

COD. C01

Lesson from exome analysis of 150 trios with ASD

F. Mari^{1,2}, A. Currò^{1,2}, C. Fallerini¹, D. Lopergolo^{1,2}, M. Baldassarri^{1,2}, V. Lamacchia^{1,2}, M.G. Cannone¹, S. Croce¹, S. Daga¹, G. Doddato¹, E. Gelli¹, A. Giliberti¹, E. Lazzarini¹, F. Lorenzetti¹, M. Palmieri¹, S. Amitrano², M. Bruttini^{1,2}, F.T. Papa¹, R. Tita², C. Lorizzo², M.A. Mencarelli², A.M. Pinto², S. Buoni³, L. Radice², S. Grosso⁴, R. Canitano³, F. Ariani^{1,2}, S. De Rubeis⁵, A. Renieri^{1,2}

¹*Medical Genetics, University of Siena, Siena, Italy*

²*Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italy*

³*Child Neuropsychiatry, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italy*

⁴*Clinical Pediatrics, Department of Molecular Medicine and Development, University of Siena, Siena, Italy*

⁵*Department of Psychiatry, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA*

Here, we present data obtained from whole exome sequencing (WES) in 150 patients attending the Medical Genetics Unit of Siena and having a diagnosis of Autism Spectrum Disorders (ASD). All these patients have been evaluated by expert clinicians of our Institution and pathogenic CNVs have been ruled out as the cause of the disease. The project is part of an International effort aiming at identifying the genetic causes of ASD (Autism Sequencing Consortium, Mount Sinai). WES identified the genetic basis of disease in 36% of patients: 14% were already known disease genes and 22% were novel candidates. Among the known genes, SCN2A is recurrently mutated. Interestingly, SCN2A and KCNQ3 mutated patients do not show epilepsy, the key feature of the known associated phenotype. Our data also reinforce the association between SYNGAP1 and PHIP genes with ASD. From a clinical point of view, the identification of PHIP mutations teaches us not to underestimate more common signs such as obesity. PHIP binds the pleckstrin homology domain of insulin receptor substrate-1, a gene modulating insulin signalling and obesity can be a key clinical handle for the diagnosis of PHIP-related neurodevelopmental disorder. More attention has also to be paid to dysmorphology even if no other congenital anomalies are observed. PHIP patients show distinct facial features that can be recognizable such as large ears, thick eyebrows, upturned nose and thin lips. Among the X-linked mutated genes, we confirmed SLC6A8 and PCDH19 as ASD genes in males and females, respectively. Among the new candidates, we identified BCORL1, SLC12A2, CABLES1 and LYPLA2. BCORL1 is expressed in brain and reported mutated in two brothers with severe intellectual disability; SLC12A2 is a Na-K-Cl cotransporter highly expressed in human developing cortical neurons; CABLES1 is a gene required for embryonic neural development and LYPLA2 is a gene needed for axon growth and maintenance differentially expressed in ASD. In conclusion, in our experience, WES analysis has a high success rate in ASD patients. Moreover, these data confirm that ASD is an heterogeneous collection of different rare disorders. Reverse phenotyping in large cohorts will help to better characterize the distinct clinical signs associated to each ASD gene.

COD. C02

SINEUP, a modular long non-coding RNA technology as possible new therapeutic tool for haploinsufficiency: CHD8 and CHD2 loss of function mutations in Autism Spectrum Disorders (ASD) and Epilepsy as Proof-of-Principle

F. Di Leva¹, M. Arnoldi¹, A. Barbieri¹, G. Alvari¹, A. Messina², M.E. Castellini², S. Casarosa², G.L. Carvill³, S. Zucchelli^{4,5}, S. Gustincich^{4,6}, M. Biagioli¹

¹*NeuroEpigenetics lab, Center for Integrative Biology, University of Trento, Trento, Italy*

²*Neural Development and Regeneration lab, Center for Integrative Biology, University of Trento, Trento, Italy*

³*Ken and Ruth Davee Department of Neurology, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, USA*

⁴*Area of Neuroscience, Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati (SISSA), Trieste, Italy*

⁵*Department of Health Sciences, University of Eastern Piedmont 'A. Avogadro', Novara, Italy*

⁶*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 basis are prominent risk factors for both disorders and, among others, de novo inactivating mutations in genes of the chromodomain helicase DNA-binding (CHD) family have been reported to be directly causative to the diseases. Specifically, CHD8 represents a recurrent risk factor for ASD, while truncating pathogenic variants in CHD2 lead to epilepsy. CHD proteins function as an 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 follow and rescue in assessing new therapeutic approaches. Particularly, we aim to test SINEUP, a novel class of synthetic long non-coding RNA - 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. SINEUP activity depends on a binding domain (BD), conferring target specificity and on an effector domain (ED) required for protein translation. By swapping the BD sequence is virtually possible to target any gene of interest. Thus, we firstly 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 progenitors, in vitro cell system. From our preliminary observations SINEUP targeting internal methionine is more efficient in stimulating CHD8 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 represents the first step towards the development of new types of RNA-based therapy, with implications for a large repertory of presently incurable genetic diseases.

COD. C03

CHD8 suppression in neuronal progenitors correlates with alterations in chromatin landscape especially affecting transcriptional initiation and elongation.

E. Kerschbamer¹, T. Tripathi¹, S. Erdin^{2,3}, E. Sebestyen⁴, F. Di Leva¹, M. Benelli⁵, S. Piazza⁶, J.F. Gusella^{2,3}, F. Ferrari⁴, F. Demichelis⁷, M.E. Talkowski^{2,3}, M. Biagioli¹

¹*Neuro Epigenetics laboratory, Centre for Integrative Biology, University of Trento, Trento, Italy*

²*Center for Genomic Medicine, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, United States*

³*Department of Neurology, Harvard Medical School, Boston, MA, United States*

⁴*Computational genomics laboratory, IFOM, Milan, Italy*

⁵*Bioinformatics Unit, Hospital of Prato, Istituto Toscano Tumori, Prato, Italy*

⁶*Bioinformatic facility, Centre for Integrative Biology, University of Trento, Italy*

⁷*Laboratory of Computational and Functional Oncology, Centre for Integrative Biology, University of Trento, Trento, Italy*

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. 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. CHD8 suppression mildly affects the overall chromatin landscape leading to a generalized reduction in the number of peaks in actively transcribed (H3K36me3) and enhancer regions (H3K4me1 and H3K27ac). Particularly, transcriptional initiation and elongation chromatin states result the most significantly affected, highlighting genes implicated in "mitotic nuclear division", "cell cycle" and "mRNA processing" as the major dysregulated targets following CHD8 suppression. Moreover, by overlaying histone marks data with CHD8 binding sites, we observe that most chromatin changes seem to intervene in regions not-bound by CHD8, thus suggesting an 'indirect mode' of chromatin remodeling. Although as previously described, CHD8 binds at promoter and enhancer regions, in addition to a general decrease in CHD8 knock-down neural progenitors, H3K36me3 is more enriched in genes bound by CHD8 hinting to a possible connection between the gene-body histone mark and the protein binding at the TSS. Considering the role of H3K36me3 in the regulation of transcription and RNA processing -mainly splicing- we are currently exploring the functional effect of this altered chromatin state at global transcriptomic level. Thus, this study will shed light on possible regulatory mechanisms in the cross-talk between chromatin and transcriptional regulation, possibly relevant to a more specific understanding of ASD.

COD. C04

GATING-AFFECTING MUTATIONS IN KCNK4 CAUSE A RECOGNIZABLE NEURODEVELOPMENTAL SYNDROME

F.C. Radio¹, P. Calligari², V. Caputo³, M.L. Dentici¹, N. Falah⁴, F. High⁵, F. Pantaleoni¹, S. Barresi¹, A. Ciolfi¹, S. Pizzi¹, A. Bruselles⁶, R. Person⁷, S. Richards⁷, M.T. Cho⁷, D.J. Claps Sepulveda¹, S. Pro¹, R. Battini⁸, G. Zampino⁹, M.C. Digilio¹, G. Bocchinfuso², B. Dallapiccola¹, L. Stella², C.K. Bauer¹⁰, M. Tartaglia¹

¹*Genetics and Rare Diseases Research Division, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, 00146 Rome, Italy*

²*Department of Chemical Science and Technologies, University of Rome Tor Vergata, 00133 Rome, Italy*

³*Department of Experimental Medicine, Sapienza University of Rome, 00161 Rome, Italy*

⁴*Division of Clinical Genetics, Nemours Children's Hospital, Orlando, FL 32827, USA*

⁵*Medical Genetics, Mass General Hospital for Children, Massachusetts General Hospital, Boston, MA 02114-2696, USA*

⁶*Department of Oncology and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rome, Italy*

⁷*GeneDX, Gaithersburg, MD 20877, USA*

⁸*Department of Developmental Neuroscience, IRCCS Stella Maris, 56128 Calambrone, Italy*

⁹*Center for Rare Disease and Congenital Defects, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli, IRCCS, Università Cattolica del Sacro Cuore, 00168 Rome, Italy*

¹⁰*Center for Experimental Medicine, Institute of Cellular and Integrative Physiology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, 20246 Hamburg, Germany*

Aberrant activation or inhibition of potassium (K⁺) currents across the plasma membrane of cells has been causally linked to altered neurotransmission, cardiac arrhythmias, endocrine dysfunction, and perturbed developmental processes more rarely. KCNK4 (also known as TRAAK, TWIK-related arachidonic acid-stimulated K⁺ channel) belongs to the mechanogated ion channels of the TRAAK/TREK subfamily of two-pore-domain (K2P) K⁺ channels. While K2P channels are well-known to contribute to the resting membrane potential and cellular excitability, their involvement in pathophysiological processes remains largely uncharacterized. We report that de novo missense mutations in KCNK4 cause a recognizable syndrome with major features including distinctive facial gestalt, gingival overgrowth, hypertrichosis, intellectual disability, and epilepsy. Patch-clamp analyses documented an impressive gain-of-function of the identified KCNK4 channel mutants basally, and impaired mechanosensitivity. Co-expression experiments provided evidence of the dominant behavior of the disease-causing mutations. Remarkably, molecular dynamics simulations consistently indicated that mutations seal the lateral intramembrane fenestration proposed to negatively control K⁺ flow by allowing lipid access to the central cavity of the channel. Overall, our findings illustrate the pleiotropic effect of dysregulated KCNK4 function and provide support to the hypothesis of a gating mechanism based on the lateral fenestrations of K2P channels.

COD. C05

A NEW FUNCTIONAL ASSAY TO ASSESS THE PATHOGENICITY OF VUS IN DIAMOND BLACKFAN ANEMIA

A. Aspesi¹, M. Betti¹, M. Sculco¹, C. Actis¹, C. Olgasi¹, M.W. Wlodarski², A. Vlachos^{3,4}, J.M. Lipton^{3,4}, U. Ramenghi⁵, S.K. Kia⁶, H. Tamary⁷, C. Santoro¹, A. Follenzi¹, S.R. Ellis⁸, I. Dianzani¹

¹Department of Health Sciences, Università del Piemonte Orientale, Novara, Italy

²Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, Division of Pediatric Hematology and Oncology, Medical Center, Faculty of Medicine, University of Freiburg, Freiburg, Germany

³Feinstein Institute for Medical Research, Manhasset, NY, USA

⁴Division of Hematology/Oncology and Stem Cell Transplantation, Cohen Children's Medical Center of New York, New Hyde Park, NY, USA

⁵Department of Public Health and Pediatric Sciences, University of Torino, Torino, Italy

⁶Department of Clinical Genetics, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands

⁷Hematology Unit, Schneider Children's Medical Center of Israel, Petach Tikva, Israel

⁸Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Louisville, Louisville, KY, USA

Diamond-Blackfan anemia (DBA) is a rare genetic hypoplasia of erythroid progenitors characterized by mild to severe anemia and associated with physical malformations and increased risk of malignancies. Heterozygous pathogenic variants in 19 Ribosomal Protein (RP) genes have been identified in approximately 70% of DBA patients. RPS19 is the most frequently mutated gene and accounts for 25% of cases.

Clinical manifestations in DBA patients are quite variable and genetic testing has become a critical factor in establishing a diagnosis of DBA. While many of the mutations found in RP genes are nonsense, frameshift, and splice site variants that can be easily interpreted as pathogenic, the classification of missense variants and small in-frame indels remains often controversial.

Our group recently characterized the phenotype of lymphoblastoid cell lines established from DBA patients with pathogenic lesions in RPS19 and observed that defective pre-rRNA processing, a hallmark of the disease, was rescued by lentiviral vectors expressing wild-type RPS19. This approach represents a new functional complementation assay that we exploited to discriminate pathogenic variants that result in DBA from benign variants that have no effect on protein function. For functional testing we selected RPS19 variants of unknown significance (VUS) already described in the literature as well as newly identified VUS.

Our results show that one missense variant (c.281G>T p.Arg94Leu) previously observed in a DBA patient and reported as pathogenic, does not impair protein function and should be reclassified as benign. All other studied VUS (c.1A>G p.Met1?, c.37_39delGAG p.Glu13del, c.62T>C p.Phe21Ser, c.178A>C p.Thr60Pro, c.187_189insCAC p.His63dup, c.301C>G p.Arg101Gly, c.305G>C p.Arg102Pro, c.338_340delTGG p.Val113del, c.353A>G p.Asp118Gly and c.406G>T p.Gly136*) were pathogenic, including two rare variants (c.68A>G p.Lys23Arg and c.164C>T p.Thr55Met) found in population databases (ESP and ExAC).

Our strategy allows to achieve a more reliable interpretation of RPS19 sequence changes and clarify their clinical significance, thus improving the counseling and management of DBA patients and their families.

COD. C06

Clinical, molecular and functional characterization of pathogenetic variants in EXT1 and EXT2 genes in a cohort of 114 Italian families with Hereditary Multiple Exostoses.

C. Fusco¹, G. Nardella^{1,2}, F. Annunziata¹, M. Copetti³, V. Guarneri¹, A. Petracca¹, L. Micale¹, T. Biagini⁴, R. Fischetto⁵, C. Caldarini⁶, S. Morlino⁷, L. D'Agruma¹, A. De Luca¹, M. Castori¹

¹*Division of Medical Genetics, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, Italy.*

²*Department of Experimental Medicine, Sapienza University of Rome, Rome, Italy.*

³*Unit of Biostatistics, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, Italy.*

⁴*Bioinformatics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, Italy.*

⁵*Unit of Metabolic Disease and Medical Genetics, University Hospital, P.O. Giovanni XXIII, Bari, Italy.*

⁶*Orthopedic Traumatology Center, Orthopedic and Traumatological Clinic Operating Unit, Milan, Italy.*

⁷*Laboratory of Medical Genetics, Department of Molecular Medicine, University "La Sapienza", San Camillo-Forlanini Hospital, Italy.*

Hereditary multiple exostoses (HME) is an autosomal dominant skeletal dysplasia characterized by the formation of benign cartilage-capped bone tumors. It is associated with pathogenetic variants in EXT1 and EXT2, encoding glycosyltransferases involved in the biogenesis of heparan sulphate. EXT proteins localize at Golgi apparatus, a relevant subcellular compartment where glycosyltransferases function. We collected 114 index patients and 39 additional affected relatives. A total of 82 different variants were identified: 41.4 % frameshift, 31.7% nonsense, 14.6 % missense, 9.7% splicing and 4.8% intragenic rearrangements. 35 recurred in multiple families and 47 were single findings; 78 families had mutations in EXT1 while 36 in EXT2. Genotype-phenotype correlation reported that EXT2 involvement is significantly associated with increased number of exostoses throughout the skeleton and that among EXT2 patients, females bear a significantly higher number of exostoses. In order to investigate whether EXT1/2 mutations interfere with the Golgi localization of the aberrant proteins, we examined the localization of a set of novel variants (1 frameshift and 1 nonsense in EXT1, 2 frameshift and 1 missense in EXT2) by confocal studies immunostaining for GALNT2. Remarkably, EXT proteins colocalize with GALNT2 while EXT mutant proteins lose Golgi localization by surrounding the nucleus and assuming a diffuse intracellular distribution. It is known that the EXT1 and EXT2 physiologically colocalize each other to catalyze their glycosyltransferase activity. Thus we verified that EXT mutants failed their ability to colocalize. Moreover, since EXT1 and EXT2 act as cell cycle regulators, we wondered if EXT1/2 mutations might affect proliferation. In a proliferation study, cells expressing EXT mutant proteins proliferated more slowly than cells expressing the corresponding wild-type proteins. Our results suggest that EXT1/2 mutations interfere with the EXT physiological functions by altering their localization and their proliferative capacity. Our study expands the EXT1/2 mutational and genotype-phenotype correlations spectrum, and gives novel insights on the pathogenesis of HMD. Hopefully, these findings will offer initial clues and novel options to improve clinical management.

COD. C07

Alone together: analysis of whole genome sequence data from Italian isolated cohorts in the context of the Italian genetic pool

M. Mezzavilla¹, M. Cocca¹, C. Barbieri², M.P. Concas¹, I. Gandin³, M. Brumat³, A. Robino¹, L. Rampoldi⁷, M. Trudu⁷, C. Sala², D. Vuckovic^{3,6}, G. Matullo⁴, O. Polasek⁵, G. Girotto³, N. Soranzo⁶, D. Toniolo², P. Gasparini^{1,3}

¹*Institute for Maternal and Child Health - IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste, Italy*

²*Division of Genetics and Cell Biology, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy*

³*University of Trieste, Trieste, Italy*

⁴*University of Torino, Torino, Italy*

⁵*University of Split, Split, Croatia*

⁶*Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, UK*

⁷*Molecular Genetics of Renal Disorders Unit, Division of Genetics and Cell Biology, San Raffaele Scientific Institute, Milan*

Large sequencing projects have identified the majority of common variants and millions of rare and low frequency variants. However in the available human genome reference sequence data sets (i.e 1000G PH3, ExAC databases, etc.) , Southern European populations are highly underrepresented. To fill this gap, we performed the sequencing of 947 Italian genomes from three different geographical areas. In particular our samples are coming from North-West (Val Borbera), North-East (Friuli Venetia Giulia) and South-East (Carlantino). We investigated population structure, patterns of natural selection, enrichment in carriers of deleterious variants and human knockouts (hKO). Finally, with our dataset of WGS from Southern Europe a reference panel (IGRP1.0) was assembled for imputation and then used in a series of GWAS studies for its testing and validation. We discovered that the majority of deleterious variants between 5 allele counts and 5% MAF have higher frequency in our populations with respect to the only available Italian reference population: Tuscans from 1000 Genome project, (15284 variants in FVG, 9370 CAR, 17999 VBI). Among the genes with signature of selection between North and South Italians (492), few carry deleterious variants with higher number of carriers in our populations respect to TSI (18.9%). In this group we found RBFOX1 (associated with neurological traits), PTPRD (T2D) and FHIT (BMI). Homozygote loss of Function (LoF) variants represent examples of human KO (hKO). In our cohorts, 478 LoF presenting with a CADD score >20 were found at homozygous state in at least one individual in one population. Several hKO were found in keratin genes, in particular two different stop gain mutations were found in KRT83. Finally, we validated our reference panel by GWAS analysis of red blood cells traits, finding significant association ($p < 3.67E-10$) for several blood traits with the pathogenic variant rs11549407 in HBB gene. Concluding, the availability of a catalogue of rare and common deleterious variants will improve the accuracy and efficacy of a series of genetics/genomics studies opening new perspectives for precise medicine and drug targets identification.

COD. C08

2127 genetic diagnoses of dystrophinopathies within the DMD Italian Network: report and reflections impacting on care and therapies.

M. NERI¹, A. MAURO¹, F. GUALANDI¹, R. SELVATICI¹, M.S. FALZARANO¹, R. ROSSI¹, C. TRABANELLI¹, P. RIMESSI¹, M. FABRIS¹, F. FORTUNATO¹, S. MESSINA², V.A. SANSONE³, S. TEDESCHI⁴, E. PEGORARO⁵, L. POLITANO⁶, E. BERTINI⁷, G.P. COMI⁸, V. NIGRO⁹, E. MERCURI¹⁰, A. FERLINI¹

¹Unit of Medical Genetics, Department of Medical Sciences, University of Ferrara, Ferrara, Italy

²Department of clinical and experimental medicine, University of Messina and Nemo Sud Clinical Center, Messina, Italy

³Neurorehabilitation Unit, Dept. Biomedical Sciences for Health, University of Milan, Centro Clinico NEMO Milan, Italy

⁴Medical Genetic Unit, IRCCS Foundation Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

⁵Neuromuscular Center, Department of Neurosciences, University of Padua, Padua, Italy

⁶Cardiomyology and Medical Genetics, Department of Experimental Medicine, University of Campania, Naples, Italy

⁷Bambino Gesù Children's Hospital, Rome, Italy

⁸Neuroscience Section, Department of Pathophysiology and Transplantation, Dino Ferrari Center, IRCCS Foundation Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, University of Milan, Milan, Italy

⁹Dipartimento di Medicina di Precisione, Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli", Naples, Italy

¹⁰Centro Clinico Nemo, Policlinico A. Gemelli, and at the Paediatric Neurology Unit, Catholic University of the Sacred Heart, Rome, Italy

Dystrophinopathies are allelic diseases caused by mutations in the dystrophin gene. Genetic diagnosis of dystrophinopathies is complex but genotype profiling is currently mandatory both for appropriate care, including prevention, and for eligibility to clinical trials. The DMD Italian network is composed by 11 centers offering dystrophin genetic analysis. 2127 patients were referred and genotyped. Among these, DMD were 59% and BMD 41% revealing a very high number of BMD phenotypes referred for diagnosis.

Among DMDs, 58% carried deletions, 11% duplications and 30% small mutations. BMDs show 78% of deletions, 9% of duplications and 13% of small mutations. Notably, the percentage of small mutations in DMD is higher than those reported; similarly BMDs do show a very high number of deletions, and small mutations are more frequent than duplications. Among small mutations 45% (DMD) and 33% (BMD) are nonsense; 62,8 % of out-of-frame deletions are eligible for single exon skipping (17,8% for exon 53 skipping, 17% for exon 51 skipping, 16,6 % for exon 45 skipping, and 11,4% for exon 44 skipping).

Among all diagnosed DMDs/BMDs, 10,5% remained orphan of a causative mutation. In these case revising the clinical diagnosis (especially the muscle biopsy results) is necessary, although this might also imply that atypical mutations may occur in a remarkable number of DMD and third level of genetic diagnosis (CGH or RNA profile) are needed. Our large patient cohort fully analyzed for DMD mutations allows a many reflections about DMD/BMD genotypes, mutation detection and mutation types percentage with repercussion on care and new therapies designing.

*Italian DMD Consortium

Fiorillo C, Bruno C, Santorelli FM, Astrea G, Tessa A, Magri F, Del Bo R, Moggio M, D'Amico A, Travaglini L, Castori M, Piemontese MR, Merla G, Cau M, Piras R, Melis MA, Boccone L, Marica M, Pastorino M, Festa S, Scuderi C, Borgione E, Lo Giudice M, Mela J, Giardina E, Vita GL, Bello L, Albamonte E

COD. C09

The longevity SNP rs2802292 uncovered: HSF1 activates stress-dependent expression of FOXO3 through an intronic enhancer.

V. Grossi¹, G. Forte², P. Sanese¹, A. Peserico¹, T. Tezil¹, M. Lepore Signorile^{1,3}, C. Fasano², V. Celestini^{1,4}, A.R. Minafra¹, V. Disciglio², F. Cariola², A. Di Carlo², A. Manghisi², F. Guglielmi², Rosaura Lovaglio¹, R. Bagnulo¹, D.C. Loconte¹, F.C. Susca¹, N. Resta¹, C. Simone¹

¹*Medical Genetics, Department of Biomedical Sciences and Human Oncology (DIMO), University of Bari Aldo Moro, Bari 70124, Italy*

²*Medical Genetics, National Institute of Gastroenterology "S. de Bellis" Research Hospital, Castellana Grotte (Ba) 70013, Italy*

³*Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, 00161 Rome, Italy*

⁴*Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology/Laboratory of Molecular Biology, IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche 'Mario Negri', Milano, 20156, Italy*

Cellular homeostasis is dependent upon the interaction between genes and the environment, and relies on the coordinated regulation of interlinked molecular processes including stress resistance (antioxidant defense, heat protection, protein degradation, glycogen storage, DNA repair, metabolism). These pathways ultimately lead to the activation of stress resistance transcription factors, such as HSF1 and FOXO3 which in turn regulate interconnected gene expression networks that are evolutionarily conserved from yeast to mammals. In humans, the rs2802292 G-allele at FOXO3 locus has been associated with longevity in all human populations tested; moreover, its copy number correlated with reduced frequency of age-related diseases in centenarians. At the molecular level, the intronic rs2802292 G-allele correlated with increased expression of FOXO3, suggesting that FOXO3 intron 2 may represent a regulatory region. Here we show that the 90 bp sequence around the intronic SNP rs2802292 at FOXO3 locus has enhancer properties, and that HSF1 binding to this region through a novel HSE binding site created by the rs2802292 minor G-allele promotes expression of FOXO3 in response to diverse stress stimuli. Molecular analyses carried out in various established cell lines, primary cultures and human near-haploid HAP1 isogenic cells (G/T) generated by the CRISPR/Cas9 system for genome editing revealed that HSF1 mediates the occurrence of physical and functional interactions between the 5'UTR and the rs2802292 region at FOXO3 locus thereby activating their enhancer functions. These data are in agreement with a recent work showing that, when stimulated by oxidative stress, the FOXO3 locus could activate several cis-regulating elements located at intron 2 forming a larger functional unit that could represent a chromatin domain defining an aging hub. Our functional studies highlighted the importance of the HSF1-FOXO3-SOD2/CAT/GADD45A cascade in cellular stress response and survival by promoting ROS detoxification, redox balance and DNA repair. Our findings suggest the existence of an HSF1-FOXO3 axis in human cells that could be involved in stress response pathways functionally regulating lifespan and disease susceptibility.

COD. C10

Genomics and functional studies to dissect the molecular bases of complex traits: the example of Age Related Hearing Loss (ARHL)

G. Giroto¹, M. Brumat¹, M. Di Stazio², E. Campana¹, M. Cocca², M. La Bianca², U. Ambrosetti³, A. Morgan¹, P. Gasparini¹

¹University of Trieste (Medical Sciences, Chirurgical and Health Dep.)/IRCCS Burlo Garofolo

²IRCCS Burlo Garofolo

³Univ. Milano U.O.C. Audiologia/Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italy.

To increase our knowledge on the genetics of ARHL, we developed a multi-step strategy combining GWAS with TRS and functional validation. GWAS on ARHL were performed on ~4150 subjects coming from different European and Asiatic cohorts, revealing a series of candidate genes. To fine-map the impact of these findings, we developed a custom TRS panel of 46 candidate genes on 500 ARHL patients. TRS data were filtered according to quality, pathogenicity prediction and conservation score and their frequency checked in an internal database of 1071 WGS healthy individuals. To define the pathogenic mechanisms of the most interesting variants, in vitro and in vivo experiments were carried out. Fifty-six variants of interest, affecting 22 genes (expressed in the mouse/zebrafish inner ear) and 128 patients, were identified. In particular, two interesting genes are here detailed: 1) DCLK1: a novel heterozygous missense variant has been detected in 1 ARHL patient. qRT-PCR studies revealed no differences in the levels of mRNA between the WT and the mutant while WB showed an increased amount of the mutated protein. Dclk1 K/O mouse model displayed a late onset and progressive hearing loss up to 12 months old; 2) SLC9A3R1: an ultra-rare heterozygous missense variant was detected in 2 ARHL unrelated patients. The zebrafish KI model revealed a reduced auditory response at all frequencies and a significant variation in the total volume of the saccular otolith in Slc9a3r1^{-/-} compared to Slc9a3r1^{+/+} and Slc9a3r1^{+/-} animals. Furthermore, 8 new candidate genes (BHMT, CLIC5, DNAH5, ACSM5, HTR4, SHANK2, SLC12A7, SUCLG2) were detected as statistically significant associated with ARHL trait. In particular, DNAH5 (topSNP=2.92E-10) has been already described as a marker gene for vestibular cells (PMID:28689068) and CLIC5 (topSNP=9.40E-09) as involved in progressive hearing loss and vestibular dysfunction (PMID:24781754). These results support the usefulness of our approach in detecting and validating new ARHL candidate genes. In vitro studies represented a critical checkpoint for a deep phenotypic characterization, based on the generation of KI or KO animal models. Updated results and functional data on the remaining genes/mutations will be presented and discussed.

COD. C11

The genetic interaction between Tbx1 and Vegfr3 in lymphangiogenesis in mice

S. Martucciello^{1,3}, M.G. Turturo², S. Cioffi², A. Baldini^{2,4}, E. Illingworth^{1,2}

¹University of Salerno, Fisciano, Italy

²Institute of Genetics and Biophysics "ABT", CNR, Naples, Italy

³IRCCS Neuromed, Pozzilli, Italy

⁴University of Naples, Federico II, Naples, Italy

Tbx1 is the major gene implicated in 22q11.2 deletion syndrome. The complex clinical phenotype includes vascular anomalies and a very recent report has presented new cases of primary lymphedema and other lymphatic anomalies in 22q11.2DS patients. In mice, loss of Tbx1 is associated with a strong reduction in lymphatic vessel density in most tissues and downregulation of Vegfr3. We are evaluating the genetic interplay between Tbx1 and Vegfr3 in lymphatic vessel development in mice. To test for a genetic interaction between Tbx1 and Vegfr3, we analysed cardiac lymphangiogenesis in conditional double heterozygous (Tbx1^{Cre/+};Vegfr3^{flox/+}) embryos at E18.5. We also generated a transgenic mouse that expresses Vegfr3 upon Cre recombination (TgVegfr3) that would allow us to manipulate Vegfr3 expression in vivo in a tissue- and time-specific way. Surprisingly, we found that restoring Vegfr3 expression in Tbx1 mutants does not rescue the lymphatic defects in these mutants, indeed it aggravates them. Our results reveal a strong interaction in cardiac lymphangiogenesis. In Tbx1^{Cre/+}; Vegfr3^{flox/+} embryos, lymphatic vessels were strongly reduced on the ventral and on the dorsal side of the heart. This phenotype is much more severe than that seen in Tbx1 or Vegfr3 heterozygous embryos. In addition, vessel morphology was altered. Moreover, we show that the Vegfr3 transgene was able to rescue partially the lymphatic defects in the compound heterozygotes. This is the first evidence that Tbx1 and Vegfr3 interaction genetically in lymphangiogenesis. Our data support the hypothesis that lymphatic hypoplasia in Tbx1 mutants is secondary to reduced Vegfr3 expression and they suggest that cardiac lymphangiogenesis is sensitive to Tbx1 and Vegfr3 dosage.

COD. C12

Genotype -phenotype correlations in primary Coenzyme Q10 deficiency and interdependency between Coenzyme Q10 biosynthesis and respiratory chain organization

E. Trevisson^{1,2}, M.A. Desbats^{1,2}, V. Morbidoni^{1,2}, L. Morbiato^{1,2}, L. Vazquez-Fonseca^{2,1}, G. Brea-Calvo³, S. Cogliati^{4,5}, J.A. Enriquez^{4,5}, L. Scorrano⁶, F. Pierrel⁷, P. Navas³, L. Salviati^{1,2}

¹*Clinical Genetics Unit, Department of Women's and Children's Health, University of Padova*

²*Città della Speranza, Istituto di Ricerca Pediatrica, IRP*

³*Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, Spain*

⁴*Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III. Melchor Fernandez Almagro, Madrid, Spain*

⁵*CIBERFES. Melchor Fernandez Almagro, Madrid, Spain*

⁶*Venetian Institute of Molecular Medicine VIMM, Padova, Italy*

⁷*Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), TIMC-IMAG, Grenoble, France.*

Background: Coenzyme Q10 (CoQ) is a lipid that exerts crucial function within cells, being an antioxidant and an electron shuttle in the mitochondrial respiratory chain. Its biosynthesis in eukaryotes requires the concerted action of over a dozen of proteins (COQ proteins). In yeast these proteins are organized in a multienzymatic complex (CoQ biosynthetic Complex QBC) and their enzymatic functions are conserved for several of their corresponding mammalian orthologues. However, some COQ proteins still lack a defined function. Mutations in 9 COQ genes have been associated with primary CoQ deficiencies, which may manifest with a broad clinical spectrum, ranging from fatal neonatal diseases to adult-onset encephalopathy. Aim of the study: we aim at characterizing COQ proteins with unknown function, studying the QBC in humans and analyzing mutants in order to establish possible genotype-phenotype correlations. Material and methods: we employed human and yeast cells to analyze the effects of mutants using complementation assays. We edited the genome of human cell lines using the Talen or CRISPR/Cas9 technologies to delete different COQ genes and analyze the effects on the QBC. Results: for some COQ genes (COQ2, PDSS2) we demonstrated that clinical severity in patients inversely correlated with the residual activity of the mutant alleles. We also proved that COQ proteins in humans form a multisubunit complex, that comigrated by BN-PAGE with Respiratory Chain Supercomplexes (RCS). Moreover, COQ proteins co-immunoprecipitated with proteins from complexes I, II and III, indicating a physical association between COQ complexes and RCS. Interestingly, cells lacking distinct COQ proteins (COQ2, COQ4, COQ6) display defects in RCS assembly and cells showing defects in RCS assembly have reduced QBC complexes and a lower CoQ biosynthetic rate. COQ proteins appear involved in RCS organization through CoQ biosynthesis, since pharmacological inhibition of CoQ also decreased RCS levels. Conclusion: we established some genotype-phenotype correlations in CoQ deficiency and demonstrated an interdependency between CoQ biosynthesis and RC organization in mammalian cells. PRIMARY COENZYME q10 DEFICIENCY

COD. C13

Definizione del fenotipo dopo WES: genetica avanzata e reverse phenotyping in pazienti con diagnosi di sindrome nefrosica.

S. Landini¹, a. Provenzano¹, v. Palazzo², e. Bosi¹, r. Artuso², a. La Barbera¹, p. Reho¹, a. Pagliuzzi¹, f. Peluso¹, I. Dosa², g. Traficante², s. Bargiacchi², I. Giunti², f. Becherucci³, b. Mazzinghi³, r. Roberto³, g. Sansavini¹, m. Allinovi¹, p. Romagnani^{1,3}, s. Giglio^{1,2}

¹*Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche "Mario Serio", Università degli Studi di Firenze, Firenze, Italia*

²*SOC di Genetica Medica, Azienda Universitaria-Ospedaliera "Anna Meyer", Firenze, Italia*

³*SOC di Nefrologia e Dialisi, Azienda Universitaria-Ospedaliera "Anna Meyer", Firenze, Italia*

La sindrome nefrosica (SN) nei pazienti pediatrici è un disordine clinico che può includere, oltre a grave proteinuria, disturbi sottostanti per lo più sconosciuti, con risposte variabili a farmaci immunosoppressori ed esiti eterogenei. Abbiamo suggerito che il sequenziamento dell'intero esoma (WES) per individuare geni nefropatici possa migliorare la diagnosi, la previsione dei risultati e la stratificazione dei pazienti per trattamenti personalizzati. Abbiamo quindi combinato l'inquadramento clinico con WES in circa 120 pazienti con grave proteinuria e diagnosi di glomerulosclerosi focale segmentaria (GSFS), al fine di espandere le nostre conoscenze sull'eziopatogenesi della SN. Abbiamo quindi convalidato tutte le varianti potenzialmente patogeniche, anche in base alla segregazione familiare. Una causa genetica è stata identificata in circa 62% dei casi, dove insieme a varianti patogenetiche in geni podocitari (29% dei casi), abbiamo trovato varianti in geni che sono stati associati a anomalie congenite delle vie urinarie, malattie della membrana glomerulare, ciliopatie o tubulopatie, spesso con genotipi complessi, senza le caratteristiche maniglie diagnostiche atte a riconoscere questi disordini. 100% dei pazienti con SN sensibile ai trattamenti cortisonici/immunosoppressori non ha mostrato varianti potenzialmente patogene. L'analisi multivariata ha identificato i test genetici come l'unico predittore dell'esito della malattia, che giustifica l'arresto o l'eliminazione di farmaci immunosoppressivi non necessari. I nostri risultati suggeriscono che una proteinuria in range nefrosico e diagnosi istologica di FSGS non sono sempre sinonimo di SN, ma possono anche essere segni di altre patologie renali che si manifesteranno successivamente con segni clinici più chiari. Un preciso inquadramento fenotipico e WES aumentano il tasso diagnostico di SN e rivelano un'inattesa diversità di geni nefropatici causali. La diagnosi personalizzata basata su WES, oltre a rendere più precisa la consulenza genetica per tutta la famiglia, basilare anche in previsione di trapianto renale, può predire l'esito della malattia e influenzare i trattamenti, evitando al paziente la somministrazione di quelli inutili e spesso dannosi.

COD. C14

Trio whole exome sequencing (WES) e disturbi del sistema immunitario: scoperta di due nuovi geni malattia ed espansione del fenotipo immunologico nella sindrome di Nasu-Hakola

E. Errichiello¹, A. Licari², P. Merli³, R. Carsetti⁴, S. Volpi⁵, T. Mattina^{6,7}, O. Zuffardi¹

¹*Genetica Medica, Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Pavia*

²*Immuno-Allergologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia*

³*Dipartimento di Onco-Ematologia e Terapia Cellulare e Genica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma*

⁴*Diagnostica Immunologica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma*

⁵*Clinica Pediatrica e Reumatologia, IRCCS Ospedale Gaslini, Genova*

⁶*Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e Tecnologie Avanzate "G.F. Ingrassia", Università degli Studi di Catania*

⁷*Centro di Riferimento Regionale per la Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Vittorio Emanuele, Catania*

Mediante analisi dell'esoma nel trio abbiamo identificato due nuovi geni associati a disturbi del sistema immunitario, POU2F2 e DENND1B, mentre è stato ampliato il fenotipo immunologico della sindrome di Nasu-Hakola (NHD) associata a TREM2.

Famiglia A. Madre e figlia affette da deficit di risposta anticorpale alle vaccinazioni. Test di proliferazione linfocitaria al tossoide tetanico e ditterico alterato, deficit selettivo di cellule B memoria. L'analisi WES ha identificato in entrambi una variante frameshift eterozigote in POU2F2 (c.1285dupC;p.Leu429ProfsTer73), gene intollerante a varianti loss-of-function (pLI=0.97) che codifica per un fattore di trascrizione cruciale nell'espressione delle Ig nei centri germinativi. La variante, non riportata in gnomAD, segrega nella famiglia e risulta de novo nella madre. Topi knock-out eterozigoti mostrano fenotipo sovrapponibile. Saggi funzionali in vitro hanno confermato un deficit di cellule B memoria switched e la riduzione di espressione delle Ig superficiali ed intracellulari in entrambi i pazienti.

Famiglia B. Padre e figlio con iperpiressia e acrocianosi. Agli esami ematochimici, aumento degli immunocomplessi circolanti e riduzione di proteina C/S libera e fattore VII. L'analisi WES ha evidenziato in entrambi una variante eterozigote in DENND1B (c.918T>G;p.Asp306Glu), assente in soggetti sani del ramo paterno. La variante, assente in gnomAD, coinvolge il dominio cDENN coinvolto nello scambio GTP-GDP nel pathway MAPK. DENND1B interagisce con NEK7, mediatore essenziale nel pathway NLRP3/inflammasoma. Come confermato dall'overespressione di IFI27 (interferon alpha-inducible protein 27) nei pazienti, la variante determina gain-of-function.

Famiglia C. Paziente con alopecia, fratture ricorrenti, malassorbimento, spasmi muscolari ed autoimmunità; dai 40 anni comparsa di sintomi neurologici. L'analisi dell'esoma ha identificato una variante di splicing omozigote in TREM2 (c.482+2T>C), associata a NHD, in cui ad oggi non sono mai state riportate alterazioni del sistema immunologico nell'uomo. Tuttavia, topi knock-out omozigoti per TREM2 e TYROBP (l'altro gene associato a NHD) mostrano un fenotipo immunologico sovrapponibile a quello del nostro paziente, con livelli anomali di citochine proinfiammatorie ed autoanticorpi.

COD. C15

de novo unbalanced translocations have a complex history/aetiology

M.C. Bonaglia¹, N.E. Kurtas², E. Edoardo², B. Sara¹, S. Beri¹, M.M. Mehrjouy³, A. Provenzano⁴, D. Vergani², V. Pecile⁵, F. Novara², P. Reho², M.C. Di Giacomo⁶, G. Discepoli⁷, R. Giorda⁸, D.N. Abuelo¹⁴, S. Giglio⁴, I. Ricca¹⁵, F. Franchi¹¹, P. Patsalis¹², C. Sismani¹², M.a. Mori¹³, J. Nevado¹³, N. Tommerup³, O. Zuffardi²

¹*Cytogenetics Laboratory, Scientific Institute, IRCCS Eugenio Medea, Bosisio Parini, Lecco, Italy.*

²*Department of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*

³*Department of Cellular and Molecular Medicine (ICMM), University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark*

⁴*Medical Genetics Section, Department of Clinical Pathophysiology, University of Florence, Florence, Italy*

⁵*Institute for Maternal and Child Health, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste, Italy*

⁶*Laboratorio di Citogenetica U.O.C. Anatomia Patologica AOR Ospedale San Carlo, Potenza, Italy*

⁷*Laboratorio di Genetica Medica - SOD Clinica Pediatrica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti, Ancona, Italy*

⁸*Molecular Biology Laboratory, Scientific Institute, IRCCS Eugenio Medea, Bosisio Parini, Lecco, Italy.*

⁹*IRCCS Fondazione Stella Maris, Pisa, Italy*

¹⁰*Medical Genetics Laboratory, Azienda Ospedaliera di Reggio Emilia, Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia, Italy.*

¹¹*Department of Cytogenetics and Genomics, The Cyprus Institute of Neurology and Genetics, Nicosia, Cyprus.*

¹²*Section of Functional and Structural Genomics Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM)-IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain*

Background

We provide a definitive answer for the mechanisms of origin of 52 de novo unbalanced translocations, consisting in a terminally deleted or inverted-duplicated deleted 46th chromosome to which the distal portion of another chromosome or its opposite end was transposed.

Methods

Array-CGH, whole-genome mate-pair sequencing and/or qPCR, and FISH analysis were applied together with trio genotyping.

Results

The duplicated region was of maternal origin in more than half of the de novo unbalanced translocations, with 25% of them showing two maternal and one paternal haplotypes. Thus, non-disjunction at maternal meiosis-I, followed by trisomy rescue of at least the distal region of the supernumerary maternal chromosome through a chromotripsis-mediated event, underlies a major fraction of de novo unbalanced translocations. An increased maternal age not only support this, but also an underlying trisomy rescue following a maternal meiotic-II non-disjunction in cases in which the maternal duplication has the same haplotype. Asymmetric breakage of an original dicentric in which the two resulting chromosomes, one being deleted and the other inverted-duplicated and deleted, are repaired by telomere capture, appear responsible not only for all inv-dup del translocations but also for some of the simple ones. In all cases, the signature at the translocation junctions was that of non-homologous end joining rather than non-allelic homologous recombination.

Conclusions

Our data show that the formation of these de novo rearrangements takes place in stages, where a first event, meiotic in some cases and post-zygotic in others, is followed by a series of post-zygotic adjustments where the retained segment is either attached to a terminal region of a non-homologous donor chromosome, or to the other end of the same chromosome, in both cases associated with the simultaneous deletion of the terminal part of the donor chromosome. Since a biparental origin of the deletion and duplication a priori would be expected in half of the cases, the high prevalence of cases where both imbalances have the same parental origin, support that most of the adjustment events occur in the very early embryo when a distinct compartmentalization of the two sets of parental chromosomes may still be present. Our data imply that there is no risk of recurrence in the following pregnancies for any of the de novo unbalanced translocations we discuss here.

COD. C16

Low-level mosaicism in focal malformations of cortical development: implementing the diagnostic workflow in the next-generation sequencing era.

V. Cetica¹, D. Mei¹, V. Ariu¹, E. Parrini¹, E. Cellini¹, C. Barba², M. Montomoli², C. Bianchini¹, V. Conti¹, R. Guerrini²

¹Laboratory of Neurogenetics and Neurobiology, Child Neurology Unit, Children's Hospital A. Meyer, Florence

²Child Neurology Unit, Children's Hospital A. Meyer, Florence

Focal malformations of cortical development (FMCDs), including focal cortical dysplasia (FCD) and hemimegalencephaly (HME), are caused by activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway and represent the most important causes of surgically treated intractable childhood epilepsy. Mutations in the PI3K-AKT-mTOR signalling pathway genes are frequently observed with a low level of mosaicism, and are often undetectable using conventional Sanger sequencing. Even if the use of next generation sequencing, such as whole-exome sequencing (WES) or targeted panel sequencing, facilitates the detection of low level mosaicism in these patients, clinical testing for mosaic mutations is still challenging and the percentage of undiagnosed patients remains high. We performed targeted NGS of 64 genes belonging to the mTOR pathway in 250 patients with epilepsy, with or without cognitive impairment, macrocephaly, and focal or diffuse anomalies of cortical development. We used a Nextera Rapid Capture Enrichment protocol and sequenced at a depth > 1000x. We analyzed data with different bioinformatic tools in order to fine-tune the balance between true low-level variants and sequencing errors. We also tested different molecular confirmation techniques for low-level mutations. We found causative mutations in 30 patients; in particular, 15 patients carried a mosaic mutation (percentage of mosaicism ranging 2% to 25%). For some patients we were able to analyze DNA purified from multiple tissues (blood, brain, saliva, fibroblasts) and found different percentages of mosaicism in the different analyzed tissues. We propose that an optimized algorithm based on an appropriate NGS strategy and a specific bioinformatic pipeline would permit to improve the efficacy in the detection of mosaic mutations in focal malformations of cortical development, in order to provide patients with a molecular diagnosis and to help clinicians to set the proper treatment option. Many clinical trials testing mTOR inhibitors are ongoing and patients diagnosed with germinal or somatic mutations in genes belonging to the mTOR pathway could become, in a near future, eligible for these innovative treatments.

COD. C17

Discovering shared genetic variants between two neural crest cells-derived tumors: neuroblastoma and malignant cutaneous melanoma

M. Avitabile^{1,2}, M. Succoio³, A. Cardinale^{1,2}, D. Formicola³, S. Cantalupo³, M. Esposito^{1,2}, F. Cimmino^{1,2}, P. Ghiorzo⁴, F. Romano¹, S. Staibano¹, E. Scalvenzi¹, J. Maris⁵, S. Diskin⁵, A. Testori¹, M. Law⁶, M. . Iles⁷, N. Zambrano^{1,2}, A. Iolascon^{1,2}, M. Capasso^{1,2,3}

¹Università degli Studi di Napoli Federico II

²CEINGE Biotechnologie Avanzate

³IRCSS SDN, Napoli

⁴Università degli Studi di Genova

⁵The Children Hospital of Philadelphia

⁶QIMR Berghofer Medical Research Institute Brisbane, Queensland, Australia.

⁷University of Leeds, Leeds, UK

Background: Neuroblastoma (NB) and malignant cutaneous melanoma (CMM) are neural crest cells (NCC)-derived tumors, which tend to be highly aggressive and both tumors may metastasize to the skin, something uncommon in other neoplasms. Many studies have performed cross-phenotype association analysis using genome-wide association studies (GWAS) results and have highlighted that different complex traits share common genetic pathways and underscored the relevance of pleiotropy in human complex diseases.

Results: To identify causal pleiotropic genetic variants associated with NB and CMM, we conducted a meta-analysis of GWAS results (dataset NB: 2,101 cases and 4,202 controls; dataset CMM: 15,990 cases and 26,409 controls, both are Americans of European ancestry). We have obtained 9,671,310 SNPs common to the two datasets. We performed a fixed-effects meta-analysis (inverse-variance-weighted meta-analysis implemented in METAL) using the NB and CMM summary statistics for all variants that were nominally associated ($P < 0.05$) with each of the two cancers. The meta-analysis identified 165 alleles spanning 4 independent loci that were associated with $P < 5 \times 10^{-8}$ with NB and CMM susceptibility. A replication effort of 1,805 SNPs with $P < 0.0001$ in an independent set of 1,403 NB cases and 1,403 controls (Americans of European ancestry) confirmed the genetic association of 25 independent risk SNPs. These later risk SNPs were further validated in an Italian cohort of 500 NB, 500 CMM cases and 2000 controls. We found 2 new loci associated with NB and CMM, 2 new loci associated with only NB, one new loci associated with CMM ($P < 0.05$). Among these risk loci, we functionally investigated the cross-associated NB-CMM SNP rs2153977 (1p13.2). In vitro and in silico analyses demonstrated that the rs2153977-T protective allele, located in a NB and CMM enhancer, decreased expression of the SLC16A1 via long-range loop formation. In NB and CMM cell lines, upon depletion of SLC16A1, we observed a decrease of proliferation and invasion cells suggesting its role as oncogene.

Conclusions: Our results demonstrate that two NC cell-derived tumors may share genetic and molecular factors involved in tumor initiation.

COD. C18

Malate Dehydrogenase 2 (MDH2) as a new diabetogene causing hyperglycemia in families with multigenerational diabetes

S. Pezzilli^{1,2}, P. Jungtrakoon^{3,4}, A. Marucci², L. Pannone^{5,6}, E. Flex⁵, T. Biagini², P. Buranasupkajorn³, O. Ludovico², L. Mercuri², T. Hastings³, R. Di Paola², F. Alberico², C. Mendonca³, J. Ceròn⁷, M. Porta-de-la-Riva⁷, Z. Abubakar⁴, M. Carella², L. Marselli⁸, T. Mazza², S. Martinelli⁵, V. Trischitta^{2,9}, A. Doria³, S. Prudente²

¹University of Chieti, Chieti, Italy.

²IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Italy.

³Joslin Diabetes Center, Boston, MA, USA.

⁴Mahidol University, Bangkok, Thailand

⁵Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy.

⁶Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Rome, Italy

⁷Bellvitge Biomedical Research Institute-IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

⁸University of Pisa, Pisa, Italy.

⁹Sapienza University, Rome, Italy.

Some adult patients diagnosed with type 2 diabetes (T2D) belong in fact to families with multigenerational, presumably monogenic, diabetes. These patients have clinical features that are intermediate between those of adult patients with monogenic diabetes (MODY) and those of patients with typical T2D. While in about one fourth of these patients hyperglycemia is sustained by mutations in known monogenic diabetes genes, in the majority of them, the genetic cause is still unknown. We have proposed to define this form of diabetes as "familial diabetes of the adulthood" (FDA). By carrying out Whole-Exome Sequencing (WES) in 60 FDA families, we have recently discovered APPL1 as a new diabetogene in two unrelated FDA families (AJHG 2015). The present study points to MDH2, coding for mitochondrial malate dehydrogenase 2, as another novel diabetogene. By operating in the Krebs cycle, MDH2 catalyzes the reversible oxidation of malate to oxaloacetate (a key molecule for gluconeogenesis) using the NAD⁺/NADH cofactor system. We identified a novel MDH2 heterozygous missense mutation (Arg52Cys), which co-segregated with hyperglycemia in one of the FDA families investigated by WES. This amino acid change was predicted to be deleterious by several bioinformatics tools and showed altered *in silico* dynamic properties. When exploring the *in vitro* effect of this mutation in human transfected HepG2 cells, Arg52Cys behaved as a gain of function mutation significantly increasing MDH2 enzymatic activity and decreasing the NAD⁺/NADH ratio - a redox change known to be deleterious for both insulin signaling and secretion. *C. elegans* carrying the corresponding mutation at the orthologous *mdh-2* gene recapitulated several features reported in worms with genetically-induced defective insulin signaling and also showed impaired glucose-stimulated insulin secretion. Finally, we found a rare variant (Val160Met) co-segregating with hyperglycemia in another FDA family, although its penetrance was strongly age-related. Similarly to the Arg52Cys, the Val160Met change was predicted to be deleterious and showed altered *in silico* dynamic properties. In summary, our findings suggest a central role of MDH2 in human glucose homeostasis and point to this gene as a new diabetogene contributing to FDA.

COD. C19

Study of the pathogenetic role of POLD1 gene in Mandibular hypoplasia, Deafness, Progeroid features and Lipodystrophy (MDPL) Syndrome in cellular models

R.V. Talarico¹, P. Spitalieri ¹, M. Murdocca¹, M. Sanchez³, C. De Masi¹, G. Longo¹, G. Novelli¹, M.R. D'Apice², F. Sangiuolo¹

¹*Dept of Biomedicine and Prevention, Division of Genetic, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy*

²*Core Facilities Center - Section of Cytometry, Istituto Superiore di Sanità - Rome, Italy.*

³*Laboratory of Medical Genetics, Tor Vergata Hospital, Rome, Italy*

Mandibular hypoplasia, Deafness and Progeroid features with concomitant Lipodystrophy and insulin resistance, define a multisystem disorder named MDPL syndrome. MDPL has been associated to de novo heterozygous mutations in POLD1 gene, which encodes the active site of DNA polymerase δ , involved in DNA replication and repair mechanisms. Dermal fibroblasts were obtained by a skin biopsy from a patient heterozygous for the recurrent in-frame deletion p.Ser605del in POLD1 gene. Cells showed aging related defects, such as nuclear envelope alterations and apoptosis. Moreover, MDPL fibroblasts revealed a poor capacity of DNA damage repair, after induction of DNA damage with cisplatin treatment. FACS assay has been also performed to characterize the cell-cycle after induced DNA-damage treatment: we showed an arrest in the phase G0/G1 transition and a lower number of cells in the phase S. In addition expression analyses of POLD1 has been conducted both by qRT-PCR and Western Blot assay, resulting in a higher level of both transcript and protein in MDPL fibroblasts, compared to WT ones. In order to improve our understanding on the molecular mechanisms of the MDPL disease, we also generated human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) from dermal fibroblasts. hiPSCs showed normal phenotypes without significant nuclear abnormalities, but we highlighted the presence of micronuclei, that correlates with DNA damage repair defects and genome instability. Their subsequent differentiation into adipose tissue that is mainly involved in the MDPL disease could represent an outstanding opportunity to yield additional insights into the pathophysiology of fat loss. Finally, this new tool might be used for drug screening and further development of targeted therapeutic approaches.

COD. C20

iPSC-derived neurons carrying FMR1 unmethylated full mutations require large CGG repeat expansions for methylation and silencing of the gene and show signs of neurodegeneration

V. Nobile¹, E. Tabolacci¹, G. Neri¹

¹*Ist. di Medicina Genomica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

In the FMR1 gene, expansion of CGG triplets above 200 repeats (full mutation, FM) triggers DNA methylation (methylated full mutation, MFM), and consequent block of transcription. The resulting absence of the FMRP protein causes the Fragile X Syndrome (FXS) phenotype. There exist rare individuals of normal intelligence who are carriers of a FM, which however remains unmethylated (unmethylated full mutation, UFM), thus rescuing them from expressing the FXS phenotype. Here we show that lack of methylation of the FMR1 promoter is maintained in iPSC cells derived from two unrelated UFM individuals. We also show that FMR1 does not undergo silencing during neuronal differentiation of these cells, similar to what has been described in FXS cells by Eiges et al. (2007). However, in a subset of iPSC clones in which CGG expansion exceeded 400 repeats, FMR1 became methylated and silenced, suggesting that UFM cells have a threshold for methylation higher than the typical 200 CGG repeats. These findings demonstrate that UFM individuals do not lack the cell-intrinsic ability to methylate the FMR1 gene, but require a CGG repeat expansion greater than that described for typical FXS patients. Preliminary data suggest a role of R-loops formation (hybrids between the nascent mRNA molecule and the template DNA strand present at the FMR1 locus during DNA replication) during active FMR1 transcription and of DNMT1 in maintaining both PM and UFM cell lines transcriptionally active. DNMT1 binds FMR1-mRNA in transcriptionally active cell lines preventing them from methylation, while in FXS cell lines binds to FMR1 gene resulting in silencing.

Furthermore, UFM iPSC-derived neurons, in which the expression of FMR1 was preserved, rapidly showed signs of neurodegeneration, with the presence of intracellular ubiquitin containing granules, as described in premutated (PM) carriers at risk for FXTAS. UFM, while rescuing carriers from the FXS phenotype, becomes a risk factor for developing FXTAS. One of our UFM subjects, now 43 years old, shows signs of gait ataxia. On the other hand, the existence of UFM carriers with a normal phenotype hints at the possibility of treating FXS by converting a methylated full mutation into a UFM.

COD. C21

Hereditary Hearing Loss (HHL): the usefulness of multiple integrated methodologies for the molecular diagnosis of 166 Italian cases.

A. Morgan¹, S. Lenarduzzi², S. Cappellani², V. Pecile², M. Morgutti², U. Ambrosetti³, M. La Bianca², F. Faletra², E. Grosso⁴, F. Sirchia², A. Sensi⁵, C. Graziano⁶, M. Seri⁶, P. Gasparini^{1,2}, G. Girotto^{1,2}

¹Università degli Studi di Trieste, Dip. Universitario Clinico di Scienze Mediche Chirurgiche e della Salute, Trieste, Italia.

²IRCCS Burlo Garofolo, U.O Genetica Medica, Trieste, Italia.

³Univ. Milano U.O.C. Audiologia/Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italia.

⁴A.U.O Città della Salute e della Scienza, U.O. Genetica Medica, Torino, Italia.

⁵Dip di Patologia Clinica, U.O. Genetica Medica, Pievesestina, Cesena, Italia.

⁶U.O Genetica Medica, Ospedale S. Orsola-Malpighi, Bologna, Italia.

HHL is genetically heterogeneous which hampers genetic counseling and molecular diagnosis. So far, the use of high-throughput genome technologies has facilitated the discovery of both mutations in known genes and new disease-causing genes. In this light, 166 Italian HHL cases (46 familial, 120 sporadic) were screened with a Targeted Re-Sequencing (TRS) panel of 96 deafness genes, using Ion Torrent PGM. In negative cases, high-density SNP arrays were applied to identify copy number variants. Finally, 14 HHL families, negative to both TRS and SNP arrays were analysed by Whole Exome Sequencing (WES) (Ion Proton), followed by functional in vitro/in vivo studies, for the identification of new candidates. Data analysis revealed ~40% of cases (66/166) as positive to GJB2 mutations. In the remaining 100 cases, TRS and SNPs array led to the characterization of ~30% of cases. In particular, we identified: 1) the first case of uniparental disomy involving LOXHD1, 2) two large deletions in OTOA and STRC, 3) 4 patients (13%) with mutations inTECTA which is thus the second major player in the Italian population, followed by Tmprss3 (3/100,10%), MYO6, MYO7A, MYO15A, PDZD7, and ACTG1 (2/100,7% each). Moreover, WES allowed the discovery of 5 new HHL-genes: PSIP1, TBL1Y, SPATC1L, PLS1 and ATP2B2. As regards PSIP1, a nonsense variant in a 3-generation family was identified; RNAseq and immunolabeling confirmed gene expression in mouse inner ear. For TBL1Y, a missense variant was detected in a large Y-linked family; functional experiments demonstrated TBL1Y expression in human cochlea and an early degradation of the mutated protein. For SPATC1L, a nonsense variant in a 3-generation family was identified; protein modelling revealed a reduced structural stability confirmed by western blot. Finally, for PLS1 and ATP2B2 Zebrafish models of the identified variants are at the final stages of validation. WES data of the remaining 9 families are now under investigation. Thanks to this approach ~58% (96/166) of cases were characterized confirming the large mutation's spectrum of HHL genes, as well as the efficacy of TRS and SNPs arrays. Furthermore, WES followed by functional studies, proved to be effective for the discovery of new candidates leading to the identification of 5 new genes.

COD. C22

GENOMIC APPROACHES FOR DIGGING INTO ARRHYTHMOGENIC CARDIOMYOPATHY GENETIC COMPLEXITY

R. Celegnin¹, M. Cason¹, M. Bueno Marinas¹, G. Beffagna¹, A. Giuliodori³, E. Lazzarini¹, K. Ludwig¹, S. Rizzo¹, C.R. Bezzina², C.A. Remme², B. Baucé¹, N. Tiso³, G. Thiene¹, C. Basso¹, K. Pilichou¹

¹*Department of Cardiac, Thoracic and Vascular Sciences, University of Padua, Padua, Italy*

²*Department of Clinical and Experimental Cardiology, University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands.*

³*Department of Biology, University of Padua, Padua, Italy*

Background. Arrhythmogenic cardiomyopathy (AC) is an inherited myocardial disease characterized by fibro-fatty replacement of the myocardium and life-threatening arrhythmias. AC is mostly a hereditary autosomal dominant disease with low penetrance and variable clinical expression. Half of AC patients carry variants in genes coding for desmosomal proteins. **Purpose.** To explore the genetic architecture of AC patients beyond current knowledge, focusing on identifying new putative genes and molecular markers involved in the development of the disease. **Materials and Methods.** Whole exome sequencing (WES) was carried out on 10 biventricular genotype- negative AC patients for disease-related genes. Whole transcription sequencing (RNA-Seq) was carried out on myocardial tissue obtained from (a) 9 heart transplanted AC patients, carriers of desmosomal mutations, (b) 4 mice overexpressing N271S-dsg2 mutation after disease onset, (c) 4 mice overexpressing N271S-dsg2 mutation before disease onset, and (d-f) wild type controls. WES were confirmed by direct sequencing and validated in additional 150 AC index cases. RNA-Seq data were confirmed by qPCR, western blotting and immunohistochemistry. **Results.** Parallel WES and RNA-Seq analyses pinpointed rare genetic variants in LGALS3 which encodes for ubiquitous and multifunctional secreted glycoprotein, Galectin3 (GAL3). Specifically, we identified 3 missense variants in 5 AC index cases, localized in domains essential for GAL3 binding. Human and murine expression-profiling highlighted Igals3 underexpression before disease onset both in AC patients as well as in mice. Further, RNA-Seq exhibited 25% of differentially expressed genes linked to WNT and TGF β pathways. **Conclusion.** Our findings linked, for the first time, LGALS3 to disease pathogenesis as a new causative gene. We demonstrated that LGALS3 is a harbinger of WNT and TGF- β signaling pathways confirming previous studies. Molecular defects both at the genome level and transcriptional level of LGALS3, may be implicated in cardiac remodeling. Further functional studies are needed to determine GAL3 dual positive and negative regulatory function during the assembly and stabilization of intercellular junctions and molecular pathway regulation.

COD. P

Expanded carrier screening in donor oocyte program

M. Bellavia⁴, E. Crugnola^{2,1}, L. Risch², M. Jemec^{3,4}, G. Filippini^{2,1}

¹*Procrealab SA, molecular genetics laboratory, Lugano, Switzerland*

²*Labormedizinisches Zentrum Dr Risch, genetic department, Bern, Switzerland*

³*Procrea SA, Swiss fertility Center, Lugano, Switzerland*

⁴*Fertility Center, Clinica "Le Betulle", Appiano Gentile, Italy*

Study question: Is expanded carrier screening for about 650 recessive inherited diseases helpful in oocyte donor selection?

Summary answer: The incidence of recessive diseases in the general population is estimated to be 1/200-300 births. NGS-screening panels are a valid solution to decrease this risk.

What is known already: Advanced maternal age at the first pregnancy is the most frequent indication for requests for oocyte donation. Blood group and physical features including height, hair and eye colour are taken into account for the choice of a donor. Another possibility for matching an appropriate donor is prior screening of recessive diseases, to reduce the risk of severe genetic disease in offspring from 1/200-300 to <1/30'000.

The use of Next-Generation Sequencing (NGS) panels in the detection of rare genetic pathologies is becoming ever more widespread in clinical practice and can be helpful in expanded carrier screening (ECS) of oocyte donors.

Study design, size, duration: 459 oocyte-donor cycles were analysed in 2016- 2017.

Participants/materials, setting, methods: 297 infertile women attending a oocyte-donation programme in an IVF clinic, for female-factor or couple infertility. ECS for 550 genes responsible for about 650 recessive diseases was proposed to all the couples. The analysis was performed with the Trusight inherited disease kit (Illumina) and data were analysed with Sophia DDM and Saphetor bioinformatic platforms. Only the mutations known to be disease-causing were considered.

Main results and the role of chance: 297 couples decided to complete the oocyte donor programme and were given genetic counselling; 31(%) requested ECS for donor matching. In 6 couples (20%), disease-causing variants were found in the same gene in the male partner and the oocyte donor; new donors were attributed. In 31 (10.4%) the donor was changed twice. Although all donors had previously been screened for 5 common recessive diseases, nonetheless 1 in 270 children born from egg donation in our cohort were at risk of one of the rare diseases in the ECS panel. These findings underline the value of expanded carrier screening for donor matching, for couples concerned about the risk of severe genetic disease in their offspring.

Limitations, reasons for caution: NGS is not suitable for the detection of repeat regions, deletions, duplications and some chromosome abnormalities. For this reason some analyses, including fragile X and spinal muscular atrophy, are performed by other methods in our laboratory.

Wider implications of the findings: Our results support the feasibility and value of ECS in oocyte donor matching.

COD. P001

Validazione del sistema CRISPR/Cas9 come terapia genica innovativa per la sindrome di Rett

I. Meloni¹, S. Croci¹, S. Daga¹, F.C. Lorenzetti¹, F.T. Papa¹, F. Donati², C. Lo Rizzo³, D. Lopergolo¹, M. Doria⁴, A. Auricchio⁴, S. Conticello², A. Renieri^{1,3}

¹*Laboratorio di Genetica Medica, Università degli Studi di Siena*

²*Molecular Mechanisms of Oncogenesis, ISPRO Core Research Laboratory (CRL), Firenze*

³*Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena*

⁴*TIGEM (Telethon Institute of Genetics and Medicine), Napoli*

La sindrome di Rett è una delle cause più comuni di disabilità intellettiva nelle bambine. La forma classica e la variante congenita sono causate rispettivamente da mutazioni nei regolatori trascrizionali MECP2 e FOXP1. Per studiare la patologia, abbiamo sviluppato e caratterizzato un modello neuronale umano, ottenuto da iPSCs derivate dai fibroblasti dei pazienti tramite riprogrammazione genetica (Livide et al, Eur J Hum Genet 2015; Patriarchi et al, Eur J Hum Genet 2016; Landucci et al Exp Cell Res 2018). Su questo modello stiamo applicando con successo la tecnologia di gene editing tramite CRISPR/Cas9. Abbiamo messo a punto un sistema a due plasmidi per correggere specifiche mutazioni (FOXP1: c.688C>T - p.Arg230Cys e c.765G>A - p.Trp255*; MECP2: c.473C>T - p.Thr158Met e c.916C>T - p.Arg306Cys). sgRNA e donor DNA mutazione-specifici sono stati clonati in un plasmide che esprime un sistema reporter mCherry/GFP. In un secondo plasmide è stata clonata la Cas9, fiancheggiata da siti di riconoscimento per l'sgRNA, per consentirne l'autoeliminazione. La trasfezione dei due plasmidi in fibroblasti ha dimostrato che le cellule li acquisiscono ed esprimono Cas9. Per la somministrazione abbiamo deciso di usare i virus Adeno-Associati (AAV) che sono stati recentemente usati con successo in un trial clinico di fase I per una terapia genica classica in pazienti affetti da Atrofia Muscolare Spinale tipo I, senza effetti collaterali significativi. L'infezione di neuroni derivati da iPSCs con AAV9 ha dimostrato che queste cellule possono essere co-infettate in modo efficiente. Infine, l'analisi tramite Next Generation Sequencing delle cellule mCherry⁺/GFP⁺ isolate tramite FACS ha dimostrato un efficiente editing. Le fasi successive del progetto prevedono l'analisi nel modello murino, attualmente in corso, e il reclutamento dei pazienti. Poiché per entrambi i geni sia la sovraespressione che la sottoespressione sono deleterie, l'approccio di "gene editing" proposto, che corregge l'allele mutato mantenendo gli elementi di controllo nativi, appare più efficace e sicuro rispetto alla "sostituzione genica", che si basa sull'aggiunta di una copia normale del gene sotto il controllo di elementi regolatori artificiali.

COD. P002

Alterations in chromatin conformation of the H19-IGF2 locus in cell lines derived from patients with Cornelia de Lange syndrome

M. La Vecchia¹, L. Fontana^{2,3}, S. Tabano^{2,3}, E.A. Colombo¹, M. Miozzo^{2,3}, C. Gervasini¹, S.M. Sirchia¹

¹*Medical Genetics, Dept. of Health Sciences, Università degli Studi di Milano, Milano*

²*Division of Pathology, Fondazione IRCCS Ca' Granda Osp. Maggiore Policlinico, Milano*

³*Medical Genetics, Dept. of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano, Milano*

Three dimensional chromatin conformation plays many roles in different aspects of genome regulation, including gene expression. One of the best example of 3D structure importance is the H19-IGF2 imprinted region, where different chromatin loops allow IGF2 and H19 monoallelic expression by distinct enhancer-promoter interactions. It has been demonstrated that in this region cohesin complex and CTCF (the major architectural proteins) co-localise and are involved in the 3D chromatin organisation. Pathogenic alterations in the genes encoding for cohesin subunits (SMC1A, SMC3 and RAD21) and/or cohesin cofactors (NIPBL, ESCO2, HDAC8) cause human genetic disorders known as cohesinopathies, including Cornelia de Lange syndrome (CdLS), a neurodevelopmental disorder characterized by intellectual disability, growth delay, facial dysmorphism, hirsutism and upper limb abnormalities. As cohesin dysfunctions present in CdLS patients could modify the 3D chromatin organization, we analysed the 3D structure of the exemplificative H19-IGF2 locus by performing chromatin conformation capture experiments (3C) on normal and CdLS lymphoblastoid cell lines. In particular, we used four cell lines derived from patients with alterations in SMC1A or NIPBL, the major causative genes of CdLS. Our results show an aberrant chromatin organisation of the H19-IGF2 region in all the analysed CdLS cell lines, compared to normal cells. In particular, we observed a profound perturbation in the chromatin associations of the IGF2-H19 enhancers and the CTCF binding site downstream H19 with genes and other elements of the locus. These evidences underline the importance of the cohesin complex in the 3D structure organization of the H19-IGF2 locus, and indicate that the 3D chromatin structure is compromised when cohesins' function is altered, like in CdLS. Similar to the 3D structure perturbation observed in the IGF2-H19 locus, we can suppose that the effect of the alterations in cohesin genes is not limited to this domain but can concern the chromatin structure of other genomic regions.

COD. P003

A novel approach to characterise genetic loci involved in complex traits in term of Natural Selection, Singleton distribution and Runs of homozygosity

M. Cocca¹, P. Gasparini¹, M. Mezzavilla¹

¹*Institute for Maternal and Child Health - IRCCS "Burlo Garofolo"*

Recent works described how genes under strong selective pressures, such as schizophrenia-associated ones, are highly enriched in common variant association signals. These works showed the importance of mutation-intolerant genes, suggesting a mechanism by which common risk variants persist in the population. If we consider that mutation intolerance is due to high selection pressure in specific genomic regions, recurrent selection against deleterious variants causes haplotypes to be removed from the gene pool, increasing homozygosity. However, this could disrupt the efficiency of the selection process, allowing alleles with small deleterious effects to rise in frequency by drift. Thus, combining homozygosity mapping with rare variant distribution and selection scan could help to identify relevant genomic regions involved in complex traits. Here we describe a novel framework which include selection scan, runs of homozygosity (ROH) mapping and singleton distribution to elucidate the evolutionary characteristic on GWAS variants previously associated with different traits. Using 423 whole genome sequences from an isolated population from North Italy we analysed a total 5952 variants extracted from GWAS catalogue. We discovered that 1% of the variants analysed showed evidence of positive selection (using the iSAFE software), 5% falls in ROH hotspots and 3% shows differences in singleton distribution across haplotypes. In particular a total of 14 GWAS SNP are located in several genomic regions with significant score in all 3 descriptors: interestingly 13 of them are eQTL of different genes. Among the significant signals we found SNP associated with LDL cholesterol (rs3846662) on HMGCR gene and schizophrenia (rs1150688) at 20kb 3' of TOB2P1. Multiple signals were found on chromosome 12 on ATXN2 gene with markers involved in different traits including coronary artery disease (rs7137828), systemic lupus erythematosus (rs597808) and eosinophil counts (rs11065979). Concluding, this novel approach will help to elucidate the role of genetic variants associated with complex traits and will provide insights for genetic loci prioritization according to evolutionary constraints and natural selection patterns.

COD. P004

Functional dissections of two pathogenetic variants in TAK1 and TAB2 underlying the overlapping TAB2-microdeletion and cardio-spondylocarpofacial syndromes

S. Morlino¹, A. Notarangelo², A. Carbone³, T. Biagini⁴, C. Fusco², P. Grammatico¹, G. Mazzoccoli³, T. Mazza⁴, M. Castori², L. Micale²

¹Laboratory of Medical Genetics, Department of Molecular Medicine, University "La Sapienza", San Camillo-Forlanini Hospital, Rome, Italy.

²Division of Medical Genetics, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Foggia, Italy.

³Division of Internal Medicine and Chronobiology Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Foggia, Italy.

⁴Bioinformatics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Foggia, Italy.

TAK1 is a member of the MAP3K family and a key substrate of many molecular mechanisms, also comprising the non-canonical TGF β signaling pathway. TAK1 activation envisages the binding with TAB1, TAB2, and TAB3. Germline pathogenic variants in TAK1 and TAB2 are associated with frontometaphyseal dysplasia (FMD) type 2 and 3, respectively. Mutations in these genes cause partially overlapping disorders: TAB2-microdeletion (TMD) and cardio-spondylocarpofacial syndromes (CSCFS), which present a combination of features inverse of FMD. We recently identified two families with strikingly similar phenotypes within the TMD-CSCFS spectrum and heterozygous mutations in the two different genes: a sporadic CSCFS girl with TAK1 c.737-7A>G and a TMD family with TAB2c.1398dup, located in the binding interface for TAB1 and TAK1, respectively. In order to understand the mechanisms underpinning such clinical similarities we extensively explored the functional effects of these nucleotide changes. Molecular dynamics analysis revealed that the TAK1 mutant protein was globally less flexible than wild-type, especially in the region containing the activation loop. Immunoprecipitation assays, performed in cells transiently expressing wild-type or mutated TAK1 and TAB2, showed that the TAK1-TABs complex was physically unimpaired by the variants. Considering the pivotal role of TAK1-TABs complex in TGF β signaling pathway, we next investigated the impact of these mutants on the regulation of the signaling functions of the complex. We found that multiple signaling pathways activated downstream of TAK1-TABs, including MAPK, NF κ B, and autophagy, were significantly perturbed in patients' fibroblasts after stimulation with TGF β , in comparison with control cells. Intriguingly, TAK1-TABs impairment reduced the expression of the major autophagy-related proteins, LC3 and beclin1, which aberrantly regulate the autophagic flux. Our studies demonstrate a wide array of convergent downstream abnormalities caused by TAK1 and TAB2 mutations. This evidence likely explains why TMD and CSCFS are phenotypically related disorders. Ongoing studies will hopefully contribute to further elucidate the context-dependent mechanisms of TAK1 disruption and might promote novel therapeutics for the related disorders.

COD. P006

WES analysis provides evidence of digenic inheritance in a child with infantile parkinsonism

V. Cordeddu^{1,14}, S. Martinelli^{2,14}, S. Galosi³, A. Lanzo⁴, E. Palma^{5,6}, L. Pannone⁷, A. Traversa⁸, A. Ciolfi⁷, G. Bocchinfuso⁹, V. Caputo⁸, A. Farrotti⁹, L. Bernardini¹⁰, M. Venditti^{3,7}, L. Stella⁹, F. Trettel⁵, M. Sciacaluga¹¹, S. Fucile^{11,12}, R. Carrozzo⁷, C. Limatola^{5,12}, E. Di Schiavi^{4,13}, V. Leuzzi^{3,15}, M. Tartaglia^{7,15}

¹*National Center for Drug Research and Evaluation, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy*

²*Department of Oncology and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy.*

³*Department of Human Neuroscience, Sapienza University, Rome, Italy.*

⁴*Institute of Genetics and Biophysics, National Research Council, Naples, Italy.*

⁵*Department of Physiology and Pharmacology, Sapienza University, Rome, Italy.*

⁶*IRCCS San Raffaele Pisana, Rome, Italy.*

⁷*Genetics and Rare Diseases Research Division, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Rome, Italy.*

⁸*Department of Experimental Medicine, Sapienza University, Rome, Italy.*

⁹*Department of Science and Chemical Technology, "Tor Vergata" University, Rome, Italy.*

¹⁰*Mendel Laboratory, Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Italy.*

¹¹*IRCCS Neuromed, Pozzilli (IS) Italy.*

¹²*Department of Physiology and Pharmacology, Sapienza University, Rome, Italy.*

¹³*Institute of Bioscience and BioResources, National Research Council, Naples, Italy.*

¹⁴*These authors contributed equally to this project.*

¹⁵*These authors contributed equally as senior authors to this project.*

We report on a 8 months child with a severe movement disorder characterized by progressive neurological deterioration leading to subcontinuous rest and action jerks of limbs, and generalized hypokinesia and dystonia. Low CSF homovanillic acid prompted L-dopa/carbidopa treatment with only transient clinical improvement. From the age of 4 years, he displayed a severe rigid-akinetic syndrome with on-off phenomena. DaTSCAN (6 years) revealed complete derangement of dopaminergic striatal pathways.

A trio-based whole exome sequencing (WES) approach allowed to identify compound heterozygosity for two missense mutations (p.Trp13Gly and p.Met227Val) in the WARS2 gene, which encodes the mitochondrial tryptophanyl tRNA synthetase. WARS2 has recently been associated with different neurological phenotypes, including isolated intellectual disability, severe leukoencephalopathy and, in a single patient, infantile-onset (2 years) parkinsonism.

Based on earliest age of onset and the severe clinical features of the patient, we hypothesized a possible contribution of a second hit in a different gene. In line with this hypothesis, WES analysis identified a de novo mutation (c.526T>C; p.Phe176Ser) in CHRNA6, encoding the $\alpha 6$ subunit of nicotinic receptors, which plays a key role in the cholinergic modulation of dopamine release in striatal dopaminergic neurons. In silico modeling predicted a disrupting effect of the mutation on the allosteric transition mediating channel opening and receptor assembly. The mutation strongly impaired receptor function in *Xenopus* oocytes, GH4C1 cells and *C. elegans* muscle receptors, and had a dominant-negative impact in neuronal receptors of the nematode.

These findings document the contributing role of defective CHRNA6 function in explaining the particularly severe phenotype associated with WARS2 mutations.

COD. P007

Screening neonatale per l'atrofia muscolare spinale: da uno studio pilota in Lazio e Toscana verso l'inclusione negli screening nazionali obbligatori

E. Abiusi¹, S. Fiori¹, A. Angeloni², G. Vento³, E. Pasquini⁴, M.A. Donati⁴, G. Lamarca⁴, A. D'Amico⁵, E. Bertini⁵, M. Pane⁶, M. Genuardi¹, E. Mercuri⁶, F.D. Tiziano¹

¹*Ist. di Medicina Genomica, Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma*

²*Dip. di Medicina Molecolare, Università La Sapienza di Roma*

³*Ist. di Pediatria, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" di Roma*

⁴*S. O. C. di Malattie Metaboliche e Muscolari Ereditarie, Azienda Ospedaliera Universitaria "Anna Meyer" di Firenze*

⁵*Dip. di Medicina Molecolare, Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù" di Roma*

⁶*U. O. di Neuropsichiatria Infantile, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" di Roma*

L'atrofia muscolare spinale (SMA) viene classificata in tre forme (I-III) in base ad età di esordio e massima acquisizione motoria. Tutte le forme di SMA presentano un burden sociale e familiare estremamente elevato, legato all'entità della disabilità motoria; inoltre la SMA I è la prima causa genetica di mortalità infantile. Indipendentemente dalla gravità, il 98% circa dei pazienti presenta l'assenza omozigote del gene SMN1. Il principale gene modificatore è SMN2, allele ipomorfo di SMN1, il cui numero di copie è variabile (da 1 a 4) ed è inversamente correlato con la gravità fenotipica. Il test genetico basato sull'identificazione dell'assenza di SMN1 presenta sensibilità elevata (98%), specificità assoluta e costi contenuti. La determinazione del numero di copie di SMN2 ha un potere prognostico predittivo dell'80% circa.

Spinraza® è il primo trattamento efficace registrato nel 2017: è stato dimostrato che l'inizio del trattamento in fase pre-sintomatica è più efficace di quello in fase avanzata di malattia, tanto da consentire uno sviluppo motorio pressoché normale anche in bambini con diagnosi predittiva di SMA I. La SMA è pertanto un candidato ideale per gli screening di popolazione, esigenza diventata ormai inderogabile ed argomento in fase avanzata di discussione in diversi Paesi.

A partire dal gennaio 2019, avvieremo il primo screening italiano effettuato mediante test genetico molecolare, per la diagnosi pre-sintomatica di SMA. Lo studio pilota durerà due anni e coinvolgerà circa 140.000 neonati di Lazio e Toscana, Regioni outstanding per gli screening neonatali obbligatori e con centri di eccellenza per diagnosi, follow-up e trattamento della SMA.

Stimiamo di identificare circa 20 pazienti SMA, di cui l'80% affetto da SMA I o II. Il follow-up verrà stabilito in base al numero di SMN2: pazienti con SMN2<2 verranno avviati al trattamento; per quelli con SMN2 >2, il trattamento verrà iniziato alla comparsa di segni strumentali di SMA.

Questo studio è prodromico all'inclusione della SMA negli screening nazionali obbligatori: i risultati consentiranno di mettere a punto la piattaforma tecnologica e di stabilire l'incidenza della condizione.

Questo studio è finanziato da Biogen Pharmaceuticals e supportato dalle Regioni Lazio e Toscana e da Famiglie SMA.

COD. P008

A spontaneous remission in a Diamond Blackfan anemia patient due to a uniparental disomy ablating a de novo RPS19 mutation

E. Giorgio¹, E. Garelli², P. Quarello³, A. Carando², E. Menegatti⁴, C. Mancini¹, E. Di Gregorio⁴, N. Crescenzo², O. Palumbo⁵, M. Carella⁵, P. Di Martino⁶, T. Pippucci⁶, I. Dianzani⁷, U. Ramenghi², A. Brusco¹

¹*Department of Medical Sciences, Medical Genetics Unit, University of Torino*

²*Department of Public Health and Paediatric Sciences, University of Torino*

³*Paediatric Onco-Haematology, Regina Margherita Children's Hospital, Torino*

⁴*Medical Genetics Unit, Città della Salute e della Scienza University Hospital, Torino*

⁵*Division of Medical Genetics, IRCCS 'Casa Sollievo della Sofferenza', San Giovanni Rotondo*

⁶*Medical Genetics Unit, Sant'Orsola-Malpighi University Hospital, Bologna*

⁷*Department of Health Sciences, University of Eastern Piedmont, Novara*

Diamond Blackfan Anemia (DBA) is a rare blood disorder characterized by red cell aplasia, often accompanied by a variety of congenital abnormalities. It typically presents in infancy with macrocytic anemia and is associated with an increased risk of myelodysplastic syndrome, leukemia, and solid tumors. Although the mechanisms remain unclear, approximately 20% of DBA patients enter spontaneous remission, and maintain stable hemoglobin (Hb) levels in the absence of steroid therapy or transfusions. Here, we illustrate a 28-yrns long genetic puzzle of a DBA patient who underwent remission. The proband was a 7-yrns old child admitted to our University Hospital in Torino born from healthy unrelated Caucasian parents. DBA was diagnosed at birth from a severe macrocytic anemia and a high erythrocyte adenosine deaminase activity (eADA) (3 U/gHb, normal values 1 ± 0.2 U/gHb). Hypoplasia of the right thenar eminence was noted. Bone marrow aspirate showed a selective decrease in erythroid precursors. The patient did not respond to steroids and was treated by monthly transfusions. At the age of nine, he achieved a stable haematological remission which is still maintained at 35 years old. Solution for this complex case was suggested by a whole exome sequencing performed on patient's DNA at 7-yrns. WES identified a reported de novo c.140C>T (p.Pro47Leu) mutation in RPS19, a well-known DBA gene. Array-CGH, microsatellite analysis and FISH were inconclusive, but suggested a uniparental partial disomy (UPD) of chromosome 19q. The UPD in about 50% of cells was further demonstrated by SNP-array. Patient started remission at 8 yrs. Using a specific primer extension test, we demonstrated that the remission was associated with a reduction of mutant cells due to the selection of UPD clones ablating the mutation. At 22 yrs, mutation mosaicism was reduced to 13.5% in blood. As expected, it remained unchanged in buccal mucosa (58% at 35 yrs.). This tissue specificity likely suggests that the auto-correction has occurred in the hematopoietic compartment due to a selective advantage over the defective blood cell population. Our findings allowed to fully unravel a case of revertant DBA, providing valuable insight into disease biology of not only DBA, but likely other similar disorders.

COD. P009

Methylation analysis of mitochondrial DNA in neurodegenerative diseases

A. Stocco¹, V. Nicoli¹, L. Mosca², G. Siciliano³, F. Baldacci³, F. Coppedè¹, L. Migliore¹

¹*Dep. of Translational Research and New Technologies in Medicine and Surgery, Medical Genetics Laboratory, University of Pisa, Pisa, Italy*

²*Medical Genetics Unit, Dep. of Laboratory Medicine, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milan, Italy*

³*Dep. of Clinical and Experimental Medicine, University of Pisa, Neurological Clinic, Pisa, Italy*

Mitochondrial dysfunction occurs early in affected tissues and in peripheral blood cells of individuals with neurodegenerative diseases (NDDs). Altered mitochondrial function induces aberrant epigenetic modifications and several reports have highlighted that DNA methylation dysregulation plays an important role in the etiology of NDDs, including Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Until now, little attention was given to the mitochondrial epigenome itself in NDDs. Recently, we have observed by means of the Methylation Sensitive High Resolution Melting technique, 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 respect to healthy controls.

In order to expand our knowledge of mtDNA methylation status in other NDDs, we investigated D-loop methylation and mtDNA copy number in 114 individuals, including ALS patients with mutations in one of the ALS associated genes and from asymptomatic carriers and non-carriers family members. We observed decreased D-loop methylation levels in individuals carriers of mutations in SOD1 gene and, interestingly, an inverse correlation between D-loop methylation and mtDNA copy number was detected, suggesting that methylation levels of D-loop region may be involved in mtDNA replication. In parallel we are analyzing mtDNA methylation in a new cohort of AD and ALS patients, as well as in patients with PD by means of pyrosequencing, that is considered the gold standard technique for gene specific methylation analysis. Particularly, DNA methylation analysis is performed in mtDNA separated from nuclear DNA, in order to avoid possible interference of nuclear mitochondrial pseudogenes.

Current results further suggest an involvement of mtDNA methylation modifications in NDDs. Furthermore, pyrosequencing data will provide information on specific CpG units of the D-loop that undergo methylation, thus further increasing our knowledge on epigenetic modifications of mtDNA in these pathologies.

COD. P010

NBAS associated disease: defining facial features and genotype-phenotype correlation

D. Carli¹, E. Giorgio^{2,3}, F. Pantaleoni⁴, S. Barresi⁴, E. Riberi¹, F. Licciardi¹, A. Gazzin¹, G. Baldassarre¹, S. Pizzi⁴, F.C. Radio⁴, M. Niceta⁴, A. Bruselles⁵, C. Molinatto¹, D. Montin¹, P.L. Calvo⁶, A. Ciolfi⁴, G.B. Ferrero¹, A. Brusco^{2,3}, M. Tartaglia⁴

¹*Department of Public Health and Pediatrics, University of Torino, Torino, Italy*

²*Department of Medical Sciences, University of Torino, Torino, Italy*

³*Medical Genetics Unit, Città della Salute e della Scienza University Hospital, Torino, Italy*

⁴*Genetics and Rare Diseases Research Division, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCSS, Roma, Italy*

⁵*Department of Oncology and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy*

⁶*Pediatric Gastroenterology Unit, Città della Salute e della Scienza University Hospital, Torino, Italy*

Background: Mutations in NBAS (MIM 608025) have been linked to two autosomal recessive disorders, infantile liver failure syndrome 2 and Short stature, Optic nerve atrophy and Pelger-Huet anomaly syndrome, the latter being associated with a homozygous specific missense change (p.R1914H). Over time, patients with intermediate phenotypes have been reported, presenting with variable involvement of hepatic, skeletal, ocular and immune systems. Facial dysmorphisms have not been considered a consistent feature in patients with NBAS mutations.

Methods: We report two patients with biallelic, previously unreported NBAS mutations and reviewed previously published cases with the aim to define NBAS-associated facial dysmorphisms, and explore possible genotype-phenotype correlations.

Results: Using WES, we found two unrelated subjects who carried distinct nonsense changes and shared a synonymous change c.6840G>A, p.(T2280T), hitting the last base of exon 51 (GnomAD 1/245,982). cDNA analysis demonstrated its pathogenicity, causing skipping of the exon.

Using FDNA facial recognition technology (www.Face2Gene.com), we compared 18 patients with NBAS mutations and 36 healthy controls demonstrating a recognizable facial phenotype, mainly characterized by hypotelorism, thin lips, pointed chin and progeroid appearance.

The clinical information available for 70 patients with NBAS mutations was used to explore genotype-phenotype correlations. No patient was found to carry two truncating variants, indicating a possible lethal effect of complete NBAS loss of function. Of note, a severe hepatic involvement (i.e., acute liver failure) was associated with variants involving exons 4-40, the majority affecting the NBAS-Nterm and Sec39 functional domains. Mild liver involvement (i.e., elevated transaminase level) was generally associated with variants in the N-term and C-term of the protein. p.C1199Y was the most common variant associated with a pure and severe hepatic phenotype.

Conclusion: We identified c.6840G>A, a novel NBAS splice mutation causing skipping of exon 51. We showed that the disorder caused by biallelic NBAS mutations has recognizable facial features, and that genotype-phenotype correlations are apparent, and can provide useful information to improve the clinical management.

COD. P011

Whole exome sequencing in clinical diagnosis of fetuses with ultrasound anomalies

L. Pezzoli¹, D. Marchetti¹, A. Pansa¹, A. Cereda², L. Pezzani¹, A. Scatigno³, A.R. Lincesso¹, L. Perego¹, U. Giussani¹, L. Spaccini⁴, F. Lalatta⁵, M. Iascone¹

¹*UOSD SMeL 4 Citogenetica e Genetica Medica, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo*

²*USC Pediatria, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo*

³*Centro per la diagnosi e il trattamento della Cardiomiopatia Ipertrofica, Policlinico di Monza*

⁴*Ostetricia e Ginecologia, Ospedale dei Bambini Vittore Buzzi, Milano*

⁵*UOSD Genetica Medica, Fondazione IRCCS Cà Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano*

Whole exome sequencing (WES) is an emerging technique in prenatal diagnosis, although its use is still limited by interpretation challenges due to incomplete prenatal phenotyping and lack of prenatal ultrasound-genotype databases.

We retrospectively evaluated our data on 29 fetus-parents trios from terminated pregnancies because of multiple congenital anomalies identified by fetal ultrasound. After written informed consent, DNA was extracted from amniocytes or fetal fibroblasts after pregnancy termination and peripheral blood samples of parents. WES analysis was performed and autoptic data were collected. All cases had been previously analyzed by karyotype and microarray and no pathogenic or likely pathogenic variants had been identified. Five families showed recurrence of ultrasound anomalies and/or miscarriage.

By trio-based WES analysis, 11 fetuses (38%) showed pathogenic variants. Three out of these 11 fetuses (27%) had autosomal dominant conditions occurring de novo, while 8 (73%) had recessive diseases (3 homozygous and 4 compound heterozygous). Genetic diagnoses provided by WES included two Joubert syndromes, one osteogenesis imperfecta, one Cornelia De Lange syndrome, one tubulinopathy, one complex brain anomaly with WDR81 gene mutation, three congenital myopathies, one hypophosphatasia and one autosomal dominant BICD2-related spinal muscular atrophy. All these findings fulfilled the clinical suspicion and/or were consistent with sonographic or autoptic findings. Among the 5 families with recurrence of ultrasound anomalies and/or miscarriage, two (40%) were diagnosed with recessive conditions.

Our results show that WES is likely to be a valuable diagnostic testing option for fetuses with multiple congenital anomalies, allowing for accurate counseling and prenatal diagnosis in future pregnancies. Although the high detection rate yielded by WES, this approach still shows time constraints and interpretation challenges, that limit its utility in decision-making of ongoing pregnancies. Indeed, the lack of a deep clinical characterization and the impossibility to monitor the evolving phenotype due to pregnancy termination limit the genetic report to pathogenic variants that cause a well-known fetal phenotype.

COD. P012

Eredità digenica-biparentale di mutazioni causative in un paziente affetto da FSHD

C. Strafella^{1,2}, V. Caputo¹, M.R. Galota³, V. Errichiello¹, M. Scutifero⁴, R. Petillo⁴, L. Colantoni³, S. Zampatti³, R. Cascella^{1,5}, G. Deidda⁶, L. Politano⁴, E. Giardina^{1,3}

¹Dip. di Biomedicina e Prevenzione, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Roma, Italia.

²Lab. Emotest, Pozzuoli, Italia

³Lab. di Medica Genomica UILDM, Fondazione Santa, Roma, Italia

⁴Cardiomiologia e Genetica Medica, Dip. di Medicina Sperimentale, Università della Campania "Luigi Vanvitelli", Napoli, Italia.

⁵Dip. per la Valutazione Chimico-Tossicologica e Farmacologica dei Farmaci, Università Cattolica Nostra Signora del Buon Consiglio, Tirana, Albania

⁶Istituto di Biologia Cellulare e Neurobiologia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Monterotondo, Roma, Italia.

La Distrofia FacioScapoloOmerale (FSHD; OMIM #158900 e #158901) è caratterizzata da debolezza muscolare, che inizialmente colpisce i muscoli facciali e successivamente si estende agli arti superiori ed inferiori. La FSHD è una delle forme più comuni di miopatia con un'incidenza di 1/8300 individui. È descritta come autosomica dominante con penetranza incompleta ed espressività variabile. Diversi studi hanno ormai dimostrato che la severità della malattia è riconducibile a cause genetiche e epigenetiche. Dal punto di vista genetico, può essere causata da una contrazione di diverse unità ripetute (RU) localizzate sulla regione cromosomica 4q35, denominata D4Z4. Il locus D4Z4 è normalmente ipermetilato inducendo il silenziamento dei numerosi geni. È stato valutato che spesso l'assetto genetico degli affetti è costituito da una contrazione (1-10 RU) della regione 4q35 con conseguente ipometilazione di diversi geni. Inoltre, SMCHD1 (18p11.32) è stato identificato come ulteriore gene causativo della malattia e di una sua forma alternativa nota come FSHD2. La FSHD è stata studiata in una famiglia composta da: probando con fenotipo severo, padre e madre clinicamente sani e zio materno con lievi sintomi. L'analisi del locus D4Z4 ha rilevato che probando e padre mostravano un frammento di 8 RU, mentre madre e zio un frammento rispettivamente di 26 e 25 RU. I risultati ottenuti non erano correlabili al fenotipo e alla severità della malattia, pertanto è stato analizzato SMCHD1, mediante NGS, sull'intera coorte. L'analisi molecolare ha rilevato la c.5150_5151delAA (p.Lys1717fs) in eterozigosi nel probando, nella madre e nello zio. Successivamente, è stata condotta un'analisi di metilazione evidenziando profili significativi nel probando e nella madre. L'integrazione dei diversi livelli analitici, condotti sull'intera famiglia, ha consentito di spiegare la severità del fenotipo nel probando e l'origine digenica (frammento corto e mutazione in SMCHD1) della malattia, permettendo una precisa correlazione genotipo-fenotipo. In fine, i risultati ottenuti evidenziano l'importanza di studiare il gene SMCHD1, di condurre un'analisi di segregazione familiare e di spiegare la complessità della malattia mediante consulenza genetica pre e post test.

COD. P013

An invariant frameshift altering the C-terminal tail of HIST1H1E accelerates cellular senescence and causes premature aging

S. Martinelli¹, E. Flex¹, A. Van Dijck², C. Andreoli³, S. Cecchetti⁴, E. Coluzzi⁵, L. Pannone⁶, G. Catanzaro⁷, A. Cioffi⁶, F.C. Radio⁶, S. Pizzi⁶, G. Carpentieri⁶, E. Ferretti⁷, S. Majore⁸, A. De Luca⁹, A. Sgura⁵, F. Kooy², M. Tartaglia⁶

¹*Dep. of Oncology and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy*

²*University of Antwerp, Edegem, Belgium*

³*Dep. of Environment and Health, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy*

⁴*Core facilities, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy*

⁵*Dep. of Science, University of Rome "Roma Tre", Rome, Italy*

⁶*Genetics and Rare Diseases Research Division, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Rome, Italy*

⁷*Dep. of Experimental Medicine, University of Rome "Sapienza", Rome, Italy*

⁸*Dep. of Molecular Medicine, Sapienza University San Camillo-Forlanini Hospital, Rome, Italy*

⁹*Mendel Laboratory, Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy*

Histones mediate dynamical packing of nuclear DNA in chromatin, a process that must be finely controlled to accomplish chromosomal segregation during mitosis, and DNA replication, transcription and repair. Recently, a narrow spectrum of germline mutations in HIST1H1E, which encodes a member of the linker histone family facilitating higher order chromatin folding, has been causally linked to an overgrowth condition with intellectual disability. Here, we report that these HIST1H1E mutations specifically affect the C-terminal tail of the protein resulting in stable proteins that localize in the nucleus, bind to chromatin, but disrupt proper compaction of DNA. Cells endogenously expressing these mutants have a dramatically reduced proliferation rate and competence, hardly enter into the S phase, and undergo accelerated senescence. Consistently, a premature aging appearance represents a previously unrecognized clinical feature of adolescents/adults with HIST1H1E mutations. Overall, our findings identify a direct link between aberrant chromatin remodeling and senescence.

COD. P014

A novel dominant-negative FGFR1 variant causes Hartsfield syndrome by deregulating RAS/ERK1/2 pathway

P. Palumbo¹, A. Petracca¹, T. Biagini², M.C. Sacco³, E. De Schiavi⁴, M. Carella¹, L. Micale¹, M. Castori¹

¹*UOC Genetica Medica - IRCCS-Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

²*Unità di Bioinformatica, IRCCS-Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

³*Unità Operativa di Pediatria, IRCCS-Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

⁴*Istituto di Bioscienze e Biorisorse, CNR Napoli*

Hartsfield syndrome (HS; MIM#615465) is an ultrarare developmental disorder mainly characterized by holoprosencephaly and ectrodactyly and caused by heterozygous or biallelic variants in the fibroblast growth factor receptor type 1 gene (FGFR1). FGFR1 belongs to the FGFR family that cooperate with fibroblast growth factors (FGFs) in the transduction of signaling pathways including the RAS/ERK1/2. Exome sequencing analysis in a 12-year-old boy with HS detected a novel de novo heterozygous missense variant in exon 14 of FGFR1 (NM_023110: c.1934 C>T), predicted to cause the p.Ala645Val aminoacid substitution. In order to evaluate the potential pathogenetic effect of this variant, which affects a highly conserved residue falling within the kinase domain, biochemical studies were employed. We measured the FGFR1 receptor activity in FGF2 treated-HEK293 cell lines exogenously expressing wild type or mutated FGFR1, by monitoring the phosphorylation level of endogenous ERK1/2 and by profiling the mRNA expression of c-Fos, a direct known transcriptional target of FGFR1-FGF2-ERK1/2 axis. Our analysis highlighted that RAS/ERK1/2 signaling was significantly perturbed in cells expressing mutated FGFR1, in comparison with control cells. Furthermore, considering the recent findings providing a novel role of FGF2/FGFR1 signaling in the regulation of autophagy flux in cancer, we further investigated the p.Ala645Val variant by exploring its effect on the LC3 levels, which is the major autophagy-related protein. We observed an impairment of the autophagic process in cells expressing mutated FGFR1 compared to control cells. All together these results strongly support the pathogenic effect of Ala645Val FGFR1 variant. Our study expanded the FGFR1 mutational spectrum associated to HS and provides functional evidences supporting a dominant-negative effect of this category of FGFR1 pathogenic variants.

COD. P015

GNB5-related syndrome: an update and a disease cell-modelling approach

N. Malerba¹, G.M. Squeo¹, B. Augello¹, G. Poke², S. Towner³, S. Landi⁴, P. Benzoni⁴, F. Giannetti⁴, I.E. Scheffer⁵, H.C. Mefford⁶, A. Barbuti⁴, L.G. Sadleir², G. Merla¹

¹*Division of Medical Genetics, IRCSS Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, San Giovanni Rotondo*

²*Department of Paediatrics and Child Health, University of Otago, Wellington*

³*Division of Medical Genetics, University of Virginia, Charlottesville*

⁴*Department of Biosciences, Univ. degli Studi di Milano*

⁵*University of Melbourne, Austin Health, Melbourne*

⁶*Departments of Paediatrics, University of Washington, Seattle*

Homozygous and compound heterozygous mutations in GNB5 have been associated with a spectrum of clinical presentations ranging from a severe multisystem disorder which includes intellectual disability, early infantile developmental and epileptic encephalopathy, retinal abnormalities, and cardiac arrhythmias (IDDCA) to a milder form with language delay, attention-deficit/hyperactivity disorder and cognitive impairment with or without cardiac arrhythmia (LADCI). Twenty-one cases have been reported. Here we report an update of the clinical and molecular features of GNB5-Related disorder. Although the number of identified GNB5 pathogenic variants is small, there is a mutational hot spot in exon 2, encoding the first WD40 protein domain. More patients are needed to further establish a genotype-phenotype correlation; however, mild ID is always associated with the presence of the p.(Ser81Leu) missense variant. Moreover a large number of patients carrying LoF GNB5 alleles have early infantile developmental and epileptic encephalopathy. In contrast, individuals carrying homozygous or compound heterozygous GNB5 missense variants do not have seizures. GNB5, together with R7-RGS7 proteins, is a crucial player of the GPCR cascade, including neuronal and cardiac signalling mediated by GIRK and other ion channels, and indeed GNB5 has been recently identified as part of the supramolecular complexes composed of GPCR/GNB5/R7-RGS/GIRK. We have generated and characterized human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) from 2 affected patients, 2 parents and 3 healthy controls. The iPSC cell lines have been characterized by qPCR and immunofluorescence assays and will be differentiated into cardiac (iCM) and neuronal (iN) cells, which are tissues relevant to the GNB5 phenotypes. iCMs and iNs will be profiled by omics - RNA seq and proteomics. Electrophysiology studies and preliminary data will be presented.

COD. P016

Large case-control study and functional analyses show that FANCM truncating mutations are associated with a breast cancer risk magnitude that varies depending on their location.

G. Figlioli¹, M. Bogliolo², L. Caleca³, BCAC Collaborators, P. Radice³, J. Surrallés², P. Peterlongo¹

¹*Genome Diagnostics Program, IFOM, The FIRC Institute of Molecular Oncology, Milan, Italy.*

²*Department of Genetics and Microbiology, Genetics Department of Hospital de les Santes Creus i Sant Pau, Universitat Autònoma de Barcelona, and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain.*

³*Unit of Molecular Bases of Genetic Risk and Genetic Testing, Department of Preventive and Predictive Medicine, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy.*

Breast cancer is the most common female oncological disease. About 50% of the familial cases are explained by rare mutations in BRCA1 and BRCA2 and other high-risk genes, by mutations in moderate-risk genes including PALB2, ATM and CHEK2, and by common low-risk alleles. Previously, other and we showed that truncating mutations within the FANCM gene are associated with breast cancer risk, particularly with ER-negative subtype. Also, we recently observed that upstream mutations cause more severe clinical phenotypes than those located in the C-terminus.

In this study, the three most common FANCM truncating mutations p.Arg658*, p.Gln1701* and p.Arg1931* were genotyped in 67,112 breast cancer cases and 53,766 controls, collected within the Breast Cancer Association Consortium. Multivariate logistic regression analyses indicated that the N-terminus p.Arg658* is a moderate risk factor for ER-negative and for triple negative breast cancers (TNBC): odds ratio (OR)=2.44 (95% CI 1.12-5.34, P=0.025) and OR=3.79 (95% CI 1.56-9.18, P=0.003), respectively. Similar analyses showed that the C-terminus mutations p.Gln1701* and p.Arg1931* are low-risk factors for TNBC [OR=2.15 (95% CI 1.05-4.38, p=0.036)] and for ER-negative breast cancer [OR=1.98 (95% CI 1.26-3.13, P=0.003)], respectively.

We performed functional studies based on patient derived FANCM### immortalized fibroblasts transduced with lentiviral vectors expressing the FANCM p.Arg658*, p.Gln1701* and p.Arg1931*. The effect of these mutations on the DNA repair mechanism was assessed by analyzing the cellular sensitivity to diepoxybutane (DEB) and the chromosome fragility. Fibroblasts expressing the p.Arg658* showed lower survival rates and higher number of chromosome breaks than cells harboring the p.Gln1701* and the p.Arg1931* mutations.

In conclusion, our genetic, functional, and previously published clinical data suggest that N-terminus FANCM truncating mutations are associated with a breast cancer risk higher than that conferred by mutation in the C-terminus and with a more severe cellular and clinical phenotype

COD. P017

NGS GENOTYPIC DEFINITION IN HEREDITARY CARDIOMYOPATHIES

M. Farnè¹, D. Ognibene¹, C. TrabANELLI¹, R. Selvatici¹, C. Balla², A. Brieda², F. Vitali², A. Balboni¹, P. Rimessi¹, S. Neri¹, M. Biffi³, G. Bronzetti⁴, E. De Maria⁵, C. Rapezzi³, A. Percesepe⁶, V. Uliana⁶, G. Rocchi⁷, M. Ziacchi³, B. Sassone⁸, S. Virzi⁸, G. Boriani⁹, A. Fucili², S. Fini¹, M. Bertini², A. Ferlini¹, F. Gualandi¹

¹Unit of Medical Genetics, Department of Medical Sciences, University of Ferrara, Ferrara, Italy

²Centro Cardiologico Universitario and LTTA Centre, University Hospital of Ferrara, Ferrara, Italy

³Cardiology, Department of Experimental Diagnostic and Specialty Medicine, Alma Mater Studiorum-University of Bologna, Bologna, Italy

⁴Pediatric Cardiology and GUCH Unit, S. Orsola-Malpighi Hospital, Alma Mater Studiorum-University of Bologna, Bologna, Italy

⁵Cardiology Unit, Ramazzini Hospital, Carpi (Modena), Italy

⁶Medical Genetics, Department of Medicine and Surgery, University of Parma, Parma, Italy

⁷Cardiology Unit, Ospedali Riuniti Marche Nord, Pesaro, Italy

⁸Department of Medicine, Division of Cardiology, Cento Hospital, AUSL Ferrara, Italy

⁹Cardiology Division, Department of Biomedical, Metabolic and Neural Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy

Primary cardiomyopathies are myocardium diseases associated with mechanical and/or electrical dysfunction with frequent genetic etiology; they are characterized by broad phenotypic and genotypic variability and a high prevalence in the general population and they are a frequent cause of sudden death in young adults. Over a three-year period in clinic and in laboratory, we studied 290 patients, of whom 80 were female and 210 were male, affected by: hypertrophic (HCM, n=104, 36%), dilated (DCM, n=32, 11%) and arrhythmogenic cardiomyopathy (AC, n=36, 12.5%), Brugada Syndrome (BrS, n=52, 18%), Long-QT Syndrome (LQTS, n=26, 9%), Short-QT Syndrome (SQTS, n=3, 1%), Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT, n=4, 1%), overlap forms (n=12, 4%) and other conduction system diseases (n=21, 7.5%). NGS molecular analysis was performed using gene panels with different sensitivity and clinical validity, following a diagnostic flow-chart based on phenotypic definition. The medium detection rate, referring to the 235 concluded analysis, was 50.6%; in particular, a genetic defect was identified in 36% of HCM, 35% of DCM, 75% of AC, 71% of BrS and 75% of LQTS. New variants or variants of uncertain significance (VUS) and complex genotypes, with occurrences of multiple mutations in a single person, were frequently detected. In 50 families, the proband's characterization allowed for familial segregation analysis in healthy and affected subjects. In our experience in a combined cardio-genetic clinic, the precise phenotypic characterization and the deep definition of the genetic history allowed us to apply genetic testing in an appropriate way, with a subsequent elevated detection rate, especially in arrhythmic forms. We have identified complex genotypes, which are the expressions of digenic inheritance or of mutation load, behind both structural and arrhythmic phenotypes. These data contribute to defining the knowledge of etiopathogenesis of cardiomyopathies and have a relevant impact on the risk stratification of both affected and presymptomatic subjects in order to adopt measures of primary prevention for major adverse cardiac events.

COD. P018

Primary biliary cholangitis: a chromosome X-wide association study revealed 5 novel susceptibility loci

R. Asselta¹, E. Paraboschi¹, M. Carbone², A. Gerussi², V. Ronca², L. Cristoferi², F. Malinverno², S. Duga¹, P. Invernizzi²

¹*Department of Biomedical Sciences, Humanitas University, Pieve Emanuele (Mi)*

²*Division of Gastroenterology and Center for Autoimmune Liver Diseases, San Gerardo Hosp., Dept. of Surgery and Medicine, University of Milan Bicocca, Milan*

Background & Aims

Genome-wide association studies (GWAS) in primary biliary cholangitis (PBC) failed to find X chromosome genetic variants associated with the disease. However, these studies analyzed the X chromosome applying methods designed for autosomes, without accounting for the analytical problems arising from X unique mode of inheritance. Aim of our study was to explore the contribution of the X chromosome to the genetic architecture of PBC -a highly sexually dimorphic complex disease with an autoimmune etiology- by performing a chromosome X-wide association study (XWAS).

Methods

The study included data derived from 5 GWAS studies (cohorts from Italy, UK, Canada, China, Japan), for a total of 5,244 cases and 11,875 controls. Genotype data were quality checked, corrected for population stratification, and imputed using the IMPUTE2 software. A total of 110,000 SNPs, common to all cohorts, were then used for association analyses. These were performed by using the PLINK-XWAS software by: 1) assuming uniform and complete X-inactivation in females and a similar effect size for males and females; and 2) considering separately males and females and then by combining p values (taking into account: differential effect-size/direction between males and females, and the weight of each study). A subsequent meta-analysis was performed using METAINTER.

Results

In the single-SNP association analysis we found 11 population-specific loci associated with PBC at a suggestive $p < 5 \times 10^{-5}$, the most significant being a signal mapping within the OTUD5 gene ($p = 4.80 \times 10^{-6}$; OR=1.39 CI=1.03-1.58; Japanese cohort). This gene codes for a protein that was demonstrated to suppress the type-I interferon-dependent innate immune response. The meta-analysis was performed separately for Caucasian and East Asian populations. This analysis revealed 7 novel loci, 5 of which (GRIPAP1, PIM2, OTUD5, LLOXNC01, KCND1) below the threshold for X-wide significance. Finally, we performed a gene-ontology analysis, evidencing a significant enrichment for genes involved in immune system ($p = 8.4 \times 10^{-11}$).

Conclusions

By applying a XWAS analysis, we were able to evidence novel association signals with PBC risk, shedding light on the genetic contribution of the "neglected" X chromosome to this immune-mediated disorder.

COD. P019

AUTOSOMAL DOMINANT DISTAL MOTOR NEUROPATHY ASSOCIATED WITH A NOVEL EMILIN1 MUTATION

M. Iacomino², R. Doliana¹, P. Striano², A. Capuano², F. Madia², C. Romeo², P. Spessotto¹, R. Iodice³, F. Manganeli³, S. Assereto², A. Tessa⁴, F. Santorelli⁴, A. Colombatti¹, C. Minetti², F. Zara², C. Fiorillo²

¹ *Istituto Giannina Gaslini, Genova*

² *Istituto Nazionale Tumori IRCCS, Aviano (PN)*

³ *Dipartimento di Neuroscienze, Università Federico II, Napoli*

⁴ *IRCCS Stella Maris, Calambrone (PI)*

INTRODUCTION: Distal hereditary motor neuropathies (dHMNs) are genetically heterogeneous conditions characterized by neurogenic amyotrophy and weakness of the distal lower limbs.

AIM OF THE STUDY: We report a family affected by autosomal dominant dHMN, in which whole exome sequencing (WES) identified a novel mutation in EMILIN1.

A 55-year-old man and his three children showed amyotrophy and weakness of the distal lower limbs dating back to early childhood.

Electrophysiology studies showed neurogenic changes on EMG and reduced amplitude of CMAP in distal leg muscles; muscle biopsy displayed few signs of neurogenic damage.

RESULTS: We performed WES and identified a novel heterozygous mutation c.748C>T (p.R250C) in EMILIN1. Elastin microfibril interface-located protein 1 (EMILIN1) is an extracellular matrix glycoprotein implicated in elastogenesis and cell proliferation. Mouse models indicate that EMILIN1 is important for correct functioning of vascular elastic fibers, whereas zebrafish models suggest a role in the nervous system development; in humans, it was reported to cause an autosomal dominant connective tissue disorder with peripheral neuropathy.

The p.R250C mutation is novel and affects a conserved amino acid located in a coiled-coil-forming region; in silico analysis showed that p.R250C has disrupting effects on coiled-coil formation.

Western blot of extracellular matrix lysate showed a marked reduction of secreted EMILIN1 protein.

We documented a strong presence of EMILIN1 in the nerve bundles; when co-immuno-stained with S100, EMILIN1 appears prevalently in the layers of connective tissue around axons.

We demonstrated that EMILIN1 is produced and secreted by cells derived from schwannoma tissue; we tested skin fibroblasts and documented a reduced extracellular deposition of EMILIN1 with a disorganized network of poorly ramified fibers.

CONCLUSIONS: We report the second family carrying a novel pathogenic EMILIN1 mutation with a damaging effect on skin fibroblasts. We documented significant expression of EMILIN1 in structures of the nervous tissue. Our findings allow to endorse the role of EMILIN1 in human disease of peripheral nerves, adding a more selective involvement of the distal motor neurons.

COD. P020

Novel mutations in VPS13A expand the spectrum of neuroacanthocytosis in Italian patients. A cross-sectional study

M. Barghigiani¹, D. Galatolo¹, P. Chiurazzi², A.R. Bentivoglio³, S. Servidei³, A. Vaisfeld², M. Genuardi², M. Petracca³, M.A.B. Melone⁴, C. Dato⁴, G. Di Iorio⁴, S. Peluso⁵, G. De Michele⁵, A. Filla⁵, A. Tessa¹, F.M. Santorelli¹

¹*Medicina Molecolare, IRCCS Fondazione Stella Maris, Pisa*

²*Istituto di Medicina Genomica, Università Cattolica del Sacro Cuore & UOC Genetica Medica Fondazione Policlinico Universitario "A.Gemelli" IRCCS, Rome*

³*UOS Disturbi del Movimento, Istituto di Neurologia, Fondazione Policlinico Gemelli IRCCS, Università Cattolica S. Cuore, Rome*

⁴*Dep of Medical, Surgical, Neurological, Metabolic Sciences, and Aging, 2nd Division of Neurology, Center for Rare Diseases and InterUniversity Center for Research in Neurosciences, University of Campania "Luigi Vanvitelli", Naples*

⁵*Dep of Neurosciences and Reproductive and Odontostomatological Sciences, Federico II University, Naples, Italy*

Neuroacanthocytosis (NA) represents a group of ultrarare diseases (prevalence 5:1.000.000) characterized by choreiform movements and erythrocytic acanthocytosis in peripheral blood smear, where chorea-acanthocytosis (ChAc) and McLeod syndrome (MLS) represent the main entities. ChAc (OMIM #200150) is a genetic disorder caused by autosomal recessive mutations in the VPS13A gene encoding chorein, which is involved in intra-cellular trafficking of transmembrane proteins. MLS (OMIM #300842) is X-linked and caused by mutations in the XK gene coding for the XK protein, which is a membrane transport protein with unknown function. In this study we screened for mutations in VPS13A and XK in 11 patients, belonging to 6 families, where NA was suspected on the basis of clinical findings, MRI images and acanthocytes in peripheral blood. We identified 9 different novel mutations in VPS13A gene in 8 patients including 2 frameshift, 3 nonsense, 1 missense and 3 splice site mutations. In 2 ChAc patients, genetic data were confirmed by western blot analysis performed on erythrocytes that showed absence or marked reduction of chorein expression. In a single patient, harboring a homozygous mutation affecting the canonical splice site sequences, we also characterized the effect of the gene variant at the level of blood cDNA. In a single case we detected an homozygous deletion encompassing the exon 1 of XK. This study provides new data on the molecular genetics of Italian NA patients and, to the best of our knowledge, it is one of the largest case series in NA, expanding phenotypic and genetic findings in chorea-acanthocytosis. Sequencing of VPS13A and XK should be regarded as a reliable diagnostic and research tool to help confirming a clinical diagnosis of NA and to facilitate future management and counseling of these patients.

COD. P021

Research of non-invasive expression biomarkers using human exon microarrays in Myotonic Dystrophy patients

F. Maiorca¹, E. Morini¹, F. Centofanti¹, L. Fontana¹, V.V. Visconti¹, F. Sangiuolo¹, G. Novelli¹, F. Amati, A. Botta¹

¹*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 and represent the most common muscular dystrophy in adults. DM1 is caused by expansion of CTG triplet repeats in 3' untranslated region (UTR) of dystrophin myotonia protein kinase gene (DMPK), whereas DM2 phenotype depends to the expansion of CCTG tetranucleotide in intron 1 of the zinc finger protein-9 gene (CNBP). In DM pathogenesis, untranslated CUG/CCUG-RNAs interfere with the normal activity of the RNA-binding proteins MBNL1 (Muscleblind-Like Splicing Regulator 1) and CUGBP1 (Elav-like Family member 1; CELF1) leading to the spliceopathy typical of DM cells and tissues. The aim of our work is to analyze the splicing isoforms of mRNAs involved in DM-spliceopathy in PBMCs from DM patients to identify possible non-invasive molecular biomarkers sensitive to the diseases progression and useful for current clinical trials. RNA from leukocytes of DM1, DM2 and healthy controls (6, 9 and 3, respectively) has been isolated to perform a whole genome expression analysis of alternative splicing by SurePrint G3 Human Exon Microarrays. EASANA bioinformatics analysis has been performed to detect exons differentially expressed between DM and control samples and to select only those with a splicing index statistically significant (fold-changes ≥ 2.0 and P-values ≤ 0.05). Preliminary results showed a global deregulation in the expression levels of 421 genes (94 upregulated and 327 downregulated) in DM1 patients and 2407 genes (1031 upregulated and 1376 downregulated) in DM2 samples. A total of 421 exons (from 642 genes) and 1933 exons (from 2658 genes) in DM1 and DM2 samples respectively are deregulated. Of these 60 and 1338 exons are upregulated, whereas 370 and 1320 exons are down regulated respectively in DM1 and DM2 patients. These genes are involved in different pathways linked to the DM pathogenesis and clinical phenotype: signalling in immune system, circadian rhythm, apoptosis and mTOR signalling. RT-PCR is currently in progress to validate the misregulated splice events identified by the microarray analysis as non-invasive biomarkers for DM diseases.

COD. P022

Defective kinesin binding of TUBB2A causes progressive spastic ataxia syndrome resembling saccinopathy.

A. Sferra¹, F. Fattori¹, T. Rizza¹, E. Flex², E. Bellacchio³, A. Bruselles², S. Petrini⁴, S. Cecchetti⁵, M. Teson⁶, F. Restaldi⁷, A. Ciolfi³, F.M. Santorelli⁸, G. Zanni¹, S. Barresi³, C. Castiglioni⁹, M. Tartaglia³, E. Bertini¹

¹Unità di Malattie Neuromuscolari e Neurodegenerative, Dip. di Neuroscienze, Osp. Pediatrico Bambino Gesù

²Dip. di Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità

³Divisione di Malattie Genetiche e Rare, Osp. Pediatrico Bambino Gesù

⁴Core Facility di Microscopia Confocale, Laboratori di Ricerca, Osp. Pediatrico Bambino Gesù

⁵Unità di Microscopia Confocale, Core Facilities, Istituto Superiore di Sanità

⁶Lab. di Biologia Molecolare e Cellulare, Istituto Dermatologico Dell'Immacolata IDI-IRCCS

⁷Unità di Genetica Medica, Osp. Pediatrico Bambino Gesù

⁸IRCCS Stella Maris, U.O. di Medicina Molecolare e Disordini Neuromuscolari

⁹Unità di Neurologia, Dip. di Pediatria, Clínica Las Condes

Microtubules participate in fundamental cellular processes, including chromosomal segregation and cell division, migration and intracellular trafficking. Their proper function is required for correct central nervous system development and operative preservation, and mutations in genes coding tubulins, the constituting units of microtubules, underlie a family of neurodevelopmental and neurodegenerative diseases, collectively known as 'tubulinopathies', characterized by a wide range of neuronal defects resulting from defective proliferation, migration and function. Here, we causally link a previously unreported missense mutation in TUBB2A (c.1249G>A, p.D417N), encoding one of the neuron-specific β -tubulin isotype II, to a disorder characterized by progressive spastic paraplegia, peripheral sensory-motor polyneuropathy and ataxia. Asp417 is a highly conserved solvent-exposed residue at the site mediating binding of kinesin superfamily motors. Impaired binding to KIF1A, a neuron-specific kinesin required for transport of synaptic vesicle precursors of the disease-associated TUBB2A mutant, was predicted by structural analyses and confirmed experimentally in vitro. We show that overexpression of TUBB2AD417N disrupts the mitotic spindle bipolarity and morphology and affects the M phase entry and length. Differently from the TUBB2AN247K and TUBB2AA248V, two mutants previously identified to affect neurodevelopment, TUBB2AD417N retains the ability to assemble into microtubules. Consistent with the differential clinical and structural impact, TUBB2AA248V does not drastically affect TUBB2A binding to KIF1A, nor mitotic spindle bipolarity. Overall, our data demonstrate a pathogenic role of the p.D417N substitution that is different from previously reported TUBB2A mutations and expand the phenotypic spectrum associated with mutations in this gene.

COD. P023

Defective trafficking of inflammatory response factors exhibit hyposensitive immunogenic response in skin fibroblasts from Ataxia-Telangiectasia patients

E. Pozzi¹, S. Cannito³, M. Parola³, S. Augeri⁴, G. Amodio⁵, S. Gregori⁵, C. Mariotti⁶, E. Giorgio¹, C. Mancini¹, E. Di Gregorio², M. Ferrero¹, E. Riberi¹, E. Chierto¹, S. Trajkova¹, S. Cavalieri², A. Brusco^{1,2}

¹*Department of Medical Sciences, University of Torino, Italy*

²*S.C.D.U. Medical Genetics, A.O.U. Città della Salute e della Scienza, Torino, Italy*

³*Department of Clinical and Biological sciences, Unit of Experimental Medicine and Clinical pathology, University of Turin, Italy*

⁴*Department of Medical Sciences, Immunogenetics Unit, University of Turin, Italy*

⁵*San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy, Milan, Italy*

⁶*Unit of Genetics of Neurodegenerative and Metabolic Diseases, IRCCS Neurologic Institute "Carlo Besta", Milan, Italy*

Background: ATM kinase is a central component of the DNA damage repair machinery and redox balance. ATM dysfunction results in the multisystem disease Ataxia-Telangiectasia (A-T). Despite the cerebellar ataxia is the prominent symptom, the major cause of mortality in A-T patients is due to lung disease caused by failure of the immune system to react against recurrent bacterial infections of the upper-respiratory tract and oral tissues. Since oxidative stress and inflammation are emerging as important hallmarks in A-T, we hypothesized that A-T patients could exhibit impaired innate immune response due to defective pattern-recognition receptors (PRRs) such as Toll-like receptors (TLRs). Methods: Primary skin fibroblasts from A-T and healthy controls were assessed for some genes encoding inflammatory response factors using RT-qPCR and citofluorimetric analysis, before and after E.Coli lipopolysaccharide (LPS) and Tumor Necrosis Factor (TNF- α) stimuli. LPS and TNF- α mediated Nf-k β activation was measured by western blot analysis. Results: We found a complete absence of NF-kB activation, TLR-4 and IL-6 gene expression in A-T cells compared to control lines, both at basal levels and after LPS stimulation. Furthermore, IL-6 was significantly lower in culture media of A-T cells with or without LPS. In A-T cells IL-8 was significantly up-regulated compared to control cells but after 4 hours of LPS and TNF-a treatment, we found a reduced IL-8 gene expression in A-T cells as compared to control cell lines, both after TNF-a but mainly after LPS stimulation. Conclusions: Our studies indicate a defective trafficking of TLR-4 and CD14 in response to LPS stimuli. This defect could contribute to hyposensitive response of A-T patients to immunogenic challenge. Further investigations in this pathways could provide a potential target for therapeutic clinical intervention in A-T.

COD. P024

La genetica come strumento per la identificazione di nuovi bersagli terapeutici per malattie complesse

M. Floris^{1,2}, S. Olla², D. Schlessinger³, F. Cucca^{1,2}

¹*Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Sassari, Italy*

²*IRGB-CNR, Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Monserrato, Cagliari, Italy*

³*Laboratory of Genetics, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, MD, USA*

La corretta identificazione delle molecole e dei meccanismi con un ruolo primario nella fisiopatologia di una malattia complessa è il primo passo essenziale nella scoperta di bersagli modulabili terapeuticamente. Tuttavia, la ricerca di nuovi bersagli terapeutici è spesso ostacolata dalla inadeguatezza delle informazioni riguardanti i meccanismi eziopatogenetici alla base della malattia, ed è classicamente basata su prove indirette, come quelle provenienti da modelli animali, cellulari ed ex vivo e da studi epidemiologici sull'uomo.

Purtroppo, terapie basate su evidenze provenienti dalla biologia animale spesso non risultano efficaci quando sono testate sull'uomo. Analogamente, gli studi epidemiologici sull'uomo, come quelli che confrontano i livelli ematici di molecole correlate alla malattia nei casi rispetto ai controlli, sono soggetti al "bias della causalità inversa" (ad esempio, se nei malati vengono rinvenuti livelli ematici di una molecola solubile più elevati rispetto agli individui sani, non è possibile stabilire chiaramente se questa molecola ha un ruolo nella eziopatogenesi della malattia oppure se – al contrario - questa molecola aumenta nel sangue come conseguenza della malattia). In questo contesto, la genetica umana sta rivelando sempre più la sua importanza nei programmi industriali di scoperta dei farmaci, soprattutto per la potenzialità nell'identificare i nessi di causalità tra malattie complesse e fenotipi "intermedi" (ovvero fenotipi misurabili che controllano un punto chiave lungo la catena di eventi molecolari che portano alla malattia; per esempio, i livelli delle cellule del sistema immunitario o di un metabolita che sono geneticamente correlati con la malattia).

Di recente, abbiamo sviluppato un approccio sistematico per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici a partire da dati genetici. Si tratta di un processo articolato in dieci step sequenziali, qui discussi in dettaglio, che ha trovato i primi riscontri nello studio di malattie complesse di tipo autoimmune in cui, utilizzando studi di associazione sull'intero genoma (Genome-Wide Association Studies, GWAS) sono stati forniti vari esempi di associazioni genetiche coincidenti che hanno portato all'individuazione e validazione di bersagli terapeutici.

COD. P025

Whole exome sequencing identifies novel predisposing genes in neural tube defects

P. De Marco¹, P. Lemay³, M. Traverso², E. Merello⁴, A. Cama⁴, Z. Kibar³, V. Capra⁴

¹*Laboratorio Neurogenetica e Neuroscienze, Istituto Giannina Gaslini, Genova*

²*UOC Patologia Muscolare, Istituto Giannina Gaslini, Genova*

³*CHU Sainte-Justine Research Center, University of Montréal, Montreal*

⁴*UOC Neurochirurgia, Istituto Giannina Gaslini, Genova*

Neural tube defects (NTD) are among the most common defects affecting 1 every 1000 births. They are caused by a failure of neural tube closure during development. Their clinical presentation is diverse and dependent on the site and severity of the original defect on the embryonic axis. The etiology of NTD is multifactorial involving environmental factors and genetic variants that remain largely unknown. We have conducted a whole exome sequencing study in 5 new NTD families and pooled the results with WES data from 3 NTD families and 43 trios that were previously investigated by our group. We analyzed the data using biased candidate gene and unbiased gene burden approaches. We identified 4 novel loss of function variants in 3 genes, MTHFR, DLC1 and ITGB1, previously associated to NTD. Notably, DLC1 carried two protein truncating variants in two independent cases. We also demonstrated an enrichment of variants in MYO1E involved in cytoskeletal remodelling. This enrichment reached borderline significance in a replication cohort supporting the association of this new candidate gene to NTD. These data provide some key insights into the pathogenic mechanisms of human NTD and demonstrate the power of next generation sequencing in deciphering the genetics of this complex trait.

COD. P026

ADA2 deficiency without ADA2 mutations explained by a homozygous intragenic structural variation in 22q11.1

A. Grossi¹, R. Cusano², M. Rusmini¹, F. Penco³, F. Schena³, R.A. Podda⁴, R. Caorsi³, M. Gattorno³, P. Uva², I. Ceccherini¹

¹*UOC Genetica Medica and UOSD Genetica e Genomica delle Malattie Rare, Istituto Giannina Gaslini, Genova*

²*Centre for Advanced Studies, Research and Development in Sardinia (CRS4), Science and Technology Park Polaris, Pula*

³*Clinica Pediatrica e Reumatologia e UOSD Centro Malattie Autoinfiammatorie e Immunodeficienze, Istituto Giannina Gaslini, Genova*

⁴*Clinica Pediatrica, Talassemie e Malattie Rare, Ospedale Brotzu e Università degli studi di Cagliari, Cagliari*

The adenosine deaminase 2 (ADA2) gene, located on chromosome 22q11.1, plays a pivotal role in the development of endothelial and haematopoietic cells. Biallelic loss-of-function mutations of this gene cause Deficiency of ADA2 (DADA2), a rare autoinflammatory disease characterized by a variable phenotype, often accompanying by neurological involvement, as well as ischemic or hemorrhagic stroke events. Patients with typical clinical DADA2 and complete enzymatic impairment, may inconsistently be either heterozygous for a ADA2 mutation or homozygous for a reference ADA2 allele, thus suggesting the presence of null alleles. We report a genetic study on a patient clinically evocative of a DADA2 condition, showing a complete lack of the enzymatic activity in circulating monocytes but without any mutation in the coding region of the ADA2 gene. After excluding the involvement of a new gene able to affect the ADA2 enzymatic activity by Whole Exome Sequencing, we sought to check for the possible presence of intronic/regulatory mutation(s), genomic deletion(s) or other structural variants. Whole Genome Sequencing allowed to detect a homozygous tandem duplication of 12895 base pairs in the genomic region encompassing exons 3 and 4, generated by two breakpoints in intron 2 and intron 4 respectively, thus leading to the p.V252Gfs*11 frameshift variation. A series of tests were carried out to confirm this finding, by means of PCR reactions properly designed to amplify the junction fragments both from the genomic DNA and from the cDNA. To identify known repeating elements, possibly accounting for the ADA2 interstitial duplication, we have confirmed the high similarity of the two intron 2 and intron 4 sequences involved in the two breakpoints, resulted in 88% of identity. Chromosome 22q11 is already known as an unstable region subjected to copy number variations and other structural genomic alterations, whose occurrence is mediated by low copy repeats or segmental duplications. The structural variation identified here, in addition to representing the first demonstration of a pathological NAHR mechanism acting in DADA2, adds a further disease to the chromosome 22 structural variability already associated with DiGeorge syndrome, Velocardiofacial syndrome, and Cat Eye Syndrome.

COD. P027

Beyond BRCA: epigenetically-mediated homologous recombination deficiency as a therapeutic choice in breast cancer

C. Mio¹, F. Caponnetto¹, A. Zanella¹, M. Barbina², C. Di Loreto^{1,3}, G. Damante^{1,4}

¹*Dip. di Area Medica, Università degli Studi di Udine, Udine, Italia*

²*Dip. Scienze della Vita, Università di Trieste, Trieste, Italia*

³*Istituto di Anatomia Patologica, ASUIUD, Udine, Italia*

⁴*Istituto di Genetica Medica, ASUIUD, Udine, Italia*

BRCA1 and BRCA2 germline mutations confer an increased risk for developing triple-negative breast cancer (TNBC). BRCA1/2 are tumor-suppressors involved in the homologous recombination (HR) pathway, the high-throughput mechanism for DNA double-strand breaks repair. BRCA1/2 loss of-function mutations hinder HR proficiency and compel cells to rely on low fidelity and error-prone DNA repair pathways. This renders cells targetable to specific therapeutic approaches based on platinum salts or PARP inhibitors (PARPis). PARP, indeed, is a core protein involved in non-HR DNA repair. Cancer displaying clinical and biological features of mutant-BRCA1/2 are acknowledge as BRCAness-showing cancers. The BRCAness phenotype may arise from somatic loss or epigenetic silencing of these genes but also of other HR-related proteins (i.e RAD51, BRIP1, CHEK1/2). The Bromodomain and Extra-Terminal (BET) proteins (BRD2, BRD3, BRD4 and BRDT) possess a tandem bromodomain by which they interact with histone acetyl-lysines to control gene transcription and DNA repair. Importantly, BET inhibitors (BETi) have reached researchers' consensus as well established anti-neoplastic agents in diverse neoplasia. Aims of this study were to assess BET proteins regulation in homologous recombination-mediated DNA repair and to explore selected clinical strategies through the BETis-mediated induction of epigenetic BRCAness in BRCA1 wild-type TNBC cells. First, the direct relationship between BRD4 and BRCA1/RAD51 expression in TNBC cells (i.e. CHIP and RNA interference assays) and the use of two BET inhibitors (JQ1 and GSK525762) was tested assessing a dose-dependent reduction in BRCA1 and RAD51 levels. BETis-treated cells, exhibiting the BRCAness phenotype, fail to overcome the increase in DNA damage following platinum salts (CDDP) exposure, leading to massive cell death, and experience synthetic lethality when combined with PARP inhibitors (AZD2281). Overall, this study demonstrates that BET proteins directly regulate the homologous recombination pathway and that their inhibition induces a BRCAness phenotype in BRCA1 wild-type TNBC cells. Noteworthy, this strategy could potentially enable clinicians to exploit platinum salts and PARP inhibitors-based treatments in a wider population of TNBC patients.

COD. P028

Clinical and functional characterization of two novel ZBTB20 mutations causing Primrose syndrome

E. Stellacci¹, K. Steindl², P. Joset², L. Mercurio¹, M. Anselmi³, S. Cecchetti⁴, L. Gogoll², M. Zweier², A. Hackenberg⁵, G. Bocchinfuso³, L. Stella³, M. Tartaglia⁶, A. Rauch⁷

¹*Dip. Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy*

²*Institute of Medical Genetics, University of Zurich, Schlieren-Zurich, Switzerland*

³*Dip. Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata" Rome, Italy*

⁴*Servizio grandi strumentazioni e core facilities, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy*

⁵*Division of Paediatric Neurology, University Children's Hospital Zurich, Zürich, Switzerland*

⁶*Genetics and Rare Diseases Research Division, Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Rome, Italy*

⁷*radiz—Rare Disease Initiative Zürich, Clinical Research Priority Program for Rare Diseases University of Zurich, Zurich, Switzerland*

⁸*Neuroscience Center Zurich, University of Zurich and ETH Zurich, Zurich, Switzerland*

⁹*Zurich Center for Integrative Human Physiology, University of Zurich, Zurich, Switzerland*

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 genomic region that is deleted in the 3q13.31 microdeletion syndrome, which explains the clinical overlap between the two disorders. A narrow spectrum of amino acid substitutions in a restricted region of ZBTB20 encompassing the first and second zinc-finger motifs have been reported thus far. Here, we characterize clinically and functionally the first truncating mutation [(c.1024delC; p.(Gln342Serfs*42)] and a 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.

COD. P029

InCAS: an integrative annotator of human copy number variants using functional genomic features

A. Giovannetti^{1,6}, M. Truglio^{2,6}, A. Traversa³, S. Castellana², F. Petrizzelli², M. Goldoni⁴, M.L. Genovesi¹, N. Panzironi¹, G. Napoli¹, P. Palumbo⁵, O. Palumbo⁵, L. Bernardini⁴, A. Pizzuti¹, M. Carella⁵, V. Caputo¹, T. Mazza²

¹*Department of Experimental Medicine, Sapienza University of Rome, Rome, Italy*

²*Bioinformatics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Italy*

³*Clinical Genomics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, Rome, Italy*

⁴*Cytogenetics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Italy*

⁵*Medical Genetics, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo, Italy*

⁶*These authors contributed equally to this work*

Copy Number Variants (CNVs) are defined as deletions or duplications of stretches of contiguous nucleotides typically larger than 1,000 base pairs. Human CNVs are known to be involved in several diseases such as intellectual disability, autism, schizophrenia and congenital anomalies, generally due to the presence of dosage-sensitive genes. However, CNVs frequently do not target protein-coding genes, thereby hitting interspersed functional DNA regions, with clinical significance that need to be largely explored. InCAS is an annotation tool that draws information on gene and functional DNA elements as well as of known and clinically significant CNVs from several third-party databases. Gene annotations are obtained from RefSeq and GENCODE databases. Non-coding genes (microRNAs and long non-coding RNAs) annotations are retrieved from miRBase and LNCipedia. Functional elements (e.g. conserved transcription factor-binding sites, microRNA regulatory sites, ultraconserved regions, promoters, enhancer predictions and topologically associated domains) are annotated through different other sources of annotations. Polymorphic CNVs are retrieved from the Database of Genomic Variants (DGV). CNV-related clinically significant data are obtained from OMIM and ClinVar databases. The whole framework is implemented in Python and Flask and deployed to a running instance of Nginx. Data are stored in MongoDB and accessible through both a mobile-first web interface and a RESTful interface for programmatic access. InCAS allows to comprehensively annotate CNVs using continuously updated information of protein-coding and non-coding elements as well as of clinically significant CNVs. It is a handy tool for the assessment of the functional effect and clinical significance of CNVs. Incas is freely available at <http://incas.css-mendel.it/>.

COD. P030

Missense variants detected in breast cancer families preventing BRCA2-PALB2 protein interaction

I. Catucci¹, L. Caleca², F. Gisella¹, L. De Cecco³, T. Pesaran⁴, M. Ward⁵, S. Volorio⁶, A. Falanga⁷, M. Marchetti⁷, M. Iacone⁸, C. Tondini⁹, A. Zambelli⁹, J. Azzollini¹⁰, S. Manoukian¹⁰, P. Radice², P. Peterlongo¹

¹Genome Diagnostics Program, IFOM the FIRC Institute of Molecular Oncology, Milan, Italy

²Unit of Molecular Bases of Genetic Risk and Genetic Testing, Department of Preventive and Predictive Medicine, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy

³Molecular Therapies Unit, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy

⁴Ambry Genetics, Department of Clinical Diagnostics, Aliso Viejo, CA, USA

⁵Cancer Outreach & Risk Assessment, Via Christi Hospitals, Wichita, KS, USA

⁶IFOM, Fondazione Istituto FIRC di Oncologia Molecolare, Milan, Italy; Cogentech Cancer Genetics Test Laboratory, Milan, Italy

⁷Department of Immunohematology and Transfusion Medicine, Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy

⁸USSD Laboratorio Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy

⁹Unit of Medical Oncology, Azienda Ospedaliera Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy

¹⁰Unit of Medical Genetics, Department of Medical Oncology and Hematology, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy

PALB2 was initially identified as a binding partner of BRCA2. It interacts also with BRCA1 forming a complex promoting DNA repair by homologous recombination. Germline pathogenic variants in BRCA1, BRCA2 and PALB2 DNA repair genes are associated with high risk of developing breast cancer. Mutation screening in these genes is routinely performed and allows the identification of individuals who carry pathogenic variants and are at risk of developing the disease. However, variants of uncertain significance (VUSs) are often detected and establishing their pathogenicity and clinical relevance remains a central challenge for the risk assessment of the carriers and the clinical decision-making process. Many of these VUSs are missense variants leading to single amino acid substitutions, whose impact on protein function is uncertain. Typically, VUSs are rare and due to the limited genetic, clinical, and pathological data the multifactorial approaches used for classification cannot be applied. Thus, these variants can only be characterized through functional analyses comparing their effect with that of normal and mutant gene products used as positive and negative controls.

Performing mutation testing in breast cancer probands, we identify the two missense variants BRCA2:c.91T>G (p.Trp31Gly) and PALB2:c.3262C>T (p.Pro1088Ser) that were detected in two Italian individuals ascertained at Breast Cancer Units of Institutes located in Milan and Bergamo, respectively. These variants were located in the BRCA2-PALB2 interacting domains, were predicted to be deleterious by in silico analyses, and were very rare and clinically not classified. Therefore, we study their functional effect by exploiting a green fluorescent protein (GFP)-reassembly in vitro assay specifically designed to test the BRCA2-PALB2 interaction. This functional assay proved to be easy to develop, robust and reliable and allows testing variants located in different genes. Results from these functional analyses showed that the BRCA2:p.Trp31Gly and the PALB2:p.Pro1088Ser prevented the BRCA2-PALB2 binding. While caution is warranted when the interpretation of rare VUSs is based on functional studies only, our data provide evidences in favor of the possibility that these variants are pathogenic.

COD. P031

Rilevanza dell'analisi di metilazione multilocus in patologie con difetti dell'imprinting: sindrome di Beckwith-Wiedemann associata a iperparatiroidismo e linfadenopatia laterocervicale bilaterale.

L. Calzari¹, D. Melis², S. Guzzetti¹, E. Mainini¹, F. Guizzardi³, L. Larizza¹, S. Russo¹

¹*Istituto Auxologico Italiano, IRCCS, Laboratorio di Citogenetica e Genetica Molecolare, Centro di Ricerche e Tecnologie Biomediche, 20095, Cusano Milanino, Milano.*

²*Università Federico II, Dipartimento di Pediatria, 80131, Napoli.*

³*Istituto Auxologico Italiano, IRCCS, Laboratorio di Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, Centro di Ricerche e Tecnologie Biomediche, 20095, Cusano Milanino, Milano.*

Studi recenti hanno mostrato che i difetti di metilazione identificati negli Imprinting Disorders (IDs) non sono eventi isolati sempre ad uno specifico locus, ma possono coinvolgere addizionali loci imprinted, di per sè causativi di altri IDs. Questo fenomeno, definito MultiLocus Imprinting Disturbance (MLID), può coinvolgere alcuni IDs, tra cui la sindrome di Beckwith-Wiedemann (BWS, ~30% in ICR2 LoM). Ad oggi risulta ancora impossibile stabilire i segni clinici predetti dai difetti epigenetici multipli identificati, dato il limitato numero di studi e di casi analizzati. Nel nostro laboratorio, attraverso diversi approcci (450K BeadChip/MS-MLPA) abbiamo indagato lo stato di metilazione delle principali DMR in un'ampia coorte di casi BWS-ICR2, identificando 45 pazienti "MLID". In particolare in 13/45 casi abbiamo evidenziato una deregolazione epigenetica eterogenea del locus GNAS (20q13.3) causa dello pseudoiparatiroidismo di tipo 1b (PHP-1b). La valutazione dell'impatto di questa specifica deregolazione sul quadro clinico in un contesto BWS non è ad oggi possibile data la frequente indisponibilità di informazioni cliniche non BWS-relate. Riportiamo un caso MLID paradigmatico giunto alla nostra attenzione con doppia indicazione di BWS (Macroglossia, Macrosomia, Epatomegalia, Ipoglicemia) e di MEN-1 (Multiple endocrine neoplasia type 1) (Iperparatiroidismo, linfadenopatia laterocervicale bilaterale). Il doppio iter diagnostico ha rivelato l'ipometilazione di ICR2, responsabile della BWS, mentre il sequenziamento NGS di un pannello multigenico MEN1-relato ha escluso varianti patogeniche. Dati questi risultati, l'analisi epigenetica è stata estesa a diversi loci imprinted identificando un significativo difetto epigenetico del locus GNAS (NESP55 GoM; NESP-AS, XL, A/B LoM) compatibile con un quadro PHP-1b. Sebbene siano ancora in atto approfondimenti mirati all'esclusione di altri effetti genetici causativi (UPD20pat/delez. STX16), possiamo confermare che le informazioni cliniche sono compatibili con il quadro epi-genetico identificato. Questo caso rappresenta un evento molto raro in cui, in età pediatrica, si esprime un quadro clinico di IDs multipli e pone l'accento sull'importanza di un'analisi multilocus in casi BWS con un difetto di ipometilazione in ICR2.

COD. P032

Serum miRNA profiling of Malignant Pleura Mesothelioma and early diagnosis: a massive parallel sequencing approach.

E. Casalone^{1,2}, B. Pardini^{1,2}, G. Birolo^{1,2}, S. Guarrera^{1,2}, A. Allione^{1,2}, M. Betti³, D. Ferrante^{5,4}, C. Casadio⁶, D. Mirabelli^{8,7}, M. Mencoboni⁹, C. Magnani^{5,10,4}, I. Dianzani^{3,10}, G. Matullo^{1,2,10,11}

¹*Italian Institute for Genomic Medicine, IIGM, Turin*

²*Dep. of Medical Sciences, Univ. of Turin, Turin*

³*Dep. of Health Sciences, Univ. of Piemonte Orientale, Novara*

⁴*Dep. of Translational Medicine, Univ. of Piemonte Orientale, Novara*

⁵*Cancer Epidemiology Unit, CPO-Piemonte, Novara*

⁶*Thoracic Surgery Unit, AOU Maggiore Della Carità, Novara*

⁷*Cancer Epidemiology Unit, Department of Medical Sciences, Univ. of Turin, Turin*

⁸*Cancer Epidemiology Unit, CPO Piemonte, Turin*

⁹*Oncology Unit, Villa Scassi Hospital, Genoa*

¹⁰*Interdepartmental Center for Studies on Asbestos and Other Toxic Particulates "G. Scansetti", Univ. of Turin, Turin*

¹¹*Medical Genetics Unit, AOU Città della Salute e della Scienza, Turin*

Background. Malignant Pleural Mesothelioma (MPM) detection, particularly at early stages, remains a great challenge owing to lack of specific biomarkers. In recent years much attention has been focused on the role of exosomal microRNAs (miRNAs) as they show tumour-specific expression profiles. Indeed, miRNAs from MPM cells or patient serum, have been proposed as new potential non-invasive biomarkers of disease. We aim at identifying MPM-specific exosomal serum miRNA expression profiles in a case-control study. Method. Serum samples were collected from 30 MPM asbestos exposed patients and 30 asbestos-exposed cancer-free controls, recruited from the areas of Casale Monferrato, Novara and Alessandria (Italy). RNA samples were processed using NEB Next Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England Biolabs). A massive parallel sequencing (MPS) approach has been used to characterise exosomal miRNAs expression profiles. Differentially expressed miRNAs analyses have been performed (Bioconductor DESeq) controlling for age, sex, and asbestos exposure. Results. MPS revealed 162 differentially expressed miRNAs (adjusted p-value < 0.05), observing consistent results with previous studies. Moreover, 328 species of small non coding RNAs were found de-regulated in cases versus controls. Our results will be replicated in an additional and independent Italian cohort of MPM patients. Moreover, to assess the potentiality of miRNAs as biomarkers of risk and early diagnosis, we will extend the analyses to a prospectively collected sample in the context of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. Conclusions. We expect to define a panel of miRNAs to improve early detection and to set up an MPM risk-score for asbestos-exposed subjects. Investigating miRNA signatures in surrogate tissues may be a useful alternative to reduce invasiveness of biopsies, and reducing health care costs for detection. Moreover, early MPM detection could anticipate interventions at potentially treatable stages, increasing survival rates. The identification of diagnostic biomarkers for MPM may contribute to understanding the molecular mechanisms underlying the disease development and progression.

COD. P033

Whole Exome Sequencing (WES) as first diagnostic yield for primary renal salt-losing nephropathies

V. Palazzo¹, A. Provenzano², F. Vanderwert², F. Becherucci³, B. Mazzinghi³, P. Reho², S. Landini², E. Bosi², R. Artuso¹, A. La Barbera², L. Tiberi², S. Guarducci¹, M. Pantaleo¹, F. Peluso², A. Pagliuzzi², R.M. Roperto³, M. Materassi³, P. Romagnani^{2,3}, S. Giglio^{1,2}

¹*Medical Genetics Unit, Meyer Children's University Hospital, Florence*

²*Department of Biomedical Experimental and Clinical Sciences "Mario Serio", University of Florence, Florence*

³*Nephrology and Dialysis Unit, Meyer Children's University Hospital, Florence*

Salt-losing tubulopathies (SLT) are a group of diseases caused by the failure of sodium reabsorption in one of the segments of the renal tubule. Mutations in genes for sodium transporters or sodium-transport regulatory proteins lead to distinct SLT, with clinical/biochemical features depending on the tubular segments involved. The most frequent disorders are Bartter and Gitelman syndrome, which affect salt transport in the Henle's loop thick ascending limb and/or the distal convoluted tubule. Main forms also include Fanconi and EAST Syndromes, Pseudohypoaldosteronism type I.

Clinical diagnosis is not always immediate, because sometimes the clinical signs overlap and treatment is variable between physicians, sometimes even controversial. Could a classification system based of the clinical phenotype distinguish between these different disorders? The use of WES represents a perfect approach for both diagnostic and research. Here, we analyzed a cohort of 50 individuals with a first clinical diagnosis of Bartter syndrome (type 1, 2, 3 or 4) or Bartter-like, Pseudohypoaldosteronism type I, Gitelman and Fanconi syndromes.

The analysis demonstrates in many cases the non-direct correspondence between clinical diagnosis and the mutated protein, displaying that the symptoms of these different conditions can overlap and confuse the diagnosis, also with lab parameters indicative of tubular ion exchanges corresponding to a precise condition. Moreover, we discovered new disease-causative variants. Here we proved that WES is essential to quickly identify the gene involved and therefore the specific form of disorder, especially to submit the patients to a targeted therapy based in the specific involved protein (s).

COD. P034

A COMBINED 'NGS-DIGITAL PCR' APPROACH GIVES NEW EVIDENCES ON THE MOLECULAR MECHANISM RESPONSIBLE FOR THE OSTEOCHONDROMAS ONSET IN MO DISEASE

E. Pedrini¹, S. Corsini¹, A. Virga¹, I. Melandri¹, L. Sangiorgi¹

¹*SSD di Genetica Medica e Malattie Rare Ortopediche, Ist. Ortopedico Rizzoli, Bologna*

Osteochondroma (OC) is the most common benign bone tumor which occurs as several neoplasms in the Multiple Osteochondromas syndrome (MO). The most severe complication is its malignant transformation into Peripheral Secondary Chondrosarcoma (PSC). Although MO has been linked to defects in EXT1 or EXT2 genes, mouse model studies evidenced how the EXT haploinsufficiency is not enough to cause the OC growth; nevertheless, there are contradictory results on the requirement of their biallelic inactivation.

Using a combined NGS-Digital PCR approach enabling the detection of low percent point mutation/copy number differences, we evaluated the EXT1-2 somatic status in 34 cartilaginous samples, 19 coming from OCs and 15 from PSCs. When available, the analysis has been performed on the corresponding germline DNA. 7 healthy cartilaginous tissues and 1 tissue not coming from cartilage have been included in the study.

Results show no further somatic point mutations different from the germline one in EXT genes, except than for two OCs. Nevertheless, the allelic ratio detected in the somatic DNA is different by what observed in the corresponding constitutional one suggesting a Loss of Heterozygosity (LOH) responsible for a quantitative increase of the allele carrying the germline EXT mutation. Digital PCR analyses characterized LOH as caused by specific CNVs (deletions or duplications, depending on the sample). Of note, some tissues are characterized by allelic unbalance in both EXT genes. Interestingly, all healthy tissues - except than that not coming from cartilage – show the presence of CNVs in both EXT genes.

The high sensitivity of the combined NGS-Digital PCR approach gave new evidences on the molecular mechanism responsible for lesion growth in MO. Firstly, the requirement of a second somatic hit in EXT genes has been finally confirmed; moreover, it has been characterized as a CNV (deletion or duplication) causative of a quantitative increase of the defective allele. The presence of CNVs in EXT genes both in pathologic and healthy cartilage lead us to hypothesize the presence of a tissue-specific molecular mechanism responsible for a constitutive presence of somatic CNVs in EXT genes that causes a casual 'over-representation' of the defective allele.

COD. P035

A miRNome analysis of drug-naïve manic psychotic bipolar patients versus healthy controls

S. Tabano¹, A. Caldiroli², A. Terrasi^{1,3}, P. Colapietro¹, S. Grassi², G.S. Carnevali², L. Fontana¹, M. Serati², V. Vaira^{1,3}, A.C. Altamura², M. Buoli², M. Miozzo^{1,3}

¹*Department of Pathophysiology and Transplantation, Medical Genetics, Università degli Studi di Milano, Italy*

²*Department of Psychiatry, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Università degli Studi di Milano, Italy.*

³*Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italy, Università degli Studi di Milano, Italy.*

The lifetime presence of psychotic symptoms is associated with more clinical severity and poorer outcome in patients affected by bipolar disorder (BD). Epigenetic mechanisms have been evoked to explain the onset of psychotic symptoms in BD as well as the associated biological abnormalities.

In drug-naïve manic psychotic bipolar patients we evaluated the expression profiles of circulating microRNAs (miRNAs), in order to identify possible non-invasive molecular markers of this disease. We enrolled 10 drug-naïve manic psychotic bipolar patients and 9 healthy controls (10 males, 9 females, mean age 35.05± 11.98 years).

Global MiRNA expression profiles (800 investigated miRNAs) were measured by Nanostring technology, on plasma samples, in order to identify those differentially expressed in patients. Overall, twelve miRNAs showed a significant different expression between the two patients and controls (p<0.05). Target genes of these differentially expressed miRNA were in silico identified by MultiMIR R tool; they can be functionally classified in genes involved in neurodevelopment and neurogenesis, up-regulated in bipolar patients, and in genes with a role in metabolic regulation, down-regulated in patients. In conclusion, we identified a signature of miRNA differentially expressed in manic psychotic bipolar patients, suggesting a possible role in neurodevelopment and metabolic processes regulation.

COD. P036

Analisi di una coorte di 38 pazienti con sospetta predisposizione oncologica: approccio clinico e molecolare

A. Gambale^{1,2}, R. Russo², I. Andolfo², V. Contestabile^{1,2}, A. Provenzano³, A. La Barbera³, S. Giglio³, L. Quaglietta⁴, A. Iolascon^{1,2}

¹*U.O.C. Genetica Medica, Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie mediche, A.O.U. "Federico II", Napoli*

²*CEINGE - Biotecnologie Avanzate, Napoli*

³*Unità di Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche Mario Serio, Università di Firenze, Firenze*

⁴*S.C. Pediatria Oncologia, Dip. di Oncoematologia Pediatrica, A.O.RN. Santobono Pausilipon, Napoli*

In età pediatrica il cancro è una delle cause più importanti di mortalità. In molti casi possono essere presenti mutazioni germline [Schiffman et al., 2013]. È di grande importanza riconoscere tali sindromi non solo per capire la causa molecolare ma anche per le conseguenze cliniche. L'analisi molecolare dei geni TP53, WT1, DICER1 è stata eseguita tramite sequenziamento Sanger, mentre per il WES è stato utilizzato una strategia basata sulla frammentazione enzimatica, seguita da riparazione finale, e amplificazione della libreria. Le librerie sono state ibridate con il protocollo SeqCap EZ Exome v3 e sequenziate con la piattaforma NextSeq 500. L'array CGH è stato eseguito tramite Oligo Array-CGHsex match Chip utilizzato: Sure print G3 Human CGH Microarray 4x180K Agilent e analizzati con Software di analisi Cytogenomics 2.9 a risoluzione media di 250 kb. Abbiamo valutato circa 50 probandi pediatrici con sospetta sindrome da predisposizione oncologica. Abbiamo diagnosticato 5 famiglie con sindrome di Li-Fraumeni, 2 famiglie con tumore di Wilms con mutazione nel gene WT1, una famiglia con tumore di Wilms familiare e mutazione nel gene WTX, [Abstract SIGU 2017 -213200895] una famiglia con epatoblastoma e una con medulloblastoma affette da poliposi familiare del colon, 2 famiglie con sindrome da suscettibilità familiare al blastoma pleuropolmonare, una famiglia con sindrome VHL, una famiglia con sindrome da feocromocitoma/paraganglioma ereditario da mutazioni nel gene SDHB un soggetto con tumore teratoide diagnosticato come sporadico da delezioni somatiche in SMARCB1, un probando con neuroblastoma e note dismorfiche, all'arrayCGH una duplicazione di SOX4, oncogene che promuove l'espressione di ALK, gene cardine del neuroblastoma, un probando con astrocitoma desmoplastico infantile e glioma di basso grado, RSPM ed epilessia con delezione del gene ELP4 (associabile al fenotipo neuropsichiatrico) e duplicazione del gene EIF3H, subunità H del complesso fattore 3 dell'iniziazione della traduzione eucariotica, iperespresso in molte neoplasie umane.

Nell'ambito della nostra coorte di pazienti abbiamo potuto diagnosticare 17 famiglie affette da sindromi da predisposizione oncologica. In tale coorte abbiamo potuto osservare 5 mutazioni non riportate in letteratura, una variante germline nel gene WTX in un caso di nefroblastoma familiare, e 2 casi di sindrome da microduplicazione comprendente oncogeni.

COD. P037

AUTS2 SYNDROME: A SEVERE CASE ASSOCIATED WITH A NOVEL IN-FRAME DELETION RESTRICTS THE MINIMAL CRITICAL REGION OF THE DISEASE TO A HISTIDINE-RICH MOTIF

S.G. Caraffi¹, I. Ivanovski¹, E. Errichiello², M. Pollazzon¹, A. Lauriello¹, S. Giangiobbe¹, L. Garavelli¹, O. Zuffardi²

¹*Medical Genetics Unit, AUSL-IRCCS of Reggio Emilia, Reggio Emilia, Italy*

²*Department of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*

'AUTS2 syndrome' is a rare genetic disease mainly characterized by neurodevelopmental delay with variable ID, dysmorphic facial features, microcephaly, feeding difficulties and behavioral issues (usually autism spectrum disorder). It is caused by heterozygous defects in the AUTS2 gene (MIM# 607270; location 7q11.22), and has usually been associated with deletions involving a large portion or the entire gene, and more rarely with intragenic loss-of-function variants. AUTS2 encodes a component of the Polycomb group multiprotein complex and has a key role in promoting gene expression programs for brain development. While the 5' portion is poorly conserved, the 3' portion has been shown to originate an alternative transcript (exons 9-19) with specific nuclear functions. Accordingly, individuals harboring deletions limited to the proximal exons usually show a milder phenotype. We report a 4-year-old child with severe ID, delayed psychomotor development, hypotonia, behavioral problems and facial dysmorphism. Whole exome sequencing revealed a novel, in-frame, de novo deletion of 24 base pairs within exon 9 of AUTS2: NM_015570.3:c.1603_1626del, NP_056385.1:p.His535_Thr542del. Both clinical and molecular findings were consistent with a diagnosis of AUTS2 syndrome. Compared to other cases, our patient displayed a severe phenotype, with marked ID, absent language and brain abnormalities at the MRI (Chiari type I malformation and slightly dysmorphic corpus callosum). Notably, head circumference (75th-90th centile) did not entail microcephaly, but CT scan showed a peculiar shape of the skull, with prominent bilateral parietal bossing, craniosynostosis and large anterior fontanelle. As expected on the basis of the in-frame nature of the variant, mRNA analysis on patient's skin fibroblasts demonstrated a stable mutant transcript, thus not subjected to degradation. According to the literature, our patient carries a unique in-frame variant removing only eight amino acid residues and perturbing a histidine-rich domain, possibly preventing AUTS2 transit or localization within nuclear speckles. Our findings imply this motif may represent the minimal critical region for the full and more severe expression of the AUTS2 syndrome.

COD. P038

Caratteristiche cliniche pre- e perinatali e diagnosi genomica di un raro caso di Atrofia Muscolare Spinale con fratture ossee congenite tipo 2 (SMABF2)

M.G. Giuffrida¹, G. Mastromoro², V. Guida³, M. Truglio⁴, M. Fabbretti¹, M. Roggini⁵, A. De Luca³, L. Bernardini¹, A. Pizzuti^{2,6}

¹Unità di Citogenetica, Fondazione Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

²Dipartimento di Medicina Sperimentale, Policlinico Umberto I, Sapienza Università di Roma

³Unità di Genetica Molecolare, Fondazione Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

⁴Unità di Bioinformatica, Fondazione Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

⁵Dipartimento di Pediatria e Neuropsichiatria Infantile, Policlinico Umberto I, Sapienza Università di Roma

⁶Unità di Genomica Clinica, Fondazione Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

Presentiamo il caso di morte perinatale di una bambina con quadro clinico di artrogriposi, importante edema generalizzato e polidramnios, nata alla 34esima settimana di gestazione da taglio cesareo, da genitori non consanguinei, nella quale l'ecografia morfologica aveva evidenziato unicamente piede torto bilaterale. L'analisi di array-CGH (180K; Agilent) ha identificato una microdelezione intragenica in eterozigosi di 64 kb (chr10: 73873192-73936961; hg19) che coinvolge gli esoni 7-10 del gene-malattia ASCC1 (*614215), a segregazione materna. Questo gene codifica per una subunità del complesso trascrizionale tetramerico ASC-1, costituito anche dalle subunità TRIP4 (ASC1; 604501), ASCC2 (614216), e ASCC3 (614217), ed agisce sia come corepressore che come coattivatore della trascrizione e partecipa verosimilmente sia al processamento dei pre-mRNA che alla regolazione dello splicing. In letteratura, ad oggi, sono state descritte due famiglie con una mutazione in omozigosi nel gene ASCC1 e atrofia muscolare spinale con fratture ossee congenite tipo 2 (SMABF2) (#616867), una patologia autosomica recessiva caratterizzata da insorgenza in utero della degenerazione degli alpha-motoneuroni e da fratture congenite nelle ossa lunghe. La radiografia eseguita sulla probanda dopo il parto ha evidenziato fratture dell'omero bilateralmente indirizzando verso questa ipotesi diagnostica, successivamente confermata attraverso l'identificazione mediante sequenziamento con piattaforma "TruSightOne" (Illumina) di una seconda variante del gene ASCC1, la variante patogenetica NM_001198799.2: c.1027C>T; p.(Arg343*), a trasmissione paterna. Questo lavoro descrive il primo caso di paziente affetta da SMABF2 di cui è possibile documentare l'evoluzione in epoca prenatale. Riporta inoltre il primo caso di eterozigosi composta del gene ASCC1 dovuta alla presenza di una microdelezione intragenica e una variante puntiforme che esita nell'introduzione di un codone di terminazione prematuro, con verosimile perdita di funzione di entrambi gli alleli. Conferma inoltre come l'utilizzo integrato delle metodiche di analisi genomica di ultima generazione, insieme ad un'attenta valutazione clinica sia fondamentale per lo studio e la diagnosi di patologie rare anche in epoca prenatale.

COD. P039

CAV1 a new candidate gene for eating disinhibition and food preferences

A. Robino¹, M.P. Concas¹, E. Catamo², M. Cocca¹, P. Gasparini^{1,2}

¹*IRCCS Materno Infantile Burlo Garofolo*

²*Università degli Studi di Trieste*

Eating behavior is a complex interplay of physiologic, psychological, social and genetic factors and it is associated with obesity and many related conditions. There is evidence for the role of genetics in human eating disinhibition, characterized by overeating, impaired satiety and counter-regulation of restraint, and heritability estimates between 0.19 and 0.40 were reported. However, to date only specific gene variants, responsible for example of individual differences in taste perception, have been associated with eating disinhibition. In this work we investigated, through a GWAS (Genome Wide Association Study), genetic components underlying eating disinhibition in Italian adults coming from Italian Network of Genetics Isolates (INGI) populations. Disinhibition was measured using statements from the three-factor eating questionnaire. Personal (sex, gender, weight, height) data were also collected, as well as liking of different foods and beverages through questionnaire. All samples were genotyped using Illumina SNP arrays. Then, after imputation using IGRP (Italian Genome Reference Panel), a genome-wide discovery step was conducted in 1124 subjects. All SNPs with $p\text{-value} < 1 \times 10^{-6}$ were selected to be used for a replication step in 426 individuals. SNPs with $p\text{-value} < 5 \times 10^{-8}$ were considered as significant after meta-analysis. A significant signal was identified with rs6961694 SNP within CAV1 (caveolin 1) gene ($p\text{-value} = 1.75 \times 10^{-8}$). Moreover, the same polymorphism resulted associated in normal weight subjects with preferences for different food groups (sweet foods, sweet fruits, cheeses, alcoholic beverages) ($p\text{-value} < 0.05$). Our results suggest that CAV1 is a new candidate gene for eating disinhibition and represent a starting point for further studies linking eating behaviors and health status.

COD. P040

CHROMATINOPATHIES NGS PANEL: FROM DIAGNOSIS TO RESEARCH

G.M. Squeo¹, B. Augello¹, C. Gervasini², V. Massa², E.A. Colombo², D. Milani³, M.C. Gandini², M. Castori¹, T. Mazza⁴, S. Castellana⁵, E. Di Fede², N. Malerba^{1,6}, G. Merla¹

¹*Division of Medical Genetics, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo*

²*Medical Genetics, Dept. Health sciences, Università degli Studi di Milano, Milano*

³*UOSD Pediatria ad alta intensità di cura, Fondazione IRCCS Cà Granda Osp. Maggiore Policlinico, Milano*

⁴*Bioinformatics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, Mendel Institute, Rome*

⁵*Bioinformatics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo*

⁶*PhD Program in Experimental and Regenerative Medicine, Faculty of Medicine, Univ. of Foggia*

Epigenetic machinery controls chromatin state, and plays an important role during development, function, and maintenance of cell integrity. Alteration of this machinery leads to a group of rare genetic diseases, termed Chromatinopathies, all characterized by intellectual disability and recognizable facial gestalt. We generated a targeted NGS panel of 66 genes causative of ~50 Chromatinopathies, comprising Kabuki, Kleeftstra, Coffin Lowry, Wiedemann Steiner, Rubinstein-Taybi, Floating Harbor, ATR-X, and Cornelia de Lange syndromes among others.

Since 2017, we analyzed 172 index cases and found pathogenic variants in 44 (25%). The main sub-groups consist of 83 Kabuki syndrome patients, 26 (30%) of them carrying KMT2D or KDM6A pathogenic variants, and Rubinstein-Taybi syndrome patients, with 9/37 (25%) subjects carrying EP300 or CREBBP pathogenic variants. Due to the clinical overlapping and shared molecular mechanisms among the different Chromatinopathies, we expected that mutations occurring in the same gene could be responsible for overlapping or bridging phenotypes. Therefore, we extended the in silico analysis for all the genes of the panel to screen all patients resulted negative.

This analysis, confirmed by Sanger sequencing, revealed that 18 of the remaining 129 individuals (14%) showed pathogenic variants in other genes of the panel not directly related to the original clinical suspicion. Some representative examples include: i) heterozygous frameshift and nonsense variants in KMT2A, typically associated in Wiedemann-Steiner syndrome (WDSTS), identified in 5 patients with Rubinstein-Taybi syndrome; ii) heterozygous pathogenic variants in CTCF, KMT2A, SRCAP, ARID1B and CHD7 in 5 patients with a clinical suspicion of Kabuki syndrome; iii) an heterozygous ARID1A pathogenic variant in a case of Cornelia de Lange syndrome.

This work demonstrates that a pathway-based NGS approach to study Chromatinopathies may offer a unique opportunity to learn about the role of epigenetics in health and disease in humans. Our study highlights the importance of re-analyzing NGS data to provide additional evidences of common molecular gene network(s) for this group of diseases.

COD. P041

Circulating tumor DNA to assess minimal residual disease in early-stage breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy

G. Cirmena¹, A. Garuti¹, S. Coco³, M. De Mariano¹, A. Benvenuto¹, B. Dellepiane², A. Domestici², P. Campanini², A. Ballestrero^{1,2}, G. Zoppoli^{1,2}

¹*Lab. di Genomica Traslazionale, DiMI, Università di Genova*

²*Clin. di Medicina Interna ad Indirizzo Oncologico, Osp. Policlinico San Martino, Genova*

³*Lung Cancer Unit, Osp. Policlinico San Martino*

Recently, the advancement of technologies has allowed noninvasive analytes to be potentially used to detect cancer. Amongst the most promising biomarkers, circulating tumor DNA (ctDNA) has been the subject of intense scientific focus. The present study aims to assess different methods for the analysis of ctDNA-based personalized follow-up of early-stage invasive breast cancer (BC) patients undergoing neoadjuvant chemotherapy (NACT) followed by surgery with curative intent. In a currently ongoing prospective, consecutive, single-center study, we have so far collected a pre-treatment tumor biopsy and serial plasma samples from BC patients at several time points: at diagnosis, during chemotherapy, before surgery, at 3,6,9, 12 months after surgery, and every 6 months with the aim of collecting samples until 5 years of follow-up or relapse, whichever event occurs first. Targeted Massively Parallel Sequencing (MPS) was performed using a commercial kit including 409 known cancer genes on DNA extracted from tumor biopsies and matched with germline DNA from peripheral blood. Target mutations were then used to identify ctDNA in plasma samples by droplet digital PCR (ddPCR). Simultaneously, we performed Tagged targeted deep sequencing (tTDS) Oncomine cfDNA assay as a complementary approach, focusing on relapsed cases (n=5). At present, 44 patients are undergoing active screening, and samples from 11 patients who completed at least 18 months of follow-up have been analyzed. We identified bona fide somatic mutations in 10 biopsies (91%) out of 11, and we have extracted ctDNA from plasma samples (n=80) derived from the same patients at the prespecified time points. ddPCR confirmed the chosen target somatic mutations of pathogenic significance detected by the targeted MPS in 3 biopsies out of 5 patients who relapsed. In one patient, we observed the target mutation by ddPCR during the monitoring on ctDNA. By tTDS we demonstrated the presence of at least one deleterious mutation in all of the relapsed cases we studied (n=5), on average six months before clinical relapse. The association with ddPCR was suboptimal. Further analyses are needed to establishment a formal comparison between these two methods.

COD. P042

CYP2C19 gene copy number variations and Clopidogrel pharmacogenetics: association of gene dosage and cardiovascular events in Sardinian and Italian continental patients with acute coronary artery syndromes

D. Fiscella², A. Fiscella¹, M. Intrieri³, G. Casu⁴, N. Marziliano¹

¹*Fondazione Floresta Longo*

²*UOC Cardiologia, PO Garibaldi, Catania*

³*Università degli Studi del Molise, Campobasso*

⁴*UOC Cardiologia, ASSL3 Nuoro*

Variability in pharmacokinetics and drug response accounts for single-nucleotide variants/polymorphisms (SNVs/SNPs) as well as copy-number variants (CNVs). While the role of SNVs/SNPs on drugs metabolism has been extensively studied, little is known about the CNVs. Cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) gene variants and their overall effects on the clinical outcomes of patients with Acute Coronary Syndromes (ACS) treated with Clopidogrel in a dual antiplatelets therapy, remain still controversial although bed-side genetic-driven care has been shown to be feasible. We sought to evaluate the impact of CYP2C19CNVs on the clinical outcomes in Sardinian patients who underwent percutaneous coronary interventions (PCI) and received clopidogrel therapy having as control population Italian continental (Sicilian ancestry included). The prevalence of CYP2C19 CNVs were assessed by means of three dedicated TaqMan assays (Hs05148033_cn, Hs02932336_cn and Hs05107177_cn) in 100 Sardinian patients who underwent PCI. The control population was made of 200 Italian continental patients (of whom 60 individuals of Sicilian ancestry). Clinical relevant outcomes (adverse cardiovascular events, stent thrombosis and bleeding) and CYP2C19 CNVs were then associated in these two groups. The primary observation was the identification of CYP2C19 gene CNVs in the Sardinian population at higher rate: 7.2% of deletion and 3.2% of duplication alleles respectively in Sardinian vs 1.2% and 0.7% in the control group. The second finding showed that the CYP2C19 deletion allele is at increased risk of a composite of cardiovascular death, myocardial infarction, symptom-driven revascularisation compared with non-carriers (10.58% vs 6.07%, OR: 1.99, 95% CI, $p < 0.001$). Stent thrombosis (ST) is also more frequent in the deletion allele carriers (2.22% vs 0.44%, OR: 4.77, 95% CI, $p < 0.001$). The risk of bleeding is higher in the duplication allele carriers. In conclusion, genetic testing including the search for CNVs, may be helpful to personalize patients' care being the dual antiplatelets therapy pivotal for patients undergoing PCI.

COD. P043

Deleterious variations in multiple genes are involved in the risk of lung cancer in non-smokers

G. Pintarelli¹, R. Colombo^{1,2}, S. Noci¹, A. De Vecchi³, D. Maspero¹, G. Cucurru⁴, D. Pescini⁵, G. Mauri², M. Incarbone⁶, D. Tosi⁷, L. Santambrogio⁷, T.A. Dragani¹, F. Colombo¹

¹*Department of Research, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy*

²*Department of Informatics, Systems and Communication, University Milano-Bicocca, Milan, Italy*

³*Department of Applied Research and Technological Development, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milan, Italy*

⁴*Division of Biomedicine, Center for Advanced Studies, Research and Development (CRS4), Pula, Italy*

⁵*Department of Statistics and Quantitative Methods, University Milano-Bicocca, Milan, Italy*

⁶*Department of Surgery, Ospedale San Giuseppe, Milan, Italy*

⁷*Department of Thoracic Surgery, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy*

Introduction: The major risk factor for lung cancer development is cigarette smoking, but lung cancer is also observed in never smokers. In them, individual genetic constitution is thought to play a role in the risk of lung cancer, but there is scarce knowledge about the genes whose germline variations may be involved.

Aim: We aimed to look for germline coding-region variants associated with lung cancer in never smokers.

Materials and Methods: We investigated, by whole exome sequencing, two case-control series: (I) 41 non-smoker lung cancer patients and their 41 healthy first-degree relatives, and (II) 32 young non-smoker lung adenocarcinoma patients and 53 controls from the Tuscans in Italy (TSI) population of the 1000 Genomes Project (data only). We created one dataset of germline variations that included all variants that altered the coding sequences (non-synonymous variants) and a second dataset that included only those non-synonymous variants that were considered deleterious, namely nonsense mutations that introduce a stop codon (stop gain), read-through mutations that delete a stop codon (stop loss), and frameshift mutations caused by indels. Non-synonymous mutations and deleterious mutations associated with cancer were identified by case-control association analysis in each series, followed by meta-analysis on the combined dataset.

Results: The presence/absence of deleterious variations (nonsense, read-through, frameshift) associated with disease status ($P < 0.01$) in nine genes: ACSM6, AFF1, AMT, ARFGAP1, FBLN2, RASEF, TBP, TLE2, TSR1. Also, the presence/absence of any non-synonymous variation associated with disease status ($P < 0.01$) in ACSM6 and eight other genes: CCDC64B, EPHB1, FAM131A, MAP7D3, NCAPH2, NUTM2F, PLIN5A, RAB11B. The pattern of genes carrying these mutations was heterogeneous among cases and controls.

Conclusion: The present study revealed a large inter-individual heterogeneity in the pattern of germline variations, both in cases and in healthy controls. Therefore, in non-smokers, different combinations of deleterious and non-synonymous mutations seem to underlie the individual risk of lung cancer. These findings should help identify biochemical pathways that, when functionally altered, increase the risk of lung cancer in non-smokers.

COD. P044

GALNT2, un nuovo gene-malattia associato ad una sindrome recessiva con ritardo psicomotorio, autismo, epilessia e microcefalia

V. Alesi¹, F.R. Lepri¹, C. Pepi², S. Genovese¹, S. Loddo¹, L. Sinibaldi³, A. Cusmai², M.C. Digilio³, B. Dallapiccola⁴, A. Novelli¹

¹Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS-Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia

²Dipartimento di Neuroscienze, IRCCS-Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia

³Genetica Medica, IRCCS-Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia.

⁴Direzione Scientifica, IRCCS-Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italia.

I disturbi neurocognitivi sono patologie eterogenee spesso associate a disabilità intellettiva. Nelle famiglie consanguinee con soggetti affetti lo SNP-array permette di identificare regioni di omozigosità, facilitando l'individuazione di geni-candidati. Abbiamo studiato una bambina di 3 anni e 9/12 affetta da ritardo psicomotorio grave, disturbo dello spettro autistico con comportamento aggressivo, epilessia ad esordio precoce, sordità neurosensoriale, microcefalia e lievi dismorfismi facciali. La risonanza magnetica cerebrale ha evidenziato una demielinizzazione periventricolare della sostanza bianca. L'analisi mediante SNP-array (Illumina 850K BeadChip) non ha rilevato variazione di numero di copie, ma ha identificato varie regioni di omozigosità nei cromosomi 1, 2 e X, rispettivamente di 11.8 Mb, 2.5 Mb and 2.1 Mb. Lo studio mediante Next Generation Sequencing dell'intero esoma e l'analisi dei geni presenti nelle regioni di omozigosità ha permesso di identificare una variante omozigote di stop nel gene GALNT2 (1q42.13): p.Arg200Ter. In alcuni pazienti affetti da disabilità intellettiva sono state recentemente identificate mutazioni patogenetiche in questo gene. Khetarpal et al. (2016) hanno descritto due famiglie consanguinee nelle quali segregavano con il fenotipo della malattia due diverse varianti omozigoti (p.F104S e p. Q289X). La seconda variante è stata successivamente confermata in due altri pazienti nati da genitori consanguinei, che presentavano ritardo psicomotorio grave, convulsioni, autismo, problemi alimentari, bassa statura, stipsi, strabismo, ernia inguinale (Reuter et al.2017). La variante identificata nel nostro paziente è nuova, ma mappa nello stesso dominio della mutazione p. Q289X, determinando la completa inattivazione della proteina. In base al fenotipo presente nella nostra paziente e nei pochi casi descritti concludiamo che le mutazioni con perdita di funzione nel gene GALNT2 siano causalmente correlate con una nuova sindrome ad eredità autosomica recessiva, caratterizzata da ritardo psicomotorio grave, disturbi dello spettro autistico, epilessia e lievi dismorfismi facciali.

COD. P045

Identification of Expression Profiling and Characterization of Long Non-Coding RNA in Osteoblastic cells from osteoporosis patients.

F. Centofanti¹, M. Marini², V. Visconti³, A.M. Rinaldi², M. Celi⁴, F. Maiorca³, L. Fontana³, G. Novelli³, A. Orlandi¹, V. Tancredi², U. Tarantino⁴, A. Botta³

¹*Dep. of Biomedicine and Prevention, Anatomic Pathology Section, University of Rome "Tor Vergata" Rome, Italy*

²*Dep. of Systems Medicine, Centre of Space Bio-Medicine, University of Rome "Tor Vergata", Rome, Italy*

³*Dep. of Biomedicine and Prevention, Medical Genetics Section, University of Rome "Tor Vergata" Rome, Italy*

⁴*Dep. of Orthopedic Surgery, University of Rome "Tor Vergata Rome", PTV Foundation, Italy*

Osteoporosis (OP) is a multifactorial disease influenced by both genetic and environmental factors. Bone homeostasis is important to maintain the coordinated activity between bone-forming osteoblast and bone-resorbing osteoclast. The major cause of the bone homeostasis imbalance is inflammation that results in excessive bone resorption. Numerous genes have been associated with osteoporosis risk, but they account for less than 10% of the phenotypic variance of osteoporosis. Epigenetic factors represent a link between individual genetic aspects and environmental influences. In particular, Long Non-Coding RNA (lncRNAs), a novel heterogeneous class of non-coding RNA, have a crucial role in regulating many important biological processes in bone, including inflammation. Based on these premises, we designed our study to identify lncRNAs misregulated in bone cells from OP patients with the aim to predict possible RNA and/or protein targets implicated in this multifactorial disease. In order to evaluate the expression levels of lncRNAs, total RNA was extracted from osteoblast primary cultures derived by OP (n=5), and CTRs (n=10) individuals. We analysed 84 lncRNAs, validated or predicted, to regulate the expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory genes and miRNAs. Seven lncRNAs were identified that were significantly down-regulated (p-value <0.05) in OP patients compared to controls: GRM5-AS1; CEP83-AS1; CTC-487M23.5; GAS5; RP11-84C13.1; NCBP2-AS2 and SDCBP2-AS1. To understand their possible role in bone homeostasis, we perform an in silico analysis using validated bioinformatics tools predicting the interaction between lncRNAs and miRNAs, mRNAs and proteins targets. From the bioinformatics analysis, we found two lncRNAs prediction targets that are implicated in bone homeostasis and in osteoporosis: CTC-487M23.5 that interacts with HDAC2 mRNA (a key positive regulator of bone resorption) and GAS5 that interact with miR-21-5p, which itself interact with PTX3 mRNA (a novel regulator of bone homeostasis). Altogether, these data open a new regulatory mechanism in gene expression in bone homeostasis and could direct the development of future therapeutic approaches.

COD. P046

Identification of new ALS associated genes by NGS approach

M. Valente¹, I. Palmieri^{1,2}, S. Zucca¹, S. Gagliardi¹, L. Diamanti^{2,3}, M. Ceroni^{2,3}, C. Cereda¹

¹*Genomic and post-Genomic Center, IRCCS Mondino Foundation, Pavia*

²*Department of Biology and Biotechnology "L. Spallanzani", University of Pavia*

³*Neurology Department, IRCCS Mondino Foundation, Pavia*

Background: Many genetic studies using deep sequencing techniques have underlined genetic comorbidities in neurodegenerative disorders shaking the specific relationship between gene and pathology. ALS is a rare neurodegenerative disease characterized by mutations in different genes that explain only a small percentage of patients' population. The aim of this work was the screening of ALS patients by NGS panel composed by 177 genes associated to the main neurodegenerative and neuromuscular diseases to identify new ALS-linked genes. Materials and methods: upon extraction of peripheral blood, NGS analysis (SureSelectQXT Target Enrichment, Agilent Technologies) has been performed using a customized "Neurodegenerative Panel" of 177 neurodegeneration-related genes on a cohort of 99 ALS patients. Pathogenic and likely pathogenic mutations have been confirmed via Sanger sequencing. Also 87 ALS individuals have been screened for C9orf72 repeat expansion (FastStart PCR Master, Roche). Results: 18 patients present mutations in classical ALS genes, such as SOD1, TARDBP, FUS and VCP. Nine patients have known mutations in SOD1, two with p.G147S, two with p.G93D, two with p.D90A, one with p.L106F, one with p.S134A and one with p.G85A. Five patients have mutations in FUS, three individuals of a family with the p.G302A in, one patient with the p.R521C and one with the p.P106R. Two brothers present a mutation in VCP gene (p.R191Q) and two patients have mutations in TARDBP gene (p.A382T and p.G357D). We found also a patient with a mutation in the FIG4 gene (p.I41T). This gene has been recently discovered as causative of ALS11. Likely pathogenic mutations in noncanonical ALS genes as BAG3, ANG, MAPT, LRRK2, PDYN and IGHMBP2 were also found. These genes have not been reported to be associated to ALS, but associated to Parkinson's Disease, Spinocerebellar Ataxia 23 and Charcot-Marie-Tooth. From the analysis of C9orf72 repeat expansion, 14 patients present at least one allele with a pathogenic expansion. Discussion: NGS data report variations in non ALS genes opening intriguing prospective in the genetics of ALS where it is clear that the old genotype-phenotype vision is very simplistic and that the approach to the neurodegenerative diseases must be changed.

COD. P047

Large cardiopathy-gene panels enable the identification of previously undiagnosed rare genetic diseases

M.V. Esposito^{1,2}, V. D'Argenio^{1,2}, M. Losi³, G. Limongelli⁴, B. Sarubbi⁵, G. Frisso^{1,2}, F. Salvatore^{1,2}

¹CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy.

²Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University of Naples Federico II, Naples, Italy.

³Department of Advanced Biomedical Sciences, Division of Cardiology, University of Naples, Federico II, Naples, Italy.

⁴Cardiologia SUN - Heart Failure Unit, Department of Cardiothoracic Sciences, L. Vanvitelli-Campania University, Naples, Italy.

⁵Paediatric Cardiology and G.U.C.H. Unit, A.O.R.N. "Ospedali dei Colli", L. Vanvitelli-Campania University, Naples, Italy.

The next-generation sequencing (NGS) technologies revolutionized the diagnostic approach to genetic diseases by enabling the analysis of disease-related genes up to complete exomes in less time and at lower costs than traditional approaches (1). This led to increase diagnostic sensitivity, discovery of novel pathogenic mutations and to obtain data regarding other genes potentially acting as disease-phenotype modifiers, particularly in the presence of heterogeneous disorders (2). In this context, inherited cardiopathies are an example of diseases with a high clinical and genetic heterogeneity (3). These genetic forms, including primary myocardial disorders and arrhythmias, overlap in molecular pathways that regulate different myocardial functions. The genetic and phenotypic overlap in primary cardiomyopathies and in several muscle and metabolic genetic diseases, makes it crucial to ensure the correct setting of genetic analysis. We analyzed about 200 unrelated patients with inherited cardiopathy-related clinical signs. The analysis was performed using 3 large customized gene panels: a 111-gene panel (MyoNext) for myocardial diseases, a panel of 75 genes (CanalPlus) for channelopathies and a 138-gene panel (SuddenDeath) that includes the two previous groups and other genes related to sudden death. Over 30% of patients were found to carry pathogenic mutations in "classic" cardiopathy-related genes, such as MYBPC3, MYH7 and SCN5A. Interestingly, we found mutations in the RAF1, GPD1L, TGFB3, PYGM, ANO5, DMD, EMD and GAA genes. These findings clarified the diagnosis of patients that showed heterogeneous unclear clinical signs not attributable to primary heart disease but to other syndromes such as Pompe disease or Emery-Dreifuss muscular dystrophy-2. In such cases, the role of the geneticist is fundamental to accurately connect the molecular results to the patient's phenotype, especially when heterozygous variants related to recessive diseases are found. Our data show that the implementation of this faster and wider molecular screening will increase diagnostic sensitivity thereby leading to a better risk assessment in patients in whom the myocardial disorder is only a symptom of a more complex syndrome.

1.D'Argenio V. High Throughput. 2018

2.Nigro V. Curr Opin Neurol 2016

3.Aleksova N. Curr Opin Cardiol 2017

COD. P048

Mutated regulatory regions in neuroblastoma are enriched in binding sites of transcription factors involved in mechanisms of chromatin remodeling.

V.A. Lasorsa^{1,2}, F. Cimmino^{1,2}, A. Iolascon^{1,2}, M. Capasso^{1,2,3}

¹*CEINGE - Biotecnologie Avanzate Scarl, Napoli*

²*Università degli Studi di Napoli "Federico II", Dip. Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Napoli*

³*IRCCS SDN, Istituto di Ricerca Diagnostica e Nucleare, Napoli*

Background: Whereas the role of protein-coding mutations in cancer development has been largely clarified, regulatory mutations remain under-explored. We analyzed somatic mutations of 17, matched tumor-normal neuroblastoma (NB) whole genomes to elucidate the extent to which this cancer is shaped by regulatory mutations.

Methods: We annotated 3,650 NB somatic mutations occurring in regulatory elements (RE) characterized by both DNase hypersensitive sites and binding sites (BS) of 161 transcription factors (TFs) (ENCODE v3 ChIP-seq data). For each TF, we counted how many times its BS was mutated and divided this number by the total of altered TFBSs. As reference, we used the number of BS of each TF divided by the total TFBSs in ENCODE. The significant over-represented TFs were obtained by using Fisher exact test ($FDR \leq 0.05$). Genes within 2Mb from the binding sites of TFs were considered as regulated by the same TFs. Gene ontology analysis was performed with WebGestalt and ClusterProfiler ($FDR \leq 0.05$).

Results: We observed 25 over-represented TFs in mutated RE. Biological processes enrichment analysis showed that these TFs were mainly enriched in Histone Modification, Gene Silencing, Chromatin Remodeling. Among the most significant TFs, we found: 1) EZH2, SUZ12 that are involved in maintaining the transcriptional repressive state of genes over cell generations; 2) The histone deacetylases SIN3A and HDAC1, acting as epigenetic repressors playing important roles in transcriptional regulation, cell cycle progression and developmental events; 3) SMARCB1, component of the BAF complex (chromatin-remodeling), that plays important roles in cell proliferation, differentiation and inhibition of tumour formation. Accordingly, the predicted genes regulated from same TFs were enriched in DNA Packaging and Epigenetic Negative Regulation of Gene Expression.

Conclusions: Our analysis has identified a significant association between NB somatic mutations within RE and specific TFs. Both TFs that their predicted "target genes" are enriched for chromatin-remodeling related processes. These results highlight the importance of interrogating regulatory genomic space for somatic mutations in cancer.

COD. P049

Phenotypically discordant monozygotic twins for Beckwith-Wiedemann syndrome sharing hypomethylation of IC2

L. Fontana¹, M.F. Bedeschi², G. Cagnoli², S. Gangi³, M. Porro³, F. Mosca³, F. Lalatta², N. Persico⁴, M. Miozzo^{1,5}, S. Tabano¹

¹*Department of Pathophysiology & Transplantation, Università degli Studi di Milano.*

²*Clinical Genetics Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano.*

³*NICU, Department of Clinical Sciences and Community Health, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano.*

⁴*Department of Obstetrics and Gynecology "L. Mangiagalli," Fondazione IRCCS "Ca' Granda" - Ospedale Maggiore Policlinico, Milano.*

⁵*Division of Pathology, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano.*

Beckwith-Wiedemann Syndrome (BWS) is an overgrowth imprinting syndrome characterized by pre- and post-natal macrosomia, congenital abnormalities and tumor predisposition. The prevalence is about 1:10.500 live births, with an equal incidence in males and females, except for monozygotic twins, with a significant female preponderance. BWS is caused by defects at chromosome 11p11.5 including Loss of Methylation (LoM) at the Imprinting Center 2 (IC2), Gain of Methylation at the Imprinting Center 1 (IC1), paternal uniparental disomy of 11p11.5 region and maternally inherited pathogenic variant of CDKN1C. About 30% of BWS show MLID (Multilocus Methylation Imprinting Disturbance). The underlying genetic causes of MLID are mostly unknown, with few cases characterized by mutations in genes with a role in methylation establishment/maintenance during early-stages of embryonic development. We present a case of monozygotic, diamniotic monozygotic female twins discordant for BWS clinical manifestations. The affected twin had IC2 LoM and MLID in blood as well as in buccal smear, whereas the normal one showed IC2 LoM and MLID in blood only. Feto-fetal transfusion has been supposed to explain the presence of epimutations in the phenotypically normal twin. Two-years clinical follow-up confirmed the complete absence of signs of BWS in the unaffected twin, the maintenance of IC2 LoM in blood and the presence of MLID. We are currently investigating: 1) the methylation profile of term placenta (FFPE) and 2) the WES of twins and parents, to find out a possible genetic alteration causing the disease.

COD. P050

Six months Ataluren therapy in a Duchenne manifesting carrier with stop codon dystrophin gene mutation.

P. D'Ambrosio¹, R. Petillo¹, V. Nigro², L. Politano¹

¹*Cardiomiologia e Genetica Medica - Dipartimento di Medicina sperimentale - Università Luigi Vanvitelli, Napoli*

²*Laboratorio di Genetica Medica- Dipartimento di Medicina di Precisione - Università Luigi Vanvitelli, Napoli*

Duchenne muscular Dystrophy (DMD) is a X-linked degenerative disorder affecting skeletal muscles and myocardium, due to mutations in DMD gene, especially deletions and duplications. Point-mutations account for 13% and stop codon mutations are even more unfrequent. Affected children have trouble in climbing stairs, getting up from the floor or running by the school age and begin using a wheelchair within 13 years old. DMD female carriers are usually asymptomatic. However a few percentage of them may present symptoms at both skeletal muscle and cardiac level. Several pathogenetic mechanisms have been suggested to explain the onset of symptoms in female carriers: uniparental disomy, chromosomal translocations, X monosomy or skewed X chromosome inactivation (XCI). The latter is considered the most frequent cause of symptoms in carriers. Muscle symptoms appear early, in the first decade of life, in girls with a XCI of the wild allele > 80%. Recently, ATALUREN, an oral drug able to read through the stop codons, has become available for DMD patients still ambulant and with stop codon gene mutations, based on the clear demonstration of its efficacy in slowing the course of the disease.

We report the case of a still ambulant 24 year-old DMD manifesting carrier with a stop-codon mutation in exon 53 (c.7792C > T; p.Gln2598Stop), who started the treatment with ATALUREN at a dosage of 2,250 mg/die. A subjective improvement of the strength was promptly reported. Unfortunately the patient was obliged to discontinue the drug assumption for two months because a traumatic fracture of the right femur that required surgical repair and prolonged rehabilitation. Three months after the restarting, the patient was able to recover autonomous ambulation despite the fracture and the prolonged immobilization; she also reported a greater freedom in changing positions. Dynamic tests including 6MWT, show a slow but steady improvement, as tests that investigating the quality of life. The result seems even more encouraging, as Duchenne patients hardly recover their ability to walk after a fracture, at this age.

Data here reported - though currently limited to only one patient - stress our opinion that DMD symptomatic female carriers must be regarded as affected as males and must therefore take advantage of the same therapeutic opportunities.

COD. P051

Systematic “minor genes” testing in inherited cardiac diseases: friend or foe?

V. Novelli¹, M.C. Russo², F. Crea³, P. Zeppilli⁴, F.D. Tiziano², M. Genuardi²

¹*IRCCS Fondazione Policlinico "A. Gemelli", Istituto di Medicina Genomica, Roma, Italy.*

²*Università Cattolica del Sacro Cuore, Istituto di Medicina Genomica, Roma, Italy*

³*IRCCS Fondazione Policlinico "A. Gemelli", Dip. di Cardiologia, Roma, Italy*

⁴*IRCCS Fondazione Policlinico "A. Gemelli" Unità di Medicina dello Sport, Roma, Italy*

Introduction: In the last years the role of the genetic testing in the inherited cardiac diseases has been revolutionized by the diffusion of the NGS technology. In particular, the NGS-based test panel approach has enabled to test a large number of genes simultaneously, differently from the traditional Sanger that was limited to the well characterized, most prevalent genes. The temptation to enlarge the genetic screening also to “minor genes” is actually really diffuse in the diagnostic lab. This new approach is generating remarkable interpretative problems mostly related to the high prevalence of variants of unknown significance (VUS), often not clearly related to disease pathophysiology. Here, we report our experience, using expanded gene panels, for the genetic testing of different cardiac phenotypes.

Materials and Methods: 94 consecutive patients, 30 suspected HCM, 23 ARVC, 17 LQTS, 18 BrS and 6 IVF have been analyzed. Three different custom sequencing panels, including 11 genes for HCM, 9 for ARVC, 12 for LQTS and IVF and 4 for Brs have been used for the genetic testing.

Results: At the moment, 87% of the patients concluded the screening. Of these, 28 probands carried at least one variant in these genes (34%). According to the ACMG guidelines, the major part of the identified variants (70%) has been classified as VUS, while the 18% were Likely Pathogenic (LP) and 12% Pathogenic (P). Looking at the VUS, the 30% of these have been identified in minor genes. In particular, 8 in LQTS/IVS panel and one in the HCM panel.

Conclusions: These data showed that the inclusion of minor genes in the genetic screening, also if restricted to few genes, gives a very limited contribution, increasing the rate of VUS and making the tests clinically irrelevant.

COD. P052

Terapia genica nella leucemia linfatica cronica attraverso l'utilizzo di CRISPR-Cpf1 e gene suicida

F.C. Lorenzetti¹, F.T. Papa¹, S. Daga¹, S. Croci¹, F. Niccheri², F. Donati², D. Lopercolo¹, M.A. Mencarelli^{1,3}, A. Gozzetti⁴, M. Bocchia⁴, S. Conticelli², A. Renieri^{1,3}, F. Mari^{1,3}

¹*Genetica Medica, Università di Siena, Siena*

²*Core Research Laboratory - ISPRO, Firenze*

³*Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena*

⁴*Dipartimento di Medicina e Scienze Immunologiche, Unità di Ematologia, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese e Università di Siena*

I pazienti con mutazione di TP53 rappresentano i casi con il peggiore decorso clinico e la minore sopravvivenza a causa della resistenza ai farmaci chemioterapici. Recentemente abbiamo dimostrato il ruolo critico dei cloni mutati in TP53 nel guidare il processo neoplastico e la loro presenza diversi mesi prima della manifestazione della malattia (Pinto AM et al., Br J Haematol 2018). Dal punto di vista patogenetico, questi cloni con mutazioni nel gene TP53 svolgono un ruolo di drivers della progressione della malattia. I cloni mutati vengono selezionati e si espandono lungo il decorso della malattia, specialmente dopo trattamento con chemioterapici, determinando la resistenza al trattamento stesso. Per questi pazienti una terapia genica personalizzata può essere la soluzione. Presentiamo un ottimo esempio di terapia genica dove il sistema CRISPR-Cpf1 viene utilizzato per il rilascio del gene herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK) di tipo 1 nel genoma dei linfociti con mutazione in TP53 isolati da pazienti con LLC. Risultati promettenti sono stati ottenuti testando il nostro sistema nella linea cellulare HEK293. Esperimenti sono in corso per ottimizzare la tecnica su cellule primarie e sul modello murino. In futuro la terapia genica personalizzata potrà migliorare la sopravvivenza di pazienti con LLC refrattari alle terapie convenzionali. Il processo di brevetto del sistema CRISPR-Cpf1 è in corso presso l'Università di Siena.

COD. P053

The Lamin B receptor: one gene, two patterns of inheritance and three different pathological phenotypes.

E. Giorgio¹, F. Sirchia², M. Bosco³, E. Pozzi¹, C. Mancini¹, S. Sobreira⁴, Broad Center For Mendelian Genomics⁴, A. Brussino¹, E. Grosso⁵, A. Brusco^{1,5}

¹University of Torino, Department of Medical Sciences, Torino

²Institute for Maternal and Child Health, Burlo Garofolo Pediatric Institute, Trieste

³San Lazzaro Hospital, Pathological Anatomy and Histology, Alba (CN)

⁴Broad Center for Mendelian Genomics, Cambridge, Massachusetts

⁵Città della Salute e della Scienza University Hospital, Medical Genetics Unit, Torino

The LBR gene encodes the lamin B receptor, an inner nuclear membrane protein with a structural role, interacting with chromatin and lamins, and an enzymatic function as a sterol reductase. Mutations in LBR can cause two distinct phenotypes. Heterozygous variants cause Pelger–Huet anomaly (PHA, MIM #169400), a benign autosomal dominant laminopathy characterized by bilobed neutrophil nuclei. On the other hand, homozygous or compound heterozygous changes are associated with Greenberg dysplasia (GRBGD, MIM #215149), a severe osteochondrodysplasia lethal in utero. This qualified GRBGD and PHA as representative of different allelic states of the same chromosomal lesion. Here we report on a new LBR missense mutation (c.1379A>G; p.Asp460Arg) causing GRBGD in two fetuses from a consanguineous Moroccan family identified by Whole Exome Sequencing. Both parents carry the causative mutation in heterozygous state but they do not show PHA or any other clinical manifestation. A deep revision of the literature allowed us to demonstrate that LBR is a further example of pleiotropic gene causing distinct phenotypes depending on the functional domain of the protein affected by the mutation/s. In brief, changes affecting exclusively the enzymatic function of the LBR are recessive and cause GRBGD, whereas variants disrupting its structural role are dominant and cause PHA. Mutations affecting both the structural and the enzymatic function of the protein, such as non-sense or frameshift mutations, are associated with both PHA and GRBGD, depending on their heterozygous or homozygous state, respectively. Furthermore, patients carrying compound heterozygous mutations in the LBR gene with mild skeletal abnormalities and PHA have been described. Here, the mild skeletal phenotype is due to the co-occurrence of a mutation completely impairing the enzymatic function of LBR and a second change having only some influence on bone morphogenesis and therefore insufficient to result in GRBGD. This finding suggests a continuum in LBR-associated phenotypes, ranging from isolated PHA through PHA with mild skeletal dysplasia to Greenberg skeletal dysplasia. The LBR gene is an instructive example of pleiotropic gene presenting with two different patterns of inheritance and three different phenotypes.

COD. P054

Two healthy babies born after implantation of multiple chromosomally-rescued oocytes

G. Filippini¹, N. Fiandanese¹, L. Risch², M. Jemec³, M. Bellavia³

¹*Procrealab SA, molecular genetic laboratory, Lugano, Switzerland*

²*Labormedizinisches Zentrum Dr Risch, genetic department, Bern, Switzerland*

³*Procrea SA, Swiss fertility center, Lugano, Switzerland*

Meiotic rescue is a well-known phenomenon but little is known about live births after oocyte rescue, because of the shortage of data on PB biopsy.

We present two cases of healthy babies born after single and double chromosome-rescued oocytes.

PGT-A has been performed for many years to increase the chance of pregnancy, especially in older women. Embryo aneuploidy is a major cause of pregnancy failure and is largely of maternal meiotic origin (>95%), with the risk increasing exponentially from approximately 35 years of age. Molecular analysis of polar bodies provides indirect assessment of an oocyte's chromosomal status by determining whether the chromosomes correctly segregated during meiosis I and II. In about one third of cases, missegregation of one or two chromosomes in meiosis I can be rescued in meiosis II, leading to an euploid oocyte.

PGT-A on polar bodies (PB) is routinely offered in our clinic to women older than 36. This study presents two case reports from 2017.

A 42- (case 1) and a 44-year old woman (case 2) underwent ART treatment with PGT-A PB, after histories of 3 and 2 prior ART failures respectively. Both couples underwent ICSI with first and second PB biopsy and comprehensive chromosome analysis by Array-CGH. The mechanisms leading to missegregation in PB1 and PB2 (nondisjunction or premature separation of sister chromatids (PSSC) were analysed using chromosome-specific STRs.

Case 1: a single euploid fertilized oocyte was transferred, after double rescue of chromosomes 3 and 18 (PB1 -3, -18; PB2: +3, +18) at day 2, resulting in a singleton pregnancy.

Case 2: a single euploid fertilized oocyte was transferred after rescue of chromosome 16 (PB1: -16; PB2:+16) at day 3. In case 1, the aneuploidy of chromosomes 3 and 18 in the first PB was caused by PSSC followed by the extrusion of 2 homologous chromosomes in the second PB. In case 2, chromosome 16 underwent PSSC and extrusion of a single chromatid in PB1, followed by nondisjunction in meiosis II and extrusion of two sister chromatids in PB2.

In both cases, the rescued oocyte was the only euploid oocyte out of 12 retrieved and they were competent for generating a pregnancy. The two women gave birth at term to healthy babies (a girl of 3280 g and a boy of 3500 g).

To our knowledge, this is the first report of healthy births after a multiple chromosomally-rescued oocyte.

COD. P055

A novel mutation in KCTD17 gene is associated with early onset hyperkinetic mixed movement disorder

F. Stregapede^{1,2}, F. Graziola^{3,4}, L. Travaglini¹, G. Garone⁴, M. Verardo¹, L. Bosco¹, S. Pro⁴, E. Bertini¹, P. Curatolo³, F. Vigevano⁴, A. Capuano⁴

¹1. Department of Neuroscience, Unit of Neuromuscular and Neurodegenerative disease, Bambino Gesù Children's Hospital, Rome Italy

²2. Department of Sciences, Roma Tre University, Rome, Italy

³3. Department of Neuroscience, Child Neurology and Psychiatry Unit, Tor Vergata University Hospital, Rome, Italy

⁴4. Department of Neuroscience, Neurology Unit, Bambino Gesù Children's Hospital, Rome Italy

KCTD17 is a gene encoding for the potassium channel tetramerization domain (KCTD)-containing protein 17, member of a family of 26 closely related and highly conserved proteins. Recently, a missense mutation in KCTD17 has been described as new form of autosomal dominant myoclonus-dystonia phenotypically distinct from cases due to SGCE mutations. Indeed, patients described in the original paper presented mild myoclonus affecting the upper limbs, while dystonia showed a progressive course, with increasing severity of symptoms and spreading from the cranio-cervical region to other sites. Here, we describe a case of an 8-years old girl referred to the Movement Disorder Clinic of Bambino Gesù Children's Hospital presenting choreic movements developed gradually and worsened in the last three years. Neurological examination revealed a mixed hyperkinetic-hypokinetic movement disorder characterized by choreic movements of the upper limbs, tongue and trunk, mirror movements and overflow dystonia associated to mild hypomimia and bradykinesia. Brain MRI resulting normal.

We assessed our patient with a deep-sequencing NGS targeted panel comprising 103 known movement disorders genes on DNA extracted from peripheral blood. We identified a novel heterozygous variant c.508-2A>T affecting the acceptor splice site of exon 5 in the KCTD17 gene. Patient's parents resulted wild-type, suggesting a de novo origin of the variant. Other known genes related to hereditary chorea were sequenced and no other variants were identified. To investigate if the mutant allele is expressed and to map the alternative splice acceptor site, RT-PCR was performed on RNA isolated from whole blood. The heterozygous mutation induced about 50-fold reduction of KCTD17 protein expression levels in patient's fibroblasts when compared with wild-type control.

Herein we presented a patient harbouring a not previously reported mutation in KCTD17 gene and to our knowledge the first description in a child of early onset hyperkinetic movement disorder associated with bradykinesia and developmental coordination disorder, thus expanding the phenotype of KCTD17-related diseases.

COD. P056

Molecular insights in the pathogenesis of classical Ehlers-Danlos syndrome from transcriptome-wide expression profiling of patients' skin fibroblasts

N. Chiarelli¹, G. Carini¹, N. Zoppi¹, M. Ritelli¹, M. Colombi¹

¹*Div. of Biology and Genetics, Dep. of Molecular and Translational Medicine, University of Brescia, Brescia, Italy*

Classical Ehlers-Danlos syndrome (cEDS) is a dominant inherited connective tissue disorder mainly caused by mutations in COL5A1 and COL5A2 genes encoding type V collagen (COLLV), which is a fibrillar COLL widely distributed in a variety of connective tissues. cEDS patients suffer from skin hyperextensibility, abnormal wound healing/atrophic scars, and joint hypermobility. Most of the causative variants result in a non-functional COL5A1 allele and COLLV haploinsufficiency, whilst COL5A2 mutations affect its structural integrity. To shed light into disease mechanisms underlying cEDS, we performed gene expression profiling in skin fibroblasts from 4 patients with haploinsufficient and structural mutations in both disease genes. Transcriptome analysis revealed significant changes in the expression levels of different extracellular matrix (ECM)-related genes, such as SPP1, POSTN, EDIL3, IGFBP2 and C3, which encode both matricellular and soluble proteins mainly involved in cell migration and cutaneous wound healing. These gene expression changes are consistent with our previous protein findings on in vitro fibroblasts from other cEDS patients, which exhibited reduced migration and poor wound repair in a scratch assay owing to COLLV disorganization. Microarray analysis also indicated the decreased expression of DNAJB7, VIPAS39, CCPG1, ATG10, SVIP, which encode for molecular chaperones facilitating protein folding, enzymes regulating post-Golgi COLs processing, and proteins acting as cargo receptors required for endoplasmic reticulum (ER) proteostasis and implicated in the formation of autophagosomes/autophagy process. Patients' cells also showed altered mRNA levels of many cell cycle regulating genes including CCNE2, KIF4A, MKI67, DTL, DDIAS. Protein studies showed that aberrant COLLV expression causes the disassembly of many structural ECM constituents including COLLI, COLLIII, fibronectin and fibrillins, and an abnormal integrin pattern. Our findings provide the first molecular evidence of significant gene expression changes in cEDS skin fibroblasts highlighting that defective ECM remodeling, altered ER homeostasis and impaired autophagy might play a role in the pathogenesis of this connective tissue disorder.

COD. P057

Precision medicine in NGS era: diagnose a misdiagnosed SCN5A Sudden Cardiac Death Syndrome using molecular data

V. Ferradini¹, S. Mannucci¹, S. Luciano¹, C. Lanzillo³, L. Calò³, G. Novelli¹, R. Mango², F. Sangiuolo¹

¹*Dept. of Biomedicine and Prevention, University of Rome "Tor Vergata", Rome, Italy.*

²*Dept. of Emergency and Critical Care, Polyclinic Tor Vergata, Rome, Italy*

³*Dept. of Cardiology, Policlinico Casilino, Rome, Italy.*

Sudden Cardiac Death (SCD) affects in Italy about 60,000 people every year. It includes several pathologies, such as Cardiomyopathies, Channelopathies, Familiar Atrium-Ventricular Block, Mitral Valve Prolapse, Aortic Dissection, all related to heart structural changes or alterations of the cardiac ion channels. Genetic susceptibility predisposing to SCD has emerged from large-scale epidemiological studies, which have shown a high familiarity. Given the complexity of the syndrome, clinical cardiology has made use of the contribution of molecular genetic analyses to characterize mutations and explain their pathophysiological mechanisms. Due to the strong heterogeneity and novel overlapping phenotypes, NGS approach is decisive for the identification of pathogenetic variants. A 72-year old female symptomatic for shortness of breath during exertion with a family history for SCD presented at our cardiogenetic unit at Tor Vergata. She is affected by hypertension and dyslipidemia. A cardiac MRI revealed apical and interventricular septal hypertrophy suggestive for hypertrophic cardiomyopathy (HCM) without signs of late gadolinium enhancement (LGE). A basal ECG recorded negative T wave from V1 to V6 leads with normal AV and IV conduction. A 24-hour Holter ECG recorded some supraventricular ectopic beats. A custom panel was used on Ion Torrent S5, covering the coding regions of 70 genes associated with SCD. NGS allowed identifying a stop variant in the exon 6 of SCN5A gene: c.655C> T (p.Arg219Ter), rs577421914 with MAF <0.01. In GnomAD only one allele has been described on 30934. According to these results, we reevaluated the patient phenotype and her clinical family history. The family study reported that the father died at age of 50 years old during sleep, typical of the variants in the SCN5A gene. Thus we concluded that probably the HCM was a clinical aspect due to hypertension and obesity and the clinical diagnosis was rectified to sudden cardiac death due to mutation in SCN5a gene. This report is an example of precision medicine: NGS we are able to identify the molecular diagnosis and correctly define the clinical phenotype usefully for the SCD prevention and for planning a specific targeted-therapy.

COD. P058

RELATIONSHIP BETWEEN STRESS GRANULES AND R-LOOPS IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS

M. Giannini^{1,2}, D. Sproviero¹, M. Bordoni^{1,2}, L. Diamanti^{2,3}, V. Fantini¹, S. Gagliardi¹, O. Pansarasa¹, C. Cereda¹

¹*Genomic and post-Genomic Center, IRCCS Mondino Foundation, Pavia*

²*Department of Brain and Behavioral Sciences, University of Pavia*

³*General Neurology, IRCCS Mondino Foundation, Pavia*

Background. R-loops naturally develop during transcription in specific genomic regions, named GC-skew, as three-stranded nucleic acid structures composed of an RNA:DNA hybrid and a displaced single-stranded DNA. R-loops accumulation can induce DNA damage and genomic instability associated with ALS. Stress granules (SGs), RNA-containing cytoplasmic foci produced in response to stress stimuli, localize with TDP-43. Additionally, TDP-43 co-localizes with active RNA polymerase II at sites of DNA damage along with BRCA1, and prevents or repairs R-loops associated DNA damage. Aim of the study. The study aims to investigate the dynamic relation between R-loops and SGs and the role of TDP-43 in R-loops' formation. **Materials and Methods.** R-loops were measured in lymphoblastoid cell lines (LCLs) derived from an ALS patient mutated in TARDBP (TDP43^{mut}), a sporadic ALS (sALS) patient and a control (Ctrl) by flow cytometry using S9.6 antibody, with and without RNase H. Co-localization of R-loops with SGs and TDP-43 was investigated by immunofluorescence. Results were confirmed by co-immunoprecipitation (Co-IP) in chromatin and whole cell lysate. **Results.** Flow cytometry revealed a higher accumulation of R-loops in LCLs of TDP43^{mut} compared to sALS and Ctrl. In TDP43^{mut} LCLs immunofluorescence demonstrated a co-localization between R-loops and TDP-43 in the perinuclear area. SGs, induced by arsenite, co-localize with R-loops in TDP43^{mut} LCLs compared to sALS and Ctrl. Co-IP confirmed a co-localization of TDP-43, R-loops and SG markers in whole cell lysate of TDP43^{mut} LCLs; a lower interaction was observed in the chromatin fraction of TDP43^{mut} LCLs. **Conclusions.** Translocation and accumulation of mutated TDP-43 in cytoplasm is linked to an increased co-localization with R-loops and to a segregation in cytoplasmic SGs. Our data first suggest a new and dynamic cross-talk between nucleus and cytoplasm, indicating that R-loops' function is associated with altered TDP-43 pathway, shedding new light on mechanisms involved in ALS.

COD. P059

Validation of a workflow for the detection of small copy number variation from gene panels NGS data.

S. Zucca¹, E. Pau², R. Altea², M. Plumari¹, A. Asaro¹, M. Valente¹, G.S. Grieco¹, P. Magni², C. Cereda¹

¹*Genomic and post-genomic Center, IRCCS Mondino Foundation, Pavia*

²*Department of Electrical, Computer and Biomedical Engineering, University of Pavia, Pavia*

Background

Targeted resequencing panels are widely employed in clinical diagnostics. Single nucleotide variants and small in/del detection is the main goal of these NGS applications and a plethora of workflows and bioinformatic pipelines are available. NGS data can also be exploited for the detection of copy number variation (CNV). Several NGS tools are available for whole exome or whole genome CNV analysis but only few solutions are suitable for the detection of smaller CNV events involving few exons. A validated workflow for small CNV detection would greatly improve clinical routine, avoiding trial-and-error approaches and validation with orthogonal techniques.

Aim

In this study, we tested available software solutions for gene panel CNV detections in germline DNA-Seq data and we defined an ad-hoc pipeline for small CNV detection, currently employed in our clinical routine.

Materials and Methods

DNA samples from patients affected by various neurological disorders were collected and prepared for DNA-Seq with custom gene panels, with different kits (Illumina Nextera, Agilent SureSelect) and sequenced with different instruments (Illumina NextSeq, MiniSeq and MiSeq). In each dataset (8 to 24 samples), an MLPA-confirmed deletion/duplication of few exons (1-6) was present. Panel sizes varied from 720 kbps (80 genes) to 2120 kbps (175 genes) and average coverage per sample was above 100X for Nextera and above 50X for SureCall samples. Five tools were tested with default parameters as suggested by developers: panelcn.MOPS, CONTRA, CNVPanelizer, CNVKit and ExomeDepth.

Results

Five freely available CNV detection tools suitable for panel processing were tested and results were compared to identify best candidates. A pipeline integrated with our current diagnostics workflow was developed based on best performing tools and de-novo developed algorithms through a machine learning approach. Preliminary data on a limited number of samples showed a sensitivity of 100%.

Conclusions

Small CNV detection from gene panel NGS data is a key issue to maximise the information retrieved from single NGS experiments, both for time and cost reduction in clinical routine. Validation of small CNV detection workflows is a crucial step to exploit whole NGS data potential.

COD. P060

Analysis of molecular pathways in primary fibroblasts and myoblasts of Wolf-Hirschhorn patients (WHS) by RNA-Seq.

P.N. Doronzio¹, G. Marangi¹, S. Lattante¹, S. Frangella¹, M. Zollino¹

¹*Istituto di Medicina Genomica Università Cattolica del Sacro Cuore, Fondazione A. Gemelli IRCCS, Roma, Italia*

Wolf-Hirschhorn Syndrome (OMIM: 194190) is a contiguous gene syndrome caused by partial 4p deletion, which core phenotype includes intellectual disability (ID), the typical "greek warrior helmet profile", growth delay and seizures. All these signs are regarded as minimal diagnostic criteria for WHS and they all map within the terminal 1.9 Mb on 4p, where the WHS critical region (WHSCR-2) was described. Pathogenesis of WHS appears to be multigenic, being WHSC1 the major candidate gene for growth delay and the typical facial dysmorphism, and LETM1 and CPLX1 the major synergic genes for seizures. We aimed to investigate by RNA Seq impaired molecular pathways at a whole transcriptome level in fibroblast and myoblast cell lines obtained from 4 WHS patients and from 3 healthy controls. Extent of the 4p deletion was of 6.5 Mb in two patients, 3.1 Mb and 16.5 Mb in the remaining two patients, respectively. RNA samples have been used to prepare RNA-Seq libraries for ION Proton platform. Results have been analyzed with "Cufflinks" and "Salmon" workflows, while the DAVID functional annotation tool has been used for pathway enrichment analysis. We observed a differential expression of genes related to cell growth / proliferation and to cell adhesion pathways both in fibroblasts and myoblasts. With respect to these subset of transcripts, results were to large extent comparable to each other independently from the 4p deletion size.

COD. P061

EURO-NMD AND CLINICAL PATIENT MANAGEMENT SYSTEM (CPMS): A TELEMEDICINE TOOL TO BREAK DOWN BARRIERS IN NEUROMUSCULAR DISEASES

F. FORTUNATO¹, A. MAURO¹, M. NERI¹, F. GUALANDI¹, T. EVANGELISTA², A. FERLINI¹

¹*Unit of Medical Genetics, Department of Medical Sciences, University of Ferrara*

²*Newcastle University, John Walton Muscular Dystrophy Research Centre, Newcastle upon Tyne, UK*

European Reference Networks (ERN) are virtual networks involving healthcare providers across Europe aiming to create a clear governance structure for knowledge sharing and care coordination. In early 2017, the European Commission approved the first 24 ERNs. These were organized around 24 disease groups as proposed by the "EUCERD recommendations on rare diseases ERNs". The ERN on rare neuromuscular disorders (ERN EURO-NMD) was amongst these first 24 ERNs. EURO-NMD includes a broad group of rare neuromuscular disorders (NMDs), collects expertise across Europe to develop new guidelines and to provide patients with specialist care through in-person and virtual consultations. At the heart of ERNs collaboration there are some online communication tools; one of these, the Clinical Patient Management System (CPMS) aims at supporting ERNs in improving the diagnosis and the treatment of rare or low prevalence complex diseases across national borders of Member States in Europe. It is a secure web-based application that enables health professionals to enroll patients using comprehensive but pseudonymised patient data. Health professionals can use the CPMS to collaborate actively within and across ERNs, uploading and sharing clinical data and medical imagery, after obtaining patients' consent. Therefore, CPMS facilitates the interaction between clinicians: virtual case discussions will allow cross-border consultations with the aim of achieving clinical conclusions on diagnosis and treatment of complex or rare patients. Moreover, this IT tool will improve research activities: sharing clinical data, researchers will be in a facilitated position for creation of ERN Registries and Databases and selection of patients for ERN research projects (e.g. clinical trials). We present our experience with this IT platform that provides the backbone for the networks' collaborative work maximizing data sharing and integration. It is crucial that HCPs across different ERNs familiarize themselves with this and other IT tools available.

COD. P062

Genetic screening and Interferon Signature of an Italian cohort of Aicardi-Goutières syndrome patients

M. Valente¹, J. Garau^{1,2}, D. Sproviero¹, S. Zucca¹, C. Santonicola³, D. Tonduti⁴, V. De Giorgis⁵, V. Cavallera⁵, F.M. Santorelli⁶, S. Orcesi⁵, C. Cereda¹

¹*Genomic and post-Genomic Center, IRCCS Mondino Foundation, Pavia*

²*Department of Brain and Behavioral Sciences, University of Pavia, Pavia*

³*Department of Biology and Biotechnology "L. Spallanzani", University of Pavia, Pavia*

⁴*Pediatric neurology, Vittore Buzzi Children's Hospital, Milan*

⁵*Child and adolescent neurology Unit, IRCCS Mondino Foundation, Pavia*

⁶*Unit of Molecular Medicine, IRCCS Stella Maris, Pisa*

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 43 AGS patients. Next Generation Sequencing analysis was performed using Nextera Enrichment Sample Illumina composed by 7 AGS genes. The interferon signature was performed on 24 AGS patients and 31 healthy controls (Rice et al., 2017). **RESULTS.** NGS genetic analysis identified mutations in 41 out of 43 subjects (95% of patients). In particular, we found 60% patients mutated in RNASEH2B, 5% in TREX1, 2% in RNASEH2A, 2% in RNASEH2C, 7% in SAMHD1, 7% in ADAR1 and 12% in IFIH1. Besides, two patients with a complete AGS phenotype did not present mutations on the 7 AGS genes. Also we found three novel mutations on RNASEH2B, SAMHD1 and IFIH1 gene, while the others were already described in literature. About interferon signature, 18 patients were positive (eleven mutated in RNASEH2B, one in RNASEH2C, one in SAMHD1, two 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 investigate with functional studies and we aim to perform exome sequencing on negative AGS patients.

COD. P063

Genetic testing of medium penetrance genes for melanoma predisposition: MITF p.E318K clinico-pathological and dermoscopic phenotype, and association with kidney cancer.

B. Dalmaso¹, G. Ciccarese¹, W. Bruno¹, P. Queirolo², L. Pastorino¹, V. Andreotti¹, F. Spagnolo², E. Tanda², G. Ponti³, C. Massone⁴, F. Drago⁵, A. Parodi⁵, G. Ghigliotti⁵, M.A. Pizzichetta⁶, P. Ghiorzo¹

¹*Genetics of Rare Cancers, Department of Internal Medicine and Medical Specialties (DiMI), University of Genoa and IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genoa, Italy*

²*Department of Medical Oncology, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genoa, Italy*

³*Department of Diagnostic and Clinical Medicine and Public Health, Division of Clinical Pathology, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy*

⁴*Dermatology Unit, Galliera Hospital, Mura delle Cappuccine 14, Genoa, Italy*

⁵*Section of Dermatology, Department of Health Sciences (Di.S.Sal.), University of Genoa and IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genoa, Italy*

⁶*Division of Oncology B, CRO Aviano National Cancer Institute, Aviano, Italy*

The p.E318K functional germline variant of the microphthalmia-associated transcription factor (MITF) gene, whose target genes regulate cell cycle and melanogenesis, has been implicated in genetic predisposition to melanoma and kidney cancer, as a medium penetrance allele. Carriers of this germline variant have an increased risk of developing melanoma (and multiple melanomas), kidney cancer (KC) or both (14-fold) than non-carriers. The p.E318K variant prevents MITF sumoylation and results in differential expression of MITF target genes. Recently, an international consensus has been reached on including this variant in gene panel testing for melanoma susceptibility and reporting it as a medium penetrance susceptibility allele, with clinical utility and tailored follow-up programmes (Bressac, 2016, Leachman, 2017).

The aim of this study was to assess genotype-phenotype associations in melanoma patients with p.E318K (MITF+), compared with non-carrier melanoma patients (MITF-), describing the largest cohort of MITF+ patients (22 out of 984) studied by integrating genetic, clinical, pathological and dermoscopic information, to date.

p.E318K prevalence was 2.2% in the whole study cohort, but was higher in multiple primary melanoma patients (5% as opposed to 1% in single melanoma patients). Aggressive, nodular melanoma was more common in MITF+ (32% compared to 19% in MITF-, $p=0.038$). Patients who removed dysplastic nevi (DN) were more frequently MITF+ (50% compared to 10% of MITF-, $p<0.01$). The positive association of p.E318K with multiple melanomas, nevi count, and family history of KC is confirmed (17% of MITF+ and 4% of MITF- had a positive family history of KC, $p=0.014$). Interestingly, among MITF+, the main pattern was the unspecific, whereas the most common patterns (multicomponent, reticular-globular) were almost absent, as opposed to MITF- ($p<0.01$).

In conclusion, MITF+ carriers tend to develop melanomas and DN with distinct histological features, frequency and dermoscopic patterns. Clinicians should be aware that these patients may develop dysplastic nevi and melanomas with unfrequent dermoscopic patterns to precociously identify melanomas and to avoid misdiagnoses.

COD. P064

Genotype-phenotype correlation and risk stratification in a cohort of 123 hereditary stomatocytosis patients

I. Andolfo^{1,2}, R. Russo^{1,2}, B.E. Rosato^{1,2}, F. Manna^{2,1}, A. Gambale^{1,2}, A. Iolascon^{1,2}

¹*Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italy*

²*CEINGE Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italy*

Hereditary stomatocytoses (HSt) are a wide spectrum of hemolytic anemias in which the erythrocyte membrane cation permeability is increased. HSt include syndromic and non-syndromic diseases: dehydrated hereditary stomatocytosis, due to mutations in PIEZO1 and KCNN4, respectively; overhydrated hereditary stomatocytosis, caused by RHAG mutations; phytosterolemia non leaky stomatocytosis, originated by biallelic mutations in ABCG5/ABCG8; cryohydrocytosis, due to genetic variants in SLC4A1; familial pseudohyperkalemia, caused by ABCB6 mutations. We here described a cohort of 123 patients enrolled in our Genetic Unit from 2013 to 2017. We found that PIEZO1 resulted the most frequent mutated gene with 47% of frequency in our HSt families. In the 84.1% of cases the mutations are missense and only in the 15.1% are duplications/deletions. In 20.5% of cases the mutations are de novo. We performed the first genotype-phenotype correlation analysis on PIEZO1-related patients useful for diagnosis, prognosis and management of these patients. To quantify the degree of severity in each patient, a method based on ranking score was performed. On the basis of weighted-rank score, the phenotype severity were correlated to the localization of mutations (non-pore domain and pore domain of the mechanosensitive channel). Interestingly, the high rank patients (severely affected) carried mutations in the pore domain while the low rank patients (mildly affected) exhibit mutations in the non-pore region, suggesting that the severity of this condition is related to the pore properties and intracellular domain that could be responsible of interactions with intracellular components.

COD. P065

GENOTYPING AND IN DEPTH PHENOTYPING OF SNYDER-ROBINSON SYNDROME

A. Peron^{1,2}, R. Stevenson³, M.J. Kutler⁴, M.P. Canevini¹, L. Spaccini⁵, M. Mastrangelo⁶, C.E. Schwartz³

¹*Child Neuropsychiatric Unit - Epilepsy Center (Medical Genetics), S. Paolo Hospital, Department of Health Sciences, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy*

²*Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, University of Utah, Salt Lake City, UT, USA*

³*Greenwood Genetic Center, Greenwood, SC, USA*

⁴*The Snyder-Robinson Foundation*

⁵*Clinical Genetics Service, V. Buzzi Children's Hospital, Milan, Italy*

⁶*Child Neurology Unit, V. Buzzi Children's Hospital, Milan, Italy*

Snyder-Robinson syndrome (SRS) is an ultra-rare X-linked disorder caused by hemizygous pathogenic variants in the Spermine Synthase gene (SMS, Xp22.11).

We reviewed the clinical and molecular information of affected individuals in the SRS Registry. We recorded over 50 variables according to the Human Phenotype Ontology (HPO) terms and the terminology of the Elements of Morphology. Eighteen males from North America and Europe met our criteria.

They all had a pathogenic variant in SMS (12 missense, 6 splice site) and reduced spermine/spermidine ratios. The results of protein levels and SMS activity analyses will be discussed in details. Median age was 8 yr (range 3-58 yr), and median age at molecular diagnosis was 3.5 yr (range 0.05-57 yr). All individuals showed intellectual disability (ID), ranging from borderline intellectual functioning to profound ID. On average, first words appeared at age 2 yr, independent sitting at age 1 yr, and independent walking at age 3 yr. Twelve patients had an unsteady gait and six were unable to walk or had not started yet. Decreased muscle mass and thin habitus were present in all individuals. Brain MRI was abnormal in 73% (11/15). Epilepsy was more frequent than previously reported (83%, 15/18), with a median age at onset of 1 yr (range 1-5 yr). Kyphoscoliosis was present in 67% (12/18), and osteoporosis in 89% (16/18). Osteoporosis was diagnosed at a median age of 5 yr (range 2-20 yr), and 75% (12/16) of these patients exhibited recurrent fractures. Gastrointestinal complications, renal problems and genital malformations were reported in 81% (13/16), 28% (5/18) and 44% (7/16) of the patients, respectively. Hearing impairment was noted in 33% (6/18) of the patients, hypoglycemia at birth in 28% (5/18). Surprisingly, 100% of those who received an immunoglobulin panel (5/5) showed elevated IgA, possibly related to recurrent infections (56%; 10/18). Common dysmorphic features consisted of asymmetric face, long palpebral fissures, malar flattening, high palate creating a characteristic nasal speech, thick vermillion of the lower lip, and long halluces.

We think that SRS could be recognized in clinic, and hope that the use of standard terminology will help both clinicians and laboratories diagnose this syndrome.

COD. P066

Malformazioni vascolari: dalla clinica all'analisi genetica. L'esperienza dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù.

E. Pisaneschi¹, C. Cesario¹, A. Diociaiuti², M.L. Dentici³, M. El Hachem², A. Novelli¹

¹*U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", Roma*

²*U.O.C. di Dermatologia, IRCCS Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", Roma*

³*Unità di Genetica Medica, IRCCS Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", Roma*

Introduzione: Le malformazioni vascolari sono congenite, generalmente evidenti fin dalla nascita, e determinate da uno sviluppo anomalo dei vasi. Secondo la classificazione dell' International Society for the Study of Vascular Anomalies (ISSVA) si distinguono in malformazioni arteriose, venose, linfatiche, capillari o complesse. Traumi, infezioni o alterazioni dello stato ormonale possono essere causa di complicità delle stesse. Materiali e Metodi: Questo studio è stato effettuato tramite NGS, con l'utilizzo di un pannello che include i principali geni associati a malformazioni vascolari. L'analisi delle varianti è stata eseguita attraverso software dedicati (Illumina Variant Studio/Tgex), considerando solo le varianti rare (con una frequenza allelica $\leq 1\%$) ed utilizzando software di predizione di patogenicità (SIFT e PolyPhen). Risultati: Abbiamo esaminato circa 200 pazienti a livello sia clinico che molecolare ed eseguito 18 studi familiari; l'analisi genetica di 17 casi è stata effettuata su DNA estratto da sangue periferico e biopsia tissutale, di 7 casi è stato analizzato solo il DNA estratto da biopsia tissutale, mentre per la restante casistica è stato studiato DNA estratto da sangue periferico. Abbiamo caratterizzato circa 45 pazienti a livello molecolare per differenti patologie che rientrano nello spettro delle malformazioni vascolari. Conclusioni: Negli ultimi anni l'identificazione di difetti genetici responsabili di malformazioni vascolari ereditarie e sindromi associate ha permesso di esplorarne i meccanismi di patogenesi, in particolare attraverso l'analisi NGS è stato possibile individuare anche forme in mosaico. È importante definire geneticamente le malformazioni vascolari e le sindromi correlate al fine di pianificare un adeguato follow-up di prevenzione e/o diagnosi precoce di rischi e complicanze (ad esempio cancro, coagulopatie, embolia polmonare e sovraccarico cardiaco). La gestione della malformazione vascolare deve essere multidisciplinare.

COD. P067

Next Generation Sequencing molecular diagnosis in Hereditary Spastic Paraplegia: a cross-sectional study

A. D'Amore¹, A. Tessa¹, A. Rubegni¹, M. Barghigiani¹, D. Galatolo¹, I. Bruno², C. Cereda³, C. Dato⁴, M. Felicori⁵, S. Gallone⁶, C. Graziano⁷, F. Gurrieri⁸, P. Mandich⁹, F. Pochiero¹⁰, M. Seri⁷, F. Stanzial¹¹, F. Tinelli¹, M. Valente¹², F.M. Santorelli¹

¹*Molecular Medicine, IRCCS Fondazione Stella Maris, Pisa, Italy*

²*Department of Pediatrics, Institute for Maternal and Child Health-IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste, Italy*

³*Genomic and Post-Genomic Center, C. Mondino National Institute of Neurology Pavia, Italy*

⁴*Second Division of Neurology, Department of Medical, Surgical, Neurological, Metabolic and Aging Sciences, University of Luigi Vanvitelli, Naples, Italy*

⁵*Child Neurology and Psychiatry Unit, IRCCS Institute of Neurological Sciences, Bellaria Hospital, Bologna, Italy*

⁶*Neurology I, Department of Neuroscience and Mental Health, AOU Città della Salute e della Scienza, Turin, Italy*

⁷*Medical Genetics Unit, Sant'Orsola-Malpighi University Hospital, Department of Medical and Surgical Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy*

⁸*Institute of Genomic Medicine, Catholic University of the Sacred Heart, Rome, Italy*

⁹*Medical Genetics Unit, Department of Diagnosis, Pathology and Treatments of High Technological 9 Complexity, IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genoa, Italy*

¹⁰*Metabolic and Muscular Unit, Neuroscience Department, Meyer Children's Hospital, Florence, Italy*

¹¹*Clinical Genetics Service and South Tyrol Coordination Center for Rare Diseases, Department of Pediatrics, Regional Hospital of Bolzano, Bolzano, Italy*

¹²*Neurology Clinic, Azienda Ospedaliero Universitaria Santa Maria della Misericordia, Udine, Italy*

Hereditary spastic paraplegias (HSPs) are a group of genetically heterogeneous neurodegenerative disorders characterized by progressive corticospinal dysfunction, lower-limb spasticity and weakness. The higher than expected genetic heterogeneity limits easy molecular definition and the recent availability of Next Generation Sequencing (NGS) could facilitate the diagnostic approach in HSP. In this cross-sectional single center study, we reported the results of 228 HSP subjects who underwent targeted multigene molecular screening using two different customized NGS panels over a period of four years. The latest version of our panel consists of 118 genes and targeted sequencing were performed on Illumina Platforms. Annotation of variants and bioinformatics were obtained using Ingenuity Variant Analysis and seven different tools were used to predict in silico variants pathogenicity. After correct annotation and confirmation by Sanger sequencing, we documented a positive diagnostic yield of 28% (63/228), and found variants of unknown significance (VUS) in 37% of patients (84/228), whereas 35% of the cases remain unsolved (81/228). MLPA analyses in SPG4, SPG3A, SPG31 were performed in the vast majority of the most cases as well as in those patients who harbored a single change in SPG7 and SPG11. To the best of our knowledge, this study investigated one of the largest Italian cohort of HSP patients. Patients were enrolled without pre-specified criteria and this could negatively have affected the positive diagnostic yield. The aim of the study was to underline the NGS revolutionary role in HSP diagnosis through the years, trying to assess its clinical usefulness as first-tier test in clinical practice. Our results confirm that NGS could be used as first-line investigation in genetic testing for those patients with no clear-cut clinical phenotype or previous information of gene tests due to the reduced turnaround time and costs per sample and the relatively high diagnostic yield. Implementation with direct analyses of intronic or regulatory regions or even extension to additional genes known to be affected in clinical conditions in the spectrum of spastic-ataxia could increase the diagnostic yield and reduced the as yet too high number of cases of missing heritability.

COD. P068

Next generation sequencing molecular profile of Acute Myeloid Leukemia with normal karyotype: clinical results from the Prospective Trial 02/06 of the Northern Italy Leukemia Group (NILG)

O. SPINELLI¹, S. SALMOIRAGHI¹, R. CAVAGNA¹, R. CAVAGNA¹, K. BUKLIJAS¹, A. MICHELATO¹, T. INTERMESOLI¹, F. LUSSANA¹, F. DELAINI¹, E. OLDANI¹, C. CAPRIOLI¹, P. STEFANONI¹, C. PAVONI¹, R. BASSAN², A. RAMBALDI¹

¹USC Hematology and Transplant Unit, Hospital Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy

²Ospedale dell'Angelo and SS: Giovanni e Paolo, Venezia-Mestre, Italy

Background. Treatment strategies for Acute Myeloid Leukemia (AML) patients are based on clinical features and cytogenetic/genetic profile of each patient. For patients with a normal karyotype (NK) AML the final risk classification is also defined by the identification of somatic mutations that have been recently described and impact on patient survival. Aims. To describe the clinical impact of the gene mutation profile of NK AML patients treated within the prospective NILG trial 02/06 [ClinicalTrials.gov Id: NCT00495287]. Methods. Genetic profiling of the 572 patients enrolled into the 02/06 trial was prospectively obtained with standard approach and subsequently with Next Generation Sequencing (NGS) for NK-AML with available material (207 out of 250). Two commercial NGS kits were applied: Trusight Myeloid panel (Illumina) and Sophia Myeloid Solution (Sophia genetics) investigating 54 and 30 gene regions, respectively. Results. The median age of the 207 studied NK AML was 52 years (19-74). The 5-year overall survival (OS) and Disease Free Survival (DFS) were 52% and 51%, respectively. The most frequently mutated genes in this NK-AML cohort were NPM1 (50%) followed by DNMT3A (38%), FLT3-ITD (26%), CEBPA (20%), (single mutated, sm, 9%, double mutated, dm, 11%), The incidence of co-occurring mutations was different among NPM1 mutated (NPM1m) and NPM1 wild type (NPM1wt) groups of patients ($p < 0.05$). Univariate analysis showed that FLT3-ITD negatively affected the OS of both NPM1m and NPM1wt patients while DNMT3A, RUNX1, TET2, IDH1, NRAS, U2AF1, determined a worse OS in the NPM1wt group ($p < 0.05$). In this latter, CEBPAdm was associated to a favorable clinical outcome. The 5-year OS of NPM1m group with or without FLT3-ITD were 38% and 72%, respectively ($P = 0.0002$), while the 5-year OS of NPM1wt group with or without any of the above described prognostically detrimental gene mutations were 26% and 72%, respectively ($P < .0001$). Multivariate analysis confirmed the results. Conclusion. Molecular profiling of NK AML is crucial for a precise definition of the relapse risk in AML patients, particularly those lacking the NPM1 mutation. High throughput NGS provides timely information on a growing set of genes and may improve treatment strategies.

COD. P069

NGS-based assay for the molecular diagnostics of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease

S. Bin^{1,2}, C.P. Cristalli^{1,2}, A. Mattiaccio^{2,3}, M. Pariali², I. Capelli¹, V. Aiello¹, D. Conte¹, F. Montanari⁴, C. Graziano⁴, M. Seri⁴, G. La Manna¹, V. Mantovani^{2,4}

¹*Dip. Medicina Specialistica Diagnostica e Sperimentale, U.O. Nefrologia, Dialisi e Trapianto, Policlinico di Sant'Orsola – Università di Bologna*

²*Centro unificato di Ricerca Biomedica Applicata, Policlinico di Sant'Orsola – Università di Bologna*

³*Dip. Scienze Mediche e Chirurgiche – Università di Bologna*

⁴*U.O. Genetica Medica, Policlinico di Sant'Orsola – Università di Bologna*

Background: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD) is one of the most common inherited disorders with a prevalence of 1/400 to 1/1000, characterized by the development and progressive enlargement of renal cysts, which often leads to end-stage renal disease (ESRD). Patients with PKD1 mutations usually develop more severe disease than patients with PKD2, with more cysts at an early age. PKD1 sequencing is challenging because of the presence of six pseudogenes with high sequence homology and high GC content.

Aim: Aim of this work is to develop and validate a rapid and cost-saving genetic test for the molecular diagnosis of ADPKD based on Next-Generation Sequencing (NGS).

Materials and methods: Our optimized NGS protocol included six gene specific Long-Range PCR, combined with a novel alignment pipeline for PKD1 gene, and followed by amplicon-based NGS for PKD2 gene. We performed sequencing by Ion Torrent PGM platform.

Results: A total of 189 patients were included in our study: 21 cases previously sequenced by Sanger (validation cohort-VC), 35 ADPKD submitted to transplantation (confirmation cohort-CC) and 133 consecutive cases (discovery cohort-DC). In the VC, all mutations present on PKD1 and PKD2 genes were correctly detected, providing 100% sensitivity and specificity. Overall, we detected potentially causative variants (Pathogenic, Likely Pathogenic and Variant of Uncertain Significance) in 81.5% of cases, 72% in PKD1 and 9.5% in PKD2 gene. 41% of the variants were novel, 96.8% of which were on PKD1 and 4.2% on PKD2. The CC showed mainly PKD1 and truncating mutations compared to DC, confirming the major pathogenicity of such alterations. Mosaicism (7%), undetectable by Sanger sequencing, was found in a proband's mother. More than one variant was found in 12% of cases, some of which with an early and severe disease.

Conclusions: Our NGS protocol resulted accurate, fast and cheap, suitable for molecular diagnostics. Moreover, NGS can allow a diagnosis in challenging mosaic samples.

COD. P070

SEVERE PERIPHERAL JOINT LAXITY IS A DISTINCTIVE CLINICAL FEATURE OF B3GALT6- AND B4GALT7-RELATED DISORDERS

L. Garavelli¹, S.G. Caraffi¹, M. Pollazzon¹, I. Ivanovski¹, A. Lauriello¹, S. Giangiobbe¹, M. Valli², A. Rossi², B. Campos-Xavier³, S. Unger³, A. Superti-Furga³

¹*Medical Genetics Unit, AUSL-IRCCS of Reggio Emilia, Reggio Emilia, Italy*

²*Department of Biochemistry "Alessandro Castellani", University of Pavia, Italy*

³*Division of Genetic Medicine, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, University of Lausanne, Switzerland*

Variations in genes encoding the enzymes responsible for the synthesis of the linker region of proteoglycans may result in recessive conditions known as "linkeropathies". Variants in B4GALT7 and B3GALT6 genes are the cause of a combined skeletal and connective tissue phenotypes. B4GALT7 variants cause a typical facial gestalt, short stature, radioulnar synostosis, osteopenia, and joint laxity. B3GALT6 variants cause both spondyloepimetaphyseal dysplasia (SEMD) with joint hypermobility (SEMDJL1 or SEMDJL Beighton type) and a severe EDS-like disorder. Affected patients generally present clinical features of connective tissue weakness in infancy, and subsequently develop signs of skeletal dysplasia. Some patients develop life-threatening complications: aortic dilatation, aneurysms and cervical spine instability. We present the clinical features of 3 patients: P1 with B4GALT7-related "progeroid EDS", P2 with severe B3GALT6-related SEMD-JL, and P3 with a B3GALT6-suggestive phenotype. P1 and P2 show compound heterozygosity of a missense and a frameshift variant in B4GALT7 (P1) or B3GALT6 (P2); P3 has no molecular confirmation yet (analysis is ongoing). Phenotypes related to B4GALT7 and B3GALT6 are similar, with short stature, hypotonia and joint laxity, skeletal features, and a suggestive face with prominent forehead, thin soft tissue, bulging eyes and often sparse hair. The most outstanding feature is the combination of severe connective tissue involvement accompanied by progressive skeletal dysplasia. The extreme laxity of distal joints and the soft, doughy skin on the hands and feet are rarely seen in other EDS types (except in EDS VIA) and are a good clue to the diagnosis, that can be supported by skeletal radiographs and molecular analysis. Accurate diagnosis will help in excluding other causes of peripheral hypotonia, such as neuromuscular disorders, and allow for physiotherapeutic interventions.

COD. P071

“What would you like to know?” Patients' attitudes towards communication of unsolicited findings emerging from new sequencing technologies

L. Godino^{1,2}, C. Bruzzone³, W. Bruno³, L. Battistuzzi⁴, L. Varesco³, M. Franiuk³, S. Miccoli^{1,2}, C. Graziano², M. Seri², D. Turchetti^{1,2}

¹*Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche: Centro di Ricerca sui Tumori Ereditari, Università di Bologna Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna Policlinico S.Orsola-Malpighi, Bologna, Italia*

²*Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche: UO Genetica Medica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna Policlinico S.Orsola-Malpighi, Bologna, Italia*

³*IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova, Italia*

⁴*Dipartimento di Informatica, Bioingegneria, Robotica e Ingegneria dei Sistemi, Università degli Studi di Genova, Genova, Italia*

In the near future, single-gene or small gene panel testing is expected to be replaced in clinical settings by whole exome/genome sequencing (WES/WGS), which raises concerns regarding if and how unsolicited findings should be disclosed and managed. Little evidence is available on the attitudes towards WES/WGS of those who are expected to be most affected by it: patients undergoing clinical genetic testing (CGT). We carried out semi-structured interviews with patients undergoing CGT with the aim of exploring their attitudes toward communication of genetic variants unrelated to the medical reason for which the test was ordered. Three-hundred and seven patients, 254 (82.7%) females and 53 (17.3%) males, aged 18-86 years, were interviewed between June 2013 and April 2017. Only about a quarter of the individuals interviewed (26.1%) reported that they had heard of WES/WGS before, while most (213; 69.5%) stated that they would like to be informed of any alteration identified. Although less informed (only 21.1% reported knowledge of WES/WGS), younger people (18-35 years) were more likely to want to learn about any alteration identified (78.9% vs 66.5% of individuals aged 36-54 and 69.7% of those aged 55-86). The main reason for choosing to be informed about the presence of unsolicited findings was wanting to learn about one's risks (83.6%); however, a significant difference in motivations was observed by age: participants who stated they wanted to be informed for the sake of relatives were older (age 52.9±15.0) than those hoping that the information will eventually become clinically useful 41.2±7.6; p=.030. Helplessness and fear of an unpreventable disease (52.6%) were the main motivations for those who only wanted to be informed about alterations associated with preventable diseases; among those, men were more likely than women (22.2% vs 3.0%, p=.043) to explain their answer with the desire to protect relatives. Concerns regarding quality of life (77.8%) were the main reason reported by participants who stated they would not want to be informed of any unsolicited findings. These preliminary data suggest that wanting to be informed about unsolicited findings is influenced by gender and age. Whether knowledge/attitude change over time is currently under investigation.

COD. P072

De novo dominant TFG mutation causing complex spastic paraparesis

S. Petrucci¹, F. Stregapede², G. Ferrazzano³, A. Germani⁴, M. Piane⁴, M.R. Torrisi⁴, E.S. Bertini⁵, G. Fabbrini⁶, L. Travaglini⁵

¹*Dip. di Medicina Clinica e Molecolare, Sapienza Università di Roma, Roma; Divisione di Genetica Medica, IRCCS-Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

²*Unità di Malattie Neuromuscolari e Neurodegenerative, Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Polo di Ricerca S. Paolo, Roma; Dip. di Scienze, Università Roma Tre, Roma*

³*IRCCS Istituto Neuromed, Pozzilli (IS)*

⁴*Dip. di Medicina Clinica e Molecolare, Sapienza Università di Roma, Roma; Osp. Universitario S. Andrea, Roma*

⁵*Unità di Malattie Neuromuscolari e Neurodegenerative, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Polo di Ricerca S. Paolo, Roma*

⁶*Dip. di Neuroscienze Umane, Sapienza Università di Roma, Roma; IRCCS Istituto Neuromed, Pozzilli (IS)*

The tropomyosin-receptor kinase fused gene (TFG, NM_006070) participates in many oncogenic rearrangements resulting in anaplastic lymphoma and myxoid chondrosarcoma. Recently TFG was identified as a causative gene for distinct neurodegenerative diseases, including dominant hereditary motor and sensory neuropathies with proximal or distal involvement (HSMN-P, or Okinawa syndrome, and CMT2, respectively) and a recessive complicated hereditary spastic paraplegia (SPG57) with lower limb spasticity, ataxia, cognitive dysfunction, parkinsonism, visual dysfunction and epilepsy. We describe a 29 years old boy, born from non consanguineous parents, who developed a sporadic form of spastic paraparesis in infancy. During the following years, the patient developed optic atrophy, mild memory compromise and impairment of executive functions. No other neurological (especially polyneuropathy) or systemic symptoms emerged from clinical and ancillary assessments. A deep-sequencing NGS targeted panel, comprising 113 known genes causing hereditary spastic paraplegia, identified the novel heterozygous variant c.80A>G; p.(H27R) in exon 2 of TFG. Segregation analysis excluded this variant in the healthy parents, suggesting a de novo origin. Since all reported SPG57 mutated patients have a recessive inheritance, we searched for a second mutated allele by quantitative Real-Time PCR assay (qRT-PCR) for dosage analysis of the 8 exons and 5'-UTR of TFG. No deletions and/or duplications of one or more exons were found. Moreover, RT-PCR analysis of the full-length cDNA confirmed the presence of a heterozygous variant and failed to detect alternative splicing isoforms possibly caused by a deep intronic mutation on the other allele. The p.(H27R) variant, predicted damaging by several bioinformatics tools (SIFT, Provean), is located in the PB1-domain, one of the three functional domains of the TFG protein. To date, no TFG variants have been detected in the PB1-domain. Indeed, the previously reported mutations (one in a homozygous state causing SPG57 and two in heterozygous state linked to CMT2 and HSMN-P) lie in the CC domain and in P/Q-rich domain, respectively. In conclusion, we describe for the first time a patient with a complicated spastic paraparesis caused by a dominant TFG mutation.

COD. P073

Happle was right; Genetic counseling and NGS in the case of Sturge-Weber Syndrome

N. Bukvic¹, L. Lospalutti², L. Garofalo³, V. Leotta⁴, F. Susca⁴, A. Stella⁴, P. Kuentz⁵, P. Vabres⁵, N. Resta⁴

¹*U.O.C Genetica Medica, Azienda Ospedaliero – Universitaria Consorziata Policlinico di Bari, Bari, Italia*

²*U.O.C. Dermatologia e Venereologia Universitaria - Azienda Ospedaliero – Universitaria Consorziata Policlinico di Bari, Bari, Italia*

³*U.O.C. Dermatologia e Venereologia – Torre a Mare/Bari, Torre a Mare (BA), Italia*

⁴*U.O.C Genetica Medica, D.A.I. Patologia Diagnostica, Bioimmagini e Sanità Pubblica, Università degli Studi “Aldo Moro”, Bari, Italia*

⁵*Laboratoire de génétique moléculaire + Equipe GAD EA 4271, Dijon cedex, France*

Common birthmarks can be an indicator of underlying genetic disease but are often overlooked, even though they are usually localized and transient, but they can be extensive, permanent, and associated with extracutaneous abnormalities when represents a group of syndromes associated with neurovascular, ophthalmological, overgrowth, and malignant complications. For example port-wine stains, one of the most common birth defects, are associated with a rare disorder called Sturge-Weber Syndrome (SWS). Sturge-Weber Syndrome occurs in approximately 1 in 20,000-50,000 live births, and is characterized by seizures, developmental delays and glaucoma, among other health problems. Recent advances in genetics, have provided molecular evidences for most of Rudolf Happle's theories (thus stressing his extraordinary ability to think and reason ahead of his time) who observed that the conditions did not appear to be inherited, suggesting they resulted from a somatic mutation. Happle was right also for SWS, since non-inherited genetic mutations arising during fetal development have been identified as activating mutations in GNA11 and GNAQ. We here report a case of 16-year-old girl referred for genetic counseling due to epilepsy, intellectual disability, glaucoma (dx) and facial and body port wine stains. She already had normal results of some genetic testing: a normal female karyotype and aCGH. Phenotype and clinical signs of our patient was suggestive of SWS, thus mutational screening has been requested after DNA extraction from skin biopsy (affected skin) and peripheral blood. The pathogenic somatic missense mutation c.547C>T; p.Arg183Cys of GNA11 (Guanine Nucleotide-Binding Protein Alpha 11) gene was detected at very low levels (7.1%) in skin biopsy but was undetectable in the blood indicating that this condition represents a postzygotic mosaic disorder, confirming the original clinical suspect (which was formulated 1 month after birth) after 16 yr. As Mandela said: “It always seems impossible until it's done”.

COD. P074

Breast cancer dysbiosis in paired tumor and normal tissues

M.V. Esposito^{1,2,3}, V. D'Argenio^{1,2,3}, M. Nunziato^{1,2,3}, M. D'Aiuto⁴, B. Fosso⁵, G. Casaburi⁶, G. Pesole^{5,7}, G. Botti⁴, F. Salvatore^{1,2,3}

¹*CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Naples, Italy.*

²*Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University of Naples Federico II, Naples, Italy.*

³*Task Force on Microbiome Studies, University of Naples Federico II, Naples, Italy.*

⁴*Istituto Nazionale Tumori – IRCCS Fondazione Pascale, Naples, Italy.*

⁵*Institute of Biomembranes and Bioenergetics, National Research Council, Bari, Italy.*

⁶*Evolve Biosystems, Inc. Davis, CA, USA.*

⁷*Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Bari A. Moro, Bari, Italy.*

Breast cancer (BC) is the most common malignancy in females. About 10% of breast tumors are hereditary and arise in individuals carrying germline predisposing-mutations, especially in the high penetrant genes BRCA1/2 (1). Most BCs, are considered sporadic and the predisposing cause is still unknown. A large number of factors, including familiarity, age, hormonal cycles and diet, have been reported to increase BC risk (2). In recent years the next-generation sequencing (NGS) technology has opened the way to the study of the human-associated microbiota, i.e., the community of microorganisms of a particular environment. The quali-quantitative imbalance of a microbiome, namely "microbial dysbiosis", has been associated to various human diseases, including cancer (3). The aim of our work was to fully characterize, using NGS-based methodology, the breast tissue microbiome to identify a microbial signature associated to BC. To this aim, we enrolled 34 women affected by BC. Tumor tissues and non-tumoral adjacent tissues were collected from each subject, for a total of 68 samples. Sequencing of the variable V4-V6 regions of the 16S rRNA gene was performed with the Illumina MiSeq System. Sequences were analyzed with the QIIME tool, and were reanalyzed using the BioMaS pipeline to consolidate our results and statistics. Bacterial composition and richness differed significantly between healthy and tumor paired tissues. Similar results were obtained with the two above-mentioned bioinformatic tools thereby confirming the statistically significant difference. Moreover, the breast tissue microbiome was found to be related to lifestyle factors. Taken together, our findings suggest a link between tissue dysbiosis and BC and thus have potential clinical implications. The validation of our results on a higher number of women, from other cancer centers and other geographic regions, will help to define the weight of environmental factors on BC microbiome composition.

1.Narod SA. Nat Rev Clin Oncol 2012

2.Engel C et al. Breast Care 2015

3.Schwabe RF et al. Nat Rev Cancer 2013

COD. P075

BROMODOMAIN-CONTAINING PROTEIN 7 (BRD7) IS A CANDIDATE TUMOUR SUPPRESSOR AND PROGNOSTIC BIOMARKER IN BREAST CARCINOMA

C. Lo Nigro^{1,2}, O. Garrone¹, D. Vivenza¹, R. Brizio³, F. Mantovani⁴, G. Del Sal⁴, T. Crook⁵, C.M. Merlano¹

¹*Oncology Department, S. Croce & Carle Teaching Hospital, Cuneo, Italy*

²*Laboratory Department, S. Croce & Carle Teaching Hospital, Cuneo, Italy*

³*Pathology Department, S. Croce & Carle Teaching Hospital, Cuneo, Italy*

⁴*Laboratorio Nazionale CIB (LNCIB), Area Science Park, Trieste, Italy*

⁵*Oncology Department, Royal Surrey County Hospital, Guildford, UK*

Background

Multiple genetic and epigenetic factors drive tumour initiation and progression in breast cancer (BC). Bromodomain-containing protein 7 (BRD7) is a transcriptional co-activator for p53, mainly localized in the nucleus, which modulates histone acetylation and promotes p53 target genes. Previous studies show that BRD7 is down-regulated in cancer and this may correlate with clinical outcomes. However, the involvement of BRD7 in BC is poorly understood.

Purpose of the study

We have investigated the expression, CpG island methylation and sub-cellular localization of BRD7 in BC cell lines and clinical cases and thereby assessed its prognostic significance. Materials and methods BRD7 expression was analysed by qRT-PCR and IHC in 13 BC cancer cell lines. Expression was also assessed by IHC in 50 cases of primary BC and 14 paired metastatic lesions. CpG island methylation was quantified by pyrosequencing. BC cases were divided for nuclear and non-nuclear BRD7 localization and then stratified for high and low BRD7 expression. The effects of BRD7 expression and clinical data on OS and PFS were evaluated using univariate and multivariate Cox regression analyses.

Results

BRD7 was expressed at levels similar to normal breast epithelium and the CpG island unmethylated in all 13 cell lines. Methylation analysis was successful in 42 FFPE collected, with 26,2% of them methylated (11/42). IHC on primary tissues showed that BRD7 is mainly localized in the nucleus (34/50: 68%). Patients with BRD7 nuclear localization (N=34) showed smaller tumours ($p=0.012$), a longer OS ($p=0.002$) and a lower relapse rate ($p=0.03$). Nuclear BRD7 expression is associated with wild-type TP53 ($p=0.04$) and unmethylated BRD7 ($p=0.04$), compared to the non-nuclear cases (N=16). No difference was seen in nodal status, grade, clinical stage, histological type, ER, PR, HER2 and Ki-67 expression. Patients (N=12) showing both nuclear localization and high BRD7 expression presented the smallest tumours (10/12 = 83%) and longer OS ($p=0,005$) and PFS ($p=0,001$). Among the 4/14 patients with nuclear localization in their primary tumours, 3 (75%) presented a diffuse or negative BRD7 in the paired metastasis.

Conclusion

BRD7 is a strong candidate for breast cancer tumor suppressor and prognostic biomarker.

COD. P076

Ayme-Gripp syndrome: further expansion of the clinical spectrum and novel mutations affecting the transactivation domain of MAF transcription factor

M. Niceta¹, E. Stellacci², C. Zweier³, A. Paula Fernandez⁴, A. Tzschach⁷, D. Barbuti⁵, C. Leoni⁶, N. Gupta⁹, C. Ruggiero⁸, E. Tizzano⁴, L. Graul-Neumann¹⁰, G. Zampino⁶, M. Tartaglia¹

¹*Genetics and Rare Diseases Research Division, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Rome, Italy*

²*Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy*

³*Institute of Human Genetics, Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany*

⁴*Department of Clinical and Molecular Genetics and Rare Disease Unit, University Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain*

⁵*Radiologia e Bioimaging, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Rome, Italy*

⁶*Center for Rare Diseases, Department of Pediatrics, Polo Salute Donna e Bambino, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli, Catholic University, Rome, Italy*

⁷*Institut für Klinische Genetik, Technische Universität Dresden, Dresden, Germany*

⁸*Centro Nacional de Genética Médica Buenos Aires, Argentina*

⁹*Division of Genetics, Department of Pediatrics, All Institute of Medical Sciences, New Delhi, India*

¹⁰*Ambulantes Gesundheitszentrum Humangenetik, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany*

Ayme-Gripp syndrome (AYGRPS) is the eponym of a recognizable condition caused by restricted dominantly acting mutations in MAF encoding for basic leucine zipper (bZIP)-containing transcription factor. Major clinical features are congenital cataracts, sensorineural hearing loss, brachycephaly, intellectual disability, seizures, reduced growth, and distinctive flat facial appearance. Skeletal abnormalities have been also noted in affected individuals, even though, due to small number of subjects, these features have not been assessed systematically. Our previous study documented that disease-causing MAF mutations clustering into GSK3 phosphorylation motif of transactivation domain of MAF impaired the phosphorylation status, activation and stability of the mature protein. Herein by a mutational screening, we report 4 additional patients with AYGRPS and 2 subjects with previously unreported de novo missense mutations in MAF. By functional studies on the identified mutations affecting highly conserved Ser57 and Ser66 residues, we demonstrate that, consistently with other disease-causing changes, the novel MAF mutants perturb the phosphorylation status of protein and its stability. Expanding the series, we also provide a more accurate characterization of clinical phenotype, with particular focus on skeletal features, which may occur in this disorder. Beside brachycephaly and chondrolysis of hips previously reported, we report that delayed skeletal age, radio-ulnar synostosis, joints limitations, and dental abnormalities are also recurrent features. In conclusion, we further expand the clinical spectrum of AYGRPS and confirm that impaired sequential phosphorylation of GSK3 phosphorylation motif is the molecular mechanism underlying the disorder.

COD. P077

Fenotipo speculare in due fratelli da “traslocazione sbilanciata 3p;9p”

P. Fontana¹, M. Falco¹, D. Postorivo², V. Brugiati², M.R. Abate², A.M. Nardone², C. Lombardi¹, M. Ciavarella¹, M. Maioli¹, G. Cantalupo¹, F. Scarano¹, S. Amabile¹, G. Scarano¹, F. Lonardo¹

¹*U.O.S.D. Genetica Medica A.O.R.N. Rummo (Benevento)*

²*U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, Policlinico Tor Vergata, Roma*

Si riporta il caso di due fratelli con due riarrangiamenti cromosomici “a specchio”: il primogenito è portatore di una delezione 3p26.3 e di una duplicazione 9p24.3p24.1; la secondogenita, invece, presenta una duplicazione 3p26.3 ed una delezione 9p24.3p24.1. I riarrangiamenti sono conseguenza di una traslocazione bilanciata 3p26;9p24 nella madre dei probandi. Il primogenito, di 38 anni, è affetto da disabilità intellettiva grave, disturbi del comportamento, tratti maniacali non controllati dalla terapia con antipsicotici, epilessia trattata con clonazepam e fenobarbital. Presenta microcefalia, facies grossolana con sinofria; manifesta tratti oppositivi e provocatori, episodi di aggressività, in particolare verso i componenti del nucleo familiare. La secondogenita, di 33 anni, è affetta da disabilità intellettiva grave, disturbi comportamentali, tratti di inibizione e di isolamento, anomalie EEG con anamnesi negativa per convulsioni, obesità, bassa statura. Il riarrangiamento della regione 3p26.3, esteso 1,1 Mb, coinvolge il gene CNTN6, codificante per una molecola di adesione espressa a livello cerebrale, la cui perdita di funzione è stata associata a disabilità intellettiva, epilessia, autismo, iperattività, schizofrenia, depressione, disturbo bipolare; meno chiaro è un eventuale effetto della duplicazione del gene stesso, che potrebbe tuttavia essere concausa del quadro clinico della secondogenita. Il riarrangiamento in regione 9p24 è esteso 6,7 Mb ed è sovrapponibile alla regione critica per la sindrome da microdelezione del braccio corto del cromosoma 9, caratterizzata da ritardo psicomotorio, ipotonia e difetti cardiaci. La duplicazione della medesima regione, viceversa, è stata associata ad un fenotipo simil-Coffin-Siris, caratterizzato da disabilità intellettiva, microcefalia, facies grossolana.

COD. P078

Genetic conflicts with Plasmodium parasites and functional constraints shape the evolution of erythrocyte cytoskeletal proteins

R. Cagliani, D. Forni¹, M. Clerici², M. Sironi¹

¹*Scientific Institute, IRCCS E. Medea, Bioinformatic Lab., Bosisio Parini, Lecco, Italy*

²*Department of Physiopathology and Transplantation, University of Milan, Milan, Italy*

Alteration in genes that encode erythrocyte cytoskeleton proteins (ECP) cause human genetic diseases such as Southeast Asian ovalocytosis (SAO), hereditary spherocytosis (HS), and hereditary elliptocytosis (HE). These disorders determine an alteration of the shape and structural properties of red blood cells (RBC), in turn exerting protective effects against the infection with Plasmodium parasites and/or the pathogenesis of malaria. As Plasmodium parasites exerted a strong selective pressure on primate genomes and specifically on the human genome, we hypothesized that ECP-encoding genes may have evolved in response to Plasmodium-driven selection. We analyzed the evolutionary history of 6 ECP-encoding genes (ANK1, EPB41, EPB42, SLC4A1, SPTA1, and SPTB) in primates, as well as of their Plasmodium-encoded ligands (KAHRP, MESA and EMP3). Results indicated that EPB42, SLC4A1, and SPTA1 evolved under pervasive positive selection and that episodes of positive selection tended to occur more frequently in primate species that host a larger number of Plasmodium parasites. Conversely, ANK1 and SPTB displayed extensive signatures of purifying selection in primate phylogenies, Homininae lineages, and human populations, suggesting strong functional constraints. Analysis of Plasmodium genes indicated adaptive evolution in MESA and KAHRP; in the latter, different positively selected sites localized to spectrin-binding domains, and evidence of selection was detected for the branch leading to P. falciparum strains. Because most of the positively selected sites in alpha-spectrin (SPTA1) localized to the domains involved in the interaction with KAHRP, we suggest that the two proteins are engaged in an arms-race scenario. This observation is relevant because KAHRP is essential for the formation of “knobs”, which represent a major virulence determinant for Plasmodium falciparum. Conversely, strong constraints acting on other ECPs such as beta-spectrin (SPTB), a major ligand of KAHRP, have limited their ability to accrue changes that may confer resistance, thus shifting the genetic conflict to the parasite's advantage.

COD. P079

Identificazione di due varianti nel gene LARS in un bambino affetto da grave fibrosi epatica neonatale

C. Molinaro¹, E. Tabolacci¹, G. Marangi¹, V. Arena², M. Tana³, G. Vento³, M. Genuardi¹

¹*Istituto di Medicina Genomica, Università Cattolica, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" IRCCS, Roma*

²*Istituto di Anatomia Patologica, Università Cattolica, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" IRCCS, Roma*

³*Divisione di Neonatologia, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" IRCCS, Università Cattolica del S. Cuore, Roma*

Descriviamo un neonato nato prematuramente a 30 settimane (peso neonatale 690 grammi), deceduto a 3 mesi di vita per insufficienza epatica, coagulopatia, ascite, sindrome epato-renale e broncodisplasia polmonare. Il reperto autoptico predominante è stato di fibrosi epatica congenita massiva associata a nefronoftisi. Durante la gravidanza sono stati riscontrati IUGR ed iperecongenicità delle anse intestinali. I genitori del probando (non consanguinei) hanno avuto una precedente gravidanza esitata nella nascita di una bimba prematura (27 settimane) per pPROM, deceduta dopo qualche giorno per cause imprecisate in quanto non è stato eseguito riscontro autoptico. L'analisi dell'esoma del trio familiare, eseguita con piattaforma Ion Torrent (Life Technologies), ha identificato nel neonato 2 varianti rare in eterozigosi composta nel gene LARS1, codificante l'enzima responsabile del legame dell'aminoacido leucina al suo specifico tRNA. Si tratta di 2 varianti non sinonime missenso, una nell'esone 8 (NM_020117: c.743G>T; p.Cys248Phe) e l'altra nell'esone 13 (rs746121910) confermate attraverso sequenziamento con metodo Sanger. L'analisi di segregazione ha dimostrato che le 2 varianti sono state ereditate rispettivamente dalla madre e dal padre, configurando una trasmissione autosomica recessiva della condizione. Varianti rare con probabile effetto patogenetico in omozigosi di LARS1, tra cui la rs746121910, sono state associate alla sindrome da insufficienza epatica infantile tipo 1 (ILFS1, OMIM#615438), descritta per la prima volta in una famiglia di consanguinei irlandesi (Casey et al., 2012). Finora sono state descritte 6 varianti (5 missenso ed una frameshift) localizzate prevalentemente nel dominio catalitico e di editing della proteina, incluse le due da noi identificate. Si tratta del primo caso italiano di varianti in LARS1 ereditate con modalità autosomica recessiva causa di ILFS1. L'identificazione di nuovi casi potrà chiarire il coinvolgimento del gene LARS1 nella patogenesi della ILFS1, soprattutto ai fini della consulenza genetica resa complessa anche dalla rarità di questa condizione autosomica recessiva (prevalenza 1:1.000.000), dal quadro clinico eterogeneo (più organi coinvolti) e dalla prognosi variabile con pazienti che raggiungono l'età adulta.

COD. P080

Identificazione di una portatrice di DMD in mosaico attraverso un approccio analitico combinato DNA/RNA

J. Mela¹, C. Peconi¹, G. Pagliaroli¹, S. Carboni¹, R. Cascella^{1,2}, G. Barrano³, I. Zito³, S. Zampatti¹, A. Novelli^{3,5}, E. Giardina^{1,4}

¹Laboratorio di Medica Genomica UILDM, Fondazione Santa, Roma, Italia

²Dipartimento per la Valutazione Chimico-Tossicologica e Farmacologica dei Farmaci, Università Cattolica Nostra Signora del Buon Consiglio, Tirana, Albania

³Ospedale S. Pietro Fatebenefratelli, UOSD Genetica Medica, Roma, Italia

⁴Dipartimento di Biomedicina e Prevenzione, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Roma, Italia

⁵Unità di Genetica Medica, Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Roma, Italia

Lo screening per identificare se una donna è portatrice di Distrofia Muscolare di Duchenne/Becker (OMIM #310200; #300376), prevede la ricerca di mutazioni nel gene DMD, di cui circa l'80% è costituito da delezioni/duplicazioni visibili attraverso MLPA. Com'è noto, l'elevata frequenza di mutazioni de novo e di mosaicismi impone di valutare in sede di consulenza genetica un rischio di ricorrenza considerevole anche in casi sporadici. È noto che, almeno una parte dei soggetti DMD apparentemente sporadici sono causati da donne portatrici in mosaico, condizione difficile da identificare con le classiche analisi molecolari. A tal proposito, viene descritto il caso di una donna con storia familiare negativa per distrofinopatia, test molecolari convenzionali negativi e figlio affetto da DMD. Il caso è stato studiato applicando un diverso protocollo (analisi DNA e RNA), rispetto a quello convenzionalmente in uso. Questo approccio ha consentito di stabilire il corretto genotipo della probanda e di evidenziare la sua condizione di portatrice in mosaico. Il presente studio ha portato ad una revisione critica delle linee guida attualmente disponibili, nonché alla possibilità di porre le opportune indicazioni per una diagnosi prenatale invasiva. Inoltre, questo caso potrebbe essere utilizzato per la creazione di un algoritmo che possa essere di supporto alla diagnostica molecolare.

COD. P081

Il Controllo Esterno di Qualità Nazionale dei test genetici coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità: 16 anni di attività

F. Censi¹, F. Tosto¹, M.C. De Stefano¹, G. Floridia², M. Salvatore¹, G. Ferrari¹, D. Taruscio¹

¹*Centro Nazionale Malattie Rare, Istituto Superiore di Sanità*

²*Unità di Bioetica, Istituto Superiore di Sanità*

Premessa: Le procedure di laboratorio sono un sistema complesso che va dall'accettazione del campione alla consegna del referto; errori in queste fasi producono risultati non affidabili. La partecipazione al Controllo Esterno di Qualità (CEQ) è il principale strumento del laboratorio per monitorare i propri risultati e raggiungere standard qualitativi elevati. La necessità per i laboratori di partecipare ai CEQ è espressa in documenti internazionali, quali la norma ISO15189, e nazionali, quali "Linee guida per i test genetici" e "Linee guida per le attività di genetica medica" che indicano l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) come provider Nazionale. Dal 2001 l'ISS svolge attività di provider di CEQ dei test genetici; ad oggi, ai 130 laboratori partecipanti/anno. Sono offerti 9 differenti schemi. Il CEQ ha principalmente un ruolo educativo. Scopo dello studio: illustrare come il monitoraggio dei laboratori attraverso il CEQ stia contribuendo al miglioramento e alla standardizzazione della qualità dei test genetici erogati da laboratori sul territorio nazionale. Materiali e Metodi: l'ISS offre 9 schemi in tre macroaree: Genetica Molecolare (Fibrosi Cistica, Beta Talassemia, Sindrome X-Fragile); Citogenetica (Prenatale, Postnatale e Oncoematologica); Genetica Molecolare Oncologica (Poliposi Adenomatosa del Colon, Tumore Ereditario della Mammella e dell'Ovaio e Sindrome di Lynch). Vengono distinti due tipologie di schemi: prospettici (invio di campioni), e retrospettivi (richiesta di casi già analizzati). I dati sono valutati, secondo criteri di valutazione prestabiliti e pubblici, attraverso una piattaforma informatica, da commissioni composte da oltre 20 esperti nazionali, fra questi sono inclusi membri della SIGU. Risultati: Dal 2001 ad oggi sono stati realizzati 13 turni e monitorati oltre 300 laboratori, di questi 22 partecipano dal 2001. Il 50% appartiene ad Asl e Aziende Ospedaliere; la restante parte a Università, IRCCS e laboratori privati. Nel corso di questi anni abbiamo ottenuto una standardizzazione del referto e un miglioramento nell'analisi del genotipo e del cariotipo; rimangono ancora alcune carenze nell'interpretazione del risultato. Conclusioni: I dati che illustreremo confermano l'importanza della partecipazione costante dei laboratori al CEQ.

COD. P082

KMT2A mutations in patients with Rubinstein-Taybi clinical diagnosis: a shared imbalance of open and closed chromatin in overlapping syndromes?

C. Gervasini¹, V. Massa¹, E. Di Fede¹, B. Augello², G. Squeo², E. Scarano³, R. Fischetto⁴, G. Zampino⁵, M. Piccione⁶, M.C. Gandini¹, M. Castori², L. Larizza⁷, G. Merla², D. Milani⁸

¹*Genetica Medica, Dip. di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano*

²*Unità di Genetica Medica, IRCSS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo*

³*Amb. di Malattie Rare, Sindromologia ed Auxologia U.O. Pediatria AOU S.Orsola-Malpighi, Bologna*

⁴*U.O.C. Malattie Metaboliche Genetica Medica, PO Giovanni XXIII, AOU Policlinico Consorziale, Bari*

⁵*Centro Malattie Rare e Difetti Congeniti, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli, Università Cattolica, Rome*

⁶*Dip. di scienze per la promozione della salute e la cura della madre e del bambino "G. D'Alessandro", Università di Palermo*

⁷*Lab. di Citogenetica medica e genetica molecolare, Centro di Ricerche e Tecnologie Biomediche -Istituto Auxologico Italiano-IRCCS, Milano*

⁸*UOSD Pediatria ad alta intensità di cura, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico Milano*

Rubinstein-Taybi syndrome (RSTS, OMIM#180849, #613684) is a rare (1:125,000) autosomal-dominant clinically heterogeneous disease characterized by intellectual disability, postnatal growth deficiency, distinctive dysmorphisms and skeletal abnormalities. RSTS is caused by mutations in CREBBP (~60%) or EP300 (~10%). However, no causative mutation is identified in about 30% of patients. CREBBP and EP300 encode the homologous lysine acetyltransferases CBP and p300 proteins that act as "writers" of epigenetic machinery, hence depicting RSTS as typical chromatinopathy. Chromatinopathies define a group of diseases caused by mutations in genes coding for components of the epigenetic apparatus termed "writers, erasers, readers and remodelers". These proteins act in concert to control the chromatin opening and closing thus regulating gene expression by modification (i.e. methylation, acetylation, etc) of histones and DNA methylation. Due to the clinical overlap between different chromatinopathies and the functional network between the epigenetic components, mutations in a same "epi-gene" could be responsible for overlapping and/or slight different clinical presentation cases. Therefore, we used a custom, targeted next generation sequencing (NGS) chromatinopathies genes panel to screen RSTS patients who resulted negative for mutation in CREBBP and EP300. We identified five different novel pathogenetic variants in KMT2A. Mutations in this gene, coding for a member of the Lysine methyltransferase 2 family cause the Wiedemann-Steiner syndrome (WDSTS, OMIM #605130), a rare chromatinopathy characterized by hypertrichosis cubiti, short stature, typical facial features, and intellectual disability. The identified mutations are de novo and unreported, but indiscernible for type and localization from mutations described in WDSTS patients. The clinical re-evaluation shows that patients display the typical RSTS features but also some WDSTS specific signs with a peculiar global clinical presentation. In summary, using a NGS-dedicated approach, we found that some RSTS patients resulted to be carriers of mutations in another chromatinopathy gene, namely KMT2A, suggesting that different mechanisms leading to imbalance of chromatin opening/closing can converge to a similar phenotype.

COD. P083

Molecular diagnosis of a complex case of arthrogryposis: an effective strategy relying on the combination of different analysis methods.

G. Marangi¹, S. Frangella¹, D. Orteschi¹, P.N. Doronzio¹, M. Pane², M. Zollino¹, E. Mercuri²

¹*Istituto di Medicina Genomica, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Roma, Università Cattolica del Sacro Cuore*

²*Istituto di Neuropsichiatria Infantile e Centro Clinico Nemo, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Roma, Università Cattolica del Sacro Cuore*

Arthrogryposis displays great clinical and genetic heterogeneity.

We report a 15-year-old patient with a congenital form of distal arthrogryposis and normal intellectual development. Pregnancy was characterized by oligoamnios. Contractures were noted early after birth on neck, elbows, hands, hips, knees and feet, with pterygia of neck and hands. She experienced a rapidly worsening scoliosis resulting in respiratory difficulties. MRI of muscles, bones and soft tissues revealed a widespread and symmetrical muscle hypotrophy.

Several unsuccessful genetic tests had been performed before. On array-CGH, a 170 kb duplication of 2q36.3, inherited from the healthy father, was detected. Gene content was unremarkable.

We performed clinical exome analysis (SureSelect Focused Exome, Agilent Technologies). No convincing causative variants in coding regions were identified. We subsequently considered intronic variants that were predicted to impair splicing. An apparently homozygous intronic variant was detected in the ECEL1 gene (OMIM:*605896), which was recently associated with AR distal arthrogryposis: NM_004826: c.1507-9G>A.

Then we performed high-resolution (HR) array-CGH (SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 2x400K, Agilent Technologies) and real-time PCR on genomic DNA from the familial trio. By combining results of all the molecular techniques along with the clinical phenotype, we could observe:

- 1) A 10 kb deletion on 2q26.3 limited to the whole coding region of ECEL1 in the father, suspected after sequencing and HR-array-CGH and confirmed by real-time PCR. Of interest, this small deletion was not contiguous to the duplication detected by array-CGH, but very close by, about 2 Mb apart;
- 2) A heterozygous intronic variant of ECEL1 in the mother. This variant was predicted to create a new splice site, abolishing the standard one;
- 3) The patient was compound heterozygous for the two different variants in ECEL1: the paternal gene deletion and the maternal splice site variant;
- 4) The clinical phenotype in our patient was fully consistent with the AR ECEL1-related distal form of arthrogryposis.

This report highlights the usefulness of integrating different analysis techniques in dissecting complex genetic variants.

COD. P084

Multilocus Inherited Neoplasia Alleles Syndrome (MINAS) o doppia sindrome da predisposizione oncologica: quando sospettarla nella pratica clinica?

E. Lucci Cordisco¹, A. Vaisfeld¹, F. Brugnoletti¹, S. Amenta¹, R. Pietrobono¹, M.G. Pomponi², M. Genuardi^{1,2}

¹*Istituto di Medicina Genomica, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Roma-Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

²*Servizio di Genetica Medica, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Roma*

Le condizioni di predisposizioni a neoplasia sono rare, ma la problematica nel complesso è relativamente comune, interessando circa il 5-10% dei tumori nella popolazione. L'impiego di pannelli multigenici ha consentito di individuare in circa il 3% dei soggetti analizzati varianti patogenetiche (VP) in più geni di predisposizione oncologica, condizione definita MINAS (Multilocus Inherited Neoplasia Alleles Syndrome). L'analisi retrospettiva del fenotipo ha evidenziato la presenza di un quadro clinico atipico o complesso in alcuni di questi pazienti. Nella nostra casistica di pazienti con sospetto di neoplasia ereditaria abbiamo individuato 5 nuovi pazienti con MINAS. In 2 era coinvolto il gene NF1: la diagnosi di neurofibromatosi era stata formulata su base clinica, mentre la seconda VP è stata ricercata in seguito rispettivamente al precedente riscontro in un familiare (gene RET) e all'insorgenza di cancro del colon giovanile (gene MSH2) nell'altro caso, un paziente con storia di sarcomi primitivi multipli. Negli altri 3 casi erano coinvolti i geni BRCA1 o BRCA2: 1) una paziente con tumore mammario giovanile e storia familiare positiva (BRCA1 e BRCA2); 2) un paziente con storia familiare di tumore della mammella maschile e storia personale di tumore del colon e del pancreas associati a manifestazioni cutanee (BRCA2 e PTEN) 3) una famiglia con storia di tumore mammario giovanile (VP BRCA1), tumore renale e cisti polmonari (VP FLCN), nella quale è stata individuata una donna portatrice delle due VP senza manifestazioni cliniche all'età di 51 anni. In 4 pazienti la ricerca della doppia VP è stata motivata dalla storia clinica, in 1 (BRCA1 e BRCA2) incidentale. Questi dati suggeriscono che l'eventuale presenza nello stesso soggetto di VP in più geni debba essere attivamente ricercata in pazienti con quadro clinico caratterizzato dalla associazione di neoplasie atipiche o quadro clinico complesso e/o storia familiare positiva per neoplasie suggestiva di più condizioni predisponenti. Il quadro clinico può essere rappresentato dalla sommatoria delle caratteristiche di ciascuna delle singole condizioni, o da manifestazioni atipiche e/o più gravi legate ad effetti moltiplicativi dell'interazione tra le due VP, come nel caso del paziente con NF1 e sindrome di Lynch.

COD. P085

Oocyte aging alters the expression of NAD⁺ pathway genes

M. D'Aurora^{1,2}, S. Franchi^{1,2}, G. Di Emidio³, C. Tatone³, P.G. Artini⁴, L. Stuppia^{1,2}, V. Gatta^{1,2}

¹*Department of Psychological, Health and Territorial Sciences, School of Medicine and Health Sciences, "G.d'Annunzio" University, Via Dei Vestini 31, 66100, Chieti, Italy*

²*Molecular Genetics, Unit, CeSI-Met, Via Luigi Polacchi 1, 66100, Chieti, Italy*

³*Department of Life, Health and Environmental Sciences, University of L'Aquila, 67100 L'Aquila, Italy*

⁴*Division of Obstetrics and Gynecology, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Pisa, Pisa, Italy*

The NAD⁺ is a mediator of many redox processes, having a key role for the regulation of enzymes NAD⁺ - dependent such as sirtuins. Aging reduces NAD⁺ levels and a gradual accumulation of damage by free radicals along with a reduced detoxifying capacity has been considered the major mechanisms underlying ovarian aging or post-ovulatory aging. Evidences show that the aging process is regulated by a continuous crosstalk between reactive oxygen species (ROS) and NAD⁺ pathway. The aim of this study was to assess the expression modification in the oocyte NAD⁺ pathway induced by ovarian aging or post-ovulatory aging. 41 genes participating in the NAD⁺ pathways have been investigated by q-RT-PCR in mice MII oocytes. The oocytes were grouped as follow: Young T0 (oocytes from young mice), Old T0 (oocytes from reproductively aged mice) and Young T24 (oocytes from young mice cultured 24 hours in vitro). RNA was obtained from each sample by Arcturus PicoPure Kit (ThermoFisher Scientific), and reverse transcribed by the High Capacity RNA-to-cDNA kit (ThermoFisher Scientific). Each cDNA has been analysed in triplicate by employing a NAD Metabolism H41 Predesigned panel for use with SYBR[®] Green, containing 41 genes of the NAD pathway, 2 housekeeping genes and 6 control probes. Raw data have been analysed by DataAssist software. Results showed the differential modulation of 24 transcripts when comparing Young T24 and Young T0, revealing a general expression up-regulation, including Sirtuin1 and 2. The comparison between Old T0 and Young T0 highlighted the differential down-expression of 26 out 30 transcripts, and the up-regulation of 4 genes, including sirtuin 1 and 5. Data suggest that both reproductive aging and post-ovulatory aging affect NAD⁺ pathway, showing different responses to OS. Oocytes from reproductively aged mice seem unable to activate protective mechanisms against OS, likely having reduced mitochondrial activity as well as reduced energy homeostasis. Post-ovulatory aged oocytes seem to strongly react against OS increasing ROS production, which in turn may reduce oocyte quality. These data highlight the correlation between the aging processes and NAD⁺ pathway alteration, suggesting that the modulation of NAD⁺ activity may be an "anti-aging" strategy.

COD. P086

Array-CGH analysis in patients with Childhood Apraxia of Speech: prevalence of copy number variants and new possible candidate-genes

I. Ricca¹, C.F. De Pasquale², S. Giglio^{3,4}, M. Pantaleo⁴, S. Guarducci⁴, F. Moro¹, A.M. Chilosi², F.M. Santorelli¹

¹*Molecular Medicine, IRCCS Stella Maris, Pisa*

²*Neuroscience Department, IRCCS Stella Maris, Pisa*

³*Department of Biomedical Experimental and Clinical Sciences "Mario Serio", University of Florence, Florence*

⁴*Medical Genetics Unit, Meyer Children's University Hospital, Florence*

Introduction

Childhood Apraxia of Speech (CAS) is a rare neurodevelopmental disorder defined by the impairment of precision and consistency of movements underlying speech in the absence of neuromuscular deficits. The etiology in CAS remains largely unclear but epidemiological studies suggest strong genetic basis. For a long time, only mutations in FOXP2 and few microdeletions (mostly involving 16p11, 2p16 and 12p13 regions) were associated with CAS. Recently, next-generation sequencing has discovered new possible causative genes. We applied array-CGH (aCGH) in CAS to study the prevalence of genomic rearrangements in affected subjects and define new possible candidate-genes.

Methods

We studied 109 Italian children with a diagnosis of CAS. Patients were divided in two subgroups, Complex (C-CAS) and Idiopathic CAS (I-CAS), defined respectively by the presence or absence of associated syndromic features and/or additional neurodevelopmental disorders. Seventy-six patients were classified as I-CAS and 33 as C-CAS. Male-to-female ratio was 4.5:1. aCGH was performed through the Agilent 60K oligonucleotide platform. CNVs were interpreted following the ACMG guidelines.

Results and conclusions

aCGH revealed CNVs in 40% of patients (35.5% of I-CAS and 51.5% of C-CAS) with a diagnostic yield of 22%. About 54% of CNVs were classified as causative (C-CNV) with no clear-cut differences between C-CAS and I-CAS. In the group of C-CNVs, the men-to-women ratio was 2.4:1. C-CNVs were de novo in 66.7% of women whereas in men we found only 45.5% C-CNV arising de novo, with 36.4% being maternally inherited. With the exception of 16p11.2 deletion, detected in 19% of the positive patients (all I-CAS), we did not find recurrent CNVs. The remaining C-CNVs in the I-CAS group involved genes or chromosomal regions already associated with intellectual disability (ID) or autism (ASD). In conclusion, we show that aCGH in CAS has a high diagnostic yield, with detection of C-CNVs and a men-to-women ratio similar to other neurodevelopmental disorders, both in complex and idiopathic cases. We demonstrated that the most prevalent CNV in I-CAS is the 16p11.2 deletion. Moreover, we found that genes mainly involved in synaptic plasticity and already implicated in ASD/ID could be relevant to I-CAS.

COD. P087

Integrative multi-omic analysis identify new drivers and pathways in molecularly distinct subtypes of ALS

G. Morello¹, M. Guarnaccia¹, A.G. Spampinato¹, S. Salomone², V. D'Agata³, F.L. Conforti¹, E. Aronica^{4,5}, S. Cavallaro¹

¹*Institute of Neurological Sciences (ISN), Italian National Research Council (CNR), Catania and Mangone (CS), Italy*

²*Department of Biomedical and Biotechnological Sciences, Section of Pharmacology, University of Catania, Catania, Italy*

³*Department of Biomedical and Biotechnological Sciences, Section of Human Anatomy and Histology, University of Catania, Catania, Italy*

⁴*Department of NeuroPathology, Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands*

⁵*Swammerdam Institute for Life Sciences, Center for Neuroscience; University of Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands*

Developing a robust molecular disease profiling that can explain the complexity and heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is fundamental to better understand its causes and develop an effective treatment. We recently demonstrated the existence of unique brain transcriptome signatures stratifying sporadic ALS (SALS) patients into two distinct subgroups. However, the elucidation of these subgroups and their molecular drivers requires integrated views of multiple high dimensional molecular data. Here, we used a custom-made array comparative genomic hybridization (aCGH) targeting clinically relevant genes for ALS and other neurological diseases to characterize copy number variants (CNVs) in motor cortex samples of SALS patients. A large number of novel or known disease-associated genomic aberrations were detected, including several subgroup-specific CNV loci. Further integrative analysis with gene expression data from the same patients revealed that 71.2% of CNV-driven genes significantly overlapped with those obtained from the expression profiling, the majority of which with a positive correlation, suggesting a strong interaction between genetic and transcriptome events in ALS pathogenesis. Interestingly, most CNV-driven genes were cluster specific and their biomarker/target assessment identified 24 potential candidates (6 in SALS1 and 18 in SALS2) for genomic-based patient stratification. Functional analysis confirmed our previous pathway-based characterization of SALS subtypes and identified three network hub genes (UBA52, RPS27A and HIST2H3A), implying their pivotal role in the pathophysiology of ALS. To our knowledge, this is the first comprehensive “omics” analysis of molecular events characterizing SALS pathology, providing a road map to facilitate genome-guided personalized diagnosis and treatments for this devastating disease.

COD. P088

Microdelezioni in 8p23.2-pter in pazienti con disordini del neurosviluppo: definizione di una nuova sindrome a penetranza incompleta ed espressività variabile.

I. Catusi¹, M.P. Recalcati¹, M. Garzo¹, C. Valtorta¹, M.P. Canevini^{2,3}, E. Grosso⁴, M. Malacarne⁵, V.G. Naretto⁴, A. Peron^{2,3,6}, M. Piccione⁷, M. Saccani⁸, A. Zonta⁴, L. Larizza¹, D. Giardino¹

¹*Laboratorio di Citogenetica Medica, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano, Italia*

²*Unità di Neuropsichiatria Infantile – Centro Epilessia (NPI-CRE), ASST-Santi Paolo e Carlo, Milano, Italia*

³*Dipartimento di Scienze della Salute, Università di Milano, Milano, Italia*

⁴*SC Genetica Medica U, AOU Città della Salute e della Scienza di Torino, Italia*

⁵*S.C. Laboratorio Genetica Umana - E.O. Ospedali Galliera, Genova, Italia*

⁶*Department of Pediatrics, Division of Medical Genetics, University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, UT, USA*

⁷*Dipartimento Materno Infantile - Università di Palermo, Palermo, Italia*

⁸*Unità di Neuropsichiatria Infantile (NPI), ASST-Santi Paolo e Carlo, Milano, Italia*

Delezioni della regione distale del cromosoma 8p sono frequentemente riportate in letteratura come sbilanciamenti isolati o associati a duplicazioni più prossimali. All'interno della regione deleta è stata considerata l'esistenza di una regione critica (RC) localizzata in 8p23.2pter, associata a disabilità intellettiva (DI)/ritardo dello sviluppo (RS), disturbo dello spettro autistico (DSA) e microcefalia. I principali geni candidati sono DLGAP2, CLN8, ARHGEF10 e CSMD1.

Delezioni della sola regione 8p23.2pter non sono presenti nel Database delle Varianti Genomiche; ad oggi in letteratura ne sono riportate 5 con dimensioni comprese tra 2 e 6 Mb e in Decipher 6 con dimensioni tra 100 kb e 5 Mb. Prevalentemente gli sbilanciamenti sono de novo, ma sono stati descritti rari casi in cui la microdelezione è stata ereditata da un genitore apparentemente sano.

In questo lavoro presentiamo 3 nuovi pazienti con microdelezioni della sola regione 8p23.2pter: un ragazzo con microdelezione di 4,55 Mb, DI/RS, microcefalia e IV dito del piede sinistro più corto; un ragazzo con microdelezione di 2,21 Mb, RS, DSA e clinodattilia bilaterale del V dito; un adulto con microdelezione di 123 kb affetto da ritardo neuropsicomotorio ed epilessia. Quest'ultimo paziente presenta la microdelezione più piccola mai riportata in letteratura coinvolgente i soli geni CLN8 e ARHGEF10. L'origine familiare della microdelezione è stata valutata in 2 pazienti su 3 ed è risultata in un caso ereditata dal padre, con ritardo del linguaggio e balbuzie, e nell'altro presente nel fratello apparentemente sano.

Il confronto combinato del genotipo e del fenotipo dei pazienti qui descritti con quello dei pazienti precedentemente riportati in letteratura e in Decipher permette di caratterizzare meglio la RC precedentemente proposta, di restringere il numero di geni candidati al fenotipo neurologico e di ipotizzare l'esistenza di una nuova sindrome da microdelezione in 8p23.2pter, a penetranza incompleta ed espressività variabile, associata a disordini del neurosviluppo.

COD. P089

Mitochondrial alterations are druggable target in Down syndrome

N. Mollo¹, A. Izzo¹, M. Nitti¹, S. Paladino¹, C. Procaccini², D. Faicchia², G. Cali², F. Bonfiglio³, R. Cicatiello¹, A. Secondo⁴, P. Pinton⁵, G. Matarese², R. Genesisio¹, A. Conti¹, L. Nitsch¹

¹*Dept of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, Uni of Naples Federico II, Naples*

²*IEOS, CNR, Naples*

³*Dept of Biosciences and Nutrition, Karolinska Inst NOVUM, Halsovagen, Huddinge*

⁴*Dept of Neuroscience, Reproductive and Odontostomatological Sciences, Uni of Naples Federico II, Naples*

⁵*Dept of Experimental and Diagnostic Medicine, Univ of Ferrara, Ferrara*

It has been suggested that the mitochondrial dysfunction observed in chromosome 21 trisomic cells and tissues contributes to Down syndrome (DS) pathogenesis. We have observed in trisomic cells a severe mitochondrial dysfunction, notably a significant disruption of mitochondrial dynamics with increased fragmentation of the mitochondrial network and decreased expression of fusion-inducing genes. The analysis of molecular mechanisms responsible for these events highlighted that the activity of the transcriptional coactivator PGC-1 α , a master regulator of mitochondrial biogenesis, was decreased in DS due to the overexpression of the chromosome 21 gene NRIP1/RIP140. We tested the hypothesis that the induction of the PGC-1 α pathway might be able to reverse the mitochondrial phenotype in DS. To this end we induced PGC-1 α in trisomic fetal fibroblasts using two strategies: i) we used metformin, which stimulates PGC-1 α through AMPK and SIRT1 activity; ii) we activated PGC-1 α through the PPAR agonist pioglitazone. We demonstrated that both drugs restore mitochondrial phenotype in trisomic cells. After 72 hours of treatment the expression of PGC-1 α and of its target genes increased together with mitochondrial respiration while ROS production decreased. Most interestingly, both drugs affected mitochondrial dynamics inducing the formation of a mitochondrial network with branched and elongated tubular morphology. Accordingly, the expression of genes of the fusion machinery, namely OPA1 and MFN2, was increased by both treatments. Also the mitophagy process, which clears dysfunctional and redundant mitochondria, might be compromised in DS. The recovery of mitochondrial network after the treatment with the drugs might be induced by the clearance of damaged mitochondria. We are, therefore, investigating a possible association between mitochondrial dynamics and mitophagy in trisomic cells. Damaged mitochondria were observed in LC3-coated autophagic structures where they are likely degraded. Counteracting mitochondrial dysfunction and removing damaged mitochondria could represent therapeutic opportunities to prevent or to slow down disease progression in DS as well as in other age-related neurodegenerative disorders.

COD. P090

MiR-423 analysis and risk stratification of patients with coronary artery disease: a new epigenetic finding for a personalized medicine

B. Rizzacasa¹, E. Morini¹, R. Mango², C. Vancheri¹, S. Budassi², G. Massaro², S. Maletta¹, M. Macrini², S. D'Annibale³, F. Romeo², G. Novelli¹, F. Amati¹

¹*Dept. of Biomedicine and Prevention, University of Rome Tor Vergata, Via Montpellier, 1, Rome, Italy*

²*Complex Operative Unit of Cardiology (UOC), Policlinico Tor Vergata, Via Montpellier, 1, Rome, Italy*

³*Dept. of System Medicine, University of Rome Tor Vergata, Via Montpellier, 1, Rome, Italy*

Atherosclerosis, a chronic inflammatory vascular disease characterized by the formation of plaques on the inner walls of arteries, represents the main causes of coronary artery disease (CAD). An individual's risk of developing CAD and acute myocardial infarction (AMI) is modulated by an interplay between genetic and lifestyle factors. Although many genomic loci associated with CAD and AMI have been already identified together with some epigenetic factors, an early prediction of AMI is still not possible. Thus, effective biomarkers predicting the occurrence of AMI are of great importance for a clinical and therapeutic standpoint. Our goal is to identify new circulating miRNAs as acute myocardial infarction biomarkers. Using an array-based approach, we profiled the expression of 84 circulating miRNAs in pooled serum samples (n=5) of CAD and AMI patients. For CAD group, one blood sample was collected at the time of hospitalization; for AMI group, one blood sample was collected within 24 hours (AMI_T0) from AMI event. The array experiments showed 27 miRNAs differentially expressed with a two-fold up- or down-regulation (10 up- and 17 down-regulated miRNAs). Among them, miR-423-5p is the only miRNA with a significant differential expression in all the recruited patients (n=99 patients, including 61 patients with stable CAD and 38 patients with acute myocardial infarction). MiR-423-5p resulted significantly down-regulated within 24 hours from the AMI event (FC=-2, p<0.05). Interestingly, circulating miR-423-5p expression resulted increased in a subgroup of the same AMI patients (AMI_T1; n=11) after 6 months from the acute event (FC=+2; p<0.005). Noteworthy, miR-423-5p expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) confirmed its up-regulation at 6 months follow-up. Receiver operating characteristic (ROC) analyses showed an important potential for miR-423-5p in the discrimination of these stable and unstable CAD patients, particularly in PBMCs, where miR-423-5p is able to discriminate AMI_T1 from AMI_T0 and CAD patients, indicating that miR-423-5p may represent an epigenetic feature of patients prone to develop AMI. Our results suggest that the evaluation of miR-423-5p expression level could represent a new biomarker for risk stratification of CAD patients.

COD. P091

Determinazione della ploidia embrionale con un protocollo combinato di SNP array e NGS per il recupero clinico di blastocisti derivanti da fecondazione anomala

V. Romanelli¹, C. Patassini¹, L. Girardi¹, M. Fabiani¹, D. Cimadomo², L. Rienzi², F.M. Ubaldi², L. Navarro Sánchez³, C. Rubio³, A. Capalbo^{1,3}

¹*Igenomix Italia, Marostica (VI), Italia*

²*GENERA, Centro di Medicina della Riproduzione, Roma*

³*Igenomix, Valencia, Spagna*

(AFO), tali embrioni non vengono quindi trasferiti per aumentato rischio di aploidia (zigoti con un singolo pronucleo: 1PN) o poliploidia (zigoti con più di due pronuclei: 2.1PN o 3PN). Nel 2017 (Capalbo et al., Fertil Steril), viene descritto un protocollo che permette di determinare la ploidia di embrioni derivanti da AFO sulla stessa biopsia utilizzata per il test genetico preimpianto per aneuploidie cromosomiche (PGT-A). Visto l'esito positivo del recupero clinico di embrioni derivati da AFO, abbiamo messo a punto un metodo maggiormente efficace per rilevare la ploidia, basato su tecnologia SNParray e Next-Generation Sequencing (NGS) per eseguire, sulla stessa singola biopsia, PGT-A. L'analisi prevede la determinazione della ploidia dal dato di frequenza allelica (B Allele Frequency, BAF). Viene infatti valutato il rapporto allelico con piattaforma SNP array (NextSeq550, Illumina) analizzando 300,000 loci altamente polimorfici. Poi, in caso di risultato diploide, il prodotto di WGA del campione viene utilizzato per realizzare PGT-A con NGS ReproSeq su piattaforma Ion Torrent S5 (ThermoFisher). Al momento della stesura di questo abstract, sono stati analizzati 9 campioni a ploidia e cariotipo noti: 5 embrioni con fecondazione normale (2PN) e 4 embrioni da AFO, due 1PN, un 3PN e un 2.1PN. Gli embrioni a fecondazione normale sono risultati diploidi, i 2 embrioni AFO 1PN aploidi, mentre il 3PN e il 2.1PN triploidi. Attraverso la valutazione del rapporto allelico, possiamo confermare la ploidia di tutti i campioni. Inoltre, sul restante prodotto di WGA dello SNP array, è stata eseguita la PGT-A con NGS e il risultato è consistente con la diagnosi di aneuploidia attesa, ottenuta con qPCR. I risultati ottenuti mostrano che il nostro procedimento per analizzare embrioni AFO permette di valutare, sulla stessa biopsia, la ploidia con SNP array e l'assetto cromosomico con NGS. A seguito di estesa validazione del metodo, si potrà procedere con la sua implementazione clinica. La possibilità di valutare la ploidia ed eseguire PGT-A sulla stessa biopsia di trofoectoderma di embrioni derivati da AFO, permetterà il recupero clinico di embrioni altrimenti considerati non trasferibili.

COD. P092

Diagnosi prenatale precoce di malattie rare monogeniche mediante celocentesi

A. Giambona¹, F. Leto¹, C. Passarello¹, M. Vinciguerra¹, M. Cannata¹, F. Cassarà¹, M. Piccione³, M. Orlandi², G. Schillaci², V. Cigna², F. Picciotto², G. Damiani², A. Maggio

¹AOR Villa Sofia Cervello, Palermo. UOC Ematologia per le malattie rare del sangue, Laboratorio di Diagnostica Molecolare Malattie Rare del sangue

²AOR Villa Sofia Cervello, Palermo. UOS di Diagnosi Prenatale

³AOR Villa Sofia Cervello, Palermo. UOS Genetica Medica

Le procedure convenzionali di diagnostica prenatale per malattie monogeniche sono la villocentesi e l'amniocentesi raccomandate, rispettivamente, dopo la XI e la XVI settimana di gestazione, per l'aumentato rischio di aborto e sviluppo di difetti negli arti. Alternativa a tali procedure è la celocentesi eseguibile alla VIII settimana di gestazione. La cavità celomatica raggiunge la massima dimensione all'interno del sacco gestazionale tra la VII e la VIII settimana e scompare intorno alla XII. Il liquido celomatico (LC), contiene cellule di origine fetale. Lo scopo del nostro studio è stato valutare la fattibilità e l'attendibilità diagnostica della celocentesi per malattie rare monogeniche. 1 mL di LC è stato prelevato per via trans-vaginale sotto costante controllo ecografico a 135 donne volontarie richiedenti IVG, a 435 donne a rischio per emoglobinopatie, a 2 donne per S. di Cockayne ed 1 donna per Esostosi Multipla. Il primo obiettivo è stato l'identificazione delle cellule fetali presenti nel LC ed il loro isolamento per superare la problematica della contaminazione materno-fetale presente in oltre il 70% dei LC. Le cellule fetali maggiormente rappresentate erano grossi eritroblasti dotati di nucleo addossato alla parete cellulare. Le cellule sono state selezionate mediante micromanipolatore ed il DNA estratto. Il campione è stato controllato con QF-PCR per valutare la presenza di contaminazione materna dopo l'isolamento delle cellule fetali e successivamente è stata eseguita la ricerca dei difetti molecolari di cui i genitori erano portatori. Il 22,5% dei feti analizzati sono risultati affetti per patologia. Nonostante l'alto numero di campioni contaminati, la fattibilità diagnostica è risultata del 99,5% mentre l'attendibilità diagnostica è stata del 100%. Quest'ultimo dato è stato ricavato dall'analisi dei tessuti abortivi, nel caso in cui le donne hanno interrotto la gravidanza in quanto il feto era risultato affetto, mediante amniocentesi di controllo richiesta nel caso di feti non affetti o dopo la nascita. La celocentesi è una tecnica attraente come diagnosi prenatale precoce per il basso rischio di aborto e l'elevata accettabilità, come dimostrato da un numero crescente di richieste di accesso alla procedura dall'Italia e dalla Comunità Europea.

COD. P093

Diagnosis for 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 deficiency in a Italian family by non invasive prenatal testing (NIPT) and whole exome sequencing (WES)

L. De Falco¹, G. Savarese¹, C. Piscopo², R. Ruggiero¹, P. Savarese¹, E. Evangelista¹, L. D' Amore¹, R. D' Angelo¹, T. Suero¹, C. Ramiro¹, A. Di Carlo¹, G. Furino¹, I. Pisano¹, C. Vicedomini¹, A. Fico¹

¹Lab. di Genetica Medica, Ames-Centro Polispecialistico Strumentale, srl, Naples, Italy

²U.O.C. Genetica Medica e di Laboratorio, AORN A. Cardarelli, Naples, Italy

17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (HSD17B3) isoenzyme is present almost exclusively in the testes and converts Delta 4-androstenodione (D4) to testosterone. Mutations in the HSD17B3 cause HSD17B3 deficiency and result in 46,XY Disorders of Sex Development (46,XY DSD). Since its introduction into clinical practice in 2011, non-invasive prenatal testing (NIPT) which use massively parallel sequencing analysis of cell-free fetal DNA (cffDNA) in maternal plasma, is widely used to detect the most common autosomal, including trisomy 21 (T21), trisomy 13 (T13), and trisomy 18 (T18), and sex chromosome aneuploidies. Here we describe a case of discrepancies between NIPT and ultrasound based fetal sex determination that was helpful in the prenatal diagnosis of abnormalities affecting the genitalia. A Caucasian pregnant woman of 25 years old was at 12+2 weeks of gestation when non invasive prenatal test (NIPT) was performed. NIPT analysis did not detect trisomy in chromosome 21, 18, 13 and the presence of a Y chromosome was also reported. During a follow up ultrasound examination at 18 weeks, the external genitalia was consistent with a female. Because a discordance occurred between NIPT results and ultrasound sex determination a second cffDNA was performed at 20 weeks of gestation, but the presence of Y chromosome was confirmed. QF-PCR on amniotic liquid showed a profile consistent with a fetus disomic for 13,18,21 and X and confirmed the finding of a Y chromosome. Also prenatal chromosomal analysis showed a female with a normal karyotype confirming NIPT and QF-PCR results. Targeted exome sequencing was performed on the cffDNA, amniotic liquid, and the parents. Libraries were generated according to manufacturer's protocols using TruSight One kits (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Sequencing was carried out on NEXT Seq 500 (Illumina) to mean sequencing depth of at least 100x. The finding of a homozygous mutation (c.645 A>T, p. Glu215Asp) in HSD17B3 gene in amniotic liquid as well as in cffDNA supports the hypothesis of a male pseudohermaphroditism. Both consanguineous parents were heterozygous for the mutation. Also, using cffDNA we developed a new method that identifies variations of known genes by a noninvasive approach. Also, using cffDNA we developed a new method that identifies variations of known genes by a noninvasive approach. In conclusion combining targeted MPS and NIPT in clinical practice could allow for more reliable gene diagnosis, improved genetic counseling, and personalized clinical management of patients.

COD. P094

FINDING MISSING DIAGNOSES FOR RARE DISEASES BY AN INTEGRATED GENOMIC APPROACH

P. Carrera^{2,3}, G. Pipitone², G. Torini¹, S. Merella², G. Melloni², A. Russo Raucchi², M.G. Patricelli², M. Ferrari^{1,2,3}

¹*University Vita-Salute San Raffaele, Milano*

²*Clinical Molecular Biology and Cytogenetics Laboratory, IRCCS San Raffaele Hospital, Milano*

³*Unit of Genomics for human disease diagnosis, Division of Genetics and Cell biology, IRCCS San Raffaele Hospital, Milano*

Rare diseases, defined as those affecting less than 1:2000 individuals, are estimated to be 7.000, about 80% being of genetic origin. The majority of rare diseases are multisystemic, involving defects in structure or physiology, with many disease-causing genes still unknown. Finding a diagnosis for rare diseases by classical clinical approaches may be challenging, because of the genetic and phenotypic variability, leaving a large portion of patients undiagnosed. Genomics and whole exome/genome sequencing has improved the potential of obtaining a diagnosis allowing for an agnostic approach. Nevertheless, establishing the consequence of the gene variants is still a challenge due to our limited knowledge and to the high number of variants. With the aim to resolve undiagnosed cases suspected for a genetic condition, we set up a cross-disciplinary protocol integrating i) a comprehensive phenotyping based on clinical and instrumental data and classified with the Human Phenotype Ontology (HPO) descriptors; ii) a family based study (parents and affected subject; parents and affected siblings); iii) application of clinical exome (CE) or whole exome sequencing (WES); selection and use of a bioinformatic framework for integration of data, prioritization of genetic variants and selection of candidate modifiers. We present the results obtained in three families, each emblematic of a particular condition: i) a de-novo truncating mutation in ARID1B, a known disease-gene for Coffin-Siris syndrome; ii) two novel missense variants in LRP2, a known disease-gene for the rare Facio-Oculo-Acoustico-Renal (FOAR) syndrome; iii) two new variants in CRBN for a very rare monogenic form of Intellectual Disability, the 4th documented case so far. Especially in the two syndromic phenotypes, our findings oriented clinical examinations for confirmation of the diagnosis ending up the patients' clinical odyssey; in the monogenic phenotype functional studies are needed in order to confirm our results.

COD. P095

Integrative approach by omic-analysis to discovery genetic biomarker of severe forms of Incontinentia pigmenti

F. Fusco¹, V. Valente¹, D. Fergola¹, A. Pescatore¹, M.B. Lioi², M.V. Ursini¹

¹*Institute of Genetics and Biophysics "A. BuzzatiTraverso" CNR, Italy*

²*University of Basilicata, Potenza 85100, Italy*

The heterogeneity of clinical manifestations in patients affected by Incontinentia Pigmenti (IP, MIM308300), a rare X-linked dominant disorder of neuroectoderm, determines the need to search for molecular genetic markers of the disease to form personalized therapeutic strategies. Although the IP is caused by mutations of a unique gene, NEMO/IKBKG, encoding for an essential regulator of NF- κ B pathway activation, the development of the disease is extremely variable: the 30% manifests neurologic (starting with neonatal seizures) and/or eye defects (retinal detachment) apparently not related to specific NEMO alterations. Additional genetic variants may contribute to the heterogeneity of this disease. To identify altered variations/genes/pathways that may affect the severity of IP disease, we used a OMIC-strategy: target exome sequencing of one candidate pathway and whole exome and transcriptome sequencing in a cohort of IP cases. All IP cases belonged to our BBMRI-IPGB biobank, and all carried the same NEMO mutation. We sequenced 79 IP cases (clinically assigned to two groups: IP severe and mild) by HaloPlex-panel of genes of metabolic pathways, and three IP severe cases by exome and transcriptome sequencing in primary fibroblast cell from severe cases. Association studies by using data from the omic-approach are in progress and will be integrated to identify the affected pathways.

COD. P096

ITALIAN REGISTRY OF MULTIPLE EXOSTOSES (REM): A USEFUL TOOL TO INVESTIGATE DISEASE PROGRESSION DURING CHILDHOOD

M. Mordenti¹, D. Grogan², M. Boarini¹, E. Pedrini³, M. Gnoli³, M. Tremosini³, D. Antonioli⁴, R. Gossen², L. Sangiorgi¹

¹*Medical Genetic Department & CLIBI Laboratory, IRCCS Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna, Italy*

²*Clementia Pharmaceuticals, Montreal, Canada*

³*Medical Genetic Department, IRCCS Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna, Italy*

⁴*Ward of Paediatric Orthopaedics and Traumatology, IRCCS Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna, Italy*

Multiple Osteochondromas (MO) is an autosomal dominant disorder caused by mutations on EXT1/2 genes. The key sign is osteochondroma (OC), a cartilage-capped bone protrusion on long bones. OCs are rarely present at birth and grow in number and size during childhood, leading to huge clinical heterogeneity. Mild forms are treated by palliative management of symptoms, while surgery is the primary choice for severe ones. Since 2003, Medical Genetics Department (MGD) of Istituto Ortopedico Rizzoli (IOR) has collected data on MO and in collaboration with CLIBI Lab, has established the Registry for Multiple Exostoses, that stores personal data, clinical features, surgery details supporting clinical practice and research. This study, investigating epidemiology and natural history of MO, aims to support the design of a clinical trial for treatment of MO children with palovarotene (PVO), a retinoic acid receptor γ agonist that inhibits spontaneous heterotopic ossification. 158 subjects with at least 1 follow-up were evaluated by age (0-6, 7-12, 13-18 years) and overall. The mean diagnosis age is 4.2 years, while age at first OC is 3.5. By month 12, 28.5% have developed at least 1 new OC. The overall incidence at months 24 (39.9%) and 36 (50%) increases. The mean number of new OCs is ~5. At baseline deformities were observed in 31.3% of 0-6 years patients compared to ~50% in other groups. Considering all 55.8 months of follow-up, the mean number and rate of new deformities is greater in younger groups. Limitations were rarely reported at baseline (~16% of patients) and the mean number and the rate of new limitations over the follow-up were similar across age. The overall incidence of surgeries prior to baseline visit was 10.1%; the incidence increased as patients aged (~5%, 10%, 33%). OCs excision is the most common procedure. At baseline, 57.9% of patients are in IOR Class I, 27.4% in Class II and 14.7% in III, while at follow-up the distribution changed in 23.4% for class I, 47.5% for II and 29.1% for III. From the collaboration among MGD and Clementia, useful information arose on natural history of MO in children. Those results were crucial to draft a PVO treatment protocol that has been positively evaluated by FDA and EMA, so that the clinical trial process is ongoing.

COD. P097

NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS) PER IL TEST GENETICO PREIMPIANTO PER ANEUPLOIDIE CROMOSOMICHE (PGT-A): VALUTAZIONE DI ANEUPLOIDIE SEGMENTALI

L. Girardi¹, V. Romanelli¹, C. Patassini¹, M. Fabiani¹, D. Zuccarello², D. Cimadomo³, E. Albani⁴, L. Rienzi³, P.E. Levi Setti⁴, F. Ubaldi³, A. Capalbo^{1,5}

¹*Igenomix Italia, Marostica*

²*Università degli Studi di Padova*

³*Clinica Valle Giulia, G.EN.E.R.A. - Centre for Reproductive Medicine, Roma*

⁴*Istituto Clinico Humanitas, Rozzano*

⁵*Igenomix, Valencia, Spagna*

La tecnologia NGS su piattaforma Ion Torrent™ Ion S5 (ThermoFisher SCIENTIFIC) è stata implementata presso il laboratorio Igenomix Italia per eseguire test genetici pre-impianto per aneuploidie cromosomiche (PGT-A). L'aumento delle capacità di risoluzione della nuova piattaforma consente, non solo una migliore rilevazione delle aneuploidie dell'intero cromosoma, ma potenzialmente anche l'individuazione di piccole delezioni e duplicazioni de novo superiori alle 15 Mb (anomalie parziali o segmentali). In questo lavoro abbiamo verificato la riproducibilità tecnica del protocollo Ion Reproseq PGT-A nel rilevare le aneuploidie segmentali de novo mediante analisi in cieco di campioni cellulari con delezioni/duplicazioni note e rianalisi su seconda biopsia indipendente di trofoectoderma (TE) dello stesso campione. La procedura di analisi dei campioni cellulari con delezioni note ha fornito valori elevati di sensibilità e specificità, infatti, tutti i campioni presentano un risultato identico all'atteso. Dalla rianalisi su seconda biopsia indipendente di TE è stata ottenuta la stessa diagnosi nel 48,57% dei casi ($n=17/35$; IC95%=31.38-66.01) e diagnosi non concordante nel 51,43% ($n=18/35$; IC95%=33.99-68.62). È interessante notare come il 17.14% ($n=6/35$; IC95%=6.56-33.65) dei campioni nella seconda biopsia presenti un'aneuploidia segmentale reciproca a carico dello stesso braccio del cromosoma. Nel 31.43% ($n=11/35$; IC95%=16.85-49.29) dei risultati discordanti non viene riconfermata solo l'anomalia segmentale, mentre vengono confermate le aneuploidie complete rilevate nella prima biopsia; infine, il 20% dei campioni ribioptizzati ($n=7/35$; IC95%=8.44 to 36.94) risulta euploide in seconda analisi. Questi ultimi risultati supportano la rilevanza biologica e diagnostica delle aneuploidie segmentali e suggeriscono che una percentuale considerevole di queste siano presenti nello stato di mosaico nello stadio di blastocisti. Con le procedure correnti non siamo in grado di dire se aneuploidie segmentali rilevate nelle biopsie di TE siano presenti anche nell'ICM che originerà la frazione fetale. Inoltre, i valori predittivi clinici sono ancora sconosciuti e per questo motivo ulteriori studi sono necessari per aumentare la numerosità del campione e monitorare gli esiti clinici.

COD. P098

MITOCHONDRIAL DNA STUDY IN PATIENTS WITH AUTISM SPECTRUM DISORDERS

M. Lo Giudice¹, E. Borgione¹, S. Santa Paola¹, S.A. Musumeci¹, F. Di Blasi¹, R. Pettinato¹, C. Romano¹, C. Scuderi¹
¹ *Oasi Research Institute – IRCCS, Troina, Italy*

Background: Mitochondrial encephalomyopathies are inherited disorders of oxidative metabolism, with a wide clinical, biochemical and genetic spectrum of expression, requiring a complex diagnostic flow-chart. Infantile forms often occur with defects in development, intellectual disabilities (ID) and dysmorphisms. Autism spectrum disorders (ASD) are neurodevelopmental disorders, with heterogeneous aetiology, characterized by deficiencies in social interaction and communication and by repetitive and stereotyped behaviours. ASD has been associated with mitochondrial respiratory chain deficiency and/or mitochondrial DNA (mtDNA) mutations; however reports in literature are based on case reports or limited samples and regard specific aspects. Aim: Our study pointed at the identification of mtDNA mutations in 20 subjects presenting ASD and clinical signs of neuromuscular involvement. Materials and methods: Genetic investigations, including long PCR for mtDNA large-scale rearrangements and Sanger sequencing of total mtDNA to identify point mutations, were carried out on total DNA obtained from frozen muscle tissue. Results: Genetic studies revealed multiple deletions of mtDNA in 1 patient with normal histological and biochemical findings and four different mtDNA mutations in 4 patients: the m.4320C>T homoplasmic mutation of tRNA^{Ile} gene already described in literature, the homoplasmic m.8836A>G mutation in ATP6, which was already identified in a patient with LHON-like optic neuropathy and in 3 cases of autism, a new homoplasmic base change m.1683C>T in 16S ribosomal RNA gene, in a patient with RC complex I deficiency and a new heteroplasmic base change m.12235T>A in tRNA^{Ser(AGY)}. These two new variants were absent in 42616 mtDNA genomes according to the website Mitomap and in more than 100 normal controls, indicating that they are unlikely to occur in the general population. Conclusions: The present study confirm the hypothesis of an aetiological link between autism and mitochondrial dysfunction. However additional studies in a larger group of subjects are needed.

COD. P099

Nonsense and single nucleotide frameshift mutations in Becker Muscular Dystrophy

M. Traverso¹, C. Panicucci¹, M. Catteruccia², S. Baratto³, P. Broda¹, F. Madia⁴, M. Derchi¹, A. Torella⁵, C. Bruno³, V. Nigro⁵, F. Zara⁴, C. Minetti¹, A. D'Amico², C. Fiorillo¹

¹*Neurologia Pediatrica e Malattie Muscolari, Ist. Giannina Gaslini, Genova*

²*Dip. di Neuroscienze e Neuroriabilitazione, Osp. Pediatrico Bambino Gesù, ROMA*

³*Centro di Miologia Traslazionale e Sperimentale, Ist. Giannina Gaslini, Genova*

⁴*Lab. Neurogenetica, Ist. Giannina Gaslini, Genova*

⁵*Lab. di Genetica Medica, Università degli Studi della Campania, Napoli*

We present clinical, molecular and immunohistochemistry study of a sample of 9 Italian Becker Muscular Dystrophy (BMD) patients carrying nonsense or single nucleotide mutations in DMD gene, leading to a premature stop codon and truncated transcript. From a clinical point of view, all patients are still ambulant, however 5 presented moderate phenotype and the oldest patient was not able to climb stairs or rise from the floor autonomously; CK was significantly elevated. The 2 oldest patients also displayed signs of heart involvement and were in therapy with ACE inhibitors. No patient was taking corticosteroids. Fresh muscle biopsies were obtained from 8 cases and western blot performed. Standard histology procedures showed variable degree of necrosis and degeneration of muscle fibres, which correlates with age at biopsy and CK level. Dystrophin expression was only partially reduced with immunohistochemistry (IHH) and western blot (WB). Study of the transcript via RT-PCR was also performed. It is known that nonsense and frameshift mutations in dystrophin gene potentially determine the interruption of protein synthesis and degradation of truncated dystrophin molecules, for this reason they are usually associated with Duchenne phenotype. The exact location of the mutation is considered an important factor. Nevertheless other factors, such as presence of splicing regulatory elements, can influence the ultimate outcome of nonsense mutation and they are largely unexplored. In this small cohort, we observed nonsense and single nucleotide frameshift mutations in BMD patients, few presenting a moderate phenotype with malignant progression. Additionally, we showed that dystrophin mRNA and protein are still retained in affected muscles, suggesting an altered function of the protein. We argue that this can be highlighted by marked reduction of the dystrophin-dystroglycans complex. These cases underscore the importance of a complete analysis of DMD gene and its transcript in order to provide better prognostic information for dystrophin patients and genotype-phenotype correlation; nonsense mutations in BMD patients raise question on the possible therapeutic approaches such as molecules able to read through premature stop signals.

COD. P100

VARIANTI GENETICHE ASSOCIATE CON LA SUSCETTIBILITÀ PER I DISTURBI DELLO SPETTRO AUTISTICO NON SINDROMICI

Y.C. Castillo De Spelozzi¹, B. Bortot², R. Devescovi², G.M. Severini²

¹*Dipartimento Scienza della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste*

²*Istituto materno infantile IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste*

I disturbi dello spettro autistico (DSA) sono caratterizzati da deficit nel linguaggio, nella comunicazione verbale e non verbale, nelle abilità sociali, nonché da comportamenti ripetitivi e stereotipati. I pazienti affetti da DSA presentano anche frequenti crisi epilettiche ed un ritardo mentale medio-grave. I DSA sono tra i disordini neuroevolutivi più frequenti in età pediatrica ed interessa l'1% della popolazione mondiale. Nel 2016, il National Health Center for Health Statistics ha riporta un nuovo tasso di incidenza, 1/36 bambini, in prevalenza maschi. Ad oggi la diagnosi dei DSA è basata su criteri esclusivamente comportamentali, sebbene la letteratura scientifica evidenzi che l'autismo sia un disturbo fortemente associato a componenti genetiche. Nel presente studio abbiamo utilizzato la tecnologia NGS per l'indagine genetica di pazienti con DSA non sindromico. Poiché i sintomi e i comportamenti dei pazienti con DSA possono avere origine da un deficit in una specifica fase di maturazione del sistema nervoso, in cui il cervello non riesce ad ottimizzare le connessioni tra diverse aree cerebrali, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sullo studio di geni implicati nei processi sinaptici. E' stato quindi disegnato un pannello di 20 geni correlati ai DSA e coinvolti nelle comunicazioni sinaptiche, la cui alterazione potrebbe determinare un deficit della connettività neuronali. Il sequenziamento è stato effettuato su una coorte composta da 100 pazienti con DSA non sindromici. Nell'analisi sono state individuate e confermate 64 varianti geniche. Tra queste varianti, sono di particolare interesse quelle identificate nella famiglia dei geni SHANK poiché sono implicati nella formazione, nella stabilizzazione e nell'omeostasi delle sinapsi. In particolare abbiamo identificato una nonsense mutation in eterozigosi sull'esone 3 del gene SHANK2, che causa la trasformazione del residuo amminoacidico 152 d'acido glutammico a codone di stop (p.E152X), determinando la perdita di 1698 amminoacidi e una variante in eterozigosi sull'esone 23 del medesimo gene, che causa una delezione di 24 nucleotidi senza creare un frameshift; inoltre è stata identificata una variante in eterozigosi nell'esone 21 del gene SHANK3 che determina un frameshift a partire dal codone 1340.

COD. P101

L'inattivazione biallelica del gene ADGRB3 (BAI3) è associata a disabilità intellettiva, atrofia cerebellare e disturbi del comportamento

L.R. Saccuzzo¹, C. Scuderi², M. Vinci², L. Castiglia², M. Salemi², T. Mattina¹, E. Borgione², S. Città², C. Romano², E. Salvo¹, M. Miceli¹, M. Aleo¹, M. Fichera^{1,2}

¹*Dip. di Scienze Biomediche e Tecnologiche, Lab. Genetica Medica, Università di Catania*

²*Istituto di Ricerca Oasi, IRCCS, Troina*

Nel corso degli ultimi anni le tecniche molecolari di analisi del genoma basate sui microarray hanno permesso di comprendere il ruolo delle variazioni del numero di copie (CNVs) in molteplici malattie genetiche, dalle forme pediatriche (quali disordini dello spettro autistico, disabilità intellettiva, anomalie congenite) alle forme ad esordio tardivo (come la schizofrenia nell'adulto). Queste tecniche rappresentano tuttora il test diagnostico d'elezione per tali disturbi. Nel presente lavoro si riporta lo studio di una famiglia costituita da una coppia di fratelli entrambi affetti da disabilità intellettiva, atassia e disordini comportamentali, i cui genitori consanguinei mostravano disturbi psichiatrici. L'analisi CGH/SNP array evidenziava in entrambi i fratelli una triplicazione di circa 300 kb della regione cromosomica 6q12, ereditata da genitori eterozigoti per la duplicazione. Tale sbilanciamento, incluso in una regione con perdita di eterozigosità di circa 37 Mb, coinvolgeva il gene ADGRB3, noto anche come BAI3. La successiva caratterizzazione molecolare definiva il riarrangiamento come una duplicazione in tandem di 14 esoni del gene ADGRB. La conseguente alterazione della struttura genomica era prevista causare la formazione di un codone di stop prematuro e la probabile degradazione dell'mRNA anomalo da parte del sistema di decadimento mediato dal non senso (nonsense mediated decay). Il gene ADGRB3 appartiene alla sottofamiglia dei recettori di adesione accoppiati alle proteine G che regolano importanti meccanismi alla base del funzionamento del sistema nervoso centrale, tra cui l'orientamento degli assoni, la mielinizzazione e la formazione delle sinapsi. Recentemente, sia polimorfismi a singolo nucleotide che CNVs a carico del gene ADGRB3 sono state associate a disordini psichiatrici. Come riportato in letteratura, le nostre osservazioni confermano che l'aploinsufficienza del gene ADGRB3 è associata a sintomi psichiatrici, ed in aggiunta mostrano come mutazioni bialleliche loss-of-function siano associate a un quadro clinico più severo, con deterioramento cognitivo e atassia.

COD. P102

Performance of universal immunohistochemistry (IHC) testing in Lynch Syndrome (LS) cancer spectrum

M. Marabelli¹, P.R. Rafaniello², M. Calvello¹, I. Feroce¹, M. Lazzeroni¹, C. Ferrari³, E. Belloni⁴, E. Marino⁴, M. Dal Molin⁴, C. Mauro⁴, L. Giacobbe⁴, L. Bernard⁴, A. Chiappa³, M. Barberis², L. Bertario¹, B. Bonanni¹

¹*Division of Cancer Prevention & Genetics, European Institute of Oncology, Milan, Italy.*

²*Division of Pathology, European Institute of Oncology, Milan, Italy.*

³*Unit of Innovative Surgical Techniques, European Institute of Oncology, Italy; University of Milan, Italy.*

⁴*Clinical Genomics Laboratory Unit, European Institute of Oncology, Milan, Italy.*

Purpose. LS is caused by germline mutations in mismatch repair (MMR) genes. Both microsatellite instability (MSI) testing and IHC staining are valuable strategies for LS detection. The aim of this study is to validate the performance of IHC testing of MMR proteins in a large monoinstitutional series of patients with LS spectrum cancers. **Methods.** From January 2016 to June 2018, we performed a combined analysis of IHC and MSI in 541 cancers (446 colorectal, 37 endometrial, 31 ovarian, 27 other sites) from 534 patients. IHC staining for MMR proteins was performed on all samples, regardless of age at diagnosis (mean=61) and family history. Samples were classified as MSI-High, MSI-Low or microsatellite stable (MSI-H, MSI-L and MSS, respectively). IHC results were classified as proficient-IHC (normal expression), deficient-IHC (loss of expression), borderline-IHC ("patchy" expression); borderline-IHC cases with MSI-H were classified as deficient-IHC. Excluding samples with BRAF p.Val600Glu mutation or MLH1 promoter hypermethylation (MLH1-Hy), deficient-IHC cases were addressed to genetic counseling for germline MMR gene testing. **Results.** We identified 471 proficient-IHC samples; 51 deficient-IHC samples; 11 borderline-IHC, 8 inadequate samples. Among the borderline-IHC tumors, 3 were MSS or MSI-L, while 8 were MSI-H and were classified as deficient-IHC cases. The 59 IHC-deficient samples (57 MSI-H and 2 MSI-L) showed loss of MMR expression as follows: all four proteins (n=1), three proteins (n=1), two proteins (n=46, i.e. 36 combined MLH1-PMS2, 10 combined MSH2-MSH6), one protein (n=11, 19%). IHC deficiency rate was significantly different among sites: 10% colorectal, 37% endometrial, 13% ovarian cancer, 0% other sites (p<0.00001). Thirty-one samples had BRAF mutation or MLH1-Hy. The remaining 28 samples were collected from 26 patients (2 patients had multiple primary cancers). To date, 12 patients have been tested and 10 germline variants were detected (4 in MLH1, 4 in MSH2 and 2 in MSH6, including 1 borderline-IHC with MSI-H). **Conclusions.** We support the systematic evaluation of all four MMR proteins in colorectal and gynecological cancers to identify patients with LS. While MSI and IHC analyses are highly concordant, MSI appears useful to manage borderline-IHC cases.

COD. P103

MUTAZIONE DE NOVO NEL GENE PLCG1 IN UN PAZIENTE CON FENOTIPO PROGEROIDE

P. Prontera¹, B. Mandriani², A. Mencarelli¹, D. Rogai¹, B. Augello², C. Gradassi¹, M. Schippa¹, R. Romani¹, C. Ardisia¹, G. Merla², G. Stangoni¹

¹*Servizio di Genetica Medica, Az. Osp. Univ. di Perugia, Perugia*

²*Division of medical genetics, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG).*

Le sindromi progeroidi rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie che hanno come denominatore comune la presenza di un aspetto “vecchieggiante” associato a patologie tipiche dell’anziano. La sindrome progeroide più nota è la Hutchinson Gilford Progeria Syndrome (HGPS), dovuta a mutazione del gene LMNA, che codifica per la Lamina A. In questo studio riportiamo i risultati di una valutazione clinica e genetico-molecolare condotta in un bambino, nato da genitori sani e non consanguinei, che presenta un fenotipo progeroide, caratterizzato da iposomia, cute sottile, alopecia, assenza di tessuto sottocutaneo, ipoacusia neurosensoriale, difetto interatriale, linfocitopenia T, normale intelligenza. Dopo aver escluso anomalie genomiche mediante array-CGH (risoluzione di 75 Kb) e mutazioni del gene LMNA è stato effettuato, su DNA estratto da sangue periferico, un WES del trio che ha portato all’identificazione di due mutazioni missense in eterozigosi, de novo, poi confermate in Sanger. Una mutazione a carico del gene PKP2 è stata già descritta in pazienti con Displasia Aritmogena del Ventricolo dx, mentre l’altra, che interessa il gene PLCG1, non è mai stata descritta come mutazione germinale nell’uomo, è assente dai database di polimorfismi e viene considerata “deleteria” da tre diversi software bioinformatici. La stessa variante PLCG1 viene riportata nella letteratura scientifica in linfomi a cellule T, come mutazione somatica. Per escludere questa ultima evenienza nel nostro paziente, abbiamo ricercato ed identificato la mutazione PLCG1 anche su DNA estratto da brushing buccale, confermando quindi la sua origine germinale. Il gene PLCG1 codifica per una proteina che svolge ruoli importanti nei processi di segnalazione intracellulare, di riorganizzazione dell’actina e di migrazione cellulare. L’actina è uno dei componenti del citoscheletro che interagisce con le Laminine e quindi una sua “disfunzione” indotta dalla mutazione PLCG1 potrebbe rappresentare un anello di congiunzione nella patogenesi delle sindromi progeroidi. Non possiamo neanche escludere una patogenesi “digenica” PKP2/PLCG1. Per questo saranno necessari ulteriori studi funzionali e la ricerca di mutazioni PLCG1 in altri pazienti con fenotipo progeroide per rafforzare questi dati preliminari.

COD. P104

Rete di Neuroscienze e di Neuroriabilitazione: sviluppo di una piattaforma Genomica condivisa per la caratterizzazione molecolare e fenotipica dei pazienti affetti da malattie neurodegenerative

E. Giardina^{1,2}, C. Caltagirone^{1,3}

¹*Fond. Santa Lucia, IRCCS*

²*Dip. di Biomedicina e Prevenzione, Univ. degli Studi di Roma "Tor Vergata"*

³*Dip. di Medicina dei Sistemi, Univ. degli Studi di Roma "Tor Vergata",*

La rete di Neuroscienze e Neuroriabilitazione degli istituti IRCCS è stata creata con l'obiettivo di armonizzare i programmi di ricerca e la diagnosi delle malattie neurodegenerative. All'interno della rete è stata sviluppata una piattaforma multicentrica, coordinata dalla Fondazione Santa Lucia IRCCS, per consentire e promuovere la condivisione e la consultazione, tra gli IRCCS afferenti alla rete, di dati clinici e genomici per ottimizzare la correlazione genotipo-fenotipo dei singoli pazienti. La piattaforma genomica intende recepire le recenti disposizioni e direttive presentate dal "Piano per l'innovazione del sistema sanitario basata sulle scienze omiche" pubblicato nella Gazzetta Ufficiale del 17 gennaio 2018. A tal proposito, l'integrazione di tutte le informazioni, raccolte dai 24 centri, garantirà una razionalizzazione dell'offerta diagnostica e un'implementazione della genomica nella pratica clinica in modo economicamente sostenibile. I dati clinici e genomici saranno registrati all'interno di un database nazionale che sarà consultabile da ogni centro afferente alla rete. Il principale obiettivo della piattaforma è la standardizzazione delle diverse procedure analitiche al fine di garantire qualità, validità e riproducibilità delle diagnosi anche se effettuate con metodologie differenti e/o condotte in Istituti diversi. La Rete sta già lavorando per uniformare i consensi informati e per condurre un censimento delle strumentazioni, dei pazienti/campioni e dell'offerta diagnostica disponibile. È stata inoltre sviluppata un'interfaccia web-based per agevolare la raccolta e la condivisione dei dati genomici e clinici. I dati raccolti consentiranno di generare un database di varianti genomiche identificate nella popolazione italiana che potranno essere impiegate per promuovere l'applicazione di protocolli di medicina genomica applicata alle neuroscienze.

COD. P105

Ruolo delle Copy Number Variations costituzionali nei Disordini Linfoproliferativi Post-Trapianto

C. Pessina¹, P. Granata¹, A. Bussini¹, E. Meroni¹, R. Casalone¹

¹*U.O. Citogenetica e Genetica Medica, Osp. di Circolo e Fond. Macchi, ASST Sette Laghi, viale Borri 57, Varese*

I Disordini Linfoproliferativi Post-Trapianto (PTLD) sono un gruppo di patologie che si sviluppano dopo trapianto di organi solidi e cellule staminali ematopoietiche nell'1-20% dei pazienti in terapia immunosoppressiva. I principali fattori di rischio sono il tipo di organo trapiantato, il periodo d'immunosoppressione, l'età dei pazienti e l'infezione da EBV. Studi genetici hanno dimostrato che alcune aberrazioni genomiche somatiche ricorrenti hanno un ruolo nello sviluppo della PTLD; la nostra ipotesi è che anche quelle germinali possano essere fattore predisponente allo sviluppo di queste patologie nei pazienti trapiantati. Sono stati analizzati, tramite tecnica array-CGH, 27 campioni di DNA di pazienti pediatrici. I pazienti, tutti EBV sieronegativi al momento del trapianto, sono stati suddivisi in quattro gruppi in base allo stato clinico: pazienti PTLD-positivi (PTLD), pazienti PTLD-negativi con alta carica virale EBV (HVL), pazienti PTLD-negativi con bassa carica virale EBV (LVL) e pazienti controllo (C). Nonostante la casistica limitata è emerso che i pazienti PTLD e HVL presentano un numero di CNVs maggiore rispetto ai pazienti LVL e C. Solo in pazienti PTLD o HVL sono state identificate CNVs che contengono geni correlati allo sviluppo di neoplasie o di linfomi, e solo in 3 pazienti PTLD sono state trovate CNVs che coinvolgono i geni delle immunoglobuline (Ig). Questi dati potrebbero indicare che in queste due categorie di pazienti ci sia una maggiore instabilità genomica e che il coinvolgimento di geni implicati nei processi di carcinogenesi favorisca lo sviluppo di PTLD. Inoltre, il riarrangiamento delle catene delle Ig sembra predisporre alla patologia indipendentemente dalla presenza di EBV. CNVs comuni nei diversi gruppi presuppongono un "second hit" genetico o ambientale, oppure un periodo di tempo maggiore, per lo sviluppo di PTLD.

COD. P106

Segmental maternal UPD of chromosome 7q in a patient with Pendred and Silver Russel syndromes-like features

S. Russo¹, V. Cirello², V. Giorgini¹, C. Castronovo¹, M. Ester¹, M. Susan³, A. Sironi¹, M.P. Recalcati¹, D. Giardino¹, L. Larizza¹, L. Persani², P. Finelli¹, P. Finelli⁵, L. Fugazzola¹, L. Fugazzola⁷

¹ *Laboratory of Medical Cytogenetics and Molecular Genetics, IRCSS Istituto Auxologico Italiano (Mi)*

² *Department of Clinical Sciences and Community Health, University of Milan, Milan*

³ *Neuropsychiatry and Neurorehabilitation Unit, Scientific Institute, IRCCS Eugenio Medea, Bosisio Parini, Lecco*

⁴ *Laboratory of Endocrine and Metabolic Research, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, (Mi)*

⁵ *Neuropsychiatry and Neurorehabilitation Unit, Scientific Institute, IRCCS Eugenio Medea, Bosisio Parini, Lecco*

⁶ *Department of Medical Biotechnologies and Translational Medicine, University of Milan, Milan*

⁷ *Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano*

Background: Pendred syndrome (PS) is an autosomal recessive disorder due to mutations in the SLC26A4 gene (chr7q22.3) and characterized by sensorineural hearing loss and variable thyroid phenotype. Silver-Russell syndrome (SRS) is a heterogeneous imprinting disorder characterized by severe intrauterine and postnatal growth retardation, and dysmorphic features. Maternal uniparental disomy either of the whole chromosome 7 (upd(7)mat) or of 7q (upd(7q)mat) is the first deciphered out of the multiple mechanisms impacting the expression of imprinted genes in SRS, and is associated with milder clinical features. Objectives: To report genetic and clinical characterization of a female child presenting with PS and postnatal growth retardation and minor dysmorphic features. Methods and Results: A gross homozygous deletion of SLC26A4 exons 17-20 and the insertion of about 1 kb of the CCDC126 gene (7p15.3) were found. The possible occurrence of a balanced rearrangement between 7p and 7q was excluded, and microsatellite segregation analysis revealed a segmental 7q (upd(7q)mat), leading to SLC26A4 homozygosity and responsible for both PS and SRS-like traits. The proband matches 3 out of 6 major SRS criteria. Conclusions: This is the first report of uniparental isodisomy encompassing almost the whole long arm of chromosome 7 resulting in PS and SRS-like features. Whereas the inner ear phenotype of PS is typical and the diagnosis easily achieved, the mild clinical features of the associated SRS might have been overlooked. Thus, upon diagnosis of PS due to intragenic homozygous deletion, screening for SRS should be mandatory.

COD. P107

VALUTAZIONE DELLA PREDITTIVITA' DEL SOFTWARE CAGENE 6.0 NELL' IDENTIFICARE I PAZIENTI CON MUTAZIONI A CARICO DEI GENI BRCA1 E BRCA2

M. Cancelli¹, L. Sorino¹, R. Ferrante¹, A. Di Serafino¹, C. Natoli⁴, E. Cianchetti^{2,3}, A. Ivana¹, L. Stuppia¹

¹1) *Laboratory of Molecular Genetics, Department of Psychological, Health and Territorial Sciences, "G. d'Annunzio" University, Chieti-Pescara, Italy.*

²2) *IRVINE3 Labs, CH-PE University, Chieti, Italy*

³3) *International Agency for Pharma Standard Supplements (IAPPS), Chieti, Italy.*

⁴4) *Department of Oral, Medical and Biotechnological Sciences, University G. D'Annunzio, Chieti-Pescara, Italy*

Introduzione: I tumori eredo-familiari sono responsabili del 5% delle neoplasie. Mutazioni nei geni BRCA1 e BRCA2 sono responsabili del 5-10% dei carcinomi mammari e del 15% dei carcinomi ovarici sierosi. I portatori di mutazioni patogenetiche in BRCA1 e BRCA2 presentano un incrementato rischio di sviluppare carcinoma mammario ed ovarico nel corso della loro vita. Obiettivi: La consulenza genetica mira ad indentificare gli individui eleggibili all'esecuzione del test per la ricerca di mutazioni a carico dei geni BRCA1 e BRCA2. La ricerca mutazionale è costosa e richiede tempo per l'esecuzione. L'analisi del dato deve essere tempestiva nel pre-surgery e nei carcinomi che beneficiano del trattamento con inibitori PARP. Questo richiede selezione dei pazienti mediante criteri di inclusione accurati. Nel nostro studio retrospettivo abbiamo valutato la predittività del Software CaGene 6.0 nell' identificare l'effettiva eleggibilità dei 194 pazienti giunti in consulenza dal 2014 al 2017 e selezionati mediante i criteri definiti dalle linee guida del National Comprehensive Cancer Network (NCCN)Materiali e metodi: Il rischio predittivo dei 194 pazienti è stato calcolato mediante il CaGene 6.0 Software. Quando il valore è superiore al 10% i pazienti vengono considerati eleggibili. I geni BRCA1 e BRCA2 sono stati analizzati mediante tecnica di sequenziamento diretto.Risultati: Su 194 pazienti 43 risultavano mutati in BRCA1 e BRCA2 (22%); dei 44 arruolati con CaGene 6.0 risultavano mutati 21 (48%); mentre 21 dei pazienti effettivamente mutati non viene identificato con il Cagene 6.0 (51%). il numero di pazienti considerati eleggibili varia in maniera strettamente significativa ($p < 0.001$) rispetto al numero di pazienti selezionato da CaGene6.Conclusioni: Il software Cagene 6.0 possiede un'alta specificità: il 48% dei pazienti arruolabili con Cagene 6.0 risulta effettivamente mutato, mentre presenta una bassa sensibilità in quanto il 51 % dei pazienti effettivamente positivi al test genetico non risulta eleggibile con CaGene 6.0. Mediante i criteri di selezione NCCN è possibile identificare un numero maggiore di pazienti mutati che possono così beneficiare dei trattamenti chirurgici e farmacologici.

COD. P108

Clinical features and genetic analysis of two siblings with Startle disease in a family of South Italy

T. Sprovieri¹, C. Ungaro¹, D. Battaglia², S. Sivo², E. Musto², M. Quintiliani², I. Contaldo², L. Citrigno¹, M. Muglia¹, F. Cavalcanti¹

¹*Istituto di Scienze Neurologiche - Consiglio Nazionale delle Ricerche, Mangone (CS), Italy*

²*Neuroipsichiatria Infantile Fondazione Policlinico A. Gemelli, IRCCS-Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italy*

Hyperekplexia also known as Startle disease is a rare neuromotor hereditary disorder characterized by exaggerated startle responses to unexpected auditory, tactile, and visual stimuli and generalized muscle stiffness, which both gradually subside during the first months of life. To date, mutations in 5 genes, including GLRA1, have been reported to cause hyperekplexia. In the present study, we describe clinical and genetic features of 2 Italian siblings with compound heterozygous mutations in GLRA1 gene. The genetic investigation, performed by NGS approach and validated by direct sequencing, revealed, in both probands, compound heterozygous mutations: c.895C>T or p.R299X inherited from the mother and c.587C>A or p.D98E inherited from the father. Until now, these two identified mutations in GLRA1 have not been reported before as compound mutations. Although both compound heterozygous patients and homozygous mutation carriers have been described in the literature for recessive forms of the disease and dominant forms of hyperekplexia have been attributed to mutations within the pore-lining transmembrane segment (TM2) and adjacent regions while recessive forms have been attributed to mutations within the other transmembrane segments (TM1 and TM3), our data are not consistent with these previous studies whereas the p.R299X nonsense mutation was detected in our patients in exon 7, codifying TM3 domain, and exhibited an autosomal dominant inheritance. No mutations were found in other genes known to cause familial hyperekplexia such as GLRB, SLC6A5, GPHN, and ARHGEF9.

COD. P109

Discovery novel variations in Sleep-related Hypermotor Epilepsy (SHE) using Next Generation Sequencing approach

L. Citrigno¹, F. Cavalcanti¹, T. Sprovieri¹, C. Ungaro¹, M. Ascoli^{2,3}, U. Aguglia^{2,3}

¹*Institute of Neurological Sciences, National Research Council, Mangone, Italy.*

²*Department of Medical and Surgical Sciences, Magna Graecia University, Catanzaro, Italy*

³*Regional Epilepsy Centre, Great Metropolitan "Bianchi-Melacrino-Morelli" Hospital, Reggio Calabria, Italy.*

Sleep-related hypermotor epilepsy (SHE) is a rare form of focal epilepsy, with an estimated minimum prevalence of 1.8/100,000 individuals. SHE affects both sexes, and involves sleep-related seizures with various motor manifestations. Seizure onset may be at any age with a peak during childhood and adolescence. Seizure frequency may be very high, with occurrence either every night or almost every night, usually many times per night. Clustering is characteristic but not obligatory for diagnosis. Seizures occur predominantly during sleep, primarily in non-REM (NREM) sleep and rarely during REM sleep. Seizures during active wakefulness may also occasionally occur during the patient's lifetime. SHE is a genetically heterogeneous condition and the roles of CHRNA4, CHRNA2 and CHRNB2 genes have been clearly established in this disease. Mutations in the KCNT1 gene have been identified in families with severe SHE. In this study, we analyzed a familial case of SHE coming from the South of Italy using an amplicon based "Next Generation Sequencing" approach with a ready to use Neurological panel comprising the most relevant genes associated with neurological disease. DNA sample from the family's proband were screened for 766 genes by using the Personal Genome Machine (PGM)-ThermoFisher Scientific and the alignment and the variant caller were carried out using the Ion Torrent suite vers.5.6. After the bioinformatic analysis, we have not highlighted pathological variations in the most associated SHE genes (CHRNA4-CHRNA2-KCNT1). We are able to identify a missense variation (c1204 G>A p.Ala402Thr) in the proband DNA in the exon 5 of the acetylcholine receptor, neuronal nicotinic, beta-2 subunit gene (CHRNB2). The proband is affected by a SHE from the age of 26. The same variation was identified in the DNA of the proband's mother who is affected by a very severe form of the disease and in the DNA of the two proband's son: the 7-year-old daughter shows very slight nocturnal shocks and the 4-year-old son has not shown any sign of the disease so far. In conclusion, gene panels and NGS sequencing approach will improve the number and specificity of the studied genes, influencing the success of diagnosis in complex genetic phenotype like SHE.

COD. P110

Next generation sequencing-based molecular profile of lung adenocarcinoma patients

M.G. Bica¹, C. Agueli¹, S. Cannella¹, V. Randazzo¹, D. Salemi¹, F. Guddo², A. Pettinato³, M. Spatafora⁴, F. Verderame⁵, F. Fraggetta³, A. Rizzo², A. Santoro¹

¹*UOSD Laboratorio di Oncoematologia e Manipolazione Cellulare, AOR Villa Sofia Cervello, Palermo*

²*UOC Anatomia Patologica , AOR Villa Sofia Cervello, Palermo*

³*UOC Anatomia Patologica , Ospedale Cannizzaro, Catania*

⁴*UOC Pneumologia , AOR Villa Sofia Cervello, Palermo*

⁵*UOC Oncologia Medica, AOR Villa Sofia Cervello, Palermo*

Background: The introduction of targeted therapy for EGFR and ALK mutated lung adenocarcinoma patients has dramatically changed the clinical history of these subjects. Unfortunately, these abnormalities occur in only about 20 % of lung adenocarcinomas and acquired resistance to first-generation drugs often develops. Lung adenocarcinomas rank among the most genomically-complex tumors allowing the opportunity to exploit the presence of other molecular alterations as therapeutic targets. In addition to EGFR and ALK abnormalities, mutations of HER2, BRAF, PIK3CA and AKT1 genes, recurrent gene fusions involving ROS1, and RET and MET genes amplification have been described and the list of other candidate genes is growing. Next-generation sequencing (NGS) allows for the simultaneous detection of multiple alterations in a single test with significant time and tissue sparing. Aim: We investigated the potentially actionable acquired genetic alterations by NGS in lung adenocarcinomas. Methods: After EGFR testing (Therascreen Qiagen), amplicon-based (Oncomine-ThermoFisher) Ion Torrent NGS assay, including 22 genes, was performed in tumor samples from 66 patients (24 EGFR mutated and 42 EGFR Wild Type). Results: NGS revealed one or more genomic alterations in tumors from 62/66 patients (93,9%). A median of 1,5 alterations per sample (range 0–3) was shown and, across mutated samples, a total of 72 individual alterations, other than EGFR abnormalities, were found. The most common abnormalities involved TP53 (34/72=47,2%), KRAS (22/72=30,6%), BRAF (4/72=5,6%), PIK3CA (4/72=5,6%) and STK11 (2/72=2,8%). EGFR and K-RAS mutations were found to be mutually exclusive; however, concurrent EGFR/TP53 mutations were highly prevalent (45%) and, in the group of EGFR wild-type tumors, we found a significant prevalence of concurrent K-RAS/TP53 mutations (21%). Conclusion: High frequency of mutations and concurrent EGFR/TP53 and K-RAS/TP53 aberrations were found in our sample. NGS-based assays reveal more actionable genomic alterations than do standard diagnostic methods and, due to the reduction of time and tissue requirements, may be suggested as the optimal molecular diagnostic platform for patients with lung adenocarcinoma. Supported by Assessorato alla Salute Regione Sicilia PSN2013

COD. P111

Position effect in NF1 Microdeletion Syndrome as a model to unravel genotype/phenotype correlation in genomic disorders

V. Tritto¹, L. Ferrari¹, G. Scuvera², C. Battaglia¹, F. Natacci², M. Eoli³, E. Mangano⁴, R. Bordoni⁴, D. Milani², P. Riva¹

¹*Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale - Università degli Studi di Milano*

²*Ospedale Maggiore Policlinico di Milano - Fondazione IRCCS Ca' Granda*

³*Istituto Neurologico Carlo Besta - Milano*

⁴*CNR-ITB - Segrate (MI)*

NF1 microdeletion (NF1-MD) syndrome is a rare and severe form of Neurofibromatosis Type 1 and it is characterized by a variable expressivity of specific clinical signs including facial dysmorphisms, cognitive and motor delay, café au lait spots, inguinal freckling, lisch nodules, neurofibromas, optic glioma, skeletal anomalies, overgrowth. NF1-MD syndrome is due to the heterozygous deletion of NF1 and a variable numbers of flanking genes. Genotype-Phenotype correlation is currently challenging in NF1-MD syndrome, as patients with same deletions extent may show different clinical traits that thus cannot be only explained by haploinsufficiency of the deleted genes. We recently described an atypical NF1-MD, generating the RNF135/SUZ12 chimeric gene that was found to be hyper-expressed in the patient's peripheral blood cells (PB) compared with the respective wild type RNF135 and SUZ12 transcripts. Since we investigated the effect of the deletion on the Topologically Associating Domains (TADs) organization and observed the disruption of two adjacent TADs. We also studied the expression of 18 genes mapped along chr17 in patient's PB and in his immortalized cell line, by Q-PCR. We detected, in PB, the hyper-expression of most 17q-genes, while the 17p-genes didn't show any expression variation, as expected. As far as the lymphoblastoid cell line, only GOSR1 centromedically and CD300LB telomerically have been found hyperexpressed, underlying the complexity of the epigenetic regulation. 4C assays will carry out to study chromatin interaction variations, elucidating the role of epigenetic mechanisms. Furthermore, to investigate pseudodominance effect, we carried out a targeted resequencing study of 139 genes included in NF1-MD regions, in the RAS/MAPK pathway group and the validated interactors of neurofibromin. After sequencing of 10 NF1-MD patients we identified loss of functional mutations in RNF135 and RAF1 genes, associating them with peculiar clinical traits in the two patients. The provided results will help to understand variable expressivity in NF1-MD as a model disease to study such a phenomenon occurring more generally in contiguous gene syndromes, improving patients' prognosis and counselling.

COD. P112

PROGNOSTIC VALUE OF BLOOD DNA METHYLATION IN MALIGNANT PLEURAL MESOTHELIOMA

G. Cugliari^{1,2}, S. Guarrera^{1,2}, C. Viberti^{1,2}, F. Grosso³, E. Casalone^{1,2}, M. Betti³, D. Ferrante^{4,5}, A. Aspesi⁶, C. Casadio⁷, R. Libener⁸, E. Piccolini⁹, D. Mirabelli^{10,11,12}, I. Dianzani^{6,12}, G. Matullo^{1,2,12,13}

¹*Italian Institute for Genomic Medicine, IIGM, Turin, Italy*

²*Department of Medical Sciences, University of Turin, Turin, Italy*

³*Division of Medical Oncology, SS. Antonio e Biagio General Hospital, Alessandria, Italy*

⁴*Medical Statistics and Cancer Epidemiology Unit, Department of Translational Medicine, University of Piemonte Orientale, Novara, Italy*

⁵*Cancer Epidemiology Unit, CPO-Piemonte, Novara, Italy*

⁶*Department of Health Sciences, University of Piemonte Orientale, Novara, Italy*

⁷*Thoracic Surgery Unit, AOU Maggiore Della Carità, Novara, Italy*

⁸*Pathology Unit, SS. Antonio e Biagio General Hospital, Alessandria, Italy*

⁹*Pneumology Unit, Santo Spirito Hospital, Casale Monferrato (AL), Italy*

¹⁰*Cancer Epidemiology Unit, Department of Medical Sciences, University of Turin, Turin, Italy*

¹¹*Cancer Epidemiology Unit, CPO Piemonte, Turin, Italy*

¹²*Interdepartmental Center for Studies on Asbestos and Other Toxic Particulates "G. Scansetti", University of Turin, Turin, Italy*

¹³*Medical Genetics Unit, AOU Città della Salute e della Scienza, Turin, Italy*

ABSTRACT

BACKGROUND

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a rare and aggressive neoplasm, with limited systemic therapeutic options and median survival time of approximately 12 months. The aim of this study was to evaluate the clinical value of DNA methylation (DNAm) in predicting overall survival (OS) as compared to the lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR), which is the most used inflammation-based prognostic score in MPM.

METHODS

We investigated a cohort of 163 incident cases of MPM diagnosed between 2000 and 2010 in the municipalities of Turin, and Casale Monferrato (Piedmont region, Italy), an area with an exceptionally high incidence of mesothelioma caused by asbestos occupational exposure and contamination in the general environment from the asbestos-cement Eternit plant that was operational until 1986. Genome-wide methylation array (HumanMethylation450 Beadchip) to identify novel blood DNAm markers related to overall survival in MPM was used. The white blood cells (WBCs) count estimated from DNAm data was used for the LMR calculation.

RESULTS

Kaplan–Meier survival curves highlighted methylation levels at a single-CpG in a gene on 6p21.31 (DNAm cut-off = 0.45, HR = 2.14, MS = 243 vs 534, days; $P = 2.4 \times 10^{-05}$) and lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR cut-off = 2.86, HR = 1.66, MS = 528 vs 310 days, $P = 3.0 \times 10^{-03}$) as related to OS. Bootstrap (IC Bias-Corrected with the acceleration constant, BCa) was used as a validity procedure to correct for potential distortions of estimates.

CONCLUSIONS

Our study is the first to demonstrate that a single-CpG DNAm in a gene on 6p21.31 is an independent marker of prognosis in patients with MPM and performs better than other inflammation-based scores as prognostic factor. DNAm evaluation will enable clinicians to better predict clinically meaningful outcomes such as response to systemic treatment and to select patients who are most likely to benefit from intensive therapy.

COD. P113

Dealing with BRCA1/2 Unclassified Variants in a Cancer Genetics Clinic: does cosegregation analysis help?

D. Turchetti¹, S. Ferrari¹, E. Bonora¹, F. Buscherini¹, B. Bertonazzi¹, M. Grippa¹, L. Godino¹, S. Miccoli¹, R. Zuntini¹

¹*UO Genetica Medica, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna Policlinico S.Orsola-Malpighi and Centro di Ricerca sui Tumori Ereditari, Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna, Bologna, Italy*

Background

Detection of variants of uncertain significance (VUSs) in BRCA1 and BRCA2 genes poses relevant challenges for counseling and managing patients. VUS carriers should be managed similarly to probands with no BRCA variants detected, and predictive genetic testing in relatives is discouraged. However, miscomprehension of VUSs is common and can lead to inaccurate risk perception and biased decisions about prophylactic surgery.

Aims and methods

The experience with VUSs at our Cancer Genetics Clinic was reviewed, especially focusing on cosegregation analysis performed in selected families, with the aim of clarifying whether cosegregation analysis proved helpful for risk assessment and communication.

Results

Out of 1045 patients undergoing BRCA1/2 testing in the period October 2011-April 2018, 66 (6.3%) carried class 3 VUSs. Among 13 VUSs detected in 11 kindreds, 7 (53.8%) did not cosegregate with breast/ovarian cancer in the family, thus excluding they had played a role in cancer clustering in these families. Among the 6 cosegregating VUSs, for two (BRCA1 c.5152+2T>G and BRCA2 c.7975A>G) additional evidence exists from databases and in silico tools supporting their pathogenicity, which reinforces the hypothesis that they have had a predisposing effect in respective families. For the remaining four, cosegregation analysis failed to provide relevant information.

Conclusions

Our findings suggest that cosegregation analysis in a clinical context may be helpful to improve test result interpretation in the specific family and should be offered whenever possible. Moreover, obtaining and sharing cosegregation data helps gathering evidence that may eventually contribute to VUS classification.

COD. P114

Decreased LINE-1 methylation in medullary and mixed thymomas from patients with Myasthenia Gravis

F. Coppedè¹, R. Ricciardi², A. Lopomo¹, A. Stoccoro¹, R. Gallo¹, M. Maestri², M. Lucchi³, L. Migliore¹

¹*Dip. di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa*

²*Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Osp. di Cisanello, Pisa*

³*Dip. di Patologia Chirurgica, Medica, Molecolare e dell'Area Critica, Università di Pisa*

Thymomas are uncommon neoplasms of the thymus that often originate in patients with Myasthenia Gravis (MG), but little is still known concerning epigenetic modifications occurring in those cancers. We collected DNA samples from 69 surgically resected thymomas from MG patients and from the adjacent normal tissue, available from 44 of them. We also collected blood DNA samples from all the patients. We then investigated global (LINE-1) and gene-specific (MLH1, MGMT, CDKN2A, and RASSF1A) methylation levels searching for differences among healthy and cancerous tissues. LINE-1 methylation was assessed with a commercially available ELISA assay. Gene-specific methylation was investigated with methylation sensitive-high resolution melting (MS-HRM) technique.

We observed a consistent reduction of LINE-1 methylation levels in thymomas with respect to healthy tissues, and particularly an average 30% reduction in type A cancers ($P = 0.005$), and a 20% reduction in type AB ($P = 0.007$). Conversely, type B thymomas (B1-B3) showed no LINE-1 methylation reduction with respect to the healthy thymic epithelial tissue. All the investigated genes were largely hypo-methylated, and no difference in average promoter methylation was observed in the comparison of cancerous and healthy tissues.

In summary, LINE-1 de-methylation occurs particularly in medullary thymomas (type A) and mixed ones (type AB), but not in type B cancers (mainly cortical types). Promoter methylation levels of MLH1, MGMT, CDKN2A and RASSF1A genes are not increased in cancer with respect to healthy tissues and do not correlate with histological or pathological features.

COD. P115

Diagnosi telematica del primo caso italiano di dermatopia restrittiva dovuta a mutazione di ZMPSTE24

C. Cesario¹, E. Pisaneschi¹, A. Diociaiuti², P. D'Amico³, S. Giancristoforo², M.G. Pappalardo³, V. Di Guardo³, G. Zambruno⁴, M. El Hachem², A. Novelli¹

¹*U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", Roma*

²*U.O.C. Dermatologia, IRCCS Ospedale Pediatrico "Bambino Gesù", Roma*

³*Neonatologia e NICU, Ospedale Cannizzaro, Catania*

⁴*Istituto Dermatologico dell'Immacolata, IRCCS, Roma*

La dermatopia restrittiva (#275210) è una rara forma di genodermatosi autosomica recessiva, causata da mutazioni nel gene ZMPSTE24 (*606480) e, meno frequentemente, nel gene LMNA (*150330). Le caratteristiche includono ritardo di crescita intrauterino, pelle sottile, rigida e con lacerazioni nelle aree di flessioni, dismorfismi facciali, anchilosi articolare e prognosi negativa. La nostra probanda, secondogenita di genitori in buona salute di origine Siciliana, presentava pelle rigida, sottile ed erosa, con una vasta lacerazione nella regione sovrapubica, contratture di diverse articolazioni, fontanella ampia, fronte sporgente, ipertelorismo, occhi ruotati verso il basso, impianto basso delle orecchie ipoplasiche, micrognazia, punta nasale e bocca strette, marcata cianosi acrale, capezzoli sporgenti e frattura di ambo gli omeri. Una consulenza telematica è stata richiesta dall'unità di terapia intensiva dell'Ospedale Cannizzaro di Catania al nostro centro di riferimento per le malattie dermatologiche rare e tale collaborazione ha permesso di raggiungere rapidamente il sospetto diagnostico di dermatopia restrittiva, confermato dal test molecolare eseguito mediante esoma clinico (SeqCap EZ Inherited Disease Panel, Roche NimbleGen). L'analisi NGS ha infatti evidenziato la variante patogenetica p.Leu362PhefsTer19 in condizione di omozigosi nel gene ZMPSTE24 (NM_005857.4) ed il sequenziamento Sanger ha documentato la presenza della stessa mutazione in eterozigosi nei genitori. La variante era già stata riportata in pazienti aventi diversa origine geografica rispetto alla nostra probanda, che rappresenta il primo caso italiano di dermatopia restrittiva dovuta a mutazione in omozigosi del gene ZMPSTE24. Particolarmente derimente per questo caso è stata la consulenza telematica, che ha permesso di semplificare ed accelerare il percorso diagnostico, evitando il trasferimento ospedaliero della neonata con implicazioni positive sia per i familiari sia per i costi di gestione della paziente, ad oggi deceduta per insufficienza respiratoria. La caratterizzazione a livello molecolare ha, inoltre, permesso di monitorare la successiva gravidanza della coppia: la variante familiare è stata evidenziata in condizione di eterozigosi nel feto.

COD. P116

Phenotype evolution and health issues of adult patients affected by Beckwith-Wiedemann Syndrome

A. Gazzin¹, D. Carli¹, C. Molinatto¹, S. Cardaropoli¹, A. Mussa², G.B. Ferrero¹

¹*Department of Public Health and Pediatrics, University of Torino, Torino, Italy*

²*Neonatology and Neonatal Intensive Care Unit, Department of Gynecology and Obstetrics, S. Anna Hospital, Città della Salute e della Scienza di Torino, Torino, Italy*

Background: clinical features of Beckwith-Wiedemann Spectrum (BWSp) usually mitigate with age and information about adulthood are scanty. Our study aims to disclose the evolution of BWSp phenotype and its impact on adulthood health issues.

Methods: 30 patients (13 males, age range 18-58, median 28 years) with BWSp were enrolled.

Results: 12 patients presented imprinting centre (IC) 2 hypomethylation, 5 paternal chromosome 11 uniparental disomy, 2 IC1 hypermethylation, 1 11p15.5 chromosomal microduplication and 8 were negative or not tested. Macroglossia was present in 28 patients (requiring surgery in 12 of them), overgrowth in 10, neonatal hypoglycaemia in 10 (persistent in 3), abdominal wall defects in 20 (11 requiring surgery), lower limb length discrepancy in 19 (surgically treated in 6). Final median height SDS was +1,19 with 12 patients presenting tall stature (SDS>2). Nephroblastoma occurred in 3 cases at 2, 3 and 10 years, one patient died of hepatoblastoma at 23 years and one died of leukaemia at 20. One patient had adrenal adenoma and testicular Sertoli cell tumour at 22 and 24 years, respectively. Three patients presented benign tumours (hepatic haemangioma, uterine myoma and mammary fibroepithelioma). Relevant adult health conditions were mostly due to pediatric issues sequelae: painful scoliosis (n=4) secondary to lateralized overgrowth; intellectual disability (n=2) likely secondary to neonatal asphyxia; recurrent urolithiasis (n=5); diabetes mellitus (n=1) due to subtotal pancreatectomy; azoospermia likely consequent to cryptorchidism (n=3). Three patients (2 males and 1 female) had healthy children, 4 physiologically conceived and 1 through in vitro fertilization-embryo transfer.

Conclusions: BWSp patients present several sequelae of developmental defects characterizing the pediatric phenotype, underlying the preventive role of follow-up strategies in childhood. The small number of patients and tumors described do not allow to estimate cancer risk in adulthood but deserve further investigation.

COD. P117

The BAP1-tumor predisposition syndrome: phenotype of novel germline pathogenic variants

L. Pastorino^{1,2}, V. Andreotti^{1,2}, B. Dalmaso^{1,2}, G. Ciccarese^{1,2}, A. Cianflone^{1,2,3}, P. Queirolo⁴, W. Bruno^{1,2}, P. Ghiorzo^{1,2}

¹*Dip. di Medicina Interna e Specialità Mediche, Università degli Studi di Genova*

²*SSD Genetica Dei Tumori Rari, IRCCS Osp. Policlinico San Martino, Genova*

³*Dip. di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili, Università degli Studi di Genova*

⁴*UO Oncologia Medica 2, IRCCS Osp. Policlinico San Martino, Genova*

Germline pathogenic variants in BAP1 (BRCA1-associated protein-1) underlie a recently described cancer predisposition syndrome associated with an increased risk for multiple type of cancers, partly yet to be confirmed as a result of the increase in the number of identified families by large international studies. Cutaneous neoplasias as atypical Spitz tumors (ASTs), melanoma (CM) and basal cell carcinoma but also uveal melanoma, mesothelioma and renal cell carcinoma are among the cancers with the stronger evidences of association with the BAP1-syndrome (BAP1-TPDS). For our diagnostic routine we adopt a melanoma risk customized gene panel that covers the well established CM susceptibility genes, CDKN2A and CDK4, but also candidate genes of recent identification, including BAP1, POT1 and MITF, and novel genes recently associated with melanoma susceptibility but tested in a research context (ACD, TERF2IP, TERT promoter). Out of 25 candidate BAP1-families, (occurrence in proband, affected by melanoma/AST, or in first-degree relative of uveal melanoma, paraganglioma, mesothelioma, AST or clear cell renal carcinoma, as proposed in Leachman et al, Cancer Metastasis Rev. 2017), we identified 5 (20%) novel germline null variants. In three of these families loss of expression of BAP1 in ASTs or mesothelioma tissue was also verified by immunohistochemistry (IHC). The overall burden of BAP1 pathogenic variants in our unselected melanoma families negative for pathogenic variants in other predisposition genes is 2% (5/250). The identification of carriers of BAP1 pathogenic variants allowed the early identification of other carriers in their families with a potential clinical benefit to be evaluated over time. Inclusion in BAP1-specific follow-up protocols led to the early identification of a mesothelioma in a carrier affected by CM. A number of research issues need to be addressed through national and international collaborative studies, which are coming up, for this novel TPDS: the ambiguous pathological classification of ASTs, to be improved by central revision and IHC for BAP1, and their pathodiagnostic role for the syndrome; functional assays to interpret missense VUS; the full determination of the spectrum of tumours associated with the syndrome.

COD. P118

THE FIRST CASE OF PAPILLARY THYROID CARCINOMA IN A PATIENT WITH SYNDROMIC FORM OF PRIMORDIAL DWARFISM

I. Ivanovski¹, S.G. Caraffi¹, A. Frasoldati², S. Rosato¹, L. Matalonga³, A. Lauriello¹, S. Giangiobbe¹, S. Bernasconi⁴, L. Garavelli¹

¹*Medical Genetics Unit, Maternal and Child Health Department, AUSL-IRCCS of Reggio Emilia, Italy*

²*Endocrinology Unit, AUSL-IRCCS of Reggio Emilia, Italy*

³*CNAG-CRG, Centre for Genomic Regulation (CRG), Barcelona Institute of Science and Technology (BIST), Barcelona, Spain*

⁴*Pediatric Department, University of Parma, Italy*

Dr Alsazia M Money (Alsazia – the Italian word for Alsace, former region in Eastern France) is an anagram of a rare form of autosomal recessive microcephalic primordial dwarfism.¹ To date, no more than 15 cases have been reported, the majority of them of Saudi Arabian origin. The condition is characterized by short stature, intellectual disability and distinct dysmorphic facial features (coarse face, short down-slanting palpebral fissures, thick everted lips, micrognathia, and microcephaly). Other reported features include skeletal findings (e.g. scoliosis), involuntary hand movements, hypersensitivity to stimuli and behavioral problems, such as anxiety. The third child of non-consanguineous Italian parents presented with low birth weight and cryptorchidism. At the age of 9 months, he developed a tremor of the hands and feet, which remains present to date. He presented coarse face, delayed psychomotor development (autonomous walking at 2 years, poorly developed language), intellectual disability, behavioral disturbances and short stature. His final height and weight are well below 3° centile. At the age of 15 years, he was operated on for papillary thyroid carcinoma (PTC). Whole exome sequencing and subsequent segregation analysis revealed two variants in compound heterozygosity in the 7PRAL (anagram!) gene: paternally inherited c.[892_895dupAGCA] p.(Ser299Lysfs*4), and maternally inherited [1087_1091delCATAA](His363Argfs*4). None of the variants have been reported to date. In accordance with early development of PTC in our patient, a Chinese group recently published an article in which they reported significantly downregulated expression levels of 7PRAL (anagram!) in a series of PTC tissues and cell lines.²References : 1 :10.1002/humu.22175 2 : 10.3892/mmr.2018.8856

COD. P119

The prognostic challenge of unbalanced X-autosome translocations – Report of a family of carriers

C. Ciaccio¹, S. Redaelli², S. Marelli³, F. Crosti⁴, E. Sala⁴, U. Cavallari¹

¹*SS Genetica Medica, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano*

²*Dip. Medicina e Chirurgia, Univ. Milano-Bicocca, Monza*

³*Centro Malattie Rare, Marfan Clinic, UO Cardiologia, ASST Fatebenefratelli-Sacco, Milano*

⁴*US Genetica Medica, UO Anatomia Patologica II, ASST-Monza Ospedale San Gerardo*

Unbalanced X-autosome translocations are challenging cases to solve in prenatal and postnatal diagnosis. We report the case of a family with four women, in three different generations, carrying an unbalanced t(X;7) with a derivative X;7 chromosome, resulting in a 23.4 Mb deletion in Xq26.2q28 and a 11.7 Mb duplication in 7q35q36. The karyotype analysis was first performed on chorionic villus sampling following a pathological 1st trimester screening showing an increased NT measure. Parental and relative testing was performed, and revealed the same alteration in the mother, aunt and grandmother of the fetus. The baby was born at 39+1 GW with normal neonatal parameters and no clinical problems, except for a PFO and a small ASD. At last evaluation (4 months old), she appeared as a healthy infant, with regular anthropometric and psychomotor development. The mother of the child, 30 years old, was diagnosed with a diminished ovarian reserve and Sjogren syndrome. The aunt, 32 years old, experienced premature ovarian failure (POF) at the age of 30 and episodes of mild dissociative disorder; she also suffers from hypothyroidism, bilateral retinal detachment, allergic asthma, lichen planus, and cervical disc herniation. The grandmother, 60 years old, also has hypothyroidism and bilateral retinal detachment; her two pregnancies were spontaneous and she did not experience POF. Individuals with t(X;autosome) are rarely described and in most cases the translocation is balanced, without loss or gain of genetic material. In our case, both the 7q duplication and the Xp deletion are quite big, spanning more than 10 Mb. When a t(X;autosome) is present, the phenotype mostly depends on the size of the deleted/duplicated fragments and from the X-inactivation pattern. When the pattern is skewed, the normal X is expressed in most cells and the translocated one mostly silenced, attenuating the phenotypic effect of the unbalance. In the family here described four women carry the same anomaly and none of them has ID or severe health problem. We believe it's important to describe such cases, as they can be of help to guide the difficult and challenging consult about these rare cytogenetic anomalies in prenatal diagnosis.

COD. P120

CAUSE GENETICHE DIFFERENTI IN PAZIENTI CON FENOTIPO RETT/RETT –LIKE

F. Cogliati¹, M. Masciadri¹, V. Giorgini¹, M. Marchi^{1,7}, M.T. Bonati², A. Peron³, A. Vignoli³, M.P. Canevini³, B. Scelsa⁴, M. Mastrangelo⁴, L. Spaccini⁵, E. Cattaneo⁵, S. Maitz⁶, I. Moroni⁸, M. Pintaudi⁹, E. Veneselli⁹, L. Larizza¹, S. Russo¹

¹*Istituto Auxologico Italiano, IRCCS, Lab. Citogenetica e Genetica Molecolare, Cusano Milanino, Milano*

²*Istituto Auxologico Italiano, IRCCS, Lab. Genetica Clinica, Milano*

³*Centro Regionale per l'Epilessia, ASST Santi Paolo e Carlo, Milano*

⁴*Unità operativa di Neurologia pediatrica-Ospedale V. Buzzi- ASST Fatebenefratelli-Sacco, Milano*

⁵*Servizio di Genetica Medica Dipartimento della mamma, donna, bambino. Ospedale V. Buzzi- ASST Fatebenefratelli-Sacco, Milano*

⁶*Ambulatorio di Genetica Pediatrica, Clinica Pediatrica, Fondazione MBBM, Monza*

⁷*Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano*

⁸*Divisione Neuropsichiatria Infantile, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano*

⁹*UO NPI Istituto Giannina Gaslini, Genova*

La sindrome di Rett (RTT, MIM 312750) è un disordine del neurosviluppo che colpisce prevalentemente i soggetti di sesso femminile, caratterizzata da un normale sviluppo nei primi 6-18 mesi di vita, seguito da un profilo di regressione caratteristico. E' divisa dal punto di vista clinico in forme classiche o atipiche secondo i criteri diagnostici rivisitati da Neul nel 2010. Mutazioni nel gene MECP2 sono responsabili del 97% circa delle forme classiche e sino all'86% delle forme atipiche; forme atipiche con insorgenza precoce di epilessia che anticipa la regressione possono essere dovute a mutazioni de novo in CDKL5, mentre in quelle con regressione molto precoce senza un periodo sviluppo normale (varianti congenite) sono state identificate mutazioni in FOXP1. Circa 3-5% di pazienti Rett (classiche o varianti) rimane senza diagnosi molecolare. Nel nostro laboratorio attraverso approccio NGS (WES o Custom Panel) in 9 pazienti di sesso femminile che soddisfacevano i criteri principali per la diagnosi di RTT, classica o atipica, e presentavano un numero variabile di criteri di supporto, ad eccezione della presenza di una franca regressione documentata, è stata identificata una causa genetica atipica. Sei pazienti avevano una mutazione de novo in STXBP1, ad oggi identificato come gene causativo in soli 4 soggetti con fenotipo RTT: 3 missenso, 2 varianti di splicing che producono trascritto aberrante ed una variante di stop. In due pazienti è stata identificata una mutazione de novo nel gene GABRG2, di cui una a mosaico sia su sangue periferico che su saliva, gene in genere associato ad un quadro epilettico da benigno a severo sino a fenotipo Dravet e a nostra conoscenza mai associato a RTT. Infine in un caso è stata identificata una mutazione in GABRB2, sinora identificato come causativo in una sola altra paziente con RTT atipica. L'identificazione di varianti patogeniche in pazienti con fenotipo RTT/RTT like di geni normalmente associati ad altre sindromi sottolinea l'eterogeneità genetica di tale fenotipo clinico, l'importanza di un approccio diagnostico NGS e lo screening di questi nuovi geni candidati in pazienti negative ai 3 geni normalmente causativi.

COD. P121

Identification, molecular characterization and segregation analysis of variant DMPK premutation alleles in an Italian family

L. Fontana¹, I. Bagni², M. Santoro³, F. Peluso⁴, A. Morrone⁵, M. Donati⁵, G. Novelli^{1,2}, L. Dosa⁶, A. Botta^{1,2}

¹*Dept. of Biomedicine and Prevention, Medical Genetics Section, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy*

²*Laboratory Medicine Department; Medical Genetics Section, Tor Vergata Hospital, Rome, Italy*

³*Don Gnocchi Foundation, Milan, Italy*

⁴*Genetics and Molecular Medicine Unit, Dept. of Experimental and Chemical Biomedical Sciences "Mario Serio", University of Florence, Florence, Italy*

⁵*Paediatric Neurology Unit and Laboratories, Neuroscience Department, Meyer Children's Hospital, Firenze, Italy.*

⁶*Genetics and Molecular Medicine Unit, Anna Meyer Children's University Hospital, Florence, Italy*

DM1 is an autosomal dominant multisystemic disease caused by an unstable CTG repeat expansion in the 3'-untranslated region (UTR) of the DMPK gene. The CTG repeat tract is usually uninterrupted in both wild-type and mutated DMPK alleles, however several independent studies documented the presence of variant expanded alleles containing CCG, CTC and/or GGC interruptions in the regular primary structure of the CTG array. Complex variant repeats were identified either at the 3' and 5'-ends of the expanded tract in DM1 patients of different origin, with an estimated prevalence of 3-5% of cases. To date, very few information is available about the frequency and clinical consequences of premutated DMPK variant allele. In this study, we describe a three-generation Italian family with the segregation of an interrupted DMPK allele within the premutation range, detected by bidirectional Triplet Repeated-Primed PCR (TP-PCR). TP-PCR with primers complementary to CCG repetitions and direct sequencing allow to identify a heterotriplet (CTG)₆(CCGCTG)₁₅(CTG)₅ repeat structure. Haplotype analysis demonstrated that this variant allele is associated with the European founder DM1 haplotype containing the 1 Kb Alu insertion polymorphism. Bisulfite pyrosequencing of the CpG islands contained in the regions flanking the CTG array, did not show an in cis effect of the CCG interruptions on the methylation profile of the DM1 locus. Analysis of two meiotic transmissions, one maternal and one paternal, revealed the intrafamilial stability of the DM1 premutation among relatives. Our findings further support the hypothesis of a stabilizing effect of CCG interruptions on the mutational dynamics of the DM1 locus also in intermediate DMPK alleles.

COD. P122

Low-level TP53 mutational load in chronic lymphocytic leukemia detected by high-throughput next-generation sequencing

V. Randazzo¹, D. Salemi¹, S. Cannella¹, C. Agueli¹, M.G. Bica¹, L. Cascio¹, A. Marfia¹, C. Russo Lacerna¹, G. Bruno¹, C. Sercia¹, C. Patti¹, F. Fabbiano¹, A. Santoro¹

¹*Dipartimento di Oncologia, AOR Villa Sofia-Cervello, Palermo*

Background: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) displays a very heterogeneous clinical behavior, the worst prognosis is associated with TP53 defects with the affected patients being potentially directed to alternative treatment. To date, the key decision-making biomarkers in CLL are TP53 gene defects, inactivation of the TP53 locus due to del(17p) and/or gene mutation, both associated with a poor outcome. Objectives: The aim of the study is the identification, by next-generation sequencing (NGS), of TP53 mutations with a low variant allelic frequency (VAF) (below the sensitivity of Sanger) that may have a prognostic value and may be selected by the pressure of chemotherapy. Methods: We performed NGS analysis of TP53 mutational status of the entire coding on 318 consecutive CLL patients, referred to our institution for molecular assays. Amplicon-based library was analyzed using Ion Torrent platform. In all cases the minimal coverage obtained was always not less than 100 at all regions and the number of variant reads for reliable variant calling was at least 10, as suggested by ERIC recommendation. Results: A total of 50 TP53 pathogenic mutations in 45 (14%) patients were found: 43 missense substitutions, 3 splice-site, 1 nonsense and 3 indel. A single mutation was detected in 88 % of mutated cases with 12 % of mutated patients presenting 2 or more mutations. Small TP53-mutated subclones (VAF <15%, were disclosed in 11/45 TP53 mutated patients, the subclone is the only detected in 8 of them. All the subclonal TP53 mutation were missense pathogenic substitution included by IARC databases. All mutation were validated by Sanger analysis and the low VAF mutation were validated by a second NGS experiment. Conclusion: TP53 screening has been incorporated into routine clinical diagnostics to improve patient stratification. Sanger sequencing is still a recommended approach, but may underestimate the TP53 status and misclassified some CLL patients. For this reason, the ERIC 2018 recommendation, introduce the NGS technologies as an applicable one. Subclonal TP53 mutations do not represent passenger events and may have the same negative impact on CLL prognosis. Supported by Assessorato alla Salute Regione Sicilia, PSN2013. The UOSD is certified by ERIC

COD. P123

Mutations in MYH7 gene cause both HCM and ARVD phenotypes

V. Ferradini¹, S. Luciano¹, S. Mannucci¹, L. Parca⁴, G. Novelli¹, M. Helmer Citterich⁴, C. Lanzillo³, A. Martino³, L. Calò³, R. Mango², F. Sangiuolo¹

¹*Dept. of Biomedicine and Prevention, University of Rome "Tor Vergata", Rome, Italy*

²*Dept. of Emergency and Critical Care, Polyclinic Tor Vergata, Rome, Italy*

³*Dept. of Cardiology, Policlinico Casilino, Rome, Italy*

⁴*Dept. of Biology, University of Rome "Tor Vergata", Rome, Italy*

Sudden Cardiac Death (SCD) is characterized by a relevant allelic and genetic heterogeneity. Recent papers describe novel overlapping phenotypes for which NGS analysis is necessary for characterizing molecular condition. MYH7 is a gene encoding a myosin heavy chain beta expressed primarily in the heart. Health conditions related to genetic changes in MYH7 are Hypertrophic Cardiomyopathy, Dilated Cardiomyopathy, Left ventricular noncompaction, Myosin storage myopathy, Laing distal myopathy. MYH7 mutations are recognized as origin of severe clinical outcomes and early age penetrance with a high frequency of SCD. The aims of this study is to describe allelic heterogeneity of MYH7 gene. To do this we have analysed a 37-year old female affected by ARVD. The family anamnesis was positive for SCD, 4 cases in the paternal gentleness whose autopsy examination revealed biventricular fibro fatty replacement. The other patient sequenced was a 30-years old female affected by HCM and syncopal episodes for which the ICD was previously implanted. For both a custom panel including 70 genes related to SCD has been used. Moreover Haddock software has been used to evaluate any folding changes within MYH7 protein. Two novel variants have been detected, both located in exon 22 of MYH7. Interestingly the ARVD patient shows c.2630T>C (p.Met877Thr) variant while HCM patient carries a missense variant in the consecutive amino acids c.2632G>T (p.Val878Leu). In silico analysis reported them as damaging. While MYH7 variants are usually associated to HCM phenotype, no variants disrupting MYH7 functionality has never been associated to ARVD condition. Thus we have evaluated Met877Thr role by using Haddock software for docking, assessing its capacity of disrupting the interaction interface among two myosin chain. The complexes between MYH7 and the other two proteins (MYL2 and MYL3) are also destabilized by the Met877Thr variant. This probably causes the expression of ARVD. The other variant shows a destabilizing effect on MYH7 protein, but no binding effect. Adding our two novel variants, up to now five different nucleotide changes associated to SCD have been described as located within this mutational hotspot in MYH7. This study enlarge the spectrum of clinical phenotype associated to MYH7 variants.

COD. P124

The expanding genotype-phenotype correlations of POLG1 gene mutations

E. Borgione¹, M. Lo Giudice¹, S. Santa Paola¹, S.A. Musumeci¹, F. Di Blasi¹, R. Ferri¹, C. Scuderi¹

¹*Oasi Research Institute – IRCCS, Troina, Italy*

Background: The POLG1 gene encodes the catalytic subunit of DNA polymerase gamma, essential for mitochondrial DNA replication and repair. Mutations in this gene compromise the stability of mtDNA causing mtDNA depletion and/or multiple deletions and have emerged as one of the most common causes of autosomally inherited mitochondrial disorders. POLG1-related disorders are associated with a broad spectrum of clinical phenotypes involving multiple organs in both children and adults, with either autosomal recessive or autosomal dominant inheritance. Common clinical phenotypes of POLG1 mutations include Alpers syndrome, progressive external ophthalmoplegia (PEO), SANDO (sensory ataxic neuropathy, dysarthria and ophthalmoplegia), SCAE (spinocerebellar ataxia and epilepsy). Aim: To investigate the genotype-phenotype correlations of POLG1 mutations, we screened a heterogeneous population of patients presenting with multiple neurological and/or extraneurological signs suggestive of mitochondrial disease. Materials and methods: In our patients we performed clinical and genetic studies. Mutations in the POLG1 gene were identified using Sanger sequencing. Results: Ten known POLG1 mutations (S64L, P116Q, R227W, T251I, G268A, G517V, P587L, P648R, Y831C, S1176L) and four new mutations (Q439E, G609V, G723V, R1026C) were identified in 17 patients, whose clinical signs included PEO, spastic tetraplegia, myopathy, polyneuropathy, ataxia and parkinsonism. Intellectual Disability (ID) was present in 11 subjects and one of them presented also autism. Conclusions: Our results expand the genotype-phenotype spectrum associated with mutations in the POLG1 gene and confirms the importance of POLG1 mutations as the underlying abnormality in a range of neurological presentations.

COD. P125

19q13.2 microdeletion: description of a new case and delineation of the minimal critical region

E. Giannusa¹, B.M. Pirola¹, F. Piccini¹, P. Bressan¹, A. Russo Raucchi¹, M. Patricelli¹, M. Ferrari^{1,2,3}

¹*Laboratorio di Biologia Molecolare Clinica e Citogenetica, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano*

²*Università Vita-Salute San Raffaele, Milano*

³*Unità di Genomica per la Diagnostica delle Patologie Umane, Divisione di Ricerca Genetica e Biologia Cellulare, IRCCS Ospedale San Raffaele, Milano*

Few cases of 19q13.2 microdeletion have been already reported, showing Diamond-Blackfan Anemia (DBA), intellectual disability and skeletal malformations. The smallest region of overlap (SRO) described so far includes 5 functionally relevant genes: RPS19, PAFAH1B3, ERF, LIPE and GSK3A. Using array Comparative Genome Hybridization (aCGH) we have identified a male with a de novo microdeletion at 19q13.2, spanning 231kb. Our patient is 30 years old and he had congenital hypotonia at birth. Mixed Germ Cell Tumor of the Testis was diagnosed at the age of 20 years. His distinctive facial features were characterized by hypertelorism, broad and high forehead, epicanthus, macrocephaly. He has cognitive impairments (IQ 45) with an affable and friendly personality. The alteration is the smallest one till now described and it doesn't involve either LIPE or RPS19 (causative of DBA). It further contributes to refine the critical region of this putative syndrome. We propose CIC, ERF and PAFAH1B3 as candidate genes for clinical features observed in these patients.

COD. P126

7p22.3 MICRODELETION: CASE REPORT OF ISOLATED HAPLOINSUFFICIENCY OF SNX8 AND NEUROLOGICAL FINDINGS

A. CAPALBO¹, G. Mastromoro², C.A. Guido³, A. Traversa⁴, A. Giancotti⁵, F. Ventriglia⁶, L. Bernardini¹, A. Spalice³, A. Pizzuti^{2,4}

¹*Cytogenetics Unit, Casa Sollievo della Sofferenza Foundation, San Giovanni Rotondo (FG)*

²*Department of Experimental Medicine, Policlinico Umberto I Hospital, Sapienza University of Rome*

³*Department of Pediatrics, Division of Child Neurology, Policlinico Umberto I Hospital, Sapienza University of Rome*

⁴*Clinical Genomics Unit, Casa Sollievo della Sofferenza Foundation, San Giovanni Rotondo (FG)*

⁵*Department of Obstetrics, Gynecology and Urologic Sciences, Policlinico Umberto I Hospital, Sapienza University of Rome*

⁶*Department of Pediatrics, Policlinico Umberto I Hospital, Sapienza University of Rome*

Rare patients carrying large deletions of 7p22 region have been reported, affected by developmental delay/neurodevelopmental disorders associated with several congenital anomalies, in particular heart defects, but the genotype-phenotype correlation is still uncertain. SNX8 (SORTING NEXIN 8)(*614905), mapping to 7p22.3, was considered the candidate gene for cardiac malformations. We describe the clinical features of a 4 year-old male, the first child of non-consanguineous parents, with a microdeletion at 7p22.3 involving only 11 exons of the SNX8 gene. He was prenatally diagnosed with left kidney agenesis and did not show congenital heart diseases, but learning and language delay. The neurological evaluation showed a deficit of processing speed abilities, which were in the very below range. Severe behavioral problems were evident by neuropsychological assessment, particularly related to the area of Hyperactive-Impulsive and Inattentive. He also suffered from insomnia and recurrent infections. Parental analysis by qPCR and genome-wide SNP-array (Cytoscan HD, Affymetrix) suggested the presence of a mosaic deletion 7p22.3 in the mother. The same deletion was also detected in the third pregnancy of the couple, for whom echocardiography excluded any cardiac involvement. This is the first case of isolated haploinsufficiency of the SNX8 gene. Two previously reported cases with small 7p22.3 deletions showed Tetralogy of Fallot, attributed to SNX8. However, in these patients other genes than SNX8 were involved. The sibs herein described conclusively demonstrating that SNX8 is not a major determinant of the congenital heart disease observed in the 7p22.3 deletion patients. However, the same gene could play an important role in determining cognitive developmental problems, recurrent in these patients.

COD. P127

NEW ACTORS IN ALS PATHOGENESIS: MINCR/MYC AND TRANSCRIPTION PATHWAY.

S. Gagliardi¹, S. Zucca¹, C. Pandini^{1,2}, M. Garofalo², M. Bordoni¹, D. Sproviero¹, V. Fantini¹, O. Pansarasa¹, C. Cereda¹

¹*Genomic and Post Genomic Center, IRCCS Mondino Foundation*

²*2. Department of Biology and Biotechnology "L. Spallanzani", University of Pavia.*

Background. Alteration in RNA metabolism, concerning both coding and long non coding RNAs (lncRNAs), may play an important role in ALS pathogenesis. Moreover, deep transcriptome studies showed numerous data that highlighted deregulation not only in gene known to be ALS linked, but also in gene associated with non-canonical pathways, such as cancer. Some evidences support the idea that cancer and neurodegenerative disorders share some common pathways. Results. About this point, RNA-seq data in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from ALS patients and controls showed an important deregulation in the oncogene c-MYC and also in some transcription factors, such as ZEB1, associated to colon cancer. Interesting, for both c-MYC and ZEB1 gene we have also found deregulated the respective lncRNAs antisense, MINCR and ZEB1-AS. About c-MYC, we have found a down-regulation in ALS of mRNAs MINCR and MYC binding protein, while c-MYC mRNAs has been found up-regulated. Western blotting analysis showed that MYCBP protein levels were reduced in ALS patients, whereas protein levels of c-MYC did not show differences. We have investigated MAX, a protein that interacts with c-MYC for the heterodimer formation; Max immunoprecipitation revealed that c-MYC binds Max more in control subjects than in ALS patients. About ZEB1, ZEB1-AS and its coding gene has been found down-regulated in ALS patients. ZEB1 may act as repressor or activator of transcription, it may repress histones organization or activate chromatin regulators. Moreover, ZEB1-AS has already been characterized in cancer, in fact has been demonstrated that higher expression values of ZEB1-AS promote tumor metastasis. Conclusions. Our data showed an important involvement of tumor actors characterized by a regulation opposite respect what have been described in cancer. This investigation may offer numerous starting points for new investigations about pathogenic mechanism involved in ALS disease.

COD. P128

Obesità in età pediatrica: analisi di riarrangiamenti genomici

I. Stanghellini¹, S.F. Madeo², F. Leo², L. Rocca², S. Ciancia², C. Menozzi¹, L. Iughetti², O. Calabrese¹

¹SSD Genetica Medica, Azienda Ospedaliero Universitaria di Modena

²UOC Pediatria, Azienda Ospedaliero Universitaria di Modena

L'obesità è un' epidemia globale: 9% dei bambini italiani (USA 17%) è affetto e il 21% è sovrappeso. E' una malattia multifattoriale causata dall'interazione tra fattori comportamentali, ambientali e genetici. L'aumento della prevalenza negli ultimi anni si può in parte attribuire ad inadeguata alimentazione e a stile di vita sedentario, ma vi sono sempre più evidenze del ruolo di una componente genetica nello sviluppo dell'obesità. Attualmente una piccola parte di pazienti obesi viene sottoposta a indagini genetiche, in genere per la presenza di dismorfismi associati. Abbiamo analizzato mediante microarray (piattaforma CytoScan-HD, Affymetrix) 43 pazienti obesi selezionati per dismorfismi, iperfagia, mancata risposta alla dieta (BMI SDS 2,69±0.9). Dei 43 pazienti 24 (55,8%) presentano un riarrangiamento genomico. In 8 su 24 (33%) il riarrangiamento può avere una relazione con obesità ed in 1 (4%) la relazione è incerta. I riarrangiamenti che possono avere un ruolo nell'obesità comprendono 4 delezioni e 4 duplicazioni. CNV coinvolgenti più geni sono 2 casi con del16p11.2(813kb e 232kb), descritte in associazione ad obesità infantile e 1 caso di dupXp22.31(1,6Mb) (geni HDHD1,STS,VCX,PNPLA4) in cui l'over-espressione di PNPLA4 è stata correlata ad obesità. Riarrangiamenti di singoli geni comprendono 2 soggetti con dup18q(393 kb) e 1 caso di del7q21.3(55kb) coinvolgenti rispettivamente i geni ONECUT2 e BAIAP2L1, implicati nel signaling dell'insulina. In un caso di dup3q24q25.1(180kb) e in uno di del20q13.13(109kb) i geni coinvolti (CP,STAU1 rispettivamente) sono descritti alterati in pazienti obesi in assenza di meccanismo patogenetico noto. La CNV incerta, del6q21(33kb), comprende il gene LAMA4 che in modelli animali svolge un ruolo nello sviluppo del tessuto adiposo. I nostri dati presentano percentuali di CNV patogenetiche (18%) simili a casistiche selezionate per forme di obesità sindromiche (23%) (Vuillaume ML et al.,2014). L'elevata frequenza di CNV, sia in obesi con dismorfismi (61,9%) che privi (48,1%) giustifica l'esecuzione del test in questi pazienti per consentire l'identificazione di una causa genetica e una miglior gestione. Restano da stabilire i criteri per identificare i soggetti per i quali tali indagini possono essere indicate.

COD. P129

POTOCKI-SHAFFER REVIEW AND CASE REPORT

S. Trajkova¹, E. Di Gregorio^{1,2}, D. Carli³, E. Giorgio¹, C. Mancini¹, E. Pozzi¹, E. Riberi³, E. Chierto¹, M. Ferrero¹, G. Battista Ferrero³, A. Brusco^{1,2}

¹*Department of Medical Sciences, University of Torino, 10126, Turin, Italy*

²*S.C.D.U. Medical Genetics, Città della Salute e della Scienza, Torino, Italy*

³*Department of Public Health and Pediatrics, University of Torino, 10126, Turin, Italy*

Patients with microdeletions encompassing only few genes are rare but informative to identify a minimal candidate region associated with a particular phenotype.

Potocki–Shaffer syndrome (PSS) is a rare contiguous gene deletion involving chromosome 11p11.2. The phenotype is heterogeneous and multiple exostoses, biparietal foramina, and neurodevelopmental delay are cardinal features. Craniofacial abnormalities, epilepsy, tapering fingers, eye and hearing abnormalities, hypothyroidism, immunodeficiency, genital malformations in males have also been reported. Current literature implies a critical minimal region with haploinsufficiency of three genes ALX4 (parietal foramina), EXT2 (multiple exostoses), and PHF21A (craniofacial anomalies, neurodevelopmental delay). Additional clinical features are likely due to the different extension of the associated microdeletions.

We report the third smallest microdeletion partially overlapping the PSS critical region [array [GRCh37] 11p11.2 (45553929x2, 45670806_45993729x1, 46027199x2) dn] in a male patient with developmental delay, intellectual disability, café-au-lait spots and linear postnatal overgrowth. Additionally, in the patient a pharmacoresistant epilepsy WEST-like was present. Principal genes associated with epilepsy were excluded by NGS sequencing.

The deletion encompassed 8 protein coding genes: C11orf94; CHST1; CRY2; GULTL1B; MAPK8IP1; PEX16; PHF21A; and SLC35C1.

A systematic review of the deletions overlapping PSS critical region allowed us to consider CHST1 like a gene-candidate for pharmacoresistant epilepsy. CHST1 is nearly LoF intolerant and is predominantly brain expressed where it is up-regulated by glucocorticoids (a treatment option for pharmacoresistant epilepsy WEST-like). It is involved in the reorganization of the actin cytoskeleton and the integrity of the blood-brain barrier. The proteins of this gene family are involved in the biotransformation and detoxification of many metabolites and end-drug products.

In the literature 40% of the PSS patients with epilepsy/seizures had this gene deleted suggesting on its incomplete penetrance.

COD. P130

Valutazione di CNV in pazienti con disabilità intellettiva/disturbo dello spettro autistico identifica nuovi meccanismi patogenetici e di posizione in geni candidati

G. Rosti¹, S. Bossi¹, M.T. Divizia², L. Pisciotta¹, E. Tassano², M. Servetti¹, I. Serio^{1,3}, M. Lerone², E. Veneselli^{1,3}, P. Ronchetto², A. Puliti^{1,2}

¹*Dip. di Neuroscienze, riabilitazione, oftalmologia, genetica e scienze materno-infantili (DINOGMI), Università di Genova, Genova*

²*UOC Genetica Medica, Ist. Giannina Gaslini, Genova*

³*UOC Neuropsichiatria Infantile, Ist. Giannina Gaslini, Genova*

L'ibridazione genomica comparativa su microarray (array-CGH) è comunemente utilizzata per identificare varianti nel numero di copie (CNVs) in pazienti con disabilità intellettiva (ID) o con disturbo dello spettro autistico (ASD).

Tuttavia, alcune delle CNVs riscontrate non rivestono un chiaro ruolo patogenetico e rimangono pertanto varianti di significato incerto (VOUS).

Abbiamo rivalutato in modo retrospettivo gli esiti delle indagini array-CGH effettuate a scopo diagnostico in 700 casi che presentavano forme di ID o ASD isolate o sindromiche. Abbiamo stimato la patogenicità delle CNVs identificate confrontandole con varianti benigne e patogenetiche riportate nei database internazionali, valutando il coinvolgimento di geni associati a ID/ASD e ricercando i dati pubblicati in letteratura.

Le VOUS che non comprendevano geni o contenevano geni senza espressione/funzione neuronale sono state valutate per un loro potenziale effetto a distanza attraverso il coinvolgimento di Domini Topologici Associati (TADs), Domini Associati alla Lamina (LADs) e altri elementi attivanti la cromatina servendoci del 3D Genome Browser online e dell'UCSC Genome Browser.

Abbiamo identificato CNVs non benigne in 314 pazienti. Tra le varianti patogenetiche e probabilmente patogenetiche (19%), abbiamo trovato CNVs comprendenti geni noti associati a ID/ASD; tra queste, una delezione de novo e due duplicazioni coinvolgono geni le cui mutazioni, recentemente identificate tramite studi di sequenziamento dell'intero esoma (WES), sono state ipotizzate avere un ruolo nei disturbi dello spettro autistico con meccanismo di perdita o acquisizione di funzione. Abbiamo inoltre riscontrato 15 casi con VOUS originate de novo coinvolgenti nuovi geni candidati e/o regioni regolatorie l'espressione di geni noti associati ad ASD, quali una duplicazione comprendente i limiti di due TADs.

COD. P131

Analisi NGS di pazienti con dissecazioni delle arterie cervicali

E. Ronda¹, F. Gotta¹, A. Giossi², A. Pezzini³, P. Cavalli¹

¹*Servizio di Genetica, ASST-Cremona, Cremona*

²*U.O. Neurologia, ASST-Cremona, Cremona*

³*Dip. di Scienze Cliniche e Sperimentali, Clinica Neurologica, Università degli Studi di Brescia, Brescia*

Le dissecazioni spontanee delle arterie cervicali (sCAD) rappresentano una delle principali cause di ictus ischemico in giovane età (20% dei casi). La patogenesi è ancora poco conosciuta, tuttavia difetti molecolari del tessuto connettivo, della matrice extracellulare e della muscolatura liscia possono alterare l'integrità e la resistenza delle pareti vascolari. Varianti in geni coinvolti in questi processi possono essere causa di dissecazione arteriosa o rappresentarne fattori di predisposizione. Al fine di valutare una possibile correlazione abbiamo definito un pannello NGS di 15 geni possibilmente associati a dissecazioni arteriose (ACTA2, COL3A1, EFEMP2, ENG, FBN1, FLNA, MYH11, MYLK, SKI, SLC2A10, SMAD3, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TGFBR2) (piattaforma Ion Torrent PGM-Thermo Fisher Scientific). Sono stati testati ad oggi 36 pazienti, età mediana di 49 anni, con dissecazione spontanea della carotide, dell'arteria basilare o vertebrale, sia in forma sporadica che familiare (2/36). Tutti i casi analizzati sono negativi per i comuni fattori di rischio (fumo, ipertensione, diabete) e non presentano un fenotipo correlato a connettivopatie. Le varianti individuate per la conferma Sanger sono state filtrate per qualità, frequenza nella popolazione, posizione genomica, effetto, significato per i principali database di varianti (ClinVar, HGMD) e score di patogenicità in silico.

Nel gene FBN1 è stata individuata una variante di classe 4 pur in assenza di fenotipo Marfan, mentre altre 11 varianti di classe 3 sono state riscontrate nei geni COL3A1, ENG, FBN1, MYH11, MYLK, TGFB3. Due varianti di classe 2 (geni SKI, FBN1) presentano una frequenza maggiore nella nostra casistica rispetto a quella riportata nei database di popolazione, statisticamente significativa.

L'analisi di questi dati preliminari, in attesa di analizzare un campione con numerosità più elevata, conferma la fattibilità e l'utilità dell'analisi NGS in caso di ictus giovanile sia familiare che sporadico, pur con la necessità di effettuare ulteriori analisi di segregazione familiare.

COD. P132

Next-generation sequencing per la diagnosi molecolare delle patologie autoinfiammatorie

C. Passarelli¹, E. Pisaneschi¹, V. Messia², M. Pardeo², A. Novelli¹, F. De Benedetti², A. Insalaco²

¹*UOC Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma*

²*Divisione di Reumatologia, Dipartimento di Medicina Pediatrica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Roma*

Premessa: Le malattie autoinfiammatorie (AID) rappresentano un gruppo di patologie complesse caratterizzate da infiammazione periodica o cronica, le cui forme differiscono a seconda del meccanismo cellulare coinvolto. Mutazioni in circa 30 geni sono state associate alle AID, sia dominanti che recessive. Il Next Generation Sequencing (NGS) è emerso negli ultimi anni come un ottimo strumento diagnostico in questo campo, consentendo la caratterizzazione molecolare delle diverse forme della patologia e una migliore comprensione della correlazione genotipo/fenotipo dei pazienti.

Scopo dello studio: Il nostro studio mira a implementare e condividere i dati ottenuti da un approccio NGS in una coorte di pazienti affetti da AID di origine non definita, allo scopo di identificare varianti patogenetiche e/o potenziali polimorfismi "di suscettibilità" nei geni associati a AID.

Materiali e Metodi: Abbiamo analizzato 385 pazienti utilizzando un protocollo di Targeted Resequencing su un pannello comprendente i geni principalmente associati a AID (MVK, MEFV, NLRP12, NLRP3, NOD2, TNFRSF1A, PSTPIP1, CECR1). Per il sequenziamento sono state utilizzate le piattaforme MiSeq[®] e NextSeq550[®] Illumina, e tutte le varianti identificate sono state confermate con sequenziamento Sanger. Sono state considerate soltanto le varianti con una frequenza allelica nella popolazione globale fino a 1% e studi in silico mediante i software SIFT e Polyphen sono stati condotti su ciascuna di esse.

Risultati: Nel 34% dei pazienti è stata identificata almeno 1 variante in eterozigosi nei geni analizzati, mentre nel 18% sono presenti varianti in più di un gene. Circa il 90% di queste varianti sono ancora a significato incerto (VUS). Le varianti monoalleliche nel gene NOD2 sono quelle più frequenti, mentre il gene NLRP12 è risultato il gene dominante maggiormente variato nella nostra coorte.

Conclusioni: L'approccio NGS ci ha consentito di identificare un ampio numero di varianti nei geni associati a AID. Varianti in geni differenti potrebbero cooperare per determinare l'insorgenza di un fenotipo patologico specifico oppure, soprattutto se consideriamo le varianti con una frequenza allelica vicino a 1%, potrebbero agire come polimorfismi di suscettibilità piuttosto che come mutazioni causative della patologia.

COD. P133

SINDROME MUIR-TORRE

F. Mannino¹, M.G. Pomponi³, M.R. Nascà⁴, A. Gennaro¹, V. Nicotra¹, F. Guarnaccia¹, M. Genuardi², T. Mattina¹

¹*Genetica Medica- Università di Catania, Dipartimento BIOMETEC, Centro di Riferimento Regionale HUB per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare.*

²*Istituto di Medicina Genomica, Università Cattolica del Sacro Cuore - Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS.*

³*UOC Genetica Medica, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS.*

⁴*Clinica Dermatologica- Università di Catania*

La sindrome di Muir Torre è stata riportata solo in circa 200 casi in tutto il mondo. Ha una trasmissione autosomica dominante, ed è caratterizzata da neoplasie multiple della cute (adenomi, epitelomi, carcinomi e/o cheratoacantomi) associate a carcinomi viscerali che di solito coinvolgono il tubo digerente, la mammella e/o le vie genito-urinarie. I tumori cutanei possono precedere o seguire la prima presentazione dei tumori maligni interni, che di solito sono multipli, esordiscono in età precoce, ma hanno un basso grado di invasività e presentano un'incidenza relativamente bassa di metastasi. La MRTES è considerata una variante clinica della S.di Lynch. Entrambe le patologie, infatti, sono causate da mutazioni germinali nei geni che correggono i difetti di appaiamento nel DNA (MLH1, MSH2 o raramente MSH6). La presa in carico è multidisciplinare, ed include la sorveglianza neoplastica internistica e dermatologica. Descriviamo un paziente di 54 anni, con una storia clinica caratterizzata da neoplasie cutanee multiple (tre epitelomi basocellulari, un carcinoma spinocellulare, due adenomi sebacei, e due cheratoacantomi) comparse in successione a partire dal 2006. Si segnalano inoltre polipi multipli nel colon e carcinoma dell'uretere (comparso nel Giugno 2018). Il fenotipo presentato dal paziente è pertanto compatibile con la sindrome di Muir Torre(MRTES,#158320). La madre del paziente ha presentato carcinoma del colon a 40 anni e dell'utero a 60. L'analisi NGS del gene MSH2 ha evidenziato la presenza in eterozigosi della variante c.278_279delTT (esone 2) che comporta la perdita di due nucleotidi con l'introduzione di un codone di stop prematuro e la probabile formazione di una proteina tronca p.(Leu93Profs*6). Tale variante è da ritenersi patogenetica (classe 5 secondo il sistema IARC-Plon et al 2008, Hum Mutat. 29:1282-1291) in base alla interpretazione del consorzio di esperti InSiGHT. La variante è stata osservata in casi di S. di Lynch, ma non risulta descritta in letteratura in associazione con MRTES.

COD. P134

A CASE OF COFFIN-SIRIS SYNDROME DUE TO A NOVEL SEQUENCE VARIATION IN ARID1B: THE CHANGING SYNDROMOLOGY IN THE NGS ERA

F. Lonardo¹, M.S. Lonardo¹, A. Novelli², E. Agolini², M. Falco¹, P. Fontana¹, D. Cocciadiferro², G. Scarano¹

¹*U.O.S.D. di Genetica Medica, A.O.R.N. "G. Rummo", Benevento, Italy*

²*Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Rome, Italy*

A male patient aged 11 years and 8 months was admitted to our Medical Genetics Unit with generalized developmental delay, autistic traits and dysmorphic features. He was born at 38 ws of gestation to non-consanguineous parents by Caesarean section. Birth weight was 3,370 g (67th percentile), length 47.5 cm (15th), OFC 36 cm (94th).

At the time of our evaluation weight was 46 Kg (75th-90th), height 151 cm (75th-90th), OFC 56.5 cm (>97th). Physical examination showed: vitiligo, locally sparse scalp hair, low frontal hairline, coarse face, arched eyebrows, synophrys, broad nasal bridge, thick alae nasi, narrow nostrils, thin upper lips, thick lower lips, gingival hypertrophy, anteverted ears, slight hypoplasia of the fingernails of some fingers (II-V), knees tendentially flexed.

The patient had already performed diagnostic tests for chromosomopathies, fragile X syndrome, storage diseases, RASopathies, all of which were negative. A Clinical Exome Sequencing detected a heterozygous sequence variation c.4493_4494insCTA (p.Gln1498delinsHisTer) in ARID1B gene. This variation, so far not described in the scientific literature, can be considered likely pathogenic, and is compatible with a diagnosis of Coffin-Siris syndrome (CSS).

CSS (ORPHA:1465) is a rare congenital syndrome characterized by aplasia or hypoplasia of the distal phalanx or nail of the fifth and additional digits, developmental or cognitive delay of varying degree, distinctive facial features, hypotonia, hirsutism/hypertrichosis, and sparse scalp hair. Congenital anomalies can include malformations of the cardiac, gastrointestinal, genitourinary, and/or central nervous systems.

Before the molecular basis was known, the diagnosis of CSS was based on clinical findings, and a hypoplastic fifth finger/fingernail was considered the cardinal sign of CSS (which is also called "fifth-digit syndrome"). With the recent detection of heterozygous pathogenic variations in ARID1A, ARID1B, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, or SOX11 in many individuals with CSS, the diagnostic features have become more clearly described. When exome studies are increasingly performed in patients with an unknown disorder, CSS may be found in more patients, even in cases with milder phenotypes or a non-typical presentation.

COD. P135

A LARGE-SCALE GENETIC ANALYSIS REVEALS AN AUTOIMMUNE ORIGIN OF IDIOPATHIC RETROPERITONEAL FIBROSIS

D. Martorana¹, A. Márquez², F.D. Carmona³, F. Bonatti¹, A. Adorni¹, M.L. Urban⁴, F. Maritati⁴, E. Accorsi Buttini⁴, C. Marvisi⁴, A. Palmisano⁴, G.M. Rossi⁴, G. Trivioli⁴, P. Fenaroli⁴, L. Manenti⁵, M. Nicastro⁴, M. Incerti⁴, D. Gianfreda⁴, S. Bani⁴, S. Ferretti⁵, D. Corradi⁶, F. Alberici⁷, E. Giacomaci⁸, G. Di Scala⁸, G. Moroni⁹, A. Percesepe¹, P.J.J. Scheel¹¹, E. Vermeer¹², E.F. Van Bommel¹², J. Martin², A. Vaglio⁴

¹Medical Genetics Unit, Parma University Hospital, Parma, Italy

²Instituto de Parasitología y Biomedicina Lopez-Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada, Spain

³Departamento de Genética e Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, Granada, Spain

⁴Nephrology Unit, University-Hospital of Parma, Parma, Italy

⁵Urology Unit, University-Hospital of Parma, Parma, Italy

⁶Pathology Unit, Parma University Hospital, Parma, Italy

⁷Nephrology Unit, San Carlo Borromeo Hospital, Milano, Italy

⁸Internal Medicine, University of Firenze, Italy

⁹Nephrology Unit, Fondazione Ca' Granda IRCCS Ospedale Maggiore, Milano, Italy

¹⁰Department of Medicine, Washington University, St. Louis, MO, United States

¹¹Department of Internal Medicine, Albert Schweitzer Hospital, Dutch national center of expertise for retroperitoneal fibrosis, Dordrecht, The Netherlands

Idiopathic retroperitoneal fibrosis (RPF) is a rare fibro-inflammatory disease that frequently causes obstructive renal failure. Environmental and genetic factors play a potential pathogenic role. To investigate the immunogenetic basis of idiopathic RPF, we conducted a large-scale genetic analysis using the Immuchip array on 308 cases and 2,443 controls. We detected genome-wide significant associations within the HLA, particularly with the classical alleles HLA-DQB1*0201 ($p=2.62E-14$, OR [95% CI]=2.44 [1.94-3.07]) and HLA-DRB1*0301 ($p=8.25E-14$, OR [95% CI]=2.45 [1.93-3.09]). After conditioning on HLA-DRB1*0301, no independent signals were found; HLA-DRB1*0301 is a marker of common autoimmune diseases. To explore the contribution of the HLA at the amino acid level, we performed an omnibus association test, which showed that positions 77 and 74 of the HLA-DR β molecule were the most relevant for disease risk. Two amino acid variants at the above positions, Asn and Arg, completely linked, were associated with the disease ($p=5.02E-14$, OR [95% CI]=2.46 [1.95-3.11]). Interestingly, Arg74, located within the peptide-binding groove of the HLA-DR β molecule, is also associated with typical autoimmune diseases (e.g., autoimmune thyroiditis, type 1 diabetes). The effect on RPF risk of Asn77 and Arg74, only present at the classical alleles HLA-DRB1*0301 and HLA-DRB1*0302, was indistinguishable to that conferred by HLA-DRB1*03. Outside the HLA region, a suggestive association was detected for the rs386813511 polymorphism ($p=1.57E-05$, OR [95% CI]=1.49 [1.24-1.78]), located in an intergenic region between the SYNDIG1 and CST7 genes. Our study demonstrates a strong contribution of the HLA to the pathogenesis of idiopathic RPF, and supports the hypothesis of an autoimmune disease.

COD. P136

Cardiopatie congenite sindromiche e sbilanciamenti genomici

S. Briuglia¹, N. Beltrami², A.P. Capra¹, P.D. Romeo¹, E. Ferro², R. Civa¹, C. Di Bella¹, A. Catania², D. Bronzi², I. Aiello¹, M.A. La Rosa¹, C. Campisi², A. Novelli³, S. Alberti¹

¹*Dipartimento di scienze biomediche, odontoiatriche e delle immagini morfologiche e funzionali*

²*L.C. Laboratori Campisi Avola (SR) Italia*

³*Laboratorio di Genetica OPBG Roma Italia*

Introduzione: Con analisi CGH-array abbiamo identificato anomalie genomiche, sindromi da delezione/duplicazione cromosomica, esclusa la sindrome di DiGeorge o del 22q, associate a cardiopatie congenite (CHDs).

Metodi e risultati: nel corso degli ultimi 5 anni, abbiamo diagnosticato n°116 pazienti affetti da sbilanciamento genomico. Abbiamo riscontrato la presenza di malformazione cardiaca nel 58% dei casi. La frequenza di CHDs è stata 50% dei pazienti con riarrangiamento del chr 1 (del1q de novo), 8% dei pazienti con riarrangiamento del chr 2 (del2q de novo), 33% dei pazienti con riarrangiamento del chr 6 (del6q de novo), 37.5% dei pazienti con riarrangiamento del chr 7 (del/dup 7q de novo), 20% dei pazienti con riarrangiamento del chr 8 (dup8p de novo), 25% dei pazienti con riarrangiamento del chr 11 (dup11q paterna), 25% dei pazienti con riarrangiamento del chr 18 (del18q de novo).

Discussione: E' noto che il 25-30% di CHDs sono associate a anomalie extracardiache, nell'ambito di sindromi da del/dup cromosomiche grandi o submicroscopiche e patologie mendeliane. Nella nostra casistica, le cause più comuni di cardiopatia congenita sono rappresentate dai riarrangiamenti genomici. Abbiamo osservato la presenza di CHDs nel 57% dei pazienti con diagnosi di aneuploidia (trisomie) o di del 22q o sindrome di DiGeorge, nel 29% di quelli con patologia sindromica monogenica mendeliana e nel 58% dei pazienti con diagnosi di sindrome da del/dup cromosomica. L'associazione più frequente è stata tra CHDs e sindromi da del1q o del/dup 7q11.2. Segnaliamo quindi una frequenza inaspettatamente alta di sbilanciamenti genomici nei pazienti con CHDs sindromica.

COD. P137

CDKL5 encephalopathy in males: follow up in three patients, new insight in phenotypical spectrum and overview of literature

M. Valente¹, S. Zucca¹, C. Varesio^{2,3}, C. Caporali^{2,3}, A. Asaro¹, V. De Giorgis², S. Masnada^{2,3}, M. Plumari¹, G.S. Grieco¹, L. Pasca^{2,3}, P. Veggiotti⁴, C. Cereda¹

¹Genomic and post-Genomic Center, IRCCS Mondino Foundation, Pavia

²Child and Adolescence Neurology Department, IRCCS Mondino Foundation, Pavia

³University of Pavia, Italy

⁴Child Neurology department, Children Ospital V. Buzzi, Milano

Background: Cycline-dependent-kinase-like 5 (CDKL5) gene (located on chromosome Xp22) encodes for Cdkl5 protein which is an important regulator for neuronal morphogenesis. Mutations in CDKL5 gene have been described in females and male with Early onset Infantile Epileptic Encephalopathy (EIEE). To date less than 30 males have been reported. They showed severe encephalopathy including early onset refractory seizures, no psychomotor development, severe hypotonia, intellectual disability with limited developmental progress. Materials and Methods: DNA of 3 Proband was extracted from peripheral blood and sequenced with Focused Exome (SureSelectQXT-Agilent Technologies) on Illumina MiniSeq sequencer. Pathogenic mutations have been confirmed by Sanger sequencing. Results: We present 3 de novo CDKL5 mutations which have never been described. Patient#1 has c.567_568delA; p.Lys190Serfs*38; patient#2 has c.601-603 del CTT; p.Leu201del and patient#3 has c.65G>T; p.Gly22Val. Our patients presented outbreak of drug resistant epileptic encephalopathy with polymorphic seizure types within three months of life, after a completely normal pre-natal period; only patient#1 started seizures during his first hours of life. They showed epileptic spasms with hypsaritmic EEG pattern. Conclusions: More than 200 mutations have been identified in the CDKL5 gene and no definitive correlation between clinical phenotypes and specific mutations has been established. Patient#3 shows a milder phenotype because has mutation into ATP binding domain while patient#1 showed the most serious phenotype because his mutation causes a frame-shift that creates a premature stop codon. Patient#2 has has a milder phenotype respect to patient#1 because deletion of Leu201 doesn't alter the reading frame. The phenotypical effect of all mutations might be different. Our aim is to demonstrate how the cellular localization of mRNA changes depending on the mutations and to understand if this diffuse cellular localization can influence the phenotypic variability. Finally we want to emphasize that CDKL5 related EIEE should be suspected in any case of early onset seizures, with polymorphic characteristics and tendency to be refractory to pharmacotherapy, associated to severe delay or absence of psychomotor development.

COD. P138

CHILD ABUSE AND MALTREATMENT: Clinical, Genetic and Epigenetic Correlates. ISN-CNR Multicenter Study.

X.G. Pappalardo¹, E. Parano¹, V. Pavone², A.M. Fazio³, G. Trovato⁴, G. Rapisarda³, G. Fichera⁵, S. Cavallaro¹

¹*Istituto di Scienza Neurologiche (ISN), Consiglio Nazionale delle Ricerche, Catania, Italy*

²*Unit of Pediatrics and Pediatric Emergency "C. Gravina", University Hospital "Policlinico-Vittorio Emanuele", Catania, Italy*

³*Child Neuropsychiatry Department U.O.C. NPIA, ASP3, Catania, Italy*

⁴*Hospital of Acireale, ASP3, Catania, Italy*

⁵*Mental Health Department, ASP3, Catania, Italy*

Significant progress has been obtained in the knowledge of mechanisms underlying neuropsychiatric disorders caused by Early-Life Stress (ELS). Research efforts have been focused on detrimental effects of childhood abuse, as a powerful environmental stressor of mental and health consequences. While the association between abuse in childhood and adverse adult health outcomes is well established, this link is infrequently acknowledged in the general medical literature. International strategies in safeguarding of minors promoted by World Health Organization (WHO), Unicef and Terre des Hommes are moving towards more interdisciplinary endeavours that may deliver innovative solutions to the challenges required by such a multifaceted problem, which not longer involves only specialized social service, health, mental health, and justice systems, but rather needs advanced competences in neurogenomics for implementing a new approach more efficient on diagnosis, prevention and personalized therapies. In view of a translational approach, our project was born to pursue two purposes: (1) to provide a broad overview of the research on the long-term effects of child abuse on mental and physical health, including some of the potential molecular pathways; (2) to call for collaborative action among clinicians, psychosocial and biomedical researchers, to take a comprehensive approach to both preventing and dealing with the sequelae of childhood abuse. Here, we describe our progress in the detection of a genomic and epigenomic profile on some candidate genes associated with a distinct type of Post Traumatic Stress Disorder (PTSD), with a specific clinical and neuropsychological pattern, which we first called Child Abuse Syndrome, (CAS), observed in maltreated children and adult survivors of child abuse. We aimed at identify a panel of epigenetic and genetic risk variants associated with CAS in order to implement new pre-emptive measures to: (i) early diagnosis by genomic screening test; (ii) treatment by selecting drugs clinically more responsive and epigenetically active compounds able to revert some aberrant regulation changes in brain, and (iii) rehabilitation to develop new combined therapies according to a biopsychosocial model empowering individual resilience.

COD. P139

Distrofia Miotonica di Steinert e Sindrome X-fragile: due esempi di infertilità femminile geneticamente determinata con outcome sfavorevole in PGT-M

D. Zuccarello¹, C. Patassini¹, L. Girardi¹, V. Romanelli¹, C. Livi², F. Benini², F.M. Ubaldi³, L. Rienzi³, G. Poma⁴, A. Luehwink⁴, F. Cammilli⁵, I. Ramacciotti⁵, F. Brancati⁶, A. Capalbo¹

¹*Igenomix Italia, Marostica (VI)*

²*Centro Procreazione Assistita Demetra, Firenze*

³*GENERA, Centro di Medicina della Riproduzione, Roma*

⁴*Centro provinciale per la procreazione medicalmente assistita, Arco (TN)*

⁵*Centro Futura Diagnostica Medica PMA, Firenze*

⁶*Università dell'Aquila, Dipartimento MESVA, UO di Genetica Medica, L'Aquila*

La diagnosi genetica preimpianto (PGT, Preimplantation Genetic Test) è considerata la forma più precoce di diagnosi prenatale per le coppie a rischio di malattia genetica. In caso di malattia genetica causata da espansione di triplette, la PGT viene eseguita mediante studio dell'aplotipo a rischio, dato che non è tecnicamente possibile in fase di PGT definire numericamente la grandezza dell'espansione. Per alcune patologie, come la sindrome X-Fragile (FRAXA), questo comporta una riduzione del numero degli embrioni potenzialmente trasferibili, poichè vengono giudicati a rischio tutti gli embrioni portatori del cromosoma X a rischio, anche quelli in cui la premutazione del gene FMR1 non si è in realtà espansa. Inoltre, sia nel FRAXA che nella Distrofia Miotonica (DM1) è nota una significativa riduzione della fertilità femminile, in termini di precoce esaurimento della riserva ovarica (POF) e di significative alterazioni metaboliche ed endocrine. Tutto ciò si traduce in un peggioramento dell'outcome riproduttivo delle coppie con tali patologie, ed è questo un dato di cui tenere conto nella fase di consulenza multidisciplinare (genetico-ginecologica) preimpianto. Negli ultimi 3 anni si sono rivolti al nostro Servizio di Consulenza Genetica preimpianto n. 7 coppie con DM1 e 7 con FRAXA, intenzionati ad eseguire una PGT. Per la DM1, 4 coppie avevano partner femminile affetto (una con espansione di classe E2), mentre 3 quello maschile (uno con espansione di classe E2). Cinque coppie hanno già concluso il percorso (3 con gravidanza singola a termine), mentre altre 2 hanno appena concluso la fase di set-up. Per il FRAXA, 6/7 partner femminili avevano una premutazione compresa tra 67 e 88 CGG, tranne una che aveva un genotipo CGG 32/>200 ed era lievemente affetta. Quattro coppie hanno già concluso il percorso (2 con gravidanza singola a termine), mentre altre 3 hanno appena concluso la fase di set-up. 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, rischio elevato di espansione della tripletta in caso di trasmissione materna).

COD. P140

DOPPIE DIAGNOSI E GENI MODIFICATORI: COSA ASPETTARSI NELL'ERA DELLA NEXT GENERATION SEQUENCING

C. Piscopo¹, I. De Maggio¹, A. Terracciano², L. Vicari¹, M. Tarsitano¹, m. Chetta¹, A. Novelli², M. Della Monica¹

¹*U.O.C. Genetica Medica e Di Laboratorio, A.O.R.N. A.Cardarelli, Napoli*

²*U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCCS, Roma*

L'utilizzo esteso della Next Generation Sequencing (NGS) nella Genetica Medica ha prodotto un incremento delle diagnosi molecolari di difficile previsione clinica. Tuttavia sarebbe lecito aspettarsi dall'utilizzo di tale metodica anche un aumento delle diagnosi contemporanee di due malattie genetiche (doppia diagnosi), essendo simultaneamente analizzati decine o centinaia di geni causativi di patologie più o meno simili. Relativamente frequente, inoltre, potrebbe essere il riscontro di più mutazioni potenzialmente patogenetiche e della conseguente difficoltà nel discernere tra la variante che produce maggiore effetto clinico rispetto a quella o quelle che possono essere considerate minori o semplicemente modificatrici del fenotipo. A tal proposito descriviamo il caso B.G., una bambina di 3 anni giunta alla nostra osservazione per ritardo psicomotorio, assenza di linguaggio, epilessia farmaco-resistente, disturbi del comportamento, incoordinazione motoria e dismorfismi. L'esame tramite NGS di circa 35 geni potenzialmente associati al quadro clinico osservato mostrava la presenza della variante genomica de novo c.3583-6 G>A in eterozigosi del gene SYNGAP1 e la presenza della variante genomica c.1625 G>A (p.Arg542Gln) in eterozigosi nel gene SCN1A, trasmessa dal padre sano: entrambe le mutazioni risultavano già descritte in letteratura. La mutazione c.3583-6 G>A del gene SYNGAP1 è riportata come causativa di ritardo mentale moderato, assenza di linguaggio, disturbi del comportamento e sindrome cerebellare; la mutazione c.1625G>A del gene SCN1A è stata invece associata ad epilessia idiopatica e/o autismo, seppure con penetranza incompleta. In questo caso, quindi, non è stato possibile concludere con certezza per una doppia diagnosi nella probanda o per la presenza di una singola malattia genetica dovuta alla mutazione de novo, aggravata clinicamente dalla presenza di una seconda mutazione a penetranza incompleta ed espressività variabile. L'osservazione del quadro clinico permetterà di definire meglio il ruolo delle singole varianti. Questo caso suggerisce pertanto che con l'aumentare dell'utilizzo delle tecniche di NGS dovrebbe corrispondere da un lato l'aumento delle doppie diagnosi genetiche, dall'altro una maggiore conoscenza di geni modificatori del fenotipo.

COD. P141

Hepatocyte nuclear factor-1 β (HNF-1 β) e la difficile correlazione genotipo-fenotipo: un interessante sviluppo nell'inquadramento delle condizioni correlate

R. Artuso¹, V. Palazzo¹, S. Landini², M. Pantaleo¹, S. Guarducci¹, B. Lucherini¹, L. Giunti¹, A. Provenzano², A. La Barbera², P. Reho², I. Sani¹, L. Dosa¹, S. Bargiacchi¹, G. Traficante¹, E. Andreucci¹, F. Peluso², A. Pagliuzzi², G. Forzano², F. Becherucci³, P. Romagnani³, S. Giglio^{1,2}

¹SOC Genetica Medica AOU Meyer, Firenze

²Dip. di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche. Università degli Studi di Firenze, Firenze

³SOC Nefrologia e Dialisi, AOU Meyer, Firenze

Hepatocyte nuclear factor1 β (HNF1 β) è un fattore di trascrizione regolatorio chiave per l'espressione tessuto-specifica in cellule epiteliali di rene, pancreas, fegato e tratto genito-urinario. HNF1 β coordina reti trascrizionali coinvolte nella nefrogenesi, differenziazione epiteliale, trasporto tubulare e metabolismo intrarenale. Pertanto, pazienti con mutazioni eterozigoti possono presentare fenotipi renali complessi. Studi genotipo-fenotipo non evidenziano correlazione tra tipo di mutazioni e tipo e/o gravità della malattia renale, e pazienti con stessa variante mostrano variabilità inter/intrafamiliare. Inoltre, sono note mutazioni in soggetti con ipomagnesiemia e ipopotassiemia e delezioni eterozigoti sono associate, oltre che a RCAD (sindrome da cisti renali e diabete, nota anche come MODY5), alla Prune-Belly, sindrome con carenza/ assenza di muscolatura della parete addominale, dilatazione del tratto urinario e criptorchidismo. La nostra casistica consta di 15 pazienti: 8 con delezione 17q12 (~1.3 MB), contenente HNF1 β , che è l'alterazione maggiormente associata a RCAD e 7 con mutazioni puntiformi. Una variante è stata identificata in epoca prenatale in feto con ipercogenicità renale e cisti che ponevano sospetto di rene policistico. La gravità del quadro renale è variabile senza differenza tra pazienti con mutazioni puntiformi e delezione. L'iperglicemia era conclamata in 6 casi d'età tra 13-40 anni, tipico nel MODY5. Altri mostrano fenotipo CAKUT, confermando l'estrema eterogeneità. Chiarire gli step che influenzano la trascrizione mediata da HNF1 β potrebbe spiegare la diversità. Innanzitutto, varianti nelle proteine interagenti con HNF1 β possono influenzare l'espressione di geni bersaglio. In base alla fase di sviluppo, la capacità di proteine regolatrici di legare HNF1 β potrebbe causare ipoplasia o cisti. In secondo luogo, le varianti in alcuni domini influenzerebbero l'espressione del gene e delle proteine regolatrici e/o la stabilità dell'mRNA. Infine, varianti della linea germinale o de novo in geni dei pathway di HNF1 β possono contribuire alla variabilità. Per provare l'ipotesi di effetti modificatori, suggeriamo un set di geni che interagiscono con HNF1 β . Lo studio potrebbe indicare nuovi bersagli per il trattamento delle anomalie renali associate

COD. P142

Identificazione di varianti germinali e somatiche mediante NGS in pazienti con feocromocitoma o paraganglioma

M. Grippa¹, G. Dondi¹, R. Zuntini¹, A. De Leo², D. Santini², V. Vicennati³, D. Turchetti¹

¹*U.O. Genetica Medica, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna*

²*U.O. Anatomia e Istologia Patologica, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna*

³*U.O. Endocrinologia, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna*

Nei pazienti con Feocromocitoma (FCC) o paraganglioma (PGL) sono riportate varianti germinali (fino al 40% dei casi) o somatiche (25-30%) in geni coinvolti nella risposta cellulare ipossica (VHL, SDHx, HIF2A, FH, SLC25A11) o nei processi di proliferazione cellulare (RET, TMEM127, MAX). Tali geni sono stati analizzati mediante pannello NGS disegnato ad hoc in 22 pazienti colpiti da FCC (15) o PGL (7) in età compresa tra i 13 e i 77 anni (mediana 41,5). Per 14 pazienti oltre al DNA costituzionale è stato analizzato anche il DNA tumorale. Tre pazienti (14%) sono risultati portatori di varianti germinali classificate patogenetiche nei geni SDHB, SDHD e VHL. Le varianti di SDHB e SDHC erano in pazienti con malattia metastatica e plurifocale in linea coi dati di letteratura. La variante di VHL c.467A>G, identificata in un paziente con FCC diagnosticato a 19 anni, è classificata come patogenetica nei database, ma è risultata presente anche nella mamma e nella nonna materna, asintomatiche a 53 e 76 anni, il che indica quanto meno una ridotta penetranza. Due pazienti (9%) presentavano varianti germinali di significato incerto (gVUS). Tra queste, una paziente con PGL metastatico a 52 anni presentava la variante SDHB c.332C>T, ereditata dalla madre, e riferiva una cugina materna affetta da PGL; la variante presenta LOH nel tumore ed è predetta deleteria dai tool in silico, dati tutti a favore della patogenicità. Una paziente affetta da PGL metastatico a 28 anni presenta invece due gVUS, in HIF2A e TMEM127, quest'ultima predetta deleteria. L'analisi dei tumori ha invece evidenziato una variante patogenetica somatica di RET in un paziente con FCC sporadico insorto a 32 anni (7%), mentre 3 pazienti (14%) sono risultati portatori di VUS somatiche (sVUS). In particolare, la paziente con le gVUS TMEM127 e HIF2A, colpita da PGL metastatico a 28 anni, presentava 9 distinte sVUS, il che suggerisce un difetto di riparazione del DNA degno di ulteriori studi. Complessivamente, il pannello NGS ha evidenziato copertura soddisfacente e sensibilità completa per le varianti dei geni precedentemente analizzati con il test Sanger standard (RET, VHL, SDHB, SDHD). Il tasso di varianti patogenetiche, tuttavia, è inferiore a quello atteso e dovrà essere confermato su un campione più ampio.

COD. P143

IMPIEGO DI CUSTOM PANEL (CP) NEL TUMORE DELLA MAMMELLA EREDITARIO (HBC): COUNSELING E GESTIONE DEL RISCHIO

M. Calvello¹, I. Feroce¹, M. Marabelli¹, E. Marino², E. Belloni², L. Giacobbe², M. Dal Molin², C. Mauro², L. Bernardi², A. Guerrieri-Gonzaga¹, B. Bonanni¹

¹*Divisione di Prevenzione e Genetica Oncologica, Istituto Europeo di Oncologia, Milano*

²*Unità Clinical Genomics, Istituto Europeo di Oncologia, Milano*

PREMESSA

Le mutazioni germinali di BRCA1 e BRCA2, principale causa di HBC, non vengono rilevate in molti casi nonostante una significativa storia personale (PH) e/o familiare (FH) di carcinoma mammario (famiglie BrCa). L'impiego di CP è sempre più considerato, in termini di tempi e costi, una valida alternativa al target gene test (TGT), soprattutto in casi con caratteristiche cliniche miste e dopo un'attenta selezione dei geni da analizzare.

SCOPO DELLO STUDIO

Descrivere limiti e vantaggi dell'uso di CP in famiglie BrCa.

MATERIALI E METODI

Un CP per HBC (BRCA1/BRCA2/PALB2/CHEK2/ATM/PTEN/TP53/CDH1) è stato proposto a pazienti appartenenti a famiglie BrCa afferiti alla nostra Divisione da Gennaio a Luglio 2018. In presenza di storia parzialmente suggestiva di Sindrome di Lynch (LS) è stata proposta anche l'analisi di MLH1/MSH2/MSH6/PMS2/EPCAM e, in caso di FH di melanoma, anche di CDKN2A/CDK4. Il DNA estratto da sangue è stato analizzato mediante Next Generation Sequencing con CP Sophia Genetics e tecnologia Illumina. La selezione dei geni si è basata su indicazione clinica e consenso del paziente.

RISULTATI

Diciotto pazienti hanno accettato di sottoporsi al CP per HBC. I geni della LS sono stati inclusi nel CP di 10 pazienti, CDKN2A/CDK4 nel CP di 7 di questi. Sono state rilevate 5 varianti patogenetiche (VP), di cui due in BRCA2, due in PALB2, una in CDH1 (5/18=28%), e 7 varianti di significato sconosciuto (VUS) (7/18=38%). Le VP di BRCA2 sono state riscontrate in due di sei pazienti eleggibili al test BRCA1/BRCA2 (BRT). Le VP di PALB2 e CDH1 sono state rilevate in tre di 12 pazienti senza criteri per BRT, di cui un soggetto sano (PALB2). La PH e FH del paziente con VP di CDH1 non suggeriva una Sindrome del Carcinoma Gastrico Diffuso Ereditario (HDGC).

CONCLUSIONI

La casistica raccolta finora suggerisce un impiego cauto e attento di CP nel HBC. La detection rate è risultata elevata solo per i geni del CP per HBC. Il TGT resta valido nei pazienti con criteri per il BRT. L'identificazione della VP di PALB2 in un soggetto sano e di CDH1 in un paziente senza storia di HDGC, esempi di complessità nella gestione di counseling e definizione del rischio, indicano al contempo una utilità nel rilevare potenziali condizioni di rischio che resterebbero altrimenti sconosciute.

COD. P144

MOLECULAR ANALYSIS OF TOR1A (DYT1) IN PRIMARY DYSTONIA

F. Fortunato¹, D. Ognibene¹, R. Selvatici¹, M. Neri¹, A. Venturoli¹, P. Rimessi¹, A. Mauro¹, P. Prontera², C. Graziano³, O. Calabrese⁴, S. Bianca⁵, A. Sensi⁶, M.C. Sensi⁷, V. Tugnoli⁷, F. Gualandi¹, A. Ferlini¹

¹*Unit of Medical Genetics, Department of Medical Sciences, University of Ferrara, Ferrara, Italy*

²*Medical Genetics Unit, S. Maria della Misericordia Hospital, Perugia, Italy*

³*Medical Genetics Unit S. Orsola-Malpighi University Hospital, Bologna, Italy*

⁴*SSD Medical Genetics, Mother-Infant Department, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy*

⁵*Genetics Unit, Maternity and Neonatal Department, ARNAS Garibaldi, Catania, Italy*

⁶*Department of Clinical Pathology, Medical Genetics Unit, Pievesestina, Cesena, Italy*

⁷*Neurology Unit, S. Anna Hospital, Ferrara, Italy*

Dystonia is defined as a movement disorder characterized by sustained or intermittent muscle contractions causing abnormal and often repetitive movements, postures or both. Dystonia may be classified as hereditary, acquired or idiopathic (unknown cause, sporadic or familial).

Early-onset torsion dystonia (DYT1) typically presents in childhood or adolescence, affecting one limb and then with a possible progression to generalized dystonia. DYT1 is an autosomal dominant disease caused by mutations in the TOR1A gene: most cases of early-onset generalized dystonia are caused by a 3-bp deletion (GAG) in the gene.

34 TOR1A molecular analysis in dystonic patients have been performed in our laboratory: 32 sporadic cases and 2 familial recurrences with an autosomal dominant pattern. 8 patients presented with a clinical diagnosis of generalized dystonia, 1 of multifocal dystonia, 9 segmental, 8 focal and 8 non-classified dystonia. GAG deletion was identified in a 40-year-old patient with a negative family history. Onset of clinical signs was in adolescence with dystonia in the lower left limb and progression with dystonic tremor of the upper right limb, head and trunk. In 25 sporadic patients in which DYT1 analysis tested negative, molecular analysis of the COL6A3 gene, which is associated with an isolated and autosomal recessive form of dystonia (DYT27), was also performed. Pathogenic mutations were not identified in any of these patients. The two families with familial recurrence are now being investigated with a panel of 24 genes associated with dystonia.

In our experience, DYT1 molecular analysis allowed for the definition of clinical diagnosis of dystonia in only 3% of cases. This finding is probably related to variable age of onset and clinical expression of symptoms in the analyzed cohort. The reported patient with DYT1 mutation has a typical presentation in terms of age of onset, body regions involved and progression to a generalized dystonia. Moreover, our data support the idea, which has recently emerged in literature, that mutations in the COL6A3 gene do not occur at a significant frequency in primary dystonia.

COD. P145

PRECAUZIONI NELLA CONSULENZA PRENATALE PER ATROFIA MUSCOLO SPINALE: LIMITI DELLA MLPA.

C. Piscopo¹, V. Uliana², I. De Maggio¹, L. Vicari¹, M. Tarsitano¹, M. Chetta¹, M. Savarese³, M. Della Monica¹

¹*Unità Operativa Complessa Genetica Medica e Di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Rilievo Nazionale, A. Cardarelli, Napoli*

²*Unità Operativa Complessa Neonatologia, Azienda Ospedaliero Universitaria di Parma, Parma*

³*CEINGE – Biotecnologie Avanzate, D.A.I. Medicina di Laboratorio, A.O.U. Federico II, Napoli*

Descriviamo un caso emblematico relativo alle difficoltà della diagnosi molecolare di Atrofia Muscolo Spinale (SMA) e delle precauzioni da osservare in caso di consulenza genetica prenatale per tale patologia. Presso l'Unità di Neonatologia della A.O.U. di Parma è stata posta diagnosi di SMA tipo 0 per il piccolo C.M., nato a termine di gravidanza normodecorsa che ha presentato da subito grave ipotono, iporeattività, impossibilità all'alimentazione ed insufficienza respiratoria. L'analisi molecolare tramite MLPA da DNA periferico del probando evidenziava la presenza di una delezione in omozigosi del gene SMN1, con assenza di amplificazione per le sequenze esoniche specifiche del gene SMN1 ed amplificazione in duplice copia per le sequenze esoniche specifiche del gene SMN2. Dallo studio molecolare dei genitori, condotto con medesima tecnica, risultava tuttavia una madre con delezione in eterozigosi del gene SMN1 ed un padre con amplificazione in duplice copia per le sequenze esoniche specifiche dei geni SMN1 e 2. I nonni paterni, pertanto, venivano inviati presso la Genetica Medica della A.O.R.N. Cardarelli di Napoli ed eseguivano indagine genetica per SMA. Il risultato della MLPA dei geni SMA 1 e 2 praticato sul DNA del nonno paterno mostrava la presenza di 3 copie degli esoni 7 e/o 8 del gene SMN1 e 2 copie del gene SMN2; la nonna paterna, invece, presentava un genotipo compatibile con la condizione di portatrice eterozigote di SMA poiché con MLPA si evidenziava 1 copia degli esoni 7 e/o 8 del gene SMN1 e del gene SMN2. Al termine delle indagini molecolari quindi si è potuto affermare che con molta probabilità la presenza della duplicazione in-cis del gene SMN1 è responsabile di falso negativo alla MLPA, come nel ramo paterno del caso indice. Tale meccanismo genetico conferisce quindi un importante rischio di errore in caso di consulenza prenatale per coppie a rischio di SMA che abbiano eseguito diagnosi molecolare tramite MLPA, soprattutto se con anamnesi familiare positiva per tale patologia. Il caso descritto sottolinea, inoltre, la già nota difficoltà della diagnosi molecolare della SMA nonché la necessità di approfondimento molecolare in caso di forte sospetto clinico o rischio familiare.

COD. P146

The Arg1038Gly missense variant of NF1 is associated with a mild phenotype characterized by café-au-lait spots without neurofibromas

E. Trevisson^{1,2}, V. Morbidoni^{1,2}, M. Forzan^{2,1}, C. Daolio³, V. Fumini¹, R. Parrozzani⁴, M. Cassina¹, L. Salviati^{1,2}, M. Clementi¹

¹*Clinical Genetics Unit, Dept of Women's and Children's Health, University of Padova, Italy*

²*Istituto di Ricerca Pediatrica, Fondazione Città della Speranza, Padova, Italy*

³*Pediatric Unit, Carlo Poma Hospital, ASST Mantova, Italy*

⁴*Department of Neurosciences, UNiversity of Padova, Italy*

Background: Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal dominant condition caused by inactivating mutations of the NF1 gene. The wide allelic heterogeneity of this condition, with more than 3000 different pathogenic variants reported so far, is paralleled by its high clinical variability, which is observed even within the same family. The definition of genotype-phenotype correlations has been hampered by the complexity of the NF1 gene, the absence of mutational hotspots and the variable timing and nature of the somatic mutation leading to the loss of heterozygosity. Although few exceptions have been recognized, the clinical course remains unpredictable in most patients.

Aims and Methods: We sequenced the NF1 gene in a large series of NF1 patients using different techniques since 2002. When no mutation could be detected or in the presence of variants of unknown significance, MLPA was carried out to search for whole gene or intragenic deletions/duplications.

Results: We identified the missense variant c.3112A>G p.(Arg1038Gly) in a three generation family segregating a CALs-only phenotype. Another unrelated patient of our cohort, who displays a mild phenotype, shows the same substitution. MLPA excluded the presence of deletions/duplications. Both cDNA analysis from patient's RNA and a hybrid minigene assay did not detect any splicing defect. The Arg1038Gly substitution has not been reported so far in any of the available databases, segregates in affected patients in both families and involves a highly conserved residue. Although our data confirm that it does not affect splicing, the molecular mechanism of the mutation remains unknown, given the lack of information about the function of this region of the protein. All the patients examined display a mild phenotype characterized by café-au-lait spots (CALs) with freckling in some cases, but without neurofibromas or other NF1-associated complications.

Conclusions: Our data strongly support a novel correlation between the Arg1038Gly missense mutation and a mild phenotype of NF1, which may have relevant implications for patients and genetic counseling, but also to get insights into the function of neurofibromin. The identification of this rare variant in further families will help to confirm this finding.

COD. P147

THE INTEGRATED MULTIPLE GENETIC APPROACH IMPROVES THE DIAGNOSTIC PROCESS AND PROVIDES A BETTER RISK-STRATIFICATION IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA

R. Cavagna^{1,2}, A. Pansa³, S. Salmoiraghi¹, K. Buklijas¹, A. Michelato¹, L. Zannino¹, T. Intermesoli¹, F. Lussana¹, C. Caprioli¹, P. Stefanoni¹, G. Cassina³, B. Facchinetti³, A. Mosca², A. Rambaldi^{1,4}, U. Giussani³, O. Spinelli¹

¹*U.S.C. Ematologia e Centro Trapianti di Midollo Osseo, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo*

²*Dip. Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti, Università degli Studi di Milano*

³*Citogenetica e genetica medica, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo*

⁴*Dip. Oncologia ed Emato-Oncologia, Università degli Studi di Milano*

Introduction. Acute Myeloid Leukemia (AML) is generally characterized by recurrent chromosomal translocations, gene mutations and/or copy number variations (CNVs). Molecular testing for genetic markers is recommended by all international guidelines for proper diagnosis, monitoring and correct risk-category allocation of AML patients. In the absence of informative genetic lesions the therapeutic decision-making process might become challenging. We report a case of AML in a young adult in which standard genetic analysis, performed at diagnosis according to European LeukemiaNet (ELN), showed no alterations. **Methods.** We analyzed the patient diagnostic bone marrow sample by conventional cytogenetic analysis, fluorescence in situ hybridization (FISH) and standard molecular assays as qualitative PCR and RT-PCR. Then, we performed a capture-based Next Generation Sequencing (NGS) assay, covering 30 genes associated to myeloid malignancies. Libraries were prepared using the Myeloid Solution kit (SOPHiA GENETICS) and paired-end sequenced on the MiniSeq Illumina platform. NGS-derived CNVs results were validated by Comparative Genomic Hybridization (CGH) array (Agilent). **Results.** Cytogenetic analysis performed at diagnosis was unsuccessful and FISH assay for TP53 and KMT2A provided normal results. Molecular evaluation of recurrent fusion genes proved negative and no mutations were identified in NPM1, CEBPA, and FLT3 genes. The NGS assay did not revealed any pathogenic Single Nucleotide Variant or Insertion/deletion, but the CNVs analysis suggested a duplication of KIT and TET2 genes and a deletion of RUNX1 from exon 5 to 8. CGH array confirmed a trisomy of chromosome 4, where KIT and TET2 genes are mapped, and a partial deletion of chromosome 21 containing a portion of the RUNX1 gene. In addition, a partial tetrasomy of chromosome 13 and a partial deletion of chromosome 17 were identified by CGH array. The risk-category of the patient was revised following the ELN guidelines and the treatment was modified accordingly. **Conclusions.** The combination of multiple innovative genetic approaches could help in identifying prognostic markers leading to a proper risk category stratification and a better patient management, especially in those cases in which standard approaches fail.

COD. P148

The role of the clinical geneticist in the exome era: EFTUD2 mutations revealed by single gene sequencing

E. Prada¹, M. Cassina², G. Scuvera¹, B. Beltrami¹, C. Rigon², C. Pinato², P. Marchisio¹, D. Milani¹

¹*Pediatric Highly Intensive Care Unit, Department of Pathophysiology and Transplantation University of Milan, Fondazione IRCSS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy*

²*Clinical Genetics Unit, Department of Women and Children's Health, University of Padova, Padova, Italy*

Mandibulofacial Dysostoses (MFDs) are a group of multiple malformation syndromes characterized by first and second brachial arch anomalies, dysmorphic features and variable systemic malformations including radial ray abnormalities, esophageal atresia, congenital heart and renal disease with very variable expressivity. These conditions are caused by mutations of genes involved into RNA synthesis, ribosome biogenesis, production and function of spliceosome. The most frequent condition is Treacher Collins syndrome (TCS) which manifests with hypoplasia of the zygomatic bones and mandible, coloboma of the lower eyelid, palate and/or lip cleft, choanal stenosis/atresia, ear abnormalities and hearing impairments. Intellect and occipitofrontal circumference are usually in the average range. Here we report two children of 5 years and 15 years old respectively that presented with craniofacial dysmorfism (including malar hypoplasia, microretrognathia and microtia), esophageal atresia or stenosis, mild congenital heart defects, intellectual disability and microcephaly; the 5-year-old child also had epilepsy. Both of the children were referred to our centre with a clinical diagnosis of Treacher Collins syndrome. Based on their clinical features, Mandibulofacial Dysostosis with Microcephaly (MFDM), was suspected and then confirmed by the molecular analysis of EFTUD2 gene (OMIM *603892), a gene encoding for a component of the spliceosome: two de novo mutations were identified. MFDM, also called Mandibulofacial Dysostosis, Guion-Almeida type (MFDGA) (OMIM #610536), is part of MFDs and should be distinguished from TCS. Here we report on two children two novel mutations in EFTUD2 gene and underline the importance of physical examination by the clinical geneticist which allows a correct differential diagnosis of this spectrum of conditions. So in the exome era the clinical geneticists have a key role: from one side they should identify the patients with a definite genetic syndrome and address them to perform the specific genetic test, from the other side they should select more complex cases that need the exome sequencing to have diagnosis.

COD. P149

THE TRANSERI STUDY: EFFECT OF ERIBULIN ON CIRCULATING TGF β AND TNF α IN METASTATIC BREAST CANCER PATIENTS.

O. Garrone¹, C. Lo Nigro^{1,2}, A. Michelotti³, A.M. Vandone¹, A. Abbona¹, C. De Angelis³, F. Tonissi¹, P. Vanella¹, N. Denaro¹, C.M. Merlano¹

¹*Oncology Department, S. Croce & Carle Teaching Hospital, Cuneo, Italy*

²*Laboratory Department, S. Croce & Carle Teaching Hospital, Cuneo, Italy*

³*Medical Oncology, AOU Pisana, Ospedale S. Chiara, ITT, Pisa, Italy*

Background

Eribulin (E) is approved for the treatment of metastatic breast cancer (mBC) patients (pts) after previous exposure to anthracyclines and taxanes. E interferes with microtubules, leading to apoptosis and cell cycle arrest in G2/M, and reverses epithelial mesenchymal transition (EMT) in human cancer cell lines and in mice. Moreover, it reduces metastatization in mice. TGF β , an immunosuppressive cytokine, is a growth factor for cancer-associated fibroblasts (CAFs) and promotes EMT. TNF α synergizes with TGF β to promote EMT. EMT permits cancer cells trafficking thus driving metastatization. Our study investigates the interference among E and TGF β and TNF α levels in pts and the correlation with the outcome and the metastatic spread.

Methods

Blood levels of TGF β and TNF α were determined at baseline, before cycle (C) 3, 5 and at disease progression in mBC pts treated with E at 1.23 mg/m², d 1–8 every 21 d.

Results

We report data on 24 pts who completed C5 or progressed before C5. We did not observe any change in TNF α level during treatment. The median (M) basal TGF β value was higher in pts than in 4 healthy volunteers (M concentration: 232 pg/ml vs 114 pg/ml respectively). We divided our population according to basal TGF β level, above or below M. PFS was similar in the two groups (112 vs 100 d). TGF β increased in 9 pts from basal to C5, and decreased in 15 pts. We observed a numerical difference in PFS between the pts with decreased and increased values (107 vs 82 d respectively). In 8 pts TGF β decreased at each subsequent point. PFS in these pts was 167 vs 84 d in the remaining. Notwithstanding the continuous decline of TGF β , 2 of these pts progressed at C5 (both at CNS). In pts with continuous TGF β decline the M value approaches healthy controls (160 pg/ml [range 303-90] vs 114 pg/ml [range 120-85] respectively). At C5 9 pts did not progress: 3 PR and 6 SD (PFS 175 d). TGF β decreased in all but 2 pts (1PR+1SD). In these 2 pts PD occurred as early as 21 and 30 d respectively from C5. This suggests that there is no correlation between tumor burden and TGF β level.

Conclusions

Basal TGF β does not predict outcome. TGF β changed during treatment with E regardless of tumor load. Our results suggest that TGF β changes might correlate with outcome in mBC.

COD. P150

Un caso di Sindrome di Angelman da madre con Sindrome di Prader-Willi

D. Greco¹, L. Ragusa¹, P. Occhipinti¹, A.A. Costanzo¹, L. Nucifora¹, A. Catania², F. Cali¹, S. Buono¹, C. Romano¹

¹*Oasi Research Institute-IRCCS, Troina (EN)*

²*L.C. Laboratori Campisi, Avola (SR)*

La sindrome di Prader-Willi (PWS) e la sindrome di Angelman (AS) sono patologie del neurosviluppo causate dalla mancanza di espressione di geni soggetti ad imprinting nella regione critica PWS/AS 15q11-q13. Le caratteristiche cliniche della PWS includono ipotonia e difficoltà ad alimentarsi alla nascita, seguiti da ritardo dello sviluppo psicomotorio, iperfagia con conseguente obesità. Altre caratteristiche segnalate sono facies peculiare (fronte stretta, occhi a mandorla, labbro superiore sottile e bocca rivolta verso il basso), mani e piedi molto piccoli, disabilità intellettiva, difficoltà di apprendimento, disturbi comportamentali o problemi psichiatrici gravi, ipogonadismo ipogonadotropo con sviluppo puberale ritardato o incompleto. L'infertilità è una caratteristica costante in entrambi i sessi PWS. Noi riportiamo il caso di una donna di 25 anni affetta da PWS e di sua figlia di 3 mesi con AS. La PWS, è stata confermata all'età di 8 anni dall'indagine di genetica molecolare che evidenziava una delezione di origine paterna di ~4,6Mb nella regione 15q11.1-15q13 (Tipo II). L'analisi di genetica molecolare nella figlia dimostra la delezione ereditata dalla madre della stessa regione. Nella letteratura scientifica sono descritte sei donne con PWS che hanno procreato e solo in un caso si ha la documentazione della nascita di un figlio con AS. Questo nostro caso conferma l'eredità non mendeliana della PWS e della AS e fornisce un'ulteriore prova di possibile fertilità nelle donne PWS. Sugeriamo che sia importante per le donne PWS ricevere un'educazione sessuale, valutare bene in esse le condizioni di fertilità per accedere eventualmente ai metodi contraccettivi e alla consulenza genetica.

COD. P151

A new clinical variant of familial adenomatous polyposis (Gatric Polyposis and Desmoid FAP) is associated with the extreme 3' end germline APC mutation

V. Disciglio¹, A. Stella², F. Cariola¹, C. Fasano¹, G. Forte¹, V. Grossi², P. Sanese², M. Lepore Signorile^{2,3}, A.R. Minafra², V. Celestini^{2,4}, A. Di Carlo¹, A. Manghisi¹, F. Guglielmi¹, C. Lotesoriere⁵, N. Resta², I. Lolli⁵, C. Simone^{1,2}

¹Medical Genetics, National Institute of Gastroenterology "S. de Bellis" Research Hospital, Castellana Grotte (Ba) 70013, Italy

²Medical Genetics, Department of Biomedical Sciences and Human Oncology (DIMO), University of Bari Aldo Moro, Bari 70124, Italy

³Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, 00161 Rome, Italy

⁴Department of Biochemistry and Molecular Pharmacology/Laboratory of Molecular Biology, IRCCS - Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milano, 20156, Italy

⁵Department of Oncology, National Institute of Gastroenterology "S. de Bellis" Research Hospital, Castellana Grotte (Ba) 70013, Italy

Germline mutations of the APC gene, encoding a multidomain protein of 2843 amino acid residues, cause familial adenomatous polyposis (FAP). Several clinical variants of FAP has been correlated to mutations in different APC regions: i) classical FAP with profuse polyposis, is associated with mutations from codon 1250 to 1424; ii) attenuated FAP, is associated with mutations at the extreme 5' (before codon 157) or 3' (after codon 1595) ends of APC and iii) classic FAP with intermediate colonic polyposis, mutations localized in the remainder part of the APC gene with a region (codon 1445–1578) associated with an increased frequency of extracolonic manifestations: desmoid tumors (DTs) and upper gastrointestinal polyposis. Here we report a family whereby a woman developed rectal cancer (64 y.o.) and carried the 3'-end APC truncating mutation (NM_000038.5:c.7709C>A; NP_000029.2:p.Ser2570#). Her three children developed multiple DTs and profuse gastric polyposis at early age (2nd and 3rd decade) in the absence of colonic polyposis. This truncating mutation has been previously identified in a patient without any description of clinical phenotype. So far, only few familial cases with an extreme 3'-end germline APC chain terminating mutations (beyond codon 2000) have been reported with detailed clinical information. Of these, two unrelated probands with truncating APC mutations involving the codon 2645 (p.Tyr2645LysfsX14; p.Tyr2645IlefsX45), were described to have gastric polyposis and DTs in the absence of FAP polyposis. Interestingly an extreme 3' end germline APC mutation, leading to a truncation at codon 2660, has been described in a kindred with DTs and a paucity of colonic polyps. In this family, the presence of gastric polyps were not investigated in the majority of affected members. Our findings provide a proof of evidence that the loss of the 3' distal end of the APC protein could be associated with a new clinical variant of FAP, which we refer as GD-FAP (Gastric Polyposis and Desmoid FAP), characterized by the development of DTs and gastric polyposis in the absence of the colonic features of FAP. The clinical and molecular findings of the present family and a literature review about the genotype-phenotype association in APC mutated patients will be discussed.

COD. P152

EXT2 compound heterozygous missense variants in a second family with SSM syndrome and exostosis: expansion of the phenotypic spectrum and further evidence on disease mechanisms

D. Cocciadiferro¹, M. Gentile², E. Agolini¹, R. Ficarella², E. Ponzi², E. Bellacchio³, M. Antonucci², A. Novelli¹

¹*Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Department of Laboratories, Laboratory of Medical Genetics Unit*

²*ASL Bari, Medical Genetics*

³*Bambino Gesù Children's Hospital IRCCS, Research Laboratories*

Seizures-Scoliosis-Macrocephaly (SSM) syndrome (OMIM 616682) is a multi-organ congenital glycosylation disorder characterized by intellectual disability, macrocephaly, speech delay, facial dysmorphisms and seizures. In 2015, whole exome sequencing analysis identified, in one-affected family, homozygous variants in EXT2 as the main cause of the condition, due to a significant decrease in EXT2 expression. EXT2 codifies for one out of two glycosyltransferases protein, characterized by the exostosin and the glycosyltransferase family 64 domains, involved in the chain elongation step of heparan sulfate biosynthesis, relevant in many physiological processes like morphogenesis and growth factor-induced signalling. Here we report the second SSM syndrome family, harbouring the compound EXT2 missense variant p.Asp227Asn, already associated to hereditary multiple exostosis, and the never described before p.Tyr608Cys variant. In addition to the classical SSM signs, our patients developed multiple exostosis, which were not present in the previously described SSM family. Our finding expands the clinical and molecular spectrum of SSM syndrome showing a possible exostosis genotype-phenotype correlation, suggesting that the presence/absence of the exostosis may depend on the EXT2 variants location inside/outside the exostosin domain.

COD. P153

Adipogenic differentiation of human Amniotic Fluid Stem Cells: the epigenetic impact of Nicotine on fetus.

D. Di Tizio¹, A. Di Serafino¹, P. Upadhyaya¹, P. Ballerini³, L. Stuppia^{1,2}, I. Antonucci^{1,2}

¹*Dept. of Psychological, Health and Territorial Sciences, School of Medicine and Health Sciences, University "G.d'Annunzio" of Chieti-Pescara, Chieti, Italy*

²*Dept. of Neurosciences, Imaging and Clinical Sciences*

³*Stem Tech Group, Center for Aging Studies and Translational Medicine (CeSI-MeT)*

BACKGROUND: Fetal exposure to nicotine has been subject to increasing interest as it still represents a major public health concern. The known effects of cigarette smoking exposure on the developing fetus are considerable and it was recently discovered that in pregnant smokers, levels of nicotine in amniotic fluid are severely elevated. **AIM OF THE STUDY:** This study is aimed to point out the epigenetic effects of maternal smoking during pregnancy on differentiated hAFSCs, in order to deeply understand the effects of Nicotine on fetus. **METHODS:** hAFSCs were cultured up to the 7th passage. After testing Nicotine in three different concentrations (0.01 μ M, 0.1 μ M and 1 μ M) for 6-24-48 hours, hAFSCs were differentiated with adipogenic differentiation medium and adipogenic differentiation medium with Nicotine (0.1 μ M) up to 20 days in order to perform epigenetics and expression studies. **RESULTS:** Expression analysis by quantitative PCR showed the increase in expression of pluripotency-associated genes (OCT3/4, SOX2, KLF4) in the cells treated with nicotine. 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 μ M. As far as adipogenic differentiation is concerned, expression analysis by quantitative PCR showed a decrease in expression of pluripotency-associated genes compared to control. Differentiated cells treated with Nicotine 0.1 μ M also show a decrease in expression of adipogenic differentiation-associated genes compared to differentiated cells without treatment. Promoter specific 5-mC % quantification by Pyrosequencing analysis showed interesting variations in the methylation of OCT4, SOX2, c-Kit and H19 in differentiated cells treated with Nicotine 0.1 μ M. **CONCLUSION:** Nicotine acts epigenetically on the DNA of hAFSCs, even at lower concentrations (0.01 μ M - 0.1 μ M), causing increased pluripotency and thus, making differentiation difficult. hAFSCs may represent an ideal model to understand these in vitro modifications. Next experiments will consist of localization of proteins by flow cytometry and miRNome.

COD. P154

Epigenetics in OSCC: BET inhibitors JQ1, IBET-151 and IBET-762 biological and molecular effects

F. Baldan¹, L. Allegri², C. Mio², M. Lazic³, J. Milasin³, G. Damante²

¹*Dip. Medicina Interna e Specialità mediche, Univ. Sapienza di Roma, Roma, IT*

²*Dip. Area Medica, Università di Udine, Udine, IT*

³*Dip. Genetica Umana, Università di Belgrado, Belgrado, SRB*

Objectives:

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is an extremely aggressive and lethal malignancy of the head-neck region. It is one of the most common cancer worldwide; it is poorly responsive to chemotherapy and, nowadays, surgery remains the sole and principal therapeutic option. In the last few years BET inhibitors (BETis) proved to be promising agents for treatment of several types of cancer. BET inhibitors (BETi) are a class of epigenetic anti-cancer drugs, targeting the Bromodomain and Extra-Terminal (BET) proteins. The latter bind to specific histone acetyl groups modulating gene transcription. Aims of this study were the analysis of both biological and molecular effects of three BET inhibitors (JQ1, IBET-151, IBET-762) in an OSCC cell line (SCC-25).

Materials and Methods:

OSCC cells were treated with three different BET inhibitors (JQ1, IBET-151 and IBET-762) and, first, cell viability, apoptosis and tumor aggressiveness were analyzed to assess drug-related biological effects. Moreover, gene expression evaluations were assessed as molecular mechanisms behind BET inhibition. BETis treatments induced MCM5 downregulation at both mRNA and protein levels. MCM5 silencing reduced cell proliferation, underlining its involvement in the block of proliferation induced by BETi.

Results:

We demonstrated that BET inhibitors treatment induces both OSCC cells death and reduction in tumor aggressiveness. Moreover, we pointed out that BETis-mediated molecular mechanisms in OSCC involves MCM5 regulation.

Conclusions:

This study demonstrate that BET inhibitors treatment induces both OSCC cells death and reduction in tumor aggressiveness. Moreover, we pointed out that the molecular mechanism of action of BET inhibitors in OSCC involves MCM5. Most importantly, this study demonstrates for the first time the anti-tumoral effect of IBET-151 and IBET-762 in OSCC.

COD. P155

Fenotipo clinico certo ma senza conferme dall'analisi del genotipo. Come procedere?

N. Bukvic¹, O. Palumbo², P. Palumbo², M. Carella², M. Castori², F. Susca³, N. Resta³

¹*U.O.C Genetica Medica, Azienda Ospedaliero – Universitaria Consorziale Policlinico di Bari, , Bari, Italia*

²*U.O.C. Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG), Italia*

³*U.O.C Genetica Medica, D.A.I. Patologia Diagnostica, Bioimmagini e Sanità Pubblica, Università degli Studi "Aldo Moro", Bari, Italia*

La sindrome di Bardet-Biedl (BBS) è una ciliopatia con coinvolgimento multi sistemico ed espressione clinica variabile, caratterizzata dall'associazione di obesità, retinite pigmentosa, polidattilia, reni policistici, ipogenitalismo e difficoltà di apprendimento. Inoltre, i pazienti BBS possono presentare anche diabete, ipertensione, cardiopatie congenite, malattia di Hirschsprung e altro. L'ampio spettro clinico osservato nella BBS si associa a una significativa eterogeneità genetica. La malattia è trasmessa per lo più come carattere autosomico recessivo (AR), ma in alcuni casi è stata osservata una trasmissione triallelica [mutazione in omozigosi (2 alleli) in un gene ed una terza in eterozigosi (1 allele) dell'altro gene]. Riportiamo il caso di una paziente, secondogenita di una coppia Italiana non consanguinea, affetta da Obesità, Agenesia Dentaria Multipla, Disturbo di Apprendimento e Retinopatia. In prima istanza si è ipotizzata una ciliopatia ed è stata consigliata l'analisi molecolare mediante NGS di un pannello di distrofie retiniche ereditarie. L'analisi eseguita ha messo in evidenza la presenza in eterozigosi di varianti di sequenza per i geni BBS5, BBS10, RPGRIP1L, RS1 e ALMS1 il cui significato patologico ad oggi rimane incerto (VUS). Si è quindi deciso di eseguire la ricerca di riarrangiamenti genomici mediante SNP-array che però non ha individuato la presenza di micro-delezioni/-duplicazioni patogenetiche. E' stata invece identificata nella regione cromosomica 14q13.2 una duplicazione di ~170 Kb ereditata dal padre che include il gene BAZ1A1 (codifica per un fattore - ACF1 - di rimodellamento della cromatina e di regolazione della espressione di alcuni geni). Anche la duplicazione è interpretabile come variante di incerto significato (VUS) e un eventuale contributo alla patologia della paziente è puramente speculativo.

COD. P156

Leucemia Mielomonocitica Cronica ed Isocromosoma 17q: un caso clinico

S. Grillo¹, G. Cantamessa¹, A. Di Tecco², D. Fantasia², G. Sabbatinelli¹, C. Cantò³, S. Falorio³, E. Pennese³, G. Calabrese^{1,2}

¹*Genetica medica, Dip. Scienze mediche, Orali e Biotec. , Università di Chieti*

²*U.O.S.D Genetica Oncoematologica, Azienda USL Pescara*

³*Dip. Ematologia, Azienda USL Pescara*

Le neoplasie mieloidi con presenza di un isocromosoma 17q isolato rappresentano un'entità clinica non ancora ben definita (Lamprianidou et al., 2017). Le anomalie citogenetiche isolate più comunemente riscontrate nella Leucemia Mielomonocitica Cronica sono: +8 (23%), -Y (20%), -7/7q- (14%), 20q- (8%), +21 (8%), der (3q) (8%) (Wassie et al., 2014). Recenti studi hanno dimostrato come il rilievo dell'isocromosoma i(17)(q10) sia raro nelle Leucemie mieloidi Philadelphia negative, specialmente nelle MDS/MPN e come l'i(17q) isolato giochi un fondamentale ruolo nella rapida trasformazione leucemica in questo gruppo di neoplasie (Kanagal-Shamanna et al., 2012). Nel giugno 2017 è giunta alla nostra attenzione una paziente di 68 anni con diagnosi di LMMC (WHO 2018), in base ai dati clinici ed ematochimici (WBC 82.65 [10³/UI], Hb 7.7 g/dL, GR 2.45 [10⁶/uL], PLT 28 [10³/uL]). La biopsia osteomidollare mostrava il 65% di cellularità; granulopoiesi ricca in precursori ed elementi immaturi con incremento di Monociti CD14+; Eritropoiesi ridotta con precursori; Megacariocitopoiesi con elementi di piccole dimensioni; modesta popolazione Plasmacellulare (<5 %). L'analisi molecolare per le mutazioni MDS/LMA-specifiche risultava negativa. L'analisi citogenetica effettuata su sangue midollare ha mostrato un cariotipo 46,XX,i(17)(q10) in 11 metafasi e 47,XX,i(17)(q10),+mar in 4 metafasi. L'analisi in SKY ha rivelato che il cromosoma marker era costituito da materiale eterocromatico. Durante il ricovero la paziente non rispondeva alla terapia con idrossiurea aggravandosi di conseguenza il suo stato clinico con comparsa di atassia paraneoplastica ed iperpiressia, peggioramento dei valori ematochimici fino al decesso (intervenuto nelle successive 48 h). A nostra conoscenza questo caso costituisce la prima descrizione di una LMMC con i(17)(q10) in assenza di altri riarrangiamenti molecolari. Il presente caso ribadisce il ruolo centrale della citogenetica nella diagnosi, nella gestione e nella prognosi dei pazienti affetti da LMMC.

COD. P157

Primo caso di variante missenso nel gene PSMD12 in un paziente affetto da disturbi del neurosviluppo (NDD)

P. Palumbo¹, O. Palumbo¹, S. Castellana², M.P. Leone¹, E. Di Muro¹, T. Mazza², M. Carella¹, L. Wanda^{3,4}, N. Bukvic⁵

¹*U.O.C Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

²*Unità di Bioinformatica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

³*Istituto di Anatomia Umana e Biologia Cellulare, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

⁴*Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS, Roma*

⁵*U.O.C Genetica Medica, Azienda Ospedaliero – Universitaria Consorziale Policlinico di Bari, Bari*

I disturbi del Neurosviluppo (NDDs) sono una classe eterogenea di patologie che comprende la disabilità intellettiva, i disordini dello spettro autistico, l'epilessia, i deficit di linguaggio e motori, i disturbi di attenzione ed iperattività. Queste condizioni hanno un'incidenza del 2-5% nella popolazione generale e vengono distinte, da un punto di vista clinico, forme sindromiche e non sindromiche. Negli ultimi anni, l'utilizzo nella pratica clinica delle metodiche di sequenziamento di nuova generazione sta fornendo impulso all'identificazione di nuovi geni responsabile di NDD e di nuove varianti in geni candidati. Si descrive il caso di un paziente affetto da una forma sindromica di NDD caratterizzata da disabilità intellettiva medio-grave, ipospadia, denti sovranumerari, piedi piatti, scoliosi e dismorfismi facciali, portatore di una variante missenso nel gene PSMD12 identificata mediante sequenziamento NGS. Tale gene, codificante per una subunità non ATP-asi del regolatore 19S del complesso proteasoma 26S, è stato recentemente descritto come responsabile di una forma sindromica emergente di NDD. Sono stati descritti in letteratura casi di pazienti portatori di delezioni che coinvolgono PSMD12, delezioni multiesoniche e mutazioni nonsense del gene. Tuttavia non sono stati riportati, ad oggi, casi di varianti missenso del gene PSMD12 responsabili del fenotipo clinico. Pertanto, la variante da noi identificata, che risulta essere estremamente rara (ExAC, GNOMAD), interessa un residuo amminoacidico estremamente conservato (PhyloP) ed è predetta come patogenetica dai sistemi di predizione in silico consultati (SIFT, PolyPhen, LRT, MutationTaster, Provean, DANN, CADD), è la prima variante missenso ad oggi descritta. Inoltre, essendo il paziente adulto (19 anni), il presente caso è utile nel fornire informazioni sull'evoluzione del quadro clinico di pazienti portatori di alterazioni di PSMD12.

COD. P158

STUDIO DELL'ESPRESSIONE MITOCONDRIALE IN SOGGETTI CON SINDROME DI DOWN

M. Giambirtone¹

¹*Associazione Oasi Maria SS. IRCCS Troina (En) Italia*

Premessa: La sindrome da Trisomia 21 o Down è causata dalla presenza di tre copie del cromosoma umano HC21, ed è la eziologia genetica più frequente della disabilità intellettiva nell'uomo. Adulti con sindrome di Down (SD) di solito sviluppano cambiamenti neuropatologici tipici del Morbo di Alzheimer (AD) nella quinta decade di vita e le caratteristiche cliniche di AD sono state rilevate nel 75% di tali individui. Inoltre è stata evidenziata che l'alterazione dell'attività del mitocondrio e dei suoi complessi, possano influenzare l'insorgenza precoce dell'Alzheimer in soggetti con SD. Obiettivi della ricerca: L'obiettivo è stato quello di analizzare l'espressione di RNA messaggero mitocondriale (mRNA) nei fibroblasti di soggetti SD, confrontati con i fibroblasti di soggetti normali di controllo (CN). Le subunità mitocondriali studiate sono: ATP6, ATP8, CO1, CO2, CO3, MT-ND1, MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4, MT-ND5 e MT-ND6. Materiali e Metodi: Lo studio è stato condotto su un totale di 16 soggetti: 8 pazienti SD (5 maschi e 3 femmine, fascia di età 25-57 anni) e 8 CN (5 maschi e 3 femmine; fascia d'età 22-55 anni). I soggetti sono stati reclutati presso l'UOC di Pediatria e Genetica dell'IRCCS Associazione Oasi Maria SS., a seguito dell'autorizzazione del Comitato Etico locale (CT2) PROT. 717/C.E. del 14/10/15. Gli esperimenti qRT-PCR sono stati eseguiti utilizzando lo strumento Light Cycler 480 (Roche Diagnostics). Tramite uno studio caso-controllo, in cui i CN sono stati accoppiati per il sesso ed età di +/- 3 anni. Le sonde TaqMan per il geni target ATP6, ATP8, CO1, CO2, CO3, MT-ND1, MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4, MT-ND5, MT-ND6 e il gene di riferimento GAPDH sono state ottenute da Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA). I valori di espressione sono stati calcolati con Light Cycler 1.5 software. Risultati: I risultati degli esperimenti di qRT-PCR, eseguiti sulla casistica oggetto del nostro studio, evidenziano che i geni sottoespressi nei campioni con SD sono stati: ATP6 e CO1 in 4 campioni; CO2, CO3, MT-ND5 e MT-ND6 in 6 campioni, ATP8 in 6 campioni, MT-ND4 in 7 campioni, MT-ND2 e MT-ND3 in tutti e 8 campioni. In tutti e 8 i campioni, la media di espressione di tutti i geni studiati per ciascun campione è risultata inferiore alla media del rispettivo controllo. Conclusioni: La riduzione dei livelli di espressione mitocondriale nei SD può contribuire ad aumentare la suscettibilità all'AD in questi soggetti, anche se sono necessari ulteriori studi per chiarire l'associazione tra espressione genica mitocondriale, SD e suscettibilità AD

COD. P159

Studio di espressione dell'mRNA CDR1 su colture di fibroblasti di soggetti con sindrome di Down.

M.G. Salluzzo¹, M. Giambirtone¹, M. Salemi¹, C. Romano¹

¹*Oasi Research- IRCCS, Troina (EN), Italy.*

Premessa: La sindrome di Down (DS) è la causa genetica più comune di disabilità intellettiva dovuta alla presenza di una copia in più del cromosoma 21, in seguito ad una mancata disgiunzione durante la meiosi materna in circa il 95% dei casi. Il cromosoma soprannumerario è presente anche per effetto della traslocazione di una porzione del cromosoma 21 su un altro cromosoma. Una terza forma è il mosaicismo, in cui solo alcune cellule sono normali. Studi di espressione genica su tessuti di soggetti DS sono stati condotti su sangue intero, fibroblasti e amniociti. Stabilendo un importante effetto di dosaggio genico per il cromosoma 21. L'espressione dei geni del cromosoma 21 è dinamica e complessa, ma non si può escludere che i geni presenti sui cromosomi diversi dal cromosoma 21 possano avere un ruolo nella sindrome di Down, infatti diversi studi hanno dimostrato come le alterazioni nei livelli di espressione di geni non presenti sul cromosoma 21 potrebbe influire sul fenotipo di soggetti DS.

La proteina del gene autoantigen 1 (CDR1) correlato alla degenerazione cerebellare è stata identificata in alcuni pazienti con degenerazione cerebellare paraneoplastica. Oltre il 90% del CDR1 è costituito da 34 ripetizioni in tandem di 6 aminoacidi che presentano un nucleo quasi invariante di residui di glutammina e acido aspartico. Obiettivi della ricerca: Lo scopo del presente lavoro era di valutare la possibile espressione differenziale dell'mRNA CDR1 in fibroblasti di tessuto gengivale di soggetti DS rispetto a fibroblasti di soggetti normali. Materiali e metodi: Presso l' IRCCS di Troina (Italia) sono stati reclutati 16 soggetti Down e 16 controlli con relativo consenso informato. Una sospensione contenente 5 • 10⁶ fibroblasti / ml in terreno di coltura è stata trattata con il RNeasy Mini Handbook (QIAGEN Sciences, Germantown, PA), come da protocollo. La qualità e la quantità dell'RNA sono state controllate mediante spettrofotometria. I livelli di espressione sono state quantificate utilizzando il metodo di $\Delta\Delta Ct$. Il livello di espressione del gene CDR1 è stato normalizzato a livello di GAPDH. I livelli di mRNA sono stati calcolati con il software Light Cyclers 1.5 fornito con LightCycler 480. Risultati: Abbiamo trovato livelli ridotti di mRNA CDR1 in tutti i campioni DS rispetto al relativo controllo e di questi, 7 hanno un livello di espressione inferiore 0,5. Conclusioni: I dati ottenuti da questo studio, suggeriscono che il gene CDR1 è sotto espresso nei fibroblasti dei soggetti Down rispetto ai fibroblasti dei controlli.

COD. P160

Una nuova variante nonsense nel gene PTPRQ causa ipoacusia autosomica recessiva tramite decadimento mediato da un nonsense (NMD)

E. Di Muro^{1,2}, P. Palumbo¹, M.P. Leone¹, S. Castellana³, S. Melchionda¹, S. Vitale⁴, M. Greco⁴, T. Mazza³, M. Castori¹, M. Accadia⁵, M. Carella¹

¹*U.O.C Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

²*Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università degli Studi di Roma "La Sapienza", Roma*

³*Unità di Bioinformatica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo(FG)*

⁴*U.O.C. Otorinolaringoiatria, Ospedale "Vito Fazzi", Lecce*

⁵*Servizio di Genetica Medica, Ospedale "Cardinale G. Panico, Tricase (LE)*

La perdita dell'udito, il deficit sensoriale più comune, colpisce circa 1/500 neonati. La maggior parte dei casi di sordità congenita e/o ad esordio infantile è di tipo non-sindromico e nel 70% dei casi è di origine genetica. In circa l'80% dei casi l'ereditarietà è autosomica recessiva (ARNSHL), mentre nel restante 20% dei casi è autosomica dominante (ADNSHL). Mutazioni diverse negli stessi geni-malattia associati a ipoacusia, possono differire non solo nella caratterizzazione del quadro clinico, ma anche nella modalità di trasmissione. Il gene PTPRQ, localizzato sul cromosoma 12 (12p13.31), codifica per il recettore Q della proteina tirosin fosfato, necessario per il normale sviluppo e funzionamento delle cellule ciliari della coclea. Mutazioni a carico del gene PTPRQ sono responsabili di una forma grave (da moderata a severa) di ipoacusia bilaterale, prelinguale, a trasmissione sia autosomica dominante (locus DFNA73) che recessiva (DFNB84). Tramite sequenziamento NGS di un pannello di 71 geni, associati sia ad ipoacusia sindromica (SHL) che ipoacusia non sindromica (NSHL), è stata rilevata la nuova variante c.87delG (p.Arg29Serfs*4) in PTPRQ (NM_001145026), in omozigosi. Il padre del probando, anch'egli affetto da ipoacusia, riportava la stessa variante in omozigosi, mentre la madre, normoudente, riportava la variante in eterozigosi. Questa nuova variante nonsense risulta essere la prima riportata nell'esone 2 del gene, e determina l'introduzione di un codone di stop prematuro. Abbiamo ipotizzato che questo trascritto potrebbe essere un potenziale target del meccanismo di decadimento mediato da un nonsense (NMD), meccanismo di sorveglianza cellulare che previene l'espressione di proteine tronche.

COD. P161

UNUSUAL FAMILIAR RING CHROMOSOME 8 DUE TO MULTIPLE REARRANGEMENTS

R. Silipigni¹, S. Paganini¹, P. Trevisanutto¹, S. Boito², F. Natacci³, S. Gueneri¹

¹Laboratory of Medical Genetics, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

²Department of Obstetrics and Gynecology 'L. Mangiagalli', Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

³Medical Genetics Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

Small supernumerary ring chromosomes (sSRC) represent a subset of small supernumerary marker chromosomes (sSMC). They are present in 0.05% of newborn infants and in 0.08% of cases screened with standard prenatal cytogenetic methods. Since, rings chromosome 8 of different size are relatively common and they occur in mosaic or non-mosaic conditions, the phenotype of sSRC(8) ranges from almost normal to variable degrees of abnormalities. We present two new patients (mother and daughter) of mosaic supernumerary ring chromosome 8 showing three copy number gains of non contiguous regions of chromosome 8. A cytogenetic analysis on peripheral blood was performed on a 33-year-old normal and healthy female after the detection of a chromosome 5p deletion (Cri du Chat Syndrome) in a first pregnancy. Mosaicism for a ring chromosome was detected: mos 47,XX,+r(?)[65]/46,XX[35]. We performed array comparative genomic hybridization (array-CGH) in order to precisely define the origin of the rearrangement. Array-CGH analysis showed that the sSRC derived from an overall 17,9 Mb non contiguous genomic gains of chromosome 8 at bands p11.22-p11.1 spanning the bases 39782232-43333638, at bands q11.1-q11.23 spanning the bases 47681335-54934102, at bands q13.1-q21.11 spanning the bases 67974438-74731817 involving many OMIM genes. In order to define the origin of the sSRC we performed the karyotype of the parents that was normal showing a de novo origin. This rearrangement derived probably by a chromoanagenesis event. During the second pregnancy the patient requested a prenatal diagnosis on CVS that showed the presence of the same ring chromosome. After a first genetic counseling the couple decided to continue the pregnancy, but needed to be repeatedly supported by the multidisciplinary team until term. Clinical and instrumental evaluation at birth showed a normal and healthy female newborn. At 11 months appropriate physical and psychomotor development was confirmed. This report underlines the evidence that chromosome rearrangements may mask an unsuspected complexity that hamper the management of the prenatal diagnosis, since genotype-phenotype correlation could not be obvious and even big and complex rearrangements may not affect the phenotype.

COD. P162

A NOVEL MUTATION IN ABCC6 GENE CAUSATIVE OF PSEUDOXANTOMA ELASTICUM

G. Contrò¹, R. Tallerico¹, A. Primerano¹, M.D. Ceravolo¹, C. Politi¹, V. Bruni¹, M.D. Nocera¹, F. Fabiani¹, P. Malatesta¹, E. Colao¹, R. Iuliano¹, N. Perrotti¹

¹*Az. Osp. Universitaria "Mater Domini", CATANZARO - U.O. Genetica Medica*

Pseudoxantoma elasticum (PXE) is a heritable disorder due to ABCC6 gene mutations, a member of adenosine binding cassette family involved in the normal development of the elastic tissue. Modification of its function results in a pathological mineralization of connective tissue in a wide range of organs, especially in skin, eye and cardiovascular system. In this report we described a case of a family with two healthy parents and two siblings affected by PXE reported for genetic counselling by the unit of dermatology of our hospital, which show the typical skin marks. H.L., first patient analysed, was a 20 years old girl referred to our unit for the presence of the typical skin alteration located at the back side of the neck, at axilla and on the upper side of the chest. At the physical exam the papules situated at the neck form a plaque with a diameter of 8 cm; the other ones at axilla and chest were as little isolated papules. G.L., patient 1 older brother, showed small yellowish papules at the shoulder and at popliteal fossa. No other sign was detected at the physical examination, neither ocular and cardiovascular signs. The papules sited at popliteal fossa was even interest by an over-infection, maybe due to the friction above the thickness of the skin. Both their parents were healthy at that time. NGS analysis detected a novel c. 4041 G>A mutation in patient 1 as homozygous.

PCR conducted on patient 2 revealed the same mutation as homozygous. After PCR followed by Sanger sequencing their parents resulted as G>G/A heterozygous (healthy carrier). In order to determinate how this mutation affect the structure and function of ABCC6, we performed a RT-PCR on patient 1 demonstrating that it leads to skip of exon 29. The lack of this portion of the protein altered the nucleotide binding folds, critical regions for the ATP transport and it determinates the pathogenicity of the mutation.

COD. P163

Aspetti Genetici in Soggetti con Disturbo dello Spettro Autistico: un Contributo Italiano

A. Frolli¹, A. Ciriello¹, A. Cavallaro¹, F. Piscopo¹, G. Savarese², A. Fico², R. Raffaella², A. Bosco¹, C. Padovano², V. Vivenzio²

¹*Centro di Ricerca sulle Disabilità, Università degli Studi Internazionali di Roma*

²*Centro di Genetica Ames*

Il Disturbo dello Spettro dell'Autismo (ASD) include un gruppo eterogeneo di situazioni cliniche legate al neurosviluppo che si manifestano entro i primi tre anni di vita. Tale disturbo è caratterizzato da una compromissione della comunicazione e dell'interazione sociale, e presenta un pattern di comportamento, interessi e/o attività ristretti, ripetitivi e stereotipati che influiscono limitando il funzionamento quotidiano dell'individuo. Nel 2014 la prevalenza di diagnosi del Disturbo dello Spettro Autistico in 11 stati dell'America era di 1 su 59 bambini di età compresa fino agli 8 anni, con un aumento complessivo del 15% rispetto ai dati di monitoraggio del 2012 (Baio et al., 2018). Si stima che varianti genetiche rare, sia de novo che ereditarie, siano la causa del 10-30% delle persone con ASD (Buxbaum, 2009; Ronemus et al. 2014). Il presente lavoro prende in considerazione una casistica di 200 bambini di età compresa tra 18 ed i 24 mesi e diagnosticati attraverso osservazione clinica, somministrazione di ADI-R ed ADOS-2. Tale casistica è stata sottoposta a screening genetico attraverso Array-CGH ed ha mostrato la presenza di mutazioni (duplicazioni e delezioni nella maggioranza dei casi) per il 36% (72/200 soggetti). Lo studio è stato completato attraverso la valutazione genetica dei genitori per considerare la percentuale di soggetti con mutazioni de novo o ereditarie. Una differenza è stata fatta, infine, tra mutazioni già descritte in letteratura e nuove mutazioni, ovvero tra mutazioni che coinvolgono geni implicati nel neurosviluppo e non.

COD. P164

Discrepancy between Non-invasive Prenatal Genetic Testing (NIPT) and Amniotic Chromosomal Test due to supernumerary marker: A Case Report

G. Savarese¹, T. Suero¹, C. Vicedomini¹, R. Ruggiero¹, I. Pisano¹, P. Savarese¹, L. D' Amore¹, L. De Falco¹, R. D' Angelo¹, C. Ramiro¹, A. Di Carlo¹, L. Circelli¹, E. Evangelista¹, G. Furino¹, A. Fico¹

¹ *Lab. of Medical Genetics, AMES-Centro Polispecialistico Strumentale, srl, Naples, Italy.*

Small supernumerary marker chromosomes (sSMCs) are structurally abnormal chromosomes that occur in addition to the 46 human chromosomes, that cannot be characterized by conventional banding cytogenetics, and that are equal in size or smaller than a chromosome 20 of the same metaphase spread. sSMCs occur in 0.072–0.075% of prenatal cases and 0.044% of newborn cases. Approximately 66.7% of sSMCs are de novo and 30% of the carriers of a sSMC are clinically abnormal. In this study we present the characterization of a case with a small SMC detected by non-invasive prenatal testing (NIPT), causing a partial false positive result. A Caucasian pregnant woman of 40 years old was at 14 weeks of gestation when NIPT was performed. NIPT analysis detected trisomy of the chromosome 13 and the presence of a Y chromosome. QF-PCR on amniotic fluids showed a profile consistent with a fetus disomic for 13,18,21 and confirmed the finding of a Y chromosome. No structural anomalies were found on the ultrasound examination at 18 weeks. However, karyotype analysis on amniocytes revealed the presence of a sSMC, resulted positive on C-banding induced by barium hydroxide and Giemsa, in 40 of the 50 metaphases analysed (mos 47,XY,+mar dn[40]/46,XY[10]). Because the chromosomal origin, size, and degree of mosaicism of the sSMC determine the prognosis, we characterized comprehensively the sSMC for its genetic content by Microarray (CMA) and Fluorescent in situ hybridization (FISH). CMA using SNP-array (HumanCytoSNP-12 BeadChip, Illumina) performed on amniotic liquid as well as on maternal DNA demonstrated no copy number variations. Then, FISH studies, using centromeric probes (ZytoLight Aneuploidy panel 13/18/21) showed that the marker was derived from chromosome 13, partially confirming NIPT result. In conclusion, NIPT can report discordant findings compared to the fetal karyotype arising from different phenomena such as a vanishing twins, confined placental mosaicism, maternal aneuploidy or mosaicism, maternal copy number maternal malignancy, prior organ transplant. Although, cell-free DNA for aneuploidy screening is only recommended for women with high risk of aneuploidy, NIPT can also predict sub-chromosomal abnormalities in the fetus and will be expected to make prenatal testing safer and more informative in the future.

COD. P165

NUOVO CASO DI OSTEOGENESI IMPERFETTA DI TIPO V IN UN PAZIENTE CON UNA VARIANTE PATOGENETICA RICORRENTE DEL GENE IFITM5

M. Falco¹, P. Fontana¹, E. Agolini², D. Cocciadiferro², A. Novelli², C. Lombardi¹, M. Ciavarella¹, M. Maioli¹, G. Cantalupo¹, F. Scarano¹, S. Amabile¹, F. Lonardo¹, G. Scarano¹

¹*U.O.S.D. Genetica Medica A.O.R.N. Rummo (Benevento)*

²*Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Rome, Italy*

L'Osteogenesi Imperfetta (OI) di tipo V è una delle forme più rare di OI a trasmissione autosomica dominante, le cui caratteristiche cliniche sono rappresentate, come nelle forme classiche, da fragilità ossea e bassa statura. Meno frequenti sono la dentinogenesi imperfetta e la presenza di sclere bluastre. A livello radiografico sono tipici l'iperplasia del callo osseo, la dislocazione del radio, la calcificazione delle membrane interossee e le bande metafisarie. L'OI di tipo V è causata da varianti patogenetiche del gene IFITM5, codificante per una proteina coinvolta nella formazione dell'osso e nella maturazione degli osteoblasti; tuttavia, il meccanismo alla base dell'eziologia di questa forma di OI non è ad oggi noto. La maggior parte dei pazienti con OI di tipo V presenta la variante patogenetica c.-14C>T localizzata nella regione 5'UTR del gene. In questo studio riportiamo un paziente giunto in consulenza all'età di 25 anni con una diagnosi di fibrodiplosia ossificante progressiva (FOP), malattia gravemente disabilitante caratterizzata da ossificazione eterotopica progressiva in siti extrascheletrici caratteristici. Il paziente, dai primi anni di vita, ha mostrato difficoltà di pronosupinazione agli arti superiori. All'età di 7 anni ha riportato una frattura del femore sinistro con iperplasia del callo osseo e una frattura spontanea della rotula a 24 anni. All'esame clinico sono emersi i seguenti dati fenotipici: peso 75 Kg (50-75°), altezza 164,3 cm (5°), OFC 57 cm (M/+2DS), morso inverso, deviazione radiale del secondo dito della mano destra, dismetria degli arti inferiori (sn>dx 1,5 cm), difficoltà di pronosupinazione e flessione degli avambracci e di flessione delle anche. Gli esami radiografici hanno mostrato corpi vertebrali biconcavi, iperplasia del callo osseo del femore sinistro e calcificazione della membrana interossea. Nel sospetto di OI di tipo V è stata eseguita l'analisi molecolare del gene IFITM5, che ha rilevato la variante patogenetica c.-14C>T in condizione di eterozigosi. La patologia è estremamente rara ed un corretto inquadramento diagnostico permette un migliore follow-up, oltre alla precisa definizione del rischio di ricorrenza.

COD. P166

PGT per sindrome MELAS: report di analisi allo stadio di blastocisti di un caso analizzato mediante qPCR

D. Zuccarello¹, V. Romanelli¹, C. Patassini¹, L. Girardi¹, F. Benini², C. Livi², A. Capalbo¹

¹*Igenomix Italia, Marostica (VI)*

²*Centro Procreazione Assistita Demetra, Firenze*

La diagnosi genetica preimpianto (PGT, Preimplantation Genetic Test) consente di diagnosticare la presenza di una specifica malattia di cui la coppia risulta essere portatrice allo stadio embrionario, effettuando al contempo la ricerca delle aneuploidie cromosomiche. Le malattie mitocondriali costituiscono una delle possibili applicazioni della PGT, anche se raramente è possibile definire con precisione lo status di embrione "non affetto" dalla condizione, mentre è piuttosto possibile eseguire un "grading" degli embrioni verificando il loro carico mutazionale. La PGT è resa difficoltosa sia dal fenomeno dell'eteroplasmia, ovvero la coesistenza di cellule con DNA mitocondriale (mtDNA) normale e mutato, sia da quello dell'effetto soglia, ovvero il livello critico di mtDNA mutato che causa la manifestazione dei sintomi della malattia. Una coppia con partner femminile affetta da MELAS (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like syndrome) si è rivolta al nostro Servizio di consulenza genetica per effettuare una PGT. Nella signora, di anni 40, è stata riscontrata la mutazione causativa m.3243A>G su sangue periferico, muscolo e sedimento urinario, con percentuale di eteroplasmia variabile (60-70%). In consulenza genetica preimpianto sono stati discussi tutti i punti critici sopra esposti e, dopo il parere ginecologico, si è deciso di avviare il percorso di PGT. La paziente è stata sottoposta a 3 cicli di stimolazione ovarica che hanno prodotto un totale di 6 blastocisti che sono state analizzate. Il rilevamento della mutazione m.3243A>G (tRNA Leu) nel mtDNA è avvenuto mediante sondaTaqMan in real time PCR. Il calcolo del grado di eteroplasmia è stato eseguito con metodo $\Delta\Delta Ct$, confrontando il risultato ottenuto con diluizioni seriali di mtDNA mutato provenienti da sangue periferico, urine e tampone buccale della paziente. In contemporanea è stata valutata la ploidia cromosomica. Il carico mutazionale degli embrioni è risultato essere elevato, compreso tra il 66,05% ed il 97,80%. Cinque su sei embrioni analizzati erano aneuploidi, mentre l'unico embrione euploide aveva un tasso di mtDNA mutato del 91,69%. La coppia, informata dell'esito, ha deciso di non procedere al transfert embrionario.

COD. P167

PMP22 Deletions Involving One or Both Copies Cause Different Forms of Neuropathy: a Familiar Case

C. Meossi^{1,4}, V. Tessarollo¹, E. Finardi^{1,4}, C. Ciaccio^{1,4}, C. Ciano², E. Schiaffi², F. Taroni³, C. Pantaleoni¹, S. D'Arrigo¹

¹*U.O.C. Neurologia dello Sviluppo, Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano*

²*U.O.C. Neurofisiopatologia, Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano*

³*U.O. Lab. di Patologia Clinica e Genetica Medica, Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano*

⁴*Università degli Studi di Milano*

Heterozygous deletions of the gene PMP22 are associated to Hereditary Neuropathy with liability to Pressure Palsies (HNPP), a demyelinating neuromuscular disease causing variable transitory focal muscles weakness. Deletions involving both copies of PMP22 cause more severe phenotypes, with early onset neuropathy and impairment in motor development. We report a patient with Hereditary Motor Sensory Neuropathy type III (HMSN-III), or Dejerine-Sottas disease (DSD), caused by two different inherited deletions of PMP22, whose parents had an HNPP.

The patient was a 3 years old girl with a story of low birth weight, weak suction, difficulties to thrive and uncoordinated swallowing. She showed delay in motor development but normal intellectual abilities. The limbs were hypotonic and weak and deep tendon reflexes were absent. There was an over-pronation of both feet and right eyelid ptosis.

The patient's father had a HNPP with mild transient paralysis in upper limb, caused by a heterozygous 17p11.2 deletion, encompassing PMP22. His brother and sister had the same deletion and variable mild symptoms too. His mother suffered from paraesthesias at both hands and right carpal tunnel. The patient's mother reported no neuropathic symptoms but her two sisters did.

A motor and sensitive conduction study in our patient showed severe signs of demyelination, suggestive for DSD. In a nerve conduction studies parents and several relatives showed signs of sensory-motor deficit with focal slowing of conduction at common sites of entrapment.

Quantitative analysis of PMP22, performed in our patient by multiplex ligation-dependent probe amplification, revealed a compound heterozygote status with the same deletion of the father and a deletion of PMP22 exon 5, after proved to be inherited from the mother and present also in the mother's sisters.

Therefore when we face an early onset, severe form of neuropathy we have to consider rare forms of hereditary neuropathy caused by homozygous or compound heterozygous mutations in PMP22, even if parents are asymptomatic; an exhaustive family history and an electrodiagnostic study are essential to guide genetic tests and to make a diagnosis.

COD. P168

The cytotoxic chemotherapeutic agent bleomycin surprisingly increases cellular proliferation and pluripotency: A study on hAFSCs

P. Upadhyaya¹, A. Di Serafino¹, D. Di Tizio¹, L. Sorino¹, L. Stuppia^{1,2}, I. Antonucci¹

¹*Department of Psychological, Health and Territorial Sciences, Laboratory of Molecular Genetics, School of Medicine and Health Sciences*

²*Stem Tech Group, Center for Aging Studies (CESI); University of Chieti-Pescara, Italy*

Human amniotic fluid stem cells (hAFSCs) are class of cells from amniotic fluid that are considered to be the intermediate between pluripotent and multipotent stem cells. They have been widely used to model many diseases in vitro and in vivo. They express characteristic markers of pluripotency, which includes C-kit, SOX-2, OCT-4 and C-myc. In this study, we have treated hAFSCs for 7 days with least concentration (IC₅) of three chemotherapeutic agents namely bleomycin, Etoposide and Cisplatin (BEP) that are widely used in chemotherapy of some cancers, to check whether BEP has any significant effect on pluripotency on those cells. Our studies demonstrate that all the three drugs are cytotoxic; however, we unexpectedly found that among the survived cells that were treated with bleomycin, the expression of Oct4 and SOX-2 were significantly higher. On the other hand, cisplatin and etoposide treated cells showed downregulation of these markers. To understand it, we examined a panel of 8 miRNAs, in which we found the significant change in the expression of miR-145 and miR-34a, correlating with the OCT-4 and SOX-2 expression. It has been reported in the literature that these two miRNAs are associated with regulation of pluripotency as well as proliferation. In conclusion, we proposed that although bleomycin is cytotoxic, the drug-induced cytotoxicity activates miRNA induced defence mechanism in the hAFSCs, which helps to increase pluripotency ultimately leading to maintenance of cell survival and cell numbers. However, why only bleomycin-treated cells show such defence and why not cisplatin or etoposide-treated cells is a still subject of debate and study. Might be it is because of the different mode of action of the drugs.

COD. P169

UN CASO MISCONOSCIUTO DI SINDROME BRANCHIO-OTO-RENALE

R. Tallero¹, G. Contrò¹, A. Primerano¹, M.D. Ceravolo¹, C. Politi¹, V. Bruni¹, M.D. Nocera¹, F. Fabiani¹, P. Malatesta¹, E. Colao¹, R. Iuliano¹, N. Perrotti¹

¹Az. Osp. Universitaria "Mater Domini", CATANZARO - U.O. Genetica Medica

La sindrome Branchio-Oto-Renale (BOR) è caratterizzata da anomalie degli archi branchiali (schisi, fistole, cisti), difetti dell'udito (malformazioni dei padiglioni auricolari con fistole preauricolari, sordità di conduzione o neurosensoriale) e anomalie renali (malformazioni delle vie urinarie, ipoplasia o agenesia renale, displasia renale, cisti renali). La prevalenza è 1/40.000. L'espressione della malattia varia nelle diverse famiglie e tra le persone affette della stessa famiglia. La sindrome BOR viene trasmessa con modalità autosomica dominante. Il gene-malattia, EYA1, è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 8. Sono state anche identificate le mutazioni dei geni SIX1 e SIX5, i cui prodotti interagiscono con EYA1 in quanto i complessi formati sono fattori di trascrizione.

Descriviamo il caso di una famiglia con diversi soggetti affetti e tipica presentazione clinica per cui non era mai stato posto il sospetto diagnostico di sindrome BOR. La signora B.G. figlia di genitori non consanguinei, la madre è deceduta a 94 anni per senilità, il padre deceduto a 74 anni per senilità presentava una sordità che è riferita essere presente sin da giovane età. La paziente ha 11 germani, di cui due fratelli ed una sorella affetti da sordità e cisti del collo. B.G. presentato un ritardo del linguaggio verosimilmente legato alla sordità congenita; presenza di due cicatrici a livello della porzione antero-laterale del collo bilateralmente, esiti di rimozioni di due formazioni cistiche, e tratto fistoloso anteriormente al trago bilateralmente. È stata eseguita indagine tramite NGS dei geni EYA1, SIX1 e SIX5, risultando eterozigote c.1319G>A (p.Arg440Gln). L'analisi è stata estesa a C.A., suo secondogenito, che presentava cisti simmetriche al collo rimosse a 7 mesi e sordità, risultando anch'esso portatore della stessa mutazione. In entrambi i casi non sono emerse anomalie renali dai controlli ecografici prescritti. Questo caso suggerisce l'importanza di una valutazione specialistica in ambito genetico in patologie sindromiche in cui appare chiara la presenza di una ricorrenza familiare (3 generazioni affette) che altrimenti resterebbe misconosciute ed evolverebbero verso quadri potenzialmente più gravi.

COD. P170

Una nuova mutazione nel gene KMT2A in una paziente con sindrome di Wiedemann-Steiner

P. Fontana¹, M. Falco¹, E. Agolini², D. Cocciadiferro², A. Novelli², C. Lombardi¹, M. Ciavarella¹, M. Maioli¹, G. Cantalupo¹, F. Scarano¹, S. Amabile¹, M.S. Lonardo¹, G. Scarano¹, F. Lonardo¹

¹*U.O.S.D. Genetica Medica A.O.R.N. Rummo (Benevento)*

²*Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Rome, Italy*

La sindrome di Wiedemann-Steiner è una rara condizione genetica, descritta per la prima volta da Wiedemann e colleghi nel 1989. E' caratterizzata dalla presenza di bassa statura, disabilità intellettiva di grado da lieve a moderato, disturbi del comportamento, alcune varianti fenotipiche quali sopracciglia folte e arcuate con diradamento nel terzo laterale, ciglia lunghe, rime palpebrali oblique in basso e lateralmente e con diametro verticale ristretto, ponte nasale slargato. E' frequente l'ipertricosi a livello dorsale e dei cubiti. Nel 2012 il gene KMT2A è stato identificato come causativo della sindrome e inserita nel gruppo estremamente eterogeneo delle "cromatinopatie"; al momento sono descritti meno di 20 pazienti con diagnosi molecolare di conferma. La paziente è una bambina di cinque anni, nata con ptosi palpebrale bilaterale molto marcata, per la quale la terapia chirurgica ha consentito di ottenere soltanto modesti benefici, e con un difetto interatriale risolto spontaneamente. Nei primi mesi di vita manifestava una severa ipotonia, tutt'ora presente in maniera sfumata. Nel corso del tempo emergevano inoltre un ritardo dello sviluppo del linguaggio, un deficit attentivo, un impaccio motorio. Una RMN encefalo mostrava una lieve ipoplasia del ponte cerebellare. L'esame clinico mostrava parametri auxologici ai limiti inferiori della norma come la circonferenza cranica. Alcune caratteristiche del viso quali sopracciglia arcuate, epicanto, ptosi palpebrale e la clinodattilia del V delle mani sono suggestive di una condizione appartenente allo spettro delle cromatinopatie, tuttavia la bambina non mostra l'ipertricosi dorsale e dei cubiti, caratteristica della sindrome di Wiedemann-Steiner. Il sequenziamento dell'esoma ha evidenziato la presenza di una mutazione missense de novo, in eterozigosi, nel gene KMT2A. La mutazione (c.8543T>C) comporta la sostituzione di una leucina con una prolina nella sequenza aminoacidica e non è stata mai riportata in letteratura.

COD. P171

DELEZIONE INTERSTIZIALE 13q12.11-q12.13: DESCRIZIONE DI UN FENOTIPO CLINICO COMPLESSO E REVISIONE DELLA LETTERATURA

V.T. Consiglio¹, E. Salzano¹, T. Fragapane¹, M. Malacarne², A. Ferrara¹, D. Vecchio¹, M. Piccione^{1,3}

¹*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.*

²*Laboratorio di Genetica Umana - Ospedale Galliera, Genova, Italia.*

³*Dipartimento di scienze per la promozione della salute e Materno - Infantile. Università degli Studi di Palermo, Italia.*

Riportiamo il caso di un individuo di sesso maschile, di anni 4 con anomalie congenite multiple e delezione 13q12.11-q12.13 di circa 5.4 Mb identificata mediante array-CGH. All'esame obiettivo il piccolo presentava peculiari tratti cranio-facciali quali occipite prominente, rime palpebrali orientateggianti, naso slargato, micrognazia, e ritardo neuromotorio. Le ulteriori indagini effettuate evidenziavano inoltre strabismo convergente, RVU bilaterale, e ampliamento dello spazio liquorale in sede latero bulbare bilaterale con iposviluppo del flocculo cerebellare. Delezioni di tale regione sono state raramente descritte, e in dimensione variabili, associate a fenotipo clinico complesso caratterizzato da ritardo neuromotorio e/o disabilità intellettiva, anomalie degli occhi, dei reni e della pelle. Un fenotipo lieve è stato descritto in individui con delezioni di dimensioni più piccole usualmente comprese tra 2,1Mb e 2,9 Mb. Dal confronto del quadro clinico del nostro paziente con quello riportato in 7 soggetti con delezione di analoghe dimensioni, è emerso che simili anomalie della fossa cranica posteriore con ampliamento degli spazi liquorali sono state descritte solo in un altro individuo con delezione di 5.7 Mb, in associazione ad anomalie degli arti, non presenti nel propositus. La regione deleta in entrambi i pazienti include un elevato numero di geni ed in particolare: GJA3, GJB2 ed GJB6 la cui aploinsufficienza è associata rispettivamente a forme di cataratta e sordità autosomica-recessiva, IFT88 codificante per una proteina implicata nella genesi del rene policistico ed FGF9 associato ad una forma di sindrome da sinostosi multiple (OMIM 612961), noto per il potenziale ruolo cruciale nello sviluppo neurologico embrionale. Tale gene è stato inoltre proposto quale responsabile delle anomalie degli arti e dei piedi riscontrate nel paziente precedentemente citato ma non descritte nel nostro caso. Sebbene ulteriori studi si rendono necessari al fine di una migliore correlazione genotipo-fenotipo, il presente caso contribuisce alla definizione del fenotipo clinico delle ampie delezioni 13q12.11-q12.13 e del ruolo in particolare del gene FGF9 nello sviluppo del sistema nervoso centrale.

COD. P172

Low-penetrance SDHB pathogenic variants and management issues: comparison between the rare and the founder

W. Bruno^{1,2}, L. Pastorino², V. Andreotti^{1,2}, B. Dalmaso², A. Cianflone³, G. Fornarini⁴, G. Peretti⁵, P. Ghiorzo^{1,2}

¹SSD Genetica Dei Tumori Rari, IRCCS Osp. Policlinico San Martino, Genova

²Dip. di Medicina Interna e Specialità Mediche, Università di Genova

³Dip. di Neuroscienze, Riabilitazione, Oftalmologia, Genetica e Scienze Materno-Infantili, Università di Genova

⁴UO Oncologia Medica 1, IRCCS Osp. Policlinico San Martino, Genova

⁵Clinica Otorinolaringoiatrica, IRCCS Osp. Policlinico San Martino, Genova

Molecular clusterization of paragangliomas (PGLs) is fundamental for patient care. Pathogenic variants of SHDB (PGL4 syndrome) are considered low penetrance variants since family history of patients is frequently negative. SDHB variants are mainly associated with non-head and neck PGLs with a stronger malignancy potential but common prognostic markers are not thoroughly predictive and the variable clinical expressivity also hinders differential diagnosis with other PGL-syndromes. We describe two carriers of different SDHB pathogenic variants, highlighting the peculiarity and the value of a careful interpretation of SDHB variants in terms of penetrance and management. The first case is a 20 years old female patient with a diagnosis of a rare PGL of the bladder at the age of 17. The patient is a carrier of the unpublished SDHB variant c.330_333dupTCTA; (p.Ala112Serfs), a frameshift variant which causes a premature stop codon, predictively causing loss of protein function either through protein truncation or mRNA decay. Two years after diagnosis, the patient is currently under clinical surveillance, with no disease recurrence or other neoplasms associated with the PGL4 syndrome. The same variant is carried by the mother and a sibling, both healthy and under a baseline surveillance standardized as for more common SDHB variants. The second case is a 57 years old patient with a negative family history who underwent partial surgery for a PGL of the carotid body at the age of 42. The patient has been characterized as a carrier of a known Dutch founder's variant (c.423+1G>A). Since the diagnosis, he hasn't developed other sign while the residual PGL tissue has slowly growed. The c.423+1G>A variant creates an alternate splice site and an in-frame deletion. According to recent studies, this variant leads to a milder phenotype, with even lower metastatic potential and risk of SDH-X syndromes-related cancers compared to other SDHB pathogenic variants. Those cases support the importance of variant-specific management, surveillance studies that include unaffected carriers, standardized diagnostic pipeline but also the research for novel pathologic or molecular markers to fully predict PGLs behavior and new therapeutic strategies according to molecular clusterization.

COD. P173

MUTATIONAL ANALYSIS OF SOST IN THE FIRST ITALIAN FAMILY WITH SCLEROSTEOSIS.

R. Procopio^{2,1}, M. Gagliardi², L. Rapisarda¹, F. Bono¹, F. Roccia³, C. Bombardieri⁴, G. Demonte¹, F. Tosto¹, A. Gambardella¹, A. Quattrone^{2,5}, G. Annesi²

¹*Institute of Molecular Bioimaging and Physiology, National Research Council, Catanzaro, Italy*

²*Institute of Neurology, Magna Graecia University of Catanzaro, Italy*

³*Rehabilitative cardiology, Azienda Ospedaliera Universitaria Mater Domini, Catanzaro, Italy*

⁴*Institute of Neuroradiology, Magna Graecia University of Catanzaro, Italy*

⁵*Neuroscience Research Center, Department of Medical and Surgical Sciences, Magna Graecia University of Catanzaro, Italy*

INTRODUCTIONSclerosteosis is a rare autosomal recessive condition characterized by progressive bone thickening due to increased bone formation. Mutations in SOST gene coding for sclerostin are linked to sclerosteosis. There are the clinical and radiographic similarities between sclerosteosis and van Buchem disease, another autosomal recessive bone dysplasia. Sclerosteosis and van Buchem disease are linked to chromosome 17q12-q21, more just van Buchem disease is associated with a 52 kb deletion at downstream of the SOST gene, sclerosteosis is caused by loss-of-function mutation of sclerostin. This protein is the SOST gene product, it secreted by osteocytes and transported to the bone surface where it inhibits osteoblastic bone formation by antagonizing Wnt signalling. Very few sporadic cases have been described around the world mainly in Africa and South America. Here we describe the first Italian family with sclerosteosis.**MATERIALS AND METHODS**Informed consent was obtained from the patients. The diagnosis of Sclerosteosis was based on a history of chronic headache and nocturnal snoring documented by neurological and audiometric examination, Brain MRI, MR venography, polysomnography and 1-hour lumbar CSF pressure monitoring. Genomic DNA was extracted from peripheral blood by standard methods. The SOST purified PCR products were analyzed on 3500 Genetec Analyzer (Life Technologies).**RESULT**The two brothers of 45 and 36 years old presented macrocephaly and an enlarged mandible, they complained unilateral visual acuity loss and unilateral deafness since adolescence. Moreover the youngest one had a bilateral facial nerve palsy since childhood. The first brother was not interest to continue the neurological and genetic investigations. A nocturnal polysomnography showed a condition of Obstructive Sleep Apnea Syndrome (OSAS) of moderate entity. We detected a nonsense mutation, p.Gln24X (c.70C>T), in homozygous in our patient and also in heterozygous state in his parents, two brothers, one sister, two sons and one nephew. **DISCUSSION**Here we described for the first time a South Italy patient with a mutation (p.Gln24X) in the SOST gene, previously reported by Brunkow et al. 2001. This nonsense mutation is predicted to exert a deleterious effect by Mutation Taster Server (<http://www.mutationtaster.org>), and lead to premature termination of the protein. The bioinformatics analysis using amino acidic alignment attested that the Glutamine at position 24 is evolutionary conserved in Vertebrates. The clinical features of this patient show the presence of OSAS causing intracranial hypertension in Sclerosteosis, these symptoms enlarge the clinical spectrum of Sclerosteosis.

COD. P174

Nuova variante del gene SPINK5 identificata in un paziente con sindrome di Netherton e disabilità intellettiva. Il valore diagnostico della tricoscopia

F. Cali¹, P. Failla¹, M.M. Siragusa¹, M. Vinci¹, C. Schepis¹

¹*Oasi Research Institute - IRCCS, Troina, Italy*

La sindrome di Netherton (SN) è una rara malattia cutanea autosomica recessiva caratterizzata da eritroderma ittiosiforme associata ad una anomalia caratteristica del fusto del capello e atopia. L'incidenza è stimata in 1/200.000 nascite. La caratteristica manifestazione cutanea si presenta dalla nascita con eritrodermia e desquamazione generalizzata e ritardo della crescita. La dermatite atopica è causa di un severo prurito. Sono possibili e descritte la disidratazione ipernatremica, le infezioni ricorrenti e il malassorbimento intestinale con diarrea. La diagnosi molecolare è essenziale per la consulenza genetica. Un bambino di 21 mesi con lieve disabilità intellettiva e con segni patognomonici della malattia di Netherton (OMIM: 256500) è giunto al nostro Centro. All'esame obiettivo era iposomico e presentava eritroderma generalizzata, si grattava costantemente, la facies era caratterizzata dalla quasi totale assenza di ciglia e sopracciglia, mentre i capelli erano corti e sottili. L'esame tricoscopico ha mostrato un rigonfiamento lungo il fusto del capello a forma di canna di bambù e l'esame con il microscopio ottico ha evidenziato la tipica tricoressi invaginata. L'analisi genetica condotta mediante Next Generation Sequencing, ha confermato la presenza di una doppia variante in eterozigosi composta nel gene SPINK5 (NM_006846.3) una delle quali riportata nei databases ClinVar e HGMD. Questo lavoro intende enfatizzare l'importanza della tricoscopia come indagine di prima istanza nel sospetto di Netherton.

COD. P175

The key role of a-CGH+SNPs analysis to unmask a hypodiploidy Acute Lymphoblastic Leukemia: a case report

S. Stioui¹, V. Achille¹, L. Di Schiena¹, M. Rossi³, L. Morabito³, M.G. Della Porta²

¹*UO Lab Analisi - Citogenetica e Genetica Medica, IRCSS Humanitas Research Hospital Rozzano (MI)*

²*Cancer Center, IRCSS Humanitas Research Hospital & Humanitas University, Rozzano (MI)*

³*Cancer Center, IRCSS Humanitas Research Hospital Rozzano (MI)*

Acute lymphoblastic leukemia often contains chromosome aneuploidies and recurrent chromosomal translocations, which are of prognostic importance and routinely used in clinical decision making. Chromosomal ploidy is a major risk stratification tool for ALL. Low hypodiploidy and near-haploidy are associated with a poor prognosis. Doubling of either a low-hypodiploid or a near-haploid clone results in an apparently high-hyperdiploid karyotype, which is often misclassified for risk. This observation justifies the application of a-CGH+SNPs testing (SurePrint G3 Cancer CGH+SNPs 4x180k platform), in association with karyotype, to detect segmental regions of loss of heterozygosity (LOH) and acquired uniparental disomy (aUPD).

We described a 69-years-old caucasian female admit to the hospital for asthenia with severe anemia, leucopenia and neutropenia. Bone marrow analysis, immunophenotype and molecular analysis confirmed a B cell Acute Lymphoblastic Leukemia Philadelphia negative.

Bone marrow conventional cytogenetic analysis showed a complex High hyperdiploid karyotype with multiple structural and numerical abnormalities including isochromosome (2)(q10) and losses in 6q21q24, 12p12, and 14q22q32. The karyotype was interpreted as 69,XX,+X,+X,+1,+1,i(2)(q10),+del(6)(q21q24)x2,+7,+8,+10,+11,+del(12)(p12)x2,del(14)(q22q32)x2,+16,+17,+18,+21,+21,+22,+22,+marx2[9]/46,XX [16]. Double copies of altered chromosomes suggested the presence of low-hypodiploid or a near-haploid clone that went up duplication. This hypothesis was confirmed and supported by a-CGH+SNPs results that detected the segmental aUPD for the chromosomes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 20 and 21. The other abnormalities identified by the array platform included gain (3~5 copies) of chromosomes 1, 10, 11, 12, 18, 19 and 22 and homozygous deletion of gene CDKN2A (p16) in 9p21.3.

In conclusion, a-CGH+SNPs was of utmost importance in the genotype clarification of this case through detection of aUPD and should be considered to be performed for ALL with apparent hyperdiploidy for accurate prognostic risk stratification and treatment planning.

COD. P176

Analisi molecolare di cardiomiopatia mediante sequenziamento di nuova generazione (NGS) di geni selezionati su sequenziatore Miseq

m. Cecconi¹, s. Davi¹, m. Castagnetta¹, d. Coviello¹

¹*Lab. Genetica Umana, Osp. Galliera, Genova*

La casistica del laboratorio, dal 2005 ad oggi, consiste in 1070 pazienti affetti da cardiomiopatia. Fino al 2014 l'analisi molecolare, effettuata prima mediante DHPLC, poi mediante sequenziamento Sanger, era mirata ad un numero ridotto di geni associati a cardiomiopatia ipertrofica primaria (hcm) o secondaria a forme metaboliche. Dal 2014, l'inserimento in diagnostica della NGS, il continuo aggiornamento della tecnologia e dei "pannelli" di geni analizzati hanno portato alla diversificazione del tipo di richiesta di analisi genetica, in base alle caratteristiche cliniche. Dal 2017 viene utilizzato un kit commerciale (TrusightCardio), che permette l'analisi di 174 geni associati a diversi tipi di cardiomiopatia. Prima dell'inserimento in routine del kit, è stata effettuata una validazione interna su 16 campioni con varianti note ed è stata osservata una copertura di almeno il 98% della regione di interesse ad una profondità di analisi minima di 20X, con una sensibilità sui campioni testati del 100%. Sono stati analizzati 40 pazienti: 25 con hcm, 1 con hcm associata ad amiloidosi, 8 con Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) e sospetto di hcm, 2 con cardiomiopatia dilatativa (dcm), 2 con sindrome di Marfan e 2 con morte improvvisa. Dei 40 pazienti analizzati, 7 sono risultati negativi, 9 eterozigoti per almeno una variante patogenetica o probabilmente patogenetica, 24 eterozigoti per una o più varianti con significato patogenetico incerto (vus). L'alto numero di vus deriva dall'alto numero di geni analizzati e rende più laboriose le fasi di interpretazione dei dati e refertazione; ciò si ripercuote sulla consulenza genetica, rendendola ulteriormente complessa, soprattutto in una patologia come la cardiomiopatia, la cui genetica è caratterizzata da penetranza ed espressività variabili e dove non è semplice stabilire una correlazione genotipo-fenotipo. Per ridurre i tempi di risposta e semplificare i referti e la consulenza (pre e post-test), tra i 174 geni del kit sono stati identificati dei "sotto-pannelli", la cui analisi viene indicata dagli specialisti inviati, in base al sospetto clinico (hcm, dcm ...). Quest'ultimo aspetto è fondamentale per ottimizzare il percorso diagnostico e sottolinea l'importanza della collaborazione tra laboratoristi e clinici.

COD. P177

Delezione interstiziale 10q22.1q22.3 de novo: una condizione rara

A. Impeduglia¹, S. Tedoldi¹, F. Gotta¹, B. Drera², P. Cavalli¹

¹*Servizio di Genetica, ASST-Cremona, Cremona*

²*Unità di Terapia Intensiva Neonatale, ASST-Cremona, Cremona*

Delezioni interstiziali della banda 10q22 sono infrequenti. I pazienti mostrano un fenotipo variabile, con ritardo dello sviluppo, ritardo del linguaggio, basso peso corporeo, bassa statura, clinodattilia del quinto dito, ipotonia, strabismo, murmure sistolico e vari dimorfismi cranio facciali.

Riportiamo il caso di un neonato di sesso maschile nato da genitori non consanguinei. Gravidanza a termine, complicata da IUGR e oligoidramnios; alla nascita ipotonia, iporeattività, pianto acuto e note dismorfiche: discromia dei capelli in zona occipitale, micrognatia, ipertelorismo, clinodattilia del quinto dito bilaterale, filtro lungo poco disegnato.

L'indagine Array-CGH, su piattaforma OGT CytoSure ISCA 4x180k v2, identifica una delezione interstiziale di origine de novo di circa 5,5 Mb nella regione cromosomica 10q22.1q22.3 tra la base 73426721 e la base 78892537 (genoma di riferimento GRCH37/hg19) coinvolgente 38 geni OMIM. La delezione riscontrata mostra una parziale sovrapposizione con gli 8 casi complessivi riportati nella letteratura medico scientifica [1-6] e in Decipher (258813, 268619, 307771, 321796, 339887). La regione comune di delezione comprende i geni KAT6B (OMIM *605880) e C10orf11 (OMIM *614537) ritenuti i maggiori responsabili del fenotipo dei pazienti. L'aploinsufficienza di KAT6B è possibilmente associata al ritardo dello sviluppo, alterazioni della parola e del linguaggio e alla palatoschisi congenita; mentre l'aploinsufficienza di C10orf11 è possibilmente associata a difetti cognitivi.

Il presente caso contribuisce ad una migliore definizione del fenotipo relativa alla delezione coinvolgente la banda 10q22.

[1] Cook L et al, *J Med Genet.* 1999 Jan;36(1):71-2

[2] Tzschach A et al, *Am J Med Genet A.* 2006 May 15;140(10):1108-10

[3] Tzschach A et al, *Eur J Hum Genet.* 2010 Mar;18(3):291-5

[4] Reddy KS et al, *Cytogenet Genome Res.* 2011;132:113-120

[5] Lei TY et al, *Cleft Palate Craniofac J.* 2017 May;54(3):343-350

[6] Preiksaitiene E et al, *Ophthalmic Genet.* 2017 Jul-Aug;38(4):383-386.

COD. P178

High-resolution genomic analysis of an amyotrophic lateral sclerosis case in a large spinocerebellar ataxia type 1 family

G. Morello¹, M. Guarnaccia¹, L. Citrigno¹, V. La Bella², S. Cavallaro¹, F.L. Conforti¹

¹*Institute of Neurological Sciences (ISN), Italian National Research Council (CNR), Catania and Mangone (CS), Italy*

²*ALS Clinical Research Center and Neurochemistry Laboratory, BioNeC, University of Palermo, Italy*

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a devastating disorder of the central nervous system that leads to progressive loss of upper and lower motor neurons. It has been demonstrated that intermediate repeat expansion of ATXN-2 (SCA2) and ATXN-1 (SCA1) represent genetic risk factors for ALS and, particularly, the relationship between the SCAs and ALS is further supported by the evidence that typical SCA1 or SCA2 patients may develop signs and symptoms of motor neuron degeneration. Using a custom-made array comparative genomic hybridization (aCGH) targeting clinically relevant genes for ALS and other neurological diseases, we characterized genomic alterations in the affected members of a large family with spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1), one of which suffering from SLA, in order to detect a picture of the genes involved. Previously, the same members underwent to mutational screening for the four major ALS-related genes (SOD1, FUS, TARDBP and C9ORF72), resulting negative. Our analysis revealed a good number of chromosomal aberration (duplications and deletions) with potential relevance for disease aetiology, some of them were observed exclusively in the ALS patient, supporting their potential role in motor neuron-specific degeneration. Further integrative analysis of data from aCGH and NGS platforms indicates a direct involvement of genes involved in vesicular fusion and trafficking. In conclusion, we suggest that the identification of genomic aberration by a high resolution genomic analysis may provide a genetic mapping of the disease and can represent the starting point in deciphering the aetiology of this complex disease, given that the affected genes can be considered candidates for influencing disease susceptibility.

COD. P179

Identificazione di una variante patogenetica nel gene PKP2 in una famiglia con storia di morte cardiaca improvvisa giovanile.

M.P. Leone¹, S. Mastroianno², P. Palumbo¹, S. Castellana³, E. Di Muro^{1,4}, T. Mazza³, A. Russo², M. Carella¹, G. Di Stolfo²

¹*U.O.C Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

²*U.O.C Cardiologia – UTCC, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

³*Unità di Bioinformatica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

⁴*Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università degli Studi di Roma “La Sapienza”, Roma*

Le cardiomiopatie (CMP) costituiscono un gruppo eterogeneo di malattie caratterizzate da alterazioni funzionali e strutturali del miocardio, che non derivano da patologie come coronaropatie, ipertensione, valvulopatie e cardiopatie congenite. Oltre il 50% delle cardiomiopatie sono a carattere familiare e possono essere responsabili di morte cardiaca improvvisa (SCD) in individui apparentemente sani. Lo screening cardiologico e genetico familiare può consentire di prevenire morti improvvise nei soggetti a rischio. Riportiamo il caso di un bambino di 14 anni deceduto per SCD dopo esercizio fisico a scuola. Il paziente presentava cardiopalmo occasionale nel mese precedente e l'esame autoptico ha evidenziato la presenza di una cardiomiopatia aritmogena con coinvolgimento biventricolare. Mediante approccio Targeted Resequencing (TRS), è stato eseguito lo screening di 75 geni responsabili e/o associati a CMP e SCD, che ha portato all'identificazione di una mutazione frameshift nell'esone 2 del gene PKP2, descritta come patogenetica in dbSNP. Il gene PKP2 (OMIM 602861) codifica per la plakofilina-2, una proteina desmosomiale coinvolta nei meccanismi di adesione cellulare e varianti frameshift che interessano la medesima regione del gene PKP2 sono note per essere responsabili di cardiomiopatia aritmogena. L'analisi dell'albero genealogico, in cui emergono 2 precedenti morti improvvise nel ramo paterno, e le successive indagini cardiologiche eseguite sui parenti, hanno permesso di identificare 4 soggetti affetti da displasia aritmogena del ventricolo destro portatori della medesima variante. Inoltre, la presenza della variante è stata confermata in altri 6 parenti ad oggi asintomatici. Il nostro studio conferma l'importanza dell'analisi genetica come parte integrante dello screening cardiologico 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 eventi fatali dovuti a cardiomiopatie ereditarie. Inoltre, il rapido progresso tecnologico nel sequenziamento del DNA consentirà, in tempi sempre più rapidi, la diagnosi e l'identificazione dei soggetti a rischio.

COD. P180

Ion Torrent sequencing : Validation of simultaneous detection for germline BRCA1/2 mutations and copy number variations

S. Cannella¹, D. Salemi¹, M.G. Bica¹, V. Randazzo¹, C. Agueli¹, A. Marfia¹, C. Russo Lacerna¹, G. Bruno¹, N. Faldetta², F. Verderame³, A. Santoro¹

¹*UOSD Lab di Oncoematologia e Manipolazione Cellulare, AOR Villa sofia-Cervello, Palermo*

²*UOSD Breast Unit, AOR Villa Sofia-Cervello, Palermo*

³*UOC Oncologia Medica, AOR Villa Sofia-Cervello, Palermo*

Background: Conventional methods used to identify BRCA1/2 germline mutations in hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC) are time-consuming and expensive, due to the large size of the genes. The recent introduction of next generation sequencing (NGS) platforms is a great promise, which is rapidly revolutionizing genetic screening. Objectives: The aim of the study is the validation of an NGS-based method to identify BRCA1/2 mutations and copy number variation (CNV). Methods: We used OncoPrint assay and Ion Torrent platforms for BRCA1/2 mutation screening. Validation set up included 15 different DNA samples, previously studied by Sanger as deleterious variants in BRCA1/2. To confirm the reproducibility inter run 1 positive sample has been retested in every procedure. Then we tested 260 newly diagnosed and uncharacterized patients by NGS. To validate large rearrangements (LGR) detection, a subset of 30 samples (two of them positive control for LGR) were utilized, CNV were detected by two bioinformatics pipelines Ion torrent Reporter and Sophia DDM. Both software used a specific and a "reference set" for the individuation of CNV. Results: All SNV and small indel were successfully identified in the validation step, no false-positive were detected by NGS. We found 45 out of 260 patients showing deleterious variants (19 SNV, 26 small indel). All pathogenetic variants identified by NGS were confirmed by Sanger sequencing. The sequencing run metrics showed acceptable values for all samples with a coverage at least 100X for all regions. To identify CNV we analyzed 30 samples, the sequencing raw data were analyzed by two bioinformatic pipeline. All samples reached good confidence level for both pipeline. We are able to identified the 2 patients positive for LGR and none false positive was detected by both analysis. Actually all samples are studied simultaneously for BRCA1/2 mutations and CNV by NGS. Conclusions: Ion Torrent approach in BRCA1/2 germline detection of SNV, small indel and CNV identification is highly sensitive, easy to use, faster than traditional techniques and represents a robust method for BRCA screening approach in routine genetic analysis. This work was supported by a grant of Assessorato alla Salute Regione Sicilia (PSN 2016)

COD. P181

Multigene panel testing increases the number of loci associated with gastric cancer predisposition.

G. Tedaldi¹, F. Pirini¹, M. Tebaldi¹, V. Zampiga¹, I. Cangini¹, R. Danesi², V. Arcangeli³, M. Ravegnani², R. Abou Khouzam⁴, C. Molinari¹, M. Bonafé¹, D. Amadori⁵, G. Martinelli⁵, F. Falcini², G.N. Ranzani⁴, D. Calistri¹

¹*Biosciences Laboratory, Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori (IRST) IRCCS, Meldola – Italy.*

²*Romagna Cancer Registry, Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori (IRST) IRCCS, Meldola – Italy.*

³*Department of Medical Oncology, Ospedale Infermi, Rimini – Italy.*

⁴*Department of Biology and Biotechnology, University of Pavia, Pavia – Italy.*

⁵*Department of Medical Oncology, Istituto Scientifico Romagnolo per lo Studio e la Cura dei Tumori (IRST) IRCCS, Meldola – Italy.*

Background

The major gene involved in gastric cancer (GC) predisposition is CDH1, but other genes have recently emerged as possibly predisposing to the disease.

Aim of the research

The aim of our study was to assess the presence of predisposing variants in Italian patients with GC family history by analyzing a panel of 94 genes involved in the main cancer syndromes.

Materials and methods

We selected 79 patients with GC, 3 patients with gastric polyposis and 14 patients with lobular breast cancer showing strong family history of GC. Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples and analyzed by Next-Generation Sequencing, using an enrichment protocol (Illumina Trusight Cancer) on MiSeq platform. Results were analyzed by a customized bioinformatic pipeline.

Results

In 10 out of 96 patients (10.4%), we identified 9 CDH1 pathogenic/likely-pathogenic variants: 4 frameshift deletions, 3 nonsense mutations, 1 splicing mutation, 1 gross deletion. In 11 out of 96 patients (11.5%), we found 11 pathogenic/likely-pathogenic variants in unexpected genes, including ATM, BLM, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, MSH2, PALB2, PMS2 and PRF1: 4 frameshift deletions, 1 frameshift insertion, 5 nonsense mutations, 1 gross deletion. In 75 out of 96 cases (78.1%) we did not find any clear functional variant. By taking into account all the identified variants, the 75 patients showed 156 unique missense variants with a population frequency <1% or n/a in the 1000Genomes, Esp6500, and Exac03 databases. We evaluated them by using PolyPhen-2/SIFT bioinformatic tools: 66 variants were classified as benign by both tools, 63 were discordantly classified and 27 were classified as probably damaging by both tools.

Conclusions

The majority of the new pathogenic/likely-pathogenic variants identified were in genes related to breast cancer (BRCA1, BRCA2, ATM, PALB2), while others were in genes involved in the susceptibility to colorectal cancer (MSH2, PMS2, BMPR1A) and to multiple cancers, such as leukemias and lymphomas (BLM, PRF1). Further studies based on segregation analysis within pedigrees and on functional assays in vitro, will definitely confirm the role in GC development of the pathogenic/likely-pathogenic variants and of the 27 variants classified as probably damaging by bioinformatic tools.

COD. P182

Next Generation Sequencing: benefit analysis to support a strategic adoption model in the Italian NHS

G. Gancitano¹, A. Recchia¹, R. Scalamogna¹, G. Gerolami¹, D. Bellavista¹, M. Dionisi¹, J. Franzini², A. Baggi², G. Bonetti², P. Pinto², M. Volpe²

¹*Roche Diagnostics, Monza*

²*Bip Life Science, Milano*

Premise: The progress on genomic sequencing is bringing personalized medicine closer to patients, due to its implications either on research or on clinical decisions. The application of omics science for the development of oncological treatment is being widely recognized by its improvements on the management of diseases and health outcome benefits. However, there still a need for evidence on overall impact for healthcare organizations, professionals and systems.

Objectives: The study aims to assess current testing procedures for NGS and hotspot single gene tests in terms of impact on hospital organization, patient and disease management. The analysis focuses on advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) and unresectable metastatic colon-rectal cancer (mCRC), for patients treated in Italian hospitals. The study provides a set of decisional and operational recommendations on clinical practice defined by an expert panel.

Methods: The study is based on a decision model, designed to compare NGS with single gene tests, along the whole testing process. The model assesses the impact of testing alternatives on hospital organization and outcomes, in terms of: flow chart, professionals and resources absorbed, time to treatment, access rate to personalized medicine, testing invasiveness. The assessment of current gene testing path has been conducted in Italian Advanced Oncological Hospitals. Results are articulated into a present scenario, based on current diagnostic practice and associated gene testing and a future scenario defined as the set of genes that an expert panel would recommend to test in order to deploy the best test strategy in the perspective of the Italian NHS.

Results: The study provides recommendations on NGS use to maximize its associated benefits. The study measures also the potential impact of NGS adoption for patients, hospitals and NHS in terms of: biopsy, adverse events, associated costs and time to treatment NGS might enable oncologist to profile the patients and define the most suitable treatment path.

Conclusions: The appropriate use of NGS as an alternative to single gene tests, allows hospitals and the NHS to capture significant organization, clinical and economic benefits in the management of advanced NSCLC and unresectable mCRC.

COD. P183

Un raro caso di donna con cariotipo 46,XX?rea(X)(q28).ish der(X)t(X;Y)(q28;p11.3)(SRY+)

M.D. Nocera¹, C. Politi¹, E. Colao¹, A. Primerano¹, G. Contrò¹, M.D. Ceravolo¹, G. Giordano², F. Fabiani¹, R. Iuliano¹, N. Perrotti¹, P. Malatesta¹

¹Azienda Ospedaliera Universitaria Mater Domini di Catanzaro - UO Genetica Medica

²Istituto Polispecialistico Futura Diagnostica Medica - Firenze

Una coppia giunge al nostro servizio per la valutazione in sede di consulenza genetica del rischio riproduttivo per la precedente nascita di una figlia (2 aa), riferita in abs, con cariotipo 46,XX, SRY-positivo. Il gene SRY, localizzato sul braccio corto del cromosoma Y, codifica per il fattore di trascrizione che, in fase embrionale, determina lo sviluppo dei testicoli ed il differenziamento del fenotipo sessuale maschile. L'analisi citogenetica eseguita su entrambi i genitori evidenzia nella madre un riarrangiamento della porzione terminale del braccio lungo di un cromosoma X: 46,XX,?rea(X)(q28). La caratterizzazione dell'anomalia strutturale, proseguita mediante metodica FISH, rivela la presenza della regione del cromosoma Y, contenete l'SRY (Yp11.3), sul braccio lungo del cromosoma X riarrangiato. Il cariotipo della paziente è stato quindi ridefinito con la formula: 46,XX?rea(X)(q28).ish der(X)t(X;Y)(q28;p11.3)(SRY+). Si tratta di una traslocazione sbilanciata priva di apparenti conseguenze fenotipiche per la paziente, che all'età di 35 anni non presenta ambiguità sessuale né alterazione della sfera riproduttiva. Dalla ricostruzione dell'albero genealogico si evince tuttavia familiarità per menopausa precoce. Le traslocazioni X-Y, SRY-positivo, coinvolgono nella maggior parte dei casi il braccio corto del cromosoma X, e sono associate ad uno spettro di fenotipi che varia dalla sindrome del maschio 46,XX alla condizione di ermafroditismo vero fino alla normalità dello sviluppo sessuale. La traslocazione del gene SRY sul braccio lungo del cromosoma X è invece un evento estremamente raro, riportato in letteratura in un solo caso associato ad una condizione di ermafroditismo vero. Il differenziamento in senso femminile osservato nella nostra probanda, nonostante la presenza del gene SRY, potrebbe essere spiegato da un'insufficiente espressione del fattore di determinazione testicolare, verosimilmente per un effetto di posizione determinato dal riarrangiamento cromosomico. E' comunque in corso il sequenziamento del gene SRY e l'estensione dello studio familiare.

COD. P184

Un raro caso di malattia di Cushing in età pediatrica associato ad una nuova mutazione del gene MEN1

P.D. Romeo¹, S. Briuglia², E. Messina¹, A.P. Capra², G. Occhi³, F. Ferrau¹, S. Alberti², S. Cannavò¹

¹ *Dip. di Patologia Umana dell'adulto e dell'età evolutiva "G. Barresi", AOUP "G. Martino", Messina*

² *Dip. di Scienze biomediche, odontoiatriche e delle immagini morfologiche e funzionali, AOUP "G. Martino", Messina*

³ *Dip. di Biologia, Università di Padova*

La malattia di Cushing (MC) si presenta con grave quadro clinico indotto da un cronico eccesso di glucocorticoidi endogeni, determinato dalla presenza di un adenoma ipofisario ACTH-secernente. La MC si presenta raramente in età pediatrica e/o nel contesto di complessi quadri sindromici su base genetica, quali la MEN1 in cui il tumore ipofisario si associa a iperparatiroidismo e altri tumori neuroendocrini. Una paziente (14 anni) giungeva alla nostra attenzione con una storia di pubarca precoce isolata, oligoamenorrea, incremento ponderale progressivo a partire dai 7 anni di età ed insulinoresistenza. La valutazione biochimica dimostrava una condizione di ipercortisolismo ACTH dipendente e iperparatiroidismo primitivo. I livelli di ACTH aumentavano dopo stimolo con desmopressina (ACTH basale 32.5, picco 80.2 ng/ml) che non si modificavano dopo stimolo con CRH. La RMN dell'ipofisi non dimostrava la presenza di un adenoma, per cui la paziente è stata sottoposta a cateterismo dei seni petrosi, che ha dimostrato un gradiente di ACTH centro/periferia >3, sia basale che dopo stimolo con CRH. L'intervento neurochirurgico per via trans-naso-sfenoidale ha consentito l'asportazione di un adenoma ipofisario ACTH-secernente con conseguente rapida remissione del quadro clinico e biochimico. Ad oggi, al followup post operatorio dopo 8 mesi, la paziente è in buona salute e pratica terapia sostitutiva con cortone acetato. L'analisi genetica ha dimostrato la presenza di una mutazione germline c.122_129delinsATTTCTGCT (p. L41Hfs*79) in eterozigosi (Ref.Seq. NM_130803) mai descritta in precedenza e potenzialmente patogenetica. Lo screening dei familiari ha dimostrato che la madre è portatrice della medesima mutazione e presenta un quadro clinico da iperparatiroidismo che prima del test genetico e dei successivi esami biochimici era rimasto misconosciuto. In conclusione, riportiamo un raro caso di malattia di Cushing in età pediatrica, associato ad iperparatiroidismo, nell'ambito di una sindrome MEN1 riconducibile ad una nuova mutazione del gene MEN1.

COD. P185

MADRE E FIGLIA CON SINDROME DI FEINGOLD DI TIPO 1 DA DELEZIONE 2p24.3p24.2

C. Lombardi¹, M. Falco¹, P. Fontana¹, D. Postorivo², I. Colapietro², L. Fantozzi², A.M. Nardone², P. Pisano³, E. Parrini⁴, E. Cellini⁴, M. Ciavarella¹, M. Maioli¹, G. Cantalupo¹, F. Scarano¹, S. Amabile¹, G. Scarano¹, F. Lonardo¹

¹*U.O.S.D. Genetica Medica A.O.R.N. Rummo (Benevento)*

²*U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, Policlinico Tor Vergata, Roma*

³*U.O.S.D. Neuropsichiatria infantile A.O.R.N. Rummo (Benevento)*

⁴*Neurogenetica - A.O.U. Meyer, Firenze*

La s. di Feingold di tipo 1 (FS1), autosomica dominante, è dovuta a mutazioni o delezioni del gene MYCN. Sono descritti circa 120 casi. Sono tipiche le anomalie delle dita (brachimesofalangia, ipoplasia del pollice, sindattilia ai piedi); frequenti microcefalia e varianti fenotipiche facciali. Le manifestazioni cliniche più gravi sono le atresie del tubo digerente, più frequenti a carico di esofago e duodeno. Possibile la presenza di fistola tracheoesofagea. Sono presenti lievi disturbi dell'apprendimento, ma la disabilità cognitiva grave è rara. Di più raro riscontro cardiopatie congenite, ipoplasia renale, bassa statura e ipoacusia. Descriviamo una paziente nata a termine di gravidanza complicata da varicella a 12 settimane e riscontro di atresia duodenale al 7° mese. Genitori non consanguinei. Il padre riferisce patologia valvolare cardiaca e la madre convulsioni febbrili; fratello minore con disabilità intellettiva ed epilessia; familiarità per epilessia nel ramo paterno. Intervento per atresia duodenale nei primi giorni. Primo episodio critico a tre anni e terapia antiepilettica. Ritardo dello sviluppo psicomotorio con disabilità intellettiva grave (QI<40). All'esame clinico: microcefalia, sinofria, radice nasale larga e prominente, tip nasale bulboso con ali nasali slargate, labbra carnose con labbro inferiore everso, padiglioni auricolari anteversti, cubito valgo, ipoplasia della falange media del V dito della mano con clinodattilia, clinodattilia del II dito della mano, alluce valgo, ipoplasia del V dito del piede. L'esame mediante CGH array ha rilevato una delezione di 1,23 Mb in regione 2p24.3p24.2 che comprende il gene MYCN, ereditata dalla madre, la quale condivide alcune caratteristiche cliniche: tendenza a sinofria, radice nasale larga e prominente, tip nasale bulboso con ali nasali slargate, labbra carnose, ipoplasia della falange media del V dito della mano con clinodattilia alle mani ed ai piedi. Il fratello minore presenta lieve disabilità intellettiva ed epilessia, ma non ha ereditato la delezione. L'analisi molecolare di un pannello NGS per epilessia ha rilevato due VOUS in due geni, presenti anche nel padre. In programma l'estensione dell'indagine alla sorella e agli altri membri del ramo paterno per valutare la segregazione.

COD. P186

Analisi simultanea di Copy Number Variation (CNVs) e mutazioni puntiformi nei geni BRCA1/2 mediante un unico workflow su piattaforma Ion PGM (Personal Genome Machine)

A. Germani^{1,2}, F. Libi², C. Savio², L. Alesi², I. De Santis², C. Rossi², V. Salvati¹, S. Petrucci¹, L. De Marchis³, P.F. Procopio⁴, A. Pizzuti^{5,6}, M.R. Torrisi^{1,2}, M. Piane^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina Clinica e Molecolare, "Sapienza" Università di Roma

²Azienda Ospedaliera Universitaria Sant'Andrea, Roma

³Dipartimento di Scienze Radiologiche Oncologiche ed Anatomopatologiche "Sapienza" Università di Roma

⁴Dipartimento di Scienze Medico-Chirurgiche e di Medicina Traslazionale

⁵Dipartimento di Medicina Sperimentale "Sapienza" Università di Roma

⁶IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo

La maggior parte dei tumori della mammella e dell'ovaio è sporadica; solo il 5-10% risulta ereditario e i geni di suscettibilità principalmente coinvolti sono BRCA1 (MIM # 604370) e BRCA2 (MIM # 600185). Mutazioni in questi geni conferiscono un rischio di sviluppare tumore della mammella e ovarico rispettivamente del 57-49% e 40-18%. Le varianti alleliche dei geni BRCA1 e BRCA2 comprendono mutazioni puntiformi (SNVs), piccole delezioni e inserzioni (indels) e Copy Number Variations (CNVs). I grossi riarrangiamenti rappresentano il 4-28% di tutte le varianti finora identificate, con una più alta frequenza nel gene BRCA1, causata dalla maggiore densità di sequenze di ALU presenti in questo gene che mediano la formazione di grossi riarrangiamenti (LRG). Una strategia accurata, efficiente, rapida ed economica per la rilevazione di tutti i tipi di varianti patogenetiche nei geni di suscettibilità è fondamentale nel percorso diagnostico terapeutico delle pazienti con tumore della mammella e/o ovaio. Ad oggi, l'analisi completa dei geni BRCA1/2, nella maggior parte dei laboratori di Genetica Medica, viene condotta utilizzando due flussi di lavoro: analisi delle SNVs e indel mediante approccio NGS (Next Generation Sequencing) e studio dei grossi riarrangiamenti mediante MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) e/o MAQ (Multiplex Amplicon Quantification). La rapida evoluzione di NGS consente di utilizzare un unico work flow per l'analisi simultanea delle SNVs, indels e CNVs. In questo studio abbiamo testato la possibilità di utilizzare la tecnologia NGS per identificare simultaneamente mutazioni puntiformi, indels e CNVs nei geni BRCA1/2 su piattaforma PGM (Personal Genome Machine). I risultati mostrano come un unico flusso di lavoro può essere utilizzato per l'identificazione di qualsiasi tipo di varianti patogenetiche dei geni BRCA1/2. La pipeline di analisi messa a punto si è rivelata veloce, affidabile e accurata sia nell'identificazione di SNVs e indels, sia nell'analisi dei CNVs e potrebbe in futuro essere utilizzata nei test diagnostici e predittivi per il cancro ereditario della mammella e dell'ovaio.

COD. P187

DUBBI INTERPRETATIVI SULLE VARIANTI AL PROMOTORE DEL GENE FMR1

A. Mencarelli¹, D. Rogaia¹, M. Schippa¹, C. Gradassi¹, R. Romani¹, C. Ardisia¹, P. Prontera¹, S. Esposito², G. Stangoni¹

¹*Servizio di Genetica Medica, Azienda Ospedaliera ed Università di Perugia, Perugia*

²*S.C. Clinica Pediatrica, Azienda Ospedaliera ed Università di Perugia, Perugia*

La sindrome dell'X-Fragile rappresenta la seconda causa genetica di disabilità intellettiva (ID) e ancora oggi, nell'epoca NGS, i protocolli di studio dell'ID prevedono la ricerca della espansione della tripletta CGG al locus FMR1 prima di procedere ad ulteriori approfondimenti molecolari. Abbiamo sostituito di recente la metodica Southern-Blotting con la MS-MLPA che consente sia lo studio dello stato di metilazione al promotore FMR1 sia l'identificazione di CNVs. Su un totale di 70 pazienti con disabilità intellettiva, 40 maschi e 30 femmine, abbiamo identificato un numero di ripetizioni e una metilazione nel range di normalità nella totalità dei casi, mentre l'analisi MLPA ha segnalato in due pazienti, un maschio e una femmina, una delezione nella regione del promotore al 5' dell'esone 1. Il segmento genomico interessato è stato sequenziato in entrambi i casi in Sanger con i seguenti risultati: variante nucleotidica c.-254A>T in eterozigosi (femmina), variante nucleotidica c.-255C>G emizigosi (maschio). Entrambe le varianti cadono in una regione di regolazione trascrizionale, Inr-like, altamente conservata. Le varianti identificate non sono riportate come polimorfismi (gnomADbrowser) mentre una simile variante (c.-254A>G) viene descritta nella letteratura internazionale in un unico paziente con ID in associazione ad una ridotta attività del promotore del gene FMR1 (Collins S.C. et al., AJMG, 2010). Ad oggi il significato di queste varianti rimane incerto, potendosi trattare di SNPs rari e privati oppure di varianti con significato funzionale e clinico. Ulteriori studi di segregazione sono tuttora in corso nelle nostre famiglie ma sarà anche necessario il confronto con casistiche più ampie per definire la frequenza allelica di queste varianti nella popolazione generale, essendo questa una regione genomica poco coperta dagli attuali studi di sequenziamento.

COD. P188

Duplicazioni del gene SHOX: sarà possibile predire il fenotipo?

A. Bussini¹, C. Pessina¹, R. Righi¹, R. Casalone¹

¹*U.O. Citogenetica e Genetica Medica, Osp. Circolo e Fond. Macchi ASST Sette Laghi, viale Borri 57, Varese*

Il gene SHOX (Short Stature Homobox containing gene) è localizzato nella regione pseudoautosomale 1 (PAR1) sul braccio corto di entrambi i cromosomi sessuali. L'aploinsufficienza di tale gene è correlata a bassa statura idiopatica e alla Sindrome di Léri-Weill. Il 70-80% degli individui con patologie legate a SHOX presentano delezioni del gene e/o delle sequenze regolatorie, mentre il 20-25% mutazioni puntiformi nella regione codificante. In letteratura sono riportati anche casi con duplicazioni che interessano non solo il gene ma anche le sequenze regolatorie a monte e a valle del gene, responsabili della regolazione della trascrizione. Il significato clinico delle duplicazioni rimane controverso e sono state correlate a diversi fenotipi: bassa statura, alta statura, Sindrome di Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (tipo 1) e disordini dello spettro autistico. Riportiamo tre pazienti giunti alla nostra osservazione per diversi sospetti diagnostici con duplicazione della regione comprendente SHOX. La prima paziente, neonata di 5 giorni, presenta microftalmia monolaterale e una duplicazione dell'intera regione codificante del gene SHOX. Il secondo paziente, neonato di 6 mesi con ritardo psicomotorio e ipoacusia bilaterale, presenta una duplicazione delle sole regioni regolatorie a monte del gene SHOX. Il terzo paziente, bambino di 9 anni con disturbo dello spettro autistico, presenta una duplicazione più estesa che comprende il gene SHOX e parte delle sequenze regolatorie sia a monte che a valle. Tutte le duplicazioni sono state identificate e confermate con due differenti tecniche (array-CGH e MLPA). In conclusione riteniamo necessario monitorare i pazienti più piccoli per capire le possibili conseguenze di queste alterazioni; l'identificazione delle duplicazioni della regione del gene SHOX potrebbe essere utile per predire il fenotipo, ipotizzare pathway biologici e comprendere i meccanismi che portano a penetranza ed espressività variabile.

COD. P189

Exonic microdeletions of the gephyrin gene as risk factor for neurodevelopmental disorders. Report of an additional family.

I. Stanghellini¹, P. Bergonzini², E. Caramaschi², C. Falcinelli¹, L. Iughetti², O. Calabrese¹

¹SSD Genetica Medica, Azienda Ospedaliero Universitaria di Modena

²UOC Pediatria, Azienda Ospedaliero Universitaria di Modena

Here, we present clinical and genomic characterization of two related children with diagnoses of ASD and epilepsy, who possess rare inherited heterozygous microdeletions overlapping the GPHN gene at 14q23.3. The first child was the full term male product of an uneventful pregnancy of healthy, non-consanguineous parents. Motor skills (child walked at 18-20 months) and language (first words at 4 y) were delayed. At our evaluation at the age of 8y he showed aggressive behavior as well as temper tantrums and mild intellectual disability. Other symptoms included gastroesophageal reflux, constipation and abnormal sleep-wake cycle. No EEG abnormalities. Height at the 75th p, weight >97th p, head circumference at 75th p, hypogonitalism were observed. Family tree showed a maternal uncle with schizophrenia, two maternal children (a boy and a girl) with lack of expressive communication and difficulty with social interaction, and a maternal cousin with epilepsy. This latter 13y boy was diagnosed with attention deficit and language delay and unprovoked generalized epilepsy since the age of 4y. No brain MRI abnormalities. A heterozygous deletion of introns 1-2 and exon 2 of GPHN gene was found by SNP array (CytoScan-HD, Affymetrix) in the child, his mother as well as in the epileptic cousin and his father. Both adults were negative for neurodevelopmental problems. GPHN gene biallelic mutations are associated with various disorders, among which encephalopathy due to sulphite oxidase deficiency and Molybdenum Cofactor Deficiency. The GPHN is a membrane-associated protein essential for the postsynaptic localization of receptors for the neurotransmitters glycine and GABA (A). The gephyrin has functional links with a few synaptic proteins, implicated in genetic risk for neurodevelopmental disorders such as ASD, schizophrenia, and epilepsy. A de novo deletion involving the GPHN gene was first identified in 2012 in an ASD case from a simplex family. Screening of 8775 cases with ASD, schizophrenia or epilepsy and 27,019 controls for GPHN deletions observed that deletions in GPHN were significantly greater in cases than in controls. Our family provides more evidence in support of GPHN deletions as etiologic risk factors across a range of neurodevelopmental disorders

COD. P190

IDENTIFICAZIONE DI UNA NUOVA MUTAZIONE NEL GENE NOTCH3 IN UNA FAMIGLIA ITALIANA AFFETTA DA UNA FORMA PAUCISINTOMATICA DI CADASIL

L. Mosca¹, E. Ferrante², L. Mauri¹, C.A. Erminio³, U. Cavallari¹

¹*S.S. Genetica Medica, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano*

²*Div. Neurologia, A.O. San Carlo, Potenza*

³*Neuroradiologia C.C., ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Milano*

La CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) è una patologia cerebrovascolare rara trasmessa con modalità autosomica dominante e caratterizzata da occlusioni delle piccole arterie del cervello. Le principali manifestazioni cliniche consistono in emicrania con aura, attacchi ischemici ricorrenti, decadimento cognitivo e disturbi psichiatrici. L'età media d'insorgenza si situa nella terza-quarta decade di vita e il decorso è solitamente progressivo; la penetranza è quasi completa e si registra un'espressività clinica ampiamente variabile, sia interche intra-familiare. Un segno clinico caratteristico è la presenza di anomalie di segnale più o meno diffuse nella sostanza bianca, localizzate principalmente nei lobi anteriori temporali, nelle regioni periventricolari e nella capsula esterna, e rilevabili tramite RMN. La patologia è causata da mutazioni nel gene NOTCH3 che codifica per un recettore transmembrana probabilmente coinvolto in meccanismi di signalling inter-cellulari; oltre il 90% delle mutazioni patogenetiche causa perdita o guadagno di residui di cisteina contenuti nei 34 domini EGF della proteina (esoni 2/24). Il test genetico costituisce il gold standard della diagnostica. Riportiamo qui l'identificazione tramite sequenziamento diretto di una nuova mutazione nel gene NOTCH3 (delins) che causa il guadagno di un residuo di cisteina nel dominio EGF-like 8 della proteina. Tale variante è stata riscontrata in eterozigosi in una donna di 40 anni, senza familiarità per la patologia, che presentava come unica sintomatologia la presenza di attacchi di cefalea e emicrania senza aura. Il sospetto di CADASIL è stato posto esclusivamente in base all'esito di RMN, compatibile con la patologia. La variante è stata trasmessa dal padre (68 anni), asintomatico; tuttavia, anche la sua RMN eseguita dopo il test genetico ha evidenziato la presenza di diffuse alterazioni focali nella sostanza bianca sottocorticale di entrambi gli emisferi cerebrali, compatibili con CADASIL. Tali risultati confermano che l'analisi genetica degli esoni 2/24 del gene NOTCH3 risulta essere un approccio fondamentale per la diagnosi di CADASIL, anche in quei pazienti senza familiarità e/o senza un fenotipo classico di malattia.

COD. P191

Identificazione di una nuova variante del gene ZFYVE26 in un paziente con paraparesi spastica ereditaria (SPG15)

M. Vinci¹, M. Fichera³, S.A. Musumeci¹, F. Cali¹, G.A. Vitello¹

¹*Oasi Research Institute – IRCCS. Via Conte Ruggero, 73 - 94018 Troina, Italia*

²*Dipartimento di Scienze biomediche e biotecnologiche, Genetica medica, Università di Catania, Catania, Italia*

Le paraparesi spastiche ereditarie sono malattie degenerative clinicamente e geneticamente eterogenee e le varianti patogenetiche nel gene ZFYVE26 sono considerate una causa molto rara. Descriviamo la mutazione nel gene ZFYVE26 identificata in un paziente maschio di 27 anni figlio di genitori consanguinei giunto alla nostra osservazione per un progressivo peggioramento delle capacità motorie fino alla perdita di deambulazione e con sospetto di paraparesi spastica autosomica recessiva. Le indagini molecolari condotte mediante Next generation Sequencing (NGS) hanno portato all'individuazione del difetto molecolare causativo della patologia (presente in omozigosi) consentendo una corretta gestione clinica del paziente e la possibilità di counseling familiare. La variante identificata finora non è stata riportata in letteratura. Questo è uno dei pochi studi che utilizzano l'approccio "NGS-target-gene" e il nostro studio amplia la conoscenza delle varianti associate a paraparesi spastiche ereditarie al gene ZFYVE26. Considerando i tempi/costi dell'approccio NGS, riteniamo utile confermare l'importanza dell'utilizzo della NGS per la diagnosi genetica delle forme cliniche eterogenee.

COD. P192

MUTAZIONI GERMINALI DEL GENE LEMD3 IN SINDROME di BUSCHKE OLLENDORFF E OSTEOPOICHILOSI: REPORT DI 3 CASI E CONFRONTO CON I DATI DI LETTERATURA

M. Gnoli¹, E. Pedrini¹, M. Tremosini¹, I. Neri², L. Sangiorgi¹

¹*Medical Genetic Department, IRCCS Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna - Italy*

²*Division of Dermatology, Department of Specialized, Clinical and Experimental Medicine, University of Bologna, Bologna, Italy.*

La Sindrome di Buschke Ollendorff (BOS) e la osteopoichilosi (OPK) fanno parte di un gruppo di rare condizioni caratterizzate da aree di addensamento osseo. In OPK, come in Meloreostosi (iperostosi corticale delle ossa lunghe con aspetto a colata di cera), si può riscontrare un coinvolgimento cutaneo a livello della lesione ossea. Nella BOS all'interessamento osseo si associano segni cutanei (nevi del tessuto connettivo, dermatofibrosi lenticularis disseminata/elastoma giovanile). Possono essere presenti manifestazioni scheletriche o cutanee o entrambe, in maniera variabile da individuo a individuo. L'espressione clinica può essere di diversa entità: generalmente BOS e OPK rappresentano delle condizioni benigne, spesso asintomatiche, riscontrate incidentalmente. Mutazioni del gene LEMD3 sono riportate sia in BOS che in OPK. Essendo descritte famiglie in cui sono presenti individui affetti da OPK, Meloreostosi oppure con soli segni cutanei o con entrambe le manifestazioni (ossee e cutanee) si potrebbe ipotizzare che BOS, OPK e Meloreostosi rappresentino parte di uno stesso spettro fenotipico. Descriviamo dal punto di vista clinico e molecolare due casi (madre e figlio) affetti da BOS ed un caso di OPK. I due casi affetti da BOS presentano una mutazione (c.568C>T, p.Arg190*) non descritta in letteratura medica. Le manifestazioni sono cutanee e, a differenza di quanto riportato in letteratura, la sintomatologia è piuttosto severa nella madre, in cui l'esordio delle manifestazioni cliniche è avvenuto in età adulta, mentre nel figlio la diagnosi è stata posta nell'infanzia, in assenza di sintomatologia dolorosa importante. Nel caso di OPK è stata identificata una mutazione germinale del gene LEMD3 descritta in letteratura medica (c.2032C>T, p.Arg678*), in particolare in due famiglie, in cui l'espressione clinica è variabile tra gli affetti (OPK o Meloreostosi). Nel nostro caso il quadro radiografico, caratterizzato da focolai di addensamento osteosclerotico, è tipico di OPK e non si rilevano segni cutanei associati. Si confermano pertanto i dati di letteratura per quanto riguarda la variabilità dei fenotipi associati a mutazione del gene LEMD3, ma il nostro caso dimostra che le manifestazioni possono essere meno benigne di quanto riportato in letteratura.

COD. P193

The most common mutation of GS patients in Italian population, with particular attention of the most frequently mutation in the Calabrian patients.

M.D. Ceravolo¹, E. Colao¹, T. Grillone¹, G. Contrò¹, R. Talerico¹, A. Primerano¹, C. Politi¹, V. Bruni¹, F. Fabiani¹, M.D. Nocera¹, P. Malatesta¹, N. Perrotti¹, R. Iuliano¹

¹Az. Osp. Uni. "Mater Domini" - Catanzaro - U.O. Genetica Medica

The vast majority mutations of the gene SLC12A3, consist of amino acid substitutions. 15 amino acid substitution was observed in literature. Nine of these: R158Q, G374V, A464T, S615L, S615W, R642G, R642H, V677M and R958G were substitutions of amino acid residues that are highly conserved in all transport proteins belonging to the protein superfamily of co-transporters NCCT, NKCC1 and NKCC2. The other six: T163M, W172R, G463E, R852S, R852C and C985Y are conserved in the NCCT family protein. Both of frameshift mutations are in the exon 17, they lead to a truncated/alterated NCCT transporter that cause a reduction of reabsorption of sodium-chloride in the distal convoluted tubule. [Syren M.L. 2002]. The majority of patients are compound heterozygous for SLC12A3 mutations, but in a significant number of GS patients are found to carry only a single SLC12A3 mutation. [Blanchard A. et al. 2017]. In the North of Italy has been highlighted the most common mutation in Gitelman's syndrome is a duplication of 7bp in exon 10, c.1196_1202dupGTGATGC, that cause a premature termination of the codon: p.Ser402x. There are also other 75 types of mutation, including missense, nonsense, duplication, deletion, and splice site [Syren M.L. et al 2010]. The missense replacements were evenly distributed throughout the gene. In Calabria was found one new mutation in two brothers aged 20 and 24 with Gitelman Syndrome (GS). Molecular analysis was performed for the SLC12A3 gene responsible for SG. Compound heterozygotes are made, i.e. carriers of a known mutation associated with GS (c.2581C>T) and of a new mutation (c.283delC) in the SLC12A3 gene. The new mutation turns out to be a frame-shift leading to a premature stop-codon (p.Gln95ArgfsX19). Both brothers presented hypokalemia, hypocalciuria and hyper-reninemia; while only one brother presented hypomagnesemia. From the age of 16, the younger brother complains about the lower limbs and transitions lasting about eight hours, in addition to the feet and heels after competitive exercise. The elder brother who will not practice physical activity is not symptomatic.

COD. P194

Cardiopatía congenita complessa, atrofia corticale, ipoplasia cerebellare e microdelezione 16q: descrizione di un caso clinico.

S. Briuglia¹, N. Beltrami², E. Ferro², A.P. Capra¹, P.D. Romeo¹, A. Catania², D. Bronzi², A. Gulisano², C. Magro², I. Aiello¹, R. Civa¹, M.A. La Rosa¹, C. Campisi², S. Alberti¹

¹*Dipartimento di scienze biomediche, odontoiatriche e delle immagini morfologiche e funzionali, Unità di Patologia Clinica, Sezione di Genetica Medica, Università di Messina, Italia*

²*L.C. Laboratori Campisi, Avola (SR), Italia*

Case report: Riportiamo il caso di un neonato unigenito di genitori non consanguinei, con diagnosi prenatale di ventricolomegalia bilaterale, cardiopatía congenita complessa. Il quadro clinico includeva cuore sinistro ipoplasico, duplice DIV, pervietà del dotto di Botallo, associati a malformazione encefalica, trombosi massiva dei grandi seni cerebrali, facies triangolare, bozze frontali, telecanto, micrognatia, orecchie basse e retrorotate, torace stretto, ipotonia, artrogriposi. Analisi RMN ha rilevato dilatazione del sistema ventricolare sopratentoriale, ridotta sostanza bianca biemisferica, atrofia corticale, ipoplasia di emisferi cerebellari, verme e protuberanza anulare del ponte. Analisi a-CGH ha rivelato delezione interstiziale 16q12.2q21 di 1,7 Mb e delezione interstiziale Yp11.31p11.2 di 6 Mb, entrambe de novo. Conclusione: I dati clinici e citogenetici supportano la diagnosi di sindrome da delezione 16q12.2q21. La regione deleta comporta la perdita di circa 10 geni OMIM correlati a anomalie del sistema nervoso centrale, epilessia, oculari, scheletriche, renali, immunoematologiche e delezione del gene coenzima Q10. Il nostro riscontro rappresenta la più piccola delezione interstiziale 16q12.2q13. Attraverso una correlazione fra le caratteristiche cliniche del nostro probando con quelle dei pazienti descritti e la valutazione dei geni OMIM malattia (DECIPHER, ENSAMBLE, pubmed) è possibile contribuire a delineare una regione minima causativa dell'ampio spettro fenotipico della sindrome da delezione 16q e informazioni genotipo-fenotipo. Il significato dei riarrangiamenti del cromosoma Y in soggetti con disabilità intellettiva e anomalie congenite multiple non è ancora stato chiarito. Delezioni interstiziali della regione Yp12, che risulta soggetta a riarrangiamenti ricorrenti, sono state riportate anche in soggetti clinicamente normali.

COD. P195

Delezione 2q33-34 e disregolazione immunologica: correlazione e implicazioni terapeutiche.

I. Panasiti², L. Caminiti², F. Borgia⁵, A. Barbalace², P.D. Romeo¹, A.P. Capra¹, J. Fresta², G. Crisafulli², M.A. La Rosa¹, G.B. Pajno², A. Novelli³, S. Alberti¹, S. Briuglia¹

¹Laboratorio di Genetica OPBG Roma Italia

²Dipartimento di Scienze Pediatriche, Unità di Allergologia Pediatrica, Università Messina, Italia

³Dipartimento di scienze biomediche e odontoiatriche e delle immagini morfologiche e funzionali, Università di Messina, Italia

⁴L.C.Laboratorio Campisi Avola (SR) Italia

⁵Unità di Dermatologia Università di Messina

Introduzione: Le delezioni interstiziali 2q sono molto rare. Nel 2014 Docker et al descrivono la SATB2-associated Syndrome (SAS) caratterizzata da malformazioni multi-organo, ritardo mentale e mutazione di SATB2 (2q33.1). In collaborazione con il gruppo di Neil Romberg (Philadelphia), abbiamo descritto due casi con delezione 2q33 e disregolazione immunologica, conseguente all'aploinsufficienza del gene CTL4 (in press).

Case report: descriviamo una paziente di 6 anni nata a termine da gravidanza complicata da minacce d'aborto e parto pretermine. Il quadro clinico era caratterizzato da dismorfismi facciali, ritardo psicomotorio, ipotonia, scarsa crescita e difficoltà all'alimentazione, ano anteriorizzato con fistola, displasia anca sinistra, cariotipo 46,XX e CGH array con delezione 2q33.1-2q34 di 8.3 Mb de novo. Dall'età di 15 mesi presenza di episodi di febbre, dolori addominali, vomito e diarrea ricorrenti almeno 2 volte al mese, dermatite atopica severa e prurito sine materia, scarsamente responsivi alla terapia. Abbiamo eseguito esami ormonali, immunologici (IgA <5 mg/dl, CD3 67% vs 45-49%, CD8 11% vs 16-34%, CD19 18% vs 19-31%), allergologici, gastroenterologici e fatto diagnosi di sindrome del 2q33.1-34, SAS, deficit di IgA, disregolazione immunologica (deficit di Treg).

Discussione: Il quadro clinico della nostra paziente è correlato all'aploinsufficienza genica della regione deleta 2q, del gene SATB2 e di un cluster genico CD28/CTL4/ICOS, potente costimolatore del recettore T-cell (TCR). In letteratura mutazione di CTL4 è stata associata alla sindrome linfoproliferativa V e allo stato infiammatorio multi-organo, che riteniamo spieghi la sintomatologia auto-infiammatoria gastrointestinale e dermatologica della paziente. La biopsia cutanea ha confermato un infiltrato linfocitario perivascolare superficiale, periannessiale nel derma medio. Romberg et al (in press) hanno somministrato con beneficio terapia con CTLA4-Ig (Abatacept), che riduce la proliferazione T-cell e la produzione di citochine infiammatorie, attualmente utilizzato in Italia nell'artrite reumatoide. Riteniamo che questa segnalazione sia rilevante per le evidenze etiopatogenetiche e la loro traslazione clinico-terapeutica nei pazienti affetti da delezione 2q.

COD. P196

Different PGD approaches in couples with male or female carriers of de novo mutations

N. Fiandanese¹, E. Crugnola¹, D. Marabella¹, A. Gobbetti¹, M. Bellavia², G. Filippini¹

¹*CML Dr Risch SA Procrealab, 6900 Lugano, Switzerland*

²*Procrea SA, Swiss fertility Center, Lugano, Switzerland*

What is known:

Preimplantation genetic diagnosis (PGD) was developed for couples at high risk for having a child affected by a severe genetic disease. PGD requires simultaneous analysis of multiple linked polymorphic markers (STRs) in addition to direct mutation analysis, with a diagnostic accuracy close to 100%. This type of analysis usually requires determining parental haplotypes to define the linkage between the mutation and the informative STRs. In cases of de novo mutations, it is not possible to determine this linkage by preliminary family testing.

Aim of the study:

We present two cases of childless couples with de novo mutations, requesting PGD. In both cases we set up a specific strategy for PGD analysis. In the first case, the female was a carrier of a de novo NF1 mutation (c.3826C>T), precluding linkage prior to the PGD cycle. In the second case, the male carried a de novo TRPS1 mutation (c.2761C>T), and phase was determined by haplotype analysis of single sperm.

Participants/Material/settings/Methods:

Case 1: After IVF treatment, eight oocytes were retrieved, polar bodies PB1 and PB2 were biopsied at different times, and used for linkage analysis. A multiplex PCR for the chosen 4 informative STRs was performed on the PBs, simultaneously with SNAPshot analysis for the mutation. The two different haplotypes for the NF1 gene were thus defined.

Case 2: We performed the set-up for the PGD analysis using sperm cells. Spermatozoa from freshly-ejaculated semen were manually separated and transferred to PCR tubes for linkage analysis. We performed a multiplex single-cell PCR and SNAPshot analysis for the mutation. In this way, we established the mutant and wild-type TRPS1 haplotypes, necessary to do the subsequent analysis on the blastocysts.

Results:

Case 1: Only one zygote (of eight oocytes analysed) was wild-type, so suitable for transfer. The patient became pregnant and decided to do the prenatal diagnosis on chorionic villus sampling. The prenatal analysis confirm that the fetus is not carrier of the maternal mutation.

For the case 2, the couple has not yet started the IVF cycle.

Conclusions: These methods enable the use of linked markers in case of maternal or paternal de novo mutations, even if the familial typing of haplotypes is not possible beforehand.

COD. P197

Exome sequencing in a Consanguineous Pakistani family with xeroderma pigmentosum identified a novel protein truncating mutation in XPC gene; an update in mutational spectrum for better genetic counseling

M.A. Khan¹, J. Blatterer², E. Schaflinger², E. Petek², M.Z. Ali¹, E. Khan¹, C. Windpassinger²

¹Gomal Centre of Biochemistry and Biotechnology, Gomal University, D.I.Khan, Pakistan

²Institute of Human Genetics, Medical University of Graz, Graz, 8010, Austria.

Objectives: To investigate the causative genetic factor of Xeroderma Pigmentosum in a Consanguineous Pakistani family.

Background:

Xeroderma pigmentosum (XP) is a rare form of dermal disorder in which patient shows hyper-sensitivity to sun UV radiations. Clinically, XP is characterized by skin lesions with increased risk of skin cancer. Genetic studies have reported nine genes associated with Xeroderma pigmentosum. The product of these genes are mostly involved in DNA repair mechanism.

Methodology: The study was approved by ethical review committee of Gomal University, D.I.Khan. Molecular analysis was carried out through whole-genome SNP genotyping, exome sequencing and Sanger sequencing.

Results: Herein this report, we present a consanguineous Pakistani family suffering from autosomal recessive xeroderma pigmentosum with four affected individuals. The patients were presented with dense black spotting (skin lesions) on exposed parts of the body (face, neck, and limbs), indicating their extreme sensitivity to sun UV rays. Genetic mapping of this family showed linkage to the XPC gene locus, and subsequent DNA sequencing revealed a novel single base insertion of thymine nucleotide {NM_004628.4: c.291_292insT (c.291dupT)} in the 2nd exon of XPC. The identified mutation leads to a premature stop codon (TGA) at position 98 (p.Asp98*) and thus presumably results in a truncated protein.

Discussion

XPC (Xeroderma pigmentosum, complementation group C) gene is located on 3p25.1 and encodes a product which is involved in nucleotide excision repair. The current nonsense mutation presumably truncates all the functional domains of XPC protein, including multiple Rad4 beta-hairpin domains, Transglutaminase-like superfamily, Papain-like cysteine peptidase superfamily and DNA_repair_Rad4 domain. Hence, it is proposed that this mutation may lead to a loss of protein function and thus causes failure of DNA repair mechanism.

Conclusion: The study assisted in expanding the mutational spectrum of XPC gene and creating awareness about the drastic effect of extensive consanguineous marriages.

COD. P198

Investigating the role of ERAP1 and STAT4 polymorphisms on Behçet Syndrome susceptibility with sequence-typing approach

M.C. Padula^{1,2}, P. Leccese¹, E. Pellizzieri², N. Lascaro¹, G. Pepe², M. Gilio¹, T. Carbone¹, A.A. Padula¹, S. D'Angelo¹, G. Martelli²

¹*Rheumatology Institute of Lucania (IReL) and Rheumatology Department of Lucania, San Carlo Hospital of Potenza and Madonna delle Grazie Hospital of Matera, Italy*

²*Department of Science, University of Basilicata, Potenza, Italy*

Background. Genome-wide association studies (GWASs) have become a significant tool to understand the pathogenesis of complex disorders, including Behçet Syndrome (BS), a chronic multisystem rheumatic disorder. The role of several single nucleotide polymorphisms (SNPs) was reported to explain the disease susceptibility [1-4]. **Objectives.** This case-control study aims to genotype two major genes involved in the immune response and to test the SNPs association with the risk of BS in a group of Italian patients. **Methods.** SNPs genotyping was performed in order to characterize the genotype distribution of three selected SNPs: rs17482078 (NG_027839.1:g.35983G>A) and rs27044 (NG_027839.1:g.35997C>G) of ERAP1, rs7572482 (NG_012852.1:g.5854T>C) of STAT4. Genomic DNA was isolated from whole blood of 38 BS patients and 39 age- and sex-matched healthy controls. SNPs were detected by PCR amplification of genomic DNA, amplicons running on agarose gel and direct sequencing. A downstream in silico step was performed for the variant analysis. The odds ratio (OR) with 95% confidence intervals was calculated to assess the strength of BS association for each genotype. **Results.** The frequency of rs17482078 GG genotype (wild-type homozygosity) and GA genotype (heterozygosity) showed no statically significant differences when patients and controls were compared (p-value: 0.463). The rs17482078 AA mutant genotype was interestingly absent in the control group, while its frequency was equal to 18.42% for the patient group; the difference was statistically significant (p-value: 0.0059; OR: 88.06). Out of 38 BS patients, 8 subjects (21.05%) showed the rs27044 wild-type CC genotype, while 19 (48.72%) of controls revealed the same genotype; this difference was statistically significant (p-value: 0.0110). No statistically significant differences were found for the heterozygous CG genotype and the GG genotype frequencies when patients and controls were compared. No differences were observed for STAT4 SNP in terms of BS risk. **Conclusions.** Our results showed the major role of rs17482078 ERAP1 in influencing BS susceptibility. The homozygosity for this variant was associated with a significant increased risk of BS. Larger series of patients and controls are required to support the data. **References.** [1] Leccese P et al. *Curr Opin Rheumatol.* 2017;29(1):12-16. [2] Takeuchi M et al. *J Autoimmun.* 2015;64:137-148. [3] Gul A. *Current Opinion in Rheumatology.* 2015;26:56-63. [4] Takeuchi M et al. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(12): 2208-2211.

COD. P199

Nuova mutazione del gene KRT1 responsabile di un quadro grave di ittiosi con particolare interessamento palmo plantare

P. FAILLA¹, C. SCHEPIS², M. VINCI³, F. CALI³, C. ROMANO¹

¹ U.O.C. di Pediatria e Genetica Medica, IRCCS Associazione Oasi Maria SS, Troina (EN)

² U.O.S. O di Dermatologia, IRCCS Associazione Oasi Maria SS, Troina (EN)

³ U.O.S. di Genetica Molecolare, IRCCS Associazione Oasi Maria SS, Troina (EN)

PREMESSA

Le ittiosi sono delle genodermatosi che appartengono ad un'ampia ed eterogenea famiglia di disordini della cheratinizzazione che fanno apparire la pelle come fosse coperta da squame, screpolata ed inspessita. Il termine deriva dal greco $\chi\theta\varsigma$ per la relativa somiglianza con la pelle a squame dei pesci.

SCOPO DELLO STUDIO

Data la peculiarità del fenotipo abbiamo voluto indagare sull'assetto genetico del soggetto mediante studio NGS (sequenziamento di nuova generazione) con un pannello di geni noti per le varie forme di Ittiosi non sindromiche sia Autosomiche Dominanti (AD) che Recessive (AR)

MATERIALI E METODI Descriviamo il caso di una bambina di 7 anni, con ittiosi congenita affetta da lesioni estese a tutto il mantello cutaneo e particolarmente gravi a livello palmo-plantare, tali da limitare la deambulazione e i movimenti fini delle mani. E' stata sottoposta ad NGS per individuare il difetto genetico della patologia con un fenotipo di difficile classificazione.

RISULTATI

E' stata riscontrata la variante missenso del gene KRT1 c.563A>T (pAsn188Ile), non precedentemente descritta in altri pazienti (The Human Gene Mutation Database - professional) e non identificata in controlli sani (1000 Genomes Project, NHLBI-ESP 6500 exome project). Analisi di predizione Sift: mutazione deleteria, Polyphen: probabilmente patogena. La variante è stata confermata mediante sequenziamento Sanger ed è risultata in eterozigosi non ereditata dai genitori.

CONCLUSIONI

L'inquadramento diagnostico delle varie forme di Ittiosi congenite, che presentano un ventaglio particolarmente variegato di espressioni fenotipiche spesso sovrapposte, è difficile. Ci sono poi delle forme a trasmissione AD, altre AR e non mancano le forme X-linked. Poter avere a disposizione un test genetico in grado di districarsi tra i vari geni potenzialmente coinvolti ci permette di affrontare l'approccio terapeutico in maniera corretta, orientarsi prognosticamente e fornire alla famiglia una consulenza genetica corretta. Infatti nel nostro caso siamo di fronte ad una mutazione de novo a trasmissione AD e quindi il rischio per la coppia genitoriale è trascurabile.

COD. P200

TEST DI SCREENING GENE CFTR EFFETTUATO SU PARTNER MASCHILE DELLA COPPIA INFERTILE CANDIDATA A TECNICHE DI PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA (PMA). L'IMPORTANZA DEL COLLOQUIO PRETEST.

R. Mineri², E. Albani¹, T. Sarno², M. Bologna², R. Benaglia¹, L. Negri¹, P. Levi-Setti¹, M.T. Sandri²

¹*Laboratorio Analisi, Settore Genetica Molecolare, Istituto Clinico Humanitas*

²*Fertility Center, Sez. Ginecologia e Medicina della Riproduzione, Istituto Clinico Humanitas*

Premessa

E' noto che circa il 15% dell' infertilità maschile sia dovuta a cause genetiche. La Fibrosi Cistica (FC) è uno dei disordini genetici a trasmissione autosomica recessiva più diffusa nella popolazione caucasica (1/2500). Una coppia su 625 circa è una coppia di portatori sani e il rischio di un figlio affetto è del 25%. E' consigliata l'esecuzione del test di screening per FC ad uno dei partner, preferibilmente al maschio, nella coppia che intraprende un percorso PMA.

Scopo dello studio

Nel recente passato vi è stata poca chiarezza e disomogeneità riguardo alle indicazioni all'esecuzione dello screening del gene CFTR nella popolazione PMA. La nostra casistica supporta l'importanza dello screening del gene CFTR riportando i risultati del test eseguito sui soggetti maschili della coppia infertile.

Materiali e Metodi

Estrazione MagnaPure 2.0 LC (Roche). Amplificazione e rilevazione: INNO-LIPA CFTR19, CFTR17+Tn Update, CFTR Italian Regional (Fujirebio) che permette l'identificazione delle mutazioni più frequenti nel bacino europeo (efficienza diagnostica 81,6% per la popolazione italiana)

Risultati

In questo studio riportiamo i risultati dello screening di I° livello del gene CFTR nella popolazione infertile maschile arrivata alla nostra osservazione: 181 individui di sesso maschile sono risultati portatori di una mutazione in eterozigosi del gene CFTR su 3617 soggetti maschili analizzati (5%).

Conclusioni

Nella nostra casistica la popolazione infertile maschile mostra una frequenza dello stato di portatore per FC più elevato rispetto a quello della popolazione generale (1/20 vs 1/25). Nell'ipotesi che questo incremento potesse essere dovuto ad una rilevante presenza di infertilità legata a CBAVD abbiamo valutato i dati dello screening andrologico: 11% CBAVD, 3% azoospermia secretoria, 4,7% OAT e 16% secr.OAT, 65,3% normospermici. L'aumento della frequenza dello stato di portatore potrebbe essere dovuto ad altre forme di infertilità maschile non caratterizzate da azoospermia o ad una sottostima epidemiologica per diagnosi mancata di forme molto lievi o atipiche. Data la complessità della patologia è fondamentale un adeguato colloquio pre-test effettuato da personale esperto per evitare che non vengano individuati e non inseriti i soggetti a rischio.

COD. P201

A novel three way MLL rearrangement in adult Acute Myeloid Leukemia

C. Giudici¹, M. Giagnacovo¹, D. Ferrario¹, S. Macchi¹, D. Armenante¹, P. Bianchi¹, M. Turrini², A. Gardellini², F. Alberio², V. Saccà², M. Zancanella², P. Modena¹

¹*U.O.S. Genetica - ASST Lariana - Como*

²*U.O. Ematologia - Osp. Valduce - Como*

The Mixed-Lineage Leukemia 1 (MLL1) gene (now renamed lysine [K]-specific Methyl Transferase 2A or KMT2A) on chromosomal band 11q23.3 is disrupted in a unique group of acute leukemias. Approximately 10% of all leukemia harbor MLL1 translocations and more than 90 different partner genes have been described. Two patient populations comprise the majority of cases: infants affected by acute lymphoblastic leukemias and adult patients with acute myeloid leukemias. In general, outcome for all MLL-rearranged leukemias is poor when compared to other types of leukemias.

In this report we describe a case of monoblastic leukemia (FAB M5) occurred in an elderly man that showed a complex rearrangement, involving three chromosomes: t(1;4;11)(p33;q21.3;q23.3), so far never reported (cf recent overview about MLL recombinome in Meyer C. et al in "Leukemia" (2018)32,273-284). Three way translocations involving 11q23 may be difficult to detect by cytogenetic tools alone. In the present case, however, the involved chromosomes were readily identifiable by QFQ banding. The recurrent translocation t(4;11)(q21;q23) leads to the production of MLL1/AF4 (now called KMT2A and AFF1 respectively) fusion gene. The majority of cases occur in infant/pediatric ALL, but it rarely can be seen in acute myeloid leukemia, usually M4 or M5 subtypes, as well as in our patient. Three way complex t(4;11;Var) has very occasionally described and there is consensus that the crucial event lies on der(11). Our next aim is the molecular characterisation of fusion sites on derivative chromosomes in order to confirm the involvement of AF4 on der(4) and to identify the third partner gene on der(1).

COD. P202

Diagnosi molecolare delle distrofie retiniche ereditarie

E. D'Alcamo, V. Agrigento, S. Sclafani, M. Piccione², V. Randazzo⁴, A. Giuffrè⁴, F. D'Esposito⁴, P. Scibetta³, F. Listì, A. Pioppo³, A. Maggio

¹*Dip. Ematologia e malattie rare - lab. Genetica - U.O. Ematologia delle malattie rare del sangue e degli organi ematopoietici - A.O.O.R. Villa Sofia - Cervello - Palermo*

²*U.O.S.D. Genetica Medica - A.O.O.R. - Villa Sofia - Cervello - Palermo*

³*U.O.C. Oftalmologia A.O.O.R. Villa Sofia - Cervello - Palermo*

⁴*Associazioni Retinopatici Sicilia (ARIS) - Palermo*

Premessa

La Retinite Pigmentosa (RP) è una distrofia retinica ereditaria caratterizzata da variabilità clinica ed eterogeneità genetica. Ad oggi sono stati identificati oltre 70 geni causativi, ma circa il 40% dei pazienti con RP rimane geneticamente non risolto.

Scopo dello studio

Lo scopo dello studio è stato quello di utilizzare tecniche innovative come la Next Generation Sequencing (NGS) che consente il sequenziamento massivo parallelo di un gran numero di geni per identificare le mutazioni causative di malattia in una coorte di pazienti siciliani.

Materiali e Metodi

La tecnica NGS è stata utilizzata su piattaforma Ion Torrent PGM. È stato progettato un pannello con 70 geni noti associati a RP. L'analisi genetica è stata eseguita in 30 campioni di pazienti affetti incluso il propositus e i loro parenti. Per validare le mutazioni trovate è stato utilizzato il sequenziamento Sanger e per comprendere l'effetto patogenetico delle varianti trovate è stata eseguita l'analisi di segregazione familiare utilizzando il propositus e i familiari affetti e non. In pazienti con altre distrofie retiniche con mutazioni identificate in altri centri è stata eseguita analisi di segregazione familiare.

Risultati

Per quanto riguarda l'analisi in NGS, l'85% delle regioni target era coperto per almeno 20X. Il coverage di base era in media 90,5% e quello degli ampliconi circa il 91%. Tra i 30 soggetti con RP analizzati, il 33% ha mostrato mutazioni patogenetiche precedentemente descritte in letteratura mentre nel 67% dei campioni abbiamo trovato varianti genetiche sconosciute o di significato incerto (VUS). Tutte le variazioni genetiche sono state confermate usando il metodo Sanger. L'analisi della segregazione familiare è stata eseguita per determinare la natura della variazioni sconosciute o delle VUS. L'analisi molecolare dei gruppi familiari dei pazienti affetti da distrofia dei coni ha permesso di stabilire la patogenicità delle diverse mutazione riscontrate.

Conclusioni

L'analisi molecolare in NGS ha permesso di identificare un gran numero di mutazioni in geni diversi che non avremmo potuto identificare con il metodo Sanger. I nostri risultati hanno mostrato una sufficiente precisione del nostro metodo e hanno suggerito l'importanza dell'analisi molecolare nella diagnosi clinica.

COD. P203

DISPLASIA ECTODERMICA X-LINKED: NUOVA VARIANTE NEL GENE EDA E FENOTIPO ATIPICO

M. Falco¹, P. Fontana¹, M.R. D'Apice², G. Longo³, C. Lombardi¹, M. Ciavarella¹, M. Maioli¹, G. Cantalupo¹, F. Scarano¹, S. Amabile¹, G. Scarano¹, F. Lonardo¹

¹*U.O.S.D. Genetica Medica A.O.R.N. Rummo (Benevento)*

²*Policlinico Tor Vergata, Roma*

³*Università degli Studi di Roma Tor Vergata*

La Displasia Ectodermica Anidrotica X-linked (OMIM #305100) è caratterizzata da anomalie dello sviluppo ectodermico; le strutture principalmente coinvolte sono quindi la cute, i capelli, i denti, le unghie e le ghiandole sudoripare. Caratteristica della patologia è la triade clinica ipotricosi – ipo/anidrosi – ipodontia (capelli radi e sottili e scarsa presenza di peli sul corpo, ridotta capacità di produrre sudore ed anomalie dentarie sia di forma che di numero). Lo spettro dei segni clinici può essere tuttavia ampio e variabile, configurando quadri clinici più o meno gravi. La malattia è dovuta a mutazioni del gene EDA ed è trasmessa con modalità X-linked dominante, pertanto i maschi affetti presentano un fenotipo più grave e le femmine affette manifestazioni cliniche più sfumate. Descriviamo una famiglia nella quale è stata posta diagnosi di displasia ectodermica. Il primo paziente è giunto alla nostra osservazione all'età di circa 4 anni. Genitori non consanguinei. Anamnesi familiare positiva nel ramo materno per soggetti con anomalie della cute e dei denti. Alla visita parametri auxologici nella norma, sopracciglia rade, alcuni elementi conici e sudorazione profusa. Viene richiesta analisi molecolare del gene EDA, che ha rilevato la variante c.520A>G che determina un cambio missenso p.(K174E), ad oggi non descritto. L'esame genetico è stato quindi esteso agli altri membri della famiglia e la variante è stata rilevata nel fratello, nella sorella e nella madre; la stessa variante è stata poi rilevata nella sorella della madre, in suo figlio e in sua figlia. Non è stato possibile studiare il nonno materno in quanto deceduto, ma viene descritto come affetto dalla malattia. Tutti i maschi emizigoti per la variante presentano soprattutto anomalie dentarie, ma non mostrano anomalie nella sudorazione. Le femmine eterozigoti presentano invece anomalie dentarie minori ma riferiscono una scarsa adattabilità al caldo. Questa famiglia merita una particolare attenzione perché la variante c.520A>G nel gene EDA non è mai stata descritta in letteratura né presente nei database di riferimento e perché il quadro clinico dei soggetti di sesso maschile non si discosta molto da quello dei soggetti di sesso femminile. Inoltre nei maschi la sudorazione non è per niente compromessa, anzi in alcuni soggetti risulta essere addirittura eccessiva.

COD. P204

FAMILIAR COMPLEX STRUCTURAL REARRANGEMENT INVOLVING A SINGLE CHROMOSOME 2

R. Silipigni¹, S. Paganini¹, E. Monfrini², G. Sovena¹, G. Tolva³, A. Giacobbe⁴, D. Milani³, S. Gueneri¹

¹Laboratory of Medical Genetics, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy

²Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Dino Ferrari Center, Neuroscience Section, Department of Pathophysiology and Transplantation, University of Milan, Milan, Italy

³Pediatric Highly Intensive Care Unit, Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico Italy

⁴Child and Adolescent Neuropsychiatric Service (UONPIA), Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico Italy

Complex Chromosomal Rearrangements (CCRs) are structural rearrangements involving more than three chromosomes or having more than two breakpoints. CCRs preferentially occur during spermatogenesis and it was proved that approximately 70% of all CCRs are not associated with any clinical phenotype at all. We describe a complex structural rearrangement segregating in a two-generation family involving copy number gains, insertion and balanced translocation confined on a long arm of chromosome 2. A 4-year-old male was evaluated for developmental delay, mild intellectual disability, epicanthus and low-set ears. Because of the clinical evaluation, an array comparative genomic hybridization (a-CGH - 8x60K) was performed on peripheral blood. The analysis detected two non contiguous genomic gains of chromosome 2 at bands q32.3-q33.2 spanning the bases 196933855-204594521 and bands q36.1-q36.3 spanning the bases 221867870-226519608. a-CGH of parents were normal. In order to define the origin and elucidate the structure of rearrangements we analyzed all members of the family. Karyotype and FISH analysis of proband revealed a recombinant chromosome 2 with a direct insertion of bands q32.3-q33.2 and q36.1-q36.3 into band q12 and the presence of the same bands in their original location (duplication). Karyotype and FISH analysis of the father revealed a de novo direct insertion of bands q32.3-q33.2 and q36.1-q36.3 into band q12 and a de novo balanced translocation between the q arm of the same chromosome 2 and the p arm of chromosome 10 not present in the proband. The absence of the translocation in the proband suggest the occurrence of a crossing-over during spermatogenesis. A SNP array analysis and haplotype reconstruction of all members of this family allowed to ascertain the paternal origin of duplications. Our report underlines the importance of determining the correct origin of chromosomal aberrations, using different molecular cytogenetic tests, in order to provide the members of the family with a good estimation of their reproductive risk mostly in cases involving CCRs.

COD. P205

RASopatie: un caso di Sindrome CFC da delezione del gene MAP2K2

A. Gennaro¹, L. Bernardini², F. Mannino¹, D. Mangiameli¹, S.C. Gorgone¹, F. Lepri³, T. Mattina¹

¹*Genetica Medica-Università di Catania, Dipartimento BIOMETEC, Centro di Riferimento Regionale HUB per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare*

²*Unità di Citogenetica, Fondazione Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

³*UOC Laboratorio di Genetica Medica IRCCS OPBG - Roma*

Le RASopatie comprendono un gruppo di sindromi caratterizzate da dismorfismi craniofacciali, malformazioni cardiache, anomalie scheletriche e di crescita, compromissione neurocognitiva e aumentato rischio oncologico. Sono causate da mutazioni germinali dei geni coinvolti nella via Ras/MAPK. Negli ultimi 10 anni abbiamo identificato 37 pazienti eleggibili per il test: 31 hanno eseguito soltanto analisi di PTPN11 (10 risultati positivi), su 6 è stato eseguito NGS dei geni della cascata RAS (PTPN11, SOS1, BRAF, RAF1, MAP2K1, MAP2K2, NRAS, KRAS, SHOC2): un soggetto è risultato positivo per una mutazione di PTPN11, un altro per una mutazione del gene BRAF.

Uno 4 dei pazienti negativi all'analisi NGS, presentava una microdelezione 19 p13.3 de novo identificata con SNP-array.

Nella regione deleta mappa il gene MAP2K2. Caso clinico: il piccolo ci viene inviato dalla neuropsichiatria infantile per note dismorfiche e ritardo del linguaggio. Presenza di dismorfismi facciali: fronte alta prominente, ipertelorismo, rime palpebrali verso il basso, strabismo divergente, sopracciglia rade, ciglia lunghe, naso corto, orecchie a basso impianto. Agli arti inferiori presenza di piattismo bilaterale con overlapping del II sul III dito e clinodattilia del V dito. All' ecocardiocolordoppler si evidenziava insufficienza aortica di grado moderato, ectasia del bulbo aortico e dilatazione dell'aorta ascendente. Eseguiti analisi dei geni della cascata RAS, risultata negativa. In letteratura, delezioni del gene MAP2K2 si associano ad un fenotipo caratteristico che si sovrappone alla Sindrome CFC (Cardio-Facio-Cutanea).

Ad oggi in letteratura sono riportati solo 7 pazienti con delezione 19p13.3 con fenotipo sovrapponibile alla Sindrome Cardio-Facio-Cutanea, mutazioni dei geni MAPK1/MAPK2 si osservano nel 25% dei casi di Sindrome CFC.

COD. P206

Riarrangiamenti rari del locus MECOM in quattro casi di sindrome mielodisplastica/leucemia mieloide acuta

G. Cantamessa¹, D. Fantasia², G. Sabbatinelli¹, A. Di Nardo², L. Cerasa¹, M. Alfonsi³, S. Grillo¹, S. Pulini⁴, P. Salutati⁴, C. Cantò⁴, P. Guanciali Franchi^{1,3}, G. Calabrese^{1,2}

¹*Genetica Medica, Dip. Scienze Mediche, Orali e Biotec., Università di Chieti*

²*UOSD Genetica Oncoematologica, AUSL Pescara*

³*UOC Genetica Medica, Ospedale Civile di Chieti*

⁴*Dip. Ematologia, AUSL Pescara*

Il riarrangiamento di MECOM (MDS1-EV11 Complex locus) in 3q26 è presente nel 2% circa delle leucemie mieloidi acute (LMA) e delle sindromi mielodisplastiche (SMD) e costituisce un fattore prognostico negativo (De Braekeleer et al., 2015; Heim & Mitelman, 2015).

Abbiamo individuato 2 pazienti con SMD e 2 pazienti con LMA con differenti riarrangiamenti rari del locus MECOM.

Il paziente 1, uomo di 72 anni con SMD, presentava cariotipo 46,XY,t(3;16)(q26;q22). L'analisi in FISH con un pannello di 6 cloni BAC della libreria RP11 (Technogenetics, Lodi), mappati in 3q26 e contenenti il locus MECOM, ha mostrato il breakpoint 3q nel clone più centromerico BAC-1 (3'MECOM), una delezione della regione ricompresa nei BAC-2a e 2b, e i BAC-3, 4 e 5 (5'MECOM) traslocati in 16q22.

Il paziente 2, donna di 64 anni con SMD, presentava cariotipo 46,XX,t(3;12)(q26;q21). L'analisi in FISH con il pannello BAC ha permesso di individuare il breakpoint 3q nel BAC-1, associato a una delezione di 72.72kb rivelata con analisi array-CGH. I restanti BAC del pannello sono risultati su 12q21.

Il paziente 3, donna di 44 anni con LMA, presentava cariotipo 46,XX,t(2;3)(p21;q26). L'analisi in FISH ha mostrato il breakpoint contenuto nel clone BAC-1 e la traslocazione in 2p21 della porzione telomerica del BAC-1 e degli altri BAC più distali.

Il paziente 4, donna di 71 anni con LMA e cariotipo complesso, presentava un cromosoma 3 dicentrico con due siti MECOM, di cui uno riarrangiato in una t(3;5)(q26;q13). L'analisi in FISH ha mostrato la porzione centromerica del BAC-1 rilocalizzata sul der(5), mentre la restante parte del BAC-1 e gli altri BAC sono risultati mappare sul der(3).

I pazienti 1, 2 e 4 sono deceduti entro 18 mesi dalla diagnosi, mentre il paziente 3 ha ricevuto un trapianto di cellule staminali emopoietiche da sangue periferico ed è attualmente in remissione ematologica e molecolare.

I risultati finora ottenuti hanno permesso di individuare una regione critica contenente il breakpoint del locus MECOM, mappata nel BAC-1 (92F16), il quale risulta coinvolto in tutti i pazienti. La caratterizzazione dei 4 riarrangiamenti, attualmente in corso, potrà fare ulteriore luce sulla struttura complessa del locus MECOM e sul suo ruolo nella patogenesi e nella severa prognosi nei pazienti con SMD e LMA.

COD. P207

SINDROME UROFACIALE DA DELEZIONE IN OMOZIGOSI NEL GENE HPSE2 IN UNA FAMIGLIA ITALIANA

V. Nicotra¹, B. Torres², S.C. Gorgone¹, M. Goldoni², L. Bernardini², T. Mattina¹

¹*Genetica Medica- Università di Catania, Dipartimento BIOMETEC, Centro di Riferimento Regionale HUB per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare*

²*Unità di Citogenetica, Fondazione Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

Il propositus è un bambino di 9 anni, nato da genitori che negano consanguineità, inviatici per disturbo da deficit di attenzione, iperattività, note dismorfiche e anomalie elettroencefalografiche parossistiche focali nella regione temporale sinistro rilevate con EEG. Presentava inoltre disturbi minzionali e idrocele sinistro con trabecolature vescicali da sforzo, ispessimento delle pareti vescicali e aspetti pseudo diverticolari parietali; residuo vescicale modesto dopo minzione, RM lombosacrale risultata nella norma. All'esame obiettivo i parametri auxologici e lo sviluppo psicomotorio erano nella norma, erano presenti: tono muscolare leggermente ridotto, lassità legamentosa ed una fisionomia facciale peculiare: il bambino sorrideva a labbra chiuse. La sorella maggiore mostrava la stessa fisionomia facciale e sin dal primo mese di vita aveva presentato problemi vescicali e nefropatia da reflusso bilaterale, vescica neurologica in assenza di disrafismo spinale occulto, per i quali aveva subito diversi interventi di plastica vescicale. L'analisi combinata di CNVs e regioni di omozigosità (ROH) effettuata su entrambi i fratelli mediante SNP-array è risultata negativa alla risoluzione di 75 Kb e ha evidenziato una ROH condivisa di circa 10.2 Mb sul braccio lungo del cromosoma 10, all'interno del quale mappa il gene HPSE2 (OMIM *613469), responsabile della sindrome urofacciale, una rara patologia autosomica-recessiva caratterizzata dall'associazione tra una grave disfunzione della minzione e un'espressione caratteristica del viso. La successiva analisi di NGS non ha rilevato varianti patogenetiche del gene e ha suggerito la perdita dell'esone 7, confermata alla rivalutazione dell'esperimento di SNP-array, che ha evidenziato una microdelezione di circa 5 Kb: arr[GRCh37]10q24(100398788_100403393)x0 in omozigosi. Ad oggi, secondo le nostre conoscenze, questo è il primo caso di una delezione intragenica in omozigosi nel gene HPSE2 descritta in una famiglia italiana e il primo caso di microdelezione dell'esone 7, molto conservato evolutivamente. Evidenzia inoltre che le forme recessive da identità per discesa e delezioni intrageniche siano più frequenti di quanto atteso.

COD. P208

Targeted NGS-panel can improve the simultaneous identification of CNVs and SNVs in Mendelian diseases

L. Citrigno¹, A. Magariello¹, A. Praticò², M. Ruggieri², M. Muglia¹

¹*Institute of Neurological Sciences, CNR, Mangone (CS)*

²*Department of Clinical and Experimental Medicine, Section of Pediatrics and Child Neuropsychiatry, University of Catania, Italy.*

The current genetic molecular diagnosis has been strongly improved by the Next-Generation sequencing (NGS). The new technology has demonstrated a big power to identify single-nucleotide variations (SNVs), small insertions/deletions and copy number variants (CNVs) underpinning disease onset. We used a NGS approach, to detect simultaneously CNVs and SNVs in patients affected by Hereditary Spastic Paraplegia (HSP) and Neurofibromatosis type 1 (NF1). High coverage targeted NGS data were generated at the Next Generation Sequencing Core of the Institute of Neurological Sciences, CNR, Mangone (CS) by amplicon-based gene panels. We used a neurological panel containing 755 genes responsible for different neurological disease and a custom panel targeting the coding sequence of six genes associated with neurocutaneous syndromes. The enriched libraries were sequenced on the Personal Genome Machine (PGM) from ThermoFisher Scientific. Primary bioinformatic analysis was carried out using Ion Torrent suite vers. 5.6. To calculate the copy number variants we used the sequencing read depth (RD) approach, based on the assumption that the RD signal is proportional to the number of copies of the chromosomal segment present in the DNA samples. For the normalization we generated a baseline with ten normal controls. By using the neurological panel we detected in an individual affected by a recessive form of HSP the variation p.A510V and the deletion of the exons 1-3 in SPG7 gene. In the NF1 screening using the custom panel, we identified in one individual the already reported deletion of exons 6-8 and in another subject the novel SNV c.2850+2 T>C. The SNVs were validated by Sanger method, whereas the deletion in SPG7 gene was confirmed by MLPA and the deletion in NF1 gene by qPCR using Syber green and $\Delta\Delta C_t$ method. In conclusion, unlike the methods already in use such as Sanger sequencing, MLPA, CGH array and qPCR, the data obtained by NGS can be integrated allowing, by a single experiment, to detect all types of the genetic variations, drastically reducing the costs and times of various genetic tests.

COD. P209

VALUTAZIONE FENOTIPICA E GENOTIPICA NELLA APLOINSUFFICIENZA DEL GENE SHOX

F. Cambosu¹, L. Ulgheri¹, S. Natale², G. Soro¹, P.M. Campus¹, R. Sanna^{2,1}, V. Alesi³, F. Lepri³, M. Mucciolo³, A. Novelli³, A. Montella^{1,2}

¹*U.O. di Genetica e Biologia dello Sviluppo, AOU Sassari, Sassari*

²*Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari, Sassari*

³*U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, Dipartimento dei Laboratori, IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma*

L'aploinsufficienza del gene SHOX (Short stature H^OmeoboX-containing gene) è spesso causa di bassa statura patologica; può essere associata a: Bassa Statura Idiopatica (ISS), Discondrosteosi di Léry-Weill (LWS), Displasia Mesomelica di Langer (LMD). Un'alterazione del gene SHOX si trova nel 2-15% dei pazienti con ISS e nel 50-90% dei pazienti con LWS; molto più raro il riscontro di LMD conseguente a omozigosi. Il gene SHOX, localizzato nella regione pseudoautosomica 1 (PAR1) dei cromosomi sessuali X e Y (Xp22.33 e Yp11.32), è composto da 6 esoni e ha almeno due prodotti di espressione nei fibroblasti del midollo osseo, SHOXa e SHOXb. SHOX inoltre regola altri geni coinvolti nei processi embriogenetici e morfogenetici. Le cause di aploinsufficienza del gene SHOX sono: delezione intragenica o della regione contenente il gene; mutazioni puntiformi distribuite in tutto il gene; duplicazione parziale del gene (13-346 Kb) o della regione critica contenente l'enhancer CNE9; riarrangiamenti cromosomici che determinano una ridotta espressione genica.

Il presente studio retrospettivo valuta la variabilità fenotipica di diversi soggetti portatori di aploinsufficienza di SHOX, conseguente a differenti alterazioni del gene stesso; lo studio include 25 individui (16 femmine e 9 maschi) di età variabile da 0 a 62 anni (8 pediatrici, 13 adulti, 4 geriatrici), appartenenti a 11 famiglie, giunti tra il 2008 e il 2018 presso l'ambulatorio di Genetica dell'U.O. di Genetica e Biologia dello Sviluppo dell'AOU di Sassari.

Il fenotipo riscontrato nell'ambito delle diverse famiglie è piuttosto eterogeneo; i pazienti presentano: mesomelia, ipertrofia muscolare e bassa statura disarmonica. Lo spettro del genotipo comprende: delezioni (terminali, parziali e interstiziali), delezione con jumping, duplicazioni, duplicazioni/delezioni (intrafamiliare), traslocazioni, mutazioni puntiformi sia in eterozigosi sia in omozigosi.

COD. P210

5q12 deletion syndrome: Description of a new case associated with a t(3;10)(q26;q22) de novo translocation

A. Cellamare¹, M.C. Nuzzi¹, R. Tripaldi¹, M. Gentile², R. Ficarella², C. Nanna², M.A. Moretti², N. Coccaro³, F. Albano³, L. Cardarelli⁴, A. Panarese⁵, A. Gesario⁵

¹*UOC Patologia Clinica, Sezione di Genetica Medica ASL TARANTO – P.O.C. SS. Annunziata*

²*UOC Laboratorio Genetica Medica ASL BARI – P.O. DI VENERE*

³*D.E.T.O. Sezione di Ematologia, Università degli Studi di Bari*

⁴*Rete Diagnostica Italiana, Gruppo Lifebrain, Limena (PD)*

⁵*Laboratorio Analisi “F. Ditunno” srl, Bari*

Chromosome 5q12 deletion syndrome (OMIM 615668), is a relatively unfamiliar disease whose associated phenotype is heterogeneous, depending on the size, and, especially, on the deleted region. To date, only 11 patients with such microdeletion have been reported in literature. They share some clinical features, i.e. postnatal growth retardation, intellectual disability (ID), behavioral abnormalities (hyperactivity), nonspecific ocular defects, and facial dysmorphism (Holder and Cheung, 2015). Epilepsy was reported in three cases (Jaillardet al., 2011; Cetin et al., 2013). We report a 8-month-old child of non-consanguineous healthy parents. She was born at 37 weeks by cesarean section. At prenatal US examination fetal growth retardation (< 5centile) and polyhydramnios were present. At the last follow up, 8 months of age, weight and head circumference were at 10-25th centile, while lenght <3rd centile. At the physical examination there was an angioma of the right lower eyelid; abdominal ultrasound showed an ovarian cyst. Cytogenetic and aCGH analysis identified a de novo translocation, 46,XX,t(3;10)(q26;q22)dn, and a concomitant, de novo, 8.6 Mb 5q deletion: arr[GRCh37] 5q11.2q13.1(58652561_67251227)x1 dn. The deletion was confirmed by FISH analysis, which also allowed us to define the translocation breakpoints. The chromosomal translocation on chromosome 3 breaks down NLGN1, a gene that codes for a member of a family of neuronal cell surface proteins involved in the formation of the central nervous system synapses (Ichtchenko et al., 1995), whose mutations are associated to epilepsy (Chahine et al., 2013). Our results contribute to a better definition of the genotype-phenotype correlation in the 5q12 deletion syndrome. An early and correct diagnosis is of great help for the patients and the family. It allows to make a proper genetic counselling about the reproductive risk, the delineation of an accurate targeted follow up, and a prompt and appropriate medical therapy, i.e. for epilepsy.

COD. P211

Caratterizzazione citogenetica e molecolare della delezione di CDKN2A nella Leucemia Linfoblastica Acuta del bambino

M.A. La Rosa¹

¹*Lab di Citogenetica-Biologia Molecolare Dip Oncoematologia Pediatrica Policlinico Catania*

Background. CDKN2A (cromosoma 9p21) codifica per un potente regolatore del ciclo cellulare, p16^{INK4A}, che agisce attraverso il pathway del retinoblastoma Rb. L'inattivazione di CDKN2A rappresenta uno dei meccanismi genetici più comuni nella genesi della leucemia. Materiali e Metodi. Abbiamo studiato in 31 bambini con LLA (15 T- e 16 B-lineage), diagnosticati e trattati presso il nostro Centro, l'incidenza e il valore prognostico della delezione di CDKN2A, confrontando FISH e MLPA. Risultati. La FISH ha evidenziato la delezione di CDKN2A rispettivamente nel 67% dei pazienti con LLA-T (90% in omozigosi) e nel 44% dei casi di LLA-B (57% in omozigosi). L'analisi MLPA ha confermato questi dati e identificato altre alterazioni. La co-delezione del gene CDKN2B si è verificata rispettivamente nel 90% dei pazienti con LLA-T e nel 71% con LLA-B, mentre la delezione dell'intera banda 9p21.3, che interessa anche l'oncosoppressore MiR31, è stata riscontrata rispettivamente nel 60% e nel 57% dei pazienti. Nei pazienti con delezione di CDKN2A e B, il gene IKZF1 era deletato nel 57% dei casi di LLA-B. Il significato prognostico è limitato alla delezione in omozigosi, associata a iperleucocitosi alla diagnosi, alla scarsa risposta allo steroide (PPR) ed all'alto rischio (HR), insieme alla delezione di IKZF1 e MiR31. Conclusioni. FISH e MLPA identificano in maniera specifica e sensibile le alterazioni del gene CDKN2A. I nostri dati confermano: la correlazione tra delezione in omozigosi e una cattiva prognosi nella LLA-T; il valore prognostico negativo in associazione alle alterazioni di IKZF1 nella LLA-B (Stanulla M et al. JCO 2018).

COD. P212

CLINICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A PATIENT WITH EHLERS-DANLOS SYNDROME DUE TO THE HOMOZYGOUS c.1925T>C (p.Leu642Pro) VARIANT IN AEBP1

V. Cinquina¹, M. Ritelli¹, M. Venturini², A. Formenti^{3,4}, M. Colombi¹

¹*Div. of Biology and Genetics, Dep. of Molecular and Translational Medicine, University of Brescia, Brescia, Italy*

²*Div. of Dermatology, Dep. of Clinical and Experimental Sciences, Spedali Civili University Hospital of Brescia, Brescia, Italy*

³*Spedali Civili of Brescia, Brescia, Italy*

⁴*IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano, Italy*

Ehlers-Danlos syndrome (EDS), with a prevalence of 1/5,000 individuals, comprises clinically heterogeneous connective tissue disorders with diverse molecular etiologies. The 2017 International Classification for the EDS recognizes 13 distinct subtypes caused by pathogenic variations in 19 genes mainly encoding for fibrillar collagens, collagen-modifying proteins, or processing enzymes. Recently, in 4 individuals from 3 unrelated families with clinical findings reminiscent of EDS, recessive alterations in AEBP1 were recognized, thus defining a new EDS subtype. AEBP1 encodes the aortic carboxypeptidase-like protein that associates with collagens in the extracellular matrix and has several roles in development, tissue repair and fibrosis. Herein, we report on an Italian 53-year-old patient, born from healthy second-cousins parents, with a clinical diagnosis of classical EDS (cEDS) for the presence of extremely hyperextensible, soft and fragile skin, with an old-aging appearance of face and extremities and multiple atrophic papyraceous scars, defective wound healing, easy bruising, spheroids, and generalized joint hypermobility (Beighton score 5/9). She also showed poikiloderma of Civatte in photo-exposed sites, androgenetic alopecia, high palate, elongated uvula, scoliosis, mobile patellas, flat feet, hallux valgus, piezogenic papulae, peripheral vasculopathy, and varicose veins. Premature birth at 30 weeks (weight 1.5 kg), hypotonia, delayed motor development, recurrent dislocations of the knees in childhood, meniscus and rotator cuffs intervention, dislocation of the left ankle with soft tissue effusion without reabsorption, pyorrhea with complete dental loss at 14 years, surgically treated umbilical hernia, myopia, femoral osteopenia, and T10 vertebral deformity were also reported. Sanger sequencing and MLPA of genes involved in cEDS, i.e., COL5A1, COL5A2, COL1A1 (p.Arg312Cys), did not identify any causal variant. AEBP1 sequencing revealed the homozygosity for the rare c.1925T>C variant (MAF<0.001) leading to the p.Leu642Pro missense substitution classified as likely pathogenetic by in silico prediction tools. These findings expand the knowledge of the clinical phenotype of this autosomal-recessive EDS subtype and the allelic repertoire of AEBP1.

COD. P213

Complete Characterization of a dic(9;12) positive B-cell precursor (Bcp) Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) in a child: Conventional Cytogenetic is still useful.

V. Iachelli¹

¹*Lab di Citogenetica e Biologia Molecolare Dip Oncoematologia Pediatrica Policlinico Catania*

Background. The dic(9;12) has been described as nonrandom chromosome abnormality that predominantly occurs in pre-B hematopoietic malignancies and it is associated with PAX5 and ETV6 fusion genes (L. Vieira et al –Cancer genetics and Cytogenetics 2005). We here report on a child with B-cell ALL who presented a dic(9;12)(p13;p12-13) as the only structural rearrangement. Materials and Methods. We analyzed, in a 12 years-old boy, the bone marrow (BM) sample of ALL, diagnosed and treated at our Center. In the morphological evaluation, we observed a 97.5% of lymphoblasts. Immunophenotypic characterization revealed a B-cell precursor origin. Conventional cytogenetic analysis and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed as previously described (S. Strehl et al Leukemia 2003) using bone marrow samples from diagnosis and during remission induction. Moreover, FISH and MLPA analyses were performed to characterize the status of CDKN2A (chromosome band 9p21) and IKZF1 genes, respectively. Results: Cytogenetic analysis showed the following karyotype: 46,XY,+8,dic(9;12)(p13;p12-13)[12]/46,XY[2]. RT-PCR analyses revealed: (i) the presence of PAX5 exon 3-ETV6 exon 3 and PAX5 exon 1A/1B-ETV6 exon 3 fusion transcripts at diagnosis; (ii) lack of PAX5-ETV6 fusion genes at the end of induction (day +78); (iii) the alternative transcripts of the normal PAX5 allele in both diagnosis and remission samples. FISH analysis showed a CDKN2A deletion. MLPA technique confirmed the monoallelic and biallelic deletion in CDKN2A (exon 4 and intron 1) and in CDKN2B (exon 1), respectively; and revealed the IKZF1 gene deletion (at intron 1 and exon 7). Conclusions. In the next generation sequencing era, conventional cytogenetic analysis is still very useful to better characterize the most common cancer in childhood, as ALL. In our case we were able to deeply define the ALL, identifying a fusion transcript associated with a good prognosis together with an IKZF+ pattern, which has been associated with a poor outcome (M Stanulla et al JCO 2018).

COD. P214

FREQUENZA DELLA MUTAZIONE c.5266dupC DI BRCA1 IN UNA CASISTICA MONOISTITUZIONALE

E. Marino¹, M. Lazzeroni², E. Belloni¹, M. Marabelli², M. Calvello², L. Giaco¹, C. Mauro¹, M. Dal Molin¹, A. Guerrieri Gonzaga², I. Feroce², D. Serrano², B. Bonanni², L. Bernard¹

¹*Istituto Europeo di Oncologia - Unita' Clinical Gemomics*

²*Istituto Europeo di Oncologia -Divisione di Prevenzione e Genetica Oncologica*

PREMESSA: Il test di ricerca della variante c.5266dupC di BRCA1, da tempo screening nella popolazione Ashkenazita, è sempre più proposto in popolazioni dell'Europa centro orientale dove la c.5266dupC rappresenta la seconda variante in frequenza. Le origini e la distribuzione della variante sono ad oggi ancora oggetto di dibattito così come l'eventuale correlazione con caratteristiche cliniche specifiche. La c.5266dupC è inoltre la variante più frequente in Italia.

SCOPO DELLO STUDIO: Analizzare le caratteristiche cliniche e la distribuzione geografica dei pazienti portatori di c.5266dupC in una casistica monocentrica.

MATERIALI E METODI: Lo studio è stato condotto su pazienti con c.5266dupC afferiti dalle 20 regioni d'Italia alla Divisione di Prevenzione e Genetica Oncologica.

RISULTATI: La variante c.5266dupC è risultata la mutazione più frequente (71/534 probandi positivi per varianti di classe 4-5 di BRCA1, 13%) e diversamente distribuita in 14 regioni. A seguire, la mutazione c.181T>G (21 casi, 4%). Al momento del test, 4 soggetti portatori della c.5266dupC erano asintomatici, 11 erano affetti da carcinoma ovarico, 38 da carcinoma mammario monolaterale, 5 da carcinoma mammario ed ovarico, 13 da carcinoma mammario bilaterale. L'età media alla diagnosi di neoplasia mammaria e ovarica è risultata essere 40 anni. Le neoplasie mammarie sono risultate estrogeno negative in 49 casi (69%), di cui 45 con fenotipo triplo negativo (ER/PgR/HER2 negativi). In 17 soggetti affetti (24%) non è stata riferita familiarità per tumore mammario e/o ovarico. La regione con la più alta frequenza di mutazione c.5266dupC è risultata essere la Puglia con 26 pazienti su 62 (42%) portatori di mutazione di classe 4-5 di BRCA1 (3 casi di c.181T>G). Nei probandi lombardi, il sottogruppo più ampio della nostra casistica con 168 test positivi per mutazione di classe 4-5 di BRCA1, 17 pazienti sono risultati portatori della variante c.5266dupC (10%).

CONCLUSIONI: La c.5266dupC si conferma la variante BRCA1 più frequente, con la più alta concentrazione nella regione Puglia. Ulteriori studi su casistiche più ampie e condivise saranno necessari per valutare l'eventuale impiego di un test mirato per la ricerca della variante c.5266dupC come screening in popolazioni italiane selezionate.

COD. P215

Microduplicazione de novo in 12q24.33 coinvolgente il gene TMEM132D in un paziente con disturbo dello spettro autistico di tipo 1.

L. Grillo¹, O. Galesi¹, L. Castiglia¹, L. Saccuzzo², S. Amata¹, P. Schinocca¹, A. Spalletta¹, M. Sturnio¹, S. Giusto⁴, M. Fichera^{1,2}, C. Romano³

¹*U.O.C. Lab. di Genetica Medica, IRCCS Associazione Oasi Maria Santissima, Troina (EN)*

²*Dip. di Scienze Biomediche e Biotecnologiche, Genetica Medica, Università di Catania*

³*U.O.C. di Pediatria e Genetica Medica, IRCCS Associazione Oasi Maria Santissima, Troina (EN)*

⁴*U.O.C. di Neurologia, IRCCS Associazione Oasi Maria Santissima, Troina (EN)*

Premessa: I disturbi dello spettro autistico (ASD) sono descritti dal DSM-V come un "Deficit persistente della comunicazione sociale e nell'interazione sociale in molteplici contesti". Vengono suddivisi in tre livelli di gravità ed hanno una prevalenza dell'1% della popolazione. Il fenotipo ASD può essere isolato o sindromico. I fattori di rischio per l'insorgenza dei disturbi dello spettro autistico sono genetici ed ambientali. Per quanto riguarda i fattori genetici, le Copy Number Variants (CNVs) sono state riscontrate nel 10% dei soggetti. Recentemente sono stati individuati geni coinvolti in specifici pathways cellulari quali il rimodellamento della cromatina, la traduzione proteica e la comunicazione cellulare.

Scopo dello studio: Individuazione di geni coinvolti nella comunicazione neuronale la cui alterazione possa correlare con i disturbi dello spettro autistico.

Materiali e Metodi: 100 pazienti con ASD afferenti all'IRCCS Associazione Oasi Maria SS di Troina sono stati sottoposti a test genetico array-CGH utilizzando una piattaforma 4x180K (Agilent Technologies). Risultati: Nel campione esaminato è stata evidenziata una duplicazione de novo di circa 300 Kb che interessa il gene TMEM132D in un soggetto con disturbo dello spettro autistico con livello di supporto 1. Il paziente mostra disturbo dello sviluppo della coordinazione, stereotipie motorie e scarsa tolleranza alle frustrazioni. Non presenta compromissione intellettiva e del linguaggio.

Conclusioni: Il gene TMEM132D, lungo circa 850 Kb, consta di 9 esoni e codifica per una proteina transmembrana. Studi di RT-PCR ELISA hanno evidenziato una moderata espressione nel cervello fetale ed adulto, in particolare nei nuclei caudati a livello degli oligodendrociti maturi. E' stato dimostrato che l'espressione della proteina inizia nel corso della maturazione cellulare e che potrebbe essere coinvolta nelle interconnessioni e nei segnali neuronali. In letteratura sono state associate varianti a singolo nucleotide (SNPs) di TMEM132D con disturbi del panico (PD) e ansietà patologica. Riteniamo interessante approfondire tale caso al fine di una correlazione fenotipica verificando l'eventuale alterazione dell'architettura del gene e l'effetto della variante sull'espressione genica.

COD. P216

Studio di espressione di microRNA candidati come potenziali biomarcatori della neuropatia diabetica

C. Ciccacci¹, A. Latini¹, C. Politi¹, G. Novelli¹, V. Spallone², P. Borgiani¹

¹*Dipartimento di Biomedicina e Prevenzione, Sezione di Genetica, Università di Roma "Tor Vergata"*

²*Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Unità di Endocrinologia, Università di Roma "Tor Vergata"*

PREMESSA. La Polineuropatia Diabetica (DPN) e la Neuropatia Autonoma Cardiovascolare (CAN) sono le forme più comuni di neuropatia diabetica nei pazienti affetti da diabete di tipo 2 (T2D). Queste complicanze del diabete sono caratterizzate da elevata variabilità inter-individuale sia nelle manifestazioni cliniche che nella severità. Negli ultimi anni, tra i fattori genetici coinvolti nello sviluppo del diabete e delle sue complicanze, sono emersi anche i miRNA. Infatti alterazioni dei livelli di espressione di miRNA sono state osservate sia in pazienti diabetici, che in sottogruppi con specifiche complicanze. Finora però sono scarsi gli studi condotti per analizzare la variabilità nell'espressione dei miRNA in relazione allo sviluppo di neuropatia diabetica. SCOPO DELLO STUDIO. Il nostro scopo è stato quello di valutare eventuali differenze di espressione di miRNA candidati, tra pazienti positivi e negativi per entrambe le forme di neuropatia diabetica. MATERIALI E METODI.

Abbiamo reclutato 50 pazienti T2D precedentemente sottoposti a valutazione per DPN e CAN. Abbiamo estratto RNA da cellule mononucleari di sangue periferico (PBMCs) e quantificato l'espressione di 6 miRNA (miR-499a, miR-27a, miR-146a, miR-128a, miR-155, miR-21) mediante saggi TaqMan. L'espressione dei diversi gruppi è stata comparata mediante T-test. RISULTATI. Nei pazienti con DPN abbiamo osservato un'espressione significativamente maggiore del miR-128a rispetto a quelli negativi ($P=0,025$). Al contrario, il miR-155 sembra essere meno espresso nei pazienti con DPN ($P=0,05$).

Osserviamo lo stesso andamento, ossia una maggiore espressione del miR-128a e una minore espressione del miR-155, anche nei pazienti con CAN rispetto a quelli senza, pur non raggiungendo la significatività statistica. Per gli altri miRNA non sono state osservate differenze. CONCLUSIONI. I nostri dati supportano il coinvolgimento dei miRNA nello sviluppo delle complicanze diabetiche. Sarebbe opportuno studiare il ruolo di questi miRNA nei pathways in cui sono coinvolti per comprendere i meccanismi molecolari alla base della neuropatia diabetica. Inoltre, se i nostri risultati saranno validati in coorti più numerose, il miR-128a e il miR-155 potrebbero essere dei potenziali biomarcatori per lo sviluppo di DPN.

COD. P217

The HuR CMLD-2 inhibitor exhibits antitumor effects via MAD2 downregulation in thyroid cancer cells

L. Allegri¹, F. Baldan², C. Mio¹, S. Roy³, J. Aubé⁴, S. Filetti², D. Russo⁵, G. Damante¹

¹*Dip. Area Medica, Univ di Udine, Udine, IT*

²*Dip. Medicina Interna e Specialità Mediche, Univ. Sapienza di Roma, Roma, IT*

³*Dip. Scienze Biomolecolari, Univ. Mississippi, Faser Hall, USA*

⁴*Dip. Biologia chimica e chimica medica, Univ. North Carolina, Chapell Hill, USA*

⁵*Dip. Scienze della Salute, Univ. Magna Graecia di Catanzaro, Catanzaro, IT*

Hu antigen R (HuR) is one of the most studied RNA-binding protein (RBP) for its role in tumorigenesis and cancer progression. In previous studies, we demonstrated that HuR is overexpressed in thyroid cancer tissues and how its silencing, induces reduction of cell viability and tumor aggressiveness in some thyroid cancer cells. In this study, we examined the antitumor activity of CMLD-2, a HuR-RNA interaction inhibitor, which competitively binds HuR and directly disrupts its target interaction, in four thyroid cancer cell lines. Treatment of thyroid cancer cells with 35 μ M CLMD-2 produced a reduction in cell viability, induced apoptosis and decreased migration and colony formation ability. In 8505C and BCPAP cells, CMLD-2 decreased protein levels of MAD2, a HuR target known to be involved in cancer development and progression. Through MAD2 overexpression after CMLD-2 treatment, we demonstrated, for the first time, that one key molecular mechanism of CMLD-2 effects involves MAD2 down-regulation.

COD. P218

Trisomia 21 omogenea e delezione del cromosoma Y a mosaico: una rarità nella rarità...

M. Crapanzano¹, I. Loddo², S. Lauricella³, M. Bongiorno¹, F. La Mendola¹, E. Capra¹, B. Domanti, H.C. Cuttaia³, S. Di Naro¹, F. Leone¹, G. Chiara¹, G. Cavaleri¹

¹*Uoc Pediatria e Neonatologia, Ospedale Sant'Elia, Caltanissetta*

²*Dipartimento di Medicina di Laboratorio e Biotecnologie Avanzate - Settore di Genetica Medica – Istituto Mediterraneo per i Trapianti e Terapie ad Alta Specializzazione (ISMETT) – IRCCS, Palermo*

³*Laboratorio di Citogenetica Medica – AOR Villa Sofia-Cervello, Palermo*

Descriviamo il caso di un neonato, terzogenito di genitori non consanguinei, nato alla 41.ma settimana di gestazione da gravidanza normodecorsa (età materna 43 anni). I monitoraggi ecografici e gli esami infettivologici eseguiti durante la gravidanza sono risultati nella norma. Il piccolo alla nascita presentava liquido tinto II, un buon adattamento alla vita extrauterina, peso di 3450 gr (25°P), lunghezza di 49 cm (10°P) e circonferenza cranica di 34 cm (10°P). All'esame obiettivo si evidenziava lieve ipotonia, orecchie a basso impianto, clinodattilia del V dito della mano bilateralmente e rime palpebrali oblique verso l'alto. Nel sospetto di una sindrome da aberrazione cromosomica venivano eseguiti visita oculistica, ecocardiografia ed ecografia addome risultati nella norma. L'analisi del cariotipo costituzionale ha evidenziato il seguente risultato: mos 47,X,del(Y),+21(q11.23)[56]/47,XY,+21[44] Descrizione: "cariotipo a mosaico con due linee cellulari: una a 47 cromosomi con trisomia del cromosoma 21 e con delezione del braccio lungo del cromosoma Y verosimilmente a livello della banda q11.23 (56%) e una linea cellulare maschile a 47 cromosomi con trisomia del cromosoma 21 (44%)". La trisomia 21, che risulta omogenea, è verosimilmente correlata all'età materna avanzata. Il mosaicismo per la delezione a livello del braccio lungo del cromosoma Y probabilmente si è verificato in seguito ad un errore mitotico post-zigotico. Conclusioni: Abbiamo ritenuto importante segnalare questo caso clinico per la sua peculiarità. In presenza di segni clinici sfumati e aspecifici in epoca neonatale, un'accurata valutazione dismorfologica permette di porre il sospetto di una sindrome genetica già al punto nascita. Una diagnosi precoce in questi casi è fondamentale, in quanto garantisce l'avvio del follow-up clinico, associato ad un adeguato programma di tipo riabilitativo, educativo e sociale, con conseguente beneficio per lo sviluppo del bambino affetto da sindrome genetica complessa.

COD. P219

Un feto triploide rilevato su cellule fetali da sangue periferico materno

G. SABBATINELLI¹, D. FANTASIA¹, C. PALKA¹, E. MORIZIO¹, M. ALFONSI³, P. GUANCIALI FRANCHI^{1,3}, G. CALABRESE^{1,2}

¹*Dip. Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche, Università di Chieti*

²*UOC Genetica Medica AUSL Chieti*

³*UOSD Genetica Oncoematologica, Dip. Ematologia, Med. Trasn, e Biotec. AUSL Pescara*

Gli autori riportano un caso di una gestante di 25 anni sottoposta al test contingente nel primo trimestre di gravidanza. Lo screening sierologico era risultato negativo per la trisomia 21, ma poiché i valori ormonali di free-beta-hCG e di PAPP-A erano inferiori ai valori normali, si è sospettata la presenza di una trisomia 18 nel feto. L'indagine ecografica eseguita nel primo trimestre, inoltre, aveva rivelato una traslucenza nucale normale e un ritardo di crescita fetale (FGR) di una settimana, confermato dall'esame eseguito nel secondo trimestre che non ha mostrato altre anomalie fetali. Alla 13^a settimana di gestazione, la gestante è stata sottoposta al test di screening non invasivo delle cellule fetali circolanti mediante analisi in FISH 'dual-probe' che ha rivelato la trisomia dei cromosomi 18 e 21. L'analisi con un pannello di sonde per i cromosomi 3, 7 e 17 ne ha anche svelato la coesistente trisomia, e l'amniocentesi eseguita alla 16^a settimana ha confermato la presenza di una triploidia nel feto, mostrando un cariotipo 69,XXY. Il presente report indica che il test sulle cellule fetali nel sangue periferico materno può essere utile in particolare in caso di screening sierologico positivo. Inoltre, questo caso sottolinea l'importanza di eseguire lo screening sierologico per la sua capacità di rilevare non solo la trisomia 21, ma anche di fornire informazioni riguardo l'origine diandrica o diagenica di una triploidia, grazie ai valori della free-beta-hCG, risultando utile per le possibili complicanze ad essa associate, quale la preclampsia. In conclusione, poiché per la prima volta lo studio delle cellule fetali circolanti nel sangue materno ha permesso di indirizzare la diagnosi di triploidia, questo approccio appare fortemente raccomandabile quando si sospetta un feto triploide, essendo l'unica analisi non invasiva in grado di rilevare questa patologia.

COD. P220

VARIABILITÀ FENOTIPICA DELLA SINDROME BRANCHIO-OCULO-FACCIALE

M. Massimello¹, A. Lazzerotti², R. Menichini³, A. Quagliarella³, C. Fossati², S. Maitz²

¹*Scuola di Specializzazione in Genetica Medica, Università degli Studi di Milano, Italia*

²*Ambulatorio di Genetica Pediatrica, Clinica Pediatrica, Fondazione MBBM, A.O. San Gerardo di Monza, Italia*

³*Scuola di Specializzazione in Pediatria, Clinica Pediatrica, Università Milano-Bicocca, Monza, Italia*

La sindrome branchio-oculo-faciale (BOFS) è causata da mutazioni del gene TFAP2A, in regione 6p24.3, a trasmissione autosomica dominante. La BOFS è caratterizzata da anomalie branchiali, oculari e facciali. Le anomalie branchiali sono alterazioni cutanee in regione cervicale o auricolare; a livello oculare possono essere presenti micro/anoftalmia, coloboma, cataratta, strabismo o altri difetti visivi; dal punto di vista facciale sono descritti dismorfismi, labiopalatoschisi, fistole del labbro superiore, ipoplasia muscolare, anomalie dell'orecchio interno, malformazioni dei padiglioni auricolari e ipoacusia. Altre caratteristiche sono ectopia del timo, malformazioni renali e anomalie ectodermiche. Lo sviluppo psicomotorio è solitamente regolare, anche se i deficit sensoriali possono influenzarlo negativamente. La prevalenza non è nota; sono descritti circa 150 casi, con grande variabilità di espressione, anche intrafamiliare. Presentiamo due casi di pazienti con diagnosi molecolare di BOFS e una presentazione fenotipica differente:

MB, 13 anni, presenta note dismorfiche e malformazioni multiple: micro/anoftalmia bilaterale, rene multicistico sinistro, DIA, labiopalatoschisi, aplasia cutis al collo bilateralmente. Mostra grave ritardo cognitivo con assenza di linguaggio, disturbi comportamentali con agitazione e aggressività. Inizialmente giunto alla nostra attenzione con diagnosi clinica di sindrome di Delleman, o sindrome oculo-cerebro-cutanea, per via dell'importante coinvolgimento neurocognitivo.

MP, 15 anni, presenta dismorfismi del volto, coloboma bilaterale dell'iride, della corioretina e del nervo ottico con scarso residuo visivo, labioschisi, ugola bifida, peduncolo auricolare destro, agenesia di 7 denti, epilessia nell'infanzia. La ragazza ha avuto uno sviluppo psicomotorio regolare e non mostra disabilità cognitive. Questi due casi ci permettono di evidenziare l'elevata variabilità fenotipica della BOFS. Come nel nostro primo caso la presenza di caratteristiche cliniche atipiche come una grave disabilità intellettiva possono deviare la diagnosi verso altre condizioni. È possibile che con l'aumentare dei casi descritti venga ampliato il quadro clinico di questa patologia e che venga riconosciuta una eventuale correlazione genotipo-fenotipo.

COD. P221

KIF11 related syndrome as the paradigm of ultra rare conditions with an easy-to-recognize phenotype: paving the way for the use of WES in clinical practice

C. Ciaccio¹, D. Milani², F. Natacci³, M. Iascone⁴, C. Meossi¹, E. Finardi¹, S. D'Arrigo¹, C. Pantaleoni¹

¹*UOC Neurologia dello Sviluppo - Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano*

²*UOSD Pediatria ad Alta Intensità di Cura - Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano*

³*UOSD Genetica Medica - Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano*

⁴*USSD Laboratorio Genetica Medica - ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo*

MLCRD syndrome (OMIM#148760) is a rare condition characterized by congenital Microcephaly (MIC), Lymphedema, Chorioretinopathy, and Intellectual Disability; the affected patients also show a typical facial appearance and additional signs of the condition include simplified brain cortical gyration, nystagmus, several eye anomalies, hearing loss, and ADHD. All these features can be variably present: some patients show a complete presentation of the syndrome, while others exhibit a milder form, in which only some of the features are seen. MLCRD is caused by dominant mutations in KIF11, a gene encoding for a protein of the Kinesin family and now considered part of the gene family accounting for MIC syndromes. We report the case of a 17-years-old girl, presenting with primary microcephaly (HC 31 cm at birth), mild intellectual disability (tlQ 56), bilateral visual impairment with retinal rod-cone dystrophy, right eye esotropia, and brain MRI anomalies (pachygyria, dysmorphic corpus callosum). At clinical examination sloping forehead, horizontal palpebral fissures, high and narrow nasal bridge, short philtrum, micrognathia and numerous café-au-lait spots were present. Neurological examination was normal, except for right esotropia and mild motor clumsiness. An Array-CGH was performed and resulted normal. The clinical presentation was suggestive for a MLCRD, as the patients showed all the clinical signs of the syndrome, except for lymphedema; given the ultra rare occurrence of the condition, we opted for a WES sequencing. The analysis revealed a heterozygous frameshift variant in KIF11 (p.Pro642fs), de novo. This is a novel variant, but the effect on the transcript (introduction of a STOP codon after 7 AA), the de novo origin, and the adherence with the phenotype made us quite confident in considering it pathogenic. This report therefore describes a novel pathogenic variant in KIF11 gene, but, most of all, it is a good example of how WES can be used in clinical practice to reach a diagnosis not only in complex and undefined cases, but also in those patients where a specific suspicion is present, but the causative gene is not routinely Sanger-sequenced and the condition is so rare to make the clinical suspicion less strong.

COD. P222

Delezioni in 12q21: descrizione di due nuovi casi e revisione della letteratura

M.P. Recalcati¹, I. Catusi¹, M. Garzo¹, S. Redaelli^{2,3}, M. Massimello^{4,5}, M. Malacarne⁶, M. Piccione⁷, L. Larizza¹, D. Giardino¹

¹Laboratorio di Citogenetica Medica, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano

²Dipartimento di Chirurgia e Medicina Traslazionale, Università di Milano-Bicocca, Milano

³Laboratorio di Genetica Medica, Ospedale San Gerardo, Monza

⁴Unità di Genetica Pediatrica, Fondazione Monza e Brianza per il bambino e la sua mamma (MBBM), Ospedale San Gerardo, Monza

⁵Scuola di Specializzazione in Genetica Medica, Università degli Studi di Milano

⁶S.C. Laboratorio di Genetica Umana, E.O. Ospedali Galliera, Genova

⁷Dipartimento Materno Infantile, Università di Palermo, Palermo

Delezioni interstiziali 12q21 sono state riportate in letteratura in 6 casi, di cui solo 4 caratterizzati con array-CGH; si tratta di ampie delezioni con estensione minima compresa tra 14 e 19 Mb circa. I pazienti presentano un fenotipo comune caratterizzato da ritardo dello sviluppo, dismorfismi facciali, anomalie ectodermiche, cardiache e renali. Nel database Decipher sono riportati una decina di pazienti con delezioni in 12q21 analizzati mediante array CGH. Questi presentano ritardo dello sviluppo e dismorfismi mentre le anomalie ectodermiche, soprattutto a carico della pelle, riguardano principalmente i pazienti con delezioni 12q21 prossimali.

Descriviamo due nuovi pazienti con delezioni in 12q21, estrapolati da una raccolta collaborativa del Gruppo di Lavoro di Citogenetica e Citogenomica della Società Italiana di Genetica Umana: una bambina di 11 anni con delezione di 5,7 Mb in 12q21.1q21.2 ed un ragazzo di 16 anni con delezione di 12,3 Mb che si estende fino alla regione 12q21.33. Entrambi presentano dismorfismi facciali, ritardo dello sviluppo e anomalie oculari, mentre anomalie ectodermiche sono presenti nel paziente con delezione più estesa. La regione di sovrapposizione delle due delezioni, di 1,6 Mb, è verosimilmente responsabile del fenotipo condiviso; in particolare il gene SYT1, che codifica per una sinaptotagmina coinvolta nel rilascio dei neurotrasmettitori, si configura come il miglior candidato per il fenotipo neurologico.

L'analisi combinata del genotipo e del fenotipo dei pazienti da noi descritti, di quelli della letteratura e del database Decipher permette per la prima volta di ipotizzare l'associazione della delezione di alcuni geni localizzati in 12q21 a tratti fenotipici specifici.

COD. P223

Espressione del gene Humanin nella malattia di Parkinson

M. Salemi¹, M.G. Salluzzo¹, R.E. Cantone¹, R. Ferri¹

¹Associazione Oasi Maria SS. (IRCCS), Troina, Italia.

Premessa: Humanin (HN), è un gene che codifica per un polipeptide di 24 amminoacidi e sembrerebbe avere un ruolo anti-apoptotico. Il gene HM è stato scoperto da Hashimoto et al. [1] nel 2001, tramite uno studio su cDNA in neuroni del lobo occipitale di un paziente con malattia di Alzheimer. L'HM è codificata dalla regione dell'RNA ribosomiale 16S (rRNA) del genoma mitocondriale, quindi è uno dei pochi peptidi derivati da DNA mitocondriali [2]. Si è dimostrato che HM svolge un ruolo di protezione dallo stress ossidativo nelle cellule epiteliali del pigmento retinico umano, inoltre altre evidenze suggeriscono che HM svolga un ruolo protettivo sia nel contesto del danno al miocardio sia come protezione nei processi neurodegenerativi. Va anche evidenziato il potenziale ruolo di HN come protezione dalla malattia di Alzheimer, in quanto sembrerebbe inibire la morte cellulare neuronale stessa. Obiettivi della ricerca: Lo scopo di questo studio è di valutare l'espressione genica dell'mRNA di HM in un gruppo di pazienti con Parkinson, paragonati a rispettivi controlli associati per sesso ed età. Materiali e metodi: Presso l' IRCCS Associazione Oasi di Troina (Italia) sono stati reclutati 30 soggetti, di cui 15 pazienti con malattia di Parkinson e 15 controlli. Gli esperimenti QRT-PCR sono stati eseguiti utilizzando il Light Cycler 480. I dati di quantificazione sono stati ottenuti utilizzando il metodo comparativo $\Delta\Delta Ct$. Risultati: I risultati evidenziano una sovra-espressione dell'mRNA di HM in 12 dei 15 soggetti con malattia di Parkinson. Tutti e 12 i campione sovra-espressi hanno un valore di espressione superiore a 1,5, mentre i dati dei casi sotto-espressi sono inferiori a 0,5. Conclusioni: I dati ottenuti hanno evidenziato che in questo gruppo di pazienti con malattia di Parkinson vi sia un' aumentata espressione del gene HM. Data la sua potenziale azione anti-apoptotica, nel contesto della malattia di Parkinson, potrebbe svolgere un ruolo di tentata protezione dalla morte neuronale tramite apoptosi.

Bibliografia

1. Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, et al. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and Abeta. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:6336–6341.
2. Cobb LJ, Lee C, Xiao J, Yen K, et al. Naturally occurring mitochondrial-derived peptides are age-dependent regulators of apoptosis, insulin sensitivity, and inflammatory markers. *Aging (Albany NY)* 2016;8:796–809.

COD. P224

MICRODELEZIONE 1q22 DE NOVO, COINVOLGENTE IL GENE ASH1L, IN UN PAZIENTE CON DISABILITA' INTELLETTIVA E PROTEINURIA

P. Prontera¹, D. Rogai¹, A. Mencarelli¹, C. Covarelli³, M. Schippa¹, C. Gradassi¹, R. Brugnano², G. Stangoni¹

¹*Servizio di Genetica Medica, Azienda Ospedaliera ed Università di Perugia, Perugia*

²*S.C. Nefrologia e Dialisi, Azienda Ospedaliera di Perugia, Perugia*

³*S.C. Anatomia ed Istologia Patologica, Azienda Ospedaliera di Perugia, Perugia*

Mutazioni missense o troncanti del gene ASH1L sono state descritte nella letteratura scientifica internazionale in 9 pazienti con disabilità intellettiva. Il ruolo di queste mutazioni nella patogenesi del deficit cognitivo e le caratteristiche cliniche dei pazienti sono ancora da definire. In nessun caso sono stati condotti studi funzionali. In questo studio riportiamo i risultati dell'analisi genomica eseguita in un paziente, maschio di 27 anni con anamnesi familiare negativa e genitori non consanguinei, che presenta disabilità intellettiva (QI tot<45) e proteinuria isolata con funzione renale nella norma. Dopo aver escluso mediante dosaggio enzimatico dell'alpha-galattosidasi leucocitaria (29 nmol/mg/h, vn: 20-65) una Malattia di Fabry, è stata effettuata, su DNA estratto da sangue periferico, un'analisi genomica mediante array-CGH (risoluzione di 75 Kb) che ha documentato una microdelezione, de novo, di circa 423 Kb in regione 1q22 [arr1q22(155516240-1559398869x1dn)], coinvolgente i seguenti geni OMIM: ASH1L, YY1AP1, DAP3, GON4L, SYT11, RIT1, RLN3R2, ARHGEF2. La delezione è stata confermata in FISH con il clone RP11-101O6. La microdelezione identificata non risulta essere un polimorfismo (Database of Genomic Variant), inoltre la sua origine "de novo" e il coinvolgimento del gene ASH1L consentono di definirne la patogenicità, almeno relativamente alla disabilità intellettiva. Dato che la proteinuria non viene segnalata negli altri 9 pazienti con mutazioni ASH1L è possibile che questa complicanza sia da attribuirsi all'aploinsufficienza di altri geni coinvolti nella delezione oppure ad altri fattori, genetici o non. Ulteriori studi funzionali saranno necessari per stabilire il ruolo dell'aploinsufficienza di ASH1L nella patogenesi della disabilità intellettiva, così come sarà necessario il confronto con altri pazienti con microdelezioni simili per stabilire se la proteinuria può essere associata a questa rara sindrome microdeletiva.

COD. P225

Synergistic heterozygosity mutations in fatty acids oxidation disorders detected with expanded newborn screening

R. GIULIA¹, A. MAGUOLO², A. BORDUGO³, L. SALVIATI^{6,7}, E. RIGOTTI², A. DIANIN³, G. GUGELMO⁸, I. MONGE³, A. PASINI⁴, N. CAMPOSTRINI⁴, F. IONPOPA⁴, F. TEOFOLI^{4,1}, M. CAMILOT^{4,1}, M. VINCENZI⁴

¹*Dip. Materno Infantile Sez. Pediatria Università degli Studi di Verona*

²*U.O.C. Pediatria Ospedale della Donna e del Bambino A.O.U.I. Verona*

³*U.O.S. Malattie Metaboliche Ereditarie U.O.C. Pediatria Osp. Donna e Bambino A.O.U.I. Verona*

⁴*Centro Regionale per screening neonatali, diagnosi e cura malattie metaboliche e endocrinologiche congenite A.O.U.I. Verona*

⁵*Unità Genetica Clinica Dipartimento Donna Bambino Università di Padova*

⁶*IRP Città della Speranza Padova*

⁷*Azienda Ospaliera Santa Maria degli Angeli Pordenone, Ospedale San Vito al Tagliamento*

⁸

INTRODUCTION: Mitochondrial fatty acid oxidation is essential pathway for energy production, especially during prolonged fasting and physical exercise. More than 15 enzymes are involved in long-chain fatty acid oxidation. Pathogenic mutations in genes encoding these enzymes result in a long-chain fatty acid oxidation disorder (lcFAOD) in which the energy homeostasis is compromised and long-chain acylcarnitines accumulate. Symptoms usually appear during catabolic situations, such as fasting, illness and exercise. The clinical spectrum is very heterogeneous, ranging from hypoketotic hypoglycemia, liver dysfunction, rhabdomyolysis, cardiomyopathy and sudden death. With the introduction of several of lcFAOD in newborn screening panels, mild and asymptomatic cases with lcFAOD are identified.

CASE REPORT: We describe 3 newborns with lcFAOD detected by expanded newborn screening (ENS). Two of them are brother and sister with high level of medium and long-chain acylcarnitines on DBS. In first child molecular test by Sanger identified 1 mutation in ACADM gene but considering the lab findings, we performed another molecular test by Sanger for ETF detecting 1 mutation in ETFDH gene. His sister had same alteration pattern of acylcarnitines on DBS and the same mutations as well. The mutations were inherited by his father. Father never complained hypoglycemia but presented with hepatic steatosis. The third newborn had a DBS pattern for high levels of long-chain acylcarnitines. Molecular target NGS panel, identified 1 mutation in ACADVL gene and 1 in HADHA gene. Genetic tests in parents are in progress. Treatment, until clinical and biochemical role of such mutations will be identified, is based on the avoidance of prolonged fasting and the emergency protocol during intercurrent illnesses. On present days 3 newborns are asymptomatic.

CONCLUSION: Genetic results of these 3 asymptomatic newborns detected by ENS, arise some questions. What's the role of 2 heterozygous mutations of genes of the same metabolic pathway? Can Synergistic heterozygosity mutations in lcFAOD, determine a functional deficit could be the same as the presence of 2 mutations in same gene? What are the therapeutical options for these newborns? Can be useful to use target NGS panel in FAOD identified by ENS?

COD. P226

UNA RARA DUPLICAZIONE INTERSTIZIALE 8q22.13-q24.12

v.t. Consiglio¹, E. Salzano¹, D. Vecchio¹, T. Fragapane¹, D. Palazzo¹, M. Malacarne², M. Piccione^{1,3}

¹*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.*

²*Laboratorio di Genetica Umana - Ospedale Galliera, Genova, Italia.*

³*Dipartimento di scienze per la promozione della salute e Materno - Infantile. Università degli Studi di Palermo, Italia.*

Riportiamo un raro caso di duplicazione interstiziale 8q in una bambina giunta alla nostra osservazione all'età di un anno per note dismorfiche (bozze frontali lievemente prominenti, ipertelorismo marcato, sopracciglia rade, modesta ipoplasia malare, narici anteverse, palato ogivale, schisi del palato), riscontro di discromie cutanee (numero 2 macchie caffè e latte), ritardo neuromotorio e scarso accrescimento staturo-ponderale. L'anamnesi patologica remota mostrava storia di ernia ombelicale, intervento chirurgico correttivo di ampio difetto interventricolare perimembranoso e di schisi del palato. Lo studio dei riarrangiamenti genomici tramite array-CGH evidenziava la presenza di un segmento duplicato a carico del braccio lungo del cromosoma 8 di circa 26Mb (8q22.13-q24.12). L'ulteriore caratterizzazione del segmento duplicato mediante ibridazione fluorescente in situ (FISH) ne rilevava l'inserzione nella regione 9p24 del braccio corto di un cromosoma 9. Lo studio parentale ha consentito di escluderne l'origine materna, mentre ancora in corso di refertazione è l'analisi paterna. L'ampio riarrangiamento include numerosi geni noti, tra i quali anche COH1, TRPS1, EXT1, le cui delezioni/mutazioni sono coinvolte in diverse condizioni sindromiche e disordini dello sviluppo. Sebbene in letteratura vengano riportati svariati casi di duplicazioni 8q, la maggior parte di essi risultano associati a concomitanti delezioni e/o ulteriori riarrangiamenti genomici. Ad oggi sono descritti solo tre casi di duplicazione interstiziale pura 8q, ed un solo caso di inserzione invertita 8q23-q24.2 nel segmento più prossimale del braccio lungo del cromosoma 8, in prossimità della banda 8q13, con duplicazione 8q23-24.2. Riportiamo pertanto il primo individuo con duplicazione 8q22.13-q24.12 ed inserzione nella regione 9p24, caratterizzato anche mediante array-CGH. L'analisi comparativa della nostra paziente e dei rari casi precedentemente riportati fornisce un contributo alla definizione del fenotipo clinico della trisomia 8q22-q24 e conferma altresì il ruolo di tale regione nella genesi dei difetti di chiusura dei processi palatini.

COD. P227

ATOPIC DERMATITIS IN A 19-MONTH-OLD INFANT GIRL WITH INTRACTABLE PRURITUS DUE TO THE TYPE 2 PROGRESSIVE FAMILIAL INTRAHEPATIC CHOLESTASIS (PFIC)

I. Panasiti¹, A. Barbalace¹, S. Briuglia², S. Costa³, M.A. La Rosa², A.P. Capra², P.D. Romeo², L. Caminiti¹, G. Crisafulli¹, S. Alberti², G.B. Pajno¹

¹*Department of Pediatrics, Allergy Unit, University of Messina, Messina, Italy*

²*Department of Biomedical and Dental Sciences and Morphofunctional Imaging, Unit of Clinical Pathology, Division of Medical Genetics, University of Messina, Italy*

³*Department of Pediatrics, Pediatric Gastroenterology and Cystic Fibrosis Unit, University of Messina, Messina, Italy*

Background: Atopic Dermatitis (AD) is the most common chronic skin disease in children, with an increasing prevalence in the past three decades. Therapeutic strategy failures and persistence of skin lesions and pruritus call for complex diagnostic procedures.

Case presentation: We reported herein the case of a 19-month-old infant with a history of AD unresponsive to treatment due to the type 2 Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis (PFIC). Genetic tests proved a homozygous mutation of the ABCB11 gene (c.2494C >G; p.Arg832Gly) associated with type 2 of Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis (PFIC 2). Whole Exome Sequencing showed that the mutation was caused by uniparental disomy of paternally inherited chromosome 2. The patient's mother was not a healthy carrier of the mutation.

Conclusions: The severe pruritus, the early onset jaundice, poor growth and raised aminotransferases levels with normal GGT led to the suspicion of PFIC. To our knowledge, this variant has not been previously described in the literature.

COD. P228

Duplicazione 7q11.2 e dilatazione sopravalvolare dell'aorta: un caso clinico

P.D. Romeo¹, S. Briuglia¹, N. Beltrami², E. Ferro², A.P. Capra¹, A. Gulisano², C. Magro², I. Aiello¹, M.A. La Rosa¹, C. Campisi², S. Alberti¹

¹*Dipartimento di scienze biomediche, odontoiatriche e delle immagini morfologiche e funzionali*

²*L.C. Laboratori Campisi Avola (SR) Italia*

Introduzione: La sindrome da duplicazione 7q11.23, reciproca alla delezione della regione Williams syndrome (WS), è stata descritta per la prima volta nel 2005. In una review recente (2018), Goldenberg P. indica come rara la cardiopatia congenita nei pazienti con duplicazione regione WS, con PDA come anomalia più comune. Il 46.2% dei pazienti dup7 si presenta con dilatazione aortica (Zarate et al. nel 2014, Parrott et al. nel 2015).

Case Report: descriviamo una paziente di 17 anni con dup 7q11.23 e PDA congenito, ritardo mentale, disturbo autistico e del linguaggio e comparsa all'età di 15 anni di dilatazione aortica sopravalvolare e aorta ascendente.

Discussione: Le sindromi del/dup 7q11.2 sono, dopo la sindrome di DiGeorge o del22q, le più comuni CNVs associate a cardiopatie. Nei nostri pazienti abbiamo osservato cardiopatia nel 37.5% dei casi. E' noto che tale regione comprende il gene dell'elastina (ELN) che la sua delezione porta a stenosi sopravalvolare aortica ed aneurismi aortici post-stenotici (sindrome di Williams). Mutazioni intrageniche a carico del gene per l'elastina causano lo stesso quadro fenotipico cardiaco (Li Dy et al.1997), con stenosi sopravalvolare aortica isolata ad eredità autosomica dominante. Nel 2007, Torniero et al. hanno suggerito la presenza nella regione critica WBS di geni con effetto dose-sensibile. I casi già segnalati in letteratura presentavano dilatazione dell'aorta ascendente o dell'aorta addominale. Il caso descritto estende le evidenze di rischio di dilatazione aortica nei pazienti con Dup 7q11.23 e supporta l'ipotesi di un effetto dose-sensibile del gene ELN, la cui aploinsufficienza causa la stenosi sopravalvolare aortica mentre la duplicazione predispone alla dilatazione aortica in Dup7, in particolare del tratto sopravalvolare e ascendente. In questi pazienti è indicato uno stretto follow up ecocardiografico per ottenere una diagnosi precoce e una tempestiva terapia medica o chirurgica. La dup7q11.2 dovrebbe essere considerata nella diagnosi differenziale delle dilatazioni aortiche sindromiche.

COD. P229

Exome sequencing reveals a novel PLP1 deletion in a Italian proband with connatal Pelizaeus-Merzbacher disease: a case report

L. De Falco¹, G. Savarese¹, F.F. Operto², A. Ciriello³, R. Ruggiero¹, R. Mazza², F. Piscopo³, A. Verrotti⁴, G. Coppola⁵, A. Frolli³

¹Lab. of Medical Genetics, AMES Polidiagnostic Instrumental Centre of Casalnuovo, Naples

²Child Neuropsychiatry Unit, Department of Basic Medical Sciences, Neuroscience and Sense Organs, University of Bari "Aldo Moro", Bari

³Disability Research Center International University of Rome

⁴Child Neuropsychiatry Unit, Department of Basic Medical Sciences, Neuroscience and Sense Organs, University of Salerno

⁵Department of Pediatrics, University of L'Aquila

Pelizaeus-Merzbacher disease (PMD; MIM #312080) is a rare X-linked recessive disorder presenting with early nystagmus, hypotonia, ataxia and neurodegeneration. PMD results from mutations in PLP1 that encodes the myelin protein proteolipid protein 1 (PLP1) and the spliced variant DM20. Clinical manifestations of PMD ranges from severe connatal cases to relatively benign adult forms. Generally, patients with PLP1 missense mutations show the most severe form of PMD (connatal form), the most common PLP1 duplications result in the classical PMD, whereas deletions and null mutations in mild form of PMD and SPG2. We describe a young patient with clinical diagnosis of PMD with a novel PLP1 deletion found by Next Generation sequencing (NGS). The proband was a 17-year-old male, born at term after an uneventful pregnancy from healthy, unrelated parents, in the absence of a family history of neurological illness. Since the first months of life, the child was hypotonic with failure to keep the head straight; he had spontaneous nystagmus in all directions and microcephaly. Later, he showed global psychomotor delay, generalized hypotonia and muscle hypotrophy, peripheral limb hypertonia. PMD was suspected, but molecular analysis excluded the common PLP1 duplication. At 14 years old, the patient was severely unable to swallow because of the paucity of tongue movements, as shown by an X-ray. At 15 years, an eye examination showed visual impairment and a brain and cord MRI showed demyelination in the left white matter with hyperintensity in T2-weighted images, severe scoliosis and thinning of the spinal cord. Currently, the boy shows severe intellectual disability, spastic quadriplegia, aphasia, irregular sleep-wake cycle benefited from daily low doses of periciazine. Clinical exome sequencing was performed on the affected proband as well as his mother. Libraries were generated according to manufacturer's protocols using TruSight One kits (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Sequencing was carried out on NEXT Seq 500 (Illumina) to mean sequencing depth of at least 100x. Although no pathogenic mutation were found in PLP1 as well as in the genes responsible for the other form of hypomyelinating leukodystrophy, PLP1 showed sequencing depth of 0 suggesting a complete or partial deletion of the PLP1. MLPA analysis confirmed a deletion in exon 6 of the PLP1 inherited from asymptomatic carrier mother. In conclusions, the patient we described showed a severe but stable phenotype, with a exon 6 deletion in PLP1, suggesting that also deletions give rise to variable phenotypes of PMD.

COD. P230

How the family pedigree can change the variant classification: a case report of a boy with a mutation in GRIA3

B. Beltrami¹, E. Prada¹, G. Scuvera¹, A. Tucci², C. Gervasini³, P. Marchisio¹, D. Milani¹

¹*Pediatric Highly Intensive Care Unit, Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy*

²*Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, The National Hospital for Neurology and Neurosurgery, London, UK*

³*Medical Genetics, Department of Health Science, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy*

GRIA3 (MIM *305915) is a gene located on the X chromosome, it encodes glutamate receptor, ionotropic, AMPA subunit 3 (GluR3). This receptor has an essential role in the neurotransmission of the central nervous system, it is involved in the processes of learning, memorizing and in the regulation of the sleep-wake cycle. Mutations, deletions and duplications of GRIA3 are associated with Mental retardation X-linked 94 (MRX94, MIM #300699). This disease is characterized by the presence of intellectual disability, delayed development, hyporeflexia, reduced muscle bulk, behavioral abnormalities and epilepsy. Here we report the case of a boy who came to our attention because of developmental delay, dysmorphic features, seizures and family history of intellectual disability (many male relatives of the mother were affected). Several analysis were performed, such as karyotype, array-CGH and the molecular analysis of the OPHN1, SLC9A6, ARX, MECP2, CDKL5, FMR1, FOXP1 and UBE3A genes. The results of testing were normal. Then we performed a clinical exome that revealed an unreported missense mutation in the GRIA3 gene. This mutation was also found in the mother of the patient (asymptomatic) and in the male cousin of the mother (who presents severe intellectual disability and epilepsy), while was absent in the brother of the mother (unaffected). At first, the mutation was described as a variant of unknown significance, but the segregation analysis, the study of the medical literature and the predictive analytics software allowed us to define the mutation as likely pathogenic.

COD. P231

IDENTIFICAZIONE DI PICCOLI RIARRANGIAMENTI CON PIATTAFORMA 180K - SINDROME DI FEINGOLD TIPO 1

C. Ceccarini¹, A.N. Polito², A. D'Aprile¹, M.G. Gallicchio¹, M.A. Carboni¹, M. Bruno¹, G. Corso¹, C. Cesarano¹

¹Sez. di Citogenetica- Lab. Centrale – Dip. Patologia Clinica, Az. Mista Ospedaliero-Universitaria di Foggia

²Struttura Complessa di Neuropsichiatria Infantile, Az. Mista Ospedaliero-Universitaria di Foggia

La tecnica CGH-array oligo 180K permette di evidenziare delezioni/duplicazioni con una risoluzione media di circa 100 Kb e la piattaforma OGT 4x180K V2 ISCA in nostro possesso presenta almeno un oligo ogni 25 Kb nel backbone e almeno ogni 19 Kb in regioni target. All'interno della nostra casistica abbiamo riscontrato due casi (PD e SA) che mostravano piccole delezioni complementari in 2p24.3 coinvolgenti il gene MYCN le cui mutazioni e delezioni si associano a sindrome di Feingold tipo 1 (FS1), autosomica dominante. La probanda PD mostrava una delezione di ampiezza pari a 5.18 Kb (delezione dell'esone 3 del gene MYCN), mentre il probando SA una delezione di ampiezza pari a 2.35 Kb (esone 2). La paziente PD è una bambina di 9 anni giunta all'attenzione per microcefalia che all'esame obiettivo presentava anche lieve disabilità intellettiva, immaturità affettiva, ritardo del linguaggio, lieve ipoacusia neurosensoriale, brachimesofalangia del II e V dito. Il paziente SA mostrava invece immaturità affettivo-cognitiva, discinesie ticcosiformi, albinismo oculo-cutaneo con nistagmo congenito, strabismo, miopia e ambliopia, shunt cardiaco SX-DX lieve. I "QC metrics" relativi all'analisi di CGH-array erano risultati per la probanda PD eccellenti per tutti i parametri valutati, mentre per SA eccellenti tranne il "DLR spread" risultato soddisfacente. La RT-PCR eseguita anche sui genitori ha confermato la delezione de novo nella paziente PD, mentre non l'ha confermata nel paziente SA, coerentemente con il quadro clinico poiché la s. di Feingold tipo 1 si associa a caratteristiche ben precise in cui risultano sempre presenti microcefalia, brachidattilia del II e V dito e lieve/moderata disabilità intellettiva. È interessante sottolineare quanto l'ausilio di una buona caratterizzazione clinica sia fondamentale nell'interpretazione dei dati di CGH-array, soprattutto nel caso di riarrangiamenti così piccoli da poter facilmente sfuggire e come una piattaforma 180K in presenza di "QC metrics" eccellenti sia in grado di evidenziare riarrangiamenti del calibro di poche Kb.

COD. P232

ONDINE DID NOT BLEES THE NEWBORNS – AN EARLY ONSET OF CCHS

S. Cordaro², J. Fresta², A. Warm², G. Del Campo², S. Passanisi², S. Briuglia¹

¹*Genetica Medica Università di Messina*

²*UO Terapia Intensiva Neonatale Università di Messina*

Introduction: We report two cases of newborns with recurrent episodes of apnea, diagnosed with Congenital Central hypoventilation syndrome (CCHS), a rare neurocristopathy, with an incidence of 1 of 200,000, characterized by an altered respiratory control and autonomic nervous system regulation in response to hypercapnia and hypoxia.

Patient A: A term non caucasian term baby girl born by urgent C section due to fetal distress following an uneventful pregnancy. On the 4th day of life, after discharge, she was readmitted to the NICU because of hypotonia and a non vigorous cry. Tracheal multiple intubations were required due to recurrent desaturation during sleep. We have excluded cardiac, pulmonary, neurological and muscular diseases. A CCHS was then postulated and subsequently confirmed by fragment analysis (PHOX2B screening test).

Patient B: A term baby boy following an uneventful pregnancy presented an hour after birth cyanosis and severe respiratory acidosis. It was necessary to intubate him and transfer him to an advanced center. During the hospitalization he presented recurring episodes of desaturation associated with elevated pCO₂ during sleep only, drastically reduced at the wakefulness period. Common causes of hypoxia have been ruled out. CCHS was immediately postulated and confirmed after performing PHOX2B muted allele screening test.

Discussion: CCHS is caused by mutations in the PHOX2B gene, and the PHOX2B genotype/mutation anticipates the CCHS phenotype, including the severity of hypoventilation, risk of sinus pauses, and risk of associated disorders like Hirschsprung disease and neural crest tumors. Early intervention and conservative management are the key for long-term outcome and neurocognitive development. Many of the cradle deaths could be attributed to Ondine Syndrome. It is important to maintain a high index of suspicion in cases of persistent alveolar hypoventilation during sleep (PaCO₂ > 60 mmHg), need for mechanical ventilation with weaning difficulty, in the absence of pulmonary, neuromuscular or cardiac diseases. Rarity of the disease, broad differential diagnosis (malformations, sepsis, inborn errors of metabolism) and need for ventilator support at birth make both diagnosis and management of these patients quite challenging.

COD. P233

RBFOX1 gene intragenic microdeletion detected by SNP-array in a patient with macrocephaly and autism spectrum disorder

V. Bruni¹, F. Scionti², M. Ceravolo¹, M.T. Di Martino², F. Falvo¹, D. Concolino¹

¹*Department of Medical and Surgical Sciences Pediatric Unit, Magna Graecia University, Catanzaro.*

²*Dep. of Experimental and Clinical Med., Magna Graecia University, Salvatore Venuta Campus, Catanzaro*

RBFOX1 (OMIM* 605104) also known as Ataxin-2-binding protein 1 (A2BP1) or FOX1, located at chromosome 16p13.3, is one of the three members in Fox gene family. This gene encoding splicing factors and it is expressed in neuronal tissues as well as muscle and heart. Mutations and copy number variations (CNVs) in RBFOX1 gene have been implicated in multiple medical conditions including mental retardation and epilepsy, bipolar schizoaffective disorder, attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder (ASD), micro/macrocephaly, hand osteoarthritis, congenital heart defects, obesity and diabetes, intracranial arachnoid cysts, primary biliary cirrhosis and other dysmorphic features. Some studies strongly suggest a role of RBFOX1 in the etiology of ASD and some evidence have shown that the 16p13 chromosomal region, where RBFOX1 is located, was identified as the location of the ASD implicate genes. We report a case of female patient with ASD, macrocephaly, speech delay and other dysmorphism, referred to our unit at the age of 2 years. The patient was the first child of nonconsanguineous phenotypically normal parents. She was born at 40-week's gestation by caesarean section following an uneventfully pregnancy. At 18-week's gestation a prenatal diagnosis by Array-Comparative Genomic Hybridization (array-CGH) for maternal age was made and it showed a normal female karyotype. Perinatal events were normal. In order to assess the cause of patient's phenotype a SNP-array was performed. SNP-array analysis, using Cytoscan HD array, revealed a 104 kb deletion on chromosome 16 [arr[hg19]16p13.3(7,034,603-7,138,711)x1] involving exon 1 of RBFOX1 gene. The microdeletion was inherited from healthy father as confirmed by quantitative Real-Time (qPCR). We suggest that when there is a complex clinical case of developmental delay and/or autism spectrum disorder with dysmorphic features and negative array-CGH, a high-resolution microarray analysis should be done.

COD. P234

STUDIO SULLA DISTRIBUZIONE DELLE MUTAZIONE RESPONSABILI DI SORDITA' NON SINDROMICA NELLA POPOLAZIONE CALABRESE.

G. Contrò¹, R. Talerico¹, A. Primerano¹, M.D. Ceravolo¹, V. Bruni¹, C. Politi¹, F. Fabiani¹, M.D. Nocera¹, E. Colao¹, P. Malatesta¹, R. Iuliano¹, N. Perrotti¹

¹*Az. Osp. Universitaria "Mater Domini", Catanzaro - U.O. Genetica Medica*

La sordità è uno dei difetti congeniti più frequenti nei paesi sviluppati, dove circa 1 bambino su 1000 presenta una grave ipoacusia che può essere già presente alla nascita o che si può sviluppare durante l'età infantile. Le forme ereditarie vanno distinte sindromiche e non sindromiche. Delle sordità di origine genetica, il 30% fanno parte di una condizione sindromica ad ereditarietà mendeliana, mentre il restante 70% sono forme non sindromiche (Non Syndromic Hearing Loss, NSHL). Ad oggi, circa 70 geni sono stati associati NSHL. Tra i primi geni ad essere individuati vi è il gene GJB2 ed il gene GJB6 appartenenti alla famiglia delle connesine, strutture essenziali nella trasmissione dello stimolo uditivo a livello dell'orecchio interno. Con lo scopo di determinare l'eziologia dell'ipoacusia e determinare l'incidenza e la correlazione tra genotipo e fenotipo nella popolazione calabrese si è selezionato un gruppo di 124 pazienti afferenti alla nostra U.O. che presentavano sordità non sindromica di vario grado, e sottoponendoli ad analisi di GJB2, GJB6 e connessina mitocondriale. All'interno del gruppo di pazienti analizzati per sordità non sindromica, circa il 40% dei pazienti è stato individuato come portatore di almeno una mutazione a carico di GJB2; nessun paziente è risultato positivo per mutazioni a carico del gene GJB6 o mitocondriale. La mutazione più frequentemente riscontrata è la delezione 35 G nell'ambito di GJB2 (in omozigosi nel 42%, in eterozigosi nel 31%), mentre le restanti mutazioni sono state riscontrate come casi singoli o duplici. Tale rilievo è in accordo con i dati epidemiologici già noti che designano questa mutazione come la più comune nella popolazione del bacino del mediterraneo. La mutazione R75Q, autosomica dominante, è stata riscontrata in due pazienti all'interno del nostro campione, non consanguinei tra loro e precedentemente descritta per la prima volta nella popolazione italiana dalla nostra unità. Inoltre è stata riscontrata l'associazione tra le due rare mutazioni V95M/L90P. Dall'analisi del campione risulta infine che la distribuzione delle mutazioni nel nostro campione è in linea con i dati disponibili in letteratura sulla popolazione europea del bacino del mediterraneo.

COD. P235

Un caso di microduplicazione di CHRNA7 a segregazione familiare

A. Primerano¹, G. Contrò¹, M.D. Ceravolo¹, F. Fabiani¹, M.D. Nocera, R. Tallerico¹, C. Politi¹, V. Bruni¹, P. Malatesta¹, R. Iuliano¹, N. Perrotti¹, E. Colao¹

¹*Azienda Ospedaliera Universitaria "Mater Domini" Catanzaro- U.O. Genetica Medica*

Presentiamo la paziente C.M. di 38 a.a. con epilessia, dismorfismi e grave ritardo mentale. Primo episodio di crisi epilettica grave a 7 mesi. Padre/madre, consanguinei; fratello in abs. C.M. presenta dismetria e flessione degli AAIL, diminuzione lordosi lombare, torsione del busto, rettilineizzazione del collo, cedimento mediale in valgo del ginocchio sx, iperlordosi lombare, coxa valga bilaterale, lieve osteoporosi coxofemorale>a sx, obesità, microcrania, ipertelorismo, fronte ampia, attaccatura bassa dei capelli, sopracciglia rade, orecchie grandi ad alto impianto, palato ogivale, microcefalia, dismetria delle anche, piedi piatti. All'EEG, punte-onde multifocali, alla RMN encefalo agenesia del seno sfenoidale. Con CGH-array si è evidenziato: microdelezione, a segregazione paterna, su 7q35, di 240 Kb, comprendente parte del gene OMIM Disease Causing CNTNAP2; microduplicazione, a segregazione materna, su 15q13.3, di 538Kb, comprendente il gene OMIM Disease Causing CHRNA7. micro duplicazione, a segregazione materna, della regione PAR1(Xp22.33/Yp11.32), di 178 Kb e comprendente il gene OMIM CRLF2. I riarrangiamenti ereditati dai genitori, vengono definiti privati e presumibilmente non patogenetici, tuttavia riteniamo che la microduplicazione su 15q13.3 che comprende il gene CHRNA7, che è a penetrazione ed espressività variabile, sia responsabile del fenotipo di C.M. Il gene CHRNA7 codifica per la proteina subunità alfa-7 del recettore dell'acetilcolina neuronale ($\alpha 7nAChRs$) che media la trasmissione del segnale veloce alle sinapsi. I soggetti portatori di una duplicazione in 15q13.3 rispondono bene alla clozapina, utilizzata in C.M., che blocca il recettore della serotonina 5HT3 rilasciando alti livelli di acetilcolina, principale ligando di $\alpha 7nAChRs$. Anche il fratello in abs ha effettuato array-CGH, al fine di programmare con la coniuge una gravidanza, che evidenzia la microduplicazione su 15q13.3; e la microduplicazione della regione PAR1, entrambi sovrapponibili a quelle della sorella C.M. e della madre. E' importante sottolineare che non vi sono indicazioni ad eseguire diagnosi prenatale per valutare l'eventuale segregazione perché la microduplicazione ha espressività e penetranza variabile con conseguente difficoltà a predire il fenotipo del nascituro.

COD. P236

Diagnosi prenatale di condrodiplosia puntata rizomelica: nuova variante GNPAT

G. Lanzoni¹, C. Bacci¹, S. Romano¹, C. Di Marco¹, S. Ciabattini¹, E. Lascaia¹, A. Cordisco², A. Cecconi¹

¹*SOS Genetica Medica, P.O. S. Maria Nuova, USL Toscana Centro, Firenze*

²*Ostetricia e Ginecologia, P.O. Piero Palagi, USL Toscana Centro, Firenze*

La condrodiplosia puntata rizomelica è un'entità clinica conseguente a difetti del metabolismo perossisomale, il cui fenotipo clinico è caratterizzato da accorciamento prossimale di omero e, in grado minore, femore, calcificazioni puntate nelle cartilagini periarticolari, lesioni coronali dei corpi vertebrali e cataratta, solitamente presenti dalla nascita. È presente ritardo cognitivo severo e la maggior parte degli affetti sviluppa epilessia. Solitamente, la sopravvivenza dei bambini non supera la prima decade di vita. La malattia viene trasmessa come carattere autosomico recessivo ed è correlata a mutazioni dei geni PEX7, GNPAT o AGPS. Nel caso in esame, una coppia di consanguinei è giunta in consulenza prenatale alla terza gravidanza; la prima era stata interrotta in seguito al riscontro ecografico di displasia scheletrica con rizomelia in presenza di cariotipo femminile normale (46,XX), mentre la seconda era esitata in aborto spontaneo precoce. Nel corso della gravidanza in atto si era evidenziata severa e precoce (18° settimana gestazionale) flessione della velocità di crescita a carico di entrambi gli omeri, oltre ad edema prefrontale e deviazione mediale degli assi di entrambi i piedi. In seguito all'interruzione della gravidanza, le radiografie dello scheletro fetale hanno evidenziato calcificazioni a carico delle cartilagini periarticolari. Alla luce di tale dato, sul materiale fetale conservato è stata condotta l'analisi dei geni sopracitati, noti per essere coinvolti nelle forme di displasia puntata rizomelica, con riscontro della variante di splicing c.924+1G>A in omozigosi nel gene GNPAT, non riportata in letteratura scientifica, il cui ruolo sulla proteina suggerisce una possibile associazione al sospetto clinico.

COD. P237

DUPLICAZIONE 10q23.1 IN PROBANDO AFFETTO DA DISTURBO DELLO SPETTRO AUTISTICO

M. De Cinque¹, A. Simone¹, P. Marino¹, E. Mazzucco², O. Palumbo³, A. Angiolillo², R. Ciavatta⁴, G. Maria⁴, L. Rossi¹, M. Carella³, S. Garofalo²

¹*U.O. di Medicina Trasfusionale, P.O. "San Timoteo", ASReM Termoli*

²*Università degli Studi del Molise, Campobasso*

³*Casa sollievo della sofferenza, San Giovanni Rotondo*

⁴*Ufficio per la tutela della salute neurologica e psichica dell'età evolutiva, ASReM Termoli*

I disturbi dello spettro autistico (DSA) mostrano una forte componente genetica ma l'eziologia molecolare rimane indefinita in un gran numero di pazienti. Una miriade di geni organizzati in complessi ed intricati network sono implicati nella genesi dei DSA: alcuni hanno un ruolo a livello delle sinapsi, altri sono coinvolti in meccanismi come la proliferazione, la differenziazione e la migrazione cellulare o nei sistemi di trasmissione di segnali intracellulari. Presentiamo il caso di un bambino di 5 anni, secondogenito di genitori caucasici non consanguinei, affetto da disturbo dello spettro autistico e livello cognitivo ai limiti della norma. L'anamnesi familiare risulta negativa per disturbi del neurosviluppo. Il probando è nato a termine da gravidanza normodecorsa e parto eutocico. L'anamnesi personale è negativa per epilessia. Durante la consulenza genetica non si evidenziano dismorfismi ed i parametri auxologici risultano nella media. Il cariotipo è normale e la ricerca delle mutazioni del gene FMR1 risulta negativa. L'esame SNP-array (Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0) ha rivelato la presenza di una duplicazione di 208 kb nella regione 10q23.1 che coinvolge i nucleotidi 84.198.806-84.406.424 in corrispondenza del gene NRG3 (neuregulina 3). Esso è un membro neurale della famiglia dell'EGF ed un ligando specifico per la tirosina chinasi del recettore ErbB4 che svolge ruoli pleiotropici nel neurosviluppo. NRG3 è espresso principalmente nel sistema nervoso centrale dove influenza la proliferazione, la migrazione e la differenziazione dei neuroblasti ed è associato a un gruppo eterogeneo di disturbi dello sviluppo neurologico inclusi ritardo dello sviluppo, deterioramento cognitivo, autismo e schizofrenia. La neuregulina 3, espressa nei neuroni eccitatori durante lo sviluppo del cervello, dirige il posizionamento finale degli interneuroni (neuroni inibitori) nei circuiti della corteccia cerebrale. NRG3 sembra essere quindi un mediatore critico nell'assemblaggio di circuiti inibitori corticali. Il nostro caso supporta l'ipotesi che CNVs in geni come NRG3, coinvolti nella regolazione dell'equilibrio eccitatorio/inibitorio a livello corticale, possano contribuire all'insorgenza di deficit comportamentali e sociali alla base dei DSA.

COD. P238

Genotipo HLA-B*57:01 e terapia con abacavir: studio prospettico su 96 pazienti affetti da HIV nella Provincia Jonica

L.A. Greco¹, L. Cristiano², M. Salustri³, L. Tarantini³, A. Greco⁴, R. Tripaldi⁵, G.B. Buccoliero²

¹UOC Patologia Clinica P.O. Centrale - Lab. Genetica Medica S.O. S Marco Grottaglie ASL TA

²UOC Malattie Infettive P.O. Centrale S.O. SG Moscati ASL TA

³UOC Patologia Clinica P.O. Centrale S.O. SG Moscati ASL TA

⁴Medico Chirurgo LP

⁵UOC Patologia Clinica P.O. Centrale ASL TA

Background

Abacavir (ABC) è un farmaco antiretrovirale utilizzato per il trattamento di pazienti con Infezione da Virus dell'Immunodeficienza Umana (Human Immunodeficiency Virus, HIV). Tuttavia circa il 5-8% dei pazienti trattati con abacavir sviluppano una reazione di ipersensibilità (hypersensitivity reaction-HSR) che consiste nell'insorgenza di una sindrome clinica multiorgano caratterizzata da febbre, rash cutaneo, cefalea e disturbi gastrointestinali, con una manifestazione sistemica più severa e rapidamente progressiva durante una successiva riesposizione al farmaco che può causare anche la morte del soggetto. Lo studio dell'allele MHC di classe I HLA-B*57:01, test di farmacogenomica ormai validato e attuabile anche nella routine per prevedere l'ipersensibilità all'abacavir, consente di ottenere un valore predittivo nei confronti di tale reazione identificando soggetti a basso rischio e soggetti ad alto rischio sulla base della presenza o meno di tale allele.

Nel presente lavoro si riporta uno studio prospettico su n. 96 pazienti con età compresa tra 18 e 71 anni, affetti da HIV, afferenti all'U.O.C. di Malattie Infettive della ASL di Taranto da novembre 2016 ad aprile 2018, sui quali, prima di iniziare il trattamento farmacologico con abacavir, è stato eseguito uno screening per la presenza dell'allele HLA-B*57:01 per l'identificazione dei pazienti a rischio di sviluppare HSR e per valutare il valore predittivo negativo in pazienti con test negativo.

Materiali e Metodi

Il DNA è stato estratto e purificato da sangue intero in EDTA, con utilizzo della metodica QiAmp DNA Blood, per una successiva amplificazione e rivelazione in Real Time PCR (Kit HLA-B*57:01 Nuclear Laser Medicine) applicata su sistema ABI 7300 (Applied) - canale JOE (Yellow)/HEX/Cy3 e IC nel canale FAM (Green).

Risultati

I pazienti risultati positivi al test sono stati n 4 su 96 (4,16%) e ad essi è stata riservata una diversa opzione terapeutica. Ai restanti 92 pazienti è stato somministrato un trattamento farmacologico con abacavir e sono stati seguiti per circa 6 settimane con attenta osservazione clinica per valutare l'eventuale insorgenza dei segni correlati con la reazione di ipersensibilità: nessun paziente ha mostrato reazioni cliniche avverse in seguito a tale terapia.

Conclusioni

I risultati ottenuti hanno dimostrato per il test genetico relativo all'individuazione dell'allele HLA-B*57:01 un valore predittivo negativo del 100% in quanto nessun paziente con un test negativo ha sviluppato la reazione di ipersensibilità in seguito a terapia con ABC e questo, in relazione all'osservazione clinica, ha permesso di ridurre la quota di diagnosi di HSR.

COD. P239

A syndromic form of intellectual disability and language impairment associated with a 7q31.1 deletion spanning the FOXP2 gene

A. Pelle^{1,2}, C. Arduino², G. D'Alessandro³, S. Siviero³, F. Talarico², P. Patrizia², E. Di Gregorio^{4,2}, A. Brusco^{2,4}

¹*University of Torino, Department of Clinical and Biological Sciences, Torino, Italy*

²*S.C.D.U. Medical Genetics, Città della Salute e della Scienza, Torino, Italy*

³*Laboratory of cytogenetics, Città della Salute e della Scienza, Torino, Italy*

⁴*University of Torino, Department of Medical Sciences, Torino, Italy*

We report on two sisters of 41 and 40 years-old affected by intellectual disability and language impairment. In their childhood, both patients showed a global developmental delay; the elder sister started walking independently at 18 months, the younger at 12 months. Both girls needed support at school and showed language difficulties. The elder sister underwent a speech therapy in infancy. Clinical features included hypothyroidism, high obesity (BMI 46 Kg/m² and 44.34 Kg/m²), blood hypertension and oligophreny in both patients. The probands shared a 4.1 Mb deletion at 7q31.1 [arr[GRCh37]7q31.1(109816527x2,109850636_113885533x1,113924338x2)], inherited from their mother, identified by array-CGH analysis (60K Agilent). Karyotype and FISH analysis of chromosome 7 did not reveal any further rearrangement. The minimal deleted region encompassed 13 genes, among which only two are known to be associated with a pathologic phenotype: 1) PPP1R3A (MIM600917), associated with a digenic form of severe insulin resistance in subjects with a concomitant heterozygous mutation at the PPARG locus. 2) FOXP2 (MIM600513), a transcription factor highly expressed in fetal and adult brain. FOXP2 mutations are known to be associated with an autosomal dominant form of speech and language disorder. The mechanism hypothesized is haploinsufficiency. Several other genes in the region are predicted to be haploinsufficient by pLI ExAC scores. Among these DOCK4 is involved in the neuronal and synaptic development. This gene is suggested as potentially associated with neurodevelopmental disorders (autism, schizophrenia and learning disabilities). In summary, we hypothesise the clinical phenotype of our probands is explained by a contiguous gene syndrome with DOCK4 (intellectual disability) and FOXP2 (language impairment) as major driver genes. Our family also shows a variable expressivity of the language deficit associated with FOXP2 haploinsufficiency given the two daughters developed severe language disorder, while only a mild intellectual disability was observed in their mother.

COD. P240

Association of a delta globin variant with homozygosity for $\alpha^{3.7}$ deletion in a migrant couple

A.P. Capra¹, P.D. Romeo¹, C. Di Bella¹, E. Ferro¹, V. Trichilo², S. Briuglia¹, M.A. La Rosa¹, S. Alberti¹

¹*Department of Biomedical and Dental Sciences and Morphofunctional Imaging, Unit of Clinical Pathology, Division of Clinical Genetics, University of Messina*

²*Department of Clinical and Experimental Medicine, Policlinico "G. Martino", University of Messina*

HBD:c.49G>C (p.Gly16Arg) (delta 16; rs34012192) is a delta chain variant identified in several populations of African origin and in few unrelated families in Sicily, as further evidence of the genetic admixture between African and Sicilian populations. All known delta variants are clinically and hematologically silent. However, misdetection of delta chains can lead to underestimate the absolute amounts of HbA₂. This can then lead to misdiagnosis of β -thalassemia traits. We report the identification of a heterozygous delta 16 variant as co-inherited with α -thalassemia gene deletion $\alpha^{3.7}$ in homozygosis, in a Nigerian pregnant woman immigrated in Italy. The patient showed a slight increase in red blood cells and reduced mean corpuscular volume (MCV 70 fL). Ferritin value was in the lower limit of the normal range, which we qualified as due to pregnancy. Identification of Hb fractions was performed using high-performance liquid chromatography with VARIANTII system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). HbA₂ was 1.4%, HbF was 0.5%, and we additionally detected an abnormal peak (1.5%) in the S-window (retention time: 4.40 minutes). We performed reverse dot blot for the analysis of the most common α -globin gene mutations and the $\alpha^{3.7}$ deletion resulted in homozygosis. Direct sequencing of the whole delta globin gene showed heterozygosity for the delta 16 variant, while no beta globin mutations were detected. We wish to note that the presence of the abnormal delta 16 peak is not readily identifiable using routine laboratory settings. Screening of her husband, a 27-year-old man from Nigeria revealed normal level of HbA₂ and HbF. An increased number of red blood cells, reduced MCV (68 fL) with 13gr% of hemoglobin led us to molecular analysis for the identification of α -globin gene mutations. Also in this case, the globin genotype was $\alpha^{3.7}$ deletion in homozygosis. In summary, we call for attention on diagnostic procedures, that may be prone to errors, when infrequent genotypes undergo analysis. We wish to note that such occurrences will most likely become more and more frequent in the future.

COD. P241

Delezione introne 5 del gene NRXN1 in un caso di disturbo dello spettro autistico

N. Beltrami³, C. Campisi³, A. Catania³, D. Bronzi³, A. Gulisano³, C. Magro³, S. Bianca², C. Barone¹

¹*Genetica Medica Asp8 Siracusa*

²*Genetica Medica ARNAS Garibaldi Nesima Catania*

³*L.C. Lab. Campisi Avola (SR)*

La neurexina 1 (NRXN1) rappresenta un locus di suscettibilità per disturbi neuropsichiatrici e del neurosviluppo: delezioni intrageniche (non ricorrenti) in eterozigosi sono state riportate in disturbi dello spettro autistico, deficit di attenzione con iperattività, disabilità intellettiva, epilessia, schizofrenia, ritardo del linguaggio e disturbo bipolare. Possono essere presenti dismorfie quali viso allungato, rime palpebrali rivolte verso il basso, ipotelorismo, orecchie a basso impianto, palato stretto e cifosi dorsale. Microdelezioni coinvolgenti NRXN1 sono state riscontrate anche nella popolazione di controllo normale (o ereditate da un genitore apparentemente normale). Il significato delle delezioni introniche di NRXN1 risulta ad oggi dibattuto: Vinas-Jornet et al, 2014 riportano tre pazienti in cui sono state riscontrate delezioni intrageniche di NRXN1 con parziale sovrapposizione a livello dell'introne 5. Riportiamo il caso di un bambino nato a 37 settimane di gestazione da parto spontaneo da gravidanza insorta con IU. Riferite problematiche del sonno. Deambulazione autonoma a 15 mesi. Ritardo del linguaggio. La valutazione NPI evidenziava un disturbo dello spettro autistico con compromissione intellettiva lieve e compromissione del linguaggio espressivo-recettivo. L'indagine array-CGH ha evidenziato una microdelezione di 60 Kb nell'introne 5 del gene NRXN1 di origine materna. La regione deleta risulta delimitare ulteriormente la regione di sovrapposizione interna all'introne 5 precedentemente descritta suggerendo l'ipotesi di un potenziale effetto causativo delle regioni non codificanti. La penetranza incompleta e l'espressività variabile delle CNV a carico di NRXN1 sono state attribuite a molti fattori tra cui l'effetto modulatore di un secondo evento patogenetico in un altro gene implicato nel neurosviluppo o condizioni epigenetiche. Delezioni introniche possono spiegare il loro meccanismo patogenetico attraverso la perdita di regioni regolatorie essenziali, come promotori alternativi, enhancers o sequenze implicate nel complesso meccanismo di splicing alternativo che genera le molteplici isoforme di mRNA del gene NRXN1.

COD. P242

Un nuovo caso della rara Sindrome KBG

S.C. Gorgone¹, E. Pisaneschi², V. Panebianco³, C. Berera¹, M. Caruso³, A. Gennaro¹, A. Novelli², T. Mattina¹

¹*Genetica Medica, Università di Catania, Dipartimento BIOMETEC. Centro di Riferimento Regionale HUB per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare*

²*UOC Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS Ospedale Pediatrico, Bambino Gesù- Roma*

³*Università di Catania, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Centro di Endocrinologia Pediatrica, Clinica Pediatrica*

La paziente di 4 anni, ci viene riferita dall'Endocrinologia Pediatrica del Policlinico di Catania per iposomia e note dismorfiche. Le caratteristiche cliniche della paziente evocavano il fenotipo Cornelia de Lange in forma mild: facies peculiare, sopracciglia larghe e rade, ipertelorismo, fessure palpebrali allungate, telecanto, ciglia folte e lunghe, radice nasale appiattita, narici leggermente anteverse, filtro naso-labiale lungo, labbra sottili, orecchie grandi e a basso impianto, collo corto. Indici antropometrici ampiamente sotto il 3°. Non si osservano malformazioni degli organi interni né degli arti. Difficoltà all'alimentazione, modesto ritardo del linguaggio e disturbo del comportamento. Cariotipo e SNP-Array negativi; analisi molecolare dei geni NIPBL, SMC3, SMC1A, HDAC8, RAD21: negativi. Fenotipi parzialmente sovrapposti con la CDS possono essere dovuti a mutazioni di geni definiti "affini alle coesinopatie" fra cui ANKRD11. L'analisi molecolare del gene ANKRD11 ha evidenziato, nella nostra paziente, la presenza della variante genomica c.3931C>T che causa la formazione di un codone di stop prematuro. Tale variante non è mai stata descritta in letteratura, ma il suo ruolo nella proteina suggerisce una possibile associazione alla sindrome KBG. Il fenotipo della nostra paziente è sovrapponibile a quello dei pazienti riportati in letteratura. La KBG sindrome, descritta in un centinaio di casi, si caratterizza per macrodontia degli incisivi centrali superiori, facies peculiare, bassa statura con ritardo dell'età scheletrica, anomalie costo-vertebrali, disabilità intellettiva, crisi epilettiche e/o anomalie EEG-grafiche. La sindrome è dovuta a mutazioni nonsense o frameshift del gene ANKRD11 localizzato sul cromosoma 16 o anche a delezioni della regione 16q24.3 comprendente il gene. È una patologia autosomica dominante a penetranza completa ed espressività variabile. La proteina codificata ha un ruolo nei meccanismi epigenetici. Per una migliore definizione patogenetica della sindrome sarebbe utile inquadrare il ruolo e l'interazione del gene ANKRD11 con altri geni coinvolti nelle coesinopatie.

COD. P243

VALIDATION OF MULTI-TARGET NEXT GENERATION SEQUENCING PANEL FOR THE GENETIC CLASSIFICATION OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA: A SINGLE CENTRE EXPERIENCE

D. Salemi¹, V. Randazzo¹, S. Cannella¹, C. Agueli¹, M.G. Bica¹, M. La Rosa¹, A. Marfia¹, C. Russo Lacerna¹, G. Bruno¹, M. Daricello¹, F. Fabbiano¹, A. Santoro¹

¹*Dipartimento di Oncologia, AOR Villa Sofia Cervello, Palermo*

Background: AML cases showing normal karyotype (NK), represent about half of the cases, and are characterized by heterogeneous molecular abnormalities. Numerous clinically significant genes have been identified to confer prognostic value. Molecular testing is considered part of the diagnostic AML work-up, but is quite time consuming and the use of targeted next-generation sequencing (NGS) is no more delayed. Aims: We planned to perform an internal validation program of targeted NGS strategy with two different commercial NGS workflow (NGSW1 and NGSW2) to introduce this technical approach for diagnostic aim. Methods: NGS panels were composed from 30 genes. A total of 33 NK-AML, molecularly characterized, were used to setup two different commercial NGS workflow (NGSW1 an amplicon-based strategy and NGSW2 capture-based approach). Training set (12 samples for W1 and 8 samples for W2) was useful to fit analysis filters to improve variant caller and reduce false positive (FP) and false negative (FN). Validation set, included 13 new samples, was performed to verify NGS workflow performance. Results: In the training set, NGS experiments showed a good coverage, not less than 500x in about 95% of regions for W1 and 100% for W2, and quite good distribution of the reads between samples (Uniformity>95%). Both NGS workflow showed a specificity of 100% (no FP). W1 showed a sensitivity of 76%, with 5FN/21 total somatic mutations, W2 showed 2 FN/13 somatic mutations with 85% sensitivity.

These results required a change in the filtering parameters. In validation set almost all mutations except one were correctly identified by both workflow obtaining about 98% of sensitivity. Conclusions: Both amplicon-based and capture-based approaches are applicable. Amplicon-based assay require small input of DNA and the workflow is easy and less time and labor-intensive. On the other hand, capture-based approaches demonstrate better uniformity of coverage and generate fewer false-negative. Assessment of an exhaustive molecular by NGS technique may be very helpful to characterize different subcategories of AML underscoring the genetic heterogeneity but advice in the interpretation of NGS data may due take in account. Supported by of Assessorato alla Salute Regione Sicilia PSN 2016

COD. P244

ANALYSIS OF cfDNA AS A PREDICTIVE MARKER OF SEPTIC RISK IN COMPARISON WITH CONVENTIONAL EMOCULTURE RESULTS

G. Micheloni¹, G. Millefanti¹, G. Porta¹

¹*Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università degli Studi dell'Insubria, Varese*

Sepsis is still a major challenge in intensive care medicine due to the difficulty on diagnose this condition. By now, there is not a clinically accepted method to monitor the risk of developing sepsis and septic shock except from blood cultures that present relevant limitations. Identification and quantification of bacteria systemically due to the presence of bacterial circulating cell-free DNA (cfDNA) in the bloodstream can represent a non-invasive, reasonably expensive and extremely powerful tool to monitor patient at high risk of developing sepsis or septic shock. In this study we have compared information obtained from cfDNA sequencing and conventional emocultures to identify and evaluate the presence of bacteria in blood coming from patients undergoing dialysis who shows signs that suggest an occurring septic shock event. Blood is collected from those patients showing signs of a septic shock event in EDTA K₂ containing tubes. Plasma separation has been performed with a double centrifugation procedure and cfDNA has been extracted using a commercial kit. We performed shotgun sequencing on cfDNA samples and sequences have been analysed by CosmosID. Metagenomic analysis gave us several information: the ratio between bacterial and human cfDNA sequences, the determination of genus and strain of bacteria to whom the sequences belong and the presence of sequences from viral factors and genes conferring resistance to antibiotics. Data from blood cultures have been obtained from the microbiological lab of the Ospedale di Circolo, Varese. We firstly analysed 5 samples in which we observed a variable frequency of human cfDNA sequences, ranging from 10% to 54%. Number of reads wasn't enough to perform a complete metagenomic analysis. We thus analysed two other samples. In both cases, metagenomic analysis revealed the presence of bacterial strains that haven't been detected by emoculture. In one case bacterial identified by this analysis was further found in emoculture, in the other the strain identified requires more than the common 5 days of emoculture to grow. Further studies are required but cfDNA seems promising in furnishing prognostic data that can be useful in determine patient therapy, in order to monitor and prevent septic shock events.

COD. P245

Citogenetica prenatale: delezione 8p11.21-11.1 ricorrente

G. Lanzoni¹, C. Bacci¹, S. Romano¹, C. Di Marco¹, S. Ciabattoni¹, D. Melani², S. Von Borries², O. Privitera², A. Cecconi¹

¹*SOS Genetica Medica, P.O. S. Maria Nuova, USL Toscana Centro, Firenze*

²*Laboratorio di Genetica - P.O. S. Stefano, USL Toscana Centro, Prato*

Nel caso in esame è stata valutata una paziente in gravidanza con primogenito affetto da ritardo psicomotorio, ritardo di crescita, anomalie fisiche minori e anemia, portatore di delezione di circa 3Mb a carico del cromosoma 8 nella regione 8p11.21-11.1, evidenziata mediante array-CGH come di nuova insorgenza nell'affetto e consistente con il quadro clinico. Al fine di escludere il rischio di ricorrenza correlabile all'eventualità di un mosaicismo germinale, è stata condotta amniocentesi (villocentesi non eseguibile per problematiche ostetriche); l'analisi citogenetica standard è risultata nella norma, mentre l'analisi array-CGH su DNA estratto da liquido amniotico, dopo esclusione di contaminazione materna, ha identificato la stessa delezione presente nel primogenito a carico della regione 8p11.21-11.1. In considerazione della ricorrenza di questo riarrangiamento cromosomico nelle due gravidanze, si è ritenuta indicata la determinazione del cariotipo costituzionale nella paziente e nel partner. Nella richiedente è emerso un cariotipo femminile a mosaico per la presenza di cellule con marcatori cromosomici (formula cromosomica $mos47,XX,+mar[167]/48,XX,+mar1,+mar2[3]/46,XX[30]$). In particolare, in 167 delle 200 analizzate sono stati evidenziati due marcatori cromosomici diversi. Inoltre, nel referto dell'analisi citogenetica viene segnalato che in tutte le metafasi analizzate il braccio corto di un cromosoma 8 risulta di dimensioni lievemente minori ma non caratterizzabile con le tecniche di citogenetica convenzionale. Da approfondimenti di citogenetica molecolare mediante FISH, l'utilizzo della sonda painting per il cromosoma 8 ha permesso di stabilire l'origine dei marcatori sovranumerari come derivativi del cromosoma 8. Sono in corso ulteriori analisi per definire con maggiore precisione le caratteristiche dei marcatori cromosomici identificati. E' tuttavia possibile ipotizzare che la paziente sia portatrice della delezione ricorrente nelle proprie gravidanze e che il materiale cromosomico sovranumerario compensi tale delezione nella paziente stessa, mentre sia stato perso nel prodotto del concepimento. Tale dato, se confermato, supporterebbe l'indicazione ad effettuare regolarmente determinazione del cariotipo standard nei genitori di individui con sindrome da microdelezione ai fini di una migliore quantificazione dei rischi di ricorrenza e di una opportuna presa in carico.

COD. P246

The role of genetic test to reach the precise diagnosis of a new case of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) deficiency

C. Mazzaccara^{1,2}, A. Redi¹, A. Nolano¹, L. Albano², S. Fecarotta³, F. Acquaviva³, C. Flagiello², B. Mirra¹, G. Parenti³, M. Ruoppolo^{1,2}, G. Frisso^{1,2}

¹*Dip. di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università Federico II, Napoli*

²*CEINGE Biotecnologie Avanzate, s.c.a r.l., Napoli (Italy)*

³*Dip. di Medicina Translazionale-Sezione di Pediatria, Università Federico II, Napoli (Italy)*

We present here the case of an infant who presented hypomethioninemia (3.9 $\mu\text{mol/l}$ versus rv: 6-20 $\mu\text{mol/l}$) at the expanded newborn screening (NBS). The second tier-test showed hyperhomocysteinemia (Hcy 106,7 μM , rv: 5-15 μM), without increases of urinary methylmalonic acid excretion. The haemochromocytometric examination showed: RBC 3.92 $\times 10^6/\mu\text{l}$ (rv: 3.9-5.6 $\times 10^6/\mu\text{l}$), HB 13.10 g/dl (rv: 11-16 g/dl) and MCV 96.30 fl (rv: 70-91 fl). These outcomes supported the suspicion of a folate metabolism disorder probably associated with MTHFR deficiency or mutations in MTR, MTRR or MMADHC genes. In agreement with the pediatricians, the genetic test for the MTHFR gene was performed. MTHFR deficiency is a rare inborn error of folate metabolism, transmitted in an autosomal recessive manner, caused by mutations in the MTHFR gene. An early treatment with betaine and methylfolinic acid could prevent clinical manifestations. The genetic test revealed the presence of two missense mutations: c.176G>C (p.Trp59Ser) and c.1769T>G (p.Leu590Arg), in MTHFR gene, inherited from the father and mother respectively. The c.176G>C was formerly reported as disease causing mutation, while the c.1769T>G is a novel variant which can be classified as likely pathogenic according to the ACMG criteria. Furthermore, the sequencing of the MTHFR gene showed the presence of two polymorphisms, c.665C>T (p.Ala222Val) and c.1286A>C (p.Glu429Ala), known as genetic risk factors for thrombophilia, both in homozygous and compound heterozygous state. Parents' genotyping showed that both carry genetic risk factors for thrombophilia, being the father homozygous for c.665C>T polymorphism and the mother compound heterozygous for c.665C>T and c.1286A>C. The asymptomatic newborn started empirical treatment with high dosed of betaine, methylfolinic acid and vitamin B12. During follow-up, levels of methionine, detected by HPLC, have normalized and homocysteine levels have reduced. In conclusion, this case report highlights the importance of molecular analysis to get the precise diagnosis and to provide the appropriate counseling to the parents, also for the possibility of a next prenatal diagnosis.

COD. P247

AN ITALIAN FAMILY WITH p.F84L TRANSTHYRETIN MUTATION ASSOCIATED WITH AMYLOIDOTIC POLYNEUROPATHY

M. Gagliardi¹, M. Morelli², R. Procopio^{1,2}, G. Demonte², A. Quattrone^{1,3}, G. Annesi¹

¹*Institute of Molecular Bioimaging and Physiology, National Research Council, Section of Germaneto, Catanzaro, Italy*

²*Institute of Neurology, Department of Medical and Surgical Sciences, University Magna Graecia, Catanzaro, Italy*

³*Neuroscience Research Center, Department of Medical and Surgical Sciences, University Magna Graecia, Catanzaro, Italy.*

OBJECTIVE Transthyretin amyloidosis (TTRA), also known as familial amyloidotic polyneuropathy (FAP), is an autosomal dominant disorder that results from a mutation in the TTR gene. This gene encodes for plasma transthyretin, a tetrameric plasma protein formerly known as prealbumin and synthesized by the liver. More than 150 pathogenic mutations in the TTR gene have been reported. The most frequent clinical features are sensorimotor neuropathy, autonomic dysfunction and cardiomyopathy. Other organs such as the eye, with vitreous opacities, and kidney may be occasionally affected. In this study, we evaluated the presence of mutations in TTR in a male patient with TTRA from South Italy. **PATIENTS AND METHODS** The patient was a 67 years old-man with numbness in the left small toe, which then moved to all toes and up her calf started 3 years ago. He subsequently developed leg weakness and balance problems and numbness progressed to involve the hands. He denied orthostatic symptoms or decreased sweating. Neurological examination showed decreased sensation below the knees with absent vibratory sensation. Lower extremity reflexes were absent, and he swayed on Romberg testing, but did not fall. The strength was reduced distally to 4 limbs. Electrodiagnostic testing showed the presence of axonal neuropathy. Genomic DNA was extracted from peripheral blood by standard method. The purified polymerase chain reaction products were sequenced using an ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies).

RESULTS The mutation analysis of the TTR gene detected the c.250T>C (p.F84L) mutation in heterozygous state in the proband and his asymptomatic sister. **DISCUSSION AND CONCLUSIONS** Susceptibility to amyloidosis is governed by heterozygosity for TTR mutations. TTR variants reduce the stability of the physiological TTR tetramer, and consequently, produce a pro-amyloidogenic monomer more easily than normal TTR. Here we reported the c.250T>C mutation in TTR gene already described in an American patient of Italian origin with amyloid polyneuropathy, in a family originating in Central Italy with several members affected by FAP and in a single case in a man who had been adopted as a baby. We identified this variant in a 67 years old man and his asymptomatic sister. We cannot exclude that his sister develops after many symptoms because the variable age of onset which is typically reported between 30 and 70 years. The presence of this mutation in more Italian patients it leads us to think that there is a founding effect of the variant in the Italian population.

COD. P248

Ritardo dello sviluppo psicomotorio, anomalie dei genitali esterni e microduplicazione 2q24.3-q32.3: descrizione di un caso clinico e revisione della letteratura

A. D'Ambra¹, S. Boni¹, L. Memo¹

¹*U.O.C. Pediatria e Patologia Neonatale, Ospedale San Martino, Belluno*

Le microduplicazioni / microdelezioni identificabili mediante arrayCGH si associano ad un'ampia varietà di quadri fenotipici spesso a patogenesi non chiara. Riportiamo il caso di un piccolo paziente inviato a consulenza genetica per la presenza di ritardo nello sviluppo psicomotorio e anomalie dei genitali esterni. Alla nostra valutazione, all'età di 10 mesi, si conferma la presenza di ritardo nell'acquisizione delle tappe dello sviluppo psicomotorio associato ad aspetti peculiari del volto, anomalie dei genitali esterni (pene curvo con prepuzio corto, criptorchidismo bilaterale) e presenza di fossetta sacrale chiusa. L'esame cromosomico molecolare (arrayCGH) identifica la presenza di due CNV: una duplicazione di circa 509-539Kb in 10p11.21 di origine paterna e una duplicazione di circa 25.76-25.81Mb de novo in 2q24.3-q32.3 (quest'ultima, confermata con metodica FISH, come in tandem senza il coinvolgimento di altri cromosomi).

Il nostro caso clinico conferma l'estrema variabilità del quadro clinico osservabile nei pazienti con microduplicazione 2q e la necessità di effettuare l'esame cromosomico molecolare in presenza di ritardo dello sviluppo con anomalie associate.

COD. P249

LONGEVITÀ E QUALITÀ DELLA VITA A SAN MARCO DEI CAVOTI (BN): LO STUDIO HEBE

F. Lonardo¹, C. Lombardi¹, M. Maioli¹, M.S. Lonardo¹, R. Murgia³, B. Simonetti⁴, S.D. Cicala⁴, C. Manzo⁵, S. Stisi²

¹*U.O.S.D. di Genetica Medica, A.O.R.N. "G. Rummo", Benevento*

²*Centro Kinesis, Via Sassari 37, Cagliari*

³*Cattedra di Statistica, Università degli Studi del Sannio, Benevento*

⁴*Servizio di Reumatologia Geriatrica, ex Ospedale "Mariano Lauro", Distretto 59, Sant'Agnello (NA)*

⁵*U.O.S.D. di Reumatologia, A.O.R.N. "G. Rummo", Benevento*

La popolazione residente a San Marco dei Cavoti, comune campano di circa 3.400 abitanti in provincia di Benevento, è caratterizzata da una notevole longevità. Lo studio Hebe (dal nome della dea dell'Olimpo, figlia di Zeus, che distribuiva l'elisir dell'eterna giovinezza nei banchetti degli dei) ha cercato di indagare le possibili basi di questa longevità.

Sono stati studiati 114 individui (55 M; 59 F) di età compresa tra i 60 ed i 106 anni e suddivisi in tre classi di età: tra i 60 e 90 anni con storia di longevità familiare (34%); tra i 60 e 90 anni senza storia di longevità familiare (32%) ed infine gli ultranovantenni (34%).

Gli over 90 (>90) sono stati valutati nella loro qualità di vita attuale. La loro condizione psico-fisica, sociale ed economica ed i loro valori ematici di vitamina D sono stati paragonati a due popolazioni di controllo formate da ultrasessantenni. La prima (>60L) formata da >60 aa che avevano avuto in famiglia almeno un genitore ed un secondo parente che aveva superato i 90 aa. La seconda popolazione di controllo (>60NL) che non aveva avuto né genitori né altri parenti ultranovantenni nelle ultime tre generazioni. Nei tre gruppi di studio (>90, >60L, >60NL) è stato inoltre valutato un polimorfismo (FokI) nel gene per il recettore della vitamina D (VDR). La presenza o meno del sito FokI determina due possibili alleli: F ed f, che danno origine a tre diversi genotipi: FF, Ff e ff. L'allele F determina la produzione di un VDR più attivo.

Lo studio indica che nel contesto di una popolazione omogenea per cultura, alimentazione, patrimonio genetico ed organizzazione sociale, i livelli serici di vitamina D tendono a ridursi con l'aumentare dell'età. Nella popolazione >90 aa e tra i soggetti con longevità familiare prevale il genotipo VDR-FF. Il dato si avvicina alla significatività statistica ma non la raggiunge, verosimilmente a causa della non elevata numerosità del campione. La frequenza aumentata del genotipo FF, dotato di maggiore efficienza, potrebbe comunque essere alla base di una maggiore probabilità di sopravvivenza ed una migliore qualità di vita nei portatori.

Lo studio verrà esteso ad un numero più elevato di soggetti, prendendo in considerazione anche altre variabili genetiche ed ambientali ed allungando il periodo di osservazione.

COD. P250

Molecular characterization of several interleukin gene: a genetic cohort study on a group of Behçet's syndrome patients

M.C. Padula^{1,2}, P. Leccese¹, N. Lascaro¹, A. Limongi², R.P. Radice², M. Gilio¹, T. Carbone¹, A.A. Padula¹, G. Martelli², S. D'Angelo¹

¹*Rheumatology Institute of Lucania (IReL) and Rheumatology Department of Lucania, San Carlo Hospital of Potenza and Madonna delle Grazie Hospital of Matera, Italy*

²*Department of Science, University of Basilicata, Potenza, Italy*

BACKGROUND. Behçet's syndrome (BS) is a rare chronic vasculitis of unknown etiology. The dysregulation of the immune response has been related to disease onset and development in genetically predisposed subjects [1,2]. BS genetic background was investigated in genome-wide association studies (GWASs) and various risk loci were reported, including several interleukine (IL) single nucleotide polymorphisms (SNPs) [3, 4]. **AIM.** To investigate the mutational state of various IL genes to describe their frequency in a group of Italian patients with BS. **METHODS.** We recruited 61 consecutive BS patients at Rheumatology Institute of Lucania (mean age \pm SD: 46.78 \pm 12.76; sex ratio: 37 males/24 females) fulfilling the ISG criteria. Genomic DNA was isolated from patient's whole blood using standard procedures. Specific primers were designed for the coverage and amplification (PCR) of five IL tagSNPs (IL10 rs1518111 and rs1800872, IL23R-IL12RB2 rs924080, IL23R rs17375018, IL12A rs17810546). Good-quality amplicons were sequenced by the GATC Biotech Sanger sequencing service. SNPs analysis and their functional effects were performed using bioinformatics tools (BlastN and Mutation Surveyor).

RESULTS. IL tagSNPs genotypes highlighted a higher frequency of IL10 rs1800872 mutant CC genotype (57.38%) than wild-type AA genotype (18.03%); the heterozygous genotype (AC) was identified in 15/61 patients (24.59% of cases). No difference was found when wild-type AA genotype and mutant GG genotype frequencies of IL10 rs1518111 were compared. Higher frequencies of wild-type genotype compared to both heterozygous and homozygous mutant genotype for IL23R-12RB2, IL23R and IL12A SNPs were also found.

CONCLUSIONS. The data shows a higher frequency of IL10 rs1800872 mutant genotype than the other IL SNPs, supporting the major role of this variant in influencing BS susceptibility. Analyses of a larger cohort of patients and matched controls are needed to confirm this preliminary data. Targeting of IL starting from genomic data could offer the possibility to personalize the treatment and obtain a good clinical response.

[1] Hatemi G et al, 2016. *Clin Exp Rheumatology*. 34:10-22; [2] Leccese P et al, 2017. *Curr Opin Rheumatol*. 2017;29(1):12-16; [3] Gül A. *Curr Opin Rheumatol*. 2014; 26:56-63; [4] Takeuchi M et al. *J Autoimmun*. 2015;64:137-148.

COD. P251

UN GENOTIPO RARO DI FIBROSI CISTICA: L'IMPORTANZA DEL COUNSELLING GENETICO NELLA VALUTAZIONE DEL TEST GENETICO E NEL FOLLOW-UP

C. Politi¹, M.D. Nocera¹, R. Tallerico¹, E. Colao¹, A. Primerano¹, G. Contrò¹, F. Fabiani¹, R. Iuliano¹, M.D. Ceravolo¹, N. Perrotti¹, P. Malatesta¹

¹*Az. Osp. Univ. "Mater Domini"- U.O. Genetica Medica - CZ*

Presentiamo un caso di diagnosi prenatale di Fibrosi Cistica (FC). La richiesta dell'indagine molecolare era supportata da una diagnosi di FC del loro primogenito, giunto presso la nostra U.O all'età di 15 mesi. La diagnosi di FC era conseguente ad un IRT (concentrazione della tripsina immunoreattiva) positivo, un risultato dubbio del test del sudore e all'indagine molecolare del gene CFTR che aveva rilevato la presenza in eterozigosi composta della mutazione c.3909C>G (N1303K) e della variante clinica di significato incerto (VUS) c.1584+2T>C. I pazienti non avevano avuto un counselling genetico post test. Abbiamo dovuto effettuare innanzitutto lo studio molecolare del gene CFTR nei genitori evidenziando nel padre di origine calabrese la mutazione N1303K e nella madre di origine ucraina la VUS c.1584+2T>C. Alla 10^w la paziente è stata sottoposta alla villocentesi, il feto è risultato portatore della VUS c.1584+2T>C in eterozigosi. E' stata esclusa la contaminazione di Dna materno mediante l'analisi di marcatori polimorfici (microsatelliti). Sono in corso ulteriori valutazioni cliniche del primogenito in quanto sia la combinazione genotipica che il risultato del test del sudore dubbio potrebbero supportare un disordine correlato a CFTR (CFTRpatia) piuttosto che una diagnosi di FC classica. Dallo studio della letteratura per una diagnosi di FC classica è necessario un test del sudore positivo (>60mEq/L) o due mutazioni causative di FC. Nel nostro paziente i dati a nostra disposizione non supportano questi criteri avendo un test del sudore dal risultato dubbio (57mEq/L) ed essendo portatore di una sola mutazione classificata come causativa di FC ereditata dal padre e da una VUS ereditata dalla madre. Pertanto crediamo che il bambino debba essere seguito da un centro specializzato in FC per approfondire quale sia il legame tra la sua combinazione genetica e la sua attuale situazione clinica.

COD. P252

Analisi mutazionale dei geni BRCA1 e BRCA2 in pazienti siciliane affette da carcinoma della mammella e dell'ovaio

S. Stella¹, S.R. Vitale¹, C. Barone³, S. Bianca², N. Inzerilli¹, P. Vigneri¹, L. Manzella¹

¹*Centro di Oncologia ed Ematologia Sperimentale, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Vittorio Emanuele, Catania; Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Catania*

²*Genetica Medica ARNAS Garibaldi, Catania*

³*Genetica Medica ASP 8, Siracusa*

I tumori della mammella e dell'ovaio, sono tumori molto frequenti in tutto il mondo. In particolare, il tumore mammario, ha una incidenza di 1.7 milioni di casi l'anno e quello dell'ovaio, di circa 239.000 casi. Sebbene l'85%-90% di queste neoplasie siano di natura sporadica, il 5%-15% vengono definite "eredo-familiari" ovvero correlate ad una predisposizione genetica che nel 90% dei casi è legata a mutazioni germinali nei geni BRCA1 (17q.21.31) e BRCA2 (13q.13.1). Le portatrici di queste mutazioni, nell'arco della propria vita, hanno un rischio di sviluppare un tumore mammario del 40%-80% ed un tumore ovarico del 30-40%. Obiettivo del nostro studio, è stato quello di analizzare, attraverso la tecnologia della Next Generation Sequencing" (NGS) lo stato mutazionale di pazienti della Sicilia orientale affette da carcinoma della mammella e dell'ovaio. Su una casistica di 80 pazienti, abbiamo riscontrato il 10% di varianti patogenetiche, il 7.5% di varianti di significato incerto ed il 2.5% di varianti mai riportate nelle più accreditate banche dati. Le mutazioni patogenetiche riscontrate, sono state validate attraverso la tecnica PCR e sequenziamento diretto secondo il metodo Sanger. La correlazione tra le due metodiche, sequenziamento NGS versus Sanger è risultato essere del 100%. In conclusione, questi dati preliminari mostrano come la tecnica NGS possa essere considerata uno strumento valido per lo studio dei tumori eredo-familiari della mammella e dell'ovaio.

COD. P253

Etereogenita fenotipica di 1q21.1 q21.2, uno studio familiare

A. Primerano¹, G. Contrò¹, F. Fabiani¹, M.D. Ceravolo¹, M.D. Nocera¹, V. Bruni¹, R. Talerico¹, C. Politi¹, P. Malatesta¹, R. Iuliano¹, N. Perrotti¹, E. Colao¹

¹*Azienda Ospedaliera Universitaria "Mater Domini" Catanzaro U.O. Genetica Medica*

La giovane G.T di 17 a.a ha effettuato visita genetica per dismorfismi e ritardo mentale. Primogenita di tre sorelle; la seconda in abs, la terza con ritardo del linguaggio. La madre riferisce gravidanza normocondotta. Peso alla nascita 3010 gr, lunghezza 50 cm, cc e apgar non riportati. Sviluppo psicomotorio ritardato, prime parole a 4 a.a. Menarca a 9 anni, cicli regolari. I genitori di 52 e 42 a.a in abs. Alla visita presenta h.164 cm (50-75°p), peso 64 kg (75-90°p), facies longitudinale, fronte corta, bozze occipitali, attaccatura bassa dei capelli, microcrania, ipertelorismo, orecchie ruotate verso l'esterno. Palato ogivale. Collo corto e tozzo con adiposità a collana. Dita affusolate con lassità a livello delle falangette. Piedi con clinodattilia del 4° sul 5° dito. E' stato effettuato CGH-array da cui si evince una microduplicazione nella regione 1q21.1q21.2, di 2.7 Mb consistente con la sindrome di microduplicazione 1q21.1. e una microdelezione su 7p21.3, di 144 Kb, comprendente il gene ICA1 a segregazione paterna (size paterno 0,9 mb). La microduplicazione del cromosoma 1q21.1 è una sindrome a trasmissione autosomica dominante ad espressività variabile. La frequenza è di 3:10.000. Alcuni soggetti sono asintomatici, altri possono presentano disabilità intellettiva da lieve a moderata (85%). o disturbi dello spettro dell'autistico (18%), ritardo nello sviluppo del linguaggio, disturbi di socializzazione, malformazioni cardiache, come tetralogia di Fallot, ipospadia e criptorchidismo nei maschi (18%), piedi piatti, displasia dell'anca, macrocrania (50%) bozze frontali (50%), cataratta (18%), ipertelorismo (50%), e impianto basso delle orecchie. Nell'età adulta è possibile schizofrenia o disturbi dell'umore (ansia o depressione). Anche la sorella minore è stata sottoposta al test perché presentava una sindrome simil autistica, facies longitudinale, mento appuntito, bozze frontali, accentuazione della sella nasale, ipertelorismo, orecchie grandi e ruotate verso l'esterno, ad alto impianto. Piedi con segno del sandalo bilateralmente, sindattilia del 2° e 3° dito bilaterale, clinodattilia bilaterale del 5° dito della mano. Anche in questo caso è stata repertata una CNV in gain nella stessa regione 1q21.1q21.2, di 1.3 Mb.

COD. P254

MOSAICISMO DI BASSO GRADO PER TRISOMIA 21 SUGGERITO DA SFUMATE VARIANTI MORFOLOGICHE

I. De Maggio¹, M. Chetta¹, L. Vicari¹, M. Tarsitano¹, C. Piscopo¹, M. Della Monica¹

¹*U.O.C. Genetica Medica e Di Laboratorio, A.O.R.N. A.Cardarelli, Napoli*

Descriviamo il caso di un probando di 5 anni, venuto alla nostra osservazione per ritardo del linguaggio e tendenza all'isolamento sociale, che aveva presentato papilledema, sottile membrana a livello del III medio inferiore dell'acquedotto mesencefalico alla RM encefalo ed asimmetria delle sezioni anteriori degli emisferi cerebrali alla TC cranio. Mostrava inoltre sfumate varianti morfologiche caratterizzate da arcata sopracciliare sporgente e lievemente asimmetrica, occhi incavati, dorso del naso insellato con narici anteverse, occipite leggermente piatto, spalle cadenti, piede piatto bilaterale. Ecocardiogramma, ecografia addome completo, ECG, ABR, esami ematochimici di routine, aminoacidemia risultavano tutti nella norma. Il fenotipo clinico, seppur sfumato, rendeva ipotizzabile un mosaicismo per trisomia del cromosoma 21. E' stata dunque praticata, contemporaneamente a CGH-array tutt'ora in corso, FISH per la regione critica della Sindrome di Down, che ha riportato, su un conteggio di 340 nuclei, la presenza di una trisomia del cromosoma 21 nel 2,6% dei nuclei analizzati (9 nuclei trisomici su 340). Potrebbe dunque ipotizzarsi una possibile correlazione tra un mosaicismo, seppur di grado molto basso, per trisomia del cromosoma 21 su sangue periferico (tenuto conto anche di una possibile maggiore percentuale di cellule trisomiche nei diversi tessuti) ed un fenotipo clinico sfumato, quale quello del nostro piccolo probando.

COD. P255

A rare splicing mutation of RP2 gene associated with severe X-Linked retinitis pigmentosa

V. Bruni¹, G. Contrò¹, R. Talerico¹, A. Primerano¹, M.D. Ceravolo¹, M.D. Nocera¹, C. Politi¹, F. Fabiani¹, P. Malatesta¹, R. Iuliano¹, N. Perrotti¹, E. Colao¹

¹*U.O.C. di Genetica Medica, Università degli studi Magna Graecia, Catanzaro.*

Retinitis pigmentosa (RP) is the most frequent genetically and clinically heterogeneous inherited retinal degeneration. Typical symptoms include night blindness followed by a gradual decrease in the visual field starting from the periphery, leading to tunnel vision and eventually complete blindness by the third or fourth decade. Clinically it begins as bone spicules in the periphery caused by pigment epithelial atrophy and pigment migration into the retina. Other signs in the late stages of this degenerative disease include optic atrophy and attenuated blood vessels. The retinal dystrophies can be attributed to mutations in more than 250 genes that cause autosomal dominant, autosomal recessive and X linked RP (XLRP). Next generation sequencing (NGS) is an effective method to identify pathogenic variations in RP. Two genes have been implicated in the pathogenesis of XLRP: retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) and retinitis pigmentosa 2 (RP2). Mutations of RPGR accounting for 70 to 75% of all XLRP cases. Mutations of RP2 accounts for approximately 6–20% of cases. RP2 shows homology to cofactor C, which functions in the assembly of native tubulin heterodimers with other cofactors. Missense, nonsense, frameshift, insertion, and deletion mutations have been identified in the RP2 gene, many of which occur at residues conserved with cofactor C, suggesting functional homology between these proteins. We report a case of a male with a severe form of RP, diagnosed at 16 years that evolved in blindness within the age of 27. In his family history other affected males were reported. Molecular analysis of patient's DNA was made to investigate the genes responsible for retinitis pigmentosa and in particular for the XLRP. RPGR gene analysis was first performed by Sanger sequencing and no mutation was detected in this gene, so NGS was then carried out. The results of NGS analysis showed a c.969+3A>G hemizygous mutation reported in only one study. This rare mutation affected the third base of the splice donor site within intron 4 generating, probably, a null allele causative of a severe XLRP phenotype. The study of other family members is in progress.

COD. P256

Accreditamento UNI EN ISO 15189:2013: l'esperienza di un laboratorio di Genetica Medica

L. Cardarelli¹, R. Albarosa¹, E. Lippi¹, G. Bragagnolo¹, E. Nalesso¹, L. Michelotto¹, S. Gomirato¹, K. Marchioro¹, M. Renier¹, L. Toffanin¹, G. Calugi², S. Seraceni¹, V. Businaro¹

¹*RDI - Rete diagnostica italiana, Gruppo LIFE BRAIN, Limena (PD)*

²*Laboratori LAG, RDI, Gruppo LIFE BRAIN, Guidonia (RM)*

La norma UNI EN ISO 15189 descrive i requisiti gestionali e tecnici ai laboratori medici che vogliono conseguire l'accreditamento. Contrariamente ad altri paesi europei, l'applicazione di questo standard per i laboratori medici non ha avuto in Italia fino al 2017 un forte interesse sia per l'impegno economico e di risorse che è necessario investire per conseguire l'accreditamento, sia per la larga diffusione della certificazione di qualità secondo la UNI EN ISO 9001:2015 di più facile applicazione, ritenuta spesso sufficiente per attestare la presenza di un sistema gestione qualità all'interno di una struttura tramite verifiche periodiche da parte di un organismo di certificazione. Al fine di garantire agli utenti un livello sempre più elevato della qualità, competenza, efficacia e professionalità nell'erogazione dei servizi, nell'ottica del miglioramento continuo, soprattutto in considerazione delle implicazioni cliniche che conseguono alle indagini genetiche, diventa sempre più importante assicurare che le analisi siano effettuate secondo criteri di qualità e competenza che la sola certificazione di sistema, quale la UNI EN ISO 9001:2015, non garantisce. Per i laboratori di genetica una prima proposta per l'assicurazione di qualità è stata rappresentata dalla certificazione SIGUCERT; si tratta comunque di una certificazione di sistema, ma, in quanto applicata nello specifico all'attività di genetica medica, permette di una verifica più approfondita e precisa delle attività analitiche attraverso il monitoraggio di indicatori specifici stabiliti dalla Società Italiana di Genetica Umana (SIGU). L'accreditamento secondo la UNI EN ISO 15189:2013 da parte di Accredia, ente unico di accreditamento, rappresenta un ulteriore passo avanti verso l'assicurazione della qualità in quanto certifica che il laboratorio di Genetica Medica, oltre ad avere un sistema di gestione conforme ai requisiti della norma, possiede anche le competenze per emettere risultati tecnicamente validi. Presentiamo l'esperienza del nostro laboratorio (RDI, Rete Diagnostica Italiana, Gruppo Lifebrain) che, in un percorso di progressivo miglioramento e crescita tecnologica, quale primo centro in Italia, ha integrato le certificazioni ISO 9001 e SIGUCERT con l'accreditamento UNI EN ISO 15189:2013 per esami di genetica molecolare e di citogenetica.

COD. P257

Sindrome da Trisomia 5p in diagnosi prenatale

S.A. Lauricella¹, H.C. Cuttaia¹, M.V. Mazara¹, G. Signorino¹, M. Alessi¹, A. Celestino¹, M. Cannizzaro¹, F. Picciotto², G. Schillaci², V. Cigna², G. Barrano³, M. Piccione⁴

¹*U.O.S. Lab. di Citogenetica Medica, AOOR Villa Sofia-Cervello, Palermo*

²*U.O.S. Medicina Fetale e Diagnosi Prenatale, AOOR Villa Sofia-Cervello, Palermo*

³*U.O.S.D. Genetica Medica, Osp. San Pietro Fatebenefratelli, Roma*

⁴*U.O.S.D. Genetica Medica, AOOR Villa Sofia-Cervello, Università di Palermo*

Introduzione:La Sindrome da Trisomia 5p è un'anomalia cromosomica causata dalla duplicazione di un segmento di grandezza variabile del braccio corto del cromosoma 5, che di solito coinvolge la banda distale 5p15. Il quadro clinico è variabile, ma si associa sempre al ritardo mentale grave. Caso Clinico: descriviamo il caso di una giovane paziente che si sottopone ad amniocentesi alla 17.3 settimane di gestazione per riscontro ecografico di malformazioni fetali: idronefrosi bilaterale, DIV da malallineamento, femore corto e oligoidramios. All' ecocardiografia fetale si conferma DIV perimembranoso. La paziente riferisce precedente aborto spontaneo alla 7 settimana di gestazione. Lo studio del cariotipo fetale da amniocentesi ha evidenziato la presenza di materiale aggiuntivo sul braccio lungo di un cromosoma 5, verosimilmente a livello della banda q31. Si procede con lo studio citogenetico familiare e gli approfondimenti diagnostici molecolari per la definizione dell'anomalia cromosomica. Risultati: il test mediante tecnica di Array-CGH, eseguito su DNA fetale a complemento sessuale femminile (XX), ha messo in evidenza la presenza di una duplicazione sul braccio corto di un cromosoma 5 nella regione p15.33p13.2, estesa circa 34 Mb ed una microdelezione sul braccio lungo di un cromosoma 5 nella regione q35.3 estesa circa 1,8 Mb. L'indagine citogenetica eseguita su linfociti periferici dei genitori ha evidenziato un cariotipo paterno con inversione pericentrica a carico di un cromosoma 5: 46,XY,inv(5)(p13.3q35.2) ed un cariotipo materno normale :46,XX. Conclusioni: Le inversioni originano da 2 rotture che avvengono sullo stesso cromosoma e dalla rotazione successiva di 180° del segmento compreso tra i punti di rottura. Producono un nuovo allineamento dei geni lungo l'asse del cromosoma e di solito non si associano ad alterazioni cliniche. I portatori di inversione sono però a rischio riproduttivo, in quanto possono produrre gamete sbilanciati, rischio stimato intorno al 5-10%. La duplicazione parziale del braccio corto del cromosoma 5 si correla alla sindrome da trisomia 5p, caratterizzata da disabilità intellettiva di grado variabile qualora, come in questo caso, è coinvolta la regione 5p14, note dismorfiche, epilessia. Non sono state dimostrate correlazioni specifiche tra i geni della regione critica e il fenotipo osservato. Nel database DECIPHER la delezione parziale del braccio lungo del cromosoma 5 (5p35.3) di dimensioni più piccole ma comprese in quelle riscontrate nel feto, viene riportata in pazienti con anomalie cerebrali e ritardo globale dello sviluppo.

COD. P258

UNA NUOVA MUTAZIONE NEL GENE BRCA2 IN UNA FAMIGLIA CON CARCINOMA DELLA MAMMELLA EREDITARIO

G. D'Elia¹, G. Caliendo¹, A. Casamassimi¹, A. Gallo¹, M. Resse², R. Glorioso¹, C. D'Agnesi¹, M. Cioffi^{2,4}, A.M. Molinari^{1,2,3}, M.T. Vietri^{1,2,3}

¹*Patologia clinica Dipartimento di Medicina di Precisione, Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"*

²*U.O.C. Patologia clinica e molecolare A.O.U. Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"*

³*U.O.C. Patologia clinica e molecolare Diagnostica molecolare - Tumori ereditari*

⁴*Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche, Neurologiche, Metaboliche e dell'Invecchiamento, Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"*

Il 5-10% dei casi di carcinoma della mammella e/o dell'ovaio è da ricondurre ad una predisposizione ereditaria, dovuta nella maggior parte dei casi a mutazioni germinali nei geni BRCA1 e BRCA2. I portatori di mutazioni in tali geni possiedono un rischio del 40-80% di sviluppare carcinoma della mammella, del 30-40% di sviluppare carcinoma ovarico ed, in percentuale minore, altri tipi di neoplasie. Una paziente di 46 anni è stata sottoposta a counselling oncogenetico. La paziente era affetta da carcinoma della mammella, diagnosticato a 46 anni e riportava in famiglia casi di carcinoma della mammella, gastrico, polmonare e leucemia. In seguito alla consulenza, la paziente è stata sottoposta a prelievo di sangue periferico per analisi mutazionale dei geni BRCA1 e BRCA2, condotta mediante NGS. I risultati hanno mostrato la presenza di una mutazione frameshift, c.5511_5511delT (p.Phe1837LeufsX2), nel gene BRCA2. Tale mutazione è nuova, non riportata precedentemente in alcun database. Essa ricade nell'esone 11 e comporta la delezione di una timina in posizione nucleotidica 5511, che determina la formazione di un codone di stop prematuro in posizione aminoacidica 1839. La presenza della mutazione è stata confermata, mediante sequenziamento di Sanger e su un secondo prelievo di sangue. L'analisi è stata estesa ai familiari della paziente, utilizzando il sequenziamento di Sanger. In particolare sono state sottoposte ad analisi mutazionale le figlie sane della paziente, di 23 e 19 anni e le sorelle di 48 e 43 anni, entrambe sane. Sia le sorelle della paziente che la figlia di 19 anni hanno presentato la mutazione, mentre la figlia di 23 anni è risultata non mutata. La nuova mutazione c.5511_5511delT (p.Phe1837LeufsX2), identificata nel gene BRCA2, determina un arresto precoce della traduzione, ciò comporta la formazione di una proteina tronca. L'analisi dei geni BRCA1 e BRCA2 permette l'individuazione di mutazioni nei pazienti affetti, in modo da attuare strategie terapeutiche adeguate. L'identificazione precoce di familiari sani portatori di mutazioni, a rischio di sviluppare carcinoma della mammella e/o dell'ovaio o neoplasie correlate, consente ad essi di beneficiare di protocolli di sorveglianza personalizzati, con trattamenti farmacologici o chirurgici.

COD. P259

Duplicazione del Gene DOCK8 in un Soggetto con ASD

A. Frolli¹, A. Ciriello¹, F. Piscopo¹, B. Antonia¹, G. Savarese², A. Fico², R. Ruggiero², A. Cavallaro¹

¹*Centro di Ricerca sulle Disabilità, Università degli Studi Internazionali di Roma*

²*Centro di Genetica Ames*

Il piccolo paziente dopo aver ricevuto una diagnosi di Disturbo dello Spettro Autistico all'età di 24 mesi è stato sottoposto a screening genetico attraverso Array-CGH. L'analisi ha evidenziato la presenza di una duplicazione con un'estensione di circa 224 Kbp, presente a livello della citobanda p24.3 del cromosoma 9, con intervallo dal nucleotide 266.045 al nucleotide 489.842 che ad oggi non assume un chiaro significato patogenetico.

Tuttavia, la duplicazione osservata, coinvolge il gene DOCK8 (OMIM#611432). Delezioni in questo gene sono associate a "Ritardo Mentale di tipo 2 a trasmissione autosomica dominante" ed a "immunodeficienza combinata da deficit di DOCK8 a trasmissione autosomica recessiva".

Nel piccolo era presente sintomatologia autistica con un livello di severità 3 (DSM-5) e pertanto, si poteva ipotizzare che le duplicazioni di tale gene anziché essere associate a Ritardo Mentale potessero essere associate ad Autismo. La mutazione, peraltro, non si evidenziava nei genitori del piccolo, ma appariva come una mutazione de novo conservando il carattere autosomico dominante.

A due anni di distanza il fratello minore veniva anch'esso diagnosticato come autistico e sottoposto a screening Array-CGH non presentava alcuna mutazione o coinvolgimento del gene DOCK8. L'analisi fenotipica dei due fratelli consentiva di discriminare nel primogenito (positivo per la duplicazione) la presenza di Ritardo Mentale e Marcate Stereotipie e nel secondo un quoziente di sviluppo psicomotorio nella norma. Pertanto l'analisi comparata dei fenotipi riconduceva anche la duplicazione del gene DOCK8 a Ritardo Mentale di tipo 2 piuttosto che alla sintomatologia autistica.

COD. P260

L'IMPORTANZA DEL TEST GENETICO PER CHIARIRE UN QUADRO CLINICO DI UN EVENTUALE CFTRPATIA.

C. Politi¹, G. Contrò¹, R. Talerico¹, A. Primerano¹, M.D. Ceravolo¹, F. Fabiani¹, M.D. Nocera¹, R. Iuliano¹, N. Perrotti¹, P. Malatesta¹, E. Colao¹

¹*Az. Osp. Universitaria "Mater Domini", CATANZARO - U.O. Genetica Medica*

Presentiamo un caso di un paziente di 18 a.a con azoospermia. Riferisce dolore testicolare ad intermittenza dall'età di 8 anni. A 17 a.a effettua ecocolordoppler che evidenzia varicocele di 3° grado. Alla visita il paziente è normotipo, peso 70 kg (50-75°p), altezza 175 cm (50°), spm 170 cm, facies normoconformata, condizioni generali buone, pannicolo adiposo poco rappresentato, masse muscolari normotoniche e normotrofiche, no ginecomastia. Il cariotipo ha dato come esito 46,XY,inv(9)(q.21.2q22.3)mat. La quasi totalità delle inversioni paracentriche eterozigoti, sono state identificate in maniera fortuita e non per anomalie fenotipiche, pertanto sono considerate innocue e il rischio genetico per la progenie risulta inferiore all'1%. Lo spermogramma rivela azoospermia e i dosaggi ormonali e la microdelezione dell'Y risultano normali. Il test genetico per Fibrosi Cistica ha evidenziato la presenza della mutazione G542X (c.1624G>T) in eterozigosi e il genotipo IVS8 poly T: 5T/9T. L'indagine genetica di CFTR sui genitori ha evidenziato l'origine paterna del polimorfismo 5T e materna della mutazione G542X. Questo genotipo potrebbe essere compatibile con un quadro di CBAVD (assenza bilaterale congenita dei vasi deferenti). Infatti le varianti 9T e 7T sono prive di significato clinico, mentre quella 5T è presente in circa il 20% dei pazienti con CBAVD. Tuttavia il significato clinico di tale variante va valutata in associazione ad una altra regione del gene CFTR costituita da un tratto di TG con un numero di ripetizioni variabile. Quando l'allele 5T è associato sullo stesso cromosoma (in cis) con l'allele (TG)12 o (TG)13 l'ammontare di proteina CFTR funzionale può essere al di sotto della soglia critica per una funzione normale della stessa proteina. La copresenza del polimorfismo 5T con l'allele (TG)12 o (TG)13 in omozigosi o in eterozigosi con una mutazione, causativa di FC, è in genere origine di un disordine correlato a CFTR come ad esempio la CBAVD o la pancreatite idiopatica cronica. L'analisi del tratto "Poly-TG" nel nostro paziente aiuterà a chiarire il quadro di azoospermia anche perché l'agenesia dei vasi deferenti non è stata confermata con l'ecografie attuali.

COD. P261

Descrizione di un caso familiare di displasia cleidocranica

G. Lanzoni¹, S. Romano¹, S. Ciabattoni¹, C. Bacci¹, C. Di Marco¹, S. Barni², G.D. Chiti², A. Medici², E. Lapi³, A. Cecconi¹

¹*SOSd di Genetica Medica, P.O. S. Maria Nuova, Usl Toscana Centro, Firenze*

²*U.O. di Pediatria, P.O. S. Stefano, Usl Toscana Centro, Prato*

³*Specialista in Genetica Medica, Ordine dei Medici di Arezzo*

Descriviamo un caso familiare di displasia cleidocranica (CCD). La madre del probando presentava: fronte alta, infossamento mediano della fronte, profilo mascellare piatto, affollamento dei denti, 1° dito delle mani e dei piedi largo, bassa statura. Aveva eseguito numerose indagini genetiche, risultate nella norma.

Alla nascita il probando mostrava: FA ampia, diastasi della sutura sagittale, ipertelorismo, radice nasale infossata, padiglioni auricolari retrorotati, appendici preauricolari bilaterali. L'ecografia cerebrale indicava un'agenesia posteriore del corpo calloso, non confermata alla Rm cerebrale. A 2 mesi di vita il lattante mostrava un accrescimento regolare (25°c), avevamo richiesto una Rm cerebrale alla madre che non ha eseguito e fissato un controllo clinico dopo 2 mesi. E' stato ricondotto a visita dopo 6 mesi, il bambino era in condizioni cliniche scadenti, la facies era invariata, si erano rese evidenti: prominenza dell'acromiion scapolare, asimmetria del torace, rientramenti alla base degli emitoraci, cute sottile iperelastica, flessione della curva di crescita ponderale (<5°c). Sono stati richiesti: ecocolordoppler cardiaco, visita otorino, saturimetria notturna, rx dello scheletro in toto. Quest'ultima ha evidenziato malformazioni ossee multiple che associate al fenotipo clinico del probando e della madre hanno orientato alla CCD. Lo studio molecolare del gene RUNX2 ha mostrato, in entrambi, una mutazione, in eterozigosi, già descritta in letteratura in associazione a CCD (Zhou et al, 1999).

La CCD è una condizione genetica rara, a trasmissione autosomica dominante, presenta ritardata chiusura delle suture craniche, ipoplasia/ aplasia delle clavicole, ipoplasia delle scapole e alterazioni dentarie, bassa statura. Intelligenza normale. Mutazioni e delezioni/duplicazioni di RUNX2 causano il 70% dei casi, nel 30% il genotipo non viene identificato.

COD. P262

IPERCOLESTEROLEMIA FAMILIARE ETEROZIGOTE TIPO IIB

M.D. Ceravolo¹, A. Primerano¹, G. Contrò¹, R. Talerico¹, C. Politi¹, P. Malatesta¹, M.D. Nocera¹, F. Fabiani¹, P. Malatesta¹, R. Iuliano¹, N. Perrotti¹, V. Bruni¹, E. Colao¹

¹*Az. Osp. Univ. "Mater Domini" - Catanzaro- U.O. Genetica Medica*

E' stata effettuata consulenza genetica per la paziente T.R. per dislipidemia familiare. La probanda è affetta da artrite psorisiaca, colesterolo a 313 mg/dl, trigliceridi 486 mg/dl. Riferisce di non assumere statine per dolori muscolari. Dai valori delle analisi ematiche ed in base ai criteri del dutch lipid clinic network (DLCN) è possibile affermare che la signora risulta affetta da ipercolesterolemia familiare. Tali pazienti sono soggetti ad alto rischio di eventi di tipo ischemico cardiaco, cerebrale o vascolare periferico; la diagnosi precoce permetterebbe adeguata prevenzione e terapia mirata per ridurre la mortalità e la morbilità cardiovascolare. Nel caso in oggetto si tratta di Ipercolesterolemia familiare eterozigote di tipo IIB, riguardante il metabolismo lipidico, caratterizzato da eccessiva presenza di colesterolo e trigliceridi nel sangue, già a partire dall'età adolescenziale. Questa condizione può essere asintomatica o provocare episodi di angina pectoris; in generale predispone al rischio di sviluppare patologie cardiovascolari. Viene definita su base genetica dalla ricostruzione dell'albero genealogico, dove si è evidenziata ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia e patologia cardiovascolare; in particolare nel padre che è deceduto a 77 anni inseguito ad IMA (infarto miocardico acuto), nelle due sorelle della paziente che presentano ipercolesterolemia ed ipertrigliceridemia, e una di queste anche patologia cardiovascolare, nel fratello che è deceduto a 48 anni per ischemia, e a 31 anni aveva avuto un IMA, in due dei quattro figli del suddetto che presentano ipercolesterolemia ed ipertrigliceridemia, nelle sorelle della mamma e nelle sorelle del padre e nei nipoti che presentano ipercolesterolemia e patologie cardiache.

COD. P263

Utilizzo della CGH-array in epoca prenatale: case reports

D. Dell'Edera¹, F. Simone¹, A.A. Epifania¹, A. Sardella¹, A. Mitidieri¹, S. Sarubbi¹, V. Aragona¹, A. Allegretti¹

¹*Laboratorio di Genetica, Presidio Ospedaliero, Matera*

Su richiesta ginecologica è pervenuta alla nostra osservazione una donna di 42 anni gravida alla 12^a settimana, per sottoporsi al bitest. Questo esame ha rilevato un rischio fetale aumentato per trisomia 21 (indice di rischio: 1/22). Per siffatto motivo alla 13^a settimana la signora si è sottoposta a villocentesi. Lo studio del cariotipo da villi coriali ha rilevato un cariotipo fetale maschile normale (46,XY). Alla 19^a settimana una ecografia fetale ha evidenziato la presenza di un difetto interventricolare e, dopo una settimana (20^a settimana) una seconda ecografia, ha rilevato le seguenti alterazioni fetali: ipoplasia toracica, ritardo di crescita intrauterina, presenza di cisti nel plesso corioideo sinistro, polidramnios. Per tale motivo, per escludere la presenza di una patologia genomica fetale, si è proceduto ad effettuare, sul DNA crioconservato estratto da villi coriali, una Ibridazione Genomica Comparativa (CGH-Array: vetrino CytoSure Oligo arrays OGT 4x180K ISCA v2; software di analisi: CytoSure Interpret Software Version 4.8). La CGH-array ha evidenziato la presenza di una microdelezione di circa 6,77 Mb sul braccio corto del cromosoma 8 (8p23.3p23.1) contenente geni OMIM Morbid "ARHGEF10, CLN8 e MCPH1"; e di una microduplicazione di circa 17;85 Mb sempre sul braccio corto del cromosoma 8 (8p23.1p12) contenente geni OMIM Morbid "ASAH1, ATP6V1B2, BMP1, CHRNA2, DLC1, EPHX2, ESCO2, EXTL3, FGF17, FGF20, GNRH1, HR, LPL, LZTS1, MSR1, NAT2, NEFL, NKX2-6, PDGFRL, SFTPC, SLC39A14, TNFRSF10B, TUSC3 e VPS37A". La maggior parte dei geni in questione sono coinvolti nel corretto sviluppo del cervello. Tale condizione genomica si associa alla sindrome da delezione/duplicazione 8p ed ha una prevalenza nella popolazione generale di circa 1-9/100.000. Alla 21^a si è avuto l'exitus del feto. Dalla autopsia si è rilevato quanto segue: agenesia del corpo calloso, ventricolomegalia, cuore sinistro ipoplastico, ostruzione intestinale. Il caso presentato dimostra quanto sia importante il bitest, la crioconservazione di DNA embrio-fetale e, nei casi di presenza di soft marker ecografici fetali, la CGH-array.

COD. P264

DESCRIZIONE DI CASI CLINICI DI MALATTIA CFTR CORRELATA/ FIBROSI CISTICA ATIPICA. CORRELAZIONE GENOTIPO/FENOTIPO IN PAZIENTI PORTATORI DEI POLIMORFISMI TG12 5T e TG13 5T

L. Termini¹, A. Ferlisi¹, F. Ficili¹, G. Traverso¹, M.A. Orlando¹, O. Bologna¹, E. Gucciardino⁶, C. Di Girgenti⁴, G. Corsello⁵, M. Rotolo⁵, M. Collura¹

¹*U.O. II Pediatria CRR Fibrosi Cistica e Mal. Respiratorie Osp. Di Cristina- ARNAS CIVICO Palermo*

²*Lab. Genetica Molecolare dell'età evolutiva ARNAS CIVICO Palermo*

³*Dipartimento di Scienze per la Promozione della Salute e Materno Infantile "G. D'Alessandro" Università di Palermo*

⁴*Patologia Clinica Pediatrica Osp. Di Cristina- ARNAS CIVICO Palermo*

La Fibrosi Cistica rappresenta la più comune malattia genetica con incidenza di 1 caso ogni 2500-3000 nati. Più di 1800 sono le mutazioni responsabili con un corredo sintomatologico eterogeneo in relazione al numero di organi e apparati coinvolti. La forma classica si caratterizza per coinvolgimento multiorgano con interessamento di tutte le ghiandole esocrine. Al di fuori delle forme classiche si collocano quelle in cui le manifestazioni della malattia interessano prevalentemente un solo organo e sono genericamente indicate come atipiche. A fronte di genotipi classici per FC esistono varianti polimorfiche che se in associazione a mutazioni classiche sono quelle ritenute responsabili di fenotipi atipici. Il TG12-13-5T rappresentano polimorfismi la cui presenza isolata non è rilevante nel genotipo di un soggetto. La sua associazione con mutazioni classiche responsabili di FC, comporta riduzione della produzione di proteina CFTR. Descriviamo il caso di cinque pazienti adulti di sesso maschile, giunti alla nostra osservazione per consulenza genetica per infertilità. Tutti i pazienti sono portatori del polimorfismo TG12-13 5T associato a mutazioni classiche responsabili di FC. Età media 34,6 anni. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione respiratoria funzionale e strumentale, studio della funzionalità pancreatico ed epatica, test del sudore, valutazione ORL, studio genetico per FC. Nella casistica da noi descritta la presenza del polimorfismo TG 12 13-5T associata a mutazione classica responsabile di FC, correla con quadri fenotipici caratterizzati da infertilità, funzionalità respiratoria nella norma con FEV 1 medio 109 % e rare bronchiectasie alla TC torace, funzionalità pancreatico ed epatica nella norma, minima alterazione della morfologia epatica, test del sudore medio patologico con concentrazione media di cloro pari a 64,8 mEq/L, un solo paziente con poliposi e pansinusite. Nonostante i nostri pazienti rientrino nell'ambito delle forme atipiche di FC, hanno presentato un coinvolgimento multiorgano. Inoltre mentre i dati della letteratura evidenziano in tali pazienti valori della concentrazione di cloro variabili, talora negativi/border line, la media della nostra casistica ha mostrato valori francamente patologici.

COD. P265

Genetic analysis of Insulin-like 3 gene in pediatric patients with testicular torsion

A.P. Capra¹, E. Ferro¹, P.D. Romeo¹, M.A. La Rosa¹, S. Briuglia¹, T. Russo², S. Alberti¹, C. Romeo², P. Impellizzeri²

¹*Department of Biomedical and Dental Sciences and Morphofunctional Imaging, Unit of Clinical Pathology, Division of Clinical Genetics, University of Messina*

²*Department of Human Pathology of Adult and Childhood "Gaetano Barresi", Unit of Pediatric Surgery -University of Messina*

Testicular torsion (TT) mainly affects boys under 18 years old. In order to avoid orchiectomy, TT requires an immediate surgical management. The etiology of TT remains unknown and the related risk factors are still controversial. Observed familiar recurrence suggests the presence of a genetic involvement. The INSL3 gene consists of two exons, and it is specifically expressed in fetal and adult Leydig cells. In transgenic mice with deletion of this gene was observed an increased testicular mobility and subsequent testicular torsion. We have hypothesized the possible involvement of the INSL3 gene as a predisposing factor of human TT. We performed genetic analysis in 25 pediatric patients with unilateral and intravaginal TT (left, n=13, 56%; right, n=12, 48%). The age of the patients ranged from 1 to 16 years (median age $n=10.4 \pm 5.46$ years). In this study, we included two first male cousins affected by TT. Venous peripheral blood samples was obtained after parental written informed consent. The Thr60Ala polymorphism was detected in exon 1 of INSL3 gene and other 2 rarer variants (rs1047233 and rs1003887) were identified in the 3' untranslated region. These variants are prevalent in patients with TT instead of healthy subjects. Our findings warrant corresponding studies in larger series of TT patients to validate the detected associations.

COD. P266

Diagnosis of anetoderma in a woman after ovarian stimulations for in-vitro fertilization: possible association with prothrombotic state and hormone therapies

C. Liuzzo¹, A.P. Capra², P.D. Romeo², M.A. La Rosa², S. Briuglia², F. Catalano³, M.L. Musumeci³, S. Bellanca¹

¹*Reproductive Medicine Unit, 'Papardo' Hospital of Messina, Italy.*

²*Department of Biomedical and Dental Sciences and Morphofunctional Imaging, Unit of Clinical Pathology, Division of Clinical Genetics, University of Messina, Italy.*

³*Dermatology Clinic, AOU Policlinico-Vittorio Emanuele, University of Catania, Italy.*

This report describes a patient with anetoderma after ovarian stimulation for in-vitro fertilization (IVF) program. Anetoderma is a rare disorder characterized by circumscribed areas of flaccid skin due to the loss of elastic tissue in the dermis. The pathogenesis of anetoderma is still unknown, but it may reflect an imbalance of dermal elastin turnover. The epidemiology and natural history of anetoderma does not strongly support the hypothesis that is controlled by female sex hormones, though this occurrence are slightly more frequent in women aged 20-40 years than in men. After 10 years of infertility, a 37-year-old nulliparous woman underwent four ovarian stimulations by short protocol in different reproductive medicine centers, resulting in unsuccessful IVF. Soon after the last hormonal therapy a skin rash appeared in the abdominal region. Serological tests and skin biopsy from a lesion were performed. Histological analysis showed a reduction of the number of elastic fibers and discrete lymphocytic superficial perivascular infiltrate, so the diagnosis of anetoderma was confirmed. Inflammatory and autoimmune conditions were excluded and IgM and IgG antibodies against *Borrelia Bugdorferi*, *Treponema Pallidum*, Hepatitis B and C virus displayed negative values. Patients with anetoderma should be evaluated for the possible presence of a prothrombotic state because hypercoagulable conditions (inherited or acquired) can predispose an individual not only to venous and/or arterial thrombosis but also to a variety of cutaneous manifestations associated with collagen irregularities and elastic fiber fragmentation. In this case, genetic analysis for heritable thrombophilia showed heterozygous prothrombin gene variation (rs1799963) far more commonly known as G20210A of the F2 gene. Furthermore, she was heterozygote for the C677T (rs1801133) variant of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and homocysteine serum levels resulted raised (20.66 $\mu\text{mol/l}$). We can conclude that probably, in our case, this rare dermatosis may be determined by a multifactorial process associated with the repeated pharmacological treatments for ovarian stimulation, together with the genetic background of the patient showing a prothrombotic state and hyperhomocysteinemia.