra madre e feto dal punto di vista della madre intesa come ricevente dell'allotrapianto. Sebbene preliminari, i risultati ci hanno permesso di individuare una piccola gerarchia di mHAg che può essere studiata nei trapianti di CSE rispetto alle sequele avverse o all'effetto graft versus tumor.



**P211**  
**Correlazione genotipo, interazioni farmacologiche ed eventi avversi in pazienti TAO trattati con warfarin**

S. Misasi<sup>1</sup>, G. Martini<sup>2</sup>, O. Paoletti<sup>3</sup>, S. Calza<sup>5</sup>, G. Scovoli<sup>4</sup>, A. Marengoni<sup>4</sup>, S. Testa<sup>3</sup>, L. Caimi<sup>2</sup>, E. Marchina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>LCGM, Dip. Medicina Molecolare e Trasloazionale, Università di Brescia

<sup>2</sup>Centro Tao, Spedali Civili di Brescia

<sup>3</sup>Centro Tao, Istituti Ospitalieri di Cremona

<sup>4</sup>Unit di geriatria, Spedali Civili di Brescia, Dip. Scienze Cliniche e Sperimentali, Università di Brescia

<sup>5</sup>Sezione di Statistica, Dip. Medicina Molecolare e Trasloazionale, Università di Brescia

Gli antagonisti della vitamina K (VKAs) sono farmaci utilizzati per la terapia anticoagulante orale (TAO) estremamente efficaci, ma caratterizzati da un indice terapeutico ristretto, richiedono il controllo di routine dell'INR più o meno frequente nei singoli pazienti e, nonostante questo, sono gravati da complicanze trombotiche o emorragiche. Obiettivo primario della farmacogenetica (PGx) è quello di ottimizzare la terapia di ogni singolo paziente attraverso la conoscenza del suo profilo genetico. I geni meglio caratterizzati coinvolti nella farmacogenetica dei VKAs sono: VKORC1 (16p11.2) relativamente alla farmacocinetica e CYP2C9 (10q24) relativamente alla farmacodinamica. Varianti alleliche a carico di questi geni riducono o annullano la loro attività: nella popolazione caucasica lo SNP -1639G>A (rs9923231) in VKORC1 riduce la trascrizione del gene, mentre le varianti CYP2C9\*2 (rs1799853) e CYP2C9\*3 (rs1057910) in omozigosi ne riducono del 12 e 5% rispettivamente l'attività enzimatica. E da tempo nota l'associazione fra queste varianti genetiche e la dose di farmaco, meno chiari sono gli effetti a lungo termine del genotipo sulle complicanze trombotiche ed emorragiche del trattamento stesso, spesso somministrato in politerapia. Scopo del presente studio è stato quello di valutare: la possibile associazione tra genotipo VKORC1 e CYP2C9 ed eventi avversi (emorragici e / o trombotici) durante la TAO con VKAs a lungo termine; l'eventuale effetto di altri farmaci, fra quelli più frequentemente somministrati a questa categoria di pazienti. Allo scopo è stato eseguito uno studio retrospettivo caso controllo reclutando pazienti caucasici in TAO afferenti a 2 centri lombardi. I risultati ottenuti hanno indicato che i pazienti in TAO presentano un elevato rischio di eventi avversi, più frequentemente emorragici, se sono portatori di uno o più dei polimorfismi studiati, la maggioranza di questi eventi si verifica nella fase di mantenimento della TAO. La concomitante somministrazione di amiodarone, statine, antiaggreganti incrementa il rischio di eventi avversi in funzione del genotipo. I dati ottenuti assumono un ulteriore valore alla luce della recente introduzione degli anticoagulanti orali diretti (OAC), la genotipizzazione preventiva di categorie a rischio potrebbe orientare, quando possibile, la terapia e ridurre l'eventualità di eventi avversi.





**P212**  
**Nanopore sequencing of BCR-ABL1 genomic breakpoint for minimal residual disease monitoring in Chronic Myeloid Leukaemia**

C. Cumbo<sup>1</sup>, L. Impera<sup>1</sup>, C.F. Minervini<sup>1</sup>, P. Orsini<sup>1</sup>, L. Anelli<sup>1</sup>, A. Zagaria<sup>1</sup>, N. Coccaro<sup>1</sup>, G. Tota<sup>1</sup>, A. Minervini<sup>1</sup>, P. Casieri<sup>1</sup>, C. Brunetti<sup>1</sup>, A. Russo Rossi<sup>1</sup>, E. Parciante<sup>1</sup>, G. Specchia<sup>1</sup>, F. Albano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sezione di Ematologia con Trapianto - Dip. dell'Emergenza e dei Trapianti di Organi - Università degli studi di Bari

Chronic Myeloid Leukaemia (CML) is a clonal, myeloproliferative disease characterized by t(9;22)(q34;q11) which produces the fusion oncogene BCR-ABL1 that is the hallmark for CML, its protein is the target for tyrosine kinase inhibitors (TKIs). The measurement of BCR-ABL1 transcripts via qRT-PCR is the method used for monitoring residual disease. About the 60% of CML patients who achieve sustained undetectable BCR-ABL1 transcripts on TKIs therapy, after drug discontinuation return of detectable disease and have to restart the treatment, highlighting the need for an improved method of disease monitoring. Recent studies demonstrate that the quantification of genomic breakpoint of BCR-ABL1 oncogene is more sensitive than measurement of transcripts but its characterization results difficult, due to the extension of the region involved. We developed a method for a rapid and easy BCR-ABL1 breakpoint sequencing using MinION, coupled with the design and testing of droplet digital PCR (ddPCR) assays. We tested the method on ten cases of CML, monitoring residual disease during follow-up. Our strategy consisted of a multiplex long-template PCR on genomic DNA for each patient and sequencing. The sequence of BCR/ABL1 genomic junction was used to design a patient-specific EvaGreen (EG) ddPCR assay to monitor the amount of disease. Results from ddPCR showed a specific disease reduction during treatment except for unresponsive patients.

To increase the specificity and the depth of analysis, a TaqMan (TM) hydrolysis probe assay was designed for a patient who showed negativity in the EG assay. The quantification of genomic breakpoint conducted with the TM assay on a total of 120.000 genomes (against of 1500 in EG) confirmed the absence of leukemic cells.

MinION is a pocket-size nanopore sequencer able to produce long reads, up to some dozen kilobases. The very low costs, the ease of use, and the length of the reads, make MinION ideal for studying structural variant of human genome as in our case.

Our data present a rapid, affordable and easy method for a personalized monitoring of leukemic cells during the follow up of disease. Although more cases need to be analyzed, it could improve the management of CML, the drug discontinuation and the outcome of patients.

**P213**  
**IPGB: biobank for development of personalized medicine in Incontinentia pigmenti**

F. Fusco<sup>1</sup>, R. Sabbatella<sup>1</sup>, V. Valente<sup>1</sup>, D. Fergola<sup>1</sup>, V. Colonna<sup>1</sup>, R. Sirica<sup>1</sup>, M.B. Lioi<sup>2</sup>, M.V. Ursini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Biophysics "A. Buzzati-Traverso" CNR, Naples Italy

<sup>2</sup>University of Basilicata, Potenza Italy

Incontinentia Pigmenti Genetic Biobank (IPGB, <http://www.igb.cnr.it/ipgb>) is the first disease-oriented biobank dedicated to Incontinentia pigmenti (IP, OMIM#308300), an X-linked dominant neuroectodermal rare disease, caused by NF-kB-Essential-MOduLator (NEMO) gene mutation. IPGB collects DNA samples, harmonised clinical and biological data of IP-TRIOS families from worldwide. IPGB biobank arises from innovative combination of three complementary expertises of our group: genetic expertise on the X-linked gene-disease, molecular expertise on the NF-kB pathway, and the availability of a large collection of DNA samples and clinical data from the historical IP families due to a long-time and consolidated collaborations with clinical international groups on skin disease. The principal aim of IPGB is to build a powerful research infrastructure for the identification of biomarkers related to severe forms of IP, and for the investigations on drug response for personalized medicine. Indeed, although the IP phenotype is always associated with skin defects each patient requires a personalized approach for the molecular diagnosis and clinical description that has revealed in 30% of cases, an unpredicted severity. Here we present the preliminary results of the first genome-wide association analysis to identify genetic modifiers of IP with neurological and/or ocular defects, the worst forms of IP. We have sequenced by HaloPlex-panel focused on metabolic gene pathway 80 IP cases belonging to two subtypes, severe and not-severe, and we identified specific differences in genetic susceptibility to severe forms of IP. This is the first study in IP where the biobank by providing highly characterized biological specimens accelerates the pace of discovery.

**P214**  
**SINEUP, a synthetic non-coding RNAs based technology as possible new therapeutic tool for haploinsufficiency: Autism Spectrum Disorders (ASD) and Epilepsy as Proof-of-Principle**

F. Di Leva<sup>1</sup>, M. Arnoldi<sup>1</sup>, G. Alvari<sup>1</sup>, A. Messina<sup>1</sup>, S. Casarosa<sup>1</sup>, G.L. Carvill<sup>2</sup>, S. Zucchelli<sup>3,4</sup>, S. Gustinich<sup>3,5</sup>, M. Biagioli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre for Integrative Biology, University of Trento, Trento, Italy

<sup>2</sup>Ken and Ruth Davee Department of Neurology, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, USA

<sup>3</sup>Area of Neuroscience, Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati (SISSA), Trieste, Italy

<sup>4</sup>Department of Health Sciences, University of Eastern Piedmont "A. Avogadro", Novara, Italy.

<sup>5</sup>Department of Neuroscience and Brain Technologies, Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), Genova, Italy

Autism spectrum disorders (ASD) and epilepsies are heterogeneous conditions that frequently coexist with other developmental disabilities. Genetic bases are prominent risk factors for both disorders and, among others, loss of function mutations in genes of the chromodomain helicase DNA-binding (CHD) family have been reported to be directly causative of the diseases. Specifically, CHD8 represents a recurrent risk factor for ASD, while CHD2 results to be more frequently mutated in epilepsy. CHD proteins function as ATP-dependent chromatin remodeling factors which can regulate transcription via direct and indirect pathways. We recently mimicked the effects of heterozygous loss-of-function mutations in neural progenitor cells, reporting evident alterations in transcriptional regulation, cell proliferation and adhesion. Thus, the sole reduction in CHD8 or CHD2 expression is able to cause cellular and molecular phenotypes that are key hallmarks to be monitored and, possibly, rescued in assessing new therapeutic approaches. We aim to test SINEUP, a novel class of synthetic long non-coding RNAs - recently reported to be able to increase the translation of target proteins to physiological level without affecting transcription - to rescue the phenotypes caused by CHD8 or CHD2 haploinsufficiency. Since the activity of SINEUP depends on two domains, an effector domain required for translation enhancement and a binding domain conferring target specificity, we initially designed SINEUP molecules able to recognize the initial and internal methionines of CHD8 and CHD2 proteins. We then proceeded to test the efficacy of different SINEUPs on neural progenitor cells, an in vitro cell system. From our preliminary observations, we identified SINEUPs molecules which are able to rescue CHD8 and CHD2 protein production. Thus representing a valid target to be further tested in patients derived cell lines and in zebrafish, in vivo model of the disorders. In conclusion, our studies investigate a novel approach to therapeutic intervention for haploinsufficiency, which represents the first step towards the development of new types of RNA-based therapy, with implications for ASD and Epilepsy, and with relevance for a large repertoire of presently incurable genetic diseases.



**P215**  
**Intracellular DNA delivery using polymeric nanoparticles for a non-viral gene therapy approach**

G.M. Severini<sup>1</sup>, B. Bortot<sup>1</sup>, E. De Martino<sup>1</sup>, A. Calarco<sup>2</sup>, A. De Luise<sup>2</sup>, G. Peluso<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dep. of Medical Genetics, Institute of Maternal and Child Health, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste, Italy.

<sup>2</sup>Institute of Agro-environmental and Forest Biology (IBAF), National Research Council (CNR), Naples, Italy

**INTRODUCTION:** Gene therapy can be currently performed by viral or non-viral vectors. Although viral ones have already come to a clinical translation, concerns remain about both safety and the industrial applicability of this system. Therefore we proposed a transposon-based gene transfer system using nanoparticles (NPs) as vector to carry the transposon within the target cells.

**AIM OF THE STUDY:** The aim was to develop a non-viral gene therapy approach in order to treat a neurological disease, globoid cell leukodystrophy (GLD). This rapidly fatal disorder affects myelin in Central and Peripheral Nervous System and is caused by mutations in the GALC gene that codifies for the galactosylceramidase (GALC).

**MATERIALS AND METHODS:** The non-viral gene therapy approach is based on transposable element called Sleeping Beauty (SB) which consists of two components: (i) a transposon containing a gene-expression cassette and (ii) a source of transposase enzyme. The expression cassette is cut from transposon plasmid and pasted into the genome by trasposase protein and then sustained transcription of a transgene can be achieved. For this purpose, we modified the transposon cloning the GALC sequence and its ability to integrate the gene in the nuclear DNA has been tested. The efficiency of the SB system has been verified evaluating the transposon copy numbers integrated in the cellular genome and mRNA expression, while the efficacy has been evaluated assaying the specific GALC activity. Then SB elements have been entrapped inside chitosan/TPP-hyaluronic acid NPs and their features (size and surface charges) have been studied.

**RESULTS:** An efficiency of the 43%, has been obtained for the transposon plasmid encapsulation while for the encapsulation of the transposase vector an efficiency of the 24%. In vitro experiments have shown that the up-take efficiency of NPs loaded with transposase plasmid is more than 75% after an incubation of two hours.

**CONCLUSIONS:** In conclusion, we demonstrated the efficiency and the efficacy of the Sleeping Beauty system by means different molecular assays. Despite large sizes of plasmids, we were able to encapsulate them inside the chitosan-based NPs with a good efficiency and we demonstrated their ability to enter inside the cells.







**P216**  
**Trials innovativi con exon-skipping nella Distrofia Muscolare di Duchenne: valutazione delle reazioni avverse**

A. Mauro<sup>1</sup>, L. Mantovani<sup>3</sup>, M.L. Conighi<sup>2</sup>, C. Bleve<sup>2</sup>, A. Armaroli<sup>1</sup>, M.E. Michelini<sup>2</sup>, A. Franchella<sup>2</sup>, M.R. Virgili<sup>3</sup>, A. Ferlini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Riproduzione e Accrescimento, U.O. di Genetica Medica, A.O.U. Ferrara

<sup>2</sup>Dip. di Riproduzione e Accrescimento, U.O. di Chirurgia Pediatrica, A.O.U Ferrara

<sup>3</sup>Dip. Medico Specialistico, U.O. di Dermatologia, A.O.U. Ferrara

La Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia neuromuscolare fatale ad esordio pediatrico, X-linked recessiva dovuta a mutazioni del gene DMD responsabili di mancata sintesi della Distrofina nelle fibre muscolari.

Diversi trials clinici con farmaci sperimentali sono in corso. L'exon-skipping è il meccanismo d'azione degli Oligoribonucleotidi Antisenso (AON) e consiste nel salto dell'esone contenente un codone di stop prematuro dal pre-m-RNA del gene DMD per ripristinare la cornice di lettura e consentire la sintesi di una proteina parzialmente funzionale. Gli AON sono corte molecole di acidi nucleici complementari alle sequenze di m-RNA bersaglio stabilizzate mediante ossature tra le quali la 2'-O-Metil-Fosforotioato (2OMePS) e la Morpholino Fosforodiamidato (PMO).

Nella nostra esperienza abbiamo partecipato a due trials GSK per lo skipping dell'esone 51 con Drisapersen (con 5 pazienti) e due trials Prosenza/Biomarin per lo skipping del 44 (con 7 pz): entrambi gli AON hanno uno scheletro 2OMePS.

Nei nostri 5 pz, a seguito della somministrazione settimanale di Drisapersen per oltre un anno per via sottocutanea sono comparse lesioni cutanee di diversa entità nei siti di iniezione (eritema, dolore, ecchimosi, prurito, discromie, lipodistrofia) e proteinuria intermittente. Negli altri 7 pz, le somministrazioni settimanali sono state per via endovenosa e/o per via sottocutanea, ma non hanno dato reazioni avverse significative nò dopo 5 settimane nò dopo un anno di trattamento.

Una visita dermatologica con documentazione fotografica dei siti di iniezione e talvolta un'analisi laboratoristica strumentale (mediante ecografia e RMN muscolare ed analisi immuno-ematologiche) sono state effettuate per i 5 pz dello skipping 51. In due/cinque pz una significativa lesione sclerotica è stata registrata in alcune aree ed è stata proposta terapia topica.

I dati di sicurezza raccolti nel nostro centro per lo skipping 51 fanno parte di uno studio internazionale su oltre 200 pz che ha evidenziato la comparsa di importanti lesioni cutanee tali da consentire il ritiro di Drisapersen dalle sperimentazioni umane da parte delle autorità regolatorie (FDA, EMA). Nuove modifiche chimico-strutturali e ulteriori studi sono necessari per migliorare la compliance di tali farmaci.

**P217**  
**Targeting mitophagy in Down Syndrome: a therapeutic opportunity?**

N. Mollo<sup>1</sup>, A. Izzo<sup>1</sup>, A. Secondo<sup>3</sup>, F. Gentile<sup>2</sup>, R. Cicatiello<sup>1</sup>, V. Sarnataro<sup>1</sup>, R. Genesio<sup>1</sup>, M. Barbato<sup>1</sup>, A. Conti<sup>1</sup>, L. Nitsch<sup>1</sup>, G. Cal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples Federico II, Via Pansini 5, 80131, Italy;

<sup>2</sup>Institute of Experimental Endocrinology and Oncology, National Research Council, Naples 80131, Italy;

<sup>3</sup>Dept. of Neuroscience, Reproductive and Odontostomatological Sciences, University of Naples Federico II, Naples, Italy

Increasing evidences highlight a link between mitochondrial damages and Down Syndrome (DS) phenotype. Together with mitochondrial dysfunction, a significant disruption of mitochondrial dynamics has been observed in trisomic cells with increased fragmentation of the mitochondrial network and decreased expression of fusion-inducing genes. Mitochondrial fragmentation, in trisomic fibroblasts, is counteracted by metformin, which induces the formation of a branched mitochondrial network and reduces ROS accumulation. It is known that damaged mitochondria are removed from the cell via mitophagy, a process regulated by a number of proteins in response to oxidative stress, such as GAPDH, that mediates damaged mitochondria uptake into lysosomes. Impairment in mitophagic processes is involved in the development of several neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD). AD and DS share common neurodegenerative processes, possibly due to similar oxidative pathways implicated in their pathogenesis. We investigated the association between mitochondrial dynamics and mitophagy in DS cells, and the effects induced by metformin on the mitophagy process. Mitochondrial morphology, GAPDH, Parkin, Rab5 and LC3b protein expression and their localization were evaluated in trisomic cells before and after treatment with metformin. We found a GAPDH accumulation in the mitochondria of trisomic cells. This could determine an alteration of both the mitochondrial permeability and mitophagy. In metformin treated cells the amount of GAPDH associated to mitochondria was strongly reduced and damaged mitochondria were sequestered inside Rab5-positive early endosomes. Damaged mitochondria were also observed in LC3-coated autophagic structures where they are likely degraded. Overall, we demonstrated that metformin acts on mitochondrial dynamics inducing at first the clearance of damaged mitochondria, possibly by a Parkin-mediated endosomal pathway, and then promoting, at a later time, the formation of a branched mitochondrial network. Removal of damaged mitochondria by inducing the mitophagic process could represent a further therapeutic opportunity to prevent or to slow disease progression in DS as well as in other neurodegenerative syndromes.

**P218**  
**Eterogeneità genetica e fenotipica in una casistica di pazienti italiani con cardiomiopia ipertrofica**

A. Germani<sup>1</sup>, C. Savio<sup>3</sup>, F. Libi<sup>3</sup>, E. Pagannone<sup>1</sup>, M.B. Musumeci<sup>1</sup>, V. Mastromarino<sup>1</sup>, L. Alesi<sup>2</sup>, I. De Santis<sup>3</sup>, C. Rossi<sup>3</sup>, M.R. Torrisi<sup>1</sup>, M. Volpe<sup>1,2</sup>, C. Autore<sup>1</sup>, S. Rubattu<sup>1,2</sup>, M. Piane<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina Clinica e Molecolare, Facoltà di Medicina e Psicologia, "Sapienza" Università di Roma

<sup>2</sup>Lab. di Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Sant'Andrea, Roma

<sup>3</sup>Dip. di Angiocardiologia, IRCCS Neuromed, Pozzilli

La cardiomiopia ipertrofica (HCM) ha una prevalenza di 1/500 nella popolazione generale ed è la più comune malattia genetica del muscolo cardiaco, con eredità autosomica dominante, penetranza incompleta ed espressività variabile. La HCM è causata principalmente da singole mutazioni in eterozigosi nei geni sarcomerici e in misura inferiore nei geni non sarcomerici. Sono inoltre descritti pazienti doppi eterozigoti o eterozigoti composti (3-6%) e in rarissimi casi pazienti con mutazioni triple (0.8%). Nel presente studio sono stati analizzati mediante sequenziamento massivo parallelo su piattaforma PGM (Ion Personal Genome Machine) 68 casi indice consecutivi non correlati, con diagnosi di HCM, utilizzando un pannello di 10 geni: MYBPC3, MYH7, TNNT2, TNNI3, TPM1 più frequentemente correlati alla cardiomiopia ipertrofica; CAV3, MYH6, TNNC1, meno frequentemente associati e LMNA, DES implicati nella cardiomiopia dilatativa, allo scopo di correlare il genotipo al fenotipo clinico e di caratterizzare geneticamente i pazienti con diagnosi clinica dubbia. Sono state identificate 54 varianti rare, di cui 49 uniche in 9/10 geni del pannello utilizzato. Il 65% dei pazienti (44/68) sono risultati portatori di almeno una variante rara, di cui 9 doppi eterozigoti (20%) e un paziente triplo mutato (0.02%). Il 49% (24/49) delle varianti sono state classificate, secondo i criteri dell'ACMG, come patogenetiche/probabilmente patogenetiche e il 51% (25/49) come varianti di significato clinico incerto (VUS). Come atteso, la maggior parte delle varianti sono state identificate nei geni MYH7 (25%) e MYBPC3 (40%). Rare varianti sono state identificate nei geni MYH6 (12%), TNNI3, LMNA, CAV3, DES, TPM1 e TNNT2 (23%). L'identificazione delle mutazioni nei probandi ci ha permesso di effettuare l'analisi di segregazione nelle famiglie, confermare la diagnosi clinica nei familiari affetti, proporre il test predittivo ai soggetti asintomatici, correlare il genotipo al fenotipo clinico sia nei pazienti con singola mutazione che nei genotipi complessi.



**P219**  
**Association between high-residual platelet reactivity in patients receiving dual antiplatelet therapy, Vitamin D plasma levels and Vitamin D Binding Protein rs7041 polymorphism**

R. Rolla<sup>1</sup>, M. Verdoia<sup>2</sup>, V. Daffara<sup>2</sup>, P. Pergolini<sup>1</sup>, P. Marino<sup>2</sup>, A. Carriero<sup>3</sup>, G. De Luca<sup>2</sup>, G. Bellomo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinical Chemistry, Maggiore della Carità Hospital, Eastern Piedmont University, Novara, Italy

<sup>2</sup>Department of Cardiology, Maggiore della Carità Hospital, Eastern Piedmont University, Novara, Italy

<sup>3</sup>Department of Radiology, Maggiore della Carità Hospital, Eastern Piedmont University, Novara, Italy

Background. Ex-vivo platelet function evaluation investigates (a) platelet dysfunction and (b) the efficacy of antiplatelet therapy. Optimal antithrombotic therapy is crucial for the management of acute coronary syndromes (ACS). An association between high residual platelet reactivity (HRPR) on dual antiplatelet therapy (DAPT) and increased risk of recurrent ischemic events and stent thrombosis has been previously shown. Among clinical conditions enhancing platelet reactivity are vitamin D deficiency and rs7041 genetic polymorphism in the Vitamin D Binding Protein (VDBP), that accounts for a significant variability in vitamin D levels. Aim of this study was to investigate the role of vitamin D plasma levels and of rs7041 polymorphism on platelet reactivity in patients on DAPT.

Methods. We measured platelet function by Multiplate (Roche Diagnostics AG), and VDBP genetic status by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism technique in 400 patients treated with DAPT (ASA and clopidogrel or ticagrelor) for an ACS at 30-90 days post-discharge. Fasting samples were obtained for main chemistry parameters and vitamin D levels.

Results. 187 patients received clopidogrel and 213 ticagrelor. The genetic polymorphism rs7041 (T/G) was observed in 318 patients, (79.5%), in 38.7% of them in homozygosis. Main clinical and chemistry features did not significantly differ according to genetic status, but for a higher rate of ACE-inhibitors and beta-blockers use among the carriers of the G allele (p=0.04 and p=0.01, respectively). VDBP genetic status did not affect the rate of HRPR with ADP-antagonists. However, the rate of HRPR with ADP-antagonists was influenced by severe hypovitaminosis D (< 10 ng/ml) only in patients carrying the G allele, especially in homozygosis (T/T: 25.9% vs 26.1%, p=0.99; G carriers: 22.1% vs 35.3%, p=0.02, p<sub>interaction</sub>=0.019; adjusted OR[95%CI]=1.93[1.11-3.34], p=0.02 for G carriers).

Conclusion. Platelet reactivity and the rate of HRPR among patients receiving DAPT rs741 was not affected by polymorphism of Vitamin D Binding Protein. The carriage of the G allele could condition the impact of hypovitaminosis D on the response to antiplatelet agents, by increasing the occurrence of HRPR especially in homozygotes.





**P220**  
**Identificazione di CNV in pazienti con cardiopatie aritmiche**

**P. Rimessi**<sup>1</sup>, C. Trabanelli<sup>1</sup>, R. Selvatici<sup>1,2</sup>, S. Neri<sup>1</sup>, M. Fabris<sup>1,2</sup>, M. Taddei Masieri<sup>1</sup>, A. Balboni<sup>1</sup>, F. Zaraket<sup>3</sup>, M. Malago<sup>3</sup>, M. Bertini<sup>3</sup>, E. De Maria<sup>4</sup>, M. Biffi<sup>5</sup>, G. Bronzetti<sup>6</sup>, G. Rocchi<sup>1</sup>, A. Perceesepe<sup>8</sup>, S. Fini<sup>1</sup>, A. Ferlini<sup>1,2</sup>, F. Gualandi<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>U.O. Genetica Medica, Dipartimento di Riproduzione e Accrescimento, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Arcispedale S. Anna, Ferrara  
<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Mediche, Sezione di Microbiologia e Genetica Medica, Università degli Studi di Ferrara  
<sup>3</sup>U.O. di Cardiologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Arcispedale S. Anna, Ferrara  
<sup>4</sup>U.O. di Cardiologia, Ospedale Ramazzini, Carpi  
<sup>5</sup>Dipartimento di Cardiologia, Università di Bologna, Bologna  
<sup>6</sup>U.O. di Cardiologia Pediatrica, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna  
<sup>7</sup>U.O. di Cardiologia, Ospedale S. Croce, Fano  
<sup>8</sup>Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università di Parma, Parma

Le cardiopatie aritmiche rappresentano una causa primaria di morte improvvisa in giovane età. L'identificazione della mutazione causativa è raccomandata dalle linee guida europee per le forti implicazioni sulla prognosi, sulle scelte terapeutiche e sulla individuazione di soggetti a rischio di eventi maggiori. L'analisi NGS di pannello di 51 geni associati a cardiopatie aritmiche in una coorte di 42 pazienti ha consentito di identificare la mutazione causativa in 7 su 24 pazienti con diagnosi di Sindrome di Brugada (BrS) (29%), 11 su 13 con sindrome del QT lungo (LQT) (85%), 1 su 5 casi di Fibrillazione Ventricolare idiopatica (FV) (20%). Dai dati di letteratura emerge come i principali geni codificanti subunit di canali ionici sodio e potassio a livello cardiaco possano essere sede di grossi riarrangiamenti, delezioni e duplicazioni esoniche, in una percentuale variabile dal 3 al 11% in pazienti con LQT, e in misura minore e scarsamente indagata in altre condizioni aritmiche come BrS e FV. Allo scopo di verificare la prevalenza di CNV nei fenotipi aritmici è stata effettuata una analisi MLPA utilizzando due distinti sistemi (P108 e P114 MRC-Holland): il primo analizza l'intera regione codificante del gene SCN5A, il secondo l'intera regione codificante dei geni KCNQ1, KCNH2, KCNE1 e KCNE2. L'analisi MLPA è stata condotta su 17 campioni BrS, 4 FV e 2 LQT. Una CNV è stata individuata in un campione BrS. Si tratta di una duplicazione dell'esone 2 del gene KCNH2, non precedentemente descritta. E in corso una analisi di segregazione familiare della CNV. Il risultato ottenuto supporta l'appropriatezza di una analisi complementare per la ricerca di CNV in pazienti con canalopatie cardiache, allo scopo di incrementare la sensibilità diagnostica. Inoltre, alla luce della frequente occorrenza di mutazioni multiple con effetto peggiorativo sulla prognosi, in particolare nel LQT, l'indagine quantitativa andrebbe inclusa nella flow-chart diagnostica parallelamente alla ricerca di mutazioni puntiformi. Il riscontro di una CNV in un gene (KCNH2) non tipicamente associato a BrS, è in accordo con la nota ampia sovrapposizione eziologica fra i diversi quadri aritmici e sottolinea l'opportunità di estendere l'analisi quantitativa ad ampie categorie fenotipiche.

**P221**  
**Diagnostic yield of sequencing lipoprotein lipase genes pathway in patients with severe hypercholesterolemia**

**N. Marziliano**<sup>1,2</sup>, R. Asproni<sup>3</sup>, S. Uras<sup>1</sup>, P. Berne<sup>1</sup>, V. Carboni<sup>1</sup>, G. Piras<sup>3</sup>, A. Uras<sup>3</sup>, C. Reverberi<sup>2</sup>, N. Gaibazzi<sup>4</sup>, P. Merella<sup>1</sup>, D. Fiscella<sup>5</sup>, G. Casu<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Laboratorio di Genetica Cardiovascolare, UOC di Cardiologia, ASL3-ATS Sardegna, Nuoro  
<sup>2</sup>Centro di Imaging Cardiovascolare, Poliambulatorio Gemini, Parma  
<sup>3</sup>Laboratorio Specialistico di Ematologia, UOC di Ematologia, ASL3-ATS Sardegna, Nuoro  
<sup>4</sup>Unit Operativa di Cardioimaging, AOU di Parma, Parma  
<sup>5</sup>Fondazione Floresta Longo, Catania  
<sup>6</sup>Dipartimento di Scienze del Benessere, Facoltà di Medicina, Università del Molise, sede di Campobasso

Background: Elevated concentrations of LDL cholesterol and triglyceride-rich lipoproteins are correlated with risk for coronary artery disease (CAD) and can be caused by a wide range of genetic, lifestyle, and environmental factors. Gene sequencing allows for the identification of causative mutations in the Familial Hypercholesterolemia (FH) and lipoprotein lipase genes, all belonging to the LPL pathway which is thought to be associated with risk for early-onset CAD. Methods: We sequenced the coding exons of the LDLR, PCSK9, APOB and LPL genes in 88 probands presenting with hypercholesterolemia (LDL cholesterol  $\geq 190$  mg/dl), with previous history of CAD (N=67; 76.13%) or without (N=21; 23.24%). By means of a custom-based IonAmpliSeq panel, we meant to annotate rare (allele frequency <1%) damaging mutations in the above genes included loss of function variants (i.e., nonsense, canonical splice site, and frameshift) and missense variants annotated as pathogenic in a clinical genetics database or predicted to be damaging by each of five computer prediction algorithms. Findings: Across all participants, 41 damaging mutations in the LDLR, PCSK9, APOB and LPL genes were identified in 40 probands (one was a carrier of a double heterozygosity). Compared to non-carriers, heterozygous carriers displayed higher LDL cholesterol (22% higher, 95%CI 11-23;  $p = 3 \times 10^{-12}$ ) and plasma triglycerides (19% higher, 95%CI 12-25;  $p = 3 \times 10^{-12}$ ) as well as increased risk for CAD (Odds Ratio 2.84; 95%CI 1.35-2.51;  $p = 0.0001$ ). Beyond rare mutations, FH mutation carriers had higher cumulative exposure to LDL cholesterol than noncarriers and an additional analysis of 6 common LPL variants noted a 51% increase in odds of CAD (95%CI 39-64;  $p = 1.1 \times 10^{-22}$ ) per standard deviation increase in triglycerides. Interpretation: In our series, about 46.6% carry a damaging mutation in the LPL pathway genes that are associated with higher plasma triglycerides as well as increased risk for CAD. Impaired clearance of triglyceride-rich lipoproteins by the LPL gene appears to be a causal mediator of human atherosclerosis, the burden for coronary artery diseases.

**P222**  
**Identification of biomarkers for early diagnosis of acute myocardial infarction through genetic and epigenetic studies.**

**E. Morini**<sup>1</sup>, B. Rizzacasa<sup>1</sup>, R. Mango<sup>2</sup>, S. Maletta<sup>1</sup>, C. Vancheri<sup>1</sup>, M. Macrini<sup>2</sup>, S. Budassi<sup>2</sup>, S. D'Annibale<sup>3</sup>, G. Massaro<sup>2</sup>, F. Romeo<sup>2,3</sup>, G. Novelli<sup>1</sup>, F. Amati<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dept. of Biomedicine and Prevention, University of Rome Tor Vergata, Italy  
<sup>2</sup>U.O.C. of Cardiology, Policlinico Tor Vergata, Rome, Italy  
<sup>3</sup>Dept. of System Medicine, University of Rome Tor Vergata, Italy

Coronary artery disease (CAD) and its major complication, acute myocardial infarction (AMI), are the leading causes of disability and death worldwide. CAD is a multifactorial disease, with both acquired and inherited components implicated in its etiology. Recently, epigenetic factors have been related to its pathogenesis. We have conducted a genetic and epigenetic study on patients with angiographically normal coronary arteries (CTR n=70), patients with CAD (CAD n=67) and patients arrived at our attention during a myocardial infarction event (AMI n=33). At the time of hospitalization one blood sample was collected for CTR and CAD and within 24 hours from the acute event for AMI group. We performed a genotyping analysis of 11 single nucleotide polymorphisms (SNPs) located within genes functionally associated to CAD by a reverse dot-blot (Cardio-KIT1). Among them, the rs2306374 SNP (MRAS) was significantly associated to AMI ( $p < 0.05$ ) while the rs12526453 SNP (PHACTR1) was significantly associated to CAD ( $p < 0.05$ ). A genome-wide DNA methylation study was carried out on 2 selected patients from each group using the NextSeq500 platform (Illumina). CAD patients showed 94% of promoters, 75% of genes and 70% of CpG single sites hypermethylated compared to CTR while AMI patients showed 75% of promoters, 66% of genes and 72% of CpG single sites hypermethylated compared to CTR. The GO Analysis highlighted that most of the differentially methylated genes and promoters were in the G-protein coupled receptor signaling and activity and transmembrane signaling receptor activity pathways. Interestingly, in CAD patients CXCL4 (promoter and gene) and MIR185 (promoter) resulted hypermethylated; in AMI patients the promoter of NDRG4 was hypomethylated while CXCL9 gene, the promoter of KLRB1 and four pseudogenes related to lncRNA class (RP11-26C10.1, HMGB3P27, RP11-158L12.2, TPTE1) resulted hypermethylated. Even if further studies are necessary to validate these genetic and epigenetic data, the genetic regions identified in this study encompass genes involved in relevant processes such as oxidative stress, immune response, cholesterol metabolism, inflammation and also lncRNAs that could be new interesting potential diagnostic biomarkers for CAD and AMI risk assessment.



**P223**  
**RNA and miRNA sequencing study for the identification of novel biomarkers for the early diagnosis of myocardial infarction**

**B. Rizzacasa**<sup>1</sup>, E. Morini<sup>1</sup>, R. Mango<sup>2</sup>, S. Maletta<sup>1</sup>, C. Vancheri<sup>1</sup>, M. Macrini<sup>2</sup>, S. Budassi<sup>2</sup>, G. Massaro<sup>2</sup>, S. D'Annibale<sup>3</sup>, F. Romeo<sup>2,3</sup>, G. Novelli<sup>1</sup>, F. Amati<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dept. of Biomedicine and Prevention, University of Rome Tor Vergata, Italy  
<sup>2</sup>U.O.C. of Cardiology, Policlinico Tor Vergata, Rome, Italy  
<sup>3</sup>Dept. of System Medicine, University of Rome Tor Vergata, Italy

Coronary artery disease (CAD), leading cause of death worldwide, depends on environmental, genetic and epigenetic factors. Although many of these factors have been identified, it is still not possible to predict the risk of disease; thus, the identification of new biomarkers is crucial for a clinical and therapeutic standpoint. We performed a total RNA and miRNA sequencing study on peripheral blood samples of patients with no coronary lesions (CTR group), patients with CAD and no previous acute myocardial infarction (AMI) events (CAD group) and patients arrived at our attention within 24 hours from an AMI event (AMI group). Filtering our results based on fold-change ( $FC \geq 2$ ) and p-value ( $p \leq 0.05$ ), we observed in CAD patients the differential regulation of 24 genes (17 up and 7 downregulated) and in AMI patients of 30 genes (19 up and 11 downregulated). The pathway analysis highlighted the NF- $\kappa$ B signaling and interleukin-1 family signaling as significantly represented pathways. Among these differentially regulated genes, NEBL ( $FC \geq 38$ ,  $p \leq 0.0005$ ) and LINC00189 ( $FC \geq 7$ ,  $p \leq 0.01$ ) are upregulated in AMI compared to CTR and CAD groups. NEBL encodes for a nebulin-like protein, strongly expressed in cardiac muscle. NEBL has been previously associated with cardiomyopathies but no evidence of its involvement in CAD are available. LINC00189, mapping on chromosome 21, is an uncharacterized long intergenic non-coding RNA. miRNA-seq analysis identified 13 regulated miRNAs (7 up and 6 downregulated) in CAD patients and 46 regulated miRNAs (23 up and 23 downregulated) in AMI patients. Among the differentially expressed miRNAs, miR-150 ( $FC \geq -7.39$ ,  $p \leq 0.005$ ) and miR-200c ( $FC \geq -6.17$ ,  $p \leq 0.05$ ) are highly downregulated in AMI patients compared to controls. Even if deeper studies on a vast cohort of patients are necessary to validate these data, the RNAs and miRNAs identified in this study are new potential diagnostic or prognostic biomarkers for CAD and AMI.





**P224**  
**High prevalence of missense/in frame mutations in NF1 patients with congenital heart disease provide evidence for a genotype phenotype correlation**

R. Criscione<sup>1</sup>, P. Daniele<sup>2</sup>, V. Pinna<sup>2</sup>, S. Cavone<sup>2</sup>, F. Annunziata<sup>2</sup>, A. Alberico<sup>2</sup>, H. Hozhabri<sup>2,3</sup>, P. Versacci<sup>1</sup>, M.C. Digilio<sup>4</sup>, G. Calcagni<sup>4</sup>, B. Dallapiccola<sup>4</sup>, M. Tartaglia<sup>4</sup>, B. Marino<sup>1</sup>, A. De Luca<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Pediatric Cardiology, Department of Pediatrics, Sapienza University, Rome, Italy

<sup>2</sup>Molecular Genetics Unit, Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy

<sup>3</sup>Department of Experimental Medicine, Sapienza University, Rome, Italy

<sup>4</sup>Bambino Gesù Children Hospital, IRCCS, 00146 Rome, Italy

**Introduction**  
 Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a common autosomal dominant disorder affecting 1 in 3500 people worldwide. NF1 is caused by heterozygous mutation in the NF1 gene and belongs to the RASopathy class of diseases, a group of rare genetic conditions caused by mutations in genes of the Ras-MAPK pathway. NF1 mutation spectrum is heterogeneous, and most of mutations (>80%) cause, directly or indirectly, a premature termination codon. Clinical manifestations include café au lait spots, lentiginos, neurofibromas, and cardiovascular manifestations with variable clinical expression. Cardiovascular manifestations of NF1 may include hypertension due to renal artery stenosis, pheochromocytoma. Congenital heart disease (CHDs) are considered unusual.

**Aim of the study**  
 The aim of this study was to analyze the mutation spectrum of NF1 patients in relation to the presence of CHDs.

**Materials and Methods**  
 The study cohort included a total of 268 NF1 patients, comprising 15 subjects with CHD and 253 without CHD. Of the NF1 patients with CHD, 11 had pulmonary valvular stenosis, 1 patient had atrial septal defect, 1 had tetralogy of Fallot and 2 patients had pulmonary valvular stenosis with atrial septal defect. In all cases, cardiac diagnosis was obtained by echocardiography. NF1 gene mutation analysis was performed using various techniques including next-generation sequencing, Sanger sequencing and MLPA. Fisher's exact test (two-tailed) was used to conduct statistical comparisons.

**Results**  
 Heterozygous NF1 defects were identified in all subjects. Nine out of 15 (60.0%) individuals with NF1 and CHD were found to have non-truncating mutations, a much higher frequency than the 19.4% (49/253) reported in the NF1 cohort without CHD (P<0.001). On the opposite, 6 of 15 (40.0%) NF1 cases with CHD had truncating mutations compared with a 80.6% truncating mutations frequency in the NF1 population without CHD.

**Conclusions**  
 In the present study we identified a clear association between NF1-related CHDs and non-truncating NF1 mutations. A specific role of non-truncating mutations on the NF1 cardiac phenotype is strongly suggested and deserves further investigation.

**P225**  
**Identificazione di varianti causative di Cardiomiopatie e Morte cardiaca improvvisa mediante Next Generation Sequencing**

P. Palumbo<sup>1</sup>, G. Di Stolfo<sup>2</sup>, S. Castellana<sup>3</sup>, S. Mastroianno<sup>2</sup>, M.P. Leone<sup>1,4</sup>, O. Palumbo<sup>1</sup>, T. Biagini<sup>3</sup>, T. Mazza<sup>3</sup>, A. Russo<sup>2</sup>, M. Castori<sup>1</sup>, M. Carella<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UOC Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

<sup>2</sup>UOC Cardiologia UTCC, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

<sup>3</sup>Unit di Bioinformatica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo Istituto Mendel, Roma

<sup>4</sup>Dipartimento di Scienze del suolo, della pianta e degli alimenti, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari

Le cardiomiopatie (CMP) sono malattie in cui il miocardio è funzionalmente e strutturalmente alterato in assenza di malattia coronarica, ipertensione, valvulopatia o cardiopatie congenite. Queste condizioni spesso sono asintomatiche per anni e la prima manifestazione clinica può essere la morte improvvisa (SCD) dell'individuo. Screening su famiglie con uno o più affetti da CMP hanno documentato che oltre il 50% delle cardiomiopatie ha carattere familiare e che l'insorgenza della maggior parte di esse è dovuta a fattori genetici. Scopo del presente studio è identificare nuove varianti genetiche causative di CMP ed SCD mediante Next Generation Sequencing. L'analisi su una coorte di 78 pazienti affetti da varie forme di CMP e 2 pazienti colpiti da SCD è stata effettuata mediante un approccio Targeted Resequencing utilizzando un pannello contenente 75 geni responsabili e/o associati a CMP e SCD. Le varianti candidate sono state confermate mediante Sanger sequencing. Nei pazienti risultati negativi all'analisi, si è posta l'attenzione su possibili forme ad ereditarietà digenica. Nei pazienti affetti da CMP sono state identificate varianti patogenetiche o ad elevato score di patogenicità nel 50% dei casi circa, che interessano geni sarcomerici come MYH7, MYBPC3, MYH6, RBM20, TTN. Inoltre, sono state identificate possibili nuove forme digeniche di CMP. In entrambi i pazienti colpiti da SCD sono state identificate varianti ad elevato score di patogenicità: in una paziente è stata identificata una nuova variante missenso nel gene SCN10A mentre il secondo paziente è risultato essere portatore di 2 varianti nei geni DSG2 e DSC2. Il nostro studio conferma l'importanza dello screening genetico in pazienti affetti da CMP e nei loro familiari anche se asintomatici, soprattutto in famiglie con casi di morte improvvisa in giovane età. La conoscenza dello stato di portatore di una variante causativa consente di sottoporre il paziente ad un mirato follow-up clinico, al fine di prevenire manifestazioni drammatiche della patologia. Inoltre, sono state identificate nuove varianti associate ad SCD utili ad aumentare le conoscenze attuali sulle basi genetiche di questa manifestazione clinica.

**P226**  
**Novel  $\alpha$ -Actin Gene Mutation p.(Ala21Val) Causing Familial Hypertrophic Cardiomyopathy, Myocardial Noncompaction and Transmural Crypts. Clinical-Pathologic Correlation**

A. Frustaci<sup>1,2</sup>, V. Guida<sup>3</sup>, F. Picci Sparascio<sup>3</sup>, H. Hozabri<sup>3,4</sup>, T. Biagini<sup>5</sup>, T. Mazza<sup>5</sup>, C. Gaudio<sup>1</sup>, M.A. Russo<sup>1</sup>, C. Chimenti<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiovascular, Respiratory, Nephrologic, Anesthesiologic and Geriatric Sciences, Sapienza University, Rome, Italy

<sup>2</sup>Cellular and Molecular Lab, IRCCS L. Spallanzani, Rome, Italy

<sup>3</sup>Molecular Genetics Unit, Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy

<sup>4</sup>Department of Experimental Medicine, Sapienza University, Rome, Italy

<sup>5</sup>Bioinformatics Unit, Ospedale Casa Sollievo della Sofferenza, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy

<sup>6</sup>Department of Internal Medicine, Center for Secondary Hypertension, Sapienza University, Rome, Italy

<sup>7</sup>IRCCS San Raffaele Pisana, and MEBIC Consortium, San Raffaele Rome Open University, Rome, Italy

<sup>8</sup>Department of Radiological, Oncological and Pathological Sciences, Sapienza University, Rome, Italy

**Introduction**  
 Mutations of  $\alpha$ -actin gene (ACTC1) have been phenotypically related to various cardiac diseases including hypertrophic (HCM) and dilated cardiomyopathy, left ventricular myocardial non-compaction (LVNC) and congenital anomalies.

**Materials and Methods**  
 In an Italian family of 7 subjects, four aged 10 (II-1), 14 (II-2), 43 (I-4) and 46 years (I-5), presenting abnormal ECG changes, dyspnea and palpitation (II-2, I-4, I-5) and recurrent cerebral ischemic attack (I-5), underwent 2-D-echo, cardiac magnetic resonance (CMR), Holter monitoring. Patient II-2 and I-5 with ventricular tachycardia underwent a cardiac invasive study including coronary with left ventricular angiography and endomyocardial biopsy.

**Results**  
 In all the affected members ECG showed right bundle branch block and left anterior hemiblock with age-related prolongation of QRS duration. 2D-echo and CMR documented LVNC in all and in I-4, I-5 and II-2 a progressive LV hypertrophy up to 22mm maximal wall thickness. Coronary arteries were normal. LV angiography showed transmural crypts progressing to spongy myocardial transformation with LV dilatation and dysfunction in the oldest subject. At histology and electron microscopy detachment of myocardiocytes were associated with cell and myofibrillar disarray and degradation of intercalated discs causing dis-anchorage of myofilaments to cell membranes. Targeted gene analysis with Illumina TruSight Cardio NGS panel showed in affected members unreported p.(Ala21Val) mutation of ACTC1.

**Conclusions**  
 Novel p.(Ala21Val) mutation of ACTC1 causes myofibrillar and intercalated disc alteration leading to familial HCM and LVNC with transmural crypts.



**P227**  
**Eterozigosi composta MYBPC3 associata a ventricolo sinistro non-compatto (VSNC) e morte nella prima infanzia: primo caso di VSNC ad eredit autosomico recessiva**

P. Prontera<sup>1</sup>, M. Magliozzi<sup>2</sup>, A. Mencarelli<sup>1</sup>, E. Sallicandro<sup>1</sup>, G. D'Elia<sup>2</sup>, E. Agolini<sup>2</sup>, A. Novelli<sup>2</sup>, G. Stangoni<sup>1</sup>, S. Troiani<sup>3</sup>

<sup>1</sup>SSD Neonatologia e Diagnostica Prenatale/CRR Genetica Medica, Azienda Ospedaliera di Perugia, Perugia, Italia

<sup>2</sup>UOC Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia

<sup>3</sup>S.C. Neonatologia, Azienda Ospedaliera di Perugia, Perugia, Italia

**Premessa:** Il ventricolo sinistro non compatto o spongioso (VSNC) è una rara forma di cardiomiopatia caratterizzata da trabecolature aggettanti nel lume ventricolare sinistro, associate a profondi recessi intertrabecolari. La ricorrenza nelle famiglie segue usualmente modelli ereditari autosomico dominanti o recessivi legati alla X, e numerosi geni sono stati implicati nella sua patogenesi.

**Scopo:** Identificare le possibili cause genetiche di VSNC ad eredit potenzialmente autosomico recessiva in una bambina deceduta a 2 anni e 6 mesi di vita.

**Materiali e Metodi:** Ecocardiografie sono state eseguite nei genitori, sani non consanguinei e con anamnesi familiari negative. Lo studio genetico è stato eseguito mediante sequenziamento di nuova generazione (Illumina Mi-Seq) di un pannello di 56 geni dedicato all'analisi molecolare delle diverse forme di cardiomiopatie.

**Risultati:** Le ecocardiografie dei genitori sono risultate nella norma. L'analisi NGS ha identificato un eterozigosi composta per le mutazioni c.3192dupC e c.2015\_2026delGG a carico del gene MYBPC3. I genitori sono risultati entrambi portatori sani delle mutazioni MYBPC3.

**Conclusioni:** Mutazioni, troncanti, in eterozigosi di MYBPC3 sono responsabili di forme autosomico dominanti di cardiomiopatia ipertrofica/dilatativa o, più raramente di VSNC. Nella letteratura scientifica vengono riportati dei rari casi di neonati deceduti per grave cardiomiopatia ipertrofica associata a mutazioni in eterozigosi composta di MYBPC3. Questo studio identifica MYBPC3 come primo gene responsabile di una forma di VSNC ad eredit autosomico recessiva o, possibilmente, eredit dominante incompleta, suggerendone l'analisi molecolare, in particolare nei casi di VSNC isolati.







P228

**The genetic heterogeneity of human cardiomyopathy may be better detected by search of comprehensive of mutational alterations through NGS-based gene panels**

M.V. Esposito<sup>1,2,8</sup>, V. D'Argenio<sup>1,2,8</sup>, M. Nunziato<sup>1,3</sup>, G. Limongelli<sup>4</sup>, B. Sarubbi<sup>5</sup>, M. Losi<sup>6</sup>, S. Betocchi<sup>6</sup>, G. Frisso<sup>1,2,9</sup>, F. Salvatore<sup>1,2,7,9</sup>

<sup>1</sup>CEINGE-Biotecnologie Avanzate, via Gaetano Salvatore 486, 80145 Naples, Italy.

<sup>2</sup>Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University of Naples Federico II, via Sergio Pansini 5, 80131 Naples, Italy

<sup>3</sup>Department of Movement Sciences and Wellness (DiSMEB), University of Naples Parthenope, via Medina 40, 80133 Naples, Italy.

<sup>4</sup>Cardiologia SUN - Heart Failure Unit, Department of Cardiothoracic Sciences, L. Vanvitelli-Campania University, Naples, Italy.

<sup>5</sup>Paediatric Cardiology and G.U.C.H. Unit, A.O.R.N. "Ospedali dei Colli", L. Vanvitelli-Campania University, Naples, Italy.

<sup>6</sup>Department of Advanced Biomedical Sciences, Division of Cardiology, University of Naples, Federico II, Naples, Italy.

<sup>7</sup>IRCCS-Fondazione SDN, via Emanuele Gianturco 113, 80143 Naples, Italy.

<sup>8</sup>co-first authors

<sup>9</sup>\*\*co-corresponding authors

Inherited cardiopathies consisting in a group of cardiovascular genetic disorders classified in primary myocardial and heart-rhythm alterations (1). These genetic forms overlap in molecular pathways that regulate different myocardial functions and, if altered, can even predispose to sudden cardiac death (SCD). The gene and allelic heterogeneity, the phenotypic variability and the different clinical penetrance of these diseases, make crucial the correct setting of genetic tests for the identification of mutation carriers, also in order to improve more specific molecular alteration diagnosis and to help into the most proper clinical treatment (2). The risk of undiagnosed disease accounts for a significant proportion of SCD in young adults and athletes (3) and makes of great utility the implementation of a rapid and complete genetic testing. To address this issue, we analyzed 162 unrelated subjects using 3 large gene custom panels: a 111-genes panel (MyoNext) to identify myocardial diseases, a 75-genes panel (CanalPlus) for channelopathies, and a 138-genes panel (SuddenDeath) constituted by practically all genes known to be related to SCD, including those present in the previous two panels. NGS libraries were prepared on our custom targeted panels, using the HaloPlex Target Enrichment System (Agilent) and sequenced by the NextSeq (2x151 PE) systems (Illumina). Data analysis was performed using the SureCall software (Agilent). Thirty per cent of patients analyzed with MyoNext, 13% of patients analyzed with CanalPlus and 44% of patients analyzed with the SuddenDeath panel carried pathogenetic mutations. Most mutations occurred in the MYBPC3 and MYH7 genes. Notably, mutations were also found in at least 10 genes not usually tested for myocardial disease, coding also for cytokines, receptors and transcription factors. These findings suggest that molecular screening for cardiopathies should be extended to many other genes beyond the conventional ones used often in routine analysis for each putative disease. In conclusion, this faster and more extensive molecular screening versus traditional Sanger sequencing of only the most common disease-related genes, in a routine diagnostic workflow, increases diagnostic sensitivity for genetic cardiopathies and will lead to a more accurate heart disease risk assessment in patients and their families. Lastly, the method we describe

can be used to detect other inherited cardiomyopathies-related genes, by the flexible gene panel customization, thus improving the knowledge about myocardial disease genetics.

Aleksova N et al. Curr Opin Cardiol 2017;32:189-95.

D'Argenio V et al. JMD 2014;16:32-44.

Harmon K et al. Br J Sports Med 2014;48:1185-1192.

P229

**A pathogenic mutation in the alpha subunit of the sodium channel (SCN5A) gene in an asymptomatic child to became an athlete: a case report**

M.V. Esposito<sup>1,2,5</sup>, V. D'Argenio<sup>1,2,5</sup>, M. Nunziato<sup>1,3</sup>, P. Buono<sup>1,3</sup>, F. Salvatore<sup>1,2,4,6</sup>, G. Frisso<sup>1,2,6</sup>

<sup>1</sup>CEINGE-Biotecnologie Avanzate, via Gaetano Salvatore 486, 80145 Naples, Italy.

<sup>2</sup>Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University of Naples Federico II, via Sergio Pansini 5, 80131 Naples, Italy.

<sup>3</sup>Department of Movement Sciences and Wellness (DiSMEB), University of Naples Parthenope, via Medina 40, 80133 Naples, Italy.

<sup>4</sup>IRCCS-Fondazione SDN, via Emanuele Gianturco 113, 80143 Naples, Italy.

<sup>5</sup>\*Co-first authors

<sup>6</sup>\*\*Co-corresponding authors

Inherited cardiopathies are clinically heterogeneous genetic disorders that represent a major predisposition cause of heart disease in all age groups (1). The clinical classification of these cardiovascular disorders is based on ventricular heart morphology and functions in primary myocardial disorders and/or channelopathies (2). These genetic forms are characterized by locus, allelic and phenotypic heterogeneity, clinical variability and also variable phenotypic penetrance. Moreover, pathogenic mutations in genes driving the molecular pathways that regulates different myocardial functions can predispose to sudden cardiac death (SCD). Because of the difficulty to diagnose these pathological alterations due to the overlapping clinical signs or symptoms or even silent phenotypes, the risk of undiagnosed disease could be high especially in young adults and athletes, which may incur in SCD. We describe a case of a clinical asymptomatic eight years old child, who underwent a routine medical examination to undertake physical activity to become an athlete. He showed abnormal electrocardiogram (ECG) signs, with a suspicion to present possibly a Brugada syndrome. Nevertheless, no cases of myocardial disease were reported in his family. Genetic analysis was performed using a 75 customized gene-panel, Canal Plus, for channelopathies designed into our laboratory. NGS library was prepared using the HaloPlex Target Enrichment System (Agilent) for our customized panel and sequenced using MiSeq (2 x 151 PE) instrument (Illumina). Data analysis was performed using the SureCall software (Agilent). The child resulted carrier of a pathogenic mutation in the SCN5A gene (c.1126C>T, p.Arg376Cys). About 20% of patients affected by Brugada syndrome bear mutations in gene coding for a sodium ion channel in the cell membranes of the myocytes. The loss-of-function mutations in SCN5A gene lead to this sodium channelopathy by alterations of cardiac conduction (3). More than 100 mutations in the SCN5A gene have been reported to date, each producing pathogenetic mechanisms and effects on normal function, thereby explaining the somewhat different clinical signs and the related phenotypic heterogeneity (4). This case report highlights the importance of the implementation of a rapid, sensitive and wide molecular screening to shed light on possible genetic alterations present especially in asymptomatic people with negative family history, which may often remain undiagnosed.

Baruteau AE et al. Nat Rev Cardiol. 2017 Sep 7.

D'Argenio V et al. JMD 2014;16:32-44.

Sarquella-Brugada G et al. Genet Med. 2016;18(1):3-12.

Hedley PL et al. Hum Mut. 2009;30:1256-66.



P230

**Riduzione dell'espressione dell'mRNA mitocondriale nella demenza con corpi di Lewy**

M. Salemi<sup>1</sup>, M. Cantone<sup>1</sup>, M.G. Saluzzo<sup>1</sup>, M. Giambirtone<sup>1</sup>, R. Spada<sup>1</sup>, R. Ferri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Associazione Oasi Maria SS. (IRCCS), Troina, Italia.

Premessa: I mitocondri si trovano in tutte le cellule umane nucleate e svolgono molteplici funzioni, tra cui la generazione di energia cellulare. La disfunzione mitocondriale conduce ad una produzione energetica insufficiente per soddisfare le esigenze di vari organi, non ultimo il sistema nervoso e con relative implicazioni sulle malattie neurodegenerative. La demenza con corpi Lewy (DLB) è una forma molto diffusa e meno diagnosticata di demenza negli anziani, che si verificano in circa il 10% dei casi. Anche se i fattori genetici possono far luce sui meccanismi della malattia, allo stato attuale non esiste alcuna indicazione per dei test genetici clinici in DLB. Obiettivi della ricerca: Lo scopo di questo studio è quello di valutare l'espressione genica dell'mRNA mitocondriale in leucociti di sangue periferico, tramite qRT-PCR, in un gruppo di pazienti con DLB, confrontando il cDNA dei pazienti con cDNA di soggetti di controllo, specificatamente le sub-unit mitocondriali: ATP6, ATP8, CO1, CO2, CO3, ND1, ND2, ND3, ND4, ND5 e ND6.

Materiali e metodi: Presso l'IRCCS Associazione Oasi di Troina (Italia) sono stati reclutati 14 soggetti, di cui 7 pazienti con DLB e 7 controlli. Gli esperimenti qRT-PCR sono stati eseguiti utilizzando il Light Cycler 480. I dati di quantificazione sono stati ottenuti utilizzando il metodo comparativo  $\Delta\Delta Ct$ . Abbiamo considerato geni come sovra-espressi nel paziente se il valore era maggiore di 1.5 e sottopresso se inferiore a 0.5.

Risultati: Le sub-unit mitocondriali che hanno avuto una sotto-espressione nei pazienti sono: ATP6 in 4 campioni, ATP8 in 5 campioni, CO1 in 4 campioni, CO2 in 6 campioni, CO3 in 6 campioni, ND1 in 3 campioni, ND2 in 6 campioni, ND3 in 4 campioni, ND5 in 4 campioni e ND6 in 3 campioni; mentre le sub-unit che hanno avuto una sovra-espressione sono: ATP6 in 1 campione, ND4 in 1 campione, ND6 in 2 campioni.

Conclusioni: I dati ottenuti hanno evidenziato che in questo gruppo di pazienti con DLB vi sia una riduzione di espressione in alcune sub-unit mitocondriali. Una disfunzione del metabolismo mitocondriale provoca una riduzione della produzione di ATP che incide sulla produzione di radicali liberi e sui meccanismi apoptotici che a loro volta contribuiscono alla demenza con corpi Lewy.





**P231**  
**A new restless legs syndrome locus on chromosome 14**

C. Villa<sup>1</sup>, S. Marelli<sup>2</sup>, L. Ferini-Strambi<sup>2</sup>, M. Lavitrano<sup>1</sup>, R. Combi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Medicine and Surgery, University of Milano-Bicocca, Monza, Italy

<sup>2</sup>Department of Clinical Neurosciences, Sleep Disorders Center, University Vita-Salute San Raffaele, Milan, Italy

Introduction: Restless legs syndrome (RLS), also known as Willis-Ekbom Disease, is one of the most common neurological sensory-motor disorder leading to insomnia and affecting more than five to 10% of the white population. It is characterized by an intrusive urge to move the legs associated with an uncomfortable and bothersome sensation in the affected limbs, which typically occurs and tend to worsen in the evening/night or during period of inactivity. Idiopathic/genetic RLS (classified as primary RLS) is a complex genetic disorder with several mostly unknown loci involved: studies demonstrated a strong relationship between genetic predisposition and early-onset RLS, of which more than 60% reveal a positive familial history, and in the majority of familial cases an autosomal dominant mode of transmission was reported. Up to now, risk variants in six genomic loci are known but they accounted for only a small proportion of the genetically determined susceptibility to RLS. Aim: to search for novel causal genes and/or mutations in a large Italian family with 19 patients affected by autosomal dominantly inherited RLS. Materials and Methods: genomic DNA was isolated from peripheral blood and the family was evaluated using a combined approach of genome-wide linkage analysis (using SNPs microarrays) and whole-exome sequencing. Results: genome-wide linkage analysis (performed with both parametric and non-parametric statistical tests) identified a single linkage peak spanning a 23.30 Mb region of the q arm of chromosome 14, with a maximum two-point parametric LOD score value of 2.80 and 2.96, in case of incomplete penetrance of 0.80 and 0.60 respectively. This locus was only minimally overlapping with the previous reported on chromosome 14. Whole-exome sequencing identified 358 SNPs (shared by 3 patients of the family) in this candidate region. In particular, 61 variants were identified in the exonic or splicing regions. However, no new variants were detected being they common and already reported in the available databases. No variants were detected in the region overlapping among the two loci on chromosome 14. Conclusions: our data support the picture of RLS as a complex trait with common variants causing susceptibility to the disease as well as other additional factors.

**P232**  
**A complex neurological phenotype related to SLC25A4 mutation. Unusal report**

A. Fogli<sup>1</sup>, M. Mancuso<sup>2</sup>, A. Michelucci<sup>1</sup>, F. Baldinotti<sup>1</sup>, C. Cosini<sup>1</sup>, E. Falaschi<sup>1</sup>, F. Lembo<sup>1</sup>, G. Siciliano<sup>2</sup>, M.A. Caligo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>SD Genetica Molecolare, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa

<sup>2</sup>U.O. Neurologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa

Mitochondrial carriers represent a large group of nuclear-encoded mitochondrial proteins with diverse substrates. The transport steps performed by these carriers are required for the maintenance and expression of mtDNA and all other mitochondrial processes. The isoform expressed at high levels in skeletal muscle, heart, and brain is AAC1 (mitochondrial ADP/ATP carrier) which is encoded by the SLC25A4 gene (also known as ANT1) (MIM:103220), located on the sub-telomeric region of chromosome 4q. Several mutations in SLC25A4 have been linked to mitochondrial disorders and fall into two distinct clinical phenotypes: null recessive mutations causing childhood-onset mitochondrial myopathy and cardiomyopathy and several single heterozygous mutations reported in cases of adult-onset autosomal-dominant progressive external ophthalmoplegia (adPEO) associated with multiple mitochondrial DNA deletions. Despite the clinical heterogeneity of SLC25A4 mutations, the course of SLC25A4-related adPEO is relatively benign, symptoms being generally restricted to skeletal muscle, without cognitive impairment. We developed an NGS (Next-Generation Sequencing)-based targeted gene panel including ten nuclear mitochondrial genes (POLG, C10orf2, TYMP, POLG2, SLC25A4, TK2, MPV17, RRM2B, OPA1, DGUOK) using the MySeq Illumina platform and we searched disease-causing mutations in patients with adPEO. Here we report the case of an Italian 74 years old woman with a complex neurological phenotype, including mitochondrial myopathy, cPEO and dementia, in whom the NGS analysis has detected the c.340G > C, p.A114P heterozygous change in the SLC25A4 gene. The p.A114P dominant mutation is reported in patients with PEO belonging to a group of less severe mutations affecting peripheral amino acids of AAC1 not crucial for transport. Further studies are needed to assess the prevalence of central neurological manifestations in SLC25A4 mitochondrial disease.

**P233**  
**The genetics of Alzheimer Disease and Frontotemporal Dementia: focusing on CD33 and TREM2**

A. Rendina<sup>1</sup>, S. Napolitano<sup>1</sup>, G. Milan<sup>2</sup>, L. Fucci<sup>3</sup>, E. Vitale<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Protein Biochemistry (IBP), CNR, Naples, Italy

<sup>2</sup>Geriatric Clinic Frullone ASL Napoli 1, Naples, Italy

<sup>3</sup>Department of Biology, University of Naples Federico II, Naples, Italy

Alzheimer Disease (AD) and Frontotemporal Dementia (FTD) are two multifactorial, heterogeneous and genetically complex neurodegenerative disorders. Despite massive research and drug development efforts, there are still no therapies that slow down or stop their progression. Several genes have been associated to both pathologies suggesting that an as yet unknown common molecular pathway could exist. Mutations in genes related to neuroinflammation, including CD33 and TREM2, may be risk factors and could be entry points for therapeutic intervention. Two CD33 SNPs and one in TREM2 were described to be predisposing factors to Late Onset Alzheimer disease (LOAD). Specifically, CD33 SNPs rs3865444 and rs12459419 in minor alleles were found to confer strong protection while conferring elevated risk of LOAD in major alleles. These SNPs directly modulate the CD33 exon 2 splicing efficiency. In addition, the rare heterozygous missense variant rs75932628-T in TREM2 exon 2 was strongly associated with the ability of TREM2 to activate microglial cells.

In order to assess the presence of these polymorphisms in our cohort we analyzed 216 Caucasians with LOAD, mean age 60.85 years, and 50 age-matched healthy controls. We used High Resolution Melting analysis (HRM) on genomic DNA from whole blood of patients as a screen for mismatches. We sequenced the DNA from individuals with different melting curves using the Sanger method and we used these as reference in our analysis. Our patients exhibited the coinheritance of SNPs rs3865444 and rs12459419, being heterozygous in 40%, homozygous for the major allele in 56.48% and homozygous for the minor allele in 3.7% of individuals. In addition, we identified a third SNP in CD33 exon 2, rs2455069, which belongs to a previously identified LD SNP block associated with an increased rate of cognitive decline. We found that all patients analyzed for SNP rs75932628 in the TREM2 gene are homozygous for the wild-type allele. However, some individuals are heterozygous for the nearby SNP rs143332484, which could be potentially associated with AD in our population. Further investigations are in progress to understand the mechanism of action of these two genes.



**P234**  
**Expanding RAD21 spectrum in chronic intestinal pseudo-obstruction (CIPO): RAD21 mapping in enteric nervous systems and identification of novel changes in associated genes**

E. Bianco<sup>1,2</sup>, E. Bonora<sup>1</sup>, D. Chiara<sup>1</sup>, G. Lindberg<sup>3</sup>, M. D Amato<sup>4,5</sup>, P. Clavenzani<sup>2</sup>, C. Graziano<sup>1</sup>, M. Seri<sup>1</sup>, S.J. Gibbons<sup>6</sup>, G. Farrugia<sup>6</sup>, R. De Giorgio<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Medical and Surgical Sciences, DIMEC, University of Bologna, Bologna, Italy

<sup>2</sup>Dept. of Medical Veterinary Sciences, DIMEVET, University of Bologna, Ozzano dell Emilia, Italy

<sup>3</sup>Dept. of Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

<sup>4</sup>Dept. of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

<sup>5</sup>Molecular Genetics of Gastrointestinal Diseases, Biodonostia Health Research Institute, San Sebastian, Spain

<sup>6</sup>Enteric NeuroScience Program, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

<sup>7</sup>Dept. of Medical Sciences, University of Ferrara, Ferrara, Italy

Objective: RAD21 is a double-strand-break repair protein and a critical component of the cohesin complex with key roles in several cellular functions including transcriptional regulation. A mutation in RAD21 has been associated with chronic intestinal pseudo-obstruction (CIPO). This study was aimed to analyze the distribution of RAD21 in enteric neurons and to identify genes mutated in a subset of neurogenic Rad21-negative CIPO patients. Methods: Colocalization of RAD21-immunoreactivity (IR) with markers for subsets of neurons was examined in the human small intestine and in mice. Whole exome sequencing (WES) was performed on genomic DNA of 6 patients with clinical, radiological and manometric evidence of neurogenic CIPO (4F). Sporadic CIPO patients (n= 111; 65 F; age: 7-70 yrs) were analyzed with a custom NGS panel. Results: RAD21-IR was found in a subset of neuronal cell bodies and nerve fibers in myenteric plexuses of human and mouse small intestine, as labeled by PGP9.5 and HuC/D. Both in human and mouse small intestine RAD21-IR neurons did not colocalize with neuronal nitric oxide synthase (nNOS), whereas a subset of choline acetyl transferase (ChAT) positive neurons displayed RAD21-IR. WES analysis identified a novel de novo variant in SMC3, a gene physically linked with RAD21 in the cohesin complex in a patient with CIPO and severe hypoganglionosis. A de novo variant in B3GAT2 a glucuronyl transferase implicated in neuronal adhesion/migration was identified in a second trio. Target sequencing showed a premature stop codon in B3GAT2 and different rare/novel missense variants in SCN5A, SCN9A, SCN10A and SCN11A in 15 CIPO patients. Conclusions: In human and mouse small intestine, RAD21 was detected in subsets of ChAT +/nNOS- and ChAT-/nNOS- enteric neurons of mouse. RAD21 loss of function mutation may cause disease by altering maintenance and survival of specific neuronal subpopulations. Moreover, high-throughput sequencing technologies identified novel mutations in genes encoding for additional cohesin components involved in gut sensorimotor function. Our findings provide a basis to better understand molecular mechanisms contributing to neuronal abnormalities underlying gut dysmotility and pain in CIPO. Support: Telethon GGP15171.





**P235**  
**Applicazione di un pannello NGS nella diagnosi delle Paraplegie Spastiche Familiari**

L. Castiglia<sup>1</sup>, M. Vinci<sup>1</sup>, O. Galesi<sup>1</sup>, L. Grillo<sup>1</sup>, S. Amata<sup>1</sup>, A. Gloria<sup>1</sup>, C. Scavuzzo<sup>1</sup>, P. Schinocca<sup>1</sup>, A. Spalletta<sup>1</sup>, M. Sturnio<sup>1</sup>, M. Fichera<sup>1,3</sup>, S.A. Musumeci<sup>6</sup>, C. Scuderi<sup>4</sup>, A. Vitello<sup>5</sup>, S. Bianca<sup>4</sup>, T. Mattina<sup>8</sup>, C. Romano<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>U.O.C. Lab. di Genetica Medica, IRCCS Associazione Oasi Maria Santissima, Troina (EN)

<sup>2</sup>Dip. di Scienze Biomediche e Biotecnologiche, Genetica Medica, Universit di Catania

<sup>3</sup>U.O.S. di Malattie Neuromuscolari, IRCCS Associazione Oasi Maria Santissima, Troina (EN)

<sup>4</sup>U.O.C. di Pediatria e Genetica Medica, IRCCS Associazione Oasi Maria Santissima, Troina (EN)

<sup>5</sup>U.O.C. di Neurologia, IRCCS Associazione Oasi Maria Santissima, Troina (EN)

<sup>6</sup>Genetica Medica Dip. Materno Infantile ARNAS Garibaldi Nesima, Catania

<sup>7</sup>Genetica Medica Universit di Catania

**Premessa.** Le Paraplegie Spastiche Familiari (PSF) comprendono un gruppo clinicamente e geneticamente eterogeneo di malattie neurodegenerative caratterizzate da spasticit degli arti inferiori che si manifesta in maniera isolata o in associazione con altri segni neurologici, come il deterioramento cognitivo, le convulsioni, l'atassia o la neuropatia. Si stima che le PSF colpiscano una persona ogni 20.000 nella popolazione generale dell'Europa, con frequenze variabili nelle diverse popolazioni tra 1,3 e 9/100.000. Le PSF possono essere ereditate come carattere autosomico dominante, autosomico recessivo o recessivo legato al cromosoma X. Nelle PSF la caratterizzazione molecolare è importante per una accurata diagnosi. L'eterogeneità clinica e genetica delle PSF ha comportato in passato un approccio diagnostico gene per gene richiedendo lunghi tempi di attesa e costi considerevoli.

**Scopo dello studio.** Fornire al clinico una strategia che permetta di aumentare l'efficienza dell'iter diagnostico con lo studio simultaneo dei geni associati alle PSF. **Materiali e Metodi.** 71 pazienti con fenotipo clinico di PSF sono stati analizzati per NGS (Next Generation Sequencing) con un pannello genetico custom (Life Technologies) di 30 geni tra quelli più comunemente coinvolti.

**Risultati.** Sono state individuate 56 varianti in 31 pazienti. L'analisi del ruolo patogenetico delle suddette varianti ha permesso di giungere ad una diagnosi certa in 20 pazienti. **Conclusione.** L'approccio con il pannello NGS implementato ha identificato la causa genetica nel 28% dei pazienti con fenotipo PSF e si è rivelato certamente vantaggioso in termini di costi e di tempi. Lo studio con un pannello NGS dovrebbe essere adottato in prima battuta nella ricerca di mutazioni nei pazienti con sospetta PSF.

**P236**  
**Microdelezione di 175Kb in Xq22.2 associata a Disabilit Intellettiva, Problemi Comportamentali ed Anomalie Morfologiche Facciali**

O. Galesi<sup>1</sup>, L. Castiglia<sup>1</sup>, L. Grillo<sup>1</sup>, M. Vinci<sup>1</sup>, S. Amata<sup>1</sup>, A. Gloria<sup>1</sup>, C. Scavuzzo<sup>1</sup>, P. Schinocca<sup>1</sup>, A. Spalletta<sup>1</sup>, M. Sturnio<sup>1</sup>, M. Fichera<sup>1,2</sup>, C. Barone<sup>4</sup>, D. Greco<sup>4</sup>, R. Pettinato<sup>4</sup>, S.A. Musumeci<sup>5</sup>, C. Scuderi<sup>3</sup>, C. Romano<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>U.O.C. Lab. di Genetica Medica, IRCCS Associazione Oasi Maria Santissima, Troina (EN)

<sup>2</sup>Dip. di Scienze Biomediche e Biotecnologiche, Genetica Medica, Universit di Catania

<sup>3</sup>U.O.S. di Malattie Neuromuscolari, IRCCS Associazione Oasi Maria Santissima, Troina (EN)

<sup>4</sup>U.O.C. di Pediatria e Genetica Medica, IRCCS Associazione Oasi Maria Santissima, Troina (EN)

<sup>5</sup>U.O.C. di Neurologia, IRCCS Associazione Oasi Maria Santissima, Troina (EN)

**Premessa:** Microdelezioni della regione Xq22.2 sono state riscontrate in pazienti con Disabilit Intellettiva (DI). Gli autori J. Labonne et al. (BMC Neurology, 2016) hanno rivisto la letteratura riguardo le microdelezioni in Xq22.2 ed hanno suggerito un ruolo patogenetico dell'aploinsufficienza del gene GLRA4 nella DI sindromica. **Scopo dello studio:** Verificare in una vasta popolazione di pazienti con DI la presenza di ulteriori microdelezioni in Xq22.2 che supportino o meno il ruolo patogenetico dell'aploinsufficienza del gene GLRA4.

**Materiali e Metodi:** 4900 pazienti con DI afferenti all'IRCCS Associazione Oasi Maria SS di Troina sono stati sottoposti a test genetico array-CGH utilizzando una piattaforma 8x60K (Agilent Technologies).

**Risultati:** Nel campione esaminato non sono state riscontrate microdelezioni coinvolgenti il gene GLRA4. È stata evidenziata una microdelezione di 175Kb che interessa i geni RAB40A, TCEAL4, TCEAL3, TCEAL1.

**Conclusioni:** Lo studio non supporta il ruolo patogenetico dell'aploinsufficienza di GLRA4. Il confronto tra la microdelezione evidenziata e quella riferita in letteratura rivela una regione comune che interessa esclusivamente il gene TCEAL1. Il confronto dei dati clinici dei due pazienti, entrambi di sesso femminile, è suggestivo di un fenotipo sindromico e suggerisce l'implicazione del gene TCEAL1. Entrambe le pazienti hanno DI di grado grave, andatura atassica con base d'appoggio allargata, stereotipie a carico delle mani, linguaggio verbale limitato all'emissione di vocalizzi e presentano disturbi del sonno e anomalie morfologiche facciali. Ulteriori studi funzionali e il ritrovamento di mutazioni o delezioni intrageniche in pazienti con fenotipo evocativo di quello descritto sono comunque necessari per validarne l'implicazione.

**P237**  
**The impairment of GABAergic pathway as one of the driver forces in the etiopathogenesis of schizophrenia: evidence from functional studies and gene-set enrichment analyses**

C. Magri<sup>1</sup>, E. Giacomuzzi<sup>1</sup>, L. La Via<sup>1</sup>, D. Bonini<sup>1</sup>, V. Ravasio<sup>1</sup>, M.E.A. Elhussiny<sup>1</sup>, P. Valsecchi<sup>2</sup>, R. Bresciani<sup>3</sup>, A. Barbon<sup>1</sup>, A. Vita<sup>2</sup>, M. Gennarelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sez. Biologia e Genetica, Dip. Medicina Molecolare e Traslazionale, Universit degli Studi di Brescia, Brescia

<sup>2</sup>Sez. Neuroscienze, Dip. Scienze Cliniche e Sperimentali, Universit degli Studi di Brescia, Brescia

<sup>3</sup>Sez. Biotecnologie, Dip. Medicina Molecolare e Traslazionale, Universit degli Studi di Brescia, Brescia

Recent genetic findings on schizophrenia (SZ) point to the disruption of excitatory glutamatergic signaling and of inhibitory GABAergic modulation as one route to pathogenesis of SZ. Recently, whole exome sequencing of patients affected by SZ and with high levels of autozygosity allowed us to identify some ultra-rare homozygous mutations. Among these, there was a novel missense substitution (c.391A>G), mapping in the glutamate acid decarboxylase 1 (GAD1) gene (NM\_000817). GAD1 encodes for GAD67 enzyme, that catalyzes the production of gamma-aminobutyric acid (GABA) from L-glutamic acid. To clarify the role of ultra-rare homozygous variants in GABAergic genes as risk factors for SZ, we performed a genetic study of the c.391A>G mutation. Moreover, we looked for the enrichment of ultra-rare homozygous variant in 124 GABAergic genes in a cohort of 4,969 cases and 6,245 controls of the Psychiatric Genomics Consortium (DbGaP: phs000473.v1.p2).

Pedigree analysis revealed that the c.391A>G mutation segregated with SZ phenotype accordingly to a recessive model of inheritance. Biochemical assays revealed that the amino acid substitution induced by the mutation reduced GAD67 enzymatic activity by ~30%, while western blot and proximity ligation assays (PLAs) suggested that this impairment was due to a reduced homodimerization of GAD67, rather than to a reduced protein level. Interestingly, PLAs highlighted that the mutation impairs homodimerization only when present in a homozygous state. This corroborates the recessive effect suggested by the pedigree analysis.

The screening of 4,969 SZ patients did not highlight any other homozygous or compound heterozygous subject for ultra-rare variants in GAD1. However, when the analysis was extended to genes implicated in the GABAergic pathway, the frequency of patients with ultra-rare homozygous mutations (0.1%) was significant higher than in controls (0.02%), (p-value = 0.033). In conclusion, GABAergic signalling deficit in SZ has always been considered an adaptive response to a broad range of biological and environmental factors. This study suggests that the impairment of GABAergic system could be a driver event due to ultra-rare homozygous mutations, adding new insights on the role of GABAergic pathway in SZ.



**P238**  
**Mutational analysis of the GBA gene in an Italian population affected by Parkinson s disease**

I. Palmieri<sup>1,2</sup>, M. Valente<sup>1</sup>, F. Rey<sup>1,3</sup>, S. Gagliardi<sup>1</sup>, S. Zucca<sup>1</sup>, B. Minafra<sup>4</sup>, R. Zangaglia<sup>4</sup>, F. Blandini<sup>5</sup>, C. Pacchetti<sup>4</sup>, C. Cereda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center of Genomic and post-Genomic, C. Mondino National Neurological Institute, Pavia, Italy.

<sup>2</sup>Dep. of Molecular Biology, GolgiCenci Foundation, Abbiategrosso, Italy.

<sup>3</sup>Dep. of Brain and Behavioral Science, University of Pavia.

<sup>4</sup>Parkinson's Disease and Movement Disorders Unit, C. Mondino National Neurological Institute, Pavia, Italy.

<sup>5</sup>Center for Research in Neurodegenerative Diseases, C. Mondino National Neurological Institute, Pavia, Italy.

**Background:** Dysfunctions of the lysosomal autophagic degradation of cellular proteins is involved in Parkinson s disease (PD) pathogenesis and progression. PD is one of the most common neurodegenerative disease characterized by protein aggregates within dopaminergic neurons. Glucocerebrosidase (Gba) is a lysosomal enzyme and heterozygous mutations in the GBA gene are considered the greatest genetic risk factor for the development of PD (Murphy KE & Halliday GM, 2014).

**Aims:** Identification of genetic mutations in the GBA gene in a cohort of Italian patients affected by idiopathic Parkinson s disease.

**Materials and Methods:** Next Generation Sequencing (NGS) analysis (SureSelectQXT Target Enrichment, Agilent Technologies) has been performed using an Illumina MiSeq sequencer on a cohort of 227 Italian patients affected by PD. Pathogenic and likely pathogenic mutations have been confirmed via Sanger sequencing.

**Results:** Among the analysed cohort, 7,93% (N=18) of patients resulted to have variations in the GBA gene, according with the literature (O Regan G et al., 2017). Particularly, four patients carry the p.N370S mutation and two patients carry the p.L444P mutation, that are considered the most recurrent ones. Therefore, we found two mutations (p.E326K, p.T369M) described as risk factors for PD in five patients and other annotated variations (p.Y244C, p.H294Q, p.R368C, p.E427K) whose role has never been described in literature yet but defined damaging by Prediction test (Mutation Teaster, Polyphen). We also found two novel variations: p.R296X and p.T247S predicted as disease causing and benign respectively. This last variation is the only one that has been found in homozygosity and never described in association with Gaucher s disease.

**Conclusions:** Our NGS data report known and unknown mutations within the GBA gene in patients affected by PD, confirming this gene as the greatest genetic risk factor for PD development. The linkage between GBA gene mutations and PD may open intriguing perspectives in the etiopathogenesis of PD, uncovering mechanisms at the base of protein accumulation. Improvement in the understanding of disease-causing and disease-protecting mechanisms may help the development of new therapeutic strategies for the treatment of PD.







**P239**  
**Clinical spectrum of PTEN mutation in pediatric patients: a bicenter experience**

C. Ciaccio<sup>1</sup>, E. Alfei<sup>1</sup>, S. D'Arrigo<sup>1</sup>, S. Esposito<sup>1</sup>, I. Moroni<sup>3</sup>, C. Pantaleoni<sup>1</sup>, V. Saletti<sup>1</sup>, D. Tonduti<sup>3</sup>, D. Milani<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Developmental Neurology Division, Foundation IRCCS Neurological Institute Carlo Besta, Milan, Italy  
<sup>2</sup>Pediatric Highly Intensive Care Unit, Department of Pathophysiology and Transplantation, University of Milan, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Via Commenda 9, 20122, Milan, Italy  
<sup>3</sup>Department of Child Neurology, Foundation IRCCS Neurological Institute Carlo Besta, Milan, Italy

PTEN Hamartoma Tumor Syndrome (PTHS) is the relatively newly coined term that includes all the previous PTEN-associated conditions. Originally discovered as a tumor suppressor gene, PTEN is historically known to cause various types of cancer when germline mutated. In the last 15 years has been growing the awareness that the clinical spectrum of PTEN mutation can be much broader than previously thought, especially in children, which typically present a macrocephaly plus DD/ASD phenotype. Studies about PTHS in children mainly focus on one or a few sides of the condition. We collected 16 PTEN mutated children, diagnosed and follow in two clinics in Milan between 2006 and 2017, in order to give a full overview on clinical, neurological and neuroradiological aspects. Of our patients, 14 are males and 2 females, with an age at first evaluation varying between 6 months and 11 years; 25% had an inherited mutation. Macrocephaly was found in 100% of the patients, and it was a remarkable one, with HC above the +3 SD in all of the patient but 2 and with 4 patients with a HC above +6 SD. The prevalence of DD/ID and ASD among was of 56% and of 25% respectively, confirming that the association between neurodevelopmental problems and macrocephaly should suggest PTEN testing, especially when macrocephaly exceeds the +3SD. Brain MRI was performed in all the patients and 88% of them had at least one anomaly, with the more represented being enlarged perivascular spaces (56%), white matter anomalies (25%), and downward displacement of the cerebellar tonsils through the foramen magnum (37%). The first two signs have been already reported to be frequent in PTHS, we suggest that the latter should be considered the third MRI-pathognomonic sign of the condition, given also previous reports about Chiari 1 malformation in PTEN children. Vascular anomalies were present in 3 children, and one of them exhibited a never reported complex heart malformation, with large PFO and a dilated pulmonary artery, which was not connected to the trunk, but vascularized by small collateral vessels. 31% of the patients present amarthomas, that confirm to be a frequent finding. All the patients are undergoing a basic periodic oncologic screening, and by now they are all malignancies free.

**P240**  
**Unexpected BRAF mutation: atypical patient's presentation and evolution**

L. Pezzani<sup>1</sup>, A. Cereda<sup>2</sup>, L. Caffi<sup>3</sup>, D. Mamoli<sup>3</sup>, D. Marchetti<sup>1</sup>, L. Pezzoli<sup>1</sup>, A.R. Lincesso<sup>1</sup>, L. Perego<sup>1</sup>, I. Pelliccioli<sup>4</sup>, E. Bonanomi<sup>4</sup>, L. Salvoni<sup>3</sup>, M. Iascone<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Laboratory of Medical Genetics, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy  
<sup>2</sup>Department of Pediatrics, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy  
<sup>3</sup>Child Neurology and Psychiatry Unit, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy  
<sup>4</sup>Pediatric Intensive Care Unit, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy

Cardiofaciocutaneous (CFC) syndrome is a well known RASopathy clinically characterized by cardiovascular anomalies, peculiar facial appearance, ectodermal abnormalities, intellectual disability and possible association with seizures. Four genes are known to be related to CFC syndrome: BRAF (~75%), MAP2K1 and MAP2K2 (~25%), and KRAS (<2%). Here we report on a 9-year-old girl born to a healthy and non-consanguineous Egyptian couple. She was macrosomic at birth; gradually, feeding difficulties resulting in failure to thrive and psychomotor development with hypotonia, severe motor delay, and absent speech were observed. She also developed seizures from the age of 7 years. Brain MRI showed a thinned corpus callosum. No other major malformations were detected. Clinical examination showed relative macrocephaly, mild asymmetric face, high forehead with frontal bossing, hypertelorism, malar hypoplasia, wide mouth with protruding tongue, low-set, posteriorly rotated ears, and short neck. At 9 years of age she showed a rapidly progressive severe neurologic worsening characterized by an acute pyretic epileptic encephalopathy requiring admission in Pediatric Intensive Care Unit and leading to a severe brain injury with spastic-dystonic quadriplegia and mental deterioration. Infective or autoimmune etiology was excluded. Trio-based whole exome sequencing (WES) analysis, performed when the girl was in very critical conditions, detected a rare (MAF 0) known de novo heterozygous mutation in BRAF gene leading to the diagnosis of CFC syndrome. A new clinical evaluation confirmed the absence of ectodermal involvement, with the only exception of curly hair that had been previously related to ethnicity. In addition, the girl did not show typical CFC facial features nor other classical CFC clinical characteristics. Nearly 50% of individuals with CFC develops epilepsy, sometimes refractory to medical treatment, but with chronic evolution; here we report the second case in the literature of CFC syndrome complicated with acute encephalopathy with severe neurologic outcome. The report highlights the role of WES in providing a fast diagnosis in patients in critical conditions with atypical presentation of a rare genetic syndromes.



**P241**  
**Diagnosi molecolare delle atassie spinocerebellari dominanti: report su 713 casi studiati a Unife**

F. FORTUNATO<sup>1</sup>, P. RIMESSI<sup>2</sup>, L. MELCHIORRI<sup>2</sup>, A. VENTUROLI<sup>2</sup>, F. GUALANDI<sup>2</sup>, M. NERI<sup>2</sup>, H. HOULDEN<sup>3</sup>, C. BETTENCOURT<sup>3</sup>, A. FERLINI<sup>1,2</sup>, R. SELVATICI<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche, Sezione di Microbiologia e Genetica Medica, Universit degli Studi di Ferrara, Italia  
<sup>2</sup>U.O. Genetica Medica, Dipartimento di Riproduzione e Accrescimento, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara, Arcispedale S.Anna, Ferrara  
<sup>3</sup>Department of Clinical and Experimental Epilepsy & Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, Queen Square, London UK

Le atassie spino-cerebellari (SCA) rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie degenerative a trasmissione autosomica dominante, caratterizzate da atassia cerebellare progressiva e spesso sono associate ad altre manifestazioni cliniche quali rigidità, tremore, distonia, discinesie, oftalmoplegia, deterioramento cognitivo, neuropatia periferica e compromissione del sistema nervoso vegetativo. Ad oggi sono stati identificati i geni di 28 forme di SCA, la cui prevalenza è stimata tra 0,8 e 3,5/100.000, con esordio tra 30 e 50 anni. In Europa le forme più frequenti sono SCA1,2,3,6,7; in Italia i genotipi più comuni sono SCA1 (41%) e SCA2 (29%). Le mutazioni responsabili di SCA1,2,3,6,7 consistono in espansioni patologiche della tripletta CAG nelle regioni codificanti dei rispettivi geni che vengono tradotte in una lunga sequenza di poliglutammine con conseguente alterazione della conformazione proteica ed acquisizione di una funzione tossica per la cellula. PCR, elettroforesi capillare e sequenza Sanger sono stati utilizzati per identificare il numero di ripetizioni CAG. Dal 2009 ad oggi, sono state eseguite 155 analisi molecolari SCA1, 150 SCA2, 137 SCA3, 135 SCA6, 127 SCA7. Sono stati studiati inoltre 9 pazienti per SCA12 in cui l'espansione CAG si trova in una regione non codificante. La diagnosi molecolare ha confermato il sospetto diagnostico in: 15 pazienti SCA1, 11 pazienti SCA2, 1 paziente SCA3 e in 2 pazienti SCA12. La nostra Unit partecipa inoltre alla collaborazione internazionale Wellcome Trust Funding (UCL Institute of Neurology, UK), Genetic modifiers in the repeat expansion disorders: common mechanisms and therapeutics e i campioni SCA positivi sono stati selezionati per lo studio di associazione genome-wide (GWAS) mediante Illumina Omnia Infinium multi-ethnic global plus custom exome beadchip per identificare pathways e geni modificatori. La diagnosi su base unicamente clinica difficilmente riesce a distinguere fra le diverse forme di SCA, è necessario ricorrere al test genetico, mediante il quale è possibile identificare la corretta espansione della tripletta nucleotidica. Lo studio GWAS è in corso e ha l'obiettivo di identificare modificatori genetici in relazione all'insorgenza della malattia e al numero di ripetizioni CAG nei pazienti.

**P242**  
**First report of an interstitial 2q24.2 microduplication involving a master regulator of autism risk genes in a patient with a severe neurodevelopmental phenotype**

C. Castronovo<sup>1</sup>, A. Sironi<sup>1,2</sup>, M.P. Recalcati<sup>1</sup>, I. Catusi<sup>1</sup>, D. Giardino<sup>1</sup>, L. Larizza<sup>1</sup>, A. Posa<sup>3,4</sup>, P. Visconti<sup>3</sup>, P. Finelli<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Medical Cytogenetics and Molecular Genetics Lab, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano  
<sup>2</sup>Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Milano  
<sup>3</sup>Child Neurology and Psychiatry Unit, IRCCS Institute of Neurological Sciences, Bologna  
<sup>4</sup>Department of Biomedical and Neuromotor Sciences, University of Bologna, Bologna

To date, more than 100 cases with a 2q deletion have been identified, although small interstitial 2q24.2q24.3 deletions are still rare. These rearrangements exhibit a heterogeneous phenotype, which might be due to the different sizes and gene content, or to a reduced penetrance or variable expressivity. Despite this, some traits seem to occur more frequently so that the 2q24.2 deletion syndrome has been recently defined as a cause of intellectual disability (ID)/developmental delay, autism spectrum disorder (ASD), epilepsy, pre- and postnatal growth retardation, and not specific gestalt. Here we report on a ten-year-old boy who presented with severe ID, absence of language, autism, and mild dysmorphic features. Brain MRI (1,5 Tesla) and EEG were normal. Low-resolution array CGH analysis revealed in the patient a rare interstitial heterozygous duplication of 1.75 Mb at 2q24.2 (chr2:160884836-162634740, hg19) as the only clinically significant CNV, which fully encompassed ITGB6, RBMS1, TANK, PSMD14, and TBR1, and partially PLA2R1 and SLC4A10. The subsequent qPCR analysis demonstrated that the aberration was inherited from the father, who was neuropsychiatrically healthy. To our knowledge this is the first report of a duplication involving the proposed 2q24.2 deletion syndrome critical region. Only seven further rare 2q24 duplications have been reported in publicly available databases, which either fully or partially overlap with that described here. However, the lack of data about both the origin of the CNVs and the corresponding phenotypes in most cases does not allow a genotype-phenotype correlation to be performed. Despite this, based on the proband's phenotype we speculate on the existence of a 2q24.2 microduplication syndrome, which might be mainly characterized by a neurodevelopmental impairment, possibly as severe as that associated to the reciprocal deletion, no signs of growth anomalies, and incomplete penetrance. This might be consistent with a possible over-dosage toxicity of the gene suggested as candidate for ID and ASD in the 2q24.2 deletion syndrome, i.e. TBR1, which is highly expressed in brain and plays a role as a master regulator of autism risk genes. Further quantitative transcript studies will be helpful in supporting this hypothesis.





**P243**  
**Mutations in TMEM230 are not a common cause of Parkinson's disease in southern Italy**

R. Procopio<sup>1</sup>, M. Gagliardi<sup>1</sup>, G. Iannello<sup>1</sup>, A. Quattrone<sup>2</sup>, G. Annesi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Bioimaging and Physiology, National Research Council, Section of Germaneto, Catanzaro, Italy

<sup>2</sup>Institute of Neurology, Department of Medical and Surgical Sciences, University Magna Graecia, Catanzaro, Italy

Parkinson's disease (PD) is one of the most frequent neurodegenerative disorders, and although most PD cases appear to be sporadic, specific genetic defects have been linked to familial PD. Previously, mutations in SNCA, LRRK2, VPS35, EIF4G1 and DNAJC13 were considered responsible for the typical examples of autosomal dominant parkinsonism. However, potential genetic causes remain unidentified. Recently mutations in the transmembrane protein 230 (TMEM230) gene have been recently identified in individuals affected by Parkinson's disease (PD). Deng and colleagues identified a heterozygous TMEM230 missense variant (NM\_001009923.1, p.Arg141Leu, exon 5) in a family of northern European ancestry, with 15 affected individuals. In this study, we performed comprehensive TMEM230 mutation screenings in familial and sporadic PD cases to assess the frequencies of known and novel rare nonsynonymous mutations. The study assessed 165 ADPD pedigrees and 160 controls. All patients submitted to a standardized neurological examination by 2 movement disorder specialists, and the criteria for diagnosing PD adopted by the participating neurologists was based on the United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank Eighteen known PD gene mutations were previously excluded in the familial cases by targeted high-throughput sequencing. The exons and intron-exon boundaries of TMEM230 were amplified by PCR and sequenced with the ABI 3500 analyzer (Applied Biosystems). Primer sequences and PCR conditions were described previously. We did not identify any PD patients carrying TMEM230 mutations. In summary, we conducted comprehensive screening of the TMEM230 mutations in 165 probands from familial PD pedigrees and 160 controls. To the best of our knowledge, this is the first survey in southern Italy to show that TMEM230 mutations may be rare in patients with familial PD. Larger-scale genetic studies in multiple ethnic populations are needed to clarify the pathogenic role of TMEM230 in familial PD.

**P244**  
**Identification of mutations in patients from southern Italy with amyotrophic lateral sclerosis using multigene panel testing**

G. Annesi<sup>1</sup>, M. Gagliardi<sup>1</sup>, G. Iannello<sup>1</sup>, R. Procopio<sup>1</sup>, A. Quattrone<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Bioimaging and Physiology, National Research Council, Section of Germaneto, Catanzaro, Italy

<sup>2</sup>Institute of Neurology, Department of Medical and Surgical Sciences, University Magna Graecia, Catanzaro, Italy

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a neurodegenerative disease that primarily affects motor neurons, resulting in progressive paralysis and death. The majority of ALS cases are sporadic, meaning that they occur with no family history of the disease (sALS). The remaining 5-10% of cases are familial (fALS), where the disease is inherited in a Mendelian, generally dominant, fashion within a family. In recent years several genes have been linked to both fALS and sALS. In this study, we performed multigene panel testing to identify mutations in ALS-related genes. We rolled 25 consecutive patients with sporadic ALS. Exome sequencing was performed using the Ion AmpliSeq Exome kit on Ion Torrent Proton Sequencer. In total, 21 genes were ultimately selected for the targeted sequencing panel. Several bioinformatics analyses were performed to identify the functional and structural significance of missense mutations or splice-site variants observed in patients. Based on a comparison with the dbSNP and HGMD databases, we identified known pathogenic variants of the ALS-related genes in 25 ALS patients. We searched dbSNP and HGMD to identify known pathogenic variants that had been previously reported to cause ALS. We also identified novel nonsynonymous variants that were classified as Probably Damaging by PolyPhen2 and Mutation Taster which yielded a list of novel potentially pathogenic variants. All variants screened were validated by Sanger sequencing. Among the potentially pathogenic variants, we focused on nonsynonymous variants that did not appear in genome databases and were predicted to be pathogenic by an in silico analysis.

**P245**  
**La variante Arg480Trp nel gene SPTBN2 causa una forma congenita di SCA5 associata a deficit cognitivo**

A. Micalizzi<sup>1,2</sup>, S. Nuovo<sup>3,2</sup>, M. Ginevrino<sup>5,2</sup>, S. D'Arrigo<sup>4</sup>, E.M. Valente<sup>5,2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Scienza Biologiche ed Ambientali, Universit di Messina, Messina

<sup>2</sup>Unit di Neurogenetica, IRCCS Fondazione Santa Lucia CERC, Roma

<sup>3</sup>Dip. di Medicina e Chirurgia, Universit di Salerno, Salerno

<sup>4</sup>Div. di Neuropsichiatria Infantile, IRCCS Fondazione "Carlo Besta", Milano

<sup>5</sup>Dip. di Medicina Molecolare, Universit di Pavia, Pavia

La SCA5 (OMIM#600224) è un'ataxia ereditaria autosomica dominante, con esordio tipico nella terza-quarta decade e fenotipo cerebellare puro, a lenta progressione. I rari casi riportati sono causati da mutazioni missenso o in-frame nel gene SPTBN2, che codifica per la subunità β-III della spectrina, altamente espressa nelle cellule del Purkinje e coinvolta nel trasporto assonale e nella stabilizzazione delle proteine di membrana. Un fenotipo più grave di atassia cerebellare (SCAR14, OMIM#615386), con esordio in età pediatrica e associato a ritardo dello sviluppo psicomotorio e deficit cognitivo, è stato descritto in casi ad ereditarietà autosomica recessiva, causati da mutazioni troncanti o di splicing allo stato omozigote. Presentiamo una paziente di 2 anni con atassia cerebellare congenita associata a ritardo psicomotorio, dolicocefalia, strabismo convergente alternante, ipotonia generalizzata e iporeflessia degli arti inferiori. La risonanza magnetica dell'encefalo, eseguita all'età di 1 anno e 10 mesi, ha mostrato un quadro di ipoplasia cerebellare globale con ampliamento dei solchi cerebellari, in assenza di alterazioni troncoencefaliche. L'analisi di Next-Generation Sequencing (NGS) di un pannello di 50 geni causativi di varie forme di atassia congenita non progressiva ha evidenziato la presenza della variante eterozigote de novo c.1438 C>T (p.Arg480Trp) nel gene SPTBN2. L'analisi comparativa degli ampliconi del gene ha escluso la presenza sull'altro allele di delezioni o duplicazioni esoniche. Questa variante, già riportata in eterozigosi in due casi sporadici con fenotipo analogo, interessa un dominio ripetuto e altamente conservato, coinvolto nella formazione di dimeri di β-III spectrina necessari al corretto assemblaggio della proteina. La patogenicità della variante è stata precedentemente confermata da studi funzionali. I dati riportati suggeriscono l'esistenza di uno specifico fenotipo Arg480Trp-correlato, assimilabile a quello caratteristico della SCAR14 ma trasmesso con modalità autosomica dominante, sottolineando l'estrema complessità legata ai disordini monogenici e fornendo indicazioni utili alla pratica clinica.



**P246**  
**Clinical features of 6 new patients carrying PIGA gene mutations**

C. Bianchini<sup>1</sup>, S. Virido<sup>1</sup>, E. Parrini<sup>1</sup>, D. Mei<sup>1</sup>, E. Cellini<sup>1</sup>, D. Pucatti<sup>1</sup>, A.R. Ferrari<sup>2</sup>, G. Traficante<sup>3</sup>, M. Montomoli<sup>1</sup>, S. Giglio<sup>3</sup>, R. Guerrini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pediatric Neurology Unit, Neurogenetics and Neurobiology Laboratories, Neuroscience Department, A. Meyer Pediatric Hospital, University of Florence, Florence, Italy

<sup>2</sup>Division of Child Neurology and Psychiatry, Epilepsy and Clinical Neurophysiology Laboratory, IRCCS Stella Maris Foundation, Pisa, Italy

<sup>3</sup>Medical Genetics Unit, A. Meyer Pediatric Hospital, University of Florence, Florence, Italy

**Background:** Mutations in PIGA, a gene involved in the biosynthesis of the glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) anchor, have been identified in patients with a wide spectrum of phenotypes including paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, multiple congenital anomalies, intellectual disability, dysmorphic features and epilepsy.

**Purpose:** We describe the clinical features of 6 male patients (2 siblings) with epilepsy harboring 5 missense mutations in PIGA.

**Methods:** In all six patients, we performed targeted resequencing of a panel including 95 genes associated with epilepsy. Segregation analysis of available family members was performed using Sanger sequencing. X-chromosome inactivation analysis was performed on DNA isolated from peripheral lymphocytes of female carriers (4 mothers and 1 grandmother) after amplification of the androgen receptor (AR) locus and of the connector enhancer of KSR 2 (CNKSR2).

**Results:** We identified 5 missense mutations in the PIGA gene, 1 de novo mutation and 4 inherited mutations from unaffected mothers. All variants were not reported in public available databases (gnomAD, Exome Aggregation Consortium and 1000genomes), and 3 were novel. X-chromosome inactivation analysis resulted to be random with the exception of one family in which the proband's mother and grandmother resulted to have skewed X-inactivation.

**Conclusion:** Sixteen mutations in the PIGA gene have been identified, so far. In our study, we identified 3 additional new mutations. The phenotypic consequences of PIGA mutations can be classified into 2 sub-types: a severe phenotype characterized by myoclonus and asymmetrical suppression bursts on EEG, multiple anomalies with dysmorphic features, and delayed myelination and a less severe phenotype characterized by intellectual disability and treatable seizures without facial dysmorphism or congenital anomalies. Patients described here presented myoclonic seizures (2/6), multifocal seizures (3/6), generalized seizures (1/6), thin corpus callosum (2/6) and psychomotor delay (4/6). This study increases the number of patients with PIGA mutations, contributing to better define the clinical spectrum of these patients.





**P247**  
**Atrofia cerebellare non progressiva nei disordini BRAT1-correlati**

M. Ginevrino<sup>1,2</sup>, A. Micalizzi<sup>3,2</sup>, A. Casella<sup>2</sup>, E. Bertini<sup>4</sup>, G. Zanni<sup>4</sup>, S. Nuovo<sup>5,2</sup>, E.M. Valente<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Medicina Molecolare, Università di Pavia, Pavia  
<sup>2</sup>Unit di Neurogenetica, IRCCS Fondazione Santa Lucia CERCA, Roma  
<sup>3</sup>Dip. di Scienza Biologiche ed Ambientali, Università di Messina, Messina  
<sup>4</sup>Lab. di Medicina Molecolare, Unit delle Malattie Neuromuscolari e Neurodegenerative, Dip. di Neuroscienze, IRCCS Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Roma  
<sup>5</sup>Dip. di Medicina e Chirurgia, Università di Salerno, Salerno

Mutazioni recessive nel gene BRAT1 [OMIM#614506] sono principalmente associate ad una rara patologia, letale in epoca neonatale, nota come Rigidity and multifocal seizure syndrome [RMFSL; OMIM#614498]. Tale sindrome è caratterizzata da microcefalia, rigidità, crisi epilettiche focali farmaco-resistenti, apnea e bradicardia. La risonanza magnetica dell'encefalo può essere normale o mostrare uno spettro di alterazioni che varia dall'ipoplasia frontale all'atrofia cerebro-cerebellare. Ad oggi sono descritti 24 pazienti con mutazioni patogenetiche in questo gene, soltanto 20 dei quali rientrano nel fenotipo RMFSL. I rimanenti casi presentano manifestazioni cliniche, neuroradiologiche ed elettroencefalografiche (EEG) variabili, definendo un gruppo eterogeneo di disordini del neurosviluppo BRAT1-correlati. Descriviamo due fratelli di 12 e 7 anni, nati da genitori non consanguinei, con un quadro di atassia congenita non progressiva, ritardo psicomotorio di grado lieve e nistagmo, associato al riscontro di atrofia cerebellare non progressiva. Su entrambi i fratelli è stata eseguita l'analisi di Whole Exome Sequencing (WES) su piattaforma Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA). Il filtraggio per modello di ereditarietà recessiva ha evidenziato la presenza di due varianti patogenetiche in eterozigosi composta nel gene BRAT1: c.638dupA (p.Val214Glyfs\*189) e c.1395G>A (p.Thr465Thr) (sito di splicing). L'analisi di segregazione ha confermato lo stato di portatore sano in entrambi i genitori. Ad oggi è stata riportata in letteratura una singola famiglia con mutazioni nel gene BRAT1 causative di atassia cerebellare non progressiva e ritardo psicomotorio, in assenza di epilessia o anomalie EEG. Tale descrizione si sovrappone al fenotipo clinico dei nostri pazienti. I dati presentati dimostrano come i disordini BRAT1-correlati costituiscano uno spettro fenotipico di gravità variabile, dalla gravissima RMFSL a forme lievi di atassia pediatrica non progressiva. Suggestiscono inoltre l'approccio WES come strategia analitica di elezione nel caso di fenotipi specifici come quello descritto, in quanto consente una notevole riduzione dei tempi diagnostici, di fondamentale importanza ai fini della consulenza genetica, del management dei pazienti e della diagnosi prenatale.

**P248**  
**Clinical features and outcome of 6 new patients carrying de novo KCNB1 gene mutations**

S. Virdo<sup>1</sup>, E. Parrini<sup>1</sup>, C. Marini<sup>1</sup>, E. Cellini<sup>1</sup>, D. De Vita<sup>1</sup>, D. Mei<sup>1</sup>, M. Romoli<sup>2</sup>, C. Costa<sup>2</sup>, F. Mari<sup>1</sup>, L. Parmeggiani<sup>3</sup>, E. Procopio<sup>4</sup>, T. Mettieri<sup>1</sup>, M. Gentile<sup>5</sup>, P. Prontera<sup>6</sup>, P. Calabresi<sup>2,7</sup>, R. Guerrini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pediatric Neurology Unit, Neurogenetics and Neurobiology Laboratories, Neuroscience Department, A. Meyer Pediatric Hospital, University of Florence, Florence, Italy  
<sup>2</sup>Neurology Unit, Department of Medicine, University of Perugia, Ospedale S. Maria della Misericordia, Perugia, Italy  
<sup>3</sup>Child Neurology Service, Hospital of Bolzano, Bolzano, Italy  
<sup>4</sup>Metabolic Unit, A. Meyer Pediatric Hospital, Florence, Italy  
<sup>5</sup>Medical Genetics Unit, Azienda Sanitaria Locale Bari, Bari, Italy  
<sup>6</sup>Neonatology Unit and Prenatal Diagnosis, Medical Genetic Unit, Ospedale S. Maria della Misericordia, Perugia, Italy  
<sup>7</sup>Department of Experimental Neurosciences, "Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico", IRCCS Santa Lucia Foundation, Rome, Italy  
<sup>8</sup>IRCCS Stella Maris Foundation, Calambrone, Pisa, Italy

**Background:**  
KCNB1 gene, encodes the pore forming and voltage-sensing  $\beta$  subunit of the voltage gated potassium ( $K^+$ ) channel sub family 2 (Kv2.1) that plays essential roles in regulating neuronal excitability, contributing to action potential repolarization and dynamic modulation of neuronal activity. De novo heterozygous mutations of KCNB1 have been reported in 14 patients with neurodevelopmental disorders.

**Purpose:**  
We describe electroclinical features and outcome of six novel patients carrying de novo missense and nonsense KCNB1 mutations.

**Methods:**  
In our patients, we performed clinical, EEG, neuropsychological and brain MRI data analysis. Targeted resequencing of a panel including 95 genes associated with epilepsy was performed in all six patients.

**Results:**  
Mean age at seizure onset was 11 months. Mean follow-up of 11.3 years documented that 4 patients, following an infantile phase of frequent seizures became seizure-free; mean age at seizure offset was 4.25 years. Epilepsy phenotypes comprised West syndrome in two patients, infantile-onset unspecified generalized epilepsy, myoclonic and photosensitive eyelid myoclonia epilepsy resembling Jeavons syndrome, Lennox-Gastaut syndrome and focal epilepsy with prolonged occipital or clonic seizures in each and every one. Five patients had developmental delay prior to seizure onset evolving into severe intellectual disability with absent speech and autistic traits in one, stereotypic hand movements with impulse control disorder in another. The patient with Jeavons syndrome evolved into moderate intellectual disability. Mutations were de novo, 4 missense and 2 nonsense, 5 were novel, and one resulted from somatic mosaicism.

**Conclusions:**  
KCNB1 related-manifestations include a spectrum of infantile onset generalized or focal seizures whose combination leads to EIEE including West, Lennox-Gastaut and Jeavons syndromes. Long term follow-up highlights that, following a stormy phase, seizures subside or cease and treatment may be eased or withdrawn. Cognitive and motor functions are almost always delayed prior to seizures onset and evolve into severe, persistent impairment. Thus, KCNB1 mutations are associated with

diffuse brain dysfunction combining seizures, motor and cognitive impairment.



**P249**  
**Hereditary epilepsy with mild cortical thickening associated with LIS1 mutation**

D. De Vita<sup>1</sup>, D. Mei<sup>1</sup>, D. Rutigliano<sup>1</sup>, R. Dilena<sup>2</sup>, E. Parrini<sup>1</sup>, R. Guerrini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Neurogenetica, AOU Meyer, Firenze  
<sup>2</sup>UOC Neurofisiologia, Osp. Maggiore Policlinico, Milano

**Background:**  
Lissencephaly is a cortical malformation due to a disorder of neuronal migration. Most cases are associated with mutations in the LIS1 (also known as PAFAH1B1) gene. Missense mutations are less frequent than truncating variants, and produce, generally, a milder phenotype.

**Purpose:**  
We report a male child exhibiting a phenotype characterized by seizures and developmental delay associated with MRI findings of posterior pachygyria. Next Generation Sequencing approach led to the identification of a novel missense mutation in the LIS1 gene inherited from his mother who showed a similar phenotype.

**Methods:**  
We performed targeted resequencing of a panel including 86 genes associated with malformations of cortical development in the proband. We performed LIS1 Western Blot, qPCR gene expression and RT-PCR analysis starting from lymphocyte cells of the proband and his parents.

**Results:**  
We identified a missense variant c.655T>A [p.(Trp219Arg)] in the LIS1 gene (Genbank Accession: NM\_000430.3), segregating in the proband's mother. Western Blot analysis showed a decreased level of the LIS1 protein in the proband and in his mother. We did not find an alteration of gene expression level by qPCR and RT-PCR did not show any aberrant mRNA.

**Conclusions:**  
Clinical presentation and outcome in patients with missense mutations in LIS1 are heterogeneous: evidence suggests that the severity of the phenotype does not always appear to correlate with the location and type of the variant. The missense mutation we identified causes reduced LIS1 protein levels and this finding might be a consequence of a post-translational regulation event, such as a reduction in the amount of correctly folded protein. These data suggest that some affected individuals carrying LIS1 mutations exhibit a milder phenotype resulting in moderate intellectual disability along with mild malformations allowing near-normal development, a condition that may not influence their genetic fitness. Our results indicate that LIS1 mutations, almost observed to be de novo, can be inherited, in a minority of cases, from mildly affected parents. Genetic counseling should consider this possibility.







**P250**  
**Clinical and neurobehavioral features of three novel Kabuki syndrome patients with KMT2D mosaic mutations**

F.R. Lepri<sup>1</sup>, B. Augello<sup>2</sup>, P. Alfieri<sup>3</sup>, D. Cocciadiferro<sup>2,9</sup>, V. Pes<sup>4</sup>, A. Vancini<sup>5</sup>, C. Caciolo<sup>3</sup>, G.M. Squeo<sup>2</sup>, A. Novelli<sup>1</sup>, R. Gherardi<sup>6</sup>, S. Sotgiu<sup>4</sup>, M.C. Digilio<sup>7</sup>, B. Dallapiccola<sup>8</sup>, G. Merla<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Medical Genetics, Bambino Gesù Pediatric Hospital, IRCCS, Rome

<sup>2</sup>Medical Genetics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, San Giovanni Rotondo

<sup>3</sup>Department of Neurosciences, Child Neuropsychiatry, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome

<sup>4</sup>Unit of Child Neuropsychiatry, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Sassari, Sassari

<sup>5</sup>Neonatal Intensive Care Unit, Maggiore Hospital, Bologna

<sup>6</sup>Unit of Child Neuropsychiatry, Appennino Bolognese, San Lazzaro

<sup>7</sup>Medical Genetic Unit, Bambino Gesù Pediatric Hospital, IRCCS, Rome

<sup>8</sup>Scientific Directorate, Bambino Gesù Pediatric Hospital, IRCCS, Rome

<sup>9</sup>PhD Program in Experimental and Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, University of Foggia, Foggia

Kabuki syndrome (KS, MIM #147920), also known as Kabuki make-up syndrome or Niikawa Kuroki syndrome, is a rare disorder characterized by distinctive face with long palpebral fissures and eversion of the lateral third of lower eyelids, short columella with broad and depressed nasal tip, prominent ears, and cleft or high-arched palate. KS is caused by mutations in KMT2D/MLL2 and KDM6A/UTX, two interacting chromatin modifier responsible respectively of 56.75% and 5.8% of the cases. To date, just three KS patients with mosaic KMT2D deletions have been reported, while no cases have been described for KDM6A. Here we expand the number of KS patients with mosaic mutations by reporting three additional cases where single nucleotide change in KMT2D results in a new frameshift mutation (p.L1199HfsX7) and two already reported nonsense mutations (p.R4484X) and (p.R5021X). Clinical examinations of all such described KS patients showed no significant differences in clinical features and cognitive profiles when compared with no-mosaic patients. Conversely none of the six subjects had severe congenital heart defects that occur in around 50% and 35% of KS patients.

KS is a multi-systemic disorder not limited to a single organ or tissue of a common embryonic origin; although a larger number of patients with mosaicism are needed, all together our data suggest that the haploinsufficiency of KMT2D in just some cell types may be enough to fully recapitulate the associated phenotype. Although two out of three cases described here were detected by Sanger sequencing, we also suggest that modern sequence technologies, as NGS, are more appropriate techniques for the analysis of this condition, allowing with a single experiment the full sequencing of the disease-genes and the detection of somatic events, often overlooked by Sanger sequencing.

**P251**  
**Intracellular FmRppolyG-HSP70 complex: Possible use as biochemical marker of FXTAS**

G. Bonapace<sup>1</sup>, R. Gullace<sup>1</sup>, D. Concolino<sup>1</sup>, G. Arabia<sup>2</sup>, A. Quattrone<sup>2,3</sup>, R. Procopio<sup>3</sup>, G. Iannello<sup>3</sup>, M. Gagliardi<sup>3</sup>, G. Annesi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical and Surgical Science, Pediatrics Unit, University Magna Graecia, Catanzaro, Italy

<sup>2</sup>Institute of Neurology, Department of Medical and Surgical Sciences, University Magna Graecia, Catanzaro, Italy

<sup>3</sup>Institute of Molecular Biomaging and Physiology, National Research Council, Section of Germaneto, Catanzaro, Italy

Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS) is a late-onset neurodegenerative disorder that affects about 25% of carriers of small, non-coding CGG-repeat expansions (55-200 repeats) in the premutation range within the fragile X gene (FMR1). Main clinical features of FXTAS include intention tremor, cerebellar ataxia, and Parkinsonism. The pathogenesis of FXTAS has been demonstrated to involve different overlapping molecular and biochemical mechanisms, with a common feature due to an increased expression of FMR1 gene. Recently, great emphasis on toxic aggregates, produced by a RAN translation process on the 5' expanded CGG region of the gene, has been given. These aggregates contain a fragile mental retardation protein with a polyglycine stretch on the aminoterminal ends, (FmRp-polyG) and so far, have been isolated and characterized only in *Drosophila* models, mouse model and post mortem FXTAS patients brain, but never in FXTAS living patients. Unfortunately, the role of these aggregates in the pathogenesis of FXTAS is still not well understood. Furthermore, the syndrome is frequently misdiagnosed because of the early diagnosis in adult carriers remains difficult due to the lack of specific biochemical markers. The same situation hampers the possibility to predict the clinical outcome in children carriers of premutation on the FMR1 gene, negative for the Fraxa syndrome, but at risk for developing FXTAS. Here we demonstrate, for the first time, using immunohistochemistry (IHC) and Western Blot procedure (WB), the presence in vivo, of toxic aggregates produced by the expanded polyG FMRP protein in fibroblasts from a carrier of a premutated FMR1 allele associated to clinical signs of FXTAS. This finding is very promising and offer the possibility to use the interaction between polyG-FMRP and HSP70 as novel early diagnostic biomarker of FXTAS in living patients. Even though the validation of this procedure needs larger research to study its predictive value for the clinical outcome of FMR1 premutation carriers without signs of FXTAS, we recommend considering its use for patients showing neurological signs of FXTAS associated to a well defined CGG premutated allele.

**P252**  
**Nuova mutazione in un paziente italiano con Sindrome di McLeod**

R. Cittadella<sup>1</sup>, E. Tartara<sup>2</sup>, G. Piccolo<sup>2</sup>, A. Cortese<sup>2</sup>, I. Ricca<sup>2</sup>, A. Bagal<sup>1</sup>, M. Terzaghi<sup>2</sup>, E.V. De Marco<sup>1</sup>, P. Benna<sup>3</sup>, C.A. Galimberti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Scienze Neurologiche, Mangone (CS) - Italy

<sup>2</sup>IRCCS Fondazione Istituto Neurologico Nazionale C. Mondino, Pavia - Italy

<sup>3</sup>A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino, Dip. di Neuroscienze e Salute Mentale, Torino - Italy

La sindrome di McLeod (MLS) è una rarissima neuroacantocitosi mistemica che coinvolge il sistema nervoso centrale, neuromuscolare ed ematologico. La MLS ha una ereditarietà recessiva legata al cromosoma X ed è causata da mutazioni nel gene XK (Xp21) che codifica per la proteina XK, che trasporta l'antigene Kx sulla superficie dei globuli rossi. Noi qui presentiamo una nuova mutazione da delezione in un uomo di 45 anni, che dall'età di 38 presenta episodi di perdita di coscienza, preceduti da sensazione ascendente di ansia al cuore, ansia, fischio biauricolare, sempre seguiti da secondaria generalizzazione, resistenti a terapia con valproato, lamotrigina e levetiracetam. Ad EEG di routine e monitoraggi di 24 ore si rilevano anomalie lente focalizzate a destra; RM encefalo negativa. Lo striscio di sangue periferico mostra la presenza di acantociti; l'indagine sierologica per la tipizzazione eritrocitaria evidenzia il pattern di espressione degli antigeni di Kell, patognomonico per il fenotipo del gruppo sanguigno McLeod, e si riscontra anche, una persistente iperCKemia (fino a 4000U) clinicamente asintomatica con biopsia muscolare nella norma. Dopo 3 anni di follow-up il paziente presenta movimenti involontari discinetici pluridirezionali (di natura non epilettica alla documentazione Video-EEG), e all'EMG si rileva neuropatia motoria assonale in ambito cranico e spinale di grado lieve; infine, il probando sottoposto a test neuropsicologici rivela tendenze ossessivo-compulsive. Considerato che il gene XK L1 è l'unico gene in cui le varianti patologiche sono note per causare MLS, abbiamo eseguito l'indagine genetica dell'intero gene, che consta di 3 esoni con relative regioni fiancheggianti. L'analisi di sequenza ha evidenziato una mutazione emizigote di 17 paia di basi nell'esone 3 (c. 248\_264 del. GGCCGAGACAACGGCGG seq. rif. ENST00000378616.3), mutazione da delezione al momento non presente nei database. Sebbene l'esatta funzione della proteina XK umana non è stata ancora compresa, e i dati a disposizione suggeriscono un ruolo importante per la regolazione dell'apoptosi, la MLS potrebbe essere un modello di disordine per studiare i principali meccanismi che sono non solo coinvolti nella fisiologia dei globuli rossi ma anche nei processi neurodegenerativi. Bibliografia Danek A, Rubio JP, Rampoldi L, et al. McLeod neuroacanthocytosis: genotype and phenotype. *Ann Neurol* 2001;50:755-64. Jung HH, Danek A, Frey BM. McLeod syndrome: a neurohaematological disorder. *Vox Sang* 2007; 93: 112-21. Yung HH, Danek A, Walker RH. Neuroacanthocytosis syndromes. *Orphanet J Rare Dis*. 2011 Oct 25;6:68.



**P253**  
**Due microduplicazioni contigue nella regione 16p13.11 associate a fenotipo neurocomportamentale**

M. De Cinque<sup>1,2</sup>, P. Marino<sup>2</sup>, A. Simone<sup>2</sup>, E. Mazzucco<sup>1</sup>, O. Palumbo<sup>3</sup>, A. Angiolillo<sup>4</sup>, R. Ciavatta<sup>4</sup>, G. Maria<sup>4</sup>, L. Rossi<sup>2</sup>, M. Carella<sup>3</sup>, S. Garofalo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Università degli Studi del Molise, DIMES, Campobasso

<sup>2</sup>UO di Medicina Trasfusionale, PO San Timoteo ASReM, Termoli

<sup>3</sup>IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo

<sup>4</sup>Ufficio per la Tutela della Salute Neurologica e Psicica dell'Età Evolutiva ASReM, Termoli

La microduplicazione della regione 16p13.11 è associata a vari disturbi dello sviluppo neurologico (disabilità intellettiva, deficit dell'attenzione ed iperattività, ritardo dello sviluppo e disturbo dello spettro autistico) ed alterazioni fisiche (difetti cardiaci e malformazioni scheletriche). Tale sindrome è caratterizzata da penetranza incompleta ed espressività variabile. È stato ipotizzato che ulteriori fattori genetici (altri CNVs patologici), epigenetici (pattern di metilazione) ed ambientali possono modulare il fenotipo. Descriviamo il caso di un bambino caucasico giunto alla nostra attenzione all'età di 9 anni per ritardo mentale, disturbo dell'attenzione ed iperattività, disturbo misto della condotta e della sfera emozionale. L'anamnesi familiare è positiva per disturbo dell'attenzione ed iperattività (zio materno). Figlio unico di genitori non consanguinei. Nato a termine da gravidanza normodecorsa e parto eutocico. L'anamnesi personale è negativa per epilessia. Primi passi all'età di 14 mesi e prime parole solo dopo i 3 anni. All'esame obiettivo non sono evidenti dimorfismi ed i parametri auxologici sono nella media. Il cariotipo è normale e la ricerca delle mutazioni del gene FMR1 risulta negativa. Si decide quindi approfondimento diagnostico genetico con array-CGH che ha rilevato 2 microduplicazioni contigue nella regione 16p13.11: una duplicazione di 385 kbp che coinvolge i nucleotidi 14.927.292-15.312.409 e un'altra duplicazione di 1.007 kbp che coinvolge i nucleotidi 15.509.592-16.516.109. Nessun altro CNV patologico è stato identificato nel paziente. Alcuni geni della regione duplicata quali NDE1, ABCC1, NOMO1, NTAN1 e PDXDC1 sono espressi durante lo sviluppo del cervello, in particolare NDE1 e NTAN1 sono stati implicati nel fenotipo neurocognitivo. Inoltre il gene miR-484 è candidato ad essere responsabile dell'iperattività. Le visite oculistica ed audiometrica non evidenziano alterazioni. Sono in programma controlli in ambito cardiologico ed ortopedico. Prossimamente verrà estesa l'analisi array-CGH ai genitori ed allo zio del probando. Anche nel nostro caso l'associazione tra duplicazione 16p13.11 e disturbi del neurosviluppo è evidente e conferma la necessità di approfondire la conoscenza dei geni coinvolti nello sviluppo cerebrale.





**P254**  
**Malattia di Huntington Giovanile: descrizione di un caso**

**P. Caforio<sup>1</sup>, C. Orsini<sup>1</sup>, C. De Luca<sup>1</sup>, C. Tucci<sup>3</sup>, P. Siani<sup>2</sup>, D. De Brasi<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Dip. di Medicina molecolare e Biotecnologie mediche, Università Federico II, Napoli

<sup>2</sup>Dip. di Pediatria, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli

<sup>3</sup>Dip. di Neuroscienze e Riabilitazione, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli

La Corea di Huntington (HD-OMIM#143100) è una malattia neurodegenerativa progressiva del SNC, di tipo AD, caratterizzata da movimenti coreici involontari, disturbi psichiatrici e demenza. È dovuta a espansione della triplicata CAG nel gene huntingtina (HTT-OMIM#613004), ha prevalenza di 1:10.000-20.000 ed esordio medio a 35-45 anni. La forma giovanile (JHD), ad esordio prima dei 20 anni, costituisce il 3-10% dei casi e presenta fenomeni di anticipazione peggiorata dalla trasmissione paterna (75% dei casi). Diversamente dalla forma adulta, si manifesta con comportamento motorio ipocinetico e bradicinetico, con componenti distoniche, sintomi cerebellari, spasticità, rigidità, disturbi dell'apprendimento con progressivo deterioramento mentale e crisi convulsive. La paziente, di 6 anni, è giunta in consulenza per ritardo dello sviluppo psicomotorio e del linguaggio e deficit di crescita. In anamnesi familiare emergeva Corea di Huntington nel padre (espansione di 49 ripetizioni CAG del gene HTT). La probanda presentava affaticabilità, impaccio motorio e ipotonia muscolare prevalente agli arti inferiori con tendenza a cadute, immaturità affettivo-relazionale con tendenza all'isolamento, deficit cognitivo, anomalie all'EEG senza episodi convulsivi. Array CGH normale. Nel sospetto di JHD effettuata RM encefalo (atrofia dei nuclei caudato e putamen), e analisi molecolare gene HTT con espansione delle ripetizioni CAG di 109-1, confermando la diagnosi. Il caso di JHD qui descritto rappresenta un esempio di esordio molto precoce di patologia, con sintomatologia neurologica severa e progressiva, da trasmissione paterna con espansione >60 ripetizioni. Tale condizione presenta una correlazione lineare inversa tra espansione di triplette ed esordio precoce di malattia. Il caso presentato sottolinea l'importanza del dato anamnestico di familiarità per HD nell'indirizzare la diagnosi in pazienti pediatrici con quadro clinico specifico di ritardo psicomotorio e deficit cognitivo, anche in età infantile. Tuttavia, l'inquadramento diagnostico precoce sebbene consenta una corretta diagnosi clinica, non permette allo stato attuale un altrettanto adeguato intervento terapeutico, non essendo disponibili allo stato terapie efficaci.

**P255**  
**Genetic screening and Interferon signature of an Italian cohort of patients affected by Aicardi-Goutières syndrome**

**J. Garau<sup>1</sup>, M. Valente<sup>1</sup>, D. Sproviero<sup>1</sup>, S. Zucca<sup>1</sup>, C. Cras<sup>1,2</sup>, V. De Giorgis<sup>3</sup>, U. Balottin<sup>4</sup>, F.M. Santorelli<sup>5</sup>, S. Orcesi<sup>3</sup>, C. Cereda<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Center of Genomic and Post-Genomic, C. Mondino National Neurological Institute, Pavia, Italy

<sup>2</sup>Department of Biology and Biotechnology, University of Pavia, Pavia, Italy

<sup>3</sup>Unit of Child and Adolescence Neurology, C. Mondino National Neurological Institute, Pavia, Italy

<sup>4</sup>Unit of Child Neurology and Psychiatry, C. Mondino National Neurological Institute, Pavia, Italy

<sup>5</sup>Unit of Molecular Medicine, IRCCS Stella Maris, Pisa, Italy

**BACKGROUND.** Aicardi-Goutières Syndrome (AGS) is a genetically determined early onset encephalopathy characterized by cerebral calcification, leukodystrophy, increased interferon alpha in cerebrospinal fluid and expression of interferon-stimulated genes (ISGs) in peripheral blood. Up to now, seven genes (TREX1, RNASEH2B, RNASEH2C, RNASEH2A, ADAR1, SAMHD1, IFIH1) associated to AGS, with a dominant or recessive pattern of inheritance, have been discovered. AIM. In our study we performed a genetic screening of an Italian cohort of AGS patients and, furthermore, we assessed the ISGs expression to define a possible association between interferon signature (IS) and mutations. **MATERIALS AND METHODS.** DNA was isolated from peripheral blood of 39 AGS patients. Next Generation Sequencing analysis was performed using Nextera Enrichment Sample Illumina composed by 7 AGS genes. The interferon signature was performed on 21 AGS patients and 31 healthy controls (Rice et al., 2017). **RESULTS.** NGS genetic analysis identified mutations in 37 out of 39 subjects (95% of patients). In particular, we found 59% patients mutated in RNASEH2B, 5% in TREX1, 2.5% in RNASEH2A, 2.5% in RNASEH2C, 8% in SAMHD1, 8% in ADAR1 and 10% in IFIH1. Besides, two patients with a complete AGS phenotype did not present mutations on one of the 7 AGS genes. Also we found three novel mutations, one in SAMHD1 and two in IFIH1 gene, while the others were already described in literature. About interferon signature, 15 patients were positive (ten mutated in RNASEH2B, one in RNASEH2C, one in ADAR1, two in IFIH1 and one without mutations on any of the 7 AGS genes), while 6 resulted negative (5 mutated in RNASEH2B and one with no mutation on AGS genes). **CONCLUSIONS.** Here we present, for the first time, genetic data of an Italian cohort of AGS patients. Our data show a higher percentage of mutations on RNASEH2B gene and a lower frequency of TREX1 mutations than international AGS cohorts (Crow et al., 2015). Besides, RNASEH2B mutated patients show a prevalence of negative IS in accordance with data reported in literature (Crow et al., 2015). We also identified three novel pathogenic mutations that need to be better investigated with functional studies and we aim to perform exome sequencing on negative AGS patients.

**P256**  
**Mitochondrial serine protease HTRA2 p.G399S in a female with Di George syndrome and Parkinson disease**

**S. Scala<sup>1</sup>, R. Ferese<sup>1</sup>, A.M. Griguoli<sup>1</sup>, R. Campopiano<sup>1</sup>, V. Albano<sup>1</sup>, M. Storto<sup>1</sup>, F. Limanaqi<sup>2</sup>, E. Giardina<sup>3,4</sup>, S. Zampatti<sup>3,4</sup>, N. Modugno<sup>1</sup>, F. Fornai<sup>1,2</sup>, D. Centonze<sup>1</sup>, S. Ruggieri<sup>1</sup>, S. Gambardella<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>IRCCS Neuromed Parco Tecnologico Pozzilli (IS)

<sup>2</sup>Department of Translational Research and New Technologies in Medicine and Surgery, University of Pisa

<sup>3</sup>Department of Biomedicine and Prevention, University of Rome Tor Vergata, Rome

<sup>4</sup>Molecular Genetics Laboratory UILDM, Santa Lucia Foundation, Rome

Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (22q11.2DS), also known as Di George syndrome (DGs), is a common genetic syndrome with onset at birth or early childhood, characterized by cardiac alterations, palatal defects, and developmental delay. In the last few years, movement disorders and, specifically, early onset parkinsonism (age at onset between 39 and 48 years) have been reported in 22q11.2DS patients. This suggests that 22q11.2 deletion represents a new genetic risk factor for Early-Onset Parkinson's Disease (EOPD). Here we describe a 35 years old female patient affected by DGs and EOPD. She developed gait disturbance and rest tremor in her upper left limb. The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) III score was 57 in off and 27 in on, after levodopa, and dystonia and dyskinesia were mostly evident in the lower left limb. Her neurological exam was consistent for a diagnosis of parkinsonism. Chromosomal microarray analysis revealed a 3 mega-base deletion consistent with 22q11.2DS, which was inherited from her mother. To better understand the genetic component of her parkinsonian syndrome, a clinical exome sequencing, considering 4800 human genes, was performed. Sequence analysis identified mutation p.Gly399Ser in OMI/HTRA2 (OMIM #606441) gene, recently designated as Parkinson disease-13 locus (PARK13). This gene encodes a serine-protease with pro-apoptotic activity and a mitochondrial targeting sequence at its N-terminal region. 22q11.2 deletion has been considered a risk factor for EOPD but no mutations in Parkinson disease genes, have been reported in patients affected by DGs and EOPD so far. Therefore, this is the first report of a DGs and EOPD patient presenting a mutation in genes related with Parkinson Disease (PD). The mutation p.Gly399Ser in PARK13 was previously shown to cause mitochondrial dysfunction, altered mitochondrial morphology, and decreased protease activity. Nonetheless, epidemiology studies in search for an association between HTRA2 and PD yielded conflicting results. This variant was identified also in the mother, who did not show neither movement disorder nor other neurological deficit. We suggest that this mutation increase the risk to develop EOPD, and should not to be considered as a pure and effective cause of disease.



**P257**  
**Children with CAG expansion in the mild repeat range of huntingtin gene showing psychiatric but not neurological presentation: is it one more shade of the disease?**

**M. Marano<sup>1,2</sup>, F. Consoli<sup>1</sup>, S. Migliore<sup>1,2</sup>, S. Maffi<sup>1</sup>, I. Mazzante<sup>2</sup>, A. Morella<sup>1</sup>, A. De Luca<sup>1</sup>, F. Squitieri<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Italy

<sup>2</sup>LIRH (Lega Italiana Ricerca Huntington) Foundation, Rome, Italy

**Introduction**  
 Huntington disease (HD) generally manifests in adulthood. Large mutations with CAG repeat expansion in HTT gene may rarely cause juvenile Huntington disease (JHD) in infancy or adolescence with atypical clinical features if compared to adult patients.

**Aim of the Study**  
 Our objective is to characterize the rare occurrence of clinical manifestations in children carrying mutations in the low-mild size, generally causing adult HD.

**Materials and Methods**  
 We are following up a subgroup of young subjects with HD mutation who manifested with disabling psychiatric condition since infancy or adolescence. Among 60 JHD patients we currently follow-up, four of them with mild mutation size showed neurological signs or movement disorders suggestive of HD in adulthood. All patients were genetically (e.g. CAG size analysis) and clinically (e.g. total motor score within the Unified HD Rating Scale) characterized.

**Results**  
 All four subjects presented a CAG expansion size <45 repeats. Two patients manifested a schizophrenia-like disturbance during the adolescence, with the later appearance of motor signs after age 20. In the other two cases, patients presented symptoms of autistic spectrum disorder, since infancy. One of them showed also a schizophrenia-like disturbance and, later, HD onset with motor signs after 20. One 4-years old patient is currently manifesting an autistic disorder in absence of others neurological signs.

**Conclusion**  
 The description of JHD is sometime including children with psychiatric manifestations associated with adult motor onset. We advise to pay careful attention to such rare conditions that might represent either psychiatric conditions erroneously classified as JHD or prodromic adult HD cases.







**P258**  
**CHARGE syndrome and ALS: a clinical and genetic study of a family from Southern Italy**

C. Ungaro<sup>1</sup>, L. Citrigno<sup>1</sup>, G. Gentile<sup>1</sup>, A. Patitucci<sup>1</sup>, A. Magariello<sup>1</sup>, M. Muglia<sup>1</sup>, S. Cavallaro<sup>1</sup>, F. Trojsi<sup>2</sup>, F.L. Conforti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Neurological Sciences, National Research Council, Mangone (CS)

<sup>2</sup>Department of Medical, Surgical, Neurological, Metabolic and Aging Sciences, Second University of Naples, Napoli.

**Introduction:** Recent findings in the field of molecular genetics have led to significant advances in our understanding of the genetic basis of a number of rare disorders. Until now, CHARGE association and ALS disease never occurred together in the same family and no cases have been reported in literature. **Aim:** Herein, we report a clinical and genetic study of a family from South Italy composed of parents and two daughters affected by ALS and CHARGE syndrome, respectively. **Material and methods:** After accurate clinical evaluation of the family members, CHD7 genetic investigation was performed. Furthermore, the ALS patient underwent to high-throughput sequencing analysis using the Ion Personal Genome Machine (PGM) with a custom AmpliSeq ALS panel. **Results:** Molecular analysis of the CHD7 gene in our family showed in the CHARGE patient a previously described variant in exon 37: c.8016G>A (W2672\*). In segregation analysis both parents and the ALS daughter were negative for the mutation, confirming this variation as de novo. This single base exchange causes no frameshift, leading to the substitution of the Tryptophan 2672 with a premature stop codon. 38 ALS genes were ultimately selected for the targeted sequencing panel to analyze the ALS affected member of this family. We identified known and unknown pathogenic variants of the 38 ALS related genes. None of the family members harbored the C9ORF72 hexanucleotide repeat expansion. **Conclusion:** Here, we give a clinical and genetic description of two sisters affected by two different disorders: ALS and CHARGE syndrome. One sister, a full-termed 41 year old female born from non-consanguineous healthy parents, carried a de novo CHD7 mutation (W2672\*), presenting all typical CHARGE syndrome defects, no brain malformation, and normal cognitive abilities. Behavioral profile presented retreat trend. The second one, a 44-year-old woman, was clinically ALS diagnosed, with bulbar onset, pyramidal impairment and spastic phenotype. Exome sequencing on the ALS patient revealed no pathogenic mutations in the major ALS genes but different other variants most of which validated by Sanger sequencing. A further deep investigation by whole exome analysis could be useful to elucidate a possible link between ALS and CHARGE disorder.

**P259**  
**Genomic and functional evaluation of the role of TNFSF14 gene in susceptibility to multiple sclerosis**

M. Zuccal<sup>1</sup>, N. Barizzone<sup>1</sup>, E. Boggio<sup>1</sup>, L. Gigliotti<sup>1</sup>, C. Basagni<sup>1</sup>, E. Corsetti<sup>1</sup>, G. Predebon<sup>1</sup>, U. Dianzani<sup>1</sup>, S. D'Alfonso<sup>1</sup>, M. Sorosina<sup>2</sup>, F. Clarelli<sup>2</sup>, S. Anand<sup>3</sup>, E. Mangano<sup>3</sup>, D. Vecchio<sup>4</sup>, F. Esposito<sup>5</sup>, R. Cantello<sup>4</sup>, V. Martinelli<sup>6</sup>, G. Comi<sup>2</sup>, M. Leone<sup>5</sup>, G. De Bellis<sup>3</sup>, F. Martinelli-Boneschi<sup>6</sup>, R. Bordoni<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Health Sciences, Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD), University of Eastern Piedmont, Novara

<sup>2</sup>Laboratory of Human Genetics of Neurological Diseases, San Raffaele Scientific Institute, Milano, Italy

<sup>3</sup>National Research Council of Italy, Institute for Biomedical Technologies, Segrate, Milano, Italy

<sup>4</sup>MS Centre, SCDU Neurology, AOU Maggiore della Carità, Novara, Italy

<sup>5</sup>SC Neurologia, Dipartimento di Scienze Mediche, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Italy

<sup>6</sup>Department of Biomedical Sciences for Health, University of Milan, Milan, Italy

Multiple Sclerosis (MS) is a complex disease. Over 200 MS susceptibility genes were identified. Among these, the strongest non-HLA signal in the Italian population maps in the Tumor Necrosis Factor (ligand) superfamily member 14 (TNFSF14) gene. TNFSF14 encodes for LIGHT, a transmembrane glycoprotein expressed on various immune cells and involved in immune modulation and dendritic cells (DC) maturation. We demonstrated that an intronic variant (rs1077667) is the primarily associated one through a fine-mapping approach. Cis-eQTL analysis data from different public databases showed that carriers of MS risk allele have a lower TNFSF14 RNA expression in EBV-transformed lymphoblastoid cell lines (Geuvaris, Biportal, Gtex) and in PBMCs (Gtex), but not in brain cells (Braineac). These data are consistent with the observation that in heterozygous individuals the allelic expression is unbalanced in favor of the allele with higher eQTL expression (p<0.0001, RNAseq on 97 lymphoblastoid cells, Geuvaris). We confirmed these data by RT-PCR expression analysis on PBMC of 84 Italian MS and 80 healthy controls (HC): individuals with the MS risk genotype produced lower levels of TNFSF14 transcript (p=1.1e-4). In addition, we observed that MS patients show significantly lower expression levels compared to HC (p=0.031). Preliminary analysis performed on peripheral blood of HC by flow cytometry showed that in myeloid DC (CD11c+) the homozygous individuals for the risk allele (N= 17) had a higher percentage of LIGHT positive cells compared to the others (N=16, p-value = 0.04). In conclusion, we propose that an altered TNFSF14 expression in immune cells driven by the intronic variant can contribute to the pathogenesis of MS. In particular, this variant seems associated with a low TNFSF14 RNA expression in a mixed population of PBMCs and with a higher percentage of LIGHT positive cells in myeloid dendritic cells (representing only 1 2% of PBMCs) suggesting a cell specific influence of this variant on LIGHT expression at the protein level, which might have distinct effects on the surface and secreted forms of the protein.

**P260**  
**Identification of pathogenetic mutations in non Neurodegenerative genes**

S. Gagliardi<sup>1</sup>, S. Zucca<sup>1</sup>, M. Valente<sup>1</sup>, O. Pansarasa<sup>1</sup>, I. Palmieri<sup>1</sup>, F. Rey<sup>1</sup>, L. Diamanti<sup>3</sup>, A. Costa<sup>3</sup>, C. Pacchetti<sup>4</sup>, M. Ceroni<sup>3</sup>, C. Cereda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genomic and Post-Genomic Center, "C. Mondino" National Neurological Institute, Pavia, Italy

<sup>2</sup>Department of Brain and Behavioral Science, University of Pavia, Pavia, Italy

<sup>3</sup>Unit of General Neurology, "C. Mondino" National Neurological Institute, Pavia, Italy

<sup>4</sup>Parkinson's Disease and Movement Disorders Unit, "C. Mondino" National Neurological Institute, Pavia, Italy

**Background:**The rise of Next-Generation Sequencing (NGS), allowing fast and cheap massive-parallel DNA sequencing, in genetic testing has revolutionized the approach to diagnosis in Neurodegenerative Diseases (NDs). The traditional approach, that considers different NDs as separated genetic conditions, has been overturned by the advent of multiple-genes and exomes panels. NGS analysis has increased the hypothesis of a co-morbidity between these disorders and has supported the existence of a close relationship between genetic profiles of different NDs. The aim of the study:Investigation of genetic co-morbidity in NDs with the use of neurodegenerative disease panel and Focused exome approach.**Materials and methods:**DNA was extracted from blood of 100 Italian patients with NDs and has been sequenced with a Neurodegenerative Pannels (200 genes). For 15 cases with particular phenotype we used a customized Focused Exome-Panel for a total gene of 6110 genes (SureSelectQXT Target Enrichment, Agilent). DNA-seq was performed using an Illumina MiniSeq sequencer. Data analysis was performed according to the best-practices described for these applications to identify single nucleotide variants and small insertions/deletions. Pathogenic and likely pathogenic mutations have been confirmed via Sanger.**Results:**Data analysis shows mutations in 12 patients Six mutations was found in classical ALS and PD genes, instead six mutations was found in non-canonical genes. Two ALS cases have a very rare nucleotide substitution in LRRK2, one with ALS/PD has heterozygous mutation in POLG, one patient with mixed phenotype ALS/SPG has mutation in REEP1 gene and one case has mutation in PINK1. 15 negative cases for Neurodegenerative Pannels, but with particular phenotype, were analyzed with focused exome. Data analysis shows mutations in 3 patients: one with a history family of Parkinsonism carries a non-synonymous homozygous mutation in AMPD1, one case presents a mutation in BAG3 gene, one with Dystonia is compound heterozygous in NAGA gene.**Conclusion:**These findings support the hypothesis of the existence of a co-morbidity between NDs and highlight the importance of wide genetic screenings. The data obtained in our laboratory have shown that neuro-exome-panel can be an excellent tool for genetically characterizing all those NDs with a uncertain clinical phenotype. Our purpose is to use the neuro-exome-panel as a diagnostic instrument not only for cases of noy clear phenotype, but for neurological diseases.



**P261**  
**Genetic analysis of Parkin gene in Parkinson disease: the heterozygote carriers represents a risk factor?**

R. Ferese<sup>1</sup>, S. Scala<sup>1</sup>, A.M. Griguoli<sup>1</sup>, R. Campopiano<sup>1</sup>, V. Albano<sup>1</sup>, M. Storto<sup>1</sup>, F. Limanaqi<sup>2</sup>, E. Giardina<sup>3,4</sup>, S. Zampatti<sup>1,3,4</sup>, N. Modugno<sup>1</sup>, F. Fornai<sup>1,2</sup>, D. Centonze<sup>1</sup>, S. Ruggieri<sup>1</sup>, S. Gambardella<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IRCCS Neuromed Pozzilli (IS)

<sup>2</sup>Department of Translational Research and New Technologies in Medicine and Surgery, University of Pisa

<sup>3</sup>Department of Biomedicine and Prevention, University of Rome Tor Vergata , via Montpellier 1, 00133, Rome, Italy

<sup>4</sup>Molecular Genetics Laboratory UILDM, Santa Lucia Foundation, via Ardeatina 354, 00142, Rome, Italy

Parkinson s disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder, after Alzheimer s disease. An estimated 1% 2% of individuals over the age of 65 years are affected, and more than 4% of the population by the age of 85 years. Mutations in the parkin gene (PARK2; OMIM #600116) are the most common genetic risk factors for early-onset Parkinson s disease (EOPD). In PD cases with age at onset (aao) ≤ 45 years from families with an autosomal recessive mode of inheritance, the frequency of parkin mutations may be as high as 49%, while in cases without a family history of PD, the reported range is 15 18%. Although PARK2 patients present two mutations in the parkin gene (autosomal recessive inheritance pattern), the risk that heterozygotes may develop PD symptoms is not yet determined although several individuals with parkinsonism, heterozygotes for the parkin gene have been reported. Here we report the analysis of gross deletions and duplications of the parkin gene in 416 PD patients (200 with and 241 without a familiar story) by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). Five mutations were detected in four PD patient (PD-22, PD-44, PD-223, PD-331). PD-22 is carrier of an heterozygote duplication of exon 2 and 3 (aao:66); PD-44 is carrier of an heterozygote duplication of exon 5 and 6 (aao:38); PD-223 is carrier of an heterozygote deletion of exon 3 (aao:27); PD-331 is carrier of an homozygote deletion spanning from of exon 4 to 9 (aao:45). Sequencing analysis of the whole parkin gene was performed in PD patients where MLPA detected only one mutation, and p.Arg42Pro was detected in PD-233. Taken together, these data allow to detect gross deletions/insertions in 5 out of 832 alleles (0.6%) in four PD patients. Among these, only two patients carry two parkin mutation, thus confirming the recessive inheritance of parkin. The high prevalence of PD patients who carry a single parkin pathogenic variant emphasize the need to establish whether heterozygote mutations represent a risk factor in the development of PD.







P262

**Evolutionary conserved ARX-regulatory pathway in mammals and nematode to find a convergent druggable pathway damaged in neurodevelopmental disorders**

L. Poeta<sup>1</sup>, A. Padula<sup>1</sup>, B. Attianese<sup>1</sup>, M. Valentino<sup>1</sup>, S. Filosa<sup>2</sup>, E. Di Schiavi<sup>2</sup>, L. Altucci<sup>3</sup>, M.G. Miano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genetics and Biophysics Adriano Buzzati Traverso, CNR, Naples

<sup>2</sup>Institute of Bioscience, CNR, Naples

<sup>3</sup>University of Campania Luigi Vanvitelli, Caserta

The X-linked ARX gene encodes the Aristaless-related homeobox protein, which belongs to a subset of morphogenetic transcription factors with a crucial role in cerebral development and patterning. Mutations in ARX cause a wide spectrum of X-linked neurodevelopmental disorders including lissencephaly, a severe cortical malformation and a catastrophic epileptic encephalopathy with recurrent and resistant seizures. The health problem to find efficient treatments for ARX-related diseases highlights the need for understanding the components and pathways that regulate brain development. Because the neuronal functioning is maintained by a complex regulatory network, the use of powerful genetic models like mouse and worm can complement studies on human genetics and physiology by offering new opportunities to dissect complicated and evolutionary conserved regulatory circuits. Here we describe for the first time the conservation of an ARX-dependent disease-pathway among human, mouse and worm establishing a gene-phenotype association from one organism to another. Indeed, starting from the homologous gene relationships between ARX and its murine (Arx) and worm (alr-1) counterparts, we established a neuronal phenolog relationship among the human phenotypes associated to ARX mutations, their relative Arx disease models in mouse, and the C. elegans alr-1 mutants. Expanding our previous study on the identification of disease-related targets of ARX in human, we proved that the homologous counterparts of KDM5C in mouse (Kdm5C) and worm (rbr-2) are under the control of ARX/Alr-1 transcription activity. In line with these findings, we established a robust downregulation of KDM5C/rbr-2 transcript in human, murine and worm mutants defective for ARX/alr-1. We will also present results on molecular and phenotypic rescue obtained by drug repositioning in each models tested. In conclusion, our data allow us to define the ARX/alr-1 phenolog-disease pathway leading to better understanding how to correct perturbation of neuronal physiology. Therefore our findings constitute a valuable basis for applying mechanism-based therapies aiming to treat neurodevelopmental diseases caused by defects in transcriptional regulators.

P263

**Analisi molecolare del gene NOTCH3 in una coorte di pazienti con sospetto clinico/strumentale di CADASIL**

L. Mosca<sup>1</sup>, L. Mauri<sup>1</sup>, M.S. Cigoli<sup>1</sup>, A. Marocchi<sup>1</sup>, T. Pavesi<sup>1</sup>, E. Ferrante<sup>2</sup>, U. Cavallari<sup>1</sup>, S. Penco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>S.S. Genetica Medica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano

<sup>2</sup>Divisione Neurologia, Ospedale San Carlo, Potenza

L'arteriopatia cerebrale autosomica dominante con infarti sottocorticali e leucoencefalopatia (CADASIL; OMIM 125310) è una patologia cerebrovascolare ereditaria ad alta penetranza che colpisce gli adulti di mezza età e che porta a disabilità e demenza. Si registra una grande variabilità clinica sia intra-familiare; la sintomatologia è rappresentata principalmente da emicrania, eventi ischemici sottocorticali, cambiamenti di umore, apatia e decadimento cognitivo. Il sospetto clinico è rafforzato dalla presenza di una storia familiare positiva e/o dall'identificazione tramite risonanza magnetica (RM) di uno o più infarti sottocorticali nella sostanza bianca tendenzialmente simmetrici. Il gene causativo è NOTCH3 (cromosoma 19p13.2-p13.1) e codifica per un recettore transmembrana probabilmente coinvolto in meccanismi di signalling inter-cellulari; le mutazioni patogenetiche sono localizzate nei 34 domini EGF-like della porzione extracellulare del recettore (esoni 2/24) e coinvolgono la sostituzione di una cisteina con un altro aminoacido o viceversa. Il gene NOTCH3 è stato analizzato tramite sequenziamento diretto in 408 soggetti con sospetto clinico/strumentale di CADASIL e afferenti alla SS Genetica Medica dell'ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda di Milano. È stato inoltre offerto a tutti i pazienti un percorso di counselling genetico pre- e post-test. 50 soggetti (11.8%) sono risultati portatori di 31 differenti mutazioni negli esoni 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 19, 20, 22. Sono state identificate 28 mutazioni canoniche missenso coinvolgenti perdita/guadagno di un residuo di cisteina, 1 mutazione non-senso (esone 3), 1 indel localizzata nell'esone 6 e 1 variante di splicing nell'introne 8. Sono stati inoltre analizzati 43 familiari; 28 sono risultati portatori di mutazione causativa. Tali risultati confermano l'importanza del test genetico nella diagnosi di CADASIL e la necessità di screening dell'intera regione dei domini EGF-like di NOTCH3 dal momento che numerose mutazioni sono state riscontrate negli esoni non-hot spots (esoni 3, 4). Inoltre risulta fondamentale il ruolo della consulenza genetica per la comunicazione dei risultati e il sostegno psicologico per pazienti e familiari.

P264

**Identificazione di una duplicazione de novo sul cromosoma 13q12.3 che include il gene HMGB1 in un paziente con epilessia farmacoresistente, ritardo mentale e dermatite atopica**

A. Fanelli<sup>1</sup>, D. Babu<sup>1</sup>, A. Zonta<sup>1</sup>, G. Strigarò<sup>2</sup>, G. Tondo<sup>2</sup>, S. Mellone<sup>1</sup>, G. Zacchetti<sup>1</sup>, E. Matino<sup>2</sup>, L. Falletta<sup>2</sup>, C. Varrasi<sup>2</sup>, R. Cantello<sup>2</sup>, M. Giordano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze della Salute, Laboratorio di Genetica Umana. Università del Piemonte Orientale, Novara

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Traslazionale, Sez. Neurologia. Università del Piemonte Orientale, Novara

È stata evidenziata mediante aCGH una duplicazione di 982 Kb all'interno della regione 13q12.3 in un paziente di 26 anni con ritardo mentale, macrocefalia, micrognazia, spianamento malare, dermatite atopica, linguaggio verbale assente ed epilessia farmacoresistente. Attualmente il paziente presenta 3-4 crisi al mese caratterizzate da sguardo fisso e alterazione della coscienza che evolvono in crisi convulsive bilaterali. L'EEG intercrico presenta tracciato diffusamente instabile con anomalie epilettiformi diffuse. I genitori in buona salute sono risultati negativi per la microduplicazione che è dunque insorta de novo nel paziente. In letteratura non sono riportate duplicazioni simili in questa stessa regione ma sono descritte delezioni associate a ritardo mentale, microcefalia, dermatite atopica e dismorfismi. Nella regione duplicata si trovano i geni LINC00544, KATNAL1, LINC00462, HMGB1, USPL1, ALOX5AP, LINC00545, LINC00398, TEX26-AS1, MEDAG. Di particolare interesse risulta il gene HMGB1 (High Mobility Group Box 1) che codifica per una DNA-binding protein di 216 aminoacidi (29 kDa) coinvolta nella formazione dei nucleosomi e nella regolazione dell'espressione genica. Studi su modelli animali di epilessia hanno dimostrato il coinvolgimento di HMGB1 in processi infiammatori ed immuni dell'epilettogenesi oltre ad un effetto proconvulsivante della proteina stessa (Maroso et al., 2010, Choy et al., 2014). HMGB1 potrebbe dunque rappresentare il gene la cui sovraespressione determina l'epilessia farmacoresistente osservata nel paziente.



P265

**Analysis of NIPA1 repeat length as a possible modifier factor of ALS C9ORF72-mediated in a large Italian ALS cohort**

N. Barizzone<sup>1</sup>, L. Corrado<sup>1</sup>, M. Brunetti<sup>2</sup>, A. Di Pierro<sup>1</sup>, M. Barberis<sup>2</sup>, R. Croce<sup>1</sup>, E. Bersano<sup>3</sup>, F. De Marchi<sup>3</sup>, A. Calvo<sup>4,5,6</sup>, C. Moglia<sup>4,5</sup>, L. Mazzini<sup>3</sup>, S. D'Alfonso<sup>4</sup>, A. Chi<sup>4,5,6</sup>

<sup>1</sup>Human Genetics Lab, Department of Health Sciences, University of Eastern Piedmont, Novara, Italy

<sup>2</sup>"Rita Levi Montalcini" Department of Neuroscience, Neurology II, ALS Center, University of Torino, Torino, Italy

<sup>3</sup>ALS Center AOU Maggiore della Carità, Novara

<sup>4</sup>ALS Center, "Rita Levi Montalcini" Department of Neuroscience, University of Torino, Torino, Italy

<sup>5</sup>The Azienda Ospedaliero Universitaria Città della Salute e della Scienza di Torino, Torino, Italy

<sup>6</sup>The Neuroscience Institute of Torino, Torino, Italy

Amyotrophic lateral sclerosis is a fatal motor neuron disease characterized by motor neuron degeneration in the primary motor cortex, brainstem and spinal cord. In about 10% of patients, the disease is familial, while the majority of patients are sporadic cases. The hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 gene (C9ORF72 HRE) is the most frequent genetic cause of ALS. Since many familial pedigrees showed incomplete penetrance and heterogeneous clinical signs, several genetic factors have been analyzed as possible modifier in ALS. Among them, the length of the GCG repeat tract in non-imprinted Prader-Willi/Angelman syndrome 1 (NIPA1), previously identified as a risk factor for ALS susceptibility, has been recently investigated as a possible modifier factor for ALS patients carrying C9ORF72 HRE. The frequency of NIPA1 long alleles was significantly higher in C9ORF72 HRE sporadic ALS carriers (15.2%) compared with 5.5% in all other sporadic ALS cases and 3.9% in controls (Dekker 2016) while no difference was observed in C9ORF72 HRE ALS carriers (3.0%) compared to controls (3.5%) in another study (van Blitterswijk 2014). Given these conflicting results, our aim is to further disclose the possible role of NIPA1 GCG repeat length as modifier of the C9ORF72 phenotype in a large cohort of Italian ALS cases. The NIPA1 GCG repeat was genotyped in 558 Italian ALS sporadic patients, including 150 ALS cases carrying the C9ORF72 HRE and 408 C9ORF72 HRE negative cases, and 483 Italian controls, recruited by Novara and Torino ALS centers. To evaluate the effect of short or long repeat length, as in the literature papers, we dichotomized NIPA1 alleles as normal ((GCG)7 or (GCG)8), or long (>8 GCG repeats). The difference of NIPA1 long alleles frequencies in the different subgroups was assessed with Fisher's exact test. We did not observe a higher frequency of NIPA1 long alleles in C9ORF72 HRE carriers (4%) compared to C9ORF72 HRE negative patients (4.4%) and to healthy controls (5%). This sample size allowed to replicate the modifier effect observed in the literature study (92% power, at alpha 0.05). In conclusion, we are not able to confirm a possible role of NIPA1 repeat length as a modifier factor of the C9ORF72 ALS phenotype.





**P266**  
**UBE2A deficiency in two siblings: a novel splicing variant inherited from a maternal germline mosaicism**

T. Giugliano<sup>1</sup>, C. Santoro<sup>2</sup>, A. Torella<sup>1</sup>, F. Del Vecchio Blanco<sup>1</sup>, P. Bernardo<sup>3</sup>, G. Esposito<sup>1</sup>, R. Erpice<sup>1</sup>, V. Nigro<sup>1</sup>, G. Piluso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biochimica, Biofisica e Patologia Generale, Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli

<sup>2</sup>Dip. della Donna, del Bambino e della Chirurgia generale e specialistica, Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli

<sup>3</sup>Dip. di Salute Mentale, Fisica e Medicina Preventiva, Clinica di Neuropsichiatria Infantile, Università degli Studi della Campania Luigi Vanvitelli, Napoli

**Introduction**

UBE2A deficiency is a syndromic condition of X-linked intellectual disability (ID) characterized by typical dysmorphic features that include synophrys, prominent supraorbital ridges, almond-shaped and deep-set eyes, large ears, wide mouth, myxedematous appearance, hirsutism, micropenis, and onychodystrophy. To date, only seven familial UBE2A intragenic mutations and nine larger microdeletions encompassing UBE2A have been reported.

**Aim**

We investigated two siblings with X-linked ID and typical clinical features of UBE2A deficiency.

**Methods and Results**

By massively parallel sequencing of X-exome, we identified a novel hemizygous mutation in UBE2A. The synonymous c.330G>A substitution in UBE2A modifies the last nucleotide of exon 5, causing the exon skipping and resulting in an out-of-frame transcript, likely encoding for a truncated form of the ubiquitin-conjugating enzyme E2A. In previously reported cases of UBE2A deficiency, all carrier females were asymptomatic, highlighting a completely skewed X-inactivation, strongly suggestive of the deleterious effect of mutations in UBE2A.

By bidirectional sequencing of UBE2A exon 5, we searched for the variant in females of the family. Unexpectedly, the c.330G>A substitution was not detected in the probands' mother, as well as in her unaffected daughters. The result was also confirmed at RNA level, where the aberrant out-of-frame UBE2A transcript was not detectable in females of the family. Segregation analysis of the X-chromosome in family members highlighted that both affected males partially share the long arm of the X-chromosome with their younger unaffected sister, including the region between DXS8081 and DXS8067 where UBE2A is mapped.

**Conclusions**

Overall, these genetic findings strongly suggest that the recurrent UBE2A deficiency observed in males of this family is caused by a germline mosaicism in the probands' mother.

**P267**  
**RAI1 intragenic deletion and concomitant overexpression in a syndromic patient: Smith-Magenis or Potocki-Lupski syndrome?**

A. Sironi<sup>1,2</sup>, I. Bestetti<sup>1</sup>, M. Masciadri<sup>1</sup>, S. Russo<sup>1</sup>, C. Pantaleoni<sup>3</sup>, S. D'Arrigo<sup>3</sup>, L. Larizza<sup>1</sup>, P. Finelli<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Lab. of Medical Cytogenetics and Molecular Genetics, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milan, Italy

<sup>2</sup>Dept. of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Milan, Italy

<sup>3</sup>Developmental Neurology Division, IRCCS Fondazione Istituto Neurologico C. Besta, Milan, Italy

Smith-Magenis Syndrome (SMS) [MIM:182290] is a complex genomic disorder characterized by intellectual disability (ID), craniofacial dysmorphisms, behavioral and sleep disturbances, speech and motor delay. SMS is caused by Retinoic Acid-Induced 1 (RAI1) gene haploinsufficiency due to interstitial deletion at 17p11.2 in 90% of the cases and RAI1 point mutations/microdeletions in the remaining 10%. Here we describe a 46,XX girl aged 17 years with a clinical suspicion of SMS. Upon previous exclusion of 17p11.2 SMS locus deletion, RAI1 mutational screening identified the yet unreported heterozygous variant p.A1091D predicted as likely benign and inherited from the healthy mother. In addition, MLPA analysis revealed in the patient a de novo heterozygous deletion encompassing RAI1 exon 5. The deletion seems to create a transcript that loses, beside exon 5, the canonical stop codon which is replaced by a new one downstream, a finding consistent with the initial clinical suspicion. In order to verify that the de novo deletion results in RAI1 haploinsufficiency, RT-qPCR studies were carried out, but they showed an unexpected statistically significant increase in transcript levels of both patient's and mother's peripheral blood cells compared to those of 10 healthy controls. To clarify the role of the identified molecular defects in both patient and mother further molecular studies are needed. Indeed, to confirm the clinical SMS diagnosis, we are currently verifying whether the normal allele or that with the exon 5 deletion, that we assume to be deleterious, is overexpressed. With similar approach we will investigate if the rare maternal variant might be implicated in RAI1 overexpression. Moreover, as RAI1 overexpression, that cause of Potocki-Lupski syndrome (PTLS) [MIM:610883] is tolerated better than haploinsufficiency, as shown by several PTLS cases with inherited duplication, a clinical re-evaluation of the patient and mother will be crucial to understand the pathogenic burden of their molecular defects and formulate a correct diagnosis.

**P268**  
**Early onset epilepsy and amelogenesis imperfecta: a case of Kohlschütter-Tonz syndrome**

E. Prada<sup>1</sup>, B. Salis<sup>2</sup>, T. Granata<sup>2</sup>, E. Alfei<sup>1</sup>, C. Pantaleoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Developmental Neurology Unit, Department of Pediatric Neurosciences, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milan

<sup>2</sup>Infantile Neuropsychiatry Unit, Department of Pediatric Neurosciences, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milan

Kohlschütter-Tonz syndrome (KTS, OMIM 226750) is a rare genetic disorder characterized by epilepsy, intellectual disability and amelogenesis imperfecta. It was first described in 1974 and approximately 30 individuals with clinical diagnosis of KTS have been reported until now. The most striking feature is global enamel hypoplasia (amelogenesis imperfecta) that affects both the primary and secondary dentition: teeth are thin, soft, rough and have a yellowish color. Epilepsy usually starts within the first year of life; it is refractory to treatment and is associated with regression of psychomotor abilities. Clinical course is variable within families; several affected individuals develop spastic tetraplegia and die during childhood due to complications of epilepsy. KTS is inherited in autosomal recessive manner and is caused by mutations in the gene RODG1. Recently, mutations in a new gene, SLC13A5, have been associated to this condition. We report a child who is 13 years old with early onset epilepsy: when he was one year old he had a first febrile seizure with generalized tonic-clonus movements. Since he was 10 years old he has showed recurrent partial seizures unrelated to fever and unresponsive to drugs. Intellectual disability was moderate-severe. During the visit the child has hypoplastic and yellow teeth. The genetic analysis has identified a homozygous frameshift mutation c.507delC in the gene RODG1 and has confirmed diagnosis of KTS.



**P269**  
**Screening della malattia di Gaucher in pazienti ematologici molisani**

M. De Cinque<sup>1,2</sup>, P. Marino<sup>1</sup>, P. Del Gatto<sup>1</sup>, A. De Filippis<sup>1</sup>, P. Spagnuolo<sup>1</sup>, R. Palma<sup>1</sup>, F. Zurlo<sup>1</sup>, A. Simone<sup>1</sup>, C. Santone<sup>1</sup>, E. D'Attilio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O Medicina Trasfusionale, P.O. San Timoteo, ASReM, Termoli (CB)

<sup>2</sup>Università degli Studi del Molise, DIMES, Campobasso

La malattia di Gaucher è una patologia ereditaria, autosomica recessiva, rara (frequenza 1:60.000 nella popolazione generale) causata da mutazioni del gene GBA1 (1q21) che determinano un deficit di β-glucocerebrosidasi, un enzima lisosomiale fondamentale per la degradazione del glucocerebroside in glucosio e ceramide. L'assenza di tale enzima provoca l'accumulo del substrato a carico del sistema reticolo endoteliale in particolare nella milza, nel fegato e nel midollo osseo. La malattia di Gaucher è una patologia metabolica multisistemica che a livello ematologico si manifesta più frequentemente con splenomegalia e piastrinopenia associata o meno ad anemia e/o leucopenia con neutropenia. A volte si presenta anche con poligammopatia o gammopatia monoclonale di significato incerto, epatomegalia, deficit della coagulazione ed iperferritinemia. L'incidenza della malattia di Gaucher è sottostimata, soprattutto negli adulti, a causa di tardiva o mancata diagnosi dovuta a manifestazioni cliniche eterogenee e in comune con le più frequenti patologie ematologiche. Alla luce di tali considerazioni, nel nostro centro è in corso il reclutamento di pazienti con et ≥ 18 anni che presentano segni clinici ematologici compatibili con la malattia di Gaucher. Essi vengono invitati a partecipare ad uno screening che consiste nel dosaggio enzimatico su spot di sangue tramite rivelazione fluorimetrica. Sono arruolati pazienti per i quali sono state escluse patologie oncoematologiche, con almeno una delle caratteristiche principali: splenomegalia e/o piastrinopenia in associazione o meno ad anemia, leucopenia, gammopatia, iperferritinemia, deficit della coagulazione o epatomegalia. Previo consenso informato il campione di ogni paziente viene raccolto su carta da filtro ed inviato a centri esterni preposti all'analisi. Allo stato attuale sono stati esaminati i primi 10 spot ematici che hanno dato esito negativo e si sta procedendo ad un ulteriore campionamento. Ad oggi non è nota la frequenza della malattia di Gaucher nella regione Molise ed il nostro studio potrebbe contribuire ad individuare pazienti rari con vantaggi in termini di qualità e quantità di vita dei probandi in considerazione dei successi della terapia sostitutiva.





**P270**  
**Four novel cases of Cystathionine beta-synthase deficit and responsiveness to pyridoxine treatment**

**A. Redi<sup>1</sup>**, M.P. Lenza<sup>2</sup>, S. Gelsomino<sup>1</sup>, C. Bisceglia<sup>1</sup>, S. Fecarotta<sup>3</sup>, C. Mazzaccara<sup>2</sup>, G. Frisso<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Dep. of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, Federico II University, Naples (Italy)  
<sup>2</sup>Dep. of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies Federico II University and CEINGE-Biotechnologie Avanzate, Naples (Italy)  
<sup>3</sup>Department of Translational Medicine-Section of Pediatrics, Federico II University, Naples (Italy)

Cystathionine beta-synthase (CBS) is pyridoxine-dependent enzyme catalyzing the conversion of serine and homocysteine (Hcy) to cystathionine. A deficient activity of CBS is the cause of Classic Homocystinuria (HCU), a rare autosomal recessive disorder (prevalence 1-9/100000). Patients with CBS deficiency show a wide spectrum of severity and age at presentation. The main clinical and biochemical features include eye anomalies, skeletal changes, thromboembolic events, CNS involvement, and high level of Hcy and methionine. Patients generally require treatment with pyridoxine, a low-methionine diet and/or betaine. Herein, we report 4 HCU cases: screening for inborn errors of metabolism identified one newborn; the others patients were diagnosed between the second and third decade of life by the typical features. All patients showed high level of Hcy at diagnosis. Genetic analysis was required to confirm the suspicion of CBS deficit and we performed Sanger sequencing of the coding region (plus exon-intron boundaries and UTR) of the CBS gene. We identified one homozygous patient (p.G116R/p.G116R) and three compound heterozygous (p.I278T/p.D444N; p.A114V/p.G116R; p.I278T/p.A355V). All mutations were previously reported as disease causing, except the p.A355V variant. It is a very rare variant in general population (MAF=0.0009%), bioinformatics analysis is discordant to attribute a pathogenic role. To date it was not possible to study familiar segregation to evaluate the cis/trans configuration of the two variations (p.I278T/p.A355V). All patients are treated using pyridoxine therapy: the compound heterozygous (p.A114V/p.G116R) patient displayed complete responsiveness (plasma total Hcy decreased to <50 mol/L), the other three showed a partial responsiveness (plasma total Hcy>50 mol/L but <80% of baseline average). The p.A114V and p.I278T mutations at homozygous state usually correlates with pyridoxine responsiveness, however for compound heterozygotes it is difficult to establish a clear genotype/phenotype correlation. The molecular analysis may be useful to address to pyridoxine therapy in order to initiate early treatment to avoid complications. Therefore, it is necessary to note new cases involving genotype and response to pyridoxine therapy.

**P271**  
**Glicogenosi III: identificazione di due nuove delezioni nel gene AGL e del primo caso di isodisomia uniparentale**

**E. Ponzi<sup>1</sup>**, A. Maiorana<sup>1</sup>, V. Alesi<sup>2</sup>, F.R. Lepri<sup>2</sup>, C. Rizzo<sup>1</sup>, S. Boenzi<sup>1</sup>, M. Semeraro<sup>1</sup>, M. Mucciolo<sup>2</sup>, S. Genovese<sup>2</sup>, A. Novelli<sup>2</sup>, C. Dionisi-Vici<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>U.O.C. di Patologia Metabolica, Dipartimento di Pediatria Specialistica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma  
<sup>2</sup>U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, Dipartimento dei Laboratori, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma

Premessa: la glicogenosi III (GSDIII) è un errore congenito del metabolismo del glicogeno a carattere autosomico recessivo. GSDIII è causata da un deficit dell'enzima deramificante ed associata a mutazioni nel gene AGL. I pazienti affetti presentano ipoglicemia chetotica, epatomegalia, ritardo di crescita, intolleranza al digiuno, miopia e cardiomiopatia ipertrofica. Scopo dello Studio: caratterizzazione genetica in pazienti con sospetto clinico di GSDIII. Materiali e metodi: sono stati studiati 3 pazienti attraverso un approccio clinico e genetico (metodo di sequenziamento Sanger/NGS). Risultati: i pazienti #1 e #3 presentavano un quadro clinico compatibile con la patologia di base, il paziente #2 presentava severa bassa statura, non del tutto ascrivibile alla GSDIII. Il sequenziamento Sanger del gene AGL ha mostrato due varianti patogenetiche in omozigosi, nei pazienti #1 e #2. L'analisi di segregazione familiare ha evidenziato uno stato di eterozigote solo in un genitore, per entrambi i gruppi familiari. Successivi approfondimenti mediante SNP-Array, Real-Time PCR e analisi dei microsatelliti, hanno evidenziato una delezione di 349 kb a segregazione paterna in eterozigosi nel paziente #1 ed una isodisomia uniparentale paterna del cromosoma 1 (UPD1) nel paziente #2. Nel paziente #3, l'analisi genetica combinata con NGS ed Array-CGH ha evidenziato una delezione dei primi 4 esoni del gene AGL. Conclusione: Lo studio del fenotipo clinico e la caratterizzazione genetica di tre pazienti con GSDIII ha permesso di: 1) descrivere due nuove delezioni del gene AGL ed il primo caso di GSDIII associata a UPD1; 2) approfondire tre diversi meccanismi genetici che causano GSDIII: eterozigosi composta mutazione/delezione, smascheramento dell'allele recessivo per UPD1, delezione in omozigosi; 3) supportare l'ipotesi secondo cui il sovradosaggio di DIRAS3, gene oncosoppressore espresso sull'allele paterno (1p31.3), possa avere un ruolo nella regolazione della crescita anche nell'uomo, come già dimostrato in modelli murini. Infine, il lavoro enfatizza l'importanza dello studio di segregazione parentale in pazienti omozigoti per mutazioni puntiformi patogenetiche allo scopo di identificare specifici meccanismi genetici alla base della patologia e stimare correttamente il rischio di ricorrenza familiare.

**P272**  
**Nonketotic hyperglycinemia: utility of molecular analysis in the genotype-phenotype correlation**

**G. Rodella<sup>1</sup>**, E. Rigotti<sup>1</sup>, A. Dianin<sup>1</sup>, G. Gugelmo<sup>1</sup>, C. Di Giovanni<sup>5</sup>, S. Pellegin<sup>2</sup>, R. Solazzi<sup>2</sup>, I. Monge<sup>1</sup>, L. Mastella<sup>3</sup>, M. Camilot<sup>4</sup>, G. Cantalupo<sup>2</sup>, A. Bordugo<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dip. Scienze Chirurgiche Odontostomatologiche Materno-Infantili, Centro Regionale per gli screening neonatali, la diagnosi e cura delle malattie metaboliche ed endocrinologiche congenite, AOUI Verona  
<sup>2</sup>U.O. Neuropsichiatria, Osp. della Donna e del Bambino, AOUI Verona  
<sup>3</sup>U.O. Neuropsichiatria Infantile, Osp. Vicenza  
<sup>4</sup>U.O. Pediatria, Osp. della Donna e del Bambino, AOUI Verona

Nonketotic hyperglycinemia is an extremely rare autosomal recessively inherited glycine encephalopathy caused by a deficiency in the mitochondrial glycine cleavage system (GCS). The mutations have been reported in GLDC and AMT gene.

In approximately 4% of patients with deficient GCS enzyme activity, no mutations are identified in GLDC or AMT; these cases are caused by defects in the synthesis of the cofactor lipoic acid. Nonketotic hyperglycinemia is characterized by complex and different phenotypes, such as cognitive impairment, developmental delay, myoclonic jerks, hypotonia, and seizures that may lead to respiratory distress and even death.

Here we report two cases. The first patient is a 14-month-old girl that has in neonatal period lethargy, feeding difficulties, hypotonia, abnormal jerking movements, and life-threatening apnoea. Later she developed profound intellectual disability and seizures that were difficult to treat. Plasma glycine levels were elevated (1664 mmol/l), EEG showed a suppression-burst pattern, and MRI showed callosal hypoplasia and high glycine levels on MR-spectroscopy. Two heterozygous mutations confirmed the diagnosis. One is a stop codon mutation p.Ser142X and the other one is a missense mutation p.Arg988Gln in the GLDC gene; AMT gene analysis showed no mutation. She was started on sodium benzoate, multiple antiepileptic drugs, and ketogenic diet.

The second patient is a 3-years-old boy who presented at 20 days of life with mild hypotonia, seizures, and excessive startle reaction. MRI showed dysmorphic corpus callosum, EEG showed monomorphic background activity, and metabolic work-up identified elevated plasma glycine levels (514 mmol/l). He was treated with sodium benzoate (200 mg/kg/die) to lower glycine levels and levetiracetam to treat seizures. Now he is seizure-free and presents only a mild developmental delay. The diagnosis was confirmed by two heterozygous missense mutations in the GLDC gene: p.Arg536Gln e p.Ala802Val gene instead AMT gene analysis shows no mutation. The p.Arg536Gln mutation is not reported in literature but in silico prediction indicates a possibly disease-causing effect.

The p.Ala802Val mutation was previously described and is associated with a high residual glycine decarboxylase activity.

These cases show that NKH have a wide spectrum of phenotypic features and gene analysis can be a powerful tool to explain the differences. Using prediction tools we can hypothesised the possible causative role of the mutation and correlation with phenotype.

In our case in the severe mutation, possibly a stop codon, the protein is not produced and the functional change is dramatic.



**P273**  
**Small non-coding RNA massive parallele sequencing in human biofluids of healthy individuals**

**B. Pardini<sup>2,1</sup>**, G. Ferrero<sup>3,4</sup>, F. Cordero<sup>3</sup>, S. Tarallo<sup>1</sup>, M. Arigoni<sup>5</sup>, F. Riccardo<sup>5</sup>, G. Gallo<sup>6,7</sup>, G. Ronco<sup>8</sup>, M. Allasia<sup>9</sup>, N. Kulkarni<sup>5</sup>, P. Vineis<sup>1,10</sup>, R.A. Calogero<sup>5</sup>, A. Naccarati<sup>11,1</sup>  
<sup>1</sup>Dep. of Medical Sciences, University of Torino, Torino  
<sup>2</sup>Italian Institute for Genomic Medicine, IIGM, Torino  
<sup>3</sup>Dep. of Computer Science, University of Torino, Torino  
<sup>4</sup>Dep. of Clinical and Biological Sciences, University of Torino, Torino  
<sup>5</sup>Dep. of Biotechnology and Health Sciences, Molecular Biotechnology Center, University of Torino, Torino  
<sup>6</sup>Dep. of Surgical and Medical Sciences, University of Catanzaro, Catanzaro  
<sup>7</sup>Dep. of Colorectal Surgery, Clinica S. Rita, Vercelli  
<sup>8</sup>Center for Cancer Epidemiology and Prevention, AO City of Health and Science, Torino  
<sup>9</sup>Dep. of Surgical Sciences, University of Torino and Citt. della Salute e della Scienza, Torino  
<sup>10</sup>MRC-HPA Centre for Environment and Health, Imperial College London, Londra, UK  
<sup>11</sup>Dep. of Molecular Biology of Cancer, Institute of Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

The role of non-coding RNAs in different biological processes and diseases is continuously expanding. Next-generation sequencing (NGS) together with the parallel improvement of bioinformatics analyses allows the accurate detection and quantification of an increasing number of RNA species. With the aim of exploring new potential biomarkers for disease classification, a clear overview of the expression levels of common/unique small non-coding RNA species among different biospecimens is necessary. However, except for miRNAs in plasma, there are no substantial indications about the pattern of expression of various small non-coding RNAs in multiple specimens among healthy humans.

By analysing small RNA-sequencing data from 245 subjects, we have identified and compared the most abundantly and uniformly expressed miRNAs and non-miRNA species of comparable size with the library preparation in four different specimens (plasma exosomes, stool, urine, and cervical scrapes).

Eleven miRNAs were commonly detected among all different specimens while 231 miRNAs were globally unique across the specimens. Classification analysis using these miRNAs provided an accuracy of 99.6% to recognize the sample types. piRNAs and tRNAs were the most represented non-miRNA small RNAs detected in all specimen types that were analysed, particularly in urine samples. With the present data, the most uniformly expressed small RNAs in each sample type were also identified. A signature of small RNAs for each specimen could represent a reference gene set in validation studies by RT-qPCR.

Overall, the data reported hereby provide an insight of the constitution of the human miRNome and other small non-coding RNAs in specimens of healthy individuals.







**P274**  
**PR/SET domain family and cancer: reanalysis of omic data from The Cancer Genome Atlas**

A. Sorrentino<sup>1,2</sup>, A. Federico<sup>2,3</sup>, M. Rienzo<sup>4</sup>, A. Casamassimi<sup>1</sup>, C. Abbondanza<sup>1</sup>, A. Ciccodicola<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Biophysics and General Pathology, University of Campania Luigi Vanvitelli, Naples, Italy

<sup>2</sup>Department of Science and Technology, University of Naples Parthenope, Naples, Italy

<sup>3</sup>Institute of Genetics and Biophysics Adriano Buzzati Traverso, CNR, Naples, Italy

<sup>4</sup>Department of Environmental, Biological, and Pharmaceutical Sciences and Technologies, University of Campania Luigi Vanvitelli, Caserta, Italy

PR/SET domain gene family (PRDM) encodes 19 different transcription factors sharing a subtype of SET domain, known as the PRDF1-RIZ (PR) homology domain, with a potential methyltransferase activity, followed by a variable number of zinc finger motifs, which theoretically mediate protein-protein, protein-RNA or protein-DNA interactions. Intriguingly, almost all PRDM family members show different isoforms, which are likely to play opposite roles in oncogenesis and are also differentially regulated. Remarkably, several studies have described alterations (both mutations and/or gene expression changes) of most the family members in solid tumors and/or hematological malignancies.

Here, to obtain a comprehensive pan-cancer picture of the genomic and transcriptomic alterations for the members of this family, we reanalyzed a large panel of human cancers taking advantage of public datasets available from The Cancer Genome Atlas (TCGA) portal through a computational pipeline based on UNIX shell and R language. Somatic mutations affecting PRDM genes and their transcription profiles have been investigated in more than ten thousand patients and 31 tumor types. Overall, PRDM3/MECOM, PRDM9, PRDM16 and ZFPM2/FOG2 were the most mutated genes with pan-cancer frequencies of protein affecting mutations higher than 1%. Moreover, we observed heterogeneity in the mutation frequencies of these genes in the different tumor types, with the most recurrently mutated cancer types also reaching a value of about 20% of mutated samples for a specific PRDM gene. Preliminary data also indicate that PRDM3/MECOM is a mutational cancer driver in both specific cancer types and in the pan-cancer analysis. Furthermore, transcriptome analysis from RNA-Seq data of paired (normal and tumor) samples revealed that the transcription of these genes is significantly altered in several malignancies. Among the others, PRDM13 was largely overexpressed in many cancers whereas PRDM16 and ZFPM2/FOG2 were often downregulated.

**P275**  
**Systematic analysis of tandem repeat loci: a comparison of target enrichment platforms for high-throughput sequencing**

E. Mangano<sup>1</sup>, M. Severgnini<sup>1</sup>, L. Corrado<sup>2</sup>, L.M. Genovese<sup>3</sup>, G. De Bellis<sup>1</sup>, G. Manzini<sup>3</sup>, F. Geraci<sup>3</sup>, R. D'Aurizio<sup>3</sup>, S. D'Alfonso<sup>2</sup>, R. Bordoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto di Tecnologie Biomediche, Consiglio Nazionale delle Ricerche (ITB-CNR), Segrate(MI)

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze della Salute, UPO, Novara

<sup>3</sup>Istituto di Informatica e Telematica, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IIT-CNR), Pisa

Repeated DNA sequences constitute about 50% of the human genome and approximately 3% is composed of tandem repeats, whose number of the repeated motifs varies from one individual to another, offering a source of genomic variability. Tandem Repeat Polymorphisms (TRPs) represent good candidates for missing heritability in different neurodegenerative diseases, for which an expansion of one or both alleles in TRPs regions represents the major disease cause. Until now, TR expansions have been identified mainly by means of classical genetic approaches, such as linkage analysis and Sanger's sequencing of single genes, but they have never been systematically analyzed at genome-wide level, even with Next Generation Sequencing (NGS) approaches, because of the inherent difficulty in analyzing repeated loci and their location outside the exonic regions usually targeted in sequencing experiments. Following a former study by Duitama and co-workers (Nucleic Acids Research, 2014, Vol.42, No.9 doi:10.1093/nar/gku212), we aimed to test the feasibility of a high-throughput sequencing approach on TRPs, comparing different target enrichment platforms (SureSelect XT by Agilent Technologies and SeqCap EZ by Roche NimbleGen) for the analysis of 10746 tandem repeat loci. Analytical performances of these platforms were evaluated on 8 DNA samples, on the basis of the specificity of the generated reads in mapping on the target regions, the depth of coverage obtained for each TR and the concordance of genotypes within already validated loci. This was possible thanks to the fact that one of the DNA samples was from an individual from CEPH collection, which was largely genotyped, for whom a total of 83 dinucleotide microsatellites (27 homozygous and 56 heterozygous) were contained within our target.

**P276**  
**Profilo metabolomico di una famiglia affetta da Osteogenesi imperfetta tipo VI**

M. Deiana<sup>1</sup>, C. Patuzzo<sup>1</sup>, A. Mori<sup>1</sup>, A. Gandini<sup>2</sup>, M.T. Valentini<sup>3</sup>, L.G. Dalle Carbonare<sup>3</sup>, F. Antoniazzi<sup>2</sup>, M. Mottes<sup>1</sup>, G. Malerba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sez. di Biologia e genetica, Dip. Neuroscienze, Biomedicina e Movimento

<sup>2</sup>Dip. Scienze Chirurgiche Odontostomatologiche e Materno-Infantili

<sup>3</sup>Dip. Medicina

L'osteogenesi imperfetta (OI) comprende un gruppo eterogeneo di malattie genetiche caratterizzate da aumento della fragilit scheletrica, diminuzione della massa ossea e suscettibilit alle fratture di gravit variabile. Al momento si distinguono 16 forme di OI, delle quali 6 hanno una trasmissibilit di tipo AD, mentre 10 AR. Recentemente abbiamo analizzato una famiglia composta dai 2 genitori e 5 figli, due dei quali affetti da Osteogenesi Imperfetta di tipo VI (AR). A livello fenotipico sono stati riscontrati tutti i tratti tipici di tale malattia, ma i test genetici per il gene candidato (SERPINF1) e per i candidati pio comuni non hanno evidenziato alcuna variante patogena. Ipotizzando che la causa di malattia potesse coinvolgere un gene diverso da SERPINF1 abbiamo genotipizzato gli individui utilizzando piattaforme di next generation sequencing per studiare l'intero esoma. Oltre allo studio genomico abbiamo inoltre studiato il metaboloma (HPLC-Orbitrap) in collaborazione con l' ICT di Praga. Le analisi preliminari hanno evidenziato 227 metaboliti modulati ( pvalue  $\leq$  0,05 ) tra il gruppo di 9 controlli ed i 7 individui della famiglia. Tali metaboliti sono stati confermati come modulati anche a seguito del confronto tra i fratelli sani ed i fratelli affetti. A quanto riportato in letteratura, alcuni di questi metaboliti (amminoacidi, la Lactosilceramide e l'acido Oleanolico) sono coinvolti in varie vie metaboliche che governano il normale equilibrio del differenziamento osteogenico. In conclusione lo studio preliminare del profilo metabolomico ci ha permesso di evidenziare una ricca lista di marcatori per la malattia, che analizzati assieme suggeriscono un loro coinvolgimento (diretto o indiretto) nel metabolismo osseo. Lo studio proceder cercando di combinare i dati prodotti da diverse omiche, quali la genomica, la metabolomica, il metilomica e la trascrittomica (in corso), per cercare di evidenziare e caratterizzare diversi meccanismi patogenetici coinvolti nella patologia studiata.



**P277**  
**Genetic susceptibility variants for lung cancer: replication study and assessment as expression quantitative trait loci**

G. Pintarelli<sup>1</sup>, C.E. Cotroneo<sup>1</sup>, M. Dugo<sup>2</sup>, L. Citterio<sup>3</sup>, M. Incarbone<sup>4</sup>, L. Santambrogio<sup>5</sup>, T.A. Dragani<sup>1</sup>, F. Colombo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetic Epidemiology and Pharmacogenomics Research Unit, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy.

<sup>2</sup>Functional Genomics and Bioinformatics Core Facility, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy.

<sup>3</sup>Genomics of Renal Diseases and Hypertension Unit, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy.

<sup>4</sup>Department of Surgery, Ospedale San Giuseppe, Milan, Italy.

<sup>5</sup>Department of Surgery, Fondazione IRCCS C. Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy.

Introduction Many single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been associated with lung cancer risk and/or prognosis. The confirmation and functional characterization of candidate SNPs from genome wide association studies (GWAS) is challenging. However, most of these SNPs map in non-coding regions and, therefore, might have a regulatory function, exerting their effects by modulating the expression of both near and distant genes which might be involved in the process of tumorigenesis. Aim: We aimed to replicate the association with lung cancer risk and survival of 56 candidate SNPs in Italian lung adenocarcinoma patients, and looked for their possible involvement in the modulation of gene expression. Materials and Methods 823 patients and 779 healthy controls were genotyped for the 56 SNPs using the TaqMan<sup>®</sup> OpenArray<sup>®</sup> Genotyping System. SNPs function as expression quantitative trait loci (eQTLs) was assessed by combining genotype data with normal lung transcriptome data (HumanHT-12 v4 Expression BeadChip microarrays) of the same patients with MatrixEQTL R package. We experimentally tested the eQTL results by searching for differential allelic expression (DAE) of the target genes of the eQTL SNPs. Results In the replication study, eight SNPs (rs401681, rs3019885, rs732765, rs2568494, rs16969968, rs6495309, rs11634351, and rs4105144) associated with lung adenocarcinoma risk and three (rs9557635, rs4105144, and rs735482) associated with survival. Five of these SNPs acted as cis-eQTLs, being associated with the transcription of IREB2 (rs2568494, rs16969968, rs6495309, and rs11634351), PSMA4 (rs6495309) and ERCC1 (rs735482), out of 10,821 genes analyzed in lung. For these three genes, we obtained experimental evidence of DAE in lung tissue, pointing to the existence of in-cis genomic variants that regulate their transcription. Conclusion Our study highlights the relevance of deepening the function of the many loci found associated with human complex traits by GWAS, and points to the role of some of these loci as eQTLs. Our results support the hypothesis that some polymorphisms associated with lung cancer risk or prognosis influence tumor development and progression through the modulation of expression levels of target genes in the normal lung tissue.





P278  
**White Sponge Nevus hereditary disease could be associated to a dose-dependent manner of KRT4 and KRT13 pathogenic mutations**

C. Lajolo<sup>1</sup>, C. Grippaudo<sup>1</sup>, A. Re<sup>2</sup>, E. Stigliano<sup>3</sup>, M. Cordaro<sup>1</sup>, C. Cafiero<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Clinica Odontoiatrica, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli Universit Cattolica del Sacro Cuore, Roma

<sup>2</sup>Lab. Genetica Medica Alessandria Artemisia, Roma

<sup>3</sup>Istituto di Anatomia Patologica, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli Universit Cattolica del Sacro Cuore, Roma

**INTRODUCTION:** White Sponge Nevus (WSN) is considered an autosomal dominant hereditary benign disease associated with mutation in genes coding for cytokeratin 4 (KRT4) and 13 (KRT13). It is characterized by white, thickened, folded and spongy lesions of the oral mucosa, although the esophageal, laryngeal, nasal and anogenital mucosa might also be affected. The aim of our work is to demonstrate that WSN disease phenotype is associated to a pathogenic mutation burden cut-off point of Keratin genes type 4 (KRT4) and 13 (KRT13). **MATERIALS AND METHODS:** Four patients were referred to our Clinic of Universit Cattolica del Sacro Cuore (Rome) for the diagnosis of white asymptomatic diffuse oral lesions. A saliva sample was collected by use of buccal swabs. Extraction and purification of DNA was carried using the automatic machine MagCore Nucleic Acid Extractor. We amplified and sequenced all coding sequence. Primer sets were designed to delineate splice junctions and included a minimum of 50 bases of intron sequence in addition to the exon sequence. Sequencing analysis of KRT4 a KRT13 gene was performed to characterize the presence of genetic defect through Sanger Method (automatic sequencer AB 3500 Genetic Analyzer). **RESULTS:** Sequencing analysis in our patients shown at least 4 rare variations between KRT4 and KRT13 genes. These variations were set out in Gene Database and annotated as related to Leukokeratosis, Hereditary Mucosal and White Sponge Nevus phenotype. Parents of these patients are healthier but have 50% of mutation carried to their sons affected to WSN. **CONCLUSIONS:** The genetic disease WSN occurs infrequently. Experts have struggled to grasp factors contributing to its clinical symptoms, gene mutations and treatment. However, the mechanism behind the disease is still unclear. Our results suggest that the development and the severity of the phenotype of this disease may be associated to a dose-dependent manner of KRT4 and KRT13 pathogenic mutations.

P279  
**New biological pathways for major depression: gene expression decomposition in GxE components**

C. Sacco<sup>1</sup>, E. Giacopuzzi<sup>1</sup>, M. Gennarelli<sup>1</sup>, C. Magri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sez. Biologia e Genetica, Dip. Medicina Molecolare e Traslaazionale, Universit degli Studi di Brescia, Brescia

Major Depressive Disorder (MDD) is a common complex disabling psychiatric condition among the top five leading causes of disability throughout the world. Low heritability and high heterogeneity made the identification of genetic risk variants a challenging task. The aim of this study was to investigate genetically regulated gene expression in MDD, exploring how genetic and environmental factors (GxE) contribute to the disease. Our study exploits an innovative approach that involves the decomposition of gene expression levels in their two major components: an expression component regulated uniquely by genetic polymorphisms (GReX) and a component influenced by environmental factors (N-Gre). In this regard, we reanalyzed genotype and blood expression data of the Levinson s dataset (NIMH Study 88), that includes 463 MDD patients and 459 controls of European-ancestry. PrediXcan was used to estimate GReX in blood and in ten brain regions. N-Gre was computed in blood from the residuals of a linear regression model that correlates the observed gene expression levels with the predicted GReX levels. After dissection of the blood gene expression levels in the GReX and N-GRe component, we noted that the major contribution to the gene expression differences observed in the original study among MDD and controls was due to the N-GRe component.

Gene-set enrichment analysis of the top hit DEGs emerged from analysis of the GreX component revealed a significant enrichment: 1) of genes involved in energy metabolism pathways, in blood; 2) of genes of the GO Cellular Component cilium, in the nucleus accumbens. These results suggest that polymorphisms in genes involved in the energy pathways as well in cilium components could be risk factors for MDD through a tissue specific modulation of gene expression.

In conclusion, the dissection of genetic expression levels in a GReX and N-GRe component could be a useful strategy to identify masked biological pathways that could be involved in the etiopathogenesis of MDD.

P280  
**Calcolo della frequenza del portatore di Fibrosi Cistica nel Veneto**

S. Egiziano<sup>1</sup>, L. Picci<sup>2</sup>, S. Boni<sup>3</sup>, V. Businaro<sup>4</sup>, L. Cardarelli<sup>4,5</sup>, M. Dalle Carbonare<sup>6</sup>, I. De Lazzari<sup>7</sup>, M. Favaro<sup>1</sup>, N. Guercini<sup>8</sup>, U. Hladnik<sup>9</sup>, C. Lapucci<sup>10</sup>, A. Leon<sup>6</sup>, E. Lippi<sup>4</sup>, B. Mancini<sup>8</sup>, R. Marchetti<sup>11</sup>, A. Montaldi<sup>8</sup>, G. Piccolini<sup>3</sup>, A. Veronesi<sup>7</sup>, E. Casati<sup>12</sup>, C. Castellani<sup>12</sup>

<sup>1</sup>AULSS 3 Serenissima, Osp. SS Giovanni e Paolo, Venezia

<sup>2</sup>Clinica Pediatrica, Azienda Ospedaliera di Padova, Padova

<sup>3</sup>AULSS 1 Dolomiti, Osp. San Martino, Belluno

<sup>4</sup>RDI - Rete Diagnostica Italiana S.r.l. - Gruppo Lifebrain, Padova

<sup>5</sup>Citotest S.r.l., Padova

<sup>6</sup>R&I - Research and Innovation S.p.A., Padova

<sup>7</sup>AULSS 6 Euganea, Centro Trasfusionale Camposampiero, Padova

<sup>8</sup>AULSS 8 Berica, Ospedale Civile San Bortolo, Vicenza

<sup>9</sup>Foundation B.I.R.D. Europe Onlus, Costozza di Longare, Vicenza

<sup>10</sup>Synlab Italia S.r.l., Monza

<sup>11</sup>Laboratori Clodia Diagnostics & Services S.r.l. Chioggia, Venezia

<sup>12</sup>Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Integrata, Verona

**Premessa:** Conoscere la frequenza del portatore di Fibrosi Cistica (FC) è indispensabile sia per il calcolo del rischio residuo nei negativi al carrier test che per valutazioni di HTA sullo screening di popolazione. L'incidenza della malattia varia in funzione dell'area geografica e la possibilità di sottostima per scarsa attenzione diagnostica o di sovrastima per inclusione di forme come le CFTR-related disorders rende imprecisa la stima della frequenza del portatore. L'attuale diffusione del test del portatore di FC nella popolazione generale consente un calcolo diretto. Tuttavia la variabilità dei pannelli mutazionali, che da un lato non includono tutte le mutazioni causanti malattia e dall'altro possono comprendere varianti a penetranza incompleta, limitano l'affidabilità di questo approccio analitico.

**Scopo dello studio:** In questo lavoro viene proposto un metodo di calcolo misto, che tenga conto sia dei dati ricavati dalla popolazione degli affetti che da quella generale. Per ovviare alla variabilità dei kit commerciali abbiamo preso in considerazione la mutazione causativa più frequente, F508del (c.1521\_1523delCTT).

**Risultati e conclusioni:** Su un campione di 57.999 veneti senza familiarità per FC gli eterozigoti F508del sono risultati 908, con una frequenza di 1/63 (J Cyst Fibros 2010;9:29-35). Nel corso di una osservazione più prolungata, dal 1995 al 2015, dell'offerta del test del portatore, sono risultati 3.289 eterozigoti F508del su 192.389 testati con una frequenza di 1/58,5, verosimilmente sovrastimata per l'inclusione di una quota di familiari di affetti o di eterozigoti precedentemente identificati (dati non ancora pubblicati). L'analisi di 552 alleli della popolazione veneta affetta da FC (Ann Hum Genet 1997;61:411-424) ha mostrato che F508del contribuisce per il 45% al pool allelico. Integrando i dati sulla frequenza di F508del nella popolazione veneta affetta e generale (1/63 x 100/45 e 1/58,5 x 100/45) risulta una frequenza del portatore di circa 1/27 - 1/28, inferiore all'1/25 abitualmente utilizzato. Poiché F508del presenta una distribuzione geografica variabile, il valore ottenuto non ha validità nazionale ma andrebbe stimato per singola regione o macroarea.

Supportato da grant Fondazione Fibrosi Cistica 26/2015



P281  
**Automatic ACMG variant classification supporting genetic diagnosis in exome sequencing NGS data: eVAI clinical validation**

S. Zucca<sup>1</sup>, I. Limongelli<sup>2</sup>, M. Valente<sup>1</sup>, A. Asaro<sup>1</sup>, J. Garau<sup>1</sup>, R. Bellazzi<sup>3</sup>, C. Ceredà<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genomic and post-Genomic Center, National Neurological Institute C. Mondino, IRCCS, Pavia, Italy.

<sup>2</sup>enGenome srl, Pavia, Italy

<sup>3</sup>Dep. of Electrical, Computer and Biomedical Engineering, University of Pavia, Pavia, Italy

**Introduction**

Genetic testing diffusion has been accompanied by new challenges in sequence interpretation. The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) provided rule-based guidelines for sequence variants interpretation. A new tool was proposed to automatically classify genomic variants according to ACMG categories (Pathogenic, Likely Pathogenic, Benign, Likely Benign, Uncertain Significance): eVAI v0.2 (enGenome srl, Pavia).

**Aim**

We tested eVAI performances on 3 patients affected by complex neurological phenotypes (E1, E2 and E3), collected from Mondino Foundation.

**Materials and methods**

Samples were processed by SureSelect Focused Exome (Agilent), targeting more than 6000 genes, on Illumina MiniSeq sequencer. Bioinformatic analysis was performed by Agilent SureCall v3.5.1.46. VCF files were exported and processed by eVAI through the enGenome web platform (pmp.engenome.com).

**Results**

For E1 sample, 2163 rare variants (MAF<5%) were detected. Five variants were reported as likely pathogenic; one of them (SCN8A gene, p.Asn1877Ser) was associated to Early infantile epileptic encephalopathy. Manual trigger of segregation rules, after extending genetic testing to parents, allowed classifying this variant as pathogenic. In E2 patient, affected by Amyotrophic Lateral Sclerosis, only one pathogenic and five likely pathogenic variants out of 3443 rare variants were reported, although associated phenotypes did not correspond to patient diagnosis. An already reported pathogenic mutation was detected, affecting POLG gene (p.Arg386Cys). This mutation is classified as uncertain significance by eVAI. Finally, E3, an epileptic patient, had 1916 rare variants. Two likely pathogenic mutations were detected; one (ADSL gene, p.Arg426His) was the causative mutation.

**Conclusions**

Variant interpretation is a complex and time-consuming process to identify disease-causing mutations. New tools for the support of variant classifications are required to speed this analysis and reduce error rate due to data manipulation. eVAI provided fast, reliable and accurate variant classification according to ACMG guidelines and supported genetic diagnosis for complex neurological phenotypes.





**P282**  
**Quality evaluation of SureSelectQXT Agilent Focused Exome kit on two bench-top sequencers**

M. Valente<sup>1</sup>, S. Zucca<sup>1</sup>, A. Asaro<sup>1</sup>, J. Garau<sup>1</sup>, M. Giannini<sup>1,2</sup>, S. Gagliardi<sup>1</sup>, C. Cereda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genomic and post-Genomic Center, National Neurological Institute C. Mondino, IRCCS, Pavia, Italy

<sup>2</sup>Department of Brain and Behavioral Sciences, University of Pavia, Pavia, Italy.

**Introduction.**

NGS applications for DNA sequencing range from small gene panels to genome (in terms of sequencing system and bioinformatics infrastructure) increases with the expected throughput. Different solutions for the analysis of thousands of disorder-related genes were proposed, with deep-coverage performances even on bench-top sequencers, and not demanding high performance computing resources for data analysis.

**Aim.**

Our aim is to compare quality performances of a focused exome panel on two different bench-top sequencers in order to establish a standard sequencing procedure suitable for diagnosis.

**Materials and methods.**

32 DNA samples from patients affected by various neurological disorders were collected and prepared by SureSelectQXT Focused Exome kit (Agilent). 20 were sequenced with Illumina MiniSeq while 12 were run by MiSeq using respectively MiniSeq High Output Reagent Kit and MiSeq Reagent Kit v2 (300-cycles), with expected throughput of 25 and 15 million reads per run, respectively. All 32 samples were processed in parallel according to manufacturer protocol, with the exception that barcoding and indexing steps was in-house set-up to fit MiniSeq chemistry. Bioinformatic analysis has been executed using the Agilent SureCall software and quality reports were generated.

**Results**

Both instruments allowed NGS sequencing with average coverage above 40x. MiniSeq outperformed MiSeq, in terms of number of reads per sample (10.3M – 2.1M for MiSeq, 28.4M – 7.2M for MiniSeq, p-value<1e-9) and of high-quality aligned reads per sample (9.4M – 1.8M for MiSeq, 24.5M – 5.4M for MiniSeq, p-value<1e-10). A 2.5-fold higher average coverage was observed for MiniSeq (47.5 – 9.1 vs 119.65 – 9.4, p-value<1e-8), although a 1.67-fold variation was expected, based on flow-cell expected outputs. The percentage of target regions sequenced with a read-depth above 20x shows a 1.3-fold increase in MiniSeq (68.9% – 5.2% for MiSeq, 90.7% +/- 5.3% for MiniSeq, p-value<1e-7), diminishing the dimension of poorly covered regions to be sequenced with complementary techniques.

**Conclusions**

These data suggest that Illumina MiniSeq sequencer is the best candidate for Focused Exome NGS application, assessing quality standards suitable for diagnostic applications.

**P283**  
**QUAGENS: a tool for QUALity Assessment of GENetic Studies of in systematic reviews. A proposal**

A. DE SILVESTRI<sup>1</sup>, C. CAPITTINI<sup>1</sup>, C. REBUFFI<sup>1</sup>, C. TINELLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servizio di Epidemiologia clinica e Statistica Medica, Direzione Scientifica, IRCCS Pol. San Matteo, Pavia

**BACKGROUND.** The HuGENet HuGE Review Handbook is a guideline for conducting systematic reviews (SR) in genetic association studies; it includes a chapter on assessing and addressing potential biases. However, no specific formal tool to assess quality of studies is available to date. **AIM.** Our aim was to develop and propose a checklist for quality assessment of genetic studies, to be used by different stakeholders involved in SRs in genetics. **METHODS.** A multidisciplinary panel (statistician, clinical epidemiologist, geneticists, clinicians, meta-analysts, librarians) adopted formal consensus methods with the following steps: 1) preliminary conceptual decisions (focus group); 2) item generation taking into account existing guidelines in similar field (e.g. QUADAS) and guidelines for reporting genetic studies (STREGA) (review of the relevant methodological literature); 3) assessment of face validity (Delphi rounds); 4) pilot trial (application to an ongoing systematic review); 5) field trials to assess consistency and construct validity (planned); 6) the generation of the refined instrument (planned). 'Quality' was defined to include both the internal and external validity of a study. **RESULTS.** We adopted the following principles for checklist development: quality assessment to be used in systematic reviews of genetic association studies, assessing the methodological quality of a study in generic terms (relevant to all studies), allow consistent and reliable assessment of quality by raters with different backgrounds, be relatively short and simple to complete. From an initial 63 potential items, we selected 39 items, in three domains (geneticist n=11, clinicians n=14, statistician n=14). **CONCLUSION.** We are currently performing a systematic review on association between coeliac disease and HLA-class II alleles. Our work will assess item consistency, construct validity, and feasibility (including time needed to complete). Our tool will help in standardizing procedures in SRs in this field.



**P284**  
**In silico analysis of CFTR pathogenic variants through the use of the genome Aggregation Database (gnomAD): insights into carrier frequency and ethnic variant distribution in non-Caucasian populations.**

S. Nappo<sup>1</sup>, C. Ronci<sup>2</sup>, L. Mannucci<sup>2</sup>, F. Sangiulio<sup>1,2</sup>, G. Novelli<sup>1,2</sup>, A. Botta<sup>1,2</sup>, M.R. D'Apice<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biomedicina e Prevenzione, Università degli Studi di Roma Tor Vergata

<sup>2</sup>Lab. di Genetica Medica, Policlinico "Tor Vergata"

In European populations, carrier screening for Cystic Fibrosis (CF) disease-causing mutations in CFTR gene can be easily achieved by testing for the few mutations represented in commercially panels, based on the 25 mutations panel designed by the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). They show a limited sensibility to exclude the carrier status of individuals from Asian and African populations where the disease incidence, CFTR alleles and carrier frequencies are unknown. On the other hand, full gene sequencing is certainly associated with high identification rates of mutation regardless of patient ethnicity, although the likelihood of detecting variants of uncertain clinical significance (VUS) is increased. Recent publications of large population sequencing data in Genome Aggregation Database (gnomAD) provide an opportunity to study the frequency and distribution of CFTR variants in non-Caucasian populations. In particular, we studied the frequency of pathogenic or likely pathogenic variants, according to the classification of ClinVar database, in Asian and African populations. Within the 2489 CFTR variants (1398 in the coding regions) we selected 165 likely pathogenic/pathogenic variants. Consistent with the low CF disease incidence, only 9 variants were observed in East-Asian population, more than half of them are population-specific. A greater number of variants were, instead, identified in Sud-Asian and African populations (30 and 48 respectively), with the p.Phe508del mutation as almost the most frequent and with an important number of population-specific variants. Some of these pathogenic variants were well characterized in recent publications. Most of them, in particular the population-specific variants, are not detected by the commercially screening panels. A carrier frequency of 1/64, 1/47 and 1/85 was observed in East-Asian, Sud-Asian and African populations, respectively. Overall, this study highlights the necessity to reevaluate the profile of CFTR mutations at a global population level in order to design CFTR mutation panels for carrier screening and patient characterization in non-Caucasian-populations.

**P285**  
**Interpreting non-coding genetic variation in multiple sclerosis GWAS loci**

E.M. Paraboschi<sup>1</sup>, G. Cardamone<sup>1</sup>, G. Sold<sup>1,2</sup>, S. Duga<sup>1,2</sup>, R. Asselta<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Sciences, Humanitas University, Pieve Emanuele (MI), Italy

<sup>2</sup>Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano (MI), Italy

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system, characterized by demyelination and progressive neurological impairment. Genome-wide association studies (GWAS) identified several common variants contributing to disease pathogenesis, however the focus has always been on protein-coding genes, due to the difficulty of interpreting non-coding features. Recently, non-coding RNAs (ncRNAs) have emerged as important players in many cellular mechanisms and in the pathogenesis of several diseases. Moreover, super-enhancers (SEs) have been described as key gene regulators, and SE loci were demonstrated to be enriched in disease-associated SNPs, including those related to autoimmunity. In this work, we aimed at identifying ncRNAs and SEs mapping in proximity of genome-wide significant MS SNPs that could underlie so far unexplored mechanisms involved in the susceptibility to the disease. The global linkage disequilibrium (LD) structure of the Italian population was assessed using genotype data of ~1700 individuals. The top 97 MS-associated SNPs were retrieved from the literature. We counted the annotated ncRNAs (long ncRNAs, lncRNAs; microRNAs, miRNAs; and circular RNAs, circRNAs) and SEs overlapping the LD blocks containing the GWA SNPs. To test for a significant enrichment of these functional elements, a bootstrapping strategy was adopted, using randomly extracted SNP-sets and repeating the workflow 1000 times. The specificity of the analysis was tested by applying the pipeline to a disease with a different etiology, i.e. coronary artery disease (CAD). The analysis evidenced 30 lncRNAs, 7 miRNAs, 639 circRNAs, and 23 SEs overlapping the MS-associated LD blocks. Interestingly, a very strong enrichment in circRNAs was observed, with the same results obtained only in the 0.1% of the bootstrapping iterations. Moreover, none of the random sets evidenced the same or a larger number of SEs compared to the MS list, thus confirming the data previously reported in the literature. No enrichment in circRNAs and SEs was instead evidenced in the CAD dataset. In conclusion, our analysis suggests the importance to investigate circRNAs as candidate functional elements in MS pathogenesis.







**P286**  
**L'eredità genetica di Homo neanderthalensis in Italia ed in Europa**

S. Anelli<sup>1,2</sup>, F. Montinaro<sup>3</sup>, A. Raveane<sup>4</sup>, H. Lancioni<sup>5</sup>, A. Mulas<sup>6</sup>, V. Grugni<sup>7</sup>, I. Cardinali<sup>8</sup>, M. Zoledziewska<sup>9</sup>, F. Brisighelli<sup>7</sup>, C. Di Gaetano<sup>1,2</sup>, S. Guarrera<sup>2,1</sup>, A. Piazza<sup>1,2</sup>, V. Pascali<sup>7</sup>, M. Peyret-Guzzon<sup>8</sup>, F. Cucca<sup>9</sup>, A. Angius<sup>9</sup>, A. Torroni<sup>4</sup>, O. Semino<sup>4</sup>, A. Achilli<sup>4</sup>, A. Olivieri<sup>4</sup>, G. Matullo<sup>1,2</sup>, C. Capelli<sup>1</sup>

- <sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino, Torino
- <sup>2</sup>IGM Italian Institute for Genomic Medicine (former HuGeF), Torino
- <sup>3</sup>Dipartimento di Zoologia, Università di Oxford, Oxford, UK
- <sup>4</sup>Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani", Università di Pavia, Pavia
- <sup>5</sup>Dipartimento di Chimica, Biologia e Biotecnologie, Università di Perugia, Perugia
- <sup>6</sup>Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB), CNR, Lanusei
- <sup>7</sup>Istituto di Medicina Legale e delle Assicurazioni, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
- <sup>8</sup>Wellcome Trust for Human Genetics, Università di Oxford, Oxford, UK
- <sup>9</sup>Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB), CNR, Monserrato

La possibile ibridazione tra Homo neanderthalensis e Homo sapiens è stata argomento di dibattito per lungo tempo. Solo recentemente il sequenziamento del DNA ricavato da reperti fossili neanderthaliani ha permesso di confermare come il genoma delle popolazioni umane moderne non africane conservi sequenze di DNA ereditate dai Neanderthal come conseguenza di eventi di mescolamento. Sebbene sia noto che il livello di introgressione sia differente tra Europa ed Asia, le possibili variazioni intra continentali sono state esplorate solo in parte.

Per poter caratterizzare la distribuzione degli alleli neanderthaliani in Europa abbiamo selezionato 7.164 tag-SNPs di regioni introgresse provenienti da Homo neanderthalensis in un campione di 455 individui italiani e 550 tra europei, africani ed asiatici. Tale analisi ha rivelato l'esistenza di un cline sia all'interno dell'Europa che nella popolazione italiana con andamento decrescente da nord verso sud. Lo studio delle frequenze alleliche tra coppie di popolazioni ha permesso l'individuazione di numerose varianti di origine neanderthaliana caratterizzate da un'elevata differenza di frequenza tra popolazioni europee, suggerendo l'esistenza di diversi pattern demografici e pressioni selettive nel continente. L'analisi del significato biologico ed evolutivo di tali varianti ha evidenziato come molte di queste siano localizzate all'interno di geni associati allo sviluppo di alcune patologie complesse, quali disordini neurodegenerativi e metabolici, nonché patologie cardiovascolari e la risposta individuale ai farmaci.

L'introgressione nell'uomo moderno di regioni genomiche neanderthaliane è stata ed è tuttora un'importante fonte di variabilità adattativa al nuovo ambiente non-africano. Tuttavia, le nostre analisi dimostrano che l'uomo moderno ha ereditato anche alcune varianti che oggi, dato il cambiamento nello stile e nell'aspettativa di vita, possono influenzare la suscettibilità alle malattie complesse.

In conclusione, l'analisi combinata del livello di admixture con Homo neanderthalensis nelle popolazioni umane e del significato biologico di tali sequenze sono un presupposto necessario per comprendere meglio la diversità genomica e fenotipica dell'uomo moderno.

**P287**  
**Genomic aberrations in Acute Myeloid Leukemia with Normal Karyotype**

C. Pessina<sup>1</sup>, P. Granata<sup>1</sup>, A. Bussini<sup>2,1</sup>, E. Meroni<sup>1</sup>, L. Elli<sup>1</sup>, F. Passamonti<sup>2,1</sup>, R. Casalone<sup>1</sup>

- <sup>1</sup>SSD Lab. Analisi, SMEL Citogenetica e Genetica Medica ASST Sette Laghi, Osp. di Circolo e Fond. Macchi, Varese
- <sup>2</sup>Università degli Studi dell'Insubria, Dip. Medicina Clinica e Sperimentale, Varese
- <sup>3</sup>Università degli Studi dell'Insubria, Dip. Biotecnologie e Scienze della Vita, Varese
- <sup>4</sup>SSD ORL Servizio di Audiostimolazione, ASST Sette Laghi, Osp. di Circolo e Fond. Macchi, Varese

Acute myeloid leukemia (AML) is a highly heterogeneous disorder characterized by clonal and malignant proliferation of primitive haematopoietic stem cells or myeloid progenitors in the bone marrow and peripheral blood. AML patients can be stratified into risk groups based on non-random cytogenetic abnormalities and genetic mutations, becoming an important prognostic factor for predicting remission, relapse, and overall survival. In addition to large chromosomal rearrangements, cryptic genetic changes and molecular changes have also been implicated in the development of AML. Cytogenetically normal AML (NK-AML) accounts for about one-half of total and are highly prognostically various, generally classified as intermediate risk. We performed a retrospective study by CGH-SNP array with 60K Hematological platform on 22 samples of primary NK-AML at the onset of the disease. QFQ-banding cytogenetic analysis was carried out on at least 20 non-stimulated bone marrow metaphases in each case. CGH array was applied to genomic DNA from bone marrow mononuclear cells and blasts. These patients were also tested for molecular mutations in NPM1 and FLT3 genes. In 50% of cases (11 out of 22), CGH array has detected genomic aberrations: 2 out of 22 patients showed CNVs and Genic Mutations; 3 out of 22 showed CNVs; 2 out of 22 showed LOH; 3 out of 22 showed CNVs and LOH; 1 out of 22 showed CNVs, LOH and genic mutation. The most relevant CNVs detected involve aneuploidy or entire chromosome-arm imbalances such as +1q, -5q, -7, +8, +10 and LOH on chromosome 2p and 11q. In the remaining 11 cases, CGH-array analysis has revealed a normal genetic setting without submicroscopic aberrations. 7 out of 11 have presented genic mutations; 4 out of 11 were normal also for molecular tests requested. This study demonstrates the utility of CGH array analysis in detecting non-replicating or cryptic clones and thus cryptic CNVs: the ability to identify molecular cytogenetics changes in the genomes of patients with NK-AML will deepen our understanding of the genetics underlying AML and lead to more specific therapies as well as improved patient classification schemes.

**P288**  
**Sindrome da microdelezione 10p15.3: descrizione di un nuovo caso**

M.R. Sansò<sup>1</sup>, A. Fratoni<sup>2</sup>, M. Ferrari<sup>3</sup>, B.M. Pirola<sup>3</sup>, M.H.N. Contri<sup>4</sup>, F. Teutonico<sup>4</sup>, F. Brustia<sup>4</sup>, F. Raviglione<sup>4</sup>, F. Di Nuovo<sup>1</sup>

- <sup>1</sup>U.O. Anatomia e Citogenetica, ASST Rhodense, Garbagnate Milanese
- <sup>2</sup>U.O. Pediatria, ASST Rhodense, Rho
- <sup>3</sup>Laboratorio di Biologia Molecolare Clinica e Citogenetica, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano
- <sup>4</sup>U.O. Neuropsichiatria Infantile, ASST Rhodense, Rho

La sindrome da microdelezione 10p15.3 è causata da un raro riarrangiamento genomico. A tutt'oggi sono stati descritti solo 23 casi. Il quadro clinico è eterogeneo ed è caratterizzato da deficit cognitivo, ritardo globale dello sviluppo, disturbo del linguaggio espressivo, ipotesia, anomalie cerebrali, ipotonia e dismorfismi craniofacciali. Riportiamo il caso di una ragazza di 17 anni, nata da genitori sani e non consanguinei. La probanda presenta tratti peculiari del volto quali ipertelorismo, radice nasale a sella, accenno di epicanto e strabismo. Inoltre si segnalano distrofia ungueale, ritardo mentale di livello medio ed epilessia focale genetica, con presenza di crisi focali motorie farmaco sensibili. La RMN encefalo risulta nella norma. L'EEG mostra anomalie focali a punta difasica asincrona a maggior espressione in sede temporale bilaterale. L'analisi Array CGH (CytoSure Oligo array ISCA 180k OGT, hg19) ha evidenziato una microdelezione de novo in 10p15.3 di circa 176 kb (chr10: 225934\_402217) e una microduplicazione di origine paterna di circa 700 kb in 1p31.1 (chr1: 76703453\_77403813) a non chiaro significato patogenetico (variante privata ereditata). La regione deleta coinvolge due geni OMIM: ZMYND11 (OMIM608668) e DIP2C (OMIM611380). ZMYND11 (zinc finger MYND domain-containing protein 11) funziona come repressore trascrizionale e svolge un ruolo inibitorio nei processi di differenziazione muscolare e neuronale. DIP2C (membro della disco-interacting protein homology 2 family) svolge una funzione ad oggi non nota. L'aploinsufficienza di ZMYND11 e/o di DIP2C è verosimilmente causativa del fenotipo nei pazienti con sindrome da microdelezione 10p15.3. Mutazioni de novo di ZMYND11 in pazienti con disturbi dello spettro autistico candidano questo gene come principale determinante del fenotipo neurologico della sindrome da microdelezione 10p15.3. Il riarrangiamento genomico da noi evidenziato si colloca tra i casi con dimensioni minori finora descritti in letteratura (che variano da 0.15 Mb a 4 Mb) e consente di definire ulteriormente la correlazione genotipo-fenotipo di questa rara sindrome.



**P289**  
**De Novo atypical Chromosome Translocation 46,XY,t(4;13)(q12;p12) in prenatal diagnosis**

M. Chetta<sup>1</sup>, L. Di Matteo<sup>1</sup>, M. Russo<sup>3</sup>, E. Sodano<sup>1</sup>, M. Festa<sup>1</sup>, G. De Feo<sup>1</sup>

- <sup>1</sup>Department of genetic and Genomic, Medicina Futura, Acerra, Italy
- <sup>2</sup>University of Salerno, Salerno, Italy
- <sup>3</sup>Department of cytogenetics Medicina Futura, Napoli, Italy

Background: Apparently balanced reciprocal translocations are a common type of chromosome rearrangements with an estimate incidence range from about 1 in 500 to 1 in 625 human newborns. Rearrangements were found both in clinically unaffected individuals and patients with phenotypic abnormalities. Most are inherited, but approximately one in five are de novo events and introduce a risk of abnormal phenotype in 6.1% of prenatal genetic counseling. Methods: In the present case, we reported the analysis results of prenatal diagnosis using Gbanded karyotype, nuclear organizer regions staining and CGH array. Initial chromosome analysis of amniotic fluid samples was performed by standard Gbanding. The karyotype analysis was extended on both parents culturing peripheral blood in order to elucidate the chromosome rearrangements in question. Results: The cytogenetic study revealed an atypical translocation 46,XY,t(4;13)(q12;p12) with a peculiar length of satellite stalks of chromosome 13. This unusual was highlighted using Ag/NOR staining. After informed consent analysis was extended to the parents. Parental origins of the translocation was excluded by the cytogenetic analysis on both parents defining this to be a de novo rearrangement. Finally using array CGH was confirmed the absence of genetic material lack in proband and the nonappearance alterations in parents corroborating the evidence of de novo balanced translocation. Conclusion: Although balanced translocations are usually associated with normal phenotypes, abnormalities are attributed to an imbalance of dosage sensitive genes that change spatial location and carriers increased risk of reproductive failure. Our results should be interpreted with caution and required a careful follow up.





**P290**  
**Validazione retrospettiva ed esperienza clinica prospettica del cfDNA test DANSR basato su analisi microarray**

F. Maggi<sup>1</sup>, B. Malvestiti<sup>1</sup>, L. Marcato<sup>1</sup>, S. Crippa<sup>1</sup>, E. Gaetani<sup>1</sup>, L. Martinoni<sup>1</sup>, V. Quaranta<sup>1</sup>, B. Grimi<sup>1</sup>, G. Simoni<sup>1</sup>, F.R. Grati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica, Citogenetica e Ricerca e sviluppo, TOMA, Advanced Biomedical Assays S.p.A., Busto Arsizio, Varese, Italia

Premessa: Nel 2011-2012 i test su DNA libero circolante nel plasma materno (cfDNA) sono stati introdotti in 5 laboratori negli Stati Uniti e Cina. Più recentemente essi si sono diffusi rapidamente in tutto il mondo in laboratori decentralizzati. Le società scientifiche richiedono trasparenza sulle modalità di validazione di questi test nei laboratori locali. Scopo: Descrivere i risultati della validazione retrospettiva delle performance analitiche e della validazione prospettica delle performance cliniche dopo implementazione in un laboratorio locale di un cfDNA test basato su analisi microarray. Materiali e metodi: Le validazioni sono state eseguite seguendo le raccomandazioni dell'EurogenTest per l'introduzione di nuovi test molecolari in ambito clinico. Per la validazione retrospettiva sono stati raccolti 410 plasmi provenienti da gravidanze singole e gemellari comprendenti 380 campioni euploidi e 30 aneuploidi; per la validazione prospettica è stato eseguito un audit di 1 anno di attività su campioni clinici. Risultati: Validazione analitica retrospettiva: nessun caso euploide è risultato falsamente positivo e un caso di T13 è risultato falsamente negativo. Le performance analitiche nel nostro laboratorio sono risultate >99.9% (ad eccezione della sensibilità per T13 risultata del 66.7%), in accordo con le performance del laboratorio fonte. La concordanza del sesso fetale è del 100%. La frazione fetale è risultata sovrapponibile nel 93.2% dei casi a quella misurata dal laboratorio fonte sullo stesso campione. Validazione clinica prospettica: FPR pari a <0.01% per T13 e 21, 0.03% per T18 e MX e 0.18% per le altre SCA. Ad oggi non è stato riportato alcun falso negativo per T13, 18, 21. Il tasso di fallimento del test dopo secondo prelievo è risultato <1%. Conclusioni: Con la moltiplicazione dei cfDNA test a livello locale, è diventata sempre più rilevante la trasparenza circa i metodi e le procedure di validazione dei test dopo tech transfer, anche quando le performance sono già state validate dal laboratorio fonte. I dati di questa validazione sottolineano come il tech transfer del microarray-based cfDNA test basato sul monitoraggio di una metrica di qualità di 172 CQI garantisca nel laboratorio locale le stesse performance del laboratorio fonte.

**P291**  
**Effetto additivo-sinergico di un doppio sbilanciamento genomico Del6q/Del18q sul fenotipo di una paziente sindromica**

M.C. Di Giacomo<sup>1</sup>, F.N. Riviello<sup>1</sup>, E. Ferri<sup>1</sup>, M.A. Antonucci<sup>1</sup>, G. Vita<sup>3</sup>, O. Palumbo<sup>4</sup>, M. Carella<sup>4</sup>, P. Palumbo<sup>4</sup>, M. Tagliente<sup>2</sup>, S. Manieri<sup>2</sup>, R. Abate<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Settore Citogenetica - SIC Anatomia Patologica - AOR Ospedale "San Carlo"-Potenza

<sup>2</sup>U.O.C. Pediatria - AOR Ospedale "San Carlo"

<sup>3</sup>SIC Anatomia Patologica - AOR Ospedale San Carlo di Potenza/ CROB di Rionero (PZ)

<sup>4</sup>U.O.C. Genetica Medica - IRCCS "Casa Sollievo della Sofferenza" - San Giovanni Rotondo (FG)

Ci sono pochi report in letteratura di pazienti con doppi riarrangiamenti genomici. Pochi anche i casi descritti con delezioni del braccio lungo del cromosoma 6 e del cromosoma 18 isolati. Szafranski et al, 2015 descrivono un fenotipo variabile per le delezioni del braccio lungo del cromosoma 6 che include ritardo di crescita, epilessia, disabilità intellettiva, dismorfismi, malformazioni degli arti superiori, anomalie neurologiche (ipotonie e disturbi del movimento), malformazioni cerebrali e cerebellari, anomalie cardiache. Anche le delezioni del braccio lungo del cromosoma 18 sono responsabili di fenotipi variabili, che dipendono come per la delezione del cromosoma 6, dai geni presenti e dalla grandezza della regione coinvolta. Tra i segni clinici rilevanti Feenstra et al, 2007 descrivono facies peculiare, microcefalia, anomalie auricolari, bassa statura, anomalie dei piedi, disabilità intellettiva e disturbi della mielinizzazione. Noi descriviamo il caso di una paziente di 3 anni che giunge alla nostra attenzione per ritardo psicomotorio, cardiopatia, dismorfismi cranio-facciali e disturbo del linguaggio. La paziente ha effettuato in epoca prenatale cariotipo su liquido amniotico e FISH per la ricerca della microdelezione 22q11.2q13, con risultato nella norma. L' esame cromosomico ad alta risoluzione su sangue periferico ha evidenziato una delezione parziale 6q, l'aCGH, effettuata per la caratterizzazione dei breakpoints, ha confermato la delezione 6q, di circa 13,9 Mb, a livello della regione 6q22.1q23.2 ed ha evidenziato un'ulteriore delezione di circa 950 Kb nella regione cromosomica 18q23. Entrambe le anomalie erano assenti nei genitori, suggerendone l'origine de novo. La rarità dei due riarrangiamenti evidenziati rende complesso il giudizio prognostico e la previsione del fenotipo, tuttavia per i due sbilanciamenti genomici è ipotizzabile un ruolo patogenetico. In particolare il fenotipo clinico della paziente sembra il risultato di entrambe le delezioni che vi contribuiscono in maniera additivo-sinergica.



**P292**  
**Alterazione delle regioni 1q21.3/1p32.3 nel Mieloma Multiplo : studio citogenetico molecolare di 38 pazienti**

M. Boni<sup>2,1</sup>, I. Giardini<sup>2,1</sup>, I. Dambruoso<sup>2,1</sup>, R. Zappatore<sup>2,1</sup>, B. Rocca<sup>2,1</sup>, A. Corso<sup>2</sup>, M. Caresana<sup>2,1</sup>, F. Pasi<sup>3</sup>, R. Nano<sup>3</sup>, P. Bernasconi<sup>2,1</sup>

<sup>1</sup>Lab. Diagnostica citogenetica e molecolare oncematologica

<sup>2</sup>UOC Ematologia, Fondazione Policlinico San Matteo IRCCS, Università di Pavia

<sup>3</sup>Dip. Biologia e Biotecnologie "L.Spallanzani" Università di Pavia

Il Mieloma Multiplo (MM) è una patologia ematologica eterogenea caratterizzata da una proliferazione clonale di Plasmacellule (PC) anormali infiltranti il Midollo Osseo e da alterazioni citogenetiche tra le quali solo la del(17p13) rappresenta ad oggi un fattore prognostico negativo indipendente, mentre la del 13q, la t(4;14) e la t(14;16) assumono un significato prognostico diverso a seconda delle caratteristiche cliniche del paziente. Le alterazioni del cromosoma 1 alla banda q21.3 e alla banda p32.3 sembrano invece avere un ruolo prognostico rilevante.

Basandoci su queste osservazioni abbiamo studiato l'incidenza delle alterazioni del cromosoma 1q21.3/1p32.3 in 38 pazienti affetti da MM e la significatività dell'associazione con altre alterazioni cromosomiche per valutarne la capacità di predire la progressione di malattia. Sono state analizzate con FISH interfascia le PC CD 138+ selezionate da sangue midollare intero utilizzando sonde molecolari specifiche per le regioni 1q21.3 / 1p32.3 CKS1B/CDKN2C, la traslocazione t(4;14) e la delezione (17)(p13). I valori di cut-off sono stati definiti secondo le indicazioni di Avet-Loiseau.

La FISH ha identificato un cariotipo anomalo nel 78% (30/38) dei pazienti studiati, il cromosoma 1 è risultato alterato nel 45% (14/30) dei casi con gain 1q21 nel 70% (10/14) e delezione 1p32 nel 30% (4/14) dei casi; due casi hanno mostrato il coinvolgimento di entrambe le regioni indagate. Abbiamo osservato l'associazione tra gain 1q21/ del 1p32 e del(17p13) in 6/14 casi, e con delezione del gene MAF19/9/14 campioni. In 6/14 pazienti è stato possibile condurre uno studio retrospettivo che ha mostrato in un caso la comparsa di gain 1q durante il follow up a partire da un cariotipo normale mentre in un altro caso, alla iniziale presenza di gain 1q, si è aggiunta una linea con gain 1q e del1p; i restanti 4 casi hanno mostrato un cariotipo stabile. Nei pz con amplificazione 1q21 si osserva una significativa riduzione dei valori di emoglobina, mentre nei casi con del1p32 si osservano alti livelli di calcemia e un maggior numero di lesioni scheletriche.

Le caratteristiche cliniche dei pazienti studiati e l'assetto citogenetico osservato mostrano come il coinvolgimento gain1q21.3/del1p32.3 nel MM avvenga in un contesto di eterogeneità clonale in pazienti con stadio avanzato di malattia e configuri un quadro di prognosi negativa.

**P293**  
**Riarrangiamento sbilanciato del cromosoma X in una bambina con fenotipo Turner-like**

A. Mormile<sup>1</sup>, R. Genesis<sup>1</sup>, P. Pignataro<sup>1</sup>, M.P. Patrizio<sup>1</sup>, A. Izzo<sup>1</sup>, N. Mollo<sup>1</sup>, V. Sarnataro<sup>1</sup>, P. Tedeschi<sup>1</sup>, P. Alessandra<sup>1</sup>, L. Passariello<sup>1</sup>, L. Nitsch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli Federico II, Napoli, Italia;

Le inversioni pericentromeriche a carico del cromosoma X sono molto rare. I portatori di tali aberrazioni sono fenotipicamente normali sebbene abbiano un maggiore rischio di prole con riarrangiamenti sbilanciati il cui fenotipo è caratterizzato da anomalie più o meno gravi, in alcuni casi letali, a seconda del contenuto genico delle regioni cromosomiche coinvolte. La monosomia del cromosoma X è spesso associata con alcune patologie autoimmuni come la celiachia. Un'associazione è stata descritta anche in casi di duplicazione Xq. I meccanismi molecolari alla base di queste associazioni rimangono tutt'ora sconosciuti. Riportiamo il caso di una bambina di 11 anni giunta alla nostra attenzione per bassa statura, lievi anomalie scheletriche e celiachia. L'indagine citogenetica ha evidenziato una delezione del braccio corto del cromosoma X di circa 38Mb da Xp11.4 a Xpter e una duplicazione del braccio lungo di circa 18Mb da Xq26.3 a Xq28, originate da un'inversione pericentromerica bilanciata materna. Il riarrangiamento strutturale del cromosoma X derivativo ha causato, nella bambina, un fenotipo parzialmente sovrapponibile alla sindrome di Turner di cui mostra soltanto alcuni segni peculiari. Non sono invece presenti segni legati alla duplicazione Xq28. Per determinare il pattern di inattivazione del cromosoma X della probanda, è stata effettuata un'analisi mediante immuno-FISH ed ibridazione con sonda SHOX su metafasi dei linfociti e dei fibroblasti della probanda, che ha evidenziato inattivazione del cromosoma X derivativo nel 100% delle cellule analizzate. Se questo pattern fosse conservato in tutti i distretti corporei, incluso il sistema nervoso, potrebbe essere giustificata l'assenza, nella probanda, di un fenotipo associato alle sindromi da duplicazione Xq28. La presenza di celiachia nella probanda potrebbe essere determinata dalla delezione Xp, ma potrebbe anche suggerire speculazioni sul coinvolgimento di geni immunoregolatori ancora non individuati nella regione duplicata, che sfuggono all'inattivazione favorendo così la patologia autoimmune.





P294  
Delezione 16q23.1-q23.3 familiare

C. Ceccarini<sup>1</sup>, A.N. Polito<sup>2</sup>, C. Cesarano<sup>1</sup>, A. D'Aprile<sup>1</sup>, M.G. Gallicchio<sup>1</sup>, M.A. Carboni<sup>1</sup>, M. Bruno<sup>1</sup>, R. Antonetti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Sez. di Citogenetica- Lab. Centrale Dip. Patologia Clinica, Az. Mista Ospedaliero-Universitaria di Foggia

<sup>2</sup>Struttura Complessa di Neuropsichiatria Infantile, Az. Mista Ospedaliero-Universitaria di Foggia

Descriviamo una famiglia in cui segrega una delezione in 16q23.1-q23.3 presente nella madre ed ereditata da due figlie femmine dei quattro figli. La figlia maggiore L nata nel 2001 presenta perviet del dotto di Botallo operata, epilessia (esordita a 11 aa con episodi critici generalizzati per cui intrapresa terapia farmacologica e attualmente in latenza clinica), lievi note dismorfiche, lieve disabilità intellettiva e disturbo del tono dell'umore. La figlia minore C nata nel 2009 mostra disturbo da disregolazione dell'umore con comportamento dirompente, mutismo selettivo, lieve disabilità intellettiva, dimorfismi e DIV subaortico. Le indagini genetiche hanno evidenziato per entrambe cariotipo femminile normale e la CGH-array ha mostrato la delezione del braccio lungo di un cromosoma 16 in 16q23.1-q23.3 di ampiezza pari a 5.8Mb che comprende 16 geni OMIM. Tale delezione rientra nel gruppo dei cosiddetti riarrangiamenti con significato patogenetico a causa dell'ampiezza e dell'elevato contenuto di geni. La delezione è stata confermata con metodica FISH la quale eseguita sui genitori ha evidenziato il riarrangiamento anche nella madre che mostra disabilità intellettiva lieve-borderline e note dismorfiche. Sopracciglia ampie, sinofria, ipertelorismo, impianto basso delle orecchie accomunano tutte e tre, mentre altre caratteristiche sono presentate singolarmente o in due componenti della famiglia. Tra i geni coinvolti c'è WWOX, gene che presenta apolinsufficienza, in cui specifiche mutazioni in omozigosi causano una sindrome caratterizzata da encefalopatia epilettica e atassia. Anche i geni GCSH e GAN agiscono a livello neuronale in maniera autosomica recessiva causando, rispettivamente, encefalopatia da glicina e neuropatia assonale gigante, pur essendo probabilmente aploinsufficienti. Come riportato in letteratura, la delezione 16q23.1-q23.3 si associa ad un fenotipo lieve al quale non sembra ascrivibile un quadro clinico caratteristico neanche all'interno della stessa famiglia. Il ritardo dello sviluppo globale (con disabilità intellettiva lieve-moderata) sembra essere ci che accomuna tutti i pazienti, mentre i dimorfismi, il disturbo del comportamento, il coloboma dell'iride, la cataratta, l'epilessia e le cardiopatie sono variabilmente rappresentati.

P295  
Caratterizzazione di una traslocazione t(3;12)(q26;q21) con riarrangiamento MECOM in un caso di mielodisplasia

G. Cantamessa<sup>1</sup>, D. Fantasia<sup>2</sup>, R. Di Gianfilippo<sup>2</sup>, G. Sabbatinelli<sup>1</sup>, A. Di Nardo<sup>2</sup>, P. Guanciali Franchi<sup>1</sup>, S. Pulini<sup>3</sup>, P. Salutati<sup>3</sup>, C. Cant<sup>3</sup>, G. Calabrese<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica, Dip. Scienze Mediche, Orali e Biotec., Università di Chieti

<sup>2</sup>U.O.S.D. Genetica Oncoematologica, Azienda USL Pescara

<sup>3</sup>Dip. Ematologia, Azienda USL Pescara

La traslocazione t(3;12)(q26;q21), coinvolgente il locus MECOM (MDS1-EVI1 COMPLEX locus) in 3q26, è stata descritta solo in due pazienti affetti, rispettivamente, da leucemia mieloide acuta (LMA) secondaria a trattamento (Poppe et al., 2006) e da mielofibrosi idiopatica cronica (CIMF) JAK2-negativa (Me anovic et al., 2014). La regione 12q21, critica per CIMF, non è stata ancora caratterizzata e non sono noti geni coinvolti nella traslocazione t(3;12)(q26;q21).

A marzo 2016 è giunta alla nostra osservazione una paziente di 62 anni, con diagnosi di sindrome mielodisplastica tipo MDS-EB2 (WHO 2016) di grado severo, in base ai dati clinici, di laboratorio e citofluorimetrici. L'analisi citogenetica dell'aspirato midollare ha mostrato un cariotipo omogeneo 46,XX,t(3;12)(q26;q21), mentre il cariotipo costituzionale è risultato normale 46,XX. La paziente è stata sottoposta a 15 cicli di chemioterapia con 5-Azacitidina ed è rimasta in remissione ematologica fino a maggio 2017, quando è giunta a controllo con un quadro clinico-ematologico compatibile con LMA. Il nuovo campione midollare ha ripresentato cariotipo omogeneo 46,XX,t(3;12)(q26;q21).

L'analisi in FISH con sonda three-color (MetaSystems, Milano) ha mostrato un riarrangiamento della regione MECOM, mappando EVI1 prossimalmente al breakpoint in 3q e la regione 5-MECOM sul der(12)(q21). Tramite un'analisi in FISH con un pannello di cloni BACesteso per circa 20 Mb sul cromosoma 12q21 (Technogenetics, Lodi), abbiamo identificato la posizione del breakpoint in 12q in una regione rappresentata all'interno di due cloni BAC, che mappano in 12q21.31. Una ridotta intensità dei segnali dei due cloni sul der(3) e sul der(12), rispetto a quelli sul cromosoma 12 normale, ha rivelato che, associata alla traslocazione, è presente una delezione, mappata tra i geni PPFIA2 e CCDC59, in corso di caratterizzazione mediante analisi oligo-SNP array.

P296  
Caratterizzazione di riarrangiamenti genomici multipli in paziente con traslocazione reciproca (8;9) ed inversione paracentrica (5)(q23q31?). Report clinico e correlazione genotipo-fenotipo

S.A. Lauricella<sup>1</sup>, H.C. Cuttaia<sup>1</sup>, M.V. Mazara<sup>1</sup>, A. Pipitone<sup>1</sup>, D. Vecchio<sup>2</sup>, T. Fragapane<sup>2</sup>, A. Ferrara<sup>2</sup>, G. Barrano<sup>3</sup>, G. Cavarretta<sup>4</sup>, M. Piccione<sup>5</sup>

<sup>1</sup>U.O.S.D. Lab. Citogenetica Medica e Genetica Molecolare, A.O.O.R. "Villa Sofia-Cervello", Palermo

<sup>2</sup>U.O.S.D. Genetica Clinica con Centro Down, A.O.O.R. "Villa Sofia-Cervello", Palermo

<sup>3</sup>U.O.S.D. Genetica Medica, Osp. S. Pietro Fatebenefratelli, Roma

<sup>4</sup>Lab. Diagnostica Molecolare delle malattie ematologiche rare, A.O.O.R. "Villa Sofia-Cervello", Palermo

<sup>5</sup>Dip. di Scienze per la Promozione della Salute e Materno Infantile, "G.D'Alessandro", Università degli Studi di Palermo

L'inquadramento etiologico di fenotipi cromosomici complessi rappresenta un challenge diagnostico specie in epoca di vita neonatale che necessita di un work-up integrato tra discipline. Descriviamo il iter in paziente con note dismorfiche, anomalie congenite multiple e cariotipo costituzionale: 46,XX,inv(5)(q23q31?),t(8;9)(8p11.2;9p11.2),del(8)(p22?). Caso clinico: Studio genomico e correlazione genotipo-fenotipo di un'aneuploidia cromosomica caratterizzantesi per traslocazione reciproca (8;9), con punti di rottura alle sottobande 8p11.2 e 9p11.2, inversione paracentrica (5)(q23q31?), verosimilmente tra le bande q23-q31, e delezione parziale 5p22. Il succitato quadro citogenetico è stato approfondito con analisi FISH mediante chromosome painting probe XPC5; XCP8; XPC9 (MetaSystems); Cloni BAC N0709L12; N072716; N0251H21; N0221N01; TelVysion Probe D8S504; 305J7-T7 (Abbott-Vysis) ed analisi Array CGH (Human Genome CGH Microarray Kit 105A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Risultati: FISH (ISCN 2016): .ish ins(5)(pter →q13.1::q14→q22::q13.2→q13.3::q23→qter)(WCP5+, N0251H21-; N0221N01+, N0251H21+), t(8;9)(p?21; p?21)(wcp9+, wcp9+, wcp9+). Array-CGH (ISCN 2016, GRCh37/hg19): 5q14.1 (78293831-80547563)x1 dn, 8p22(17390835-17629747x1) dn, 8p21.3p21.2 (20226720-25689705)x1 dn. L'analisi FISH ha confermato una traslocazione reciproca tra un cromosoma 8 ed un cromosoma 9. La sonda painting specifica per il cromosoma 5 ha permesso di escludere il coinvolgimento di altri cromosomi nell'anomalia strutturale del braccio corto del cromosoma 5 e la sonda BAC locus specifica per la regione 5q13.2 ha evidenziato la presenza di un'inserzione del segmento cromosomico 5q13.2q13.3. A livello molecolare tutti i riarrangiamenti genomici, che sono stati altresì caratterizzati essere de novo mediante studio dei genitori, sono stati ulteriormente indagati mediante Array CGH che ha evidenziato le succitate multiple aneuploidie segmentali. Conclusioni: L'iter diagnostico condotto nella probanda ha permesso di caratterizzare come espressività e penetranza del fenotipo presentato coincidano maggiormente, anche se non univocamente, con le anomalie associate alla sindrome da delezione interstiziale 8p11.2 (ORPHA:251066). Tale condizione si caratterizza dall'associazione di dimorfismi facciali peculiari (micrognatia, microcefalia, solchi preauricolari, palato ogivale, orecchie displastiche), ritardo di crescita intrauterino ed ipotonia neonatale, tutti segni presenti nella nostra paziente.



P297  
Diagnosi di Pallister-Killian su cellule della mucosa buccale con Array-CGH

A.M. Crivello<sup>1</sup>, G. Cavarretta<sup>1,2</sup>, T. Fragapane<sup>2</sup>, D. Palazzo<sup>2</sup>, D. Vecchio<sup>2</sup>, A. Giambona<sup>1</sup>, A. Maggio<sup>1</sup>, M. Piccione<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>U.O.C. di Ematologia per le Malattie Rare del Sangue e degli Organi Ematopoietici, Laboratorio di Diagnosi Molecolare delle Malattie Rare, Villa Sofia Cervello, Palermo

<sup>2</sup>Centro di Riferimento Regionale per la prevenzione, la diagnosi e la cura delle Malattie Genetiche Rare Cromosomiche e della Sindrome di Down, Villa Sofia Cervello, Palermo

<sup>3</sup>Dipartimento di Scienze per la promozione della salute e Materno-Infantile. Università degli Studi di Palermo.

PREMESSA. La Sindrome di Pallister-Killian (PKS) è un raro disordine multisistemico, caratterizzato da tetrasomia 12p in mosaico generalmente dovuta ad un isocromosoma soprannumerario del 12p. L'incidenza stimata è 1/20-25.000. Clinicamente la PKS è caratterizzata da dimorfismi cranio-facciali, alterata pigmentazione cutanea, anomalie di mani e piedi, ipotonia, disabilità intellettiva ed epilessia. Il mosaicismismo dell'i(12p) presenta distribuzione tessuto-specifica, riscontrandosi nel 30-100% di fibroblasti e cellule buccali, nel 10-100% delle cellule del midollo osseo e degli amniociti, ma solo in 0-2% dei linfociti periferici. La diagnosi di PKS è solitamente eseguita su biopsia cutanea anche se il tampone buccale rappresenta un sistema di campionamento affidabile.

SCOPO DELLO STUDIO. Diagnosi di PKS su DNA ottenuto da cellule della mucosa buccale attraverso l'utilizzo della tecnica di Array-CGH (aCGH).

MATERIALI E METODI. Eseguito Tampone Buccale, estrazione del DNA ed analisi del cariotipo molecolare con aCGH sulle cellule della mucosa.

RISULTATI. Il paziente, bambino adottato, giungeva alla nostra osservazione all'età di 3 anni per note dismorfiche e ritardo globale dello sviluppo. L'esame obiettivo mostrava parametri antropometrici normali, dimorfismi facciali specifici, nistagmo bilaterale, orecchie a basso impianto. Le indagini strumentali risultavano nella norma, tranne l'RX di colonna-bacino, che mostrava scoliosi (C6-D3) e testa femorale sinistra ipoplasica. Veniva eseguito aCGH su sangue, normale. Al successivo controllo all'età di 7 anni, mostrava accrescimento corporeo adeguato, madismorfie facciali, exoforia e nistagmo. Alla luce del quadro fenotipico, veniva posto il sospetto di PKS ed eseguito tampone buccale per analisi aCGH. Veniva così identificata l'amplificazione del braccio corto del cromosoma 12.

CONCLUSIONI. La PKS è un'anomalia cromosomica rara. Nel caso da noi descritto la dimostrazione dell'amplificazione del 12p attraverso aCGH su tampone buccale conferma l'utilità di tale procedura come indagine di prima battuta nella diagnosi di PKS, per ricorrere alla biopsia cutanea solo in rari casi.







**P298**  
**Descrizione di un caso di s. di Alfi in una neonata con trigonocefalia e dismorfismi facciali**

F. Lonardo<sup>1</sup>, M. Falco<sup>1,2</sup>, M. Ciavarella<sup>1</sup>, C. Lombardi<sup>1</sup>, P. Fontana<sup>1</sup>, M. Maioli<sup>1</sup>, G. Cantalupo<sup>1</sup>, S. Amabile<sup>1,2</sup>, G. Scarano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.S.D. di Genetica Medica, A.O.R.N. G. Rummo, Benevento  
<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II

La s. da delezione 9p (OMIM 158170) è stata descritta per la prima volta nel 1973 da Alfi in 6 pazienti. Successivamente diversi Autori ne hanno ulteriormente delineato le caratteristiche cliniche, tentando anche di stabilire una correlazione tra il tratto deletato ed il fenotipo. I pazienti generalmente presentano: ritardo dello sviluppo psicomotorio, trigonocefalia, ipoplasia mediofaciale, ponte nasale piatto, filtro lungo, collo corto. Altre caratteristiche frequenti sono: ipertelorismo, epicanico, rime palpebrali corte ed inclinate verso l'alto e l'esterno, narici anteverse, atresia delle coane, orecchie piccole, ad impianto basso e retrorotate, microstomia, micrognatia. Il cariotipo solitamente presenta una delezione terminale 9p, ma sono stati descritti anche altri tipi di riarrangiamento cromosomico. In circa la metà dei casi è presente una delezione 9p de novo, con punti di rottura generalmente compresi tra 9p21 e 9p24. In altri casi si osserva un derivativo del cromosoma 9 che si forma per ricombinazione anomala di una traslocazione bilanciata presente in un genitore. È stato descritto anche qualche caso con duplicazione associata alla delezione (talvolta come conseguenza di un'inversione presente in un genitore). Descriviamo il caso di una neonata giunta alla nostra osservazione per ipotonìa assiale, note dismorfiche e cardiopatia congenita (DIV). Dati alla nascita: P 3,640 Kg (50-75), L 51 cm (50-75), CC 36,5 cm (75-90). L'esame del cariotipo ha evidenziato un assetto 46,XX,del(9)(p22)dn. L'esame mediante CGH-Array ha evidenziato una perdita di 16,44 Mb: arr[hg19]9p24.3p22.2(204090\_16640536)x1. Rivalutata a 7 mesi, la bambina presentava: crescita staturale-ponderale nella norma: P 7,400 Kg (25-50); L 67 cm (25-50); CC 42,5 (10-25), ipotonìa assiale medio-grave, capelli radi e sottili, trigonocefalia, prominente della sutura metopica, rime oculari ristrette, leggermente inclinate verso l'alto e l'esterno, epicanico bilaterale, orecchie piccole, ponte nasale ampio ed appiattito, narici anteverse, micrognatia, labbra strette e sottili, palato ogivale, ugola bifida, collo corto, soffio pan-sistolico 2/6, addome globoso, genitali normali, clinodattilia del V dito dei piedi bilateralmente.

**P299**  
**Analisi di una traslocazione inserzionale (5;4) familiare in 3 generazioni: due casi di monosomia parziale e un caso di trisomia parziale di due segmenti non contigui del braccio lungo del cromosoma 4**

L. Cardarelli<sup>1</sup>, I. Mammi<sup>2</sup>, E. Nalesso<sup>1</sup>, S. Gomirato<sup>1</sup>, L. Michelotto<sup>1</sup>, K. Marchioro<sup>1</sup>, M. Duca<sup>1</sup>, G. Calugi<sup>1,3</sup>, V. Businaro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio RDI - Rete Diagnostica Italiana, Genetica Medica, Gruppo Lifebrain, Limena (PD)

<sup>2</sup>Ambulatorio di Genetica Medica, AULSS3 Serenissima, Osp. Dolo (VE)

<sup>3</sup>Laboratorio Analisi Guidonia, Gruppo Lifebrain, Guidonia Montecelio (RM)

Le traslocazioni inserzionali consistono nello spostamento di un segmento cromosomico all'interno in un altro cromosoma, omologo (inserzioni intracromosomiche) o non omologo (inserzioni intercromosomiche). Comportano un rischio riproduttivo molto alto (rischio teorico del 50%) per cui spesso i portatori di inserzione vengono individuati a seguito della nascita di un figlio affetto, con trisomia o monosomia parziali di uno dei cromosomi coinvolti. La reale frequenza nella popolazione generale delle traslocazioni inserzionali non è nota; si ritengono poco frequenti le traslocazioni inserzionali di più ampie dimensioni, citogeneticamente visibili (circa 1:8000), ma sembra che l'incidenza delle traslocazioni di segmenti submicroscopici (identificate solo da quando è entrato nella pratica clinica l'utilizzo dell'array-CGH) sia più elevata (circa 1:1000, 2% dei riarrangiamenti submicroscopici apparentemente de novo) (Nowakowska BA et al, Eur J Hum Genet 2012). I casi di duplice inserzione sono molto rari.

Presentiamo il caso di una famiglia giunta alla nostra attenzione per esecuzione di array-CGH nel probando, un bambino di 5 anni con lieve ritardo globale dello sviluppo. Dall'analisi è stata riscontrata un'anomalia cromosomica submicroscopica, caratterizzata da doppia microdelezione a livello del braccio lungo del cromosoma 4, rispettivamente di 1,68Mb in 4q22.1 (intervallo minimo chr4:89,150,426-90,833,151 bp, hg19) e di 7,75Mb in 4q22.1q23 (intervallo minimo chr4:92,807,547-100,553,718bp, hg19).

L'estensione dell'analisi ai genitori, mediante FISH, ha evidenziato nella madre la presenza dell'inserzione dei due segmenti non contigui del braccio lungo del cromosoma 4 nel braccio corto di un cromosoma 5, presumibilmente a livello della sottobanda 5p15.2.

Ulteriori analisi eseguite successivamente sui familiari materni, hanno portato all'identificazione della stessa traslocazione inserzionale bilanciata nel nonno del probando, e dei due sbilanciamenti reciproci, rispettivamente monosomia e trisomia parziali, nella sorella e nel fratello materni.

Si discutono il fenotipo dei due casi con la duplice microdelezione e del caso con la duplice microduplicazione dei segmenti 4q22.1 e 4q22.1q23, la correlazione con rispettivi i genotipi e la possibile origine del duplice riarrangiamento inserzionale (cromotripsis?).

**P300**  
**Iposomia marcata e note dismorfiche in una neonata con grave prematurità e delezione 11q13.1 contenente il gene COX8A**

C. Lombardi<sup>1</sup>, L. Grappone<sup>2</sup>, F. Cocca<sup>2</sup>, G. Di Manso<sup>2</sup>, N. Pozzi<sup>2</sup>, M. Ciavarella<sup>1</sup>, M. Maioli<sup>1</sup>, G. Cantalupo<sup>1</sup>, F. Lonardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.S.D. di Genetica Medica, A.O.R.N. G. Rummo, Benevento

<sup>2</sup>Terapia Intensiva Neonatale, A.O.R.N. G. Rummo, Benevento

Descriviamo una bambina nata da parto spontaneo dopo una gestazione durata 25 settimane e 2 giorni. Dati alla nascita: peso 279 g, lunghezza 23 cm, CC 16,5 cm, Apgar 1, 3 e 6 (a 1, 5 e 10). La bambina ha avuto necessità di essere rianimata ed ha presentato un'insufficienza respiratoria con ipossiemia refrattaria. L'esame dismorfologico evidenziava: ipertelorismo, edema dei tessuti periorbitali (più marcato a destra), radice nasale depressa, con presenza di un solco orizzontale, tip bulboso, filtro poco modellato, labbro superiore sottile, V metacarpo corto, piede torto bilaterale, gap tra I e II dito del piede dx. Dopo circa 14 ore dalla nascita è intervenuto l'exitus. È stato immediatamente prelevato un campione di sangue, sul quale è stato eseguito l'esame del cariotipo e la ricerca di sbilanciamenti genomici mediante CGH-Array. L'esame del cariotipo ha evidenziato un assetto femminile normale (46,XX), mentre l'esame CGH-Array ha evidenziato una delezione nel braccio lungo del cromosoma 11, delle dimensioni di circa 127,7 Kb: arr 11q13.1(63663933\_63791640)x1 dn. La delezione non è presente nei genitori (de novo). La regione deleta ha un'estensione di circa 127,7 Kb, e contiene 6 geni UCSC (MARK2, RCOR2, NAA40, COX8A, OTUB1, MACROD1) e 5 geni OMIM (MARK2, RCOR2, COX8A, OTUB1, MACROD1). Tra questi geni, solo COX8A è stato finora associato a patologie. La proteina codificata da questo gene fa parte del complesso della citocromo-c ossidasi (COX). La citocromo-c ossidasi (o complesso IV) è l'ultimo complesso enzimatico coinvolto nella catena di trasporto degli elettroni e catalizza il trasferimento degli elettroni dal citocromo c all'ossigeno.

Alterazioni di questo complesso possono portare a manifestazioni cliniche eterogenee: cardioencefalopatia infantile fatale, cardiomiopatia ipertrofica, epatomegalia, ipotonìa, atassia, dispnea, ritardo della crescita e dello sviluppo psicomotorio. Nelle forme meno gravi segni e sintomi possono manifestarsi nella vita adulta. Le forme più gravi possono invece manifestarsi già alla nascita, e possono determinare l'exitus dopo poche ore di vita.



**P301**  
**Quando il quadro clinico diventa ancora più complesso: sindrome di Silver-Russel e delezione terminale del braccio corto del cromosoma 9 causate da una traslocazione sbilanciata 9;11**

M. Falco<sup>1,2</sup>, A.M. Nardone<sup>3</sup>, D. Postorivo<sup>3</sup>, M.R. D'Apice<sup>3</sup>, F. Scarano<sup>1</sup>, P. Fontana<sup>1</sup>, G. Scarano<sup>1</sup>, F. Lonardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.S.D. di Genetica Medica, A.O.R.N. G. Rummo, Benevento

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II

<sup>3</sup>U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, Policlinico Tor Vergata, Roma

Descriviamo una paziente di due anni affetta da due sbilanciamenti genomici, entrambi patogenetici, derivanti da una traslocazione cromosomica sbilanciata de novo. Nata pretermine, piccola per l'età gestazionale e con peso alla nascita estremamente basso (700 g). Asfissia neonatale. Ricovero in TIN per 3 mesi. Vista e udito nella norma; pervietà del forame ovale all'ecocardiogramma; danno anossico perinatale alla RMN dell'encefalo. Alla nascita riscontro di cariotipo femminile con delezione terminale del braccio corto del cromosoma 9: 46,XX,del(9)(p22) de novo. All'età di circa 4 mesi peso e lunghezza <5 centile, CC al 10 centile, plagiocefalia, macrocefalia relativa e proptosi oculare. L'esame CGH-array ha rilevato la presenza di due sbilanciamenti genomici: delezione terminale del braccio corto del cromosoma 9 (p24.3-p23) di 11,9 Mb e duplicazione terminale del braccio corto del cromosoma 11 (p15.5-p15.4) di 4 Mb. Mediante FISH il cromosoma riarrangiato è stato caratterizzato come derivativo da una traslocazione sbilanciata 9;11 con punti di rottura rispettivamente in 9p23 e 11p15.4. L'analisi molecolare dei microsatelliti del braccio corto del cromosoma 11, sottoposto ad imprinting, ha identificato l'origine materna del segmento duplicato. La delezione parziale 9p è descritta in letteratura come patogenetica (OMIM #158170). I pazienti generalmente presentano ritardo dello sviluppo psicomotorio, trigonocefalia, ipoplasia mediofaciale, ponte nasale piatto, filtro lungo, collo corto. Altre caratteristiche frequenti sono: ipertelorismo, epicanico, rime palpebrali corte ed inclinate verso l'alto e l'esterno, narici anteverse, atresia delle coane, orecchie piccole, ad impianto basso e retrorotate, microstomia, micrognatia. La duplicazione parziale del braccio corto del cromosoma 11 di origine materna è una delle possibili cause della sindrome di Silver-Russel (OMIM #180860), caratterizzata da ritardo di crescita, anomalie fenotipiche, macrocefalia relativa, asimmetria degli arti e sviluppo cognitivo mediamente nella norma. Il caso merita attenzione in quanto la piccola al momento presenta un quadro clinico complesso, determinato dalla contemporanea presenza dei due sbilanciamenti descritti.





**P302**  
**Inv dup del(4p) in feto con gravi malformazioni**

F. Scarano<sup>1</sup>, G. Scarano<sup>1</sup>, L. Bernardini<sup>2</sup>, M. Maioli<sup>1</sup>, M.G. Giuffrida<sup>2</sup>, M. Ciavarella<sup>1</sup>, C. Lombardi<sup>1</sup>, M. Falco<sup>1,3</sup>, P. Fontana<sup>1</sup>, F. Lonardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>U.O.S.D. di Genetica Medica, A.O.R.N. G. Rummo, Benevento

<sup>2</sup>Unit di Citogenetica, Fondazione Casa Sollievo della Sofferenza, IRCCS, San Giovanni Rotondo (FG)

<sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Universit degli Studi di Napoli Federico II

Alla XIV settimana della prima gravidanza di genitori non consanguinei è stato evidenziato ecograficamente un quadro di igroma cistico settato, sospetto difetto di chiusura addominale e mancata visualizzazione di un arto inferiore. La coppia ha deciso di interrompere la gravidanza. All'esame dismorfologico del prodotto del concepimento: sesso indeterminato per la presenza di tubercolo genitale, gastroschisi con erniazione del contenuto intestinale e del fegato, ano imperforato, malposizione degli arti inferiori con i piedi rivolti verso la superficie anteriore del torace. Al riscontro necroscopico: peso 60 g, parametri auxologici compatibili con un'età gestazionale di circa 13 settimane, gastroschisi, agenesia rene dx, ipoplasia vescicale, assenza delle gonadi, brevit dell'intestino crasso e atresia ano-rettale, polmone destro bilobato e sinistro privo di lobature, ipoplasia della colonna lombo-sacrale. Rx scheletro: sacro non visualizzabile. Sono state eseguite varie indagini citogenetiche e citogenomiche su biopsia cutanea fetale:

Cariotipo fetale: 46,XY,der(4)(p16.3)dup(4)(p15.2p16.3); FISH per le zone subtelomeriche del cromosoma 4: ish del(4)(p16.3)(TelVysion 4p)-dn;

FISH mediante sonde locus-specifiche: ish inv dup del(4)(p15.2p16.3::p16.3qter)(N0265J04+-N0751M11++\_D2S3359)-dn;

CGH-Array: arr[hg 19] 4p16.3(23,060-628,525)x1,4p16.3p15.2(650,030-22,265,509)x3.

Cariotipo e FISH per le zone subtelomeriche del cromosoma 4 su entrambi i coniugi sono risultati normali. Conclusioni: riarrangiamento complesso 4p con delezione terminale 4pter e duplicazione invertita 4p16.3p15.2 de novo. Il tratto deletato si estende per circa 605,5 Kb e contiene 2 geni OMIM; quello duplicato ha una dimensione di circa 21,6 Mb e contiene 97 geni OMIM. Il riarrangiamento è estremamente raro. In letteratura sono soltanto 4 i contributi presenti, tutti de novo. L'espressività clinica è comunque molto variabile: in alcuni dei casi noti è possibile rilevare una somiglianza o sovrapposizione seppure parziale con la sindrome di Wolf-Hirschhorn, per la perdita di regioni WHS. Nel caso in esame le regioni WHS sono presenti, così come in uno dei quattro casi già riportati.

**P303**  
**Instabilità delle regioni satelliti dei cromosomi acrocentrici alla base di riarrangiamenti genomici**

N. Villa<sup>1</sup>, S. Redaelli<sup>2</sup>, F. Crosti<sup>1</sup>, E. Sala<sup>1</sup>, S. Maitz<sup>3</sup>, A. Selicorni<sup>4</sup>, M. Rigoldi<sup>5</sup>, A. Bentivegna<sup>2</sup>, G. Roversi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale San Gerardo, ASST di Monza

<sup>2</sup>Scuola di Medicina e Chirurgia, Universit di Milano-Bicocca, Monza

<sup>3</sup>Ambulatorio di Genetica e sindromologia Pediatrica - Fondazione MBBM, Ospedale san Gerardo, Monza

<sup>4</sup>UOC Pediatria, Presidio S. Fermo, ASST Lariana, Como

<sup>5</sup>Centro Malattie Rare Ospedale San Gerardo ASST di Monza

Il cariotipo molecolare (arrayCGH) consente di evidenziare sbilanci genomici non identificabili all'analisi del cariotipo convenzionale ma non permette di localizzare le CNVs sui cromosomi. Inoltre non mostra alterazioni genomiche bilanciate, sbilanci di regioni pericentromeriche e telomeriche di piccole dimensioni. Solo l'integrazione di più metodi d'analisi permette la corretta definizione di alterazioni genomiche e consente di fare ipotesi sui meccanismi che portano all'insorgenza di riarrangiamenti. Descriviamo due casi familiari con alterazioni sbilanciate evidenziate in arrayCGH e FISH con sonde subtelomeriche specifiche: un derivativo del cromosoma 13 da traslocazione (4;13)(q35;p11.2) ed un derivativo 13 da traslocazione (7;13)(q36;p11.2). Nel primo caso l'analisi FISH è stata chiesta in un bambino di 2 anni per la presenza di ritardo psicomotorio, la stessa alterazione è presente nel padre e nella nonna paterna fenotipicamente normali. Nel secondo caso l'alterazione è stata casualmente riscontrata nel padre, fenotipicamente normale, di un bambino con diagnosi in FISH di delezione 9q34. L'approfondimento sui genitori con sonde telomeriche specifiche ha escluso il coinvolgimento della regione 9q34, ma ha identificato il der(13)t(7;13) non trasmesso al figlio. L'estensione dell'analisi FISH alla generazione precedente ha permesso di trovare lo stesso riarrangiamento nella nonna paterna. L'analisi arrayCGH (180K) effettuata sui genitori identifica in entrambi i casi una CNV in acquisizione: nel primo caso una duplicazione di 78kb interstiziale in 4q35.2 che non contiene sequenze espresse conosciute ed è sovrapponibile alla regione dove mappa la sonda subtelomeriche specifica. Nel secondo caso la duplicazione di circa 525kb è terminale e contiene 3 geni noti in OMIM (WDR60, ESYT2, VIPR2). Il gene VIPR2 in duplicazione rappresenta un fattore di suscettibilità per schizofrenia. Questi casi hanno fornito due punti di discussione: da un lato il possibile coinvolgimento dell'instabilità delle regioni satelliti degli acrocentrici nel generare CNVs, dall'altro, sottolineano un possibile ruolo regolatorio dell'eterocromatina che mediante silenziamento per effetto di posizione potrebbe spiegare il fenotipo normale nei portatori.

**P304**  
**COL6A5, COL8A1, COL10A1: biomarcatori differenziali per Psoriasi, Psoriasi Artropatica e Eczema Atopico**

C. Strafella<sup>1</sup>, M. Ciancamerla<sup>2</sup>, V. Caputo<sup>2</sup>, V. Errichiello<sup>2</sup>, F. Sangiuolo<sup>2</sup>, G. Novelli<sup>2</sup>, R. Cascella<sup>3</sup>, E. Giardina<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Dip. di Biomedicina e Prevenzione, Universit degli Studi di Roma Tor Vergata; Lab. Emotest

<sup>2</sup>Dip. di Biomedicina e Prevenzione, Universit degli Studi di Roma Tor Vergata

<sup>3</sup>Dip. di Biomedicina e Prevenzione; Universit degli Studi di Roma Tor Vergata; Dipartimento di Tecnologie Chimiche, Farmaceutiche e Biomolecolari, Universit Cattolica Nostra Signora del Buon Consiglio

<sup>4</sup>Dip. di Biomedicina e Prevenzione, Universit degli Studi di Roma Tor Vergata; Lab. di Genetica Molecolare UILDM, Fondazione Santa Lucia

Ad oggi, sono noti 28 sottotipi di collagene, principalmente coinvolti nella formazione e nel mantenimento dei componenti strutturali della cartilagine, osso, epidermide, cornea, vasi sanguigni, dischi intervertebrali. Pertanto, polimorfismi nei geni codificanti per tali proteine possono produrre tessuti connettivi meno resistenti e più suscettibili a danni da sforzo meccanico e invecchiamento. La nostra attenzione si è focalizzata sull'identificazione di biomarcatori di suscettibilità per Psoriasi (Ps), Psoriasi Artropatica (PsA) ed Eczema Atopico (EA), analizzando i polimorfismi dei geni del collagene. Infatti, l'insorgenza di tali malattie dipende da difetti in diversi pathways molecolari coinvolti nel mantenimento dell'epidermide e dell'osso, ai quali prendono parte i geni COL6A5, COL8A1 e COL10A1. 1576 campioni (Ps:383, PsA:420, EA:285, Controlli: 497) sono stati genotipizzati mediante Real-Time PCR (Chimica TaqMan) per gli SNPs rs12488457 (A/C, COL6A5), rs13081855 (G/T, COL8A1) e rs3812111 (A/T, COL10A1) e successivamente sottoposti ad analisi biostatistica (X<sup>2</sup> e OR) e bioinformatica (siti di predizione). rs12488457 è risultato associato a Ps [p=2.97\*10<sup>-9</sup>, OR (C): 1.75, CI95%: 1.44-2.13], PsA [p=1.24\*10<sup>-5</sup>, OR (C): 2.46, CI95%: 2.03-2.97] ma non a EA. Lo SNP rs13081855 ha riportato l'associazione con Ps [p=0.001, OR (T): 1.79, CI95%:1.24-2.59], PsA [p=9.06\*10<sup>-6</sup>, OR (T): 2.17, CI95%:1.53-3.06] ed EA [p= 1.62\*10<sup>-5</sup>, OR (T), 2.46, CI95%: 1.68-3.58]. Lo SNP rs3812111 invece, è associato soltanto a PsA [p=0.008, OR (T):1.29, CI95%:1.07-1.57]. L'associazione differenziale osservata concorda con i dati bioinformatici relativi all'impatto funzionale e alla localizzazione dei geni considerati. Infatti, COL6A5 è maggiormente espresso a livello cutaneo e delle giunzioni dermoepidermiche nonché coinvolto nella proliferazione cellulare. COL8A1 è espresso nell'epidermide, dove prende parte ai processi di neovascolarizzazione. COL10A1 invece, risulta particolarmente espresso nel tessuto osseo ed è implicato nei meccanismi di ossificazione e neoformazione ossea. In conclusione, COL6A5, COL8A1 e COL10A1 rappresentano biomarcatori di suscettibilità specifici per Ps, PsA e EA riflettendo l'esistenza di meccanismi eziopatogenetici differenziali alla base di queste malattie.



**P305**  
**Sindrome di Holt-Oram: variante patogenetica familiare non descritta ad espressività variabile e penetranza incompleta**

C. Berera<sup>1</sup>, F. Cariola<sup>2</sup>, M. Gentile<sup>3</sup>, S.C. Gorgone<sup>1</sup>, D. Mangiameli<sup>1</sup>, F. Mannino<sup>1</sup>, V. Nicotra<sup>1</sup>, T. Mattina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica Universit di Catania, Centro di Riferimento Regionale HUB per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare, A.O.U Policlinico - V.E., Catania

<sup>2</sup>UO Genetica Medica IRCCS Saverio de Bellis, Castellana Grotte (BA)

<sup>3</sup>UOC Laboratorio di Genetica Medica ASL BARI

La s. di Holt-Oram (HOS), la più comune sindrome cuore-mano, è caratterizzata da anomalie scheletriche degli arti superiori (asse radiale) e da difetti cardiaci; la severità delle manifestazioni è molto variabile, con ampio spettro fenotipico. La prevalenza è stimata tra 0.7 e 1/100000; nel 70% circa dei casi sono presenti mutazioni del gene TBX5 (OMIM \*601620), molto spesso de novo. La trasmissione è autosomica dominante e, in genere, viene descritta penetranza completa per i difetti degli arti superiori (orpha:392). Presentiamo due germani giunti alla nostra osservazione per DIA di tipo ostium secundum, nel maschio (13 aa al primo accesso), e mano torta radiale bilaterale con ipoplasia del I metacarpo, nella femmina (19 aa). Esami clinici e strumentali hanno escluso il coinvolgimento di altri organi e apparati. I genitori sono non consanguinei e asintomatici. L'analisi molecolare di TBX5 ha evidenziato in entrambi la variante genetica c.490\_492delCAC (p.His164del) (esone 5). La variante, non descritta in letteratura, causa la delezione di un singolo aminoacido ed è stata riscontrata pure nella mamma dei ragazzi che, tuttavia, ad una ulteriore valutazione clinico-strumentale non presenta segni clinici riferibili alla HOS (RX mani e avambracci ed ecocardiografia nella norma).

TBX5 codifica per un fattore di trascrizione coinvolto nella regolazione dell'embriogenesi. Le varianti di TBX5 più comunemente responsabili di HOS (nonsense, frameshift, siti di splicing) hanno come conseguenza la codifica di una proteina trunca, non funzionale. Il quadro clinico pertanto deriva da aploinsufficienza di TBX5 (Al-Qattan MM et al., 2015). Negli altri casi non è semplice né immediato stabilire un ruolo causativo della variante riscontrata. Nella famiglia da noi descritta, la variante presenterebbe espressività variabile nei fratelli, senza dare alcuna manifestazione nella madre, lasciando ipotizzare un meccanismo di non penetranza. In un caso familiare una mutazione missenso di TBX5 è riportata con penetranza incompleta (Guo Q. et al., 2015). Il nostro caso porta ulteriori evidenze circa la possibilità di penetranza incompleta e conferma l'estrema variabilità di espressione della HOS, elementi che possono rendere complesso l'iter del counselling, specie in epoca prenatale.





**P306**  
**11q+ : studio prospettico e retrospettivo della sindrome da duplicazione parziale 11q**

S.C. Gorgone<sup>1</sup>, C. Berera<sup>1</sup>, F. Mannino<sup>1</sup>, V. Nicotra<sup>1</sup>, M. Fichera<sup>1</sup>, T. Mattina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Genetica Medica Universit di Catania Centro di Riferimento Regionale per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare HUB, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico-V.E. di Catania

La trisomia 11q parziale è una patologia cromosomica caratterizzata dalla presenza di un tratto cromosomico 11q in triplice copia con conseguente dosaggio genico incrementato rispetto alla condizione fisiologica.

La presenza di tre dosi di una parte del cromosoma 11 si verifica con diversi possibili meccanismi patogenetici: la segregazione sbilanciata di una traslocazione bilanciata parentale, la traslocazione sbilanciata de novo, la duplicazione 11q sullo stesso cromosoma, diretta o invertita. In ognuna di queste condizioni la duplicazione parziale 11q pu riguardare regioni diverse, si pu accompagnare ad un altro sbilanciamento coinvolgente un altro cromosoma o lo stesso cromosoma 11.

Le differenze fra le forme pure e le forme associate ad altri sbilanci e le differenze nella regione duplicata in ciascun paziente fanno s che nella maggior parte dei casi i pazienti siano in effetti casi unici o almeno estremamente rari.

Il quadro clinico è inevitabilmente maldefinito, sintomi comuni sono: ritardo di crescita intrauterina, dismorfismi facciali, microcefalia, difetti cardiaci, ipotonia muscolare, difetti dell'apparato genitale, ernia inguinale, scoliosi e disabilità intellettiva medio-grave.

Allo scopo di ridurre, per quanto possibile, questo gap informativo, abbiamo provveduto a raccogliere informazioni anamnestiche personali e familiari, esame obiettivo, visita dismorfologica con documentazione iconografica, nelle famiglie con 11q+ che hanno partecipato agli incontri delle associazioni delle famiglie con delezione 11q, o che ci hanno contattato per via informatica. Le famiglie aderenti al progetto sono 60 di diversa provenienza europea e statunitense. Si sta procedendo alla raccolta dati tramite l'utilizzo di questionari appositamente studiati e della documentazione clinica. Visite, raccolta iconografica e follow up avvengono negli incontri con le Associazioni. I pazienti vengono confrontati dopo essere stati distinti in gruppi sovrappanti sulla base del quadro genomico. Si riportano risultati preliminari.

**Bibliografia**  
 -Zimberg-Bossira et al, Clin Dysmorphol 2011  
 -Ben-Abdallah-Bouhjar I. et al, Gene 2013  
 -Kayhan G. et al, Gene 2013

**P307**  
**Cdx2 and Fok1 polymorphisms of the VDR gene are associated with muscle atrophy and VDR nuclear localization in osteoporotic patients**

E. Centofanti<sup>1</sup>, M. Scimeca<sup>1,2</sup>, M. Celli<sup>3</sup>, E. Gasbarra<sup>3</sup>, R. Bonfiglio<sup>4</sup>, G. Novelli<sup>1</sup>, U. Tarantino<sup>3</sup>, A. Botta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dep. of Biomedicine and Prevention, University of Rome Tor Vergata

<sup>2</sup>IRCCS San Raffaele Pisana

<sup>3</sup>Dep. of Orthopedics and Traumatology, "Tor Vergata" University of Rome, "Policlinico Tor Vergata" Foundation

<sup>4</sup>Dep. of Experimental Medicine and Surgery, University "Tor Vergata"

Sarcopenia and osteoporosis increase the risk of bone fracture in the elderly due to the loss of muscle mass and the decrease in bone mineral density. Skeletal muscle is in close relationship with bone tissue and emerging evidence suggests that vitamin D and Vitamin D Receptor (VDR) play a direct role in both muscle and bone homeostasis. In this retrospective study, we investigated the relationship between sarcopenia (evaluated in term of fibers atrophy), vitamin d receptor protein expression and TaqI/Cdx2/FokI VDR genotypes in an Italian cohort of osteoporosis (n=44) and osteoarthritis (n=46) patients. Muscle biopsies were fixed and investigated by both immunohistochemistry (vitamin d receptor expression) and transmission electron microscopy (satellite stem cells niches). Vitamin d receptor polymorphisms were studied on DNA extracted from muscle paraffin sections. For the first time, we reported that aging differently affects the VDR activation in OA and OP patients. In particular, while in OP patients we observed a significant reduction of VDR positive myonuclei with age, no age effect was observed in OA patients. The frequent activation of VDR could be explain the lower number of atrophic fiber that we observed in OA patients respect to OP. From genetic point of view, we showed a correlation between polymorphisms of FokI and Cdx2 genes, vitamin d receptor activation and the occurrence of sarcopenia. Altogether these data open new prospective for the prevention and cure of age-related muscle disorders. Indeed, the systematic control of vitamin D serum levels and/or the analysis of VDR polymorphisms could be effective prevention tools for the sarcopenia occurrence.

**P308**  
**Sequenziamento dell'esoma e identificazioni di varianti associate alla malattia renale**

F. Belpinati<sup>1</sup>, S. Udali<sup>2</sup>, A. Mori<sup>1</sup>, C. Patuzzo<sup>1</sup>, G. Gambaro<sup>3</sup>, A. Lupo<sup>2</sup>, G. Santoro<sup>2</sup>, G. Zaza<sup>2</sup>, C. Fava<sup>2</sup>, P. Minuz<sup>2</sup>, D. Girelli<sup>2</sup>, N. Martinelli<sup>2</sup>, O. Olivieri<sup>2</sup>, F. Griggio<sup>4</sup>, M. Rossato<sup>4</sup>, M. Delledonne<sup>4</sup>, C. Bombieri<sup>1</sup>, E. Trabetti<sup>1</sup>, P.F. Pignatti<sup>1</sup>, G. Malerba<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dip. Neuroscienze, Biomedicina e Movimento, Universit degli Studi di Verona, Verona

<sup>2</sup>Dip. Medicina, Universit degli Studi di Verona, Verona

<sup>3</sup>Universit Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Roma

<sup>4</sup>Dip. Biotecnologie, Universit degli Studi di Verona, Verona

All'interno di uno studio volto ad individuare polimorfismi associati alla risposta a farmaci comuni per alcuni caratteri complessi si è analizzato l'esoma di 200 individui. Di questi, 50 soggetti appartengono allo studio INCIPE interessato a determinare la componente genetica nella malattia renale. La regione target (45 milioni di basi) è stata letta ad una profondità media di sequenziamento di 36x (con read 150PE) e con almeno 10 sequenze nel suo 85%. Abbiamo identificato oltre 50.000 varianti distribuite lungo tutto l'esoma. In alcune delle analisi preliminari abbiamo studiato i polimorfismi del gene HLA-C e ricercato varianti associate alla malattia renale. Lo studio del gene HLA-C (nei database pubblici sono descritte oltre 200 varianti alleliche) ha portato alla individuazione di 49 alleli dove le frequenze dei 5 alleli più comuni identificati (C\*07:01, C\*04:01, C\*12:03, C\*07:02, C\*06:02) mostrano una forte concordanza con quelle riportate per la popolazione italiana. Lo studio di associazione dell'esoma con la malattia renale (38 individui affetti) ha evidenziato 3 varianti di 3 geni diversi (HEL22, OAS2, IL1RL2; p< 0.00005). Curiosamente gli alleli di rischio sono comuni negli affetti e piuttosto rari negli individui non affetti studiati e nei database pubblici. Se confermati, questi risultati sottolineano l'importanza degli studi basati su sequenziamento poiché in grado di individuare anche varianti rare rilevanti per le malattie comuni; tali varianti, data la loro bassissima frequenza, sfuggono spesso agli studi basati sui DNA chip-array poiché non inclusi nei chip-array. In conclusione, i risultati preliminari dello studio dell'esoma mostrano che è possibile studiare le regioni altamente polimorfiche con opportuni strumenti bioinformatici e che 3 geni descritti in malattie autoimmuni potrebbero essere associati alla malattia renale.



**P309**  
**Espressione di miR-132 in soggetti con Sindrome di Down**

M. Salemi<sup>1</sup>, C. Barone<sup>1</sup>, M.G. Salluzzo<sup>1</sup>, M.C. Morale<sup>1</sup>, M. Giambirtone<sup>1</sup>, F. Scillato<sup>1</sup>, C. Romano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Associazione Oasi Maria SS. (IRCCS), Troina, Italia.

Premessa: La Trisomia 21 è la più frequente causa genetica associata alla disabilità intellettiva. MiRNAs sono brevi RNA non codificanti (~22 nucleotidi) che mediano il silenziamento di vari geni in una fase post-trascrizionale. I miRNA svolgono un ruolo nello sviluppo neuronale e nelle malattie neurodegenerative. MiR-132 (MIM 610016) mappa sul cromosoma 17p13.3 e sembra avere un ruolo nel sistema nervoso centrale: è stato coinvolto nella trasmissione sinaptica, nella plasticità neuronale, nella crescita arborizzazione dendritica, nei meccanismi di apprendimento e della memoria, oltre che nei meccanismi apoptotici. Inoltre è stata evidenziata una sovra-espressione del miR-132 nel cervello del topo con deficit cognitivo.

Obiettivi della ricerca: In questo studio abbiamo valutato l'espressione di miR-132 in leucociti di pazienti con sindrome di Down (SD) paragonati a soggetti di controllo normali.

Materiali e Metodi: Sono stati reclutati, presso l'IRCCS Associazione Oasi Maria SS. di Troina, complessivamente 46 soggetti, tra cui 23 pazienti con SD (12 maschi e 11 femmine, et 25-57 anni) e 23 soggetti normali (12 maschi e 11 femmine, et 22-55 anni). La quantificazione di miR-132 è stata eseguita tramite uno studio caso-controllo, in cui i soggetti normali sono stati accoppiati per il sesso ed et di +/- 3 anni. Gli esperimenti qRT-PCR per la quantificazione del miRNA sono stati eseguiti utilizzando il Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania). Le sonde TaqMan per il gene target miR-132 e il gene di riferimento GAPDH sono state ottenute da Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA). I trascritti amplificati sono stati quantificati utilizzando il metodo comparativo ΔΔCt e il software Light Cycler 1.5.

Risultati: Lo studio ha evidenziato un'espressione aumentata di miR-132 in 17 campioni di soggetti con SD, dei quali 11 hanno un valore di espressione maggiore di 2,5 volte rispetto al controllo relativo.

Conclusioni: Questi dati sono in accordo con i risultati riportati da altri autori che indicano una maggiore espressione di miR-132 nel cervello di topo con deficit cognitivo. In conclusione, i nostri risultati supportano la possibilità che miR-132 possa influenzare sia lo sviluppo cerebrale che la funzione cognitiva nei soggetti con SD.





