

VALUTAZIONE FISH DELL'HER-2 GENE STATUS IN 25 TUMORI GASTRICI

B. Bossi¹, M. Fortunato², S. Ungari³, L. Longa², A. Maffè³, F. Giordano², R. Brizio², A. Comino², C. Ginardi⁴, E. Pellegrino¹, A. Bongiovanni¹, P. Manzone²

¹Laboratorio di Citogenetica, S.S Genetica e Biologia Molecolare, S.C. Laboratorio Analisi, A.S.O. S.Croce e Carle Cuneo

²S.C. Anatomia Patologica, A.S.O. S.Croce e Carle Cuneo

³S.S. Genetica e Biologia Molecolare, S.C. Laboratorio Analisi, A.S.O. S.Croce e Carle Cuneo

⁴S.C. Laboratorio Analisi, A.S.O. S.Croce e Carle Cuneo

Il tumore gastrico è la 2° causa di morte correlata al cancro. Nei paesi europei la malattia è al 4° posto per incidenza e al 3° per mortalità. Il proto-oncogene c-erbB-2 (HER-2/neu) localizzato sul cromosoma 17q11.2-q12 gioca un ruolo importante nella regolazione della crescita cellulare. L'iperespressione di Her-2 è emerso sotto il profilo della caratterizzazione biologica dei tumori gastro-esofagei e dello stomaco. E' stata confermata la correlazione fra amplificazione del gene c-erbB-2 ed iper-espressione proteica. La determinazione della espressione proteica sulla membrana e dello stato del gene, vengono effettuate con la IHC e la FISH. Presso il Lab. di Citogenetica della ASO S.Croce e Carle di Cuneo, sono state eseguite 25 indagini FISH su tumori gastrici provenienti da 20 maschi e 5 femmine. L'età media è risultata di 68 anni senza differenze tra i due sessi. Come proposto dalle linee guida ASCO-CAP, un Her-2/Chr17 <1.8 è : Negativo per amplificazione del gene Her-2; un Her-2/Chr17 tra 1,8 e 2,2 è : Dubbio ; un Her-2/Chr17 >2,2 è : Positivo. La polisomia è stata definita come media del numero di segnali del Chr.17 ≥ 3 . E' stato utilizzato il test Vysis PathVysion HER2 DNA Probe e per l'esecuzione delle FISH la tecnica di codenaturazione ed ibridazione in situ in microcamera. Nei 25 casi studiati si è potuto constatare che 13 (52%) avevano un Her-2 Gene Status amplificato, 4 (16%) erano polisomici e 8 (32%) erano negativi. L'unico caso analizzato con IHC =0 è risultato negativo. I 6 casi con IHC =1+ sono risultati: 4 (67%) normali, 2 (33%) polisomici e nessun amplificato. I 12 casi con IHC =2+ sono risultati: 3 (25%) non amplificati, 2 (17%) polisomici e 7 (58%) amplificati. I 6 casi con IHC =3+ sono risultati tutti amplificati. Sebbene la concordanza tra IHC e FISH sia ottima nei casi negativi (score =0 o =1+) e positivi (score =3+), si è constatato che come per il tumore della mammella, la determinazione dell' Her-2 Gene Status nei tumori dubbi all'IHC (score =2+) è irrinunciabile e di grande rilevanza clinica attraverso un completamento della diagnosi istologica, consentendo un approccio diagnostico e prognostico più allargato ed accurato, indispensabile per disegnare un algoritmo di terapia veramente efficace.

INDIVIDUAZIONE DI RIARRANGIAMENTI CROMOSOMICI CRIPTICI IN 5 PAZIENTI CON RITARDO MENTALE ASSOCIATO AD AUTISMO E/O EPILESSIA MEDIANTE L'UTILIZZO DI UNA PIATTAFORMA BAC GENOME- ARRAY- CGH: CORRELAZIONE GENOTIPO/FENOTIPO

A.L. Nucaro¹, V. Cabras³, S. Zorco², A. Milia⁴, C. Montaldo²

¹*Ist. di Ricerca Genetica e Biomedica, CNR, Cittadella Universitaria. Monserrato, Cagliari.*

²*Dip. di Scienze Chirurgiche e Odontostomatologiche, Lab OBL, Università di Cagliari.*

³*Scuola di Specializzazione di Patologia Clinica, Università, Cagliari.*

⁴*Dip. di Biologia Sperimentale, sez. Genetica, Università di Cagliari.*

Abbiamo riesaminato 10 pazienti, precedentemente studiati con le tecniche della citogenetica tradizionale. 5 presentavano un cariotipo normale, 5 un cariotipo anormale associato a dismorfismi. Tutti i pazienti esaminati presentavano Ritardo Mentale, associato ad Autismo e/o Epilessia.

Per lo studio, abbiamo utilizzato la piattaforma BAC Genome Array- CGH (Cytochips Blue-gnome, Technogenetics – Bou-ty).

La piattaforma Cyto-Chips BAC microarrays consiste di 4898 cloni BAC, spottati in quattro copie, con una risoluzione media di 0.6 Mb. Questo approccio ci ha permesso di identificare ulteriori riarrangiamenti criptici, non evidenziati precedentemente con la citogenetica convenzionale.

Abbiamo identificato due geni: SLC8A3 (human gene for member 3 of solute carrier family 8), a sodium-calcium exchanger elettivamente espresso nel cervello, e possibile gene candidato per Epilessia, (Nucaro et, al 2010); CSMD1 (Cub and sushi multiple domains 1), possibile gene candidato per Autismo associato a Ritardo Mentale e Epilessia (Nucaro et al, 2011). L'utilizzo di questa tecnologia ci ha permesso di poter meglio correlare il genotipo/fenotipo nei nostri pazienti.

La nostra esperienza mostra la validità della piattaforma BAC come utile metodo di screening genome- wide di aberrazioni cromosomiche, così come la oligonucleotide-based Array CGH, nello studio di pazienti con ritardo mentale idiopatico e/ o in associazione con Autismo ed Epilessia.

IPEROSSALURIA PRIMARIA TIPO 3: DIAGNOSI MOLECOLARE DEL GENE HOGA1

A. Pelle¹, R. Sebastiano¹, D. Giachino¹, G. Mandrile¹, M. De Marchi¹

¹SSD Genetica Medica, Dip. Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino, AOU S. Luigi Gonzaga, Orbassano (TO)

Le iperossalurie primarie (PH) sono un gruppo di rare malattie a trasmissione autosomica recessiva, che si manifestano, per lo più in età infantile, con alti livelli di ossalato urinario e plasmatico, nefrolitiasi, nefrocalcinosi e insufficienza renale cronica. Sono ben note la PH1, causata dalla perdita o ridotta funzione dell'enzima epatico alanina-gliossalato aminotransferasi (AGXT) e la PH2, determinata dal deficit dell'enzima gliossalato reduttasi/idrossipiruvato reduttasi (GRHPR).

Di recente è stata descritta la PH3, causata da mutazioni del gene HOGA1, codificante per l'enzima mitocondriale 4idrossi2ossoglutarato aldolasi. Questo enzima ubiquitario, espresso maggiormente nel fegato e rene, catalizza il passaggio finale del metabolismo mitocondriale dell'idrossiprolina che porta alla produzione di gliossalato e piruvato a partire dal 4idrossi2ossoglutarato (HOG). Sono state descritte mutazioni missenso, nulle e di splicing. Pertanto, anche se non è stato ancora chiarito l'esatto meccanismo, si ritiene che l'inattivazione di questo enzima porti ad un aumento nei mitocondri e nel citoplasma di HOG, che può essere convertito a gliossalato da altri enzimi (LDH e GR).

Nei casi fino ad ora descritti il fenotipo di PH3 è peculiare in quanto si manifesta con urolitiasi ad esordio precoce (in media a 7 mesi di vita) e rapida progressione del danno renale, seguita da una remissione clinica ma non biochimica a circa 4 anni di età.

Il nostro laboratorio si occupa già da anni della diagnosi molecolare di PH1 e 2 ed è membro del gruppo OxalEurope (gruppo europeo di studio per PH, www.oxaleurope.com). Al fine di garantire la completezza delle indagini molecolari abbiamo iniziato l'analisi del gene HOGA1, proposta ai pazienti PH negativi per mutazioni nei geni AGXT e GRHPR (Cochat, 2012). Il gene HOGA1 (10q24.2) è composto da 7 esoni (327aa) e viene analizzato mediante sequenziamento diretto della sequenza codificante e di 5' e 3' UTR.

In analogia alle altre forme di PH si ipotizzano possibili delezioni del gene HOGA1, per cui è in corso la valutazione di uno specifico kit MLPA (B.Beck, OxalEurope).

E' auspicabile una maggior attenzione a questo gruppo di malattie, largamente sottodiagnosticate, al fine di garantire un adeguato trattamento ai pazienti.

DUE NUOVE VARIANTI DEL GENE PTEN DI PROBABILE SIGNIFICATO PATOGENICO ASSOCIATE A MACROCEFALIA E AUTISMO/RITARDO DELLO SVILUPPO PSICOMOTORIO

C. Brusa¹, S. Varacalli¹, S. Orcesi², C. Tzialla³, D. Tonduti², E. Cattaneo⁴, A. Selicorni⁴, M. Caldognetto⁵, G. Mandrile¹, D. Giachino¹

¹SSD Genetica Medica, Dip. Scienze Cliniche e Biologiche, Università di Torino, AOU S. Luigi Gonzaga, Orbassano (TO)

²S.C. Neuropsichiatria Infantile, Fondazione Istituto Neurologico Nazionale C. Mondino, IRCCS, Pavia

³U.O. Patologia Neonatale e Neonatologia, Policlinico San Matteo, Pavia

⁴Amb. Genetica Clinica Pediatrica, Clinica Pediatrica, Fondazione MBBM, Monza

⁵SC Neuropsichiatria Infantile, ASLTO4, Ivrea (TO)

Mutazioni germinali del gene PTEN sono responsabili delle "sindromi amartomatose associate al gene PTEN" (PHTS). Le principali manifestazioni ad esordio pediatrico (s. di Bannayan–Riley–Ruvalcaba) sono macrocefalia, lipomi, polipi amartomatosi intestinali e lesioni cutanee (iperpigmentazione/papule). Circa la metà dei pazienti sviluppa ipotonia, ritardo psicomotorio e deficit intellettivo. Al fine di contribuire allo studio delle varianti di PTEN in questa sindrome, si riportano i risultati di due analisi effettuate c/o il nostro Centro.

Descriviamo due bambini di 3 e 4 anni, con macrocefalia (CC +6.96 e +6.26 SD). Il primo, nato in 32° settimana, manifestava macrocefalia congenita; accrescimento staturponderale sempre ai limiti superiori della norma, lieve ritardo dello sviluppo psicomotorio, bozze prefrontali prominenti e ipertelorismo. Il secondo, nato in 35° settimana, ha progressivamente sviluppato macro-dolicocefalia, associata a moderato ritardo dello sviluppo psicomotorio ed autismo. La RMN cerebrale evidenziava nel primo caso ventricolomegalia e alterazioni della sostanza bianca periventricolare, nel secondo aspetto riconducibile a incompleto processo di mielinizzazione (sn>dx). In nessuno dei due casi erano evidenti altre caratteristiche tipiche della PHTS.

Nel primo paziente è stata identificata la sostituzione c.320A>G, p.Asp107Gly e nel secondo la c.476G>A, p.Arg159Lys, entrambe localizzate nel dominio fosfatidico di PTEN, essenziale per la funzione della proteina. Le due varianti non risultano descritte in letteratura, tuttavia l'elevata conservazione degli amminoacidi interessati, la localizzazione in un dominio funzionalmente essenziale e la descrizione di altre mutazioni somatiche e/o germinali negli stessi codoni, suggeriscono la natura patologica di queste due varianti.

La mutazione è stata esclusa nella madre del primo bambino (non possibile l'analisi nel padre) e nei genitori del secondo, suggerendo, in quest'ultimo caso, l'insorgenza de novo, come spesso riportato nella s. di Bannayan–Riley–Ruvalcaba.

Sarà possibile definirne meglio l'espressione clinica nel corso del follow up longitudinale programmato. Inoltre, si è ritenuto utile sottoporre i pazienti ad un programma di sorveglianza oncologica (Eng et al. 2012).

Sindrome di CHARGE: esperienza quadriennale e analisi dei risultati

A. Maffè¹, S. Ribero¹, C. Ferrero¹, E. Giaccio¹, S. Renaudo¹, R. Tallone¹, M. Zuccarofino¹, B. Bossi¹, C. Ginardi², S. Ungari¹

¹S.S. *Genetica e Biologia Molecolare*, A.S.O. S. Croce e Carle - Cuneo

²S.C. *Laboratorio Analisi*, A.S.O. S. Croce e Carle - Cuneo

La sindrome di CHARGE è una condizione autosomica dominante a fenotipo variabile caratterizzata dall'associazione di varie malformazioni congenite. La prevalenza stimata è 1-12/1000000 nati vivi.

La diagnosi è clinica e si basa sull'utilizzo di criteri diagnostici che valutano la presenza di segni maggiori (coloboma, atresia/stenosi delle coane, anomalie nervi cranici, orecchie tipiche) e segni minori (genitali ipoplasici, ritardo psicomotorio e/o di crescita, difetti cardiovascolari, schisi orofaciale, fistola tracheoesofagea, dismorfismi).

Attualmente CHD7 è l'unico gene noto che, se mutato, è responsabile della s. di CHARGE. Le mutazioni descritte sono diffuse nell'intera regione codificante e nei siti di splicing e, per lo più, causano la produzione di una proteina tronca; più raramente alla base della patologia vi sono microdelezioni della regione 8q12. Il sequenziamento è in grado di individuare mutazioni di CHD7 nel 65-70% dei casi con fenotipo più lieve e nella maggior parte dei pazienti che presentano 4 segni maggiori o 3 maggiori e 3 minori.

Dal 2008 ad oggi abbiamo studiato i DNA di 76 probandi, inviati al nostro laboratorio da vari ospedali italiani perché affetti da sospetta s. di CHARGE in base ai criteri clinici diagnostici. I campioni sono stati sottoposti a sequenziamento diretto del gene CHD7 (esoni codificanti e regioni introniche fiancheggianti). Abbiamo identificato mutazioni nel 53% dei probandi. Le mutazioni identificate sono: nel 10% dei casi missenso, nel 37% non-senso, nel 20% nei siti di splicing, nel 33% causano frame-shift. In circa metà degli esoni studiati non sono mai state individuate mutazioni. Nel 57% dei casi le mutazioni individuate non sono ancora state descritte in letteratura in pazienti affetti da s. di CHARGE. Nella maggioranza dei casi per i quali è stata individuata una mutazione non ancora descritta in letteratura sono stati studiati i genitori e tutte le mutazioni si sono rivelate de novo.

Il 90% delle mutazioni da noi identificate causano la produzione di una proteina tronca; più della metà delle mutazioni identificate non sono ancora state descritte in letteratura; inoltre il nostro studio conferma l'importanza della selezione clinica accurata dei pazienti da indirizzare alla analisi molecolare.

POLYMORPHISMS IN DC-SIGN AND L-SIGN GENES ARE ASSOCIATED WITH HIV-1 VERTICAL TRANSMISSION IN A NORTHEASTERN BRAZILIAN POPULATION.

M. MORGUTTI¹, L. SEGAT¹, S. CROVELLA¹, S. LENARDUZZI¹, E. CATAMO¹

¹*Servizio di Genetica. IRCCS Burlo Garofolo, Trieste*

²*IRCCS Burlo Garofolo, Trieste*

DC-SIGN and L-SIGN are receptors expressed on specialized macrophages in decidua, (Hofbauer and placental capillary endothelial cells), known to interact with several pathogens, including HIV-1.

To disclose the possible involvement of these molecules in the susceptibility to HIV vertical transmission, we analyzed DC-SIGN and L-SIGN gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 250 children exposed to HIV-1 (58 uninfected, 192 infected) and 96 healthy uninfected children not exposed to HIV-1, all from Brazil.

While for DC-SIGN exon 4 polymorphism no differences were evidenced, for three SNPs in the DC-SIGN promoter (-139G>A, -201G>T and -336A>G) as well as for the tandem repeat polymorphism in L-SIGN gene, differences were encountered within the three group of children analyzed, indicating an association with susceptibility to HIV-1 vertical transmission.

This genetic association suggests that both DC-SIGN and L-SIGN molecules may play a role in HIV-1 infection susceptibility and vertical transmission.

P007

A REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION-BASED PROTOCOL FOR LOW/MEDIUM-THROUGHPUT Y-CHROMOSOME MICRODELETIONS ANALYSIS

M. MORGUTTI¹, L. SEGAT¹, S. LENARDUZZI¹, E. CATAMO¹, S. CROVELLA¹, G. RICCI¹

¹*IRCCS Burlo Garofolo, Trieste*

We describe a real-time PCR protocol based on the fluorescent molecule SYBR Green chemistry, for low to medium-throughput analysis of Y chromosome microdeletions, optimized according to the European guidelines and aimed at making the protocol faster, avoiding post-PCR processing and simplifying the results interpretation.

We screened 156 men from the Assisted Reproduction Unit, Department of Obstetrics and Gynecology, Institute for Maternal and Child Health IRCCS Burlo Garofolo (Trieste, Italy), 150 not presenting Y chromosome microdeletion and 6 with microdeletions in different AZF regions. For each sample the ZFY, SRY, sY84, sY86, sY127, sY134, sY254 and sY255 loci were analyzed performing one reaction for each locus.

AZF microdeletions were successfully detect in six individuals, confirming the results obtained with commercial kits and checked by and sequencing of the amplicons.

Our real-time PCR protocol permits the analysis of up to 10 samples (with the addition of positive and negative controls) in 96 wells plate format, or up to 46 in 384 wells plate for all markers simultaneously, in less than two hours without the need of post PCR manipulation, allowing to make the diagnosis of Y microdeletion with rapid, safe and relatively cheap method suitable for a low to medium-throughput processing.

DEFINIZIONE DI UN CARIOTIPO COMPLESSO IN UN CASO DI LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA (LMA)

G. Gentile¹, V. Altieri¹, M.R. Villa², A. Bossone¹, L. Mastrullo², A. Zatterale¹

¹U.O.C. di Genetica ASL Napoli 1 Centro, Napoli

²U.O.C di Ematologia – P.O."S.Gennaro"- ASL Napoli 1 Centro, Napoli

La LMA è una neoplasia caratterizzata da alterata proliferazione della cellula staminale emopoietica e delle linee cellulari derivanti:mieloide e/o eritroide e/o megacariocitaria. La LAM si può presentare a qualsiasi età, ma la sua frequenza aumenta con l'incremento dell'età.

Descriviamo il caso di un paziente di 60 anni ricoverato nell'aprile 2012. Presentava all'emocromo: WBC 3.800/mmc, Hb 8.6 gr/dl, Pt 16.000/mmc, assenza di blasti in periferia. Nel midollo si evidenziava un 60% di blasti ad habitus mieloide e note di eritrofagocitosi. La biologia molecolare risultava negativa. L'analisi citometrica evidenziava: CD34+,CD45dmin,CD117+, CD13+,CD33+,CD4+/-,CD14-,CD56-,CD11a+,CD11B+,CD11C+, NPO7+. Veniva diagnosticata una LMA.

L'analisi citogenetica di routine da colture di sangue midollare a 24 e 48h e bandeggio RBA ed RHG evidenziava un cariotipo complesso con monosomie dei cromosomi 1, 5, 12 e 17, trisomie dei cromosomi 2, 11 e 21 e presenza di 4 marker presumibilmente originati da riarrangiamenti coinvolgenti i cromosomi implicati nelle monosomie.

Sono state effettuate FISH PAINT per i cromosomi 1, 5, 12 e 17 che hanno permesso, in affiancamento alla citogenetica classica, di definire i 4 cromosomi marker come cromosomi derivativi. Il cariotipo risultava così definito:

49,XY,+1,der(1;5)(p10;p10)x2,+2,-5,+11,der(12)t(1;12)(q12;q13),der(17)t(12;17)(q13;p12),+21

Il paziente praticava polichemioterapia secondo protocollo FLAG. Nel maggio 2012 eseguiva, per refrattarietà della malattia, una polichemioterapia di salvataggio secondo schema FLAG.

Sempre nel maggio 2012 il paziente eseguiva un controllo di citogenetica che confermava la mancata remissione, con un cariotipo identico al precedente.

Nel luglio 2012 praticava polichemioterapia di 3a linea secondo schema MEC.

La diagnosi delle LAM si presenta complessa. Attenzione particolare meritano i casi che presentano un cariotipo complesso. In particolare quando il paziente risulta refrattario alla terapia standard, in presenza di un cariotipo con vari riarrangiamenti cromosomici, sarebbe importante giungere, attraverso l'approfondimento citogenetico-molecolare su casistiche significative, ad individuare le alterazioni che potrebbero essere messe in relazione con la resistenza ai farmaci.

MONITORAGGIO DEL CHIMERISMO POST-TRAPIANTO IN CELLULE CD34+ IN PAZIENTI CON LEUCEMIA ACUTA

A. Lari¹, G. Iaquina¹, B. Minuti¹, M. Trafeli¹, A. Gozzini¹, B. Peruzzi², A.M.G. Gelli², F. Mannelli³, A. Bosi³, F. Torricelli¹

¹*SOD Diagnostica Genetica AOU Careggi Firenze*

²*SOD Laboratorio Generale Settore Citofluorimetria AOU Careggi Firenze*

³*SOD Ematologia AOU Careggi Firenze*

Il trapianto allogenico di midollo osseo o cellule staminali è una procedura standard per il trattamento di diverse malattie ematologiche, in particolare delle leucemie acute. Il trapianto di midollo osseo dovrebbe sostituire le cellule clonali maligne e, attraverso l'infusione di cellule di un donatore sano, ricostituire la funzionalità ematologica e immunitaria nel più breve tempo possibile.

La maggiore causa di fallimento del trapianto è la ricomparsa della malattia; questa può derivare dalla persistenza di cellule emopoietiche del ricevente insieme a cellule del donatore (chimerismo misto).

Il monitoraggio del chimerismo post-trapianto nel ricevente risulta fondamentale per valutare precocemente i primi segni di ricaduta, specialmente in quei pazienti che non hanno uno specifico marcatore per poter valutare la malattia minima residua. A tal fine si eseguono i profili genetici del paziente prima del trapianto e del donatore mediante 15 loci STR che verranno confrontati con il profilo genetico del paziente dopo il trapianto, ottenuto, ad ogni intervallo (+30, +60, +100 etc.), sia da un campione intero di sangue periferico, sia da un campione di cellule CD34+ separate al citofluorimetro.

Il principale scopo di questo studio è quello di confrontare i valori di chimerismo ottenuti dal campione intero e dal campione di cellule CD34+ per stabilire quanto quest'ultimo dato sia un indicatore precoce di recidiva ematologica.

Nel caso in cui l'analisi di chimerismo in cellule staminali CD34+ permetta di fare una diagnosi più precoce di eventuale recidiva rispetto all'analisi del campione intero, questo approccio metodologico può essere applicato alla pratica clinica per personalizzare prospettivamente il trattamento degli effetti immunologici del trapianto di midollo osseo.

ESPRESSIONE DEL GENE PARP1 IN LEUCOCITI DI UN PAZIENTE CON CRIPTORCHIDISMO

M. Salemi¹, L.O. Vicari², R. Castiglione², E. Borgione³, P. Bosco¹, E. Vicari²

¹Laboratorio di Citogenetica. Associazione OASI (I.R.C.C.S.) Troina (EN).

²Sezione di Endocrinologia, Andrologia e Medicina Interna, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Catania, Italia

³Laboratorio di Neuropatologia Clinica. Associazione OASI (I.R.C.C.S.) Troina (EN).

Il criptorchidismo è il difetto più frequente del tratto urogenitale maschile alla nascita e si verifica quando uno o entrambi i testicoli non riescono a scendere dalla regione lombare allo scroto. È presente nel 2-4% di nati a termine e nel 20-30% di parti prematuri. Esso rappresenta un fattore di rischio per patologie testicolari primitive ed è associato con complicanze a lungo termine come infertilità e tumori al testicolo, infatti il criptorchidismo rappresenta il principale fattore di rischio per le neoplasie testicolari a cellule germinali (5-10 volte più probabile rispetto a un testicolo normale). Le basi molecolari di questa patologia sembrano implicati nell'attivazione di un percorso pro-apoptotico. Il gene Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) (1q42), che ha una lunghezza di 43 Kb, è conosciuto come gene pro-apoptotico, infatti una maggiore espressione di PARP1 favorisce un incremento di mRNA del gene Caspase-3 il quale a sua volta agisce come elemento pro-apoptotico nei meccanismi cellulari. In questo studio si descrive il caso di un ragazzo di 19 anni con criptorchidismo monolaterale. Il paziente è affetto alla Divisione di Andrologia ed Endocrinologia, presso l'Università degli Studi di Catania. La diagnosi di testicolo ritenuto è stata fatta dall'esame fisico e successivamente confermata da esame ecografico. Il volume testicolare era di 19 ml circa, significativamente inferiore alla norma, specificatamente il volume testicolare dei tre controlli normali arruolati era di $28,4 \pm 1,2$ ml. Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare, tramite qRT-PCR l'espressione dell'mRNA del gene PARP1 in leucociti di sangue periferico del caso descritto; gli esperimenti sono stati eseguiti anche su mRNA di leucociti di 3 soggetti normali associati per sesso ed età al caso studiato. Il gene Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) è stato utilizzato come gene controllo, e i dati sono stati analizzati secondo il metodo del Delta-Delta Ct. I risultati ottenuti evidenziano, nel nostro paziente, una maggiore espressione del gene PARP1 rispetto ai nostri 3 controlli, specificatamente: 1.311, 1.202 e 1.553 in più. Questi dati indicano che il gene PARP1 potrebbe avere un ruolo nei meccanismi pro-apoptotici del criptorchidismo.

DIFFERENTI FENOTIPI ELETTRICOLI ASSOCIATI A DELEZIONE E DUPLICAZIONE DEL 2P24.3: DESCRIZIONE DI 3 CASI

M. Traverso¹, M. Pezzella¹, G. Gobbi², P. Ricciardelli¹, G. Giudizioso¹, G. Prato¹, P. Pavone⁴, R. Falsaperla⁴, G. Tortorella⁵, F. Zara¹, M.G. Baglietto¹, P. Striano¹

¹Dip. di Neuroscienze, Istituto Giannina Gaslini, Genova

²U.O. Neurologia Pediatrica, Ospedale Maggiore, Bologna

³Dip di Neurologia pediatrica, Faenza

⁴Dip di Pediatria, Ospedale Vittorio Emanuele, Catania

⁵UOC di Neuropsichiatria Infantile, AOU G. Martino, Messina

Razionale: Microriarrangiamenti del q24.3 sono raramente riportati e il quadro epilettico può essere compreso nel fenotipo sia delle duplicazioni che delle delezioni. Riportiamo il caso di tre pazienti, rispettivamente, con del 2q24.3, del 2q24.3-31.2, dup 2q24.2-24.3.

Casi clinici: CA, di anni 3, esordio delle crisi a 2 mesi di tipo TC, in febbre. Mioclonie parziali complesse, in cluster o di lunga durata (>15min) anche stati di male. RM encefalo rivela ampliamento degli spazi subaracnoidei e ipoplasia corpo calloso. All'esame obiettivo si riscontra ipotonia generalizzata, discinesie e movimenti afinalistici, automatismi orobuccali, tratti autistici. La tecnica CGH-array mostra una delezione de novo 2q24.3 di 1.8 Mb.

BN, di anni 1 e 3 mesi, esordio delle crisi a 5 mesi, di tipo TC, in febbre. Dagli 8 mesi, riferiti episodi di perdita di contatto, con talvolta mioclonie al volto, e crisi cloniche agli arti quotidiane. EEG con anomalie parossistiche(AP) multifocali; RM encefalo rivela segni di atrofia corticale. All'esame obiettivo presenta numerosi dimorfismi (microcefalia, rientramento bitemporale, ampio filtro nasale, camptodattilia, ipoplasia dei genitali); all'esame neurologico, RPM, segni piramidali, ipotono assiale. Al CGH-array si evidenzia una delezione de novo 2q23-q31.2. di 14.1 Mb.

BL, di mesi 7, in seconda giornata esordio di crisi TC, in apiressia, quotidiane e farmaco resistenti. RM encefalo negativa, EEG con AP multifocali. In seguito, comparsa di spasmi asimmetrici, trattati con ACTH. All'esame obiettivo, si rileva ipospadia, ginecomastia; all'esame neurologico segni piramidali ai quattro arti; RPM. Il CGH-array rileva una duplicazione de novo 2q24.2-q24.3, di 9.6 Mb.

Risultati e conclusioni: I casi clinici presentati, sebbene presentino un riarrangiamento che coinvolge la stessa regione 2q24.3, mostrano caratteristiche fenotipiche diverse tra loro. Discutiamo le possibili relazioni genotipo-fenotipo focalizzando l'attenzione sui numerosi geni coinvolti in entrambi (in particolare, SCN1A, SCN2A/3A) e su come questi possano spiegare, oltre le differenze cliniche, soprattutto quelle epilettologiche, per quanto riguarda età di esordio, semeiologia, andamento delle crisi.

DEFICIT DELLA PROTEINA ABCA3 IN 2 FRATELLI GEMELLI DIZIGOTI

C. Piscopo¹, M. Petrillo¹, D. Tarantino¹, A. Colucci¹, G. Cerbone¹, C. Rosania¹, I. Di Maggio¹, A. Barbaruolo¹, P. Carrera², L. Amatucci³, M.G. D'Avanzo¹

¹*U.O.C. Genetica Medica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

²*Servizio di Biologia Molecolare Clinica e Citogenetica, Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Milano*

³*U.O.C. Neonatologia con TIN, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

In consulenza prenatale è giunta alla nostra osservazione una coppia di non consanguinei per problemi di infertilità.

Il consultand è nato con criptorchidismo bilaterale non operato. All'età di circa 30 anni ha avuto l'asportazione chirurgica di entrambi i testicoli per la presenza di un seminoma; conseguentemente il paziente ha presentato una azospermia pressoché completa.

La coppia per problemi di concepimento è ricorsa alla ICSI. Sono nati 2 gemelli (un maschio ed una femmina), nati a termine, da gravidanza normodecorsa. Per distress respiratorio particolarmente grave, che sembrava non legato a fattori infettivi, vengono ricoverati presso la Terapia Intensiva Neonatale della nostra Azienda. In seguito a radiografia del torace si sospetta Deficit del surfattante polmonare.

Viene richiesta una consulenza genetica che conferma il sospetto diagnostico e pertanto si richiede l'esame molecolare per la proteina B (SP-B), risultato negativo, e per la proteina ABCA3 essenziale per la formazione dei corpi lamellari, la cui carenza è causa di distress respiratorio neonatale letale con fenotipo simile al deficit di SP-B e di pneumopatia interstiziale in età pediatrica. L'esame del gene ABCA3 evidenzia in eterozigosi le seguenti varianti nucleotidiche: la variazione c.580A>G (p.Arg194Gly) descritta in letteratura in associazione a distress respiratorio neonatale; la variazione conservativa c.2268C>T (p.Ala756=) presente in dbSNP; la variazione c.4844del13 (p.Val1615GlyfsX15) che dà origine ad una proteina putativa tronca mai descritta.

Si deve avere il sospetto clinico del Deficit di surfattante quando un neonato o un bambino presentano un'insufficienza respiratoria particolarmente grave, prolungata e che non risponde a nessuna terapia,. Anche l'anamnesi familiare può essere importante per la diagnosi in presenza di 1 o più neonati morti per insufficienza respiratoria grave.

La diagnosi precoce di Deficit del surfattante consente di effettuare sui villi coriali e sulle cellule del liquido amniotico la diagnosi prenatale alla coppia, in una futura gravidanza, tenuto conto che il rischio, come per tutte le malattie autosomiche recessive, è del 25% ad ogni gravidanza.

DUE MALATTIE RARE ED UN SOLO BAMBINO

C. Piscopo¹, M. Petrillo¹, D. Tarantino¹, A. Colucci¹, G. Cerbone¹, C. Rosania¹, I. Di Maggio¹, A. Barbaruolo¹, L. Politano², C. Petruzzello³, S. Strocchia³, M.G. D'Avanzo¹

¹*U.O.C. Genetica Medica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

²*Servizio di Cardiomiologia e Genetica Medica, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Seconda Università di Napoli*

³*U.O.C. Oculistica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

Descriviamo il caso di N.G. di 12 anni e 3 mesi, con diagnosi di S. di Williams. Nato da parto cesareo a 37 settimane di E.G., P. 1970 gr, ha presentato reflusso gastro-esofageo ed ernia inguinale dx.

Fenotipo: facies tipica della sindrome con labbra grosse e sporgenti, malocclusione dentaria, denti piccoli, palato ogivale, orecchie grandi, miopia, ipoplasia malare e mandibolare. Torace excavatus, asimmetria mammaria (dx>sn). Dorso curvo con scapole alate. V dito delle mani corto. Scapola alta congenita con sterno incavato. Alla visita endocrinologica: bassa statura sindromica, basso peso. Genitali esterni di tipo maschile in corso di sviluppo puberale con testicoli in sede, volumetria 8 ml.

Alla consulenza neuropsichiatrica: goffaggine e maldestrezza. Inadeguata la motricità fine. Incoordinazione motoria. Lieve strabismo occhio sinistro. Disprassie semplici e complesse. Linguaggio: inadeguato il livello fonologico e pragmatico. Si evidenzia ritardo mentale da valutare.

Esame del carattere: tranquillo e sereno al colloquio. Linguaggio discreto. Ha il sostegno scolastico.

RX colonna vertebrale: atteggiamento scoliotico dorso-lombare dx-convesso ad ampio raggio. Accentuazione della cifosi dorsale.

Alla consulenza ortopedica: scapola alta congenita con apparente ipotono-trofia di pettorali e fissatori delle scapole. L'ipotonìa del torace e la consulenza ortopedica ci hanno suggerito di approfondire il quadro muscolo-scheletrico. Nel sospetto di una seconda sindrome, Facio-scapolo-omerale, si è proceduto all'elettromiografia che ha confermato la diagnosi. EMG: grande pettorale sinistro, grande pettorale destro, sovraspinato sinistro, sovraspinato destro: assenza di attività a riposo; a sforzo massimale reclutamento in interferenza con riduzione dell'ampiezza del tracciato (maggiormente evidente a livello dei mm sovraspinali); potenziali d'azione di durata media nei limiti ed ampiezza instabilmente diminuita; presenza di potenziali polifasici. Reperti elettromiografici suggestivi di alterazione miogena.

Si è effettuata anche l'indagine molecolare che ha dimostrato la presenza di una delezione de novo nella regione sub-telomerica del braccio lungo del cromosoma 4 (4q35) confermando la Sindrome Facio-scapolo-omerale, nel soggetto Williams.

SOGGETTO CON SINDROME DI WERNER AUTOSOMICA RECESSIVA IL CUI PAPÀ PRESENTA STIGMATE DELLA SINDROME

C. Piscopo¹, M. Petrillo¹, D. Tarantino¹, A. Colucci¹, G. Cerbone¹, C. Rosania¹, I. Di Maggio¹, A. Barbaruolo¹, S. Volpe², R. Iandoli³, M.G. D'Avanzo¹

¹*U.O.C. Genetica Medica, A.O.R.N. San G.Moscato, Avellino*

²*Servizio Immunoematologia e Trasfusioni, A.O.R.N. San G.Moscato, Avellino*

³*U.O.C. Dermatologia e Dermochirurgia, A.O.R.N. San G.Moscato, Avellino*

E' giunto alla nostra osservazione un paziente affetto da Sindrome di Werner per la presa in carico presso il nostro Centro. All'esame obiettivo il paziente mostra il fenotipo classico della Sindrome: diffuse ulcere al gomito sx, alle ginocchia, alle caviglie ed alle mani, sclerosi cutanea al volto, alle mani ed ai piedi. Ipertrofia dei muscoli degli arti inferiori.

Il paziente è affetto anche da Diabete mellito tipo I insulino-dipendente, in scarso compenso.

Esami praticati hanno messo in evidenza:

presenza di rallentato transito esofageo

steatosi epatica

struma multinodulare

L'analisi biochimica del prodotto genico nelle cellule del paziente è stato ricercato.

Durante il ricovero del paziente si è avuto modo di visitare anche il padre, avendo notato piccoli segni dismorfici.

Visita genetica: incanutimento all'età di circa 30 anni, operato di cataratta all'età di circa 45 anni e presenta un fenotipo più vecchieggiante rispetto all'età anagrafica, cute macchiata e sottile.

Essendo i genitori del consultand cugini di I grado (figli di fratello e sorella) la Werner presenta ereditarietà a. r. come nelle forme classiche e più frequenti della Sindrome. Pertanto la presenza di alcune stigmate fenotipiche presenti nel padre ci ha fatto porre la domanda se per un'aploinsufficienza del gene sia possibile la presenza di alcune manifestazioni anche nel soggetto eterozigote.

E' in corso lo studio del gene WRN mappato sul cromosoma 8 (8p12) sia all'affetto che al padre.

SINDROME MICRODELEZIONE/DUPLICAZIONE 15Q13.3: UNA SINDROME DA IMPRINTING?

C. Piscopo¹, M. Petrillo¹, D. Tarantino¹, A. Colucci¹, G. Cerbone¹, I. Di Maggio¹, A. Barbaruolo¹, V. Alesi², G. Barrano², A. Novelli², D. Quattrocchi³, M.G. D'Avanzo¹

¹*U.O.C. Genetica Medica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

²*Unità di Genetica Medica, Ospedale San Pietro Fatebenefratelli, Roma*

³*U.O.C. Fisiopatologia della Riproduzione, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

Descriviamo due casi di microdelezione e microduplicazione della regione genomica 15q13.3 in due differenti pazienti, entrambe di sesso femminile, con caratteristiche cliniche notevolmente differenti. In letteratura sono presenti diverse pubblicazioni che sottolineano come sia la microdelezione che la microduplicazione della regione in esame comportino un fenotipo sovrapponibile principalmente caratterizzato da ritardo psicomotorio e del linguaggio, disturbo pervasivo dello sviluppo con atteggiamenti di tipo autistico, ritardo mentale da lieve a moderato ed un maggiore rischio di epilessia. Le nostre due pazienti invece presentano profonde differenze. T.L., terzogenita di genitori non consanguinei, di anni 28 e con microduplicazione 15q13.3 estesa circa 624kb, ha presentato alla nascita labiopalatoschisi ed ha necessitato di numerosi interventi ricostruttivi; normale sviluppo psicomotorio e quoziente intellettivo nella norma, non presenta particolari dismorfismi ma soffre di retto colite ulcerosa. C.A., di anni 18 e con microdelezione 15q13.3 estesa circa 2Mb, nata a termine di gravidanza normocondotta, ha presentato dalla nascita macrosomia ed ipotonia per le quali ha praticato approfondimento molecolare per sindrome di Prader Willy che ha dato esito negativo. Attualmente presenta obesità, ritardo mentale moderato ed alterazioni del comportamento di tipo autistico. Sono in corso ulteriori approfondimenti molecolari per delineare la trasmissione familiare di suddette delezione/duplicazione. La discrepanza clinica osservata nelle due pazienti, a differenza di quanto segnalato in letteratura, potrebbe derivare da un pattern trasmissione paterna o materna del tratto interessato che è noto essere soggetto ad imprinting.

EFFETTUARE INDAGINI MOLECOLARI SENZA ALCUN SOSPETTO DIAGNOSTICO NON SOLO E' INUTILE MA E' ANCHE DANNOSO PER LA SPESA SANITARIA

C. Piscopo¹, M. Petrillo¹, D. Tarantino¹, A. Colucci¹, G. Cerbone¹, I. Di Maggio¹, A. Novelli², V. Alesi², G. Barrano², V. Petretta³, G. Gerosolima⁴, M.G. D'Avanzo¹

¹U.O.C. *Genetica Medica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

²Unità di *Genetica Medica, Ospedale San Pietro Fatebenefratelli, Roma*

³U.O.C. *Neurologia, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

⁴U.O.C. *Ginecologia ed Ostetricia, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

Presentiamo il caso di S.C. di 4 anni e 6 mesi, arrivata nel nostro D.H. dopo medical shopping e con diagnosi di scarso incremento staturale associato a stenosi valvolare polmonare di grado moderato, da probabile sofferenza alla nascita. Nata a 39 settimane da gravidanza complicata da gestosi nelle ultime due settimane, L 47,5cm, P 2480gr, C.F.C. 32,2cm. Fenotipo: facies con fronte ampia e bombata, trigonocefalia lieve, capillizio folto con attaccatura bassa sulla nuca, ipertelorismo, lieve epicanto, apparente strabismo, orecchie a basso impianto, naso con sella infossata, collo corto e tozzo con pterigio. Iposomia. Soffio sistolico 2/6 Centrum Cordis. Torace con carenatura, aumento della distanza intermammillare con lateralizzazione del capezzolo sinistro ed apparente ipertrofia del pettorale (dx>sn). Asimmetria scapolare. Clinodattilia V dito delle mani bilaterale. Polso con lieve accentuazione dorsale dell'epifisi ulnare (simil-Madelung). Piede con tendenza al piattismo ed al valgismo delle ginocchia. Sindattilia cutanea II-III dito dei piedi bilaterale.

Esami ematochimici, esame del cariotipo, CGH array: nella norma.

Visita NPI: Schema corporeo non completamente acquisito. Linguaggio dislalico, inadeguato il livello pragmatico. Oppositività, a tratti tiranneggia la madre. Viene riferito isolamento a scuola.

Visita endocrinologica: Ritardo staturale (< 3° C). Apparente buono compenso tiroideo.

Eco cardio: Stenosi polmonare lieve, cuspidi ipomobili non displasiche con gradiente transvalvolare max 33 mmHg.

Lo scarso incremento staturale associato a stenosi valvolare polmonare, ai tipici dimorfismi facciali e a deformità toraciche ha indirizzato verso il sospetto diagnostico di S. di Noonan, confermato da esame molecolare: presenza della mutazione p.G503R allo stato eterozigote nell'esone 13 del gene PTPN11.

Il caso sottolinea l'importanza dell'analisi accurata dei segni clinici, del percorso diagnostico-clinico completo e ragionato, per una specifica indagine molecolare. Infatti solo grazie al sospetto diagnostico si è potuto effettuare l'indagine molecolare appropriata che ha permesso di avere la diagnosi, con risvolti positivi sulla prognosi della paziente, evitando accanimenti diagnostici inappropriati.

NUOVA MUTAZIONE NEL GENE NIPBL, RESPONSABILE DELLA SINDROME CORNELIA DE LANGE

C. Piscopo¹, M. Petrillo¹, D. Tarantino¹, A. Colucci¹, G. Cerbone¹, C. Rosania¹, A. Barbaruolo¹, A. Di Blasio², S. Russo², A. Police³, M. Ventruto³, M.G. D'Avanzo¹

¹*U.O.C. Genetica Medica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

²*Laboratorio di Analisi, Sezione Biologia Molecolare, Istituto Auxologico Italiano, Milano*

³*U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

La sindrome di Cornelia de Lange è caratterizzata da peculiari caratteristiche facciali, ritardo di crescita, irsutismo e difetti in riduzione degli arti superiori. Molti individui dimostrano un comportamento autistico, tendenze autodistruttive. Possono presentarsi anomalie gastrointestinali, genitourinarie, problemi oculari .

Descriviamo il caso di A.L. di 1 anno e 10 mesi, giunta alla nostra osservazione per iposomia e segni dismorfici. Nata a termine da parto eutocico, P. 2600 g, L. 47 cm, CFC 30,5, Apgar 8-9.

Fenotipo: facies con fronte bassa, naso con sella infossata e narici anteverse, palato ogivale, sinofrio, attaccatura bassa dei capelli, ipertricosi al dorso, agli arti superiori ed inferiori. Linea unica palmare a sinistra. Iposomia. Pianto flebile. Scarso incremento ponderale. Comportamento tranquillo in braccio alla madre, la bimba sorride se intervistata. Linguaggio alla fase di lallazione. Non convulsioni. Sospetta ipoacusia. Timpanogramma piatto bilateralmente.

Rx mano e polso: età ossea di un anno.

Eco addome: il rene dx, di normale morfovolumetria, evidenza al III medio area solida iperecogena ovalare a margini regolari, debordante lievemente dal profilo (cm 2,7 per 2,2 circa).

Eco cardio: turbolenza a livello del ramo sx dell'arteria polmonare (grad.max di 16 mmhg) senza significato emodinamico.

Visita NPI: nella norma. Linguaggio: riferito 2-3 parole a significato. Esame psichico: angoscia da separazione. Difficoltà a fidarsi.

Esame molecolare: presenza di una sostituzione nucleotidica c.4920 G>A nel gene NIPBL de novo, che non determina alcuna variazione aminoacidica sulla proteina, ma che è stato dimostrato alterare lo splicing del trascritto. Tale mutazione, non descritta in letteratura, conferma dunque la diagnosi di Sindrome di Cornelia de Lange.

LA "PAZIENZA DI GIOBBE" IN UN SOGGETTO KLINEFELTER

C. Piscopo¹, A. Carpenito², M. Petrillo¹, G. Cerbone¹, A. Colucci¹, C. Rosania¹, I. Di Maggio¹, A. Barbaruolo¹, A. Police³, A. Pedicini³, R. Iandoli⁴, M.G. D'Avanzo¹

¹U.O.C. Genetica Medica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino

²Endocrinologia e Malattie del Ricambio, Università G.D'Annunzio, Chieti Pescara

³U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino

⁴U.O.C. Dermatologia e Dermochirurgia, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino

Presentiamo il caso di D.C. di anni 34 affetto da Sindrome di Klinefelter e prurito intenso che si accentua con il calore, il sole, presenza di sudore che peggiora in seguito a bagno o doccia. In inverno lamenta astenia. Vengono riferiti frequenti ascessi. Durante il DH genetico ha eseguito:

TC torace: sui campi polmonari superiori, specie a snx, visibilità di qualche bronchiectasia cilindrica che sono appena più numerose sui segmenti basali dei lobi inferiori ove si apprezzano anche iniziali segni di oligoemia con air trapping.

Eco addome completo: Fegato di dimensioni aumentate ad ecostruttura steatosica. A destra cisti biliari del diametro di 7 e 5 mm. Prostata a struttura disomogenea per ipoecogenicità del lobo medio con calcificazione periuretrale del diametro di 14mm.

Esami ematochimici: nella norma (eosinofili 11%)

IgE totali: 1902 U/ml (a successivi controlli persistenza di valori elevati)

Anticorpi anti-Gliadina (IgE-IgG): elevati (è esclusa la Malattia celiaca sia dalla biopsia digiunale che da EMA e TTG nella norma). E' in corso l'indagine molecolare per la predisposizione al Morbo Celiaco.

RAST: positività per Dermatophagoides pteronysinus e Dermatophagoides farinae

Ecocardiogramma ed ecodoppler: nella norma.

La presenza di elevati livelli di IgE nel siero, ascessi cutanei ricorrenti da stafilococco e polmonite ricorrenti ha fatto pensare alla Sindrome di Job o Sindrome da iper-IgE autosomica dominante. La diagnosi differenziale di questa sindrome si pone con la fibrosi cistica, la granulomatosi cronica, la dermatite atopica grave e l'infezione da HIV, escluse dai relativi esami. Il sequenziamento del gene STAT3, le cui mutazioni sono causa di malattia nel 70% dei casi, è in programma nei successivi accessi del DH genetico.

SINDROME DI EDWARDS IN SOGGETTO DI CIRCA 8 ANNI

C. Piscopo¹, I. Di Maggio¹, M. Petrillo¹, D. Tarantino¹, A. Colucci¹, G. Cerbone¹, A. Barbaruolo¹, M. Pensa², C. Petruzzello², A. Police³, L. Cuomo³, M.G. D'Avanzo¹

¹*U.O.C. Genetica Medica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

²*U.O.C. Oculistica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

³*U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

A.C., 7anni/8mesi, giunge alla nostra osservazione per Trisomia 18. Secondogenita di genitori non consanguinei di giovane età, nata da gravidanza normocondotta, T.C. d'emergenza, P 1830gr, L 42cm, CFC 32cm, Apgar 1':1/5':6. Alla nascita grave depressione cardiorespiratoria, cardiomiopatia ipertrofica non ostruttiva, rianimazione con intubazione. Nel I anno di vita rientrato quasi totalmente il quadro cardiaco, nel II anno nessun particolare sintomo o problema. Nei primi 2 anni frequenti infezioni vie aeree sup. Fenotipo: facies con sopracciglio ad arco, sinofrio accennato, microcefalia grave, fronte ampia con bozze frontali ed aspetto torricefalico, naso aquilino, disodontiasi, rima buccale stretta. Ipotrofia muscolare, forte ipotonia. Orecchie ad impianto basso. Torace carenato. Clinodattilia del V dito bilaterale, aspetto ad uncino, seppure non marcato, delle mani. Protusione calcaneare con aspetto a barca dei piedi. Distrofia ungueale bilaterale dei piedi. Microsomia.

Cariotipo: 47,XX, +18

Visita gastroenterologica: paziente senza reflussi, sporadici colpi di tosse, no rigurgiti. Riferita difficoltà nella nutrizione, alvo aperto ai gas.

Visita dermatologica: Xerosis cutis diffuso. Visita ORL: timpanogramma piatto. Visita oculistica: cheratopatia da esposizione OD>OS. Visita ortopedica: severo dismorfismo scoliotico. Ecocardiografia: aneurisma del setto interatriale in assenza di shunt. EEG: attività bioelettrica encefalica diffusamente instabile e disregolata, caratterizzata prevalentemente da ritmo theta, priva di anomalie focali e/o a potenzialità critica.

Ambiente familiare molto caloroso e accogliente; la mamma comprensiva e affettuosa, vive quasi in simbiosi con la piccola, pur non trascurando gli altri 3 figli.

La trisomia 18 è caratterizzata dalla presenza di un cromosoma 18 in sovrannumero associata a ritardo della crescita, dolicocefalia, facies caratteristica, anomalie degli arti e malformazioni viscerali. L'incidenza è stimata in circa 1/600-1/8000 nati. Oltre il 95% degli affetti muore in utero, il 90% muore nel primo anno di vita. Per motivi non noti, il tasso di sopravvivenza è > nelle femmine. Sono stati descritti soggetti sopravvissuti (anche in età adulta) in presenza di trisomia a mosaico o trisomia parziale. Nel nostro caso la trisomia è completa.

NUOVA MUTAZIONE NEL GENE COMP RESPONSABILE DELLA DISPLASIA EPIFISARIA MULTIPLA

C. Piscopo¹, M. Petrillo¹, D. Tarantino¹, I. Di Maggio¹, A. Colucci¹, G. Cerbone¹, C. Rosania¹, A. Barbaruolo¹, M. Baffico², D. Coviello², R. Iandoli³, M.G. D'Avanzo¹

¹*U.O.C. Genetica Medica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

²*S.C. Laboratorio di Genetica, Dipartimento Scienze Genetiche Perinatali e Ginecologiche, EO Ospedali Galliera, Genova*

³*U.O.C. Dermatologia e Dermochirurgia, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

Presentiamo il caso M.D.P., giunta alla nostra osservazione per gravissima coxartrosi e gonalgia bilaterali. Riferisce analogo quadro clinico nella madre, in un fratello ed in una sorella.

Visita genetica: peso Kg.53,H cm 151,CFC cm 52.Facies non caratteristica. Andatura incerta e claudicante. Lamenta dolenzia coxo-femorale accentuata nella deambulazione prolungata.

Visita ortopedica ed esami radiografici del bacino: coxartrosi bilaterale con grossolani speroni osteofitosici, a dx tendenza all'appiattimento della testa femorale, a sin. aspetti coxoartrici.

Consulenza neurologica: Andatura oscillante per patologia articolare in sede coxo-femorale. Emmetria alla prova indice-naso. Riflessi osteotendinei presenti ed ipoelicitabili, ubiquitariamente.

Quadro clinico e gli esami radiografici ci hanno fatto porre il sospetto di "Displasia Epifisaria Multipla".

L'esame molecolare nel soggetto esaminato ha evidenziato la mutazione p.Phe577Val, allo stato eterozigote nel gene COMP. La mutazione non risulta ad oggi descritta in letteratura; si ritiene che correli con la patologia in esame, in quanto localizzata in un dominio funzionale C-terminale importante per l'attività della proteina, nel quale sono già state individuate altre mutazioni causa di Displasia Epifisaria Multipla o Pseudoacondroplasia.

Conclusioni: L'assenza di grave bassa statura ha fatto orientare verso la diagnosi di Displasia Epifisaria Multipla Dominante (EDM1), caratterizzata da anomalie delle epifisi, che causano dolore articolare precoce, osteocondriti ricorrenti e artrosi precoce. La displasia epifisaria multipla 1 è la forma meglio definita clinicamente ed è caratterizzata all'esordio da andatura ondeggiante, dolore e moderata bassa statura. La complicazione maggiore è l'artrosi precoce dell'anca. La EDM1 è trasmessa come carattere autosomico dominante ed è causata dalle mutazioni nel gene (COMP; 19p13.1), che codifica per la proteina oligomerica della matrice cartilaginea.

Sono in corso le indagini molecolari nei familiari del soggetto affetto.

MICRODUPLICAZIONE E MICRODELEZIONE 17p11.2: TRATTI DEL FENOTIPO SIMILI

C. Piscopo¹, M. Petrillo¹, I. Di Maggio¹, A. Colucci¹, G. Cerbone¹, A. Barbaruolo¹, A. Novelli², V. Alesi², G. Barrano², M. Pensa³, G. Inserra³, M.G. D'Avanzo¹

¹*U.O.C. Genetica Medica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

²*Unità di Genetica Medica, Ospedale San Pietro Fatebenefratelli, Roma*

³*U.O.C. Oculistica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

La paziente è venuta presso il nostro DH per disturbi dello spettro autistico e piccoli segni dismorfici al volto. In ambito ospedaliero è stato effettuato cariotipo, nella norma, e alla dimissione la diagnosi è di sofferenza alla nascita per parto distocico.

Presso il nostro DH ha effettuato:

Visita genetica: fenotipo con trigonocefalia da precoce saldatura della sutura metopica, epicanto, filtro corto, ipoplasia mandibolare. Lieve ritardo psicomotorio. Non ha mai presentato convulsioni, se si escludono alcune convulsioni febbrili nei primi anni.

Visita comportamentale: linguaggio non adeguato all'età, ma aggancia lo sguardo. Carattere piuttosto timido ed introverso.

Rx colonna: lieve atteggiamento scoliotico dorso-lombare dx convesso.

Rx torace per coste: nella norma.

ECG: nella norma.

Eco fegato, vie biliari, pancreas e milza: nella norma.

Eco rene e vie urinarie: nella norma.

EEG: nella norma.

Si è sospettata una Sindrome di Smith-Magenis per la facies a cherubino nel primo anno di vita, il labbro superiore ad arco di cupido, mani e piedi piccoli. Pertanto si è proceduto allo studio molecolare del cromosoma 17.

L'indagine molecolare ha evidenziato una microduplicazione sul braccio corto del cromosoma 17 (17p11.2)

La diagnosi, pertanto, è stata di Sindrome di Potocki-Lupski in cui si ha, appunto, una duplicazione nella stessa zona, che invece, se deleta, determina la Sindrome di Smith-Magenis.

La diagnosi molecolare è compatibile con il fenotipo della piccola che presenta infatti solo un lieve ritardo psicomotorio ed atteggiamenti autistici.

Il caso potrebbe essere interessante sia perché evidenzia come in genetica clinica è molto importante la diagnosi differenziale, sia perché evidenzia come la duplicazione e la delezione della stessa zona genomica possa avere comunque tratti fenotipici comuni.

La descrizione della facies della nostra paziente nel I anno di vita ricorda molto la facies della Smith- Magenis.

TERAPIA E PRESA IN CARICO DEL PAZIENTE CON SINDROME DI EHLERS-DANLOS

C. Piscopo¹, M. Petrillo¹, D. Tarantino¹, A. Colucci¹, G. Cerbone¹, C. Rosania¹, I. Di Maggio¹, A. Barbaruolo¹, A. Rega², A. Laporta², E. De Simone³, M.G. D'Avanzo¹

¹*U.O.C. Genetica Medica, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

²*U.O.C. Ortopedia e Traumatologia, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

³*U.O.C. Fisiopatologia del Dolore e Cure Palliative, A.O.R.N. San G.Moscati, Avellino*

La sig.ra A.C. è affetta da ED tipo ipermobile ex EDSIII. La qualità di vita della paziente, dopo aver avuto la diagnosi, non era migliorata, anzi addirittura peggiorata. E' giunta alla nostra osservazione in uno stato di totale sfiducia e rassegnazione. Nel campo delle malattie genetiche rare è sì importante e necessario effettuare la diagnosi, ma rimane, purtroppo spesso, il solo obiettivo che si pone il genetista clinico. Il genetista medico deve prendersi in carico il paziente e cercare di rendere la qualità di vita la più soddisfacente possibile, solo in questo modo il vero obiettivo sarà raggiunto.

Nella EDS non si può non considerare il DOLORE quale aspetto più grave e più dannoso per i pazienti, anche il "riposo notturno" richiede attenzione e soluzione. L'obiettivo che noi, pertanto, ci siamo posti è la presa in carico terapeutica per "curare" e prevenire il dolore, compensare le disfunzioni dell'apparato digerente e respiratorio.

Si è consigliato alla paziente un materasso antidecubito di classe II con un cuscino antiulcera di classe II. L'ortopedico di fiducia della nostra Azienda ha consigliato dei plantari speciali e dei tutori di riposo del polso e delle dita per la notte. Il primario della Fisiopatologia del dolore della nostra Azienda, che fa parte dell'equipe multidisciplinare a disposizione dei nostri pazienti, ha consigliato dei farmaci per alleviare il dolore, evitando analgesici che possono avere effetti collaterali sull'intestino e vescica, ma soprattutto sullo stato di vigilanza, già precario poiché questi pazienti si sentono stanchi ed affaticati.

La EDS è un'entità clinica e genetica abbastanza sconosciuta ed orfana di un medico competente. Spesso i pazienti sono accompagnati da sofferenze ed umiliazioni quando i dolori e le difficoltà funzionali vengono attribuiti a disturbi della psiche. La paziente viene seguita annualmente nel nostro DH servendosi, come già detto, di specialisti di altre branche che lavorano in sinergia con noi ed il buon risultato che abbiamo notato ci ha ripagato di tutti gli sforzi e la pazienza che noi tutti (medici, infermieri, operatori sociali) abbiamo profuso. Vedere sul volto della nostra paziente il sorriso e soprattutto la fiducia nei medici, è impagabile.

MCKUSICK-KAUFMAN OR BARDET-BIEDL SYNDROME? A NEW BORDERLINE CASE IN AN ITALIAN NONCONSAnguINEOUS HEALTHY FAMILY

M. Chetta¹, V. Bafunno², B. Nenad³

¹*Università degli Studi di Milano, Milano*

²*Università degli Studi di Foggia, Foggia*

³*Ospedali Riuniti di Foggia, Foggia*

McKusick-Kaufman syndrome (MKS, OMIM #236700) is a rare syndrome inherited in an autosomal recessive pattern with a phenotypic triad comprising hydrometrocolpos (HMC), postaxial polydactyly (PAP), and congenital cardiac disease (CHD). The syndrome is caused by mutations in the MKKS gene mapped onto chromosome 20p12 between D20S162 and D20S894 markers. Mutations in the same gene causes Bardet-Biedl-6 syndrome (BBS-6, OMIM #209900) inherited in an autosomal recessive pattern. BBS-6 comprises retinitis pigmentosa, polydactyly, obesity, mental retardation, renal and genital anomalies. HMC, CHD, and PAP defects can also occur in BBS-6, and there is a significant clinical overlap between MKS and BBS-6 in childhood. We describe a new borderline case of MKS and BBS syndrome and suggest insights for understanding correlation between MKKS gene mutations and clinical phenotype. Here, we report the results of molecular analysis of MKKS in a female proband born in an Italian nonconsanguineous healthy family that presents HMC and PAP. The mutational screening revealed the presence of two different heterozygous missense variants (p.242A>S in exon 3, p.339 I>V in exon 4) in the MKKS gene, and a nucleotide variation in 5'UTR region in exon 2 (-417 A>C).

Analisi inter-popolazionistica delle differenze farmacogenomiche nella risposta ai farmaci antipertensivi

R. Polimanti¹, A. Iorio², S. Piacentini¹, D. Manfellotto², M. Fuciarelli¹

¹*Dip. di Biologia, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Roma*

²*Centro di Fisiopatologia Clinica, AFaR - Osp. "San Giovanni Calibita" Fatebenefratelli, Isola Tiberina, Roma*

L'ipertensione arteriosa è un importante fattore di rischio per molte malattie cardio-vascolari e la terapia farmacologica rimane lo strumento principale per contrastarla. Tuttavia solo il 35% dei pazienti sottoposti a terapia ha un controllo ottimale della pressione arteriosa, suggerendo che gli attuali trial clinici e le strategie farmacologiche non sono in grado di identificare terapie ottimali per ogni paziente. Questa lacuna potrebbe essere dovuta alla presenza di differenze farmacogenomiche nella popolazione degli ipertesi e, in particolare, la variabilità genetica tra le popolazioni umane potrebbe incidere su queste differenze.

L'obiettivo di questo studio è stato analizzare la variabilità delle popolazioni umane in tutti i geni attualmente associati con la risposta ai farmaci antipertensivi, valutando l'impatto funzionale delle singole varianti e degli aplotipi presenti nei diversi gruppi etnici.

Dopo un'analisi della letteratura, sono stati individuati 66 geni associati ai meccanismi di risposta dei farmaci antipertensivi. Successivamente, è stata effettuata un'analisi delle differenze inter-popolazionistiche utilizzando i dati dello Human Genome Diversity Project e del progetto 1000 Genomes. Utilizzando diversi programmi di predizione funzionale, sono state identificate le differenze funzionali presenti nei diversi gruppi umani

L'analisi della variabilità genetica ha evidenziato significative differenze inter-popolazionistiche nei geni associati con la risposta ai farmaci antipertensivi. Considerando le classi farmacologiche (ACE inibitori, Beta-bloccanti, Calcio antagonisti, Diuretici tiazidici), sono state individuate le specifiche differenze inter-popolazionistiche presenti nei pathway metabolici dei diversi farmaci. I risultati ottenuti hanno mostrato come specifici gruppi etnici siano potenzialmente predisposti ad avere una risposta significativamente diversa ad un determinato trattamento farmacologico.

In conclusione, il presente studio ha fornito un'attenta analisi delle conoscenze farmacogenomiche relative ai farmaci antipertensivi, mettendo in luce aspetti che potrebbero fortemente influire in futuro sulla scelta delle strategie farmacologiche.

EVOLUZIONE DELLA DIAGNOSTICA DI BETA TALASSEMIA ED EMOGLOBINOPATIE A FRONTE DI UNA DOMANDA SEMPRE PIU' DIVERSIFICATA

A. Venturoli¹, B. Dolcini¹, M. Taddei Masieri¹, C. Trabanelli¹, M. Fabris¹, P. Rimessi¹, F. Gualandi¹, A. Ferlini¹, A. Ravani¹
¹*Unità Operativa di Genetica Medica, Azienda Ospedaliero-Universitaria - Università degli Studi, Ferrara*

Le emoglobinopatie costituiscono un problema sanitario importante, non solo per le regioni a diffusione endemica, ma a livello universale, a causa dell'ampio fenomeno migratorio.

In Italia le aree a maggior frequenza di emoglobinopatie sono il Delta padano, le regioni meridionali e le isole maggiori, mentre i flussi migratori recanti tali patologie provengono principalmente dal continente africano, dall'Asia e dall'Est Europa. Il Centro della Microcitemia di Ferrara, confluito nel 1995 nell'Istituto di Genetica Medica, ha effettuato diagnostica molecolare delle emoglobinopatie a partire dal 1985, con diagnosi indiretta (analisi di RFLP intragenici). Venne poi introdotta la ricerca diretta del difetto genetico e nel corso degli anni sono state usate varie metodiche (ASO, ARMS, RDB). Attualmente la diagnostica è basata sul sequenziamento diretto del gene beta globinico. Dal 1989 al 2011 sono stati tipizzati 4762 portatori di beta talassemia. Vengono riportati i dati relativi all'origine dei soggetti analizzati nel corso di oltre 20 anni di attività: 27% di originari del Delta padano, 21% di immigrati e restante 52% provenienti dalle regioni meridionali d'Italia e isole. Per quanto riguarda le mutazioni identificate, come atteso, la distribuzione differisce a seconda della provenienza.

Nel Delta padano le due mutazioni più comuni, Beta^ocod.39 e Beta+IVS1-110, costituiscono il 90% degli alleli mutati, mentre nelle regioni meridionali rappresentano il 60%. Infatti per raggiungere il 90% di detection rate in questo caso è necessario un pannello di 7 mutazioni; in ordine di frequenza: Beta^ocod.39, Beta+IVS1-110, Beta+IVS1-6, Beta^oIVS1-1, Beta+IVS2-745, Beta^oIVS2-1,

HbS.

Tra gli immigrati la HbS risulta la mutazione più frequente, seguita dalla HbC (entrambe tipicamente africane). E' frequente anche la HbE negli originari delle regioni sud-est asiatiche, a rispecchiare l'andamento del flusso migratorio. Notevole l'eterogeneità delle mutazioni meno rappresentate, soprattutto per il Sud Italia e gli immigrati. Ciò supporta ampiamente la scelta di effettuare diagnosi mediante sequenziamento diretto dell'intero gene, garantendo sempre, insieme ad una adeguata analisi quantitativa (MLPA) del cluster beta globinico, una risposta al quesito diagnostico.

VALIDATION OF MICROARRAY DATA IN HUMAN LYMPHOBLASTS SHOWS A ROLE OF THE UBIQUITIN-PROTEASOME SYSTEM AND NF- κ B IN THE PATHOGENESIS OF DOWN SYNDROME

B. Granese¹, I. Scala¹, A. Valentino¹, M. Coletta¹, S. Ascione¹, G. Montefusco¹, P. De Luca², G. Andria¹

¹*Dept. of Pediatrics, Federico II University, Naples, Italy*

²*Stazione Zoologica "A. Dohrn" c/o BioGeM, Via Camporeale, Ariano Irpino, Italy*

Down syndrome (DS) (MIM 190685) is a complex disorder caused by the trisomy of either the entire, or a critical region of chromosome 21 (21q22.1-22.3). Despite representing the first genetic cause of mental retardation, the molecular bases of the syndrome are still largely unknown.

To better understand the pathogenesis of DS, we analyzed the genome-wide transcription profiles of lymphoblastoid cell lines (LCLs) from six DS and six euploid individuals and investigated differential gene expression and pathway deregulation associated with trisomy 21. Connectivity map and PASS-assisted exploration were used to identify compounds whose molecular signatures counteract those of DS and to predict their therapeutic potential. An experimental validation in DS LCLs and fetal fibroblasts was performed for the most deregulated GO categories, i.e. the Ubiquitin mediated proteolysis and the NF- κ B cascade, to confirm their imbalance in DS.

We provide evidence, for the first time, that the level of protein ubiquitination is reduced in human DS cell lines and that proteasome activity is increased in both basal conditions and oxidative microenvironment. We also show that NF- κ B transcription levels, a paradigm of gene expression control by ubiquitin-mediated degradation, is impaired in DS due to reduced I κ B- α ubiquitination, increased NF- κ B inhibitor (I κ B- α) and reduced p65 nuclear fraction. Finally, the DSCR1/DYRK1A/NFAT genes, linked to the pathogenesis of DS in animal studies, were analysed. In human DS LCLs, we confirmed the presence of increased protein levels of DSCR1 and DYRK1A, and showed that the levels of the transcription factor NFATc2 were decreased in DS along with a reduction of its nuclear translocation upon induction of calcium fluxes. In conclusion, the present work offers new perspectives to better understand the pathogenesis of DS and suggests a rationale for innovative approaches to treat some pathological conditions associated to DS.

LA TRISOMIA DEL CROMOSOMA 21 ALTERA LA FUNZIONE MITOCONDRIALE IN FIBROBLASTI DA FETI CON LA SINDROME DI DOWN

A. Izzo¹, C. Piccoli², R. Scrima², F. Bonfiglio¹, R. Manco¹, G. Quarato², O. Cela², M. Prisco³, R. Cicatiello¹, A. Conti¹, N. Capitano², L. Nitsch¹

¹*Dip. di Biologia e Patologia Cellulare e molecolare, Università di Napoli Federico II*

²*Dip. di Scienze Biomediche, Università di Foggia*

³*Dip. di Scienze Biologiche, Università di Napoli Federico I*

Il fenotipo della Sindrome di Down (DS) è determinato dalla sovra-espressione dei geni del cromosoma 21 (Hsa21) anche se non è noto quali e quanti geni siano responsabili di specifici tratti fenotipici. Una disfunzione mitocondriale descritta in modelli murini e in soggetti con la DS potrebbe contribuire ad alcuni aspetti del fenotipo, incluso il difetto cardiaco, che si verifica nel 50% dei pazienti con DS. Non essendo note le basi molecolari della disfunzione mitocondriale a livello trascrizionale, abbiamo correlato il fenotipo mitocondriale di fibroblasti ottenuti da feti trisomici per Hsa21, con e senza difetti cardiaci, all'espressione di geni che mappano sul cromosoma 21 e di geni coinvolti nella funzione mitocondriale. Oltre alla globale upregolazione dei geni del Hsa21, abbiamo osservato nei fibroblasti trisomici, la downregolazione di 3 geni che svolgono un ruolo chiave nella biogenesi mitocondriale: PGC-1 α , il suo attivatore trascrizionale NRF1 e la proteina della membrana mitocondriale interna IMMT. Alla disregolazione genica era associata una riduzione dell'attività respiratoria dei mitocondri, un'aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno e un incremento dei livelli di calcio intramitocondriale, specialmente nei fibroblasti provenienti da feti con difetto cardiaco. La microscopia elettronica ha rivelato inoltre anomalie della morfologia dei mitocondri nei fibroblasti trisomici, in particolare nell'organizzazione delle creste in tutti i fibroblasti trisomici.

L'ipotesi che stiamo valutando è che alcuni geni chiave del cromosoma 21 giochino un ruolo patogenetico diretto nelle alterazioni mitocondriali della DS, esercitando, per effetto primario del dosaggio, un'azione sinergica inibitoria sull'espressione di PGC-1 α . Questi eventi possono indurre alterazioni della biogenesi e della funzione mitocondriale mediante la downregolazione del fattore trascrizionale NRF1.

La conoscenza dei meccanismi patogenetici della disfunzione mitocondriale nella DS potrebbe avere interessanti implicazioni terapeutiche. Sono infatti disponibili farmaci attivatori di PGC-1 α , la cui somministrazione in feti/pazienti trisomici per Hsa21 potrebbe contrastare le alterazioni mitocondriali attenuando alcuni aspetti del fenotipo patologico.

MUTATION OF PLASMA MEMBRANE Ca²⁺ ATPASE ISOFORM 3 IN A FAMILY WITH X-LINKED CONGENITAL ATAXIA IMPAIRING Ca²⁺ HOMEOSTASIS

G. Zanni¹, T. Cali², K. Vera³, D. Ottolini⁴, S. Barresi¹, N. Lebrun⁵, L. Montecchi-Palazzi⁶, H. Hao³, J. Chelly⁵, E. Bertini¹, M. Brini², E. Carafoli¹

¹*Unità di Malattie Neuromuscolari e Neurodegenerative, Laboratorio di Medicina Molecolare. Dipartimento di Neuroscienze IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù*

²*Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università di Padova*

³*Max Planck Institute for Molecular Genetics, Department of Human Molecular Genetics, Berlin, Germany*

⁴*Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Padova*

⁵*Department of Genetic and Development, Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS/UMR 8104, Paris, France*

⁶*European Bioinformatics Institute (EBI), Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK*

⁷*Istituto Veneto di Medicina Molecolare, Padova*

Congenital ataxias (CAs) account for about 10% of nonprogressive infantile encephalopathies. They are characterized by severe neonatal hypotonia and motor delay, followed by cerebellar ataxia in the first years of life. They are generally classified into pure cerebellar and syndromic forms, and their inheritance can be autosomal recessive, autosomal dominant or X-linked recessive. Using X-exome sequencing we have identified a missense mutation (G1107D) in the CaM-binding domain of isoform 3 of the PMCAs in a family with congenital cerebellar atrophy and normal cognitive development. PMCA3 is highly expressed in the cerebellum, particularly in the presynaptic terminals of parallel fibers–Purkinje neurons. To study the effects of the mutation on Ca²⁺ extrusion by the pump, model cells (HeLa) were cotransfected with expression plasmids encoding its mutant or wild-type (wt) variants and with the Ca²⁺-sensing probe aequorin. The mutation reduced the ability of the PMCA3 pump to control the cellular homeostasis of Ca²⁺. The genetic defect in PMCA3 described here extends the disease phenotypes caused by calcium dysregulation to the area of congenital non progressive cerebellar ataxias.

VERSO UN QUADRO FENOTIPICO FETALE ASSOCIATO ALLA SINDROME DA TETRASOMIA 9P

R. Cicatiello¹, R. Genesio¹, V. Galliero¹, A. Izzo¹, P. Tedeschi¹, L. Casciello¹, A. Del Gaudio¹, G. Sglavo², G. Pastore², D. Paladini², A. Conti¹, L. Nitsch¹

¹*Dip. di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, Università di Napoli Federico II*

²*Dip. di Ostetricia e Ginecologia, Università di Napoli Federico II*

La tetrasomia 9p è un'alterazione rara di cui sono stati descritti fino ad oggi circa 30 casi, di cui 20 in diagnostica prenatale. La valutazione del fenotipo con strumenti ecografici sempre più perfezionati sta delineando un quadro malformativo specifico che potrebbe permettere di formulare un sospetto diagnostico fin dal I trimestre di gravidanza.

Descriviamo qui il caso di una donna di 34 anni, alla 21a settimana di gravidanza, per la quale è stata richiesta diagnostica citogenetica per un grave quadro malformativo fetale che comprendeva: alterazioni del verme cerebellare, assenza dell'osso nasale, malformazioni cardiache, iperecogenicità renale e piede torto. L'analisi del cariotipo ha rivelato la presenza omogenea di un marker sovranumerario asimmetrico, caratterizzato come isocromosoma 9p. Dato l'elevato rischio prognostico, la madre ha optato per un aborto terapeutico.

Dal confronto del nostro con i casi precedentemente riportati si conferma un'associazione importante della tetrasomia 9p con le anomalie del verme cerebellare, riportate anche in casi di trisomia parziale 9p. Risultano anche significativamente rappresentate anomalie cardiache, anomalie renali, anomalie degli arti e dismorfismi faciali, come l'assenza dell'osso nasale. Tutti questi segni, presenti in più del 50% dei casi descritti, delineano un fenotipo fetale specifico della sindrome da tetrasomia 9p, che, nel I trimestre di gravidanza, può essere caratterizzato da un aumento della translucenza nucale, presumibilmente legato alle anomalie cardiache, e dalla assenza dell'osso nasale.

La morfologia simmetrica del marker, in questo caso, depone per un meccanismo di formazione che comporti un 'U-type exchange' fra bracci di cromosomi omologhi, accompagnato da una non disgiunzione. Il cariotipo parentale non presentava anomalie, pertanto la consulenza genetica ha suggerito un rischio di ricorrenza molto basso.

Caratterizzazione clinica, patologica e molecolare di una popolazione di giovani donne affette da tumore della mammella sottoposte al test BRCA.

C.B. Ripamonti¹, M. Zuradelli¹, M. Autuori¹, R. Torrisi¹, G. Masci¹, V. Basilico², C. Tinetti³, A. Testori⁴, L. Di Tommaso⁵, L. Bernard⁶, P. Radice⁷, A. Santoro¹

¹Dip. di Oncologia Medica ed Ematologia, Humanitas Cancer Center, Rozzano (Mi), Italia

²Dip. di Oncologia Medica, Humanitas Mater Domini, Castellanza (VA), Italia

³Unità di Senologia, Humanitas Cancer Center, Rozzano (Mi), Italia

⁴Dip. di Chirurgia Toracica, Humanitas Cancer Center, Rozzano (Mi), Italia

⁵Dip. di Anatomia Patologica, Humanitas Cancer Center, Rozzano (Mi), Italia

⁶Dip. di Oncologia Sperimentale, Istituto Europeo di Oncologia e Consortium for Genomics Technology (Cogentech), Milano, Italia

⁷Dip. di medicina Predittiva e per la Prevenzione, UO basi molecolari, rischio genetico e test genetici, IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori e FIRC Institute of Molecular Oncology Foundation (IFOM), Milano, Italia

Premessa: in Italia il 36% dei tumori nelle donne sotto i 44 anni è mammario. I tumori ereditari della mammella costituiscono il 10% dei tumori mammari e nel 30% dei casi si riscontra una mutazione in BRCA1/BRCA2. Nelle donne con predisposizione genetica la diagnosi di tumore mammario è frequentemente associata alla giovane età e/o alla presenza nella famiglia di parenti affetti da tumore mammario e/o ovarico. Scopo: caratterizzare dal punto di vista clinico, patologico e genetico le pazienti affette da tumore mammario prima dei 41 anni sottoposte a test BRCA, indipendentemente dalla familiarità. Materiali e metodi: sono stati rivisti i dati clinici e patologici delle 192 pazienti sottoposte a test BRCA (luglio 2008-gennaio 2012). L'analisi genetica è stata eseguita con sequenziamento degli esoni codificanti e delle giunzioni introne/esone e MLPA. Risultati: 80 donne (età media 36 anni, range 22-40) sono state incluse nello studio. Dei 75 referti istologici disponibili, 63 (84%) sono risultati carcinomi duttali invasivi, 6 (8%) lobulari invasivi, 3 (4%) midollari, 1 duttale in situ, 2 (3%) mucinosi. Trentaquattro carcinomi su 62 (55%) sono risultati G3. I recettori di estrogeni/progesterone sono risultati positivi in 58/74 (78%) casi e in 9/55 (16%) è stato definito lo status di "triplo negativo" (TN). Il 10% delle pazienti presentava un tumore mammario controlaterale (3 prima dei 40 anni). In 16/80 (20%) pazienti sono state identificate mutazioni patogeniche (11 BRCA1-5 BRCA2), in tre casi senza familiarità. Sono state trovate 9 varianti a significato incerto (4 BRCA1-5 BRCA2). Quattro pazienti con mutazione patogenica e una con variante avevano un tumore TN. A giugno 2012, 10 pazienti (12.5%) avevano presentato ricaduta della malattia (3 decedute). La mastectomia profilattica è stata eseguita in 3/16 pazienti mutate ed in 4 non-mutate con familiarità positiva per tumore mammario. L'annessiectomia profilattica è stata eseguita in 4/16 pazienti mutate ed in una non. Conclusioni: i nostri risultati confermano l'importanza di sottoporre al test BRCA le pazienti con tumore mammario in giovane età indipendentemente dalla familiarità perché possono beneficiare di un programma di follow-up più stringente.

REDITEF (REGISTRO DINAMICO TUMORI EREDOFAMILIARI) COME STRUMENTO DI ATTIVITA' INTEGRATA CGO (AMBULATORIO CONSULENZA GENETICA ONCOLOGICA) E SCREENING MAMMOGRAFICO. NUOVE PROPOSTE

F. Adami¹, F. Carbonardi¹, G. Cavazzini¹, S. Carra⁴, E. Anghinoni³, P.P. Vescovi⁵

¹SC Oncologia, Osp. C. Poma Mantova

²SC Oncologia, Osp. C. Poma Mantova

³Dip. Prevenzione ASL Mantova

⁴Screening Mammografico, Osp. C. Poma Mantova

⁵Div. Medicina Interna, Osp. C. Poma Mantova

E' stato dimostrato da numerosi studi che lo screening mammografico ha ridotto la mortalità del tumore mammario. In Italia si seguono le linee guida Europee: viene offerta una mammografia a tutte le donne di età compresa tra i 50 ed i 69 anni. La fascia di età scelta tiene conto dei soli dati epidemiologici di maggior incidenza in queste decadi. Effetto rilevante dello screening è la rilevazione delle BBD (alterazioni benigne mammarie che in piccola percentuale evolveranno in neoplasia) e degli EBC (early breast cancer). Nel nostro Ospedale è attivo dal 2004 un ambulatorio CGO che scrina le famiglie ad aumentato rischio, su base ereditaria, di insorgenza di neoplasia mammaria/ovarica. Queste famiglie sono state inserite in un Registro Dinamico dei Tumori Eredo-Familiari (REDITEF) che è in rete con il Dipartimento di Prevenzione dei Tumori Femminili della nostra ASL. Questo Registro contiene dati generali (scheda anagrafica), un Pedigree generato dall'inserimento dei dati familiari, una scheda di calcolo di rischio che utilizza e mette a confronto diversi sistemi (Criteri Tabellari, Criteri di Modena, BRCAPRO, Gail, Klaus, Boadicea).

Il REDITEF prevede una sezione Molecolare per chi è stato testato mediante sequenziamento diretto o MPLA dei geni di predisposizione maggiore. Prevede una scheda di programmazione della sorveglianza nella quale viene specificato quali esami strumentali e visite devono essere eseguite, con quale cadenza e da quale età di inizio.

E' stato di recente stipulato accordo con la nostra ASL che prevede la consultazione diretta del REDITEF e la presa in carico di tutte le donne a rischio 50-69. A tali donne l'ASL eroga gli accertamenti previsti dal CGO in base al rischio familiare. Quindi alle donne a rischio 50-69 non sarà erogata mammografia ogni due anni ma gli accertamenti proposti dal CGO (Mammografia + eco mammaria annuale +/- RMN mammaria).

E' in fase di proposta la gestione ASL delle donne a rischio 40-49 e 70-75 y.

Attualmente le donne a rischio seguite dal nostro CGO sono 700 di queste circa 300 sono le donne 50-69 gestite dall'ASL. Annualmente verrà effettuata analisi dei costi/benefici comparata con screening tradizionale per fasce di età e di rischio.

SINDROME DI PRADER-WILLI DA TRASLOCAZIONE 5;15

P. Olivieri¹, C. Di Stefano², M. Calabrese¹, C. Langella¹, C. Mastellone¹, A. Tafuri¹, G. Fioretti³, P. Friso³, N. Nosari², M. Ingenito¹

¹*U.O.S.Lab. di Genetica Molecolare e Citogenetica, P.O. Andrea Tortora, Pagani*

²*U.O.S. TIN, P.O. Umberto I, Nocera Inferiore*

³*U.O.C. Genetica Medica A.O. Cardarelli, Napoli*

Riportiamo il caso di una neonata di 4 giorni ricoverata in terapia intensiva neonatale dell'Ospedale Umberto I di Nocera Inferiore. La paziente nata da genitori non consanguinei, presentava note dismorfiche ed ipotonia assiale. Veniva richiesto un cariotipo per escludere anomalie cromosomiche. L'esame dei cromosomi ottenuti da linfociti di sangue periferico secondo metodiche standard, evidenziava un cariotipo femminile con un cromosoma derivativo risultante da una traslocazione sbilanciata tra il braccio q di un cromosoma 15 a livello della regione 1 banda 3 e l'estremità terminale del braccio p di un cromosoma 5. Il tratto 15q11-q13 era deletato. Il cariotipo dei genitori risultava normale. Veniva effettuata FISH con le sonde Vysis D15S11 e SNRPN che evidenziava un solo segnale, conseguenza della traslocazione sbilanciata. L'utilizzo delle sonde D5S23 e D5S721 escludeva la delezione terminale submicroscopica di 5p. Le Sindromi di Prader Willi e di Angelman sono dovute alla perdita della regione critica 15q11-q13 su cromosomi di origine parentale diversa. Il test di metilazione evidenziava l'origine paterna del cromosoma traslocato. La Sindrome di Prader Willi da traslocazione sbilanciata si ritrova in circa l'1 % dei pazienti. Il fenotipo è sovrapponibile a quello da delezione classica.

La conoscenza precoce della causa genetica permette di prevedere l'evoluzione del quadro clinico dei pazienti. Soggetti con UPD materna hanno dismorfismi più sfumati rispetto a quelli con delezione, non presentano il fenomeno dello skin picking, né ipopigmentazione, ma disturbi psichici, depressione e psicosi più frequenti in età adulta.

La diagnosi precoce della Sindrome permette inoltre di anticipare la terapia multidisciplinare. La somministrazione dell'ormone GH migliora la qualità di vita dei soggetti, aumentando la velocità di crescita, migliorando la composizione della massa corporea e la funzionalità muscolare. È stata dimostrata anche una sua azione positiva sulle alterazioni della facies.

SCREENING PER LA FIBROSI CISTICA ESEGUITO CON UN NUOVO KIT BASATO SU PCR ALLELE SPECIFICA

C. Centrone¹, B. Minuti¹, S. Falconi¹, A. Mariottini¹, F. Torricelli¹

¹*SOD Diagnostica Genetica, Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze*

La Fibrosi Cistica (FC, OMIM 219700) è una malattia autosomica recessiva causata dalla presenza di mutazioni in entrambi gli alleli del gene Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR).

Sono state descritte fino ad oggi più di 1.500 mutazioni distribuite lungo tale gene e

non di tutte è certo il ruolo causale per la malattia. Tra queste la più diffusa è la DeltaF508, con una frequenza relativa variabile nelle diverse popolazioni: rappresenta infatti circa il 50% delle mutazioni nell'Europa meridionale, mentre è presente nell'80-90 % circa dei Paesi del Nord Europa.

Le altre mutazioni hanno in genere una frequenza compresa fra il 2 e il 5%, oppure sono caratteristiche di alcuni gruppi etnici.

Per tutti questi motivi non esiste al momento attuale un test genetico ideale in grado di identificare tutte le mutazioni; le tecniche utilizzate devono soddisfare criteri di sensibilità, riproducibilità e rapidità e per questo sono disponibili kit commerciali standard per l'analisi di primo livello correlati ad un grado crescente di complessità e di estensione del test genetico, a fronte di tecniche prodotte in laboratorio che non sempre soddisfano i suddetti criteri.

Il progetto si propone di analizzare mediante Devyser CF CORE kit 36 tra le mutazioni più frequenti a carico del gene CFTR e il tratto di politimidine e i TG repeats dell'introne 8.

La casistica è rappresentata da circa 5000 nati nell'anno 2011 nelle regioni Toscana e Umbria. I campioni, costituiti da sangue assorbito su Guthrie Card, sono stati analizzati in modo completamente anonimo. La tecnica utilizzata per l'analisi qualitativa delle mutazioni nel gene CFTR è Devyser CF CORE kit, basato su PCR allele specifica. L'analisi viene eseguita con due mix di amplificazione: il Devyser CF core mix1 amplifica gli alleli wild type per le 36 mutazioni comprese nel kit, mentre la mix 2 amplifica gli alleli mutanti. In aggiunta il CF core mix2 comprende l'analisi del tratto di politimidine e i TG repeats dell'introne 8 del gene CFTR. La metodica è stata ottimizzata mediante processi automatizzati capaci di garantire l'accuratezza e l'attendibilità del risultato riducendo al minimo il tempo di analisi e i costi.

CHROMOSOMAL ABNORMALITIES INDUCED BY TAMOXIFEN IN FOUR BREAST CANCER CELL LINES

S.M. RONDON LAGOS¹, L. Verdun di Cantogno¹, C. Botta¹, P. Gugliotta¹, B. Pasini¹, S. Ramírez¹, A. Sapino¹

¹*Department of Medical Sciences, University of Turin*

²*Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia*

INTRODUCTION

Currently, the best strategies for breast cancer treatment are designed to target specific markers; estrogen receptors (ER) and HER2 are examples of these markers. Tamoxifen (TAM) is one of the most frequently prescribed drug in treatment of ER+ breast cancers. Paradoxically, it has been reported that TAM possesses a high mutagenic potential. However, type and frequency of chromosome abnormalities and the mechanisms by which TAM induces chromosome instability are unknown. Additionally, cytogenetic studies about the effects of TAM at low doses, as it is suggested for treatment of pre-invasive low grade breast lesions (e.g. low grade in situ ductal carcinomas or lobular intraepithelial neoplasia) are limited.

OBJECTIVE

To determine low dose TAM effects on chromosomes, cell proliferation and its association with ER and HER2 status in MCF-7 and T47D (ER+/HER2-), BT474 (ER+/HER2+) human breast cancer cell lines. SKBR3 (ER-/HER2+) cell line was used as control.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines were treated with 1 μ M of TAM for 24h, 48h and 96h. At each time the cells were analyzed for proliferation rate (ELISA assay) and for chromosomal aberrations using conventional (G-banding) and molecular cytogenetic techniques (FISH, M-FISH) (Abbott Molecular Europe; Zeiss).

RESULTS

All cell lines treated with TAM at low dose show more rearranged karyotype than control. After treatment specific abnormalities appeared, some of these were found in more than one cell line as: del(1)(p22), del(3p13), add(8p23) and add(9p24). As expected, TAM inhibited proliferation of ER+/HER- cells. In ER+/HER2 amplified cells TAM induced rapid growth at 24h and then reduction of cell proliferation at 48h with a final rapid increase at 96h as compared to control. Finally in ER-/HER+ cells the increase of cell proliferation TAM-induced at 96h was lower, although significant.

CONCLUSIONS

Our results indicated that TAM at low dose (1 μ M) increase chromosomal aberrations on all cell lines independently of ER status. Cell growth alteration induced by TAM depends on ER and HER2 status.

I DIFFERENTI PATTERN FISH HER2/CEP17 SU NUCLEI DI CARCINOMA MAMMARIO SOTTENDONO DIVERSI RIARRANGIAMENTI DEL CROMOSOMA 17?

L. Verdun di Cantogno¹, S.M. Rondon Lagos², P. Gugliotta³, C. Botta³, A. Sapino³

¹*Dip. di Diagnostica di Laboratorio, Az. Ospedaliera Città della Salute e della Scienza di Torino*

²*Facoltà di Scienze Naturali e Matematiche, Università del Rosario, Bogotà Colombia*

³*Dip. di Scienze Mediche, Università degli Studi di Torino*

2 Rossi/2Verdi (2R/2V): questo è il pattern normale dei nuclei di cellule mammarie sottoposte a FISH per il gene HER2, marcato in Rosso, e per il centromero del cromosoma 17 (CEP17), marcato in Verde. Nelle cellule di carcinoma mammario questo pattern subisce tutti i rimaneggiamenti possibili, dalla ipodisomia del gene e/o del centromero, al graduale aumento dell'uno e/o dell'altro. Si arriva ad avere anche molto più di 10 segnali, con assetto a cluster o diffuso, di HER2 e a volte anche di CEP17. Se lo schema 2R/2V sottende la presenza di due cromosomi 17 integri, cosa sottendono le altre configurazioni?

Nel tentativo di rispondere a questa domanda, i pattern FISH HER2/CEP17 su metafasi e nuclei derivati da linee cellulari di tumore mammario sono stati analizzati; i dati ottenuti sono stati utilizzati per interpretare i pattern evidenziati su nuclei di casi di tumori mammari inclusi in paraffina. Si è visto che effettivamente la disposizione dei segnali su metafasi corrisponde su nucleo; inoltre il rapporto HER2/CEP17, sia in assenza che in presenza di amplificazione del gene, è labile: segnali HER2 sono presenti su cromosomi non der(17) come anche sono riscontrabili der(17) senza gene. L'accurata analisi dei pattern dei segnali HER2 e CEP17 ottenuti tramite FISH su sezioni incluse in paraffina di casi di tumore mammario, tratti dalla nostra routine degli ultimi 3 anni, ha permesso di identificare 13 categorie di pattern di cui: 5 sempre non amplificati, 4 potenzialmente equivoci, 4 con amplificazione di HER2.

Danno ossidativo e genotossico in soggetti con β -talassemia

E. Ferro¹, G. Visalli², R. Civa¹, M.A. La Rosa¹, G. Randazzo Papa³, B. Baluce², D.G. D'Ascola⁴, B. Piraino¹, C. Salpietro¹, A. Di Pietro²

¹*Dipartimento di Scienze Pediatriche Mediche e Chirurgiche, Policlinico Universitario di Messina*

²*Dipartimento di Igiene, Policlinico Universitario di Messina*

³*A.S.P. N.5, Messina*

⁴*U.O.C. Centro Microcitemia, Ospedale Riuniti di Reggio Calabria*

Introduzione. Nelle β -talassemie l'anemia cronica e l'ipossia tissutale aumentano l'assorbimento enterico di ferro ed alterano la funzionalità mitocondriale. La regolare terapia emotrasfusionale migliora i livelli di emoglobina ma determina emosiderosi che aumenta la produzione di specie ROS.

Obiettivi. Lo studio vuole valutare il danno ossidativo cellulare e la conseguente genotossicità in soggetti con talassemia major ed intermedia.

Materiali e Metodi. Sono stati reclutati 113 pazienti di anni 33.8 ± 9.7 (media \pm SD), afferenti ai centri di Microcitemia dell'Ospedale Riuniti di Reggio Calabria e del Policlinico Universitario di Messina. Di questi, 92 sono pazienti trasfusi ed in trattamento con terapia ferrochelante, mentre 21 sono soggetti con talassemia intermedia, occasionalmente trasfusi. Dieci soggetti sono stati arruolati come controlli sani. Il danno ossidativo cellulare è stato determinato mediante il dosaggio dei ROS endocellulari, di 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), del potenziale transmembranario mitocondriale ($\Delta\psi_m$) e della perossidazione lipidica. La genotossicità è stata determinata mediante il CBMN assay e la Comet assay.

Risultati. I dati mostrano degli aumentati livelli di ROS e idroperossidi lipidici nei pazienti talassemici rispetto ai controlli, in particolare nei soggetti non trasfusi. Questi presentano un significativo decremento del $\Delta\psi_m$ a sottolineare un deficit energetico e la sovrapproduzione di ROS a livello della catena respiratoria che caratterizzano la marcata anemia ed ipossia. I livelli di 8-oxo-dG sono aumentati nei pazienti rispetto ai controlli, ma non differiscono significativamente tra trasfusi e non. Entrambi i biomarker di genotossicità sottolineano il ruolo mutageno del sovraccarico di ferro. Gli elevati valori di %TDNA e la frequenza di micronuclei sono significativamente aumentati nei soggetti politrasfusi.

Discussioni. Il nostro studio di biomonitoraggio conferma il danno ossidativo nei soggetti con talassemia major e rileva un inaspettato danno ossidativo cellulare in quelli con talassemia intermedia. In aggiunta al sovraccarico di ferro, l'aumentata produzione mitocondriale di ROS, indotta dall'ipossia, gioca un ruolo importante nel determinare il danno ossidativo nelle β -talassemie.

RISCHIO RESIDUO DI PATOLOGIA CROMOSOMICA DOPO TEST PRENATALE NON INVASIVO (NIPT) PER LE ANEUPLOIDIE FETALI SU PLASMA MATERNO: VALUTAZIONE DA UN'ESPERIENZA DI 170.000 DIAGNOSI PRENATALI DEL PRIMO E DEL SECONDO TRIMESTRE

F.R. Grati¹, J.C.P.B. Ferreira², B. Grimi¹, K. Bajaj², F. Malvestiti¹, L. Marcato¹, S. Paganini¹, E. Gaetani¹, L. Martinoni¹, F. Maggi¹, G. Simoni¹, S. Gross³

¹*Research & Development, Cytogenetics, Molecular Cytogenetics and Molecular Biology, TOMA Advanced Biomedical Assays, S.p.A., Busto Arsizio (VA)*

²*Maternal Fetal Unit of the Obstetrics and Gynecology department, Jacobi Medical Center, New York*

³*Maternal Fetal Unit of the Obstetrics and Gynecology department, Jacobi Medical Center, New York & Albert Einstein University, New York*

Dopo decenni di ricerca con gli avanzamenti delle tecniche molecolari sono ora disponibili i test prenatali non invasivi (NIPT) per sindrome di Down su plasma materno. I pianificatori di sanità pubblica e i clinici necessitano di strumenti per valutare l'efficacia di questa tecnica nonché le conseguenze di questa nuova opzione.

Dagli studi recenti emerge come questi test non siano ancora considerabili diagnostici quanto più degli screening ad altissima sensibilità (DR media per T21: 99.1%, 97–100% al 95% CI; false-positive rate per T21: 0.3%, 0.2–0.7% al 95% CI). Gli studi di validazione clinica condotti in laboratori certificati sono incentrati principalmente sulla trisomia 21. La sindrome di Down è la patologia clinicamente più significativa associata ad anomalie cromosomiche presenti alla nascita ed è pertanto il principale interesse dei test prenatali. Tuttavia i test diagnostici invasivi attualmente in uso permettono anche di identificare un'ampia gamma di altre anomalie citogenetiche clinicamente significative nell'ambito della quale la trisomia 21 rappresenta il 30-60% di essa. Sebbene questi studi abbiano validato protocolli NIPT su gestanti ad alto rischio (con rischio aumentato dopo test di screening) attualmente si dibatte sulla possibilità di offrirli a gestanti della popolazione generale con rischio a priori definito in base all'età materna (indicazioni "età materna avanzata" e "ansietà <35anni").

Lo scopo di questo studio è di calcolare la DR dei NIPT nel contesto di una più ampia gamma di anomalie citogenetiche fetali clinicamente significative estrapolando i risultati citogenetici riferiti alle sole gestanti con indicazione "AMA" (96.000) e "ansietà" (33.500) da un'audit retrospettivo di 170.000 diagnosi prenatali citogenetiche del primo e del secondo trimestre effettuate dal laboratorio TOMA.

I risultati indicano che in gestanti <35a non vi è alcun miglioramento significativo nel tasso di rilevamento utilizzando NIPT come test di primo livello rispetto agli screening (0.42, 95%CI 0.36-0.48 vs 0.48; 95%CI 0.42-0.54; OR 1.27); per le gestanti ≥35a, l'aumento della detection rate è statisticamente significativo, anche se con un OR di 1.67 (0.66, 95%CI 0.64-0.68 vs 0.77, 95%CI 0.74-0.78).

SINDROME DELL'ERNIA DIAFRAMMATICA CONGENITA IDENTIFICATA MEDIANTE ARRAY-CGH IN UN FETO CON EDEMA E NT AUMENTATA

S. De Toffol¹, E. Craperi², L. Marcato¹, M. Lanna³, L. Garavaglia¹, C. Agrati¹, B. Grimi¹, F. Dulcetti¹, A. Ruggeri¹, F. Maggi¹, G. Simoni¹, F.R. Grati¹

¹Ricerca & Sviluppo, Citogenetica e Biologia Molecolare, TOMA Advanced Biomedical Assays SpA, Busto Arsizio, Varese

²G.B. Mangioni Hospital SpA, Lecco

³Diagnosi Prenatale e Chirurgia Fetale, Ospedale V. Buzzi, Istituti Clinici di Perfezionamento-Università degli Studi di Milano, Milano

Con il termine di ernia diaframmatica congenita (CHD) ci si riferisce ad un gruppo di difetti congeniti caratterizzati da una mancata o incompleta formazione del diaframma. La frequenza è compresa tra i 2.500/3.500 nati vivi con una mortalità elevata (#50%) dovuta principalmente ad una grave ipoplasia polmonare causata dalla risalita degli organi addominali nella cavità toracica.

La CHD può presentarsi come anomalia isolata oppure in associazione a sindromi (es. Pallister-Killian, Fryns, WAGR, Denys-Drash, Wolf-Hirschhorn) o differenti anomalie cromosomiche (es. trisomia 18, delezioni 15q24-26). La diagnosi clinica viene generalmente effettuata alla nascita anche se circa la metà dei casi possono essere identificati già in epoca prenatale, generalmente nel II trimestre di gravidanza, mediante esame ecografico in grado di rilevare anomalie nell'anatomia del torace.

Il caso descritto si riferisce ad una donna di 35 anni che esegue la diagnosi prenatale alla 11a sdg per riscontro di edema sottocutaneo generalizzato e NT di 8mm. L'esame citogenetico risulta normale (46,XX), mentre l'analisi molecolare eseguita mediante array-CGH (135K) evidenzia una delezione interstiziale de-novo di 4.2Mb nella regione 15q26.1q26.2, associata a CHD di tipo 1 (MIM%142340). Le successive ecografie e la risonanza magnetica, eseguite tra la 17a e la 21a sdg, hanno confermato la presenza di ernia diaframmatica sinistra oltre a ipoplasia del polmone destro e cardiopatia. La gestante ha deciso di non interrompere la gravidanza, tutt'ora in corso.

L'applicazione dell'array-CGH nel I trimestre di gravidanza ha permesso di evidenziare una delezione criptica associata a CHD in assenza di uno quadro clinico specifico, anticipando la diagnosi ecografica e indirizzando i successivi approfondimenti clinici che hanno confermato la correlazione tra l'anomalia genetica riscontrata e il fenotipo atteso. La diagnosi precoce di CHD in epoca prenatale può favorire una gestione clinica e psicologica più adeguata sia del resto della gravidanza che del momento del parto. Il trattamento immediato in epoca perinatale di neonati affetti da CHD in centri specializzati consente di aumentare il tasso di sopravvivenza fino al 70-90%.

CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI DERIVATE DA VILLI CORIALI AL PRIMO TRIMESTRE SONO STABILI GENETICAMENTE E APPLICABILI IN MEDICINA RIGENERATIVA

E.A. Roselli¹, S. Lazzati¹, F. Iseppon¹, M. Manganini², L. Marcato¹, L. Garavaglia¹, M. Gariboldi³, F. Maggi¹, F.R. Grati¹, G. Simoni¹

¹*TOMA Advanced Biomedical Assays S.p.A., settore Ricerca e Sviluppo, 21052 Busto Arsizio (VA), Italia*

²*Biocell Center S.p.A, Viale Stelvio 125, 21052 Busto Arsizio (VA), Italia*

³*Università dell'Insubria, Dip. di Biologia Strutturale e Funzionale (DBSF), 21052 Busto Arsizio (VA), Italia*

Questa ricerca è volta ad evidenziare la presenza di cellule con potenzialità staminale in campioni di villo coriale (VC) del primo trimestre e di verificarne la stabilità genomica per una possibile applicazione in medicina rigenerativa.

Una piccola aliquota di campioni (5 mg), in esubero rispetto la pratica diagnostica, sono stati crio-conservati in condizioni GMP. A seguito di scongelamento e disgregazione enzimatica, sono state allestite colture cellulari allo scopo di isolare ed espandere in vitro cellule staminali mesenchimali (MSC). La natura mesenchimale è stata indagata tramite analisi citofluorimetrica dell'espressione dei marcatori di staminalità mesenchimale e analisi della capacità differenziativa tramite l'utilizzo di terreni di induzione selettivi. La stabilità genomica è stata analizzata ai diversi passaggi in coltura attraverso protocolli a diverso grado di risoluzione tra cui l'analisi del cariotipo, della stabilità dei microsatelliti e oligo arrayCGH 135K per verificare l'assenza di sbilanciamenti cromosomici submicroscopici non evidenziabili citogeneticamente.

L'analisi della curva di crescita delle cellule in coltura ha evidenziato un elevato potenziale proliferativo. La caratterizzazione immunofenotipica ha evidenziato l'espressione di marcatori tipici di MSC e assenza di marcatori ematopoietici. L'analisi della capacità differenziativa ha mostrato un potenziale multilineage verso adipociti, osteociti e condrociti. L'analisi del cariotipo delle MSC espanse in vitro ha confermato una frequenza di aberrazioni cromosomiche non significativamente diversa da quella di colture primarie. Dati ottenuti da analisi CGH-array e analisi della stabilità di microsatelliti tramite confronto del DNA di colture a passaggi precoci e tardivi non ha mostrato variazioni nel numero di copie di segmenti di DNA. I nostri risultati indicano che è possibile isolare ed espandere estensivamente MSC da villi coriali e che la coltivazione in vitro non interferisce con i meccanismi di riparazione del DNA e con la stabilità del genoma. Alla luce di queste evidenze, cellule staminali mesenchimali fetali risultano essere idonee ad una utilizzazione in medicina rigenerativa.

FENOTIPO PRENATALE NELLA SINDROME DI WILLIAMS-BEUREN E NELLA SINDROME DA DUPLICAZIONE RECIPROCA

L. Marcato¹, L. Turolla², E. Pompili³, D.M. Gomes⁴, T. Popowski⁴, C. Dupont⁵, S. Bacrot⁵, S. De Toffol¹, A. Aboura⁵, E. Blondeel⁴, E. Troilo⁶, A.C. Tabet⁵, A. Delezoïde⁵, G. Bracalente⁷, D. Baldo², E. Frate², F. Maggi¹, G. Simoni¹, B. Benzacken⁵, F. Vialard⁴, F.R. Grati¹

¹*Ricerca e Sviluppo, Citogenetica e Biologia molecolare, TOMA Advanced Biomedical Assays, Busto Arsizio (VA)*

²*U.O.S. Genetica Medica, Azienda ULSS 9, Treviso*

³*UO Genetica medica, Policlinico Sant'Orsola Malpighi, Bologna & Gynepro Medical, Bologna*

⁴*Department of Cytogenetics, Fetopathology, Obstetrics and Gynaecology, CHI Poissy St Germain*

⁵*Department of Cytogenetics and Developmental Biology, Robert Debré Hospital, Paris and University Paris 7 Diderot, Paris, France*

⁶*Gynepro Medical, Bologna*

⁷*S.C. Ginecologia e Ostetricia, Ospedale di Treviso*

La sindrome di Williams-Beuren (WBS) causata dalla microdelezione in 7q11.23, è caratterizzata da disordini dello sviluppo, malformazioni cardiache (SVAS), ritardo psicomotorio, dismorfismi facciali suggestivi e profilo cognitivo e comportamentale specifico. In diagnosi prenatale non è descritto un fenotipo caratteristico correlabile alla sindrome.

La duplicazione reciproca della regione WBS presenta difficoltà espressive e di linguaggio e, in alcuni casi, anomalie comportamentali. Non sembrano essere associati dismorfismi facciali caratteristici.

Riportiamo quattro casi di WBS ed uno di duplicazione reciproca, riscontrati in epoca prenatale.

La diagnosi è stata eseguita mediante PrenatalBOBsTM o array-CGH dopo cariotipo normale.

Nei 4 casi di delezione era presente un segno clinico precoce comune: il ritardo di crescita intrauterino (IUGR) isolato o in associazione rilevabile dalla 18sg. L'analisi autoptica ha rilevato le altre anomalie tipiche quali dimorfismi facciali caratteristici, stenosi sopravvalvolare aortica e polmonare nei casi con epoca gestazionale ≥ 25 sg.

Nel caso con duplicazione complementare a 11+4gg erano presenti NT aumentata (4.8mm), assenza dell'osso nasale ed inversione dell'onda "a" nel dotto venoso. Le ecografie successive hanno mostrato: a 16 sg una cisti del plesso corioideo sx e pielectasia renale bilaterale; a 19+4sg una biometria dell'estremo cefalico al 90°p, con rapporto femore/cc tra -1 e -2DS, ventricolomegalia borderline monolaterale. RM cerebrale a 21sg: ventricoli laterali ampi, con trigono sn di 13mm e ds di 11mm e scarso sviluppo della scissura silviana, ippocampale e parietooccipitale interna. L'esame obiettivo del feto evidenziava prevalenza del neurocranio rispetto allo splancocranio, modico ipertelorismo, edema periorbitario, lieve ipoplasia malare, ponte nasale alto, naso largo, lieve micrognazia.

In conclusione, nei casi di WBS, sebbene non vi sia un quadro ecografico precoce comune, lo IUGR sembra essere l'unica anomalia ecografica riscontrabile dopo 18sg. In tali condizioni, potrebbe essere utile aggiungere la ricerca della microdelezione 7q11.23. Inaspettatamente, la duplicazione complementare mostra un fenotipo fetale più severo rispetto alla delezione in epoca gestazionale più precoce

Genetic and environmental factors for normal hearing function and age-related hearing loss: a broad study from Europe to Central Asia

G. Giroto¹, D. Vuckovic¹, A. Buniello², K.P. Steel², P. Gasparini¹

¹*Med Genet, IRCCS-Burlo Garofolo Children Hospital, Trieste Univ, Trieste, Italy*

²*Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SA, UK*

The vast majority of genetic and environmental/lifestyle factors underlying normal hearing function and age-related hearing loss (ARHL) need to be identified. To reach this goal we decided to run Genome Wide Association Studies (GWAS) on hearing quantitative and qualitative traits using isolated populations and the following auditory phenotypes: 1) low, medium and high Pure Tone Average, 2) the separated thresholds, 3) 3 Principal components. Expression studies in wildtype mice using immunohistochemistry and confocal microscopy were then carried out on genes identified by the GWAS. Finally, a search for environmental/lifestyle factors (degree of education, smoke and drinking habits including alcohol, coffee and tea, etc.) was performed.

Up to now, we have run 3 meta-analyses using a series of isolated populations coming from Europe (Italy, Croatia and Ukraine), Caucasus (Armenia, Azerbaijan, Georgia) and Central Asia (Uzbekistan, Kazakhstan, Tajikistan and Kirghizstan) for an overall number of 3681 individuals. In particular, 2 GWAS for hearing quantitative traits (one sex separated), and 1 GWAS for ARHL (qualitative traits) have been performed. By meta-analysis of data in these populations, some significant and suggestive loci ($p < 10^{-6}, 10^{-7}$) have been found and some of them map to known hereditary hearing loss loci whose genes still need to be identified (Giroto et al. JMG 2011). A list of 22 strong candidate genes has been defined to be included in the following expression studies. 5 of them (Arsg, Slc16a6, Dclk1, Gabrg3, Csmd1) show strikingly specific expression in the cochlea (e.g. at the top of sensory hair cells and in the marginal cells of the stria vascularis) while the other 10 (Ptprd, Grm8, GlyBP, Evi5, Irg1, Rimb2, Ank2, Mbd1, Rbfox1, Cdh13) are located in multiple cell types in the cochlea. As regards the search for environmental/lifestyle factors, the epidemiological analysis in these isolated populations revealed a positive association ($p=0.006$) between coffee drinking and better auditory function (low PTA). Moreover, the degree of education was significantly associated with ARHL ($p=0.5 \times 10^{-8}$) confirming previously reported data. Additional studies are now in progress to further confirm present results.

ASSOCIATION BETWEEN MISSENSE VARIANT AND LARGE DELETION IN USH2A GENE IN PATIENT WITH CLINICAL DIAGNOSIS OF USHER SYNDROME

A. Mariottini¹, L. Berti¹, S. Palchetti¹, I. Passerini¹, A. Sodi², M. Trafeli¹, F. Torricelli¹

¹*SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze*

²*Dip. Scienze Chirurgiche Specialistiche, Clinica Oculistica, AOU Careggi, Firenze*

Introduction: Usher syndrome (USH) is a clinically variable and genetically heterogeneous autosomal recessive disorder (prevalence 3,5-6,2/100.000) defined by congenital, bilateral deafness and a later onset loss of the visual field, caused by Retinitis Pigmentosa (RP). Three clinical subtypes of USH are distinguished, mainly on the basis of the severity and progression of the hearing loss and the age of onset of RP.

USH 1 (caused by 5 identified genes: MYO7A, USH1C, CDH23, PCDH15, USH1G) is the most severe form of the disease, characterized by congenital profound hearing loss with absent vestibular function, and a prepubertal onset of RP. USH 2 (caused by 3 identified genes: USH2A, USH2C, USH2D) is the most common subtype and characterized by congenital moderate to severe hearing loss and onset of RP during or after puberty. In USH 3 (caused by CLRN1) the hearing loss is progressive and the vestibular function and onset of RP are variable.

Methods: Three families with USH were recruited through the Hereditary Retinal Degenerations Referring Center of the Eye Clinic of the University of Florence. All the subjects were clinically evaluated by means of a standard ophthalmologic examination, fundus photography, electrophysiological tests (EOG, ERG) and OCT scan to assess their phenotype. The molecular study was performed by automated sequencing of USH2A gene. This case was observed an abnormal segregation analysing of the parents of proband, we perform MLPA analysis and Real-time quantitative PCR, for confirmation.

Discussion: In the first family one novel missense variant c.4144 T>C (p.Trp1382Arg) and a large deletion of 3 exons were identified (EX17-18-19) in the proband and in her affected sister in heterozygous state.

In the second family we found in the index patient the described variants c.1434 G>C (p.Glu478Asp) and c.7595-2144 A>G (p.Lys2535ThrfsX56), and the deletion of exon 22, all in heterozygous state.

In the third proband we identified the novel variant c.11831C>A (p.Ala3944Asp) and the deletion of 10 exons (EX23-24-25-26-27-28-29-30-31-32), both in heterozygous state.

Conclusions: This study is the first case that show an association between missense variant and large deletion in USH2A gene in patient with clinical diagnosis of Usher Syndrome.

“ANTISENSE-EXON-SKIPPING” NEL GENE COL6A2 DETERMINA UNA DEGRADAZIONE ALLELE-SPECIFICA E CORREGGE UNA MUTAZIONE DOMINANTE IN UN PAZIENTE CON DISTROFIA MUSCOLARE DI ULLRICH

F. Gualandi¹, E. Manzati¹, P. Sabatelli², C. Passarelli¹, M. Bovolenta¹, C. Pellegrini¹, D. Perrone³, S. Squarzone², E. Pegoraro⁴, P. Bonaldo⁵, A. Ferlini¹

¹*Section of Medical Genetics- Department of Medical Science, University of Ferrara, Italy.*

²*IGM-CNR Unit of Bologna, Bologna, Italy*

³*Department of Chemistry, University of Ferrara, Italy.*

⁴*Department of Neurosciences, University of Padova, Italy.*

⁵*Department of Biomedical Sciences, University of Padova, Italy.*

Mutazioni nei geni che codificano per il collagene di tipo VI causano le miopatie di Ullrich e Bethlem (UCMD/BM). Mutazioni in eterozigosi che esercitano un effetto dominante negativo sull'assemblaggio e secrezione del collagene VI, sono frequenti sia in pazienti UCMD che BM. E' ipotizzabile quindi che approcci molecolari mirati a ridurre o abolire l'espressione dell'allele mutato possano rappresentare una strategia terapeutica promettente in molti casi di miopatie da collagene VI. Tale veduta trova ulteriore supporto nell'evidenza che una condizione di aploinsufficienza per il collagene VI è priva di conseguenze patologiche. Per testare questa ipotesi abbiamo utilizzato oligonucleotidi antisensense a RNA (2'OMePS-AON) per indurre exon skipping out-of-frame e conseguente degradazione selettiva di una mutazione dominante nel gene COL6A2 (c.954+17_954+22del28 nell'introne 9). L'approccio è stato quello di transfettare in vitro i fibroblasti del paziente UCMD con un AON disegnato verso la variante allelica di un comune SNP in cis con la mutazione causativa e presente in un esone out-of-frame (esone 3). L'AON è stato opportunamente disegnato per mascherare sequenze ESE (exonic splicing enhancer) interne all'esone. Il trattamento in vitro è stato in grado di indurre skipping dell'esone 3 e di determinare la degradazione preferenziale del trascritto mutato. A livello proteico a ciò è corrisposto il ripristino della secrezione nella matrice extracellulare di collagene VI, completamente ritenuto a livello intracellulare in condizioni basali. Il collagene VI secreto veniva inoltre correttamente incorporato nella matrice. Studi di microscopia elettronica hanno permesso di documentare il recupero focale della capacità di formare una rete interconnessa di microfibrille nello spazio extracellulare. Lo studio ha confermato la fattibilità dell'approccio molecolare di exon-skipping per la correzione di mutazioni ad effetto dominante negativo e questa nuova strategia di modulazione dell'RNA può rappresentare una potenzialità terapeutica non solo per le miopatie da collagene VI, ma per molti disordini a patogenesi simile.

FACIAL-AUTISTIC DUPLICATION X-LINKED (FADUX): UNA NUOVA SINDROME DA DUPLICAZIONE XQ12-Q13.3

P. Prontera¹, V. Ottaviani¹, I. Isidori¹, M. Schippa¹, C. Gradassi¹, C. Ardisia¹, D. Rogaia¹, A. Mencarelli¹, G. Stangoni², E. Donti¹

¹*Medical Genetics Unit, Hospital and University of Perugia, Perugia, Italy.*

²*Neonatology, Hospital of Perugia, Perugia, Italy.*

L'applicazione di tecniche di analisi genomica (array-CGH, SNP-array) allo studio di pazienti con disabilità intellettive e/o disturbi dello spettro autistico ha dato un enorme contributo all'identificazione dell'eziologia di sindromi note o alla definizione di nuove entità nosologiche.

Un recente esempio viene dallo studio di Kaya et al. (2012) che riporta un caso familiare di duplicazione Xq12.q13.3 (ChrX: 64824141-74251345x3, Genome build NCBI 37, hg-19) in tre maschi che presentano un fenotipo clinico simile, caratterizzato principalmente da: microcefalia, dimorfismi facciali, ritardo globale di sviluppo, comportamenti autistici ed epilessia. Gli autori hanno anche esaminato 200 pazienti con disturbi neuropsichiatrici e neuroevolutivi senza riscontrare la stessa alterazione genomica.

Nel corso dell'attività di genetica clinica abbiamo avuto modo di osservare recentemente due fratelli, di 6 ed 1 anno, con gli stessi segni clinici dei pazienti descritti da Kaya. L'analisi genomica eseguita mediante array-CGH (CytoChip 4x44K, Blugnome) ha evidenziato una duplicazione di circa 9 Mb in Xq12.q13.3 (ChrX:65418928-75204221x3, NCBI 37), di origine materna, del tutto sovrapponibile a quella osservata nei pazienti di Kaya. I risultati dell'array-CGH sono stati confermati mediante MLPA e FISH sia nei fratelli che nella madre.

Questa osservazione supporta l'esistenza di una sindrome da duplicazione Xq12.q13.3 ricorrente ed implica che l'aumento di dose dei geni coinvolti si associa ad un disturbo neuroevolutivo e comportamentale X-linked recessivo clinicamente riconoscibile, per il quale suggeriamo il nome "FADUX syndrome", acronimo di "Facial-Autistic DUplication X-linked syndrome".

Sindrome da ipermobilità articolare (sindrome di Ehlers-Danlos variante ipermobile): un nuovo modello di studio e di trattamento della disabilità associata a patologie ereditarie sistemiche

M. Castori¹, F. Camerota², M. Celli³, C. Celletti², S. Antonelli⁴, C. Blundo⁵, G. Minisola⁴, A. Morrone⁶, G. Paola¹

¹UOC Laboratorio di Genetica Medica, Dipartimento di Medicina Molecolare, Sapienza Università di Roma, AO San Camillo-Forlanini, Roma

²UOC Medicina Fisica e Riabilitazione, Dipartimento di Scienze Ortopediche, Sapienza Università di Roma, Policlinico Universitario Umberto I, Roma

³Dipartimento di Pediatria, Sapienza Università di Roma, Policlinico Universitario Umberto I, Roma

⁴UOC Reumatologia, Dipartimento di Medicina Specialistica, AO San Camillo-Forlanini, Roma

⁵UOC Neurologia e Neurofisiopatologia, Dipartimento di Neuroscienze, AO San Camillo-Forlanini, Roma

⁶Direzione Generale, AO San Camillo-Forlanini, Roma

La sindrome da ipermobilità articolare (SIA), altrimenti nota come sindrome di Ehlers-Danlos variante ipermobile, è la patologia ereditaria del tessuto connettivo più comune nella specie umana. La mancata conoscenza delle sue basi biologiche e l'attuale assenza di elementi obiettivi specifici rendono la SIA, paradossalmente, anche la patologia ereditaria del tessuto connettivo più difficile da riconoscere. Sebbene, fino a pochi anni fa, la SIA sia stata considerata di preminente interesse reumatologico, recenti evidenze dimostrano quanto essa abbia manifestazioni sistemiche che rendono necessaria una gestione multispecialistica del paziente. Inoltre, l'alto grado di disabilità associato alla SIA, la sua elevata frequenza, la generale sottostima diagnostica e l'assenza di modelli di trattamento efficaci nel lungo termine hanno un impatto non trascurabile in termini di Sanità Pubblica. L'ampia diffusione delle molteplici disabilità correlate alla SIA ed il progressivo aumento dei pazienti diagnosticati, raggiunto grazie ad una capillare attività di sensibilizzazione, ci hanno indotto ad istituire un percorso assistenziale multidisciplinare ed un gruppo di studio attivo presso alcune strutture dell'Università La Sapienza con sede presso il Policlinico Universitario Umberto I e l'Azienda Ospedaliera San Camillo-Forlanini di Roma. A queste strutture afferiscono ad oggi più di 150 pazienti con diagnosi clinica di SIA. L'esperienza maturata dall'interscambio tra fisiatra, fisioterapista, terapeuta occupazionale, pediatra, neuropsicologo, reumatologo, terapeuta del dolore e genetista clinico, ha permesso di migliorare l'attuale approccio preventivo e terapeutico di questi pazienti attraverso la definizione di alcuni principi di gestione, condivisi a livello internazionale ed in corso di validazione.

SPECIFIC ALTERATIONS OF THE MICRORNA TRANSCRIPTOME AND GLOBAL NETWORK STRUCTURE IN COLORECTAL CANCER AFTER TREATMENT WITH MAPK / ERK INHIBITORS

M. Ragusa¹, L. Statello¹, M. Maugeri¹, D. Barbagallo¹, M. Scalia¹, R. Caltabiano³, G. Privitera⁴, A. Cappellani², S. Celeste⁵, C. Di Pietro¹, F. Basile², M. Purrello¹

¹*Dipartimento Gian Filippo Ingrassia, Sezione di Biologia, Genetica, Genomica Cellulare e Molecolare Giovanni Sichel, Unità di BioMedicina Molecolare Genomica e dei Sistemi Complessi, Genetica, Biologia Computazionale, Università di Catania*

²*Dipartimento di Chirurgia, Università di Catania*

³*Dipartimento Gian Filippo Ingrassia, Sezione di Anatomia Patologica, Università di Catania*

⁴*Dipartimento di Ostetricia, Ginecologia e Scienze Radiologiche, Università di Catania*

⁵*European Drug Safety and Metabolism Research Center, Myrmex, Catania*

The MAPK/ERK pathway has a master control role in various cancer-related biological processes. It also regulates many transcription factors that control miRNAs and their biosynthetic machinery. To investigate on the still poorly characterised global involvement of miRNAs within the pathway, we profiled the expression of 745 in 3 Colorectal Cancer (CRC) cell lines after blocking the pathway with 3 different inhibitors. This allowed the identification of 2 classes of post-treatment differentially expressed (DE) miRNAs: (i) common DE miRNAs in all CRC lines after treatment with a specific inhibitor (class A); (ii) DE miRNAs in a single CRC line after treatment with all 3 inhibitors (class B). By determining the molecular targets, biological roles, network position of chosen miRNAs from class A (miR-372, miR-663b, miR-1226*) and class B (miR-92a-1*, miR-135b*, miR-720), we experimentally demonstrated that they are involved in cell proliferation, migration, apoptosis, and globally affect the regulation circuits centred on MAPK/ERK signalling. Interestingly, the levels of miR-92a-1*, miR-135b*, miR-372, miR-720 are significantly higher in biopsies from CRC patients than in normal controls; they also are significantly higher in CRC patients with mutated KRAS than in those with wild-type genotypes: the latter could be a downstream effect of ERK pathway over activation, triggered by KRAS mutations. Finally, our functional data strongly suggest the following miRNA/target pairs: miR-92a-1*/PTEN-SOCS5; miR-135b*/LATS2; miR-372/TXNIP; miR-663b/CCND2. Altogether, these results contribute to deepen current knowledge on still uncharacterized features of MAPK/ERK pathway, pinpointing new oncomiRs in CRC and allowing their translation into clinical practice and CRC therapy.

Bibliography:

M Ragusa, L Statello, M Maugeri, A Majorana, D Barbagallo, L Salito, M Sammito, M Santonocito, R Angelica, A Cavallaro, M Scalia, R Caltabiano, G Privitera, A Biondi, M Di Vita, A Cappellani, E Vasquez, S Lanzafame, E Tendi, S Celeste, C Di Pietro, F Basile, M Purrello. Specific alterations of the microRNA transcriptome and global network structure in colorectal cancer after treatment with MAPK/ERK inhibitors. *Journal of Molecular Medicine* 2012 Jun 4.

Analisi retrospettiva, confronto cariotipo Vs QF-PCR

B. Minuti¹, C. Centrone¹, C. Giuliani¹, U. Ricci¹, I. Giotti¹, S. Bernabini¹, S. Frusconi¹, A. Gozzini¹, E. Lisi¹, F. Torricelli¹

¹SOD Diagnostica Genetica, AOU-Careggi, Firenze

Negli ultimi anni nella Regione Toscana, si è osservato un notevole incremento delle diagnosi prenatali (DP) nel primo trimestre di gravidanza (villo coriale), rispetto alle DP invasive del secondo trimestre (liquido amniotico); questo è principalmente dovuto all'introduzione di metodiche di screening con una sempre maggiore sensibilità ed attendibilità, ma anche ad un aumento dell'età materna. Data l'elevata manualità necessaria per l'esecuzione del cariotipo da metafasi spontanee (metodo diretto), è stata introdotta la QF-PCR nell'analisi dei CVS. Dal 2008 ad oggi sono stati analizzati con metodica QF-PCR 6500 CVS e 566 LA, notando un incremento annuale costante nel numero dei CVS.

Dall'analisi dei dati, si rileva che la percentuale di risultati discrepanti tra risultato QF e risultato cariotipo (0,58%) è in accordo con i dati riportati in letteratura e che tali discrepanze sono dovute soprattutto a presenza di mosaicismi; che rappresentano una delle problematiche prevalenti dell'esame citogenetico su villo coriale; tale problema, anche con l'introduzione della QF-PCR, non è superato.

Nella citogenetica classica il problema del mosaicismo è legato al fatto che l'esame viene effettuato su due diversi tessuti (citotrofoblasto e mesenchima) in tempi diversi; introducendo la QF-PCR si analizzano entrambi i tessuti contemporaneamente la problematica del mosaicismo è ancora di più difficile interpretazione.

Riteniamo che il percorso che prevede per le DP invasive l'associazione tra QF-PCR e analisi del cariotipo sia un ottimo approccio per la diagnosi delle aneuploidie più frequenti.

E' necessario sottolineare che il risultato della QF-PCR deve essere confermato e complementato dal risultato della citogenetica convenzionale, che comunque rimane al momento il gold standard nella DP invasiva. Questo iter diagnostico richiede strutture di alta specializzazione dove cooperino biologi molecolari e citogenetisti esperti nell'allestimento di colture cellulari, nella manipolazione in sterilità di CVS ed LA. Oltre alla collaborazione con genetisti e ginecologi che espongono alle pazienti quali sono i limiti ed vantaggi delle metodiche utilizzate.

NOVEL MUTATIONS OF THE NR5A1 GENE IDENTIFIED IN A POPULATION OF ITALIAN PATIENTS WITH 46,XY DISORDERS OF SEX DEVELOPMENT (DSD).

L. Baldazzi¹, A. Nicoletti¹, S. Menabò¹, G. Cangemi¹, A. Balsamo³, L. Mazzanti²

¹*Lab Genetica Molecolare UO Pediatria Prof. Pession Az Osp.-Univ di Bologna, S.Orsola-Malpighi*

²*SS Malattie Rare e Sindromologia UO Pediatria Prof. Pession Az. Osp.-Universitaria di Bologna*

³*SS Malattie Endocrine UO Pediatria Prof. Pession Az. Osp.-Universitaria di Bologna*

Steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) is a nuclear receptor that regulates multiple genes involved in adrenal and gonadal development. Recently, heterozygous mutations in the NR5A1 gene were reported as a frequent cause of 46,XY DSD in humans, in particular among patients with severe underandrogenization at birth. These patients may also show hormone profiles in the neonatal period that may lead to a presumptive diagnosis of partial androgen insensitivity syndrome (PAIS). The NR5A1 gene was analyzed by means of PCR and direct sequencing in 16 of the patients, among a cohort of 30 Italian patients with 46,XY DSD that did not show any AR/SRD5A2 gene mutation.

Heterozygous NR5A1 mutations were found in 7 cases. Of these, two presented a mutation predicted to disrupt RNA stability and five are missense mutations that affect a conserved residue: two map in the DNA binding domain and three in the ligand binding domain. As far as we know, all the identified mutations are novel.

All patients presented with severe underandrogenization at birth: female external genitalia with enlarged clitoris, inguinal retained testis and, in a few cases, a very mild gonadal dysgenesis. With the exception of the 2 most recently observed, all were submitted to gonadectomy and female correction of external genitalia in the first years of life. To date, adrenal insufficiency has not occurred in any of the patients. DNA analysis of the available parents identified two carriers and their clinical evaluation is running.

The degree of conservation of the affected residues, as well as the type of substitution (not conservative in most of the cases), strongly suggest an implication in the phenotypes observed.

This study has enlarged the spectrum of NR5A1 gene mutation and clearly confirmed the high frequency of SF1 heterozygous mutations among 46,XY DSD patients without adrenal insufficiency, thus underlining the role of SF1 aplo-insufficiency in humans. It also confirms the importance of performing NR5A1 gene analysis in this group of patients in order to take into consideration alternative strategies for the treatment and follow up both of the patients and the 46,XX carriers as well as for the genetic counselling.

Espressione genica di RBFOX1 in fratelli autistici discordanti

C. Zusi¹, P. Prandini¹, G. Malerba¹, A. Marostica¹, E. Trabetti¹, P.F. Pignatti¹, I. T.A.N.²

¹*Dip di Scienze della Vita e della Riproduzione, Sez di Biologia e Genetica, Università di Verona*

²*The Italian Autism Network*

I disturbi dello spettro autistico (ASD) fanno parte di un gruppo di disordini pervasivi dello sviluppo infantile con origini genetiche complesse.

Studi recenti hanno messo in luce il ruolo di RBFOX1 come regolatore chiave della trascrizione e dello splicing nelle cellule neuronali durante lo sviluppo.

Allo scopo di confermare il ruolo di questo gene in ASD è stata analizzata l'espressione di RBFOX1 in 18 coppie di fratelli discordanti della coorte ITAN tramite Real-Time PCR.

RBFOX1 è risultato espresso in linee cellulari linfoblastoidi (LCL) ma non in linfociti, tuttavia non sono state trovate differenze significative tra probandi ASD e fratelli sani.

Sebbene le LCL siano considerate una valida approssimazione dell'espressione genica neuronale, non è stata confermata la sottoespressione di RBFOX1 nei casi, nonostante sia possibile osservarne un trend. Questa differenza non significativa potrebbe essere dovuto ad una variazione di espressione in LCL meno accentuata rispetto ai campioni neuronali.

UN RARO CASO DI MICRODELEZIONE DEI CROMOSOMI SESSUALI CON DEFICIT DI SHOX ASSOCIATO A PANIPOPITUITARISMO ANTERIORE CONGENITO

D. De Brasi¹, G. Fioretti¹, L. Rossi¹, M. Gentile³, A. Pansini³, R. Volpe², F. Scavuzzo², A.L. Buonadonna³, M.L. Cavaliere¹

¹*U.O.C. Genetica Medica, AORN "A. Cardarelli", Napoli*

²*U.O.S. Endocrinologia, AORN "A. Cardarelli", Napoli*

³*U.O.C. Laboratorio Genetica Medica ASL Bari*

Introduzione: la discondrosteosi di Leri-Weill è una displasia scheletrica caratterizzata da bassa statura disarmonica e deformità di Madelung. Nel 70% dei casi è dovuta ad aploinsufficienza del gene SHOX, che mappa in Xp22.33 e Yp11.32 (PAR-1). E' causata da mutazioni puntiformi o delezioni del gene SHOX. La microdelezione Yq è associata ad oligoazoo-spermia ed infertilità. L'associazione delle due condizioni cliniche è un evento raro.

Paziente e metodi: descriviamo un paziente in cui una microdelezione Xp22.33 si associa a perdita di gran parte del cromosoma Y e a panipopituitarismo anteriore congenito.

Il probando di anni 16, presenta bassa statura lievemente disarmonica (tronco>arti), obesità, lieve RSPM, facies Kabuki-like, collo corto, Madelung bilaterale, deficit della pronosupinazione, brachimetarpia bilaterale del IV e V raggio, ginocchio valgo, ipogenitalismo (orchidometria 7 ml).

L'assetto endocrino è caratterizzato da panipopituitarismo anteriore associato ad empty sella parziale con compressione/dislocazione posteriore dell'ipofisi e del peduncolo. L'E.O. è ritardata di circa 2 anni. E' in trattamento con L-T4, cortisone, testosterone, rhGH.

Il test all'HCG ha evocato una normale risposta endocrina del testicolo allo stimolo.

Il cariotipo ha mostrato un piccolo frammento derivativo del cromosoma Y, confermato dalla FISH che ha escluso la possibile traslocazione di parte della Y su altri cromosomi. L'a-CGH ha evidenziato una delezione "de novo" (0.85 Mb) del braccio corto del cromosoma X (Xp22.33) comprendente SHOX, ed una delezione "de novo" (53 Mb) del cromosoma Y (Yp11.2-q12) comprendente il braccio lungo ed una parte del braccio corto, con risparmio del gene SRY e SHOXY. Tale delezione, coinvolgendo i loci AZF, dovrebbe associarsi ad azoospermia, per l'accertamento della quale è in programma un trattamento con gonadotropine.

Conclusioni: il caso descritto è un "fenotipo composto", risultante, cioè, da alterazioni genetiche (deficit di SHOX, delezione AZF) ed endocrine (panipopituitarismo anteriore); si vuole inoltre sottolineare come la presenza di "elementi sindromici" in pazienti endocrinopatici debba essere attentamente valutata ed indagata in ambito genetico.

DOPPIA MUTAZIONE DEL GENE SHOX E FENOTIPO LERI-WEIL: DESCRIZIONE DI DUE FRATELLI AFFETTI

G. Fioretti¹, D. De Brasi¹, M.A. Pisanti¹, D. Coviello², M. Baffico², P. Castelluccio¹, L. Vicari¹, M.L. Cavaliere¹

¹*U.O.C. Genetica Medica, AORN "A. Cardarelli", Napoli*

²*S.C. Laboratorio di Genetica, E.O. Ospedali Galliera, Genova*

Introduzione: la discondrosteosi di Leri-Weill (DLW) è una displasia scheletrica, caratterizzata da bassa statura disarmonica e deformità di Madelung. Nel 70% dei casi è dovuta all'aploinsufficienza del gene SHOX, che mappa sulla regione pseudoautosomica (PAR1) Xp22.33 e Yp11.32. La displasia mesomelica di Langer (DML) è caratterizzata da severa ipostaturia non armonica per grave accorciamento meso e rizomelico degli arti superiori e inferiori. A differenza della DLW, la deformità di Madelung non è presente in modo caratteristico nella DML. La DML è causata dalla presenza di mutazioni puntiformi e/o delezioni del gene SHOX allo stato di omozigosi o eterozigosi composta.

Pazienti e metodi: descriviamo due fratelli affetti da bassa statura disarmonica con fenotipo DLW portatori di doppia mutazione del gene SHOX.

Il primo, di anni 9, presenta una bassa statura disarmonica con accorciamento prevalentemente mesomelico degli arti, macrocefalia relativa, Madelung bilaterale, deficit della pronosupinazione, varismo tibiale. Cariotipo: 46,XY. Analisi del gene SHOX: eterozigosi composta per delezione di SHOX e della sua regione "enhancer" e mutazione c.374C>A nell'esone 3 (pThr125Lys).

Il secondo, di mesi 5, presenta una iposomia disarmonica, simile al fratello. Cariotipo: 46, XY; l'analisi del gene SHOX è sovrapponibile a quella del fratello.

I genitori presentano una bassa statura armonica senza evidenza clinica di Madelung. L'analisi molecolare ha mostrato la presenza in eterozigosi nel padre della delezione di SHOX e nella madre della mutazione c.374C>A.

La sorella, di anni 7, presenta normali parametri auxo-antropometrici con uno scarto dal target di + 2.6 SD. In ella non è stata riscontrata alcuna alterazione del gene SHOX.

Conclusioni: i casi descritti dimostrano come nelle iposomie da deficit di SHOX non sia sempre possibile una precisa correlazione genotipo-fenotipo; ciò assume particolare rilevanza nel counselling genetico prenatale laddove è sempre necessario confrontare l'analisi genetica con il dato ecografico morfostrutturale fetale.

IL TRATTAMENTO DI LINEE CELLULARI X FRAGILE CON IL FARMACO RIATTIVANTE 5-AZA-2-DEOSSICITIDINA NON DETERMINA DEMETILAZIONE ASPECIFICA DEL DNA GENOMICO

S. Lanni¹, G. Mancano¹, M. Goracci¹, M. Moscarda¹, P. Chiurazzi¹, E. Tabolacci¹, G. Neri¹

¹*Ist. di Genetica Medica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

La sindrome X fragile (FXS) è causata dall' espansione oltre le 200 ripetizioni della sequenza CGG al 5'UTR del gene FMR1 (mutazione completa) e successiva metilazione sia della regione espansa che dell'isola CpG associata al promotore del gene. Queste modificazioni determinano il silenziamento epigenetico del gene FMR1. Abbiamo precedentemente dimostrato che il trattamento di linee linfoblastoidi FXS con 5-aza-2-deossicitidina (5-azadC) è in grado di riattivare il gene silente, demetilando i siti CpG del promotore e determinando un aumento di acetilazione degli istoni H3 ed H4 e di metilazione di H3-K4. Una estensione di questi esperimenti ci ha permesso di osservare che l'effetto riattivante della 5-azadC su linee FXS è maggiore dopo 10-15 giorni dalla fine del trattamento (3-8 giorni consecutivi con 1 µM 5-azadC), raggiungendo i livelli di trascrizione di un controllo normale (WT). Esperimenti preliminari condotti su linee con espansione completa non metilata (UFM) mostrano inoltre un iniziale aumento della trascrizione di FMR1 con un picco intorno al 10°-15° giorno dalla sospensione del trattamento, a cui fa seguito una progressiva riduzione del trascritto al di sotto dei livelli basali. Considerata la riattivazione di FMR1, abbiamo verificato la specificità dell'azione demetilante della 5-azadC mediante sequenziamento della regione che si trova a monte del promotore di FMR1 e risulta metilata anche nelle cellule WT [Naumann et al., 2009], previa trasformazione del DNA con bisolfito di sodio. Tale regione non viene demetilata dal trattamento con 5-azadC. Inoltre l'analisi di metilazione condotta mediante MS-MLPA di siti metilati in corrispondenza dell'esone 17 di FMR1 e delle regioni PWS/AS e BWS/SRS mostra come anche su questi siti l'effetto demetilante della 5-azadC è minimo o assente. Questi dati indicano che il trattamento con 5-azadC non ha un effetto demetilante aspecifico sul DNA genomico, ma limitato a particolari regioni tra cui quella del promotore del gene FMR1 metilato a causa dell'espansione della sequenza CGG, aprendo così nuove prospettive nell'ambito della terapia epigenetica della FXS.

GATA6 MUTATIONS CAUSE A BROAD PHENOTYPIC SPECTRUM OF DIABETES FROM PANCREATIC AGENESIS TO ADULT-ONSET DIABETES WITHOUT EXOCRINE INSUFFICIENCY

E. De Franco¹, C. Shaw-Smith¹, H. Lango Allen¹, S. Flanagan¹, A. Hattersley¹, S. Ellard¹

¹*Institute of Biomedical and Clinical Science, University of Exeter Medical School, Exeter, EX2 5DW, UK*

Neonatal diabetes (NDM) diagnosed before 6 months is a rare disorder with an incidence of 1:100,000; a genetic diagnosis is possible in ~70% of cases. NDM due to pancreatic agenesis is extremely rare and until recently the causal gene was identified in just five cases, two due to mutations in PTF1A and three with mutations in PDX1. We recently used exome sequencing to identify heterozygous GATA6 mutations as the most common cause of pancreatic agenesis, accounting for 15/27 patients with NDM requiring insulin treatment and exocrine pancreatic insufficiency requiring enzyme replacement therapy. Extra-pancreatic features were also described, with congenital cardiac malformations being the most common (present in 14/15 cases).

In this study we undertook GATA6 mutation screening in 171 subjects with NDM of unknown genetic aetiology selected from a cohort of 795 NDM patients. Pancreatic agenesis was diagnosed in 39/795 cases. Aim of the study was to confirm GATA6 mutations as the most common cause of pancreatic agenesis and assess whether mutations in GATA6 also cause NDM in patients without exocrine pancreatic insufficiency.

GATA6 mutations were identified in 9/171 probands and 5 parents. Pancreatic agenesis was diagnosed in 6/9 probands. In total we have identified GATA6 mutations in 21/39 (54%) patients with pancreatic agenesis (6 cases in this study and 15 previously reported). Three of 147 patients with NDM but not on exocrine supplementation were heterozygous for GATA6 mutations; two have permanent diabetes and one has transient episodes of hyperglycaemia. Analysis of parental samples revealed that the mutation was inherited in 5 cases: four parents were diagnosed with diabetes outside the neonatal period (12-46 years). One parent with a mosaic mutation was not diabetic but had a heart malformation. Sub-clinical exocrine insufficiency was detected in 3 diabetic patients who did not receive enzyme supplementation. Extra-pancreatic features were observed in all 24 probands and three parents, with congenital heart defects most frequent (83%).

This evidence shows that heterozygous GATA6 mutations cause a wide spectrum of diabetes manifestations, ranging from pancreatic agenesis to adult-onset diabetes with sub-clinical or no exocrine insufficiency.

Linkage studies and Whole Exome Sequencing: a useful combined strategy to identify new deafness genes

G. Giroto¹, F. Faletra¹, D. Licastro², D. Vozzi¹, K. Abdulhadi³, S. Dipresa¹, E. Athanasakis¹, M. Khalifa Alkowari⁴, R. Badii⁴, P. Gasparini¹

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

²*CBM S.c.r.l. Trieste, Italy*

³*Audiology and Balance Unit, National Program for Early Detection of Hearing Loss, WH, Hamad Medical Corporation (HMC) Doha, Qatar*

⁴*Molecular Genetics Laboratory; Laboratory of Medicine and Pathology, Hamad Medical Corporation (HMC), Doha, Qatar*

Nonsyndromic Hereditary Hearing loss is a common disorder accounting for at least 60% of prelingual deafness. Despite GJB2 gene mutations, GJB6 deletion and A1555G mitochondrial mutation play a major role worldwide accounting for approximately 35% of Italian pathogenic alleles, still there is a need to search for new causative mutations/gene underlying the disease in several population such as Italy as well as countries from the Gulf region.

Until recently, linkage analysis was the first step in positional cloning approaches while now, the availability of Next Generation Sequencing (NGS) technologies opens new perspectives in the search for causative genes. Despite the power of NGS, the identification of new genes is still difficult for the large number of variants obtained from the output. To overcome this problem, a combine strategy using linkage and whole exome sequencing has been performed. In particular, HD SNPs arrays have been utilized to get "sniff" linkage data and define a number of candidate loci to be applied in the NGS filtering phase while NGS protocols have been used to obtain whole exome data.

Six Italian families (dominant inheritance) and 5 Qatari ones (recessive inheritance), all negatives for the presence of mutations in the most common HHL genes, have been selected. After filtering (dbSNP and in-house database) results led to the identification of 5 new loci/genes in the Italian families for which Sanger sequencing confirmation is in progress. Moreover, 4 new loci and one new HHL gene have been identified in Qatari families. In particular a causative mutation (c.7873 t>g leading to p.*2625Gluext*11) in BDP1 gene has been found. The mutation disrupts the last stop codon of the transcript resulting in an elongation of 11 residues of the BDP1 protein. Immunohistochemistry analysis carried out in the mouse inner ear showed Bdp1 expression in the mouse cochlea. These finding, definitely increase our knowledge of new HHL genes, further confirming the importance of the combination of both strategies for disease gene identification and may suggest new targets for hearing impairment treatment and prevention.

DIAGNOSI DI SINDROME “MEGAVESCICA, MICROCOLON, IPOPERISTALSI INTESTINALE” ALLA TERZA RICORRENZA

C. Cesaretti¹, B. Gentilin¹, G. Melloni¹, J. Azzollini¹, S. Boito², M. Di Segni³, T. Rizzuti⁴, F. Lalatta¹

¹Fond. IRCCS Ca' Granda Osp. Magg. Policlinico, Area della salute della donna del bambino e del neonato, UOD Genetica Medica, Milano

²Fond. IRCCS Ca' Granda Osp. Magg. Policlinico, Area della salute della donna del bambino e del neonato, UO Ostetricia e Ginecologia I, Milano

³Fond. IRCCS Ca' Granda Osp. Magg. Policlinico, Lab. di Genetica Medica, Settore di Citogenetica, Milano

⁴Fond. IRCCS Ca' Granda Osp. Magg. Policlinico, UO Anatomia Patologica, Milano

La vescica fetale può essere visualizzata ecograficamente nell'80% dei feti a partire dall'undicesima settimana gestazionale (sg), quando il diametro maggiore è solitamente inferiore a mm 6. Si definisce megavescica fetale una vescica con diametro di almeno mm 7 a 11–13⁺⁶sg; tale condizione ha una prevalenza di circa 1/1500 gravidanze.

Il riscontro ecografico di megavescica può essere transitorio e risolversi spontaneamente, oppure essere conseguenza di un reflusso o di problematiche ostruttive, neurogene o miopatiche. La causa più frequente è l'ostruzione uretrale da valvola uretrale posteriore nei maschi e da atresia uretrale nelle femmine. La maggior parte dei casi è sporadica, rare sono le forme familiari o sindromiche.

Riportiamo il caso di una donna di 38 anni (G5P0, due aborti spontanei) giunta all'attenzione della nostra Unità in occasione della terza ricorrenza di megavescica fetale. Nelle due precedenti gravidanze, interrotte nel primo trimestre senza valutazione anatomico-patologica, il cariotipo su villi coriali era risultato maschile normale. La coppia non è consanguinea e non riferisce dati anamnestici rilevanti.

Durante la terza gravidanza la megavescica fetale (diametro mm 28) è stata diagnosticata alla 12[^]sg. Il cariotipo su villi coriali è risultato nuovamente maschile normale. A seguito della consulenza prenatale multidisciplinare, la coppia ha deciso di interrompere la gravidanza mediante induzione per ottenere un riscontro autoptico. Tale esame ha confermato la megavescica e ha evidenziato la presenza di dilatazione dei bacineti renali, microcolon, ipoplasia polmonare e del diaframma, utero unicorne e piedi torti.

Grazie al dato autoptico, è stato possibile ipotizzare la diagnosi di sindrome Megavescica, microcolon, ipoperistalsi intestinale, rara patologia caratterizzata da dilatazione della vescica e delle vie urinarie, idronefrosi e microcolon; è una condizione a trasmissione autosomica recessiva, ma attualmente il gene responsabile non è noto.

Questo caso è un esempio di come l'approccio integrato multidisciplinare, basato sulla collaborazione tra medico genetista, ostetrico ed anatomico-patologo, rivesta una fondamentale importanza per una corretta diagnosi e definizione prognostica anche nelle condizioni più rare.

DIAGNOSI PRENATALE DI MICRODELEZIONE 9P MEDIANTE ARRAY-CGH IN UN CASO DI TRASLOCAZIONE CROMOSOMICA DE NOVO, APPARENTEMENTE BILANCIATA: DISCREPANZA TRA I REPERTI ECOGRAFICI E IL RISCONTRO AUTOPTICO

C. Cesaretti¹, A. Peron¹, L. Ballarati², G. Zuliani³, T. Rizzuti⁴, F. Lalatta¹

¹Fond. IRCCS Ca' Granda Osp. Magg. Policlinico, Area della salute della donna del bambino e del neonato, UOD Genetica Medica, Milano

²IRCCS Ist. Auxologico Italiano, Lab. di Citogenetica e Genetica Molecolare, Cusano Milanino, Milano

³Fond. IRCCS Ca' Granda Osp. Magg. Policlinico, Area della salute della donna del bambino e del neonato, UO Ostetricia e Ginecologia I, Milano

⁴Fond. IRCCS Ca' Granda Osp. Magg. Policlinico, UO Anatomia Patologica, Milano

Il 6% circa dei soggetti con riarrangiamento cromosomico apparentemente bilanciato de novo presenta anomalie fenotipiche; nel 30-50% di questi casi, viene identificato mediante Array-CGH uno sbilanciamento cromosomico submicroscopico. Questo approfondimento è pertanto inserito nel percorso diagnostico dopo riscontro prenatale di traslocazione de novo, per una migliore definizione del fenotipo fetale.

Descriviamo il caso di una donna di 39 anni, inviata presso la nostra Unità di Genetica Medica nel corso della sua seconda gravidanza. Il concepimento era stato spontaneo ed il decorso regolare fino alla villocentesi, eseguita per età materna avanzata. Il cariotipo su villi coriali ha evidenziato un assetto femminile con una traslocazione reciproca de novo, apparentemente bilanciata, tra un cromosoma 1 e un cromosoma 9 [46,XX,t(1;9)(q32;p24)]. L'Array-CGH, effettuato su amniociti, ha rivelato una delezione de novo di 1,29 Mb sul cromosoma 9p23p22.3 a livello del breakpoint identificato mediante il cariotipo. In considerazione della prognosi fetale correlata a questo esito, i genitori hanno chiesto l'interruzione volontaria della gravidanza, sebbene l'ecografia e l'ecocardiografia fetale non avessero messo in evidenza alcun difetto morfologico, difetto di crescita o anomalie dei movimenti fetali. L'autopsia fetale, in contrasto con la normalità dei reperti ecografici, ha evidenziato dismorfismi del volto compatibili con la sindrome da delezione 9p (narici anteverse, filtro lungo e prominente, micrognatia, labbra sottili, orecchie a basso impianto e malformate) e segni di danno neurologico.

Il caso in esame conferma il ruolo irrinunciabile dell'Array-CGH nell'identificazione degli sbilanciamenti genomici criptici di rilevanza clinica nei casi di riarrangiamenti cromosomici strutturali de novo rilevati in ambito prenatale. Sottolinea inoltre l'importanza del riscontro autoptico fetale per la definizione della correlazione genotipo-fenotipo in epoca prenatale e per la consulenza di restituzione alla coppia.

UN FENOTIPO ATIPICO DI MALATTIA DI DENT CAUSATO DALLA CO-EREDITARIETÀ DI MUTAZIONI PRESENTI NEI GENI CLCN5 E OCRL1

M. Addis¹, C. Meloni¹, E. Tosetto², M. Ceol², R. Cristofaro², M.A. Melis¹, P. Vercelloni³, D. Del Prete², G. Marra³, F. Anglani²

¹*Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Clinica e Molecolare, Sezione di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università di Cagliari*

²*Laboratorio di Istomorfologia e Biologia Molecolare del Rene, Divisione di Nefrologia, Dipartimento di Medicina, Università di Padova*

³*Unità di Nefrologia, IRCCS Ca' Grande Università di Milano.*

La Malattia di Dent è una tubulopatia renale X-linked recessiva causata da mutazioni a carico soprattutto del gene CLCN5. Difetti nel gene OCRL1, che di solito è mutato in pazienti con Sindrome di Lowe, sono stati associati ad un fenotipo Dent, chiamato malattia Dent 2. Il 20% circa dei pazienti con Malattia di Dent non presenta mutazioni nè in CLCN5 nè in OCRL1. L'eterogeneità genetica della malattia è accompagnata da eterogeneità fenotipica interfamiliare e intrafamiliare. In questo lavoro riportiamo un caso di Malattia di Dent con un fenotipo molto particolare (dismorfismi, anomalie oculari, ritardo della crescita, rachitismo, lieve ritardo mentale) caratterizzato da una ereditarietà digenica. Il paziente ha ereditato dalla madre sana due nuove mutazioni patogenetiche: una mutazione frameshift nel gene CLCN5 (A249fs * 20) e una mutazione di splicing nel gene OCRL1 (c.388 3 A> G). L'analisi dell'mRNA estratto dai leucociti del paziente ha messo in evidenza lo skipping in frame dell'esone 6 del gene OCRL1 che porta ad una proteina più corta ma mantiene intatto il dominio centrale inositolo 5-fosfatasi e l'estremità C-terminale del dominio ASH-RhoGAP. Nei leucociti della madre è presente solo l'mRNA wild-type a causa dell'inattivazione dell'X completamente sbilanciata. Questo studio rivela per la prima volta l'effetto di un secondo modificatore epistatico della malattia di Dent, in grado di modularne la sua espressività. Ipotizziamo che il fenotipo grave di Malattia di Dent 2 del nostro paziente possa essere dovuto ad un effetto additivo delle due mutazioni.

ANALISI MOLECOLARE DEL GENE OCRL1: LA NOSTRA ESPERIENZA DI 10 ANNI DI ATTIVITÀ DIAGNOSTICA

M. Addis¹, C. Meloni¹, M. Cau¹, M. Serrenti¹, R. Congiu², A. Loi², R. Chessa¹, M.A. Melis¹

¹*Dipartimento di Sanità Pubblica, Medicina Clinica e Molecolare, Sezione di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università degli Studi di Cagliari.*

²*Ospedale Regionale per le Microcitemie ASL-Cagliari, Cagliari.*

Il gene OCRL1 mappa sul braccio lungo del cromosoma X in posizione Xq25-q26 e codifica per una proteina di 105-kD. Il gene contiene 24 esoni, si espande per 58 kb e la regione codificante è inclusa tra gli esoni 2 e 23, con un sito di splicing alternativo nell'esone 18a. Il prodotto del gene è un inositolo 5-fosfato 5-fosfatasi, la cui struttura è caratterizzata da due domini aminoacidici di cui uno è coinvolto nel legame specifico al substrato e l'altro nell'attività catalitica. L'enzima è localizzato nella rete trans dell'apparato del Golgi e nel compartimento endosomiale di una varietà di tipi cellulari come cervello, muscolo scheletrico, cuore, rene, polmone. Le mutazioni presenti nel gene OCRL1 sono responsabili della Sindrome Oculo-Cerebro-Renale di Lowe e della malattia di Dent 2. La sindrome di Lowe è una malattia rara X-linked recessiva, la cui prevalenza nella popolazione generale è di 1:500,000 ed è caratterizzata dalla presenza di cataratta bilaterale congenita, sindrome renale di Fanconi e ritardo mentale. La malattia di Dent, caratterizzata da proteinuria a basso peso molecolare e da numerosi altri sintomi, come glicosuria, aminoaciduria e fosfaturia, ma non l'acidosi tubulare, associata alla sindrome renale di Fanconi, è un difetto X-linked recessivo, dovuto nel 60% dei casi a mutazioni del gene CLCN5 (Dent 1), localizzato in Xp11.22 che codifica per la proteina CIC-5, uno scambiatore di ioni Cl/H, espressa soprattutto negli endosomi. Il 15% dei pazienti CLCN5 negativi presenta mutazioni del gene OCRL1 (Dent2). In questo lavoro presentiamo la nostra esperienza su 180 casi inviati al nostro laboratorio (Lab. di Genetica Umana, Ospedale Regionale per le Microcitemie, Cagliari) per l'analisi molecolare del gene OCRL1 con sospetto diagnostico di Sindrome di Lowe e loro familiari, 52 casi con sospetto di Malattia di Dent2 e loro familiari.

Germ-line polymorphic intron base change in the p53 gene: does it increase risk for breast cancer?

F. Sessa¹, V. Bafunno¹, B. Pilato², F. Tommasi², M. Margaglione¹

¹*Servizio di Genetica Medica, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università degli Studi di Foggia, Foggia*

²*National Cancer Research Centre, Istituto Tumori Giovanni Paolo II, Bari*

BACKGROUND. TP53 is a tumor suppressor with function of caretaker and gatekeeper. P53 mutations have been associated with resistance to anthracyclines and mitomycin in breast cancer. Previous studies have determined that the frequency of germ-line p53 mutations in familial breast cancer patients is 1% or less; there are reports that have investigated the importance of polymorphic intron base changes in the p53 gene. There is an evidence that report the importance of a germ-line polymorphism in the p53 gene at position IVS6 as -36 with a G to C base change (rs17880604): this substitution is described as an increased risk for breast cancer.

METHODS. We focused on a cohort of 68 Italian women with breast cancer and negative for BRCA1 and BRCA2 screening and they were assessed for germ-line mutations in TP53 gene. We investigated the frequency of the polymorphism IVS6 as -36 G/C in these 68 women vs a control group (125 healthy women) using direct cycle sequence analysis with the Taq dye-deoxy terminator method and an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer sequencer.

RESULTS. 7 (10,3%) breast cancer patients were heterozygous for this polymorphism, but nobody had a homozygous mutation; the other 61 (89,7%) were wild type. In comparison, 9 (7,2%) of control group were heterozygous for the p53 IVS6 as -36 G/C mutation, while 116 (92,8%) were wild type. The "C" allelic frequency showed a small increase in sporadic breast cancer patients (5,14%) vs control group (3,6%), but this increase is not statistically significant.

CONCLUSION. We did not found a suggestive association between IVS6 as -36 G/C polymorphism and increased risk for breast cancer, in contrast to previous studies. Analysis of associated increased risk for breast cancer and germ-line mutation in the p53 gene needs further examination to explain the relationship between genetic background and cancer.

Sindrome di Usher tipo 2: ruolo patogenetico della mutazione missenso Pro3272Leu in una famiglia sarda

F. Meloni¹, A. Mariottini², F. Torricelli², A. Ideo¹, P. Moi¹, F. Sessini¹, R. Puddu¹

¹*Servizio di Screening e Consulenza Genetica, Ospedale Microcitemico, Cagliari*

²*SOD Diagnostica Genetica, Azienda Ospedaliera Universitaria Careggi, Firenze*

Introduzione: La sindrome di Usher tipo 2 è una malattia autosomica recessiva caratterizzata da retinite pigmentosa associata a ipoacusia neurosensoriale congenita di grado variabile da moderato a severo in assenza di sintomi vestibolari. Ad oggi tre sono i geni noti associati alla sindrome, tra questi USH2A tiene conto dell'80% dei casi.

Caso Clinico: Riportiamo il caso di una famiglia, giunta alla nostra osservazione in consulenza genetica, costituita da genitori sardi non consanguinei e tre figli. L'anamnesi clinica, supportata dagli esami strumentali, ha messo in evidenza nel secondo e terzogenito un quadro clinico sovrapponibile caratterizzato da retinite pigmentosa e ipoacusia bilaterale di tipo neurosensoriale con intatta risposta vestibolare, sebbene con differenze per età d'insorgenza e gravità della sintomatologia. Per l'associazione del disturbo uditivo e visivo in assenza di alterazioni delle funzioni vestibolari e per storia familiare compatibile con ereditarietà autosomica recessiva è stato posto il sospetto di Sindrome di Usher tipo 2. Per la conferma diagnostica si è proceduto con lo studio molecolare.

Metodi: Il sequenziamento degli esoni e delle giunzioni esone-introne del gene USH2A (NM_206933.2) è stato effettuato utilizzando la stazione robotizzata Beckman-Coulter e successiva corsa nel sequenziatore 3730 DNA Analyzer. L'analisi di sequenza è stata effettuata utilizzando il software SeqScape 2.7, l'interpretazione delle varianti riscontrate è stata effettuata utilizzando il software Alamut 2.2-0. La ricerca delle delezioni/duplicazioni degli esoni del gene USH2A è stata effettuata utilizzando il kit MLPA MRC-Holland P361/P362. L'analisi si è svolta utilizzando il software Coffalyser.

Risultati: Il sequenziamento del gene USH2A ha messo in evidenza la presenza della variante di sequenza c.9815C>T(Pro3272Leu) nell'esone 50 descritta in letteratura ad oggi con incerto significato patogenetico, in omozigosi nei due fratelli affetti e in eterozigosi in entrambi i genitori e nel fratello non affetto.

Conclusioni: Il riscontro della variante di sequenza di origine familiare c.9815C>T(Pro3272Leu) in omozigosi nei due fratelli affetti e in eterozigosi nel primogenito e nei genitori ci consente di poterne definire il ruolo patogenetico.

MIR-296-3P, MIR-298-5P AND THEIR DOWNSTREAM NETWORKS ARE CAUSALLY INVOLVED IN HIGHER RESISTANCE OF MAMMALIAN PANCREAS α CELLS TO CYTOKINE-INDUCED APOPTOSIS RESPECT TO β CELLS

D. Barbagallo¹, S. Piro², A.G. Condorelli¹, L.G. Mascali², N. Parrinello², A. Monello², L. Statello¹, M. Ragusa¹, A.M. Rabuazzo², C. Di Pietro¹, F. Purrello², M. Purrello¹

¹*Dip. Gian Filippo Ingrassia, Unità di BioMedicina Molecolare Genomica e dei Sistemi Complessi, Genetica, Biologia Computazionale, Università di Catania, Catania 95123, Italy, EU*

²*Dip. di BioMedicina Clinica e Molecolare, Università di Catania, Catania 95122, Italy, EU.*

Molecular bases of mammalian pancreas α cells higher resistance than β to proinflammatory cytokines are very poorly defined. MicroRNAs are master regulators of cell networks, but only scanty data are available on their transcriptome in these cells and its alterations in pathology. Accordingly, we analysed microRNA transcriptome profiles in murine pancreas α and β cells at steady state and after treatment with proinflammatory cytokines: this brought us to identify eight microRNAs (mmu-miR-146a, -149, -191*, -203, -296-3p, -298-5p, -411*, -700) with significant differential expression in α cells after exposure to cytokines. Among them, miR-296-3p and miR-298-5p are specifically expressed at steady state in α TC1-6, but not in β TC1 cells. Genes encoding them are physically clustered and co-regulated, and share more targets than expected by chance; both are significantly downregulated by cytokines. By exploiting specific pre-miRs and anti-miRs, we experimentally demonstrated that: (1) downregulation of miR-296-3p and miR-298-5p in α TC1-6 cells importantly contributes to negatively modulating their propensity to apoptosis; (2) IGF1R β and TNF α are downstream targets of both microRNAs and both are upregulated by cytokines. Network analysis suggests that LEF1 and MAFB (two transcription factors, which are abundantly expressed in α cells) control the expression of miR-296-3p and miR-298-5p. As outcome of our data, we propose that miR-296-3p, miR-298-5p and their networks could be considered attractive targets for designing new DM therapeutic strategies.

Caratterizzazione mediante array-CGH ed analisi genotipo-fenotipo in un paziente con ring del cromosoma 6

M.C. Roberti¹, S. Russo¹, L. Ciocca¹, C. Surace¹, M.C. Digilio², P. Sirleto¹, A. Lombardo¹, V. Brizi¹, C. Cini³, A. Angioni¹

¹*Dip. dei Laboratori, U.O. Anatomia Patologica, S.S. di Citogenetica e Genetica Molecolare*

²*Dip. di Medicina Pediatrica, U.O. Genetica Medica*

³*Dip. di Neuroriabilitazione Ped. e UDGEE*

Il ring del cromosoma 6 [r(6)] è un'anomalia costituzionale che si verifica raramente e nella maggior parte dei casi si presenta de novo. La formazione della struttura ad anello si suppone sia dovuta o a rotture e conseguenti delezioni di materiale genetico ad entrambe le estremità del cromosoma o, in un ridotto numero di casi, alla fusione delle estremità telomeriche senza perdita di materiale. Nel caso in cui ci siano delezioni l'unione delle porzioni terminali rimanenti genera una parziale monosomia di entrambe le braccia distali del cromosoma. La sindrome può comprendere sia casi in cui sono evidenziabili solo segni clinici minimi sia casi in cui sono presenti gravi malformazioni con deficit neurologici. I segni clinici più frequenti sono: ritardo di crescita, ritardo mentale, difetti cardiaci congeniti, collo corto e altre alterazioni facciali che comprendono il ponte nasale largo, micrognazia e attaccatura delle orecchie spostata verso il basso. Inoltre possono essere riscontrate malformazioni coinvolgenti i sistemi nervoso centrale, oculare e uditivo.

Lo scopo del progetto è stato quello di caratterizzare il r(6) con una tecnica di elevata precisione permettendo di conoscere esattamente tutti i geni coinvolti nel difetto e di stabilire una più corretta associazione genotipo/fenotipo.

Illustriamo il caso di una bambina di 16 mesi con cariotipo 46,XX,r(6) che presenta un lieve ritardo psicomotorio, anomalie cardiache e malformazioni facciali. Il cromosoma ring è stato individuato inizialmente con la citogenetica tradizionale mentre le delezioni sia sul braccio p che sul braccio q sono state caratterizzate prima con la FISH e successivamente con l'array-CGH. I risultati ottenuti mostrano la presenza di delezioni in posizione 6p25.3 (1.3Mb) e 6q26.27 (6.7Mb). Confrontando i nostri dati con quelli della letteratura abbiamo valutato il ruolo di alcuni geni in relazione all'espressione clinica. In conclusione, descriviamo, per la prima volta, la caratterizzazione completa del r(6) fornendo ulteriori informazioni per studi di associazione genotipo-fenotipo, sia avvalorando il ruolo di geni candidati già presi in considerazione sia suggerendo nuovi geni target.

UN CASO DI RING DEL CROMOSOMA 10 A MOSAICO

C. Ardisia¹, P. Prontera¹, R. Romani¹, I. Manes¹, D. Rogai¹, V. Ottaviani¹, C. Gradassi¹, M. Schippa¹, I. Isidori¹, A. Mencarelli¹, E. Donti¹

¹*Centro di Riferimento Regionale di Genetica Medica, Azienda Ospedaliera "Santa Maria della Misericordia", Perugia*

Descriviamo il caso di un bambino di anni 13, giunto alla nostra osservazione per lieve disabilità intellettiva, ritardo del linguaggio, dismorfismi facciali, bassa statura, deficit di GH, criptorchidismo, scoliosi e miopia. L'esame citogenetico, eseguito su linfociti di sangue periferico mostrava la presenza di due linee cellulari: una maggioritaria (79%) a 46 elementi con un cromosoma 10 ad anello(p15q26.3) e l'altra (13%) con monosomia dello stesso cromosoma. Il cariotipo risultava dunque essere: mos46,XY,r(10)(p15q26.3[34]/45,XY,-10[12]. Nel rimanente 8% delle metafasi osservate erano presenti riarrangiamenti strutturali non clonali sempre a carico del cromosoma 10.

La caratterizzazione in FISH ha documentato: a) con sonda alfa –satellite la presenza di un solo centromero nel r(10); b) con sonda painting (WCP CHR 10) la stessa frequenza delle due linee cellulari osservata con il bandeggio GTG; c) l'utilizzo di sonde subtelomeriche per il braccio corto e lungo del cromosoma 10 non ha evidenziato perdite di queste specifiche regioni nel cromosoma riarrangiato, ish r(10)(wcp10+,D10Z1+,306F7+,137E24+)[100]/-10(wcp10x1,D10Z1X1,306F7X1,137E24X1)[11].

Anche l'analisi delle regioni subtelomeriche, effettuata con MLPA su DNA estratto da sangue periferico, e' risultata normale. Pochi sono i casi di r(10) descritti in letteratura. Le caratteristiche cliniche dei soggetti portatori sono variabili, ma costante è la presenza di un severo ritardo di crescita, ritardo mentale, bassa statura, microcefalia, dimorfismi minori. Tra i difetti clinici riscontrati nei casi descritti: idronefrosi e/o dilatazione dell'uretra, cataratta, atrofia della coroide, pigmentazione anomala della retina, atrofia ottica, microcefalia, palatoschisi, malformazioni cardiache, megacolon e ipoplasia renale. Il range di età di osservazione va da 0 a 10 anni di vita. Nel caso qui riportato non erano presenti malformazioni congenite gravi, probabilmente da attribuire alla posizione estremamente distale dei breakpoints associata a perdite minime di materiale del 10. Il fenotipo clinico del paziente è verosimilmente da riferire anche alla monosomia osservata, la cui distribuzione somatica verra' valutata analizzando altri tessuti.

REDUCED CATHEPSINS B AND D CAUSE IMPAIRED AUTOPHAGIC DEGRADATION THAT CAN BE ALMOST COMPLETELY RESTORED BY OVEREXPRESSION OF THESE TWO PROTEASES IN SAP C-DEFICIENT FIBROBLASTS

M. Motta¹, M. Tatti¹, M. Tartaglia¹, R. Salvioli¹

¹*Dept. of Haematology, Oncology and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Saposin (Sap) C deficiency, a rare variant form of Gaucher disease (GD), is due to mutations in the Sap C coding region of the prosaposin (PSAP) gene. Sap C is required as an activator of the lysosomal enzyme glucosylceramidase (GCase), which catalyzes glucosylceramide (GC) degradation. Deficit of either GCase or Sap C leads to the accumulation of undegraded GC and other lipids in lysosomes of monocyte/macrophage lineage.

Recently, we reported that Sap C mutations affecting a cysteine residue result in increased autophagy. Here, we characterized the basis for the autophagic dysfunction. We analyzed Sap C-deficient and GCase-deficient fibroblasts and observed that autophagic disturbance was only associated with lack of Sap C. By a combined fluorescence microscopy and biochemical studies, we demonstrated that the accumulation of autophagosomes in Sap C-deficient fibroblasts is not due to enhanced autophagosome-formation but to delayed degradation of autolysosomes caused, in part, to decreased amount and reduced enzymatic activity of cathepsins B and D. On the contrary, in GCase-deficient fibroblasts, the protein level and enzymatic activity of cathepsin D were comparable with control fibroblasts, whereas those of cathepsin B were almost doubled. Moreover, the enhanced expression of both these lysosomal proteases in Sap C-deficient fibroblasts resulted in close to functional autophagic degradation. Our data provide a novel example of altered autophagy as secondary event resulting from insufficient lysosomal function.

GENETIC ASPECTS OF DRAVET SYNDROME IN SOUTHERN ITALY

M. Gagliardi², P. Tarantino¹, F. Cavalcanti¹, M. Sesta⁵, D. Galeone⁵, G. Tortorella³, L. Graziadio¹, F. Falcone¹, A. Labate⁴, A. Quattrone⁴, A. Gambardella¹, G. Annesi¹

¹*Institute of Neurological Sciences, National Research Council, Cosenza*

²*University Magna Graecia, Catanzaro*

³*Departement of Neurosciences, Psychiatry and Anaesthesiology University of Messina, Messina*

⁴*Institute of Neurology, University Magna Graecia Catanzaro and Neuroimaging Research Unit, National Research Council, Germaneto*

⁵*Departement of Neurosciences, Psychiatry and Anaesthesiology Department of Neurology, Pediatric Hospital, Bari*

Dravet syndrome (DS), or severe myoclonic epilepsy of infancy (SMEI) is a genetically determined encephalopathy mainly caused by de novo mutations in the SCN1A gene. A small percentage of female patients with a DS-like phenotype might carry in the gene encoding protocadherin-19 (PCDH19) who were negative for mutations in the SCN1A gene. The aim of this study was to investigate the frequency of SCN1A mutations in 70 SMEI patients with epileptic encephalopathy of infancy (EEI) from southern Italy and to investigate the frequency of PCDH19 mutations in female patients who resulted negative for SCN1A mutations. All patients had seizures onset before 12 months of age, mild to severe mental retardation with poor language development, with or without ataxia. Genomic DNA from the patients was analysed by direct sequencing of the SCN1A and PCDH19 genes on an ABI 3130XL Avant automated sequencer. The genomic anomalies of the SCN1A gene were screened using MLPA and confirmed by real-time PCR. We identified 13 different heterozygous mutations of SCN1A gene in 13/70 patients with SMEI (18,57%) (Lys1246fsX1268, Phe807Leu, Arg1636X, p.1502del, Glu1021X, IV242A-G, Arg1886Gly, Thr1289Ile, IVS7+4delA, 3840insT, Ser1505X, del. ex 1-25, Tyr1460X). Thirty-one/70 female with genetic test negative for SCN1A mutations were analyzed for the PCDH19 gene. This analysis revealed three different heterozygous novel mutations (9,67%) (Ile508ProfsX59, Arg550Pro, Ser856Cys). We found 13 patients carrying different SCN1A mutations, thus confirming the high genetic heterogeneity related to DS. The proportion of patients with SCN1A mutations in our population is 18,57%. Previous studies a highly variable rate of SCN1A mutations, ranging from 30% to 80%. These discrepancies may be due to the sizes of the series, the use of different clinical criteria, or the inclusion of broader epileptic phenotypes. Also the results of this study indicate that PCDH19 mutations are a relatively frequent cause of EEI in Southern Italy. This frequency (9,67%) is comparable to that reported in previous studies.

SINDROME DI AICARDI ASSOCIATA A SBILANCIAMENTO GENOMICO AUTOSOMICO: COINCIDENZA O EVIDENZA DI UN'EREDITARIETA' AUTOSOMICA CON ESPRESSIONE LIMITATA AL SESSO? SINDROME DI AICARDI: L'IPOTESI AUTOSOMICA

V. Ottaviani¹, I. Isidori¹, P. Prontera¹, A. Bartocci², D. Rogai¹, I. Manes¹, G. Guercini³, A. Mencarelli¹, G. Stangoni⁴, E. Dotti¹

¹Unità Genetica Medica, Univ. degli Studi di Perugia, Osp. S. Maria della Misericordia, Perugia

²Neurofisiopatologia, Osp. S. Maria della Misericordia, Perugia

³Neuroradiologia, Osp. S. Maria della Misericordia, Perugia

⁴Strutt. Compl. Neonatologia, Osp. S. Maria della Misericordia, Perugia

La Sindrome di Aicardi (AIS) (Aicardi, 1965), è un raro disordine neuroevolutivo (sono stati descritti circa 200 casi in letteratura) ad eziologia sconosciuta, caratterizzato clinicamente da: agenesia del corpo calloso, spasmi infantili e lacune corioretiniche. Lo stesso autore (2005) ha revisionato i criteri diagnostici della sindrome, includendo: deficit intellettivo (da moderato a severo), microcefalia, dismorfismi facciali, coloboma del nervo ottico, anomalie del sistema nervoso centrale (eterotopie periventricolari, microgiria, dilatazione ventricolare o cisti porencefalica).

La sindrome interessa principalmente il sesso femminile pertanto si ritiene che possa essere dovuta a mutazioni X-linked dominanti de-novo, con letalità negli embrioni maschili emizigoti. La maggior parte degli studi cromosomici e genomici comparsi in letteratura ha evidenziato condizioni di normalità, tranne rare eccezioni.

In questo studio riportiamo il caso di una ragazza con i classici segni clinici della AIS (spasmi infantili, agenesia del corpo calloso, lacune corioretiniche, dismorfismi facciali e ritardo mentale moderato) in cui le analisi molecolari e citogenetico-molecolari (MLPA subtelomeric, array-CGH e FISH) hanno documentato una delezione a carico del braccio lungo del cromosoma 6 ed una duplicazione del braccio lungo del cromosoma 12, originatasi dalla malsegregazione di una traslocazione bilanciata materna. Le stesse analisi condotte in due fratelli maschi che presentano ritardo mentale ma non le caratteristiche cliniche dell'AIS, hanno portato ad evidenziare il medesimo sbilanciamento cromosomico.

Riteniamo che si possano formulare due ipotesi: a) l'associazione tra traslocazione autosomica e AIS è del tutto casuale e quindi il fenotipo AIS osservato dipende da fattori diversi da quelli identificati; b) l'effetto di dose di uno o più geni coinvolti nello sbilanciamento potrebbe agire in modo differenziale nei due sessi, suggerendo un'ipotesi eziologica alternativa e mettendo in evidenza una serie di potenziali geni candidati autosomici.

Lack of the VPS35 Asp620Asn mutation in southern Italian patients with familial Parkinson's disease

G. Annesi¹, M. Gagliardi², P. Tarantino¹, F. Cavalcanti¹, F. Falcone¹, M. Caracciolo¹, L. Graziadio¹, A. Gambardella¹, A. Quattrone³

¹*Institute of Neurological Sciences, National Research Council, Cosenza*

²*University Magna Graecia, Catanzaro*

³*Institute of Neurology, University Magna Graecia, Catanzaro, Italy Neuroimaging Research Unit, Institute of Neurological Sciences, National Research Council, Germaneto*

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disorder, affecting 2% of those over the age of 75 years. Although generally considered a sporadic disease, Mendelian forms of the disease are described (SNCA and LRRK2 for causing autosomal dominant PD and 3 genes causing autosomal recessive, juvenile PINK1, Parkin, DJ1). Recently using an exome sequencing based approach, 2 independent groups have identified a missense mutation in vacuolar protein sorting 35 homolog (VPS35 c.1858G>A; p.Asp620Asn) as the probable cause of late onset PD in a number of kindreds. To estimate the frequency of the Asp620Asn mutation in VPS35 in familial PD, we screened for this variant in a southern Italy PD cohort. Our population included 114 patients with familial PD, having at least 1 relative among their first degree, second degree, in third degree family members with a formal diagnosis of PD (major PD genes had been analyzed and positive cases (9 LRRK2) were not excluded. Genomic DNA was extracted from peripheral blood by standard method. The genotype was determined by genomic DNA amplification of a 229 bps fragment and sequencing was done on an ABI PRISM 3130 XL-AVANT Genetic Analyzer. This variant was not detected in any of the 150 analyzed familial PD cases, thus indicating that this mutation is rare among familial PD cases in the southern Italy. It would seem reasonable to conclude, therefore, that the recently published VPS35 mutation, is not a common cause of familial PD, in our population.

COUNTERACTING EFFECTS OPERATING ON SRC-HOMOLOGY 2 DOMAIN-CONTAINING PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE 2 (SHP2) FUNCTION DRIVE SELECTION OF THE RECURRENT Y62D AND Y63C SUBSTITUTIONS IN NOONAN SYNDROME

S. Martinelli¹, A.P. Nardoza², S. Delle Vigne¹, G. Sabetta³, P. Torreri⁴, G. Bocchinfuso³, E. Flex¹, S. Venanzi¹, G. Cesareni², L. Stella³, L. Castagnoli², M. Tartaglia¹

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

²*Dip. di Biologia, Università di Roma 'Tor Vergata', Rome, Italy*

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

⁴*Centro Nazionale Malattie Rare, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy*

Activating mutations in PTPN11 cause Noonan syndrome (NS), the most common non-chromosomal disorder affecting development and growth. PTPN11 encodes SHP2, a Src homology 2 (SH2) domain-containing protein tyrosine phosphatase that positively modulates RAS function. Here, we characterized functionally all possible amino acid substitutions arising from single-base changes affecting codons 62 and 63 to explore the molecular mechanisms lying behind the largely invariant occurrence of the Tyr62Asp and Tyr63Cys substitutions recurring in NS. We provide structural and biochemical data indicating that the autoinhibitory interaction between the N-SH2 and PTP domains is perturbed in both mutants as a result of an extensive structural rearrangement of the N-SH2 domain. Most mutations affecting Tyr63 exerted an unpredicted disrupting effect on the structure of the N-SH2 phosphopeptide-binding cleft mediating SHP2's interaction with signaling partners. Among all the amino acid changes affecting that codon, the disease-causing mutation was the only substitution that perturbed the stability of SHP2's inactive conformation without severely impairing proper N-SH2's phosphopeptide binding. On the other hand, the disruptive effect of the Tyr62Asp change on the autoinhibited conformation of the protein was balanced, in part, by less efficient binding properties of the mutant. Overall, our data demonstrate that the selection-by-function mechanism acting as driving force for PTPN11 mutations affecting codons 62 and 63 implies balancing of counteracting effects operating on the allosteric control of SHP2's function.

FREQUENZA DELL'APLOTIPO 5T-12TG NELLO SCREENING DI COPPIE SOTTOPOSTE A PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA

L. Ferbo¹, M. Siepi¹, S. Gaeta¹, M. Ventruto¹, M.A. Police¹

¹*Laboratorio di Genetica Medica, A.O.R.N. S. G. Moscati, Avellino*

Lo studio del gene CFTR, le cui mutazioni sono responsabili della Fibrosi Cistica, è eseguito di routine nelle coppie che si sottopongono a fecondazione assistita, vista l'elevata incidenza di portatori sani nella popolazione (1:27). Le mutazioni a carico del gene CFTR sono associate ad un ampio spettro di fenotipi che vanno dalla forma "classica" di FC alle diverse forme "mild", caratterizzate da un fenotipo meno grave che comprende FC con insufficienza pancreatica, bronchiectasia e sterilità maschile dovuta a azoospermia ostruttiva da CBAVD (congenital bilateral absence of the vas deferens), e a oligozoospermia.

Abbiamo effettuato su 580 coppie lo screening di primo livello delle mutazioni del gene CFTR, approfondendo lo studio dei soggetti portatori di IVS8-5T, poichè l'aplotipo 5T-12/13TG provoca una diminuzione dell'efficienza di splicing e quando associato ad un'altra mutazione in trans è causa di una forma "mild" di fibrosi cistica. Pertanto è stato analizzato il tratto a monte del poliT contenente un numero variabile di ripetizioni TG (9-13). Dai nostri dati è emerso che il 4,3% dei maschi ha aplotipo 5T-12TG, di cui soltanto l'8% presentava CBAVD, eterozigote composto (DeltaF508/5T-12TG) e il 36% presentava oligozoospermia.

Le donne presentavano frequenza dell'aplotipo 5T-12TG pari al 5.7% di cui il 41.7% aveva infertilità idiopatica che potrebbe mostrare associazione con l'aplotipo riscontrato.

Visti i dati ottenuti si suggerisce di estendere la ricerca delle mutazioni CFTR a tutti i casi di infertilità maschile con azoospermia e di lasciare al campo della ricerca l'approfondimento delle varianti nell'infertilità femminile.

MARKER CROMOSOMICI SOVRANNUMERARI: 10 ANNI DI ATTIVITA' E CASI PARTICOLARI IN UN LABORATORIO DI GENETICA MEDICA

S. Gaeta¹, L. Ferbo¹, M. Siepi¹, L. Cuomo¹, A. Pedicini¹, M.A. Police¹

¹Laboratorio di Genetica Medica, A.O.R.N. S. G. Moscati, Avellino

I marker cromosomici soprannumerari sono cromosomi anomali che non possono essere identificati dalla sola citogenetica tradizionale (ISCN,2009).La loro frequenza nella popolazione varia tra lo 0.028% e 0.15% (Liehr,2007).Gli sSMC sono il risultato di errori numerici o riarrangiamenti strutturali di cui la maggior parte deriva dalle braccia corte e dalle regioni pericentromeriche dei cromosomi acrocentrici (Crolla,2005) ed in particolare dal cromosoma 15 (Webb,T,1994).La presenza di un marker cromosomico potrebbe comportare UPD.Circa un terzo degli sSMC causano quadri clinici mentre molti marker cromosomici soprannumerari non sono correlati ad alcuna sindrome.

MATERIALI E METODI

Bandeggi RHG ,GTG ,CBG ed AgNOR; FISH ;test di metilazione-specifica (MSP).

CASI CLINICI

In 10 anni di attività dell'UOC Laboratorio di Genetica Medica dell'AORN "SG Moscati" (AV),sono state effettuate 11950 analisi del cariotipo su SP,LA e mat. abortivo,di cui 29 con presenza di marker soprannumerari (0.24).

Vengono descritti due casi particolari.

CASO I: 47,XX, i(12p)/46,XX

La paziente, coniugata con un non consanguineo, alla seconda gravidanza si è sottoposta ad amniocentesi. Il cariotipo ha rivelato la presenza a mosaico (50%) di un marker cromosomico.Sono stati effettuati i bandeggi CBG ed Ag-NOR ai quali l'sSMC è risultato metacentrico non satellitato.L'apparenza citogenetica indirizzava verso un isocromosoma soprannumerario derivante dal braccio corto del cromosoma 12.Tale ipotesi è stata confermata da una FISH su cromosomi in metafase con sonde WCP (Vysis), per il cromosoma 12.

CASO II: 47, XY, inv(12)(p11.2q13.2),+ish mar der(14/22) (D14Z1/D22Z1+, N25-)

Il probando si è sottoposto ad indagine del cariotipo per astenospermia.Lo studio del cariotipo ha evidenziato un'inversione pericentrica di un cromosoma 12 ed un marker soprannumerario de novo: 47XY, inv(12)(p11.2q13.2),+mar.Mediante i bandeggi CBG ed AgNOR si è evinto che il marker cromosomico è metacentrico e monosatellitato.E' stata eseguita la FISH con sonda alpha-satellite per i cromosomi 14/22 ed una FISH specifica il cr. 22.L'indagine FISH ha rivelato che il marker cromosomico ha origine dalle regioni centromeriche dei cromosomi 14/22.

P060

UN NUOVO CASO DI MICRODUPLICAZIONE 17p13.3

S. Caruso¹, A. Pico¹, S. Mauro¹

¹*Laboratorio di Genetica Medica, Presidio Ospedaliero Vito Fazzi, Lecce*

PREMESSA

La microduplicazione della regione deleta nella Sindrome di Miller-Dieker (MDS) è stata identificata di recente mediante studi di array-based comparative genomic hybridation (a-CGH), con la descrizione di nuovi disordini genomici nel locus MDS. I riarrangiamenti descritti sono compresi tra 59 kb e 4 Mb. Il quadro clinico è variabile e comprende il ritardo psicomotorio, da lieve a moderato, l'ipotonia e alcuni lievi dismorfismi craniofacciali.

SCOPO DELLO STUDIO

Evidenziare un probabile riarrangiamento genomico in una donna di 40 anni con disturbo bipolare e disabilità intellettiva che nel corso degli anni aveva avuto un peggioramento del quadro comportamentale e alla quale era stato effettuato, quale unico esame genetico, il cariotipo su sangue periferico secondo le tecniche convenzionali.

MATERIALI E METODI

Piattaforma a-CGH oligo 44k con software BlueFuse e conferma mediante sonde FISH.

RISULTATI

Microduplicazione di 3.4 Mb del cromosoma 17p13.3p13.2

CONCLUSIONI

Questo contributo aggiunge nuove caratteristiche al fenotipo clinico della microduplicazione 17p3.3.

NOVEL VARIANTS AND INTRAGENIC REARRANGEMENTS OF MATERNAL ORIGIN ARE PRESENT IN ID/ASD PATIENTS IN THE GENE CADPS2

E. Bonora¹, F. Minopoli¹, E. Bacchelli², P. Magini¹, C. Diquigiovanni¹, S. Lomartire², P. Parchi³, A. Parmeggiani³, L. Mazzone⁴, A. Battaglia⁵, C. Graziano¹, E. Maestrini², M. Seri¹, G. Romeo¹

¹*Unit of Medical Genetics, Dept of Medical and Surgical Sciences, University of Bologna, Italy*

²*Dept of Biology, University of Bologna, Italy*

³*Dept of Neurological Sciences, University of Bologna, Italy*

⁴*IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, UO di NPI, Roma*

⁵*Stella Maris Clinical Research Institute for Child and Adolescent Neurology and Psychiatry, Calambrone (Pisa), Italy*

Over the last decade a large effort has been made in order to elucidate the genetic causes of two childhood psychiatric disorders, i.e. intellectual disability (ID) and Autism spectrum disorders (ASDs). ID is not a single disease entity, but a highly heterogeneous group of syndromic and nonsyndromic disorders that have impaired intellectual abilities as a common hallmark. ASDs are complex neurodevelopmental conditions characterized by social and verbal communication impairments, and stereotyped and repetitive behaviors. Recent studies revealed that mutations in the same gene(s) can be found in individuals with either ID or ASDs¹.

We identified a novel intragenic deletion in CADPS2, a gene mapping to chromosome 7q31 in two affected sibs, a male and a female presenting mild ID, epilepsy and autistic behaviours. The deletion maps between exon 4 and exon 28, is not present in the father and in a healthy maternal uncle.

CADPS2 maps to the AUTS1 locus, it is involved in the release of neurotrophins² and alternative spliced forms were reported to be more frequent in individuals with ASD or with lower IQ, although data from different groups are controversial³. Therefore 120 ID/ASD sporadic patients were selected for mutation screening and novel heterozygous variants were found in the coding region. From segregation analysis, an excess of maternal transmission was identified. We investigated the allelic expression of CADPS2 in blood RNA of individuals heterozygous for a coding SNP: preliminary data indicated that CADPS2 is monoallelically expressed; when parental origin could be determined the expressed allele is the maternal one, suggesting an imprinting effect. Further experiments are ongoing to confirm these data in additional individuals, and to investigate CADPS2 expression in different human brain regions. In parallel, we are investigating the methylation status of CADPS2 CpG islands. The putative imprinting status of Cadps2 will also be investigated in mouse tissues.

1 Geschwind DH Trends Cogn Sci 2011, 15:409-16.

2 Sadakata Tet al Cerebellum 2009, 8:312-22

3 Sadakata T et al J Clin Invest 2007, 117:931-43.

Association studies of 102T/C 5-HT2A polymorphism and risperidone and olanzapine early response in schizophrenia symptoms.

A. Minelli¹, E. Sacchetti², C. Scassellati³, B. Cesana⁴, P. Valsecchi², C. Congiu¹, C. Bonvicini³, M. Gennarelli¹

¹*Dept. of Biomedical Sciences and Biotechnologies, Biology and Genetics Division, Brescia University School of Medicine, Brescia, Italy*

²*Dept. of Mental Health, Brescia Spedali Civili, and University Psychiatric Unit, Brescia University School of Medicine, Brescia, Italy*

³*Genetics Unit, I.R.C.C.S. "San Giovanni di Dio" - Fatebenefratelli, Brescia, Italy*

⁴*Dept. of Biomedical Sciences and Biotechnologies, Section of Medical Statistics and Biometry, Brescia University School of Medicine, Brescia, Italy*

Antipsychotic drugs are the preferred choice for schizophrenia treatment; however, treatment response is often variable. Several studies in schizophrenia have implicated a role of the serotonin receptor gene HTR2A 102T/C polymorphism in treatment response to these drugs, with heterogeneous results. In a replication attempt we carried out a genetic association study of 102T/C polymorphism and antipsychotic response in two samples of schizophrenia patients treated in monotherapy for two weeks with risperidone (n=117) and olanzapine (n=100).

We show that homozygosity the T allele of the 5-HT2A 102T/C polymorphism is associated with a higher improvement in cognitive symptoms with risperidone and a poorer improvement in anxiety symptomatology with olanzapine using a multifactor analyses.

We suggest that 5-HT2A gene is involved also in the early action mechanisms of antipsychotics. The pharmacogenetic of early response could be more useful in clinical practice and get more feasible the setup of multicenter research trials to achieve larger samples.

IL PERCORSO DIAGNOSTICO DOPO DIAGNOSI PRENATALE DI ERNIA DIAFRAMMATICA CONGENITA

A. Peron¹, B. Gentilin¹, I. Fabietti², R. Fogliani², T. Rizzuti³, S. Gana⁴, M.F. Bedeschi¹

¹UOD Genetica Medica, Dip. Area della salute della donna del bambino e del neonato, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

²UOS Diagnosi Prenatale, Dip. Area della salute della donna del bambino e del neonato, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

³UO di Anatomia Patologica, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

⁴Genetica Medica, Università di Pavia, Pavia

L'ernia diaframmatica congenita (CDH), che si realizza alla 6° settimana gestazionale per incompleta chiusura della cupola diaframmatica, comporta un'erniazione dei visceri addominali nel torace e conseguente compressione e dislocazione degli organi mediastinici controlateralmente al difetto. L'incidenza è di circa 1/2000 nati vivi con una sopravvivenza dopo intervento chirurgico di circa il 65%. La diagnosi ecografica prenatale è potenzialmente possibile a partire dalla 12° settimana di gestazione. Nel 60% dei casi la malformazione è isolata, mentre nel 30% è associata ad altre malformazioni, e nel 10% fa parte di sindromi genetiche. La causa del difetto diaframmatico è identificabile solo nel 15-20% dei casi. Nella fase prenatale la definizione della prognosi è molto complessa.

Descriviamo la casistica dell'U.O di Diagnosi Prenatale della Clinica Mangiagalli di Milano riferita al periodo 2007 - 2011. Per tutte le pazienti, dopo la diagnosi, è stato effettuato l'esame ecografico di secondo livello con ecocardiografia fetale, la consulenza genetica, l'acquisizione del cariotipo fetale e/o Array-CGH, e la RMN fetale nei casi dubbi di erniazione epatica o anomalie associate.

La casistica comprende 38 casi di CDH. L'epoca gestazionale media alla diagnosi è stata di 24 settimane (12-40). Sono state diagnosticate 29 ernie sinistre (76,3%), 7 destre (18,4%) e 2 eventrazioni (5,3%). In 23 casi (61%) la diagnosi è stata di CDH isolata; in due di questi il follow-up ha però rivelato la presenza di ulteriori malformazioni. In 15 casi (39%) l'ernia era associata ad altre anomalie ecografiche. Il cariotipo fetale ha evidenziato un caso di trisomia 18, uno di sindrome di Pallister-Killian ed un riarrangiamento complesso. L'analisi Array-CGH è stata eseguita sui casi complessi. La diagnosi di altri 5 casi sindromici (3 sindromi di Fryns, 1 sindrome di Apert, 1 sospetta sindrome di Goltz) è stata raggiunta solo dopo la nascita/interruzione della gravidanza.

I nostri dati sottolineano l'importanza di un percorso prenatale multidisciplinare dopo riscontro di CDH sia per la definizione prognostica del feto che per la corretta informazione alla coppia di genitori. Ancora molto limitata è la definizione eziologica durante la gravidanza.

DISORDINE DELLA GLICOSILAZIONE ASSOCIATO A DIFETTI NELLA FOSFOMANNOMUTASI 2: FENOTIPIZZAZIONE BIOCHIMICA PER UN NUOVO APPROCCIO TERAPEUTICO

G. Andreotti¹, M.V. Cubellis²

¹*Istituto di Chimica Biomolecolare-CNR, Pozzuoli-Napoli, Italy*

²*Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università Federico II, Napoli, Italy; Istituto di Biostrutture e Bioimmagini-CNR, Napoli, Italy*

La deficienza di fosfomannomutasi II (PMM2) e' il piu' comune fra i disordini congeniti della glicosilazione (CDG). Questa patologia, PMM2-CDG, conosciuta in passato come sindrome di Jaeken o CDG-1a, é una malattia rara autosomica recessiva. Individui portatori di un singolo allele mutato sono asintomatici mentre i pazienti sono generalmente eterozigoti composti per due mutazioni missenso di cui almeno una conserva una residua attività enzimatica (mutazione ipomorfa). Una precisa caratterizzazione biochimica della proteina mutata e' necessaria per sviluppare farmaci specifici ed è possibile che non esista una singola terapia appropriata a tutti i genotipi.

Abbiamo caratterizzato oltre all'enzima wild type anche la F119L-PMM2 che e' la piu' frequente mutazione ipomorfa trovata nei pazienti PMM2-CDG e una delle poche osservate anche in omozigosi.

Abbiamo provato che la mutazione produce parecchi effetti deleteri sulla proteina, ne riduce l'attività e la stabilità e danneggia la struttura quaternaria.

Questi risultati rendono conto del fatto che i pazienti affetti da questa mutazione manifestano generalmente una sintomatologia grave.

Una precisa conoscenza del fenotipo al livello biochimico ci permette di proporre un approccio terapeutico che potrebbe essere utile per trattare pazienti PMM2-CDG affetti da mutazioni gravi come F119L.

Abbiamo infatti individuato delle molecole che stabilizzano l'enzima mutato migliorandone la stabilità termodinamica e la resistenza alle proteasi. Queste molecole possono essere utilizzate come composti guida per la progettazione di chaperone farmacologici o di attivatori.

RIARRANGIAMENTI STRUTTURALI DEL BRACCIO LUNGO DEL CROMOSOMA 3 NELLE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE : DATI CITOGENETICI RACCOLTI NEL NOSTRO LABORATORIO E CORRELAZIONE CLINICA

L. Vicari¹, M. Annunziata², M. Tarsitano³, P. Angelillo², U. Sessa⁴, P. Friso¹, M.L. Cavaliere¹

¹*U.O.C. Genetica Medica, A.O.R.N. Cardarelli, Napoli*

²*U.O.C. Ematologia con TMO, A.O.R.N. Cardarelli, Napoli*

³*CEINGE, Napoli*

⁴*U.O.C. Tere, A.O.R.N. Cardarelli, Napoli*

I riarrangiamenti strutturali del braccio lungo del cromosoma 3 nelle leucemie mieloidi acute (LMA) con punti di rottura localizzati in 3q21 e 3q26 sono rari ma ricorrenti. Nella recente classificazione WHO (2008), le LMA con inv(3)(q21q26.2) e t(3;3)(q21;q26.2) sono state riconosciute come nuove entità nella categoria delle LMA con "alterazioni genetiche ricorrenti", caratterizzate da scarsa risposta alla terapia e prognosi infausta. LMA con inv(3)/t(3;3) rappresentano circa il 2-2.5% delle LMA, presentano alla diagnosi displasia multilineare e over-espressione del gene ecotropic virus integration site 1 (EV11). Alterazioni cromosomiche aggiuntive a inv(3)/t(3;3) sono frequenti, in particolare -7/7q-, -5/5q- e cariotipo complesso. Più raramente sono stati identificati altri riarrangiamenti che coinvolgono le bande 3q21 e 3q26 con partners cromosomici diversi e la loro rilevanza prognostica non è ancora stata definita. Nel nostro laboratorio abbiamo diagnosticato 28 casi di riarrangiamenti 3q negli ultimi 10 anni. L'analisi citogenetica è stata eseguita su agoaspirato midollare usando tecniche standard e bandeggio RHG, classificando le anomalie secondo ISCN. Abbiamo diviso questi pazienti in 3 gruppi: riarrangiamenti inv(3)/t(3;3), riarrangiamenti in 3q21, riarrangiamenti in 3q26. Di questi pazienti, 20 sono valutabili per analisi di sopravvivenza, mentre 7 sono persi al followup a breve distanza dalla diagnosi. Un paziente non è valutabile perché la diagnosi è stata effettuata recentemente ed è in corso terapia d'induzione. Lo scopo del nostro studio è valutare le caratteristiche cliniche e di laboratorio all'esordio dei pazienti affetti da LMA con alterazioni del cromosoma 3q, e valutare inoltre il valore prognostico di tali alterazioni citogenetiche sulla risposta alla chemioterapia convenzionale e sulla sopravvivenza globale(OS).

EMOCROMATOSI TIPO 4: UNA NUOVA MUTAZIONE NEL GENE DELLA FERROPORTINA

L. Pagano¹, C. Arosio², D. De Brasi¹, M. Ammirabile¹, A. Spasiano⁴, F. Grasso¹, A. Salamandra¹, M.L. Cavaliere¹, A. Piperno³

¹*U.O.C. Genetica Medica ,A.O.R.N. Cardarelli, Napoli*

²*Consorzio per la Genetica Molecolare, Monza*

³*Clinica Medica, Università Milano-Bicocca, A.O. S. Gerardo*

⁴*U.O.D. Microcitemia ,A.O.R.N. Cardarelli, Napoli*

L'Emocromatosi(EE) è una malattia ereditaria che conduce al progressivo sviluppo di un sovraccarico di ferro e di danno ferro-correlato a livello di diversi organi e tessuti.

La maggior parte dei casi di EE è ascrivibile al gene HFE e alle sue più comuni mutazioni(C282Y e H63D). Questa forma è detta EE classica o tipo 1. Esistono altre forme di EE:

- giovanile o tipo 2 che è una forma severa ad insorgenza precoce dovuta a mutazioni dei geni di emogiuvellina(2a) dell'epcidina (2b);

- tipo 3 che ha fenotipo intermedio tra forma classica e giovanile e dipende da mutazioni del gene del recettore della transferrina

- tipo 4 che a differenza delle precedenti ha una trasmissione autosomica dominante, ed è dovuta a difetti della ferroportina (Fpn)l'unico noto esportatore cellulare del ferro. Si distinguono due forme:A e B. La prima, più comune, è caratterizzata da una saturazione della transferrina normale e un accumulo di ferro che coinvolge in prima battuta le cellule di Kupffer e, in seguito, anche gli epatociti; il tipo B presenta un fenotipo simile all'EE di tipo 1.

L'Fpn è il recettore dell'epcidina, un ormone che ne determina l'internalizzazione e la sua degradazione producendo un ridotto assorbimento di ferro a livello intestinale e del suo rilascio dai macrofagi.

Mutazioni diverse di Fpn possono causare un deficit di ferroportina (tipoA) o una resistenza all'epcidina (tipo B). E' pervenuta nel nostro ambulatorio una famiglia di origine campana. Il padre n.03-09-68 presentava un valore di ferritina di 2005#g/L sideremia 70 mcg/dL e saturazione della transferrina del 30%; il figlio n.21-09-95 ferritina 677#g/L ; sideremia 86 mcg/dl e saturazione 20%; la figlia 09-01-2002 ferritina 510#g/L; sideremia 90 mcg/dl e saturazione del19%. La trasmissione autosomica dominante e la normalità della saturazione della transferrina ci ha fatto supporre una EE tipo 4 A. La ricerca di mutazioni nel gene della Fpn è stata condotta mediante sequenziamento diretto del DNA genomico, dell'intera regione codificante e delle relative regioni di splicing. Il padre è risultato eterozigote per la variante aminoacidica Gln182Glu (Q182E),c.544 C#G nell'esone 6 del gene. Tale variante aminoacidica non risulta ancora essere descritta in letteratura.

STUDIO SUI TUMORI EREDITARI DIFFUSI DELLO STOMACO: CARATTERISTICHE CLINICO-PATOLOGICHE DEI CASI RECLUTATI PRESSO L'ISTITUTO EUROPEO DI ONCOLOGIA (IEO)

D. Serrano¹, I. Feroce¹, M. Barile¹, L. Bernard⁵, V. Pensotti⁶, G.N. Ranzani⁴, V. Molinaro⁴, S. Pozzi¹, N. Fazio¹, F. Spada¹, A. Sonzogni¹, E. Botteri¹, R. Biffi¹, B. Andreoni¹, P.P. Bianchi¹, S. Mora¹, B. Bonanni¹

¹*Istituto Europeo di Oncologia, Milano*

²*Consortium for Genomic Technologies (Cogentech), Milano*

³*Istituto FIRC di Oncologia Molecolare (IFOM), Milano*

⁴*Dipartimento di Biologia e Biotecnologie dell'Università di Pavia, Pavia*

⁵*Istituto Europeo di Oncologia, Milano, Consortium for Genomic Technologies (Cogentech), Milano*

⁶*Consortium for Genomic Technologies (Cogentech), Milano, Istituto FIRC di Oncologia Molecolare (IFOM), Milano*

Background. Il carcinoma gastrico diffuso ereditario (HDGC) è una sindrome caratterizzata da insorgenza precoce del cancro gastrico diffuso (DGC) a cui si può associare anche il carcinoma lobulare (CLI) della mammella. Questa sindrome è associata ad una mutazione costitutiva del gene per l'E-caderina (CDH1) in circa il 40% delle famiglie con casi di DGC. L'espressione dell'E-caderina è spesso assente o alterata anche nei DGC di tipo sporadico.

Abbiamo disegnato uno studio mirato a valutare difetti costitutivi, fra cui quelli d'espressione, del gene CDH1 in soggetti con possibile predisposizione genetica per HDGC.

Metodi: Per la selezione dei soggetti abbiamo utilizzato i criteri di Brooks-Wilson: 2 casi di carcinoma gastrico con almeno un caso di DGC diagnosticato prima dei 50 anni; 3 casi di ca gastrico con almeno un DGC indipendentemente dall'età; donne con diagnosi di CLI della mammella e almeno un DGC; singolo caso di DGC \leq 45 anni.

Risultati e conclusioni: Dal tumor registry dello IEO nell'arco di tempo dal 2000 al 2011 abbiamo selezionato 181 pazienti (pts) affetti da carcinoma dello stomaco con diagnosi <45 anni indipendentemente dalla storia familiare; 38 pazienti con diagnosi >45 anni e accertata familiarità. Di questi solo quelli con attivo follow-up presso lo IEO sono stati ricontattati per proporre il test molecolare e 27 soggetti hanno aderito allo studio. La stadiazione era rispettivamente 6 pts Ia, 6 Ib, 5 II, 9 IV, una pt è stata inserita per un CLI stadio I. L'immunoistotipo dei 26 tumori gastrici era 6 DGC, di cui 4 misti, 12 a cellule ad anello con castone, 1 di tipo intestinale, 3 definiti come altro. Per mutazione CDH1, 19 pts erano wild-type, 2 con mutazione patogenetiche, 6 con mutazione a significato incerto (UV). Le 2 mutazioni patogenetiche, una di splicing e una delezione degli esoni 7-8, sono state riscontrate in due pts: una con DGC diagnosticato a 32 anni, pregresso linfoma di Hodgkin e familiarità negativa; la seconda con CLI della mammella a 36 anni, madre CLI a 45 anni e nonna materna con carcinoma gastrico a 62 anni e CLI a 65 anni. I pazienti con UV, 4 maschi e 2 femmine, avevano un range di età alla diagnosi compresa tra 33 e 41 anni e solo 2 avevano familiarità per carcinoma gastrico.

GluD1 is down-regulated in both MECP2-mutated and CDKL5-mutated iPS cells

G. Livide¹, E. Grillo¹, C. Lo Rizzo¹, M.A. Mencarelli¹, F. Mari¹, F. Ariani¹, A. Renieri¹, I. Meloni¹

¹*U.O. Genetica Medica, Policlinico "Le Scotte", Siena*

Rett syndrome is a monogenic disease due to de novo mutations in either MECP2 (classic and Zappella variant) or CDKL5 genes (early onset seizure variant). In spite of their involvement in the same disease, a functional interaction between the two genes has not been proven. MeCP2 is a transcriptional regulator; CDKL5 encodes for a kinase protein that might be involved in the regulation of gene expression. Therefore, we hypothesized that the two genes may lead to similar phenotypes by dys-regulating the expression of common genes. To test this hypothesis we used induced pluripotent stem (iPS) cells derived from fibroblasts of one Rett patient mutated in MECP2 (p.R306C) and 2 patients with mutations in CDKL5 (p.Q347X and p.T288I). Expression profiling was performed in CDKL5 mutated cells by microarray technology (Agilent platform) and interesting genes were confirmed by real-time RT-PCR in both CDKL5 and MECP2 mutated cells. The only major change in gene expression common to MECP2-mutated and CDKL5-mutated iPS cells was for GRID1, encoding for glutamate d1 receptor (GluD1), a member of delta family of ionotropic glutamate receptors. GluD1 does not form AMPA or NMDA glutamate receptors. It acts like an adhesion molecule by linking the postsynaptic and presynaptic compartments and inducing preferentially inhibitory presynaptic differentiation of cortical neurons. Our results demonstrate that GRID1 gene is down-regulated in both MECP2-mutated and CDKL5-mutated iPS cells, providing the first functional link between the two genes. These data give novel insights into disease pathophysiology and pinpoint to possible targets for new therapeutic approaches.

MCKUSICK-KAUFMAN OR BARDET-BIEDL SYNDROME? A NEW BORDERLINE CASE IN AN ITALIAN NONCONSAUINGUEOUS HEALTHY FAMILY

M. Chetta¹, N. Bukvic³, V. Bafunno², M. Sarno⁴, R. Magaldi⁴, G. Grilli⁴, V. Bertozzi⁴, F. Perfetto⁴, M. Margaglione²

¹*Università degli Studi di Milano*

²*Università degli Studi di Foggia, Lab. Genetica Medica*

³*Ospedali Riuniti di Foggia, Il Lab. Citogenetica*

⁴*Ospedali Riuniti di Foggia*

McKusick-Kaufman syndrome (MKS, OMIM #236700) is a rare syndrome inherited in an autosomal recessive pattern with a phenotypic triad comprising hydrometrocolpos (HMC), postaxial polydactyly (PAP), and congenital cardiac disease (CHD). The syndrome is caused by mutations in the MKKS gene mapped onto chromosome 20p12 between D20S162 and D20S894 markers. Mutations in the same gene causes Bardet-Biedl-6 syndrome (BBS-6, OMIM #209900) inherited in an autosomal recessive pattern. BBS-6 comprises retinitis pigmentosa, polydactyly, obesity, mental retardation, renal and genital anomalies. HMC, CHD, and PAP defects can also occur in BBS-6, and there is a significant clinical overlap between MKS and BBS-6 in childhood. We describe a new borderline case of MKS and BBS syndrome and suggest insights for understanding correlation between MKKS gene mutations and clinical phenotype. Here, we report the results of molecular analysis of MKKS in a female proband born in an Italian nonconsanguineous healthy family that presents HMC and PAP. The mutational screening revealed the presence of two different heterozygous missense variants (p.242A>S in exon 3, p.339 I>V in exon 4) in the MKKS gene, and a nucleotide variation in 5'UTR region in exon 2 (-417 A>C).

UNA NUOVA MUTAZIONE IN DYNC1H1 ASSOCIATA A NEUROPATIA MOTORIA E DEFICIT DI MIGRAZIONE NEURONALE

F. Moro¹, G. Astrea¹, M.C. Meschini¹, E. Inguaggiato¹, F.M. Santorelli¹, C. Fiorillo¹

¹*IRCCS Fondazione Stella Maris, Calambrone, Pisa*

Il gene DYNC1H1 codifica per la catena pesante della dineina 1 citoplasmatica, una proteina che grazie all'energia di idrolisi dell'ATP si muove lungo i microtubuli, trasportando macromolecole e microorganelli. Analogamente ad altre proteine- motore, la dineina citoplasmatica svolge funzioni fondamentali quali la formazione e separazione del fuso mitotico e il trasporto assonale retrogrado nei neuroni. Mutazioni della catena pesante della dineina citoplasmatica sono state recentemente riportate in diverse patologie neuromuscolari ed in particolare in una famiglia con una forma dominante di neuropatia sensitivo-motoria assonale (CMT-2O) [1] in 3 famiglie affette da una forma di atrofia muscolare spinale agli arti inferiori (SMA-LED) [2,3] e in due casi sporadici con difetti di migrazione neuronale [4,5]. Simili aspetti si ritrovano in parte in modelli murini spontanei di alterata dineina 1 citoplasmatica [6].

Abbiamo identificato una nuova mutazione localizzata nella regione N-terminale "tail" della proteina DYNC1H1 (c.3581A>G/p.Q1194R) in un paziente affetto da una forma di neuropatia puramente motoria ad esordio congenito ed evoluzione benigna, in cui si associavano ritardo dello sviluppo cognitivo e anomala girazione del lobo frontale.

L'analisi molecolare è stata effettuata mediante RT-PCR e sequenziamento da fibroblasti del probando.

Predizioni in silico indicano che la mutazione è deleteria per la funzione della proteina e induce un'alterazione conformazionale compromettendo la regione "tail" della proteina necessaria sia per l'omodimerizzazione sia per l'interazione della dineina con altre proteine.

Il quadro di neuropatia motoria osservato nel nostro caso e la presenza di un deficit di migrazione neuronale centrale contribuiscono ad ampliare lo spettro fenotipico associato a mutazioni in DYNC1H1 nell'ambito delle malattie del sistema nervoso centrale e periferico.

Bibliografia

1. Weedon MN, et al. *Am J Hum Genet.* 2011; 89:308-312.
2. Harms MB, et al *Neurology.* 2010;75:539-546.
3. Harms MB, et al *Neurology.* 2012;78:1714-1720.
4. Willemsen MH, et al. *J Med Genet.* 2012; 49:179-183.
5. Vissers Leet al.. *Nature Genet.* 2010; 42:1109-1112.
6. Hafezparast M, et al. *Science* 2003; 300:808-812.

SINDROME PEHO, (O SYNDROME PEHO-LIKE ?) LA STORIA NATURALE, SCATURITA DA UN FOLLOW-UP DI 22 ANNI, IN UNA NUOVA PAZIENTE. LA INDIVIDUAZIONE DI UNA DUPLICAZIONE DI 320 KB ALLA REGIONE CROMOSOMICA 7p15.1, NELLA PROPOSITA E NEL PADRE CLINICAMENTE NORMALE

S. Baffini¹, G. Scarselli², J. Barp³, E. Chiappini³, P. Lionetti³, M. Paci⁴, O. Galesi⁶, M. Fichera⁵, L. Castiglia⁶, M.L. Giovannucci Uzielli¹

¹*Genetic Science, Firenze, Italia*

²*Dip. di Neurologia Pediatrica, Università degli Studi di Firenze*

³*Dip. di Scienze della Salute della Donna e del Bambino, Università degli Studi di Firenze*

⁴*AOU A. Meyer, Firenze, Italia*

⁵*Genetica Medica, Università degli Studi di Catania*

⁶*Laboratorio di Genetica Medica, OASI Maria SS. Troina (Enna)*

La sindrome PEHO (Progressive Encephalopathy with oedema, Hypsarrhythmia, and Optic atrophy) è disordine genetico raro, caratterizzato da ritardo mentale severo, ipotonia, difficoltà motorie costanti, edema congenito e persistente, caratteristiche faciali peculiari. La prima delineazione, riportata da Salonen ed altri nel 1991, è frutto dello studio di un piccolo cluster di pazienti nella popolazione finlandese, integrata due anni più tardi da Somer ed altri. Pochi i casi riportati in letteratura in soggetti non-finlandesi, in particolare nord-americani, australiani, inglesi e giapponesi. La presenza, nel quadro clinico, di alcune differenze, soprattutto a livello dei reperti neuro-radiologici, può giustificare la distinzione di un disordine PEHO-like. E' stato ipotizzato un meccanismo di trasmissione Autosomico Recessivo. La paziente da noi osservata presenta un fenotipo del tutto caratteristico, con edema congenito persistente e generalizzato, ritardo psicomotorio severo, costante, ed altri gravi aspetti di encefalopatia progressiva. Non acquisizione di posizione assisa ed eretta, non deambulazione autonoma. Microcrania, lunghezza definitiva intorno ai 146 cm. La facies presenta dismorfismi peculiari, assolutamente sovrapponibili a quelli riportati in soggetti australiani, da Field ed altri nel 2003. Nella paziente, in varie età della vita, abbiamo condotto indagini diagnostiche diverse, a livello anche strumentale, senza acquisire elementi utili. Normali i risultati delle analisi citogenetiche con tecniche convenzionali.

La ricerca di sbilanciamenti genomici mediante array-CGH, con la metodica Human Genome CGH 60K Oligo Microarray kit (AMADID 21924, Agilent Technology), ha messo in evidenza, nella paziente ed anche nel padre normale, una duplicazione di circa 320 kb, nella regione cromosomica 7p15.1. La duplicazione, non nota, non è stata riportata, in particolare, in soggetti con PEHO e PEHO-like.

TWO NOVEL MUTATIONS IN THE ATGL GENE CAUSE NEUTRAL LIPID STORAGE DISEASE WITH MYOPATHY

S. Missaglia¹, B. Giardina², E.M. Pennisi³, C. Redaelli¹, G. Invernici¹, M. Arca⁴, R.A. Coleman⁵, D. Tavian¹

¹ *Lab. of Human Molecular Biology and Genetics, Catholic University of the Sacred Heart, Milan*

² *Lab. of Clinical Molecular Diagnostics, Inst. of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Catholic University, Rome*

³ *UOC Neurologia, A.C.O.San Filippo Neri, Rome*

⁴ *Dep. of Internal Medicine and Applied Sciences, Sapienza University of Rome, Rome*

⁵ *Dep. of Nutrition, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599, USA*

In most tissues the lipid droplets (LDs) are cellular organelles for the triacylglycerol storage. LDs metabolic functions are mediated by proteins bound to their surface. In particular, the lipase that catalyzes the removal of the first acyl chain from triacylglycerol is the patatin-like phospholipase domain-containing protein 2 (PNPLA2). This protein is coded by the ATGL gene. ATGL mutations cause the onset of Neutral Lipid Storage Disease with Myopathy (NLSD-M), a rare autosomal recessive disorder characterized by an abnormal intracellular accumulation of triacylglycerol. NLSD-M patients are affected by progressive myopathy, cardiomyopathy and hepatomegaly. Other clinical symptoms may include diabetes, chronic pancreatitis and short stature.

In two Italian siblings, we identified two novel mutations in the ATGL gene: the c.24G>C (p.Trp8X), which likely results in a complete absence of PNPLA2 protein, and the c.516C>A, which causes an amino acid change (p.Asn172Lys). The last one is located in the patatin domain, essential for enzymatic function. In order to verify the pathogenic charge of this mutation, HeLa cells were transfected with wild type and two mutant ATGL-GFP plasmids, carrying Ser47Ala or Asn172Lys mutation. Ser47 is an invariant catalytic residue of lipase. PNPLA2(Asn172Lys) and PNPLA2(Ser47Ala) proteins were able to localize on LDs. The comparison between them showed that PNPLA2(Ser47Ala) was completely inactive, while PNPLA2(Asn172Lys) retained a residual lipase activity.

These results indicate that the Trp8X and Asn172Lys mutations determine the onset of NLSD-M in our patients, who are characterized by slowly progressive muscle weakness and light myocardial dysfunction. Moreover, functional data provide initial genetic evidences that might explain the variable degrees of myopathy and cardiomyopathy in NLSD-M.

CHARACTERISATION OF A LARGE DUPLICATION IN THE COL5A1 GENE IN A CLASSIC EHLERS-DANLOS SYNDROME PATIENT

N. Chiarelli¹, M. Ritelli¹, C. Dordoni¹, S. Quinzani¹, M. Traversa¹, M. Venturini², P. Calzavara-Pinton², M. Colombi¹

¹*Division of Biology and Genetics, Dep. of Biomedical Sciences and Biotechnology, Medical Faculty, University of Brescia, Brescia, Italy*

²*Dep. of Dermatology, University Hospital Spedali Civili, Brescia, Italy*

Classic Ehlers-Danlos syndrome (cEDS) (MIM#130000) is a rare autosomal dominant connective tissue disorder characterised by skin hyperextensibility, abnormal wound healing/atrophic scars and generalised joint hypermobility. Other prominent features include: smooth, velvety skin, molluscoid pseudotumors, subcutaneous spheroids, piezogenic papules, manifestations of generalised tissue extensibility such as inguinal and umbilical hernias, flat feet, and (kypho)scoliosis. Recently, a comprehensive molecular study reported that over 90% of patients, which satisfy all major criteria for cEDS, harbor a type V collagen (COLLV) defect. The majority of these mutations are nonsense, small del/ins and splice mutations, all leading to COLLV haplo-insufficiency and only a few missense and splice errors that affect the structural integrity of type V collagen are reported. No large genomic rearrangements are described.

We report a large genomic duplication in COL5A1 identified in a cEDS family, negative for COL5A1 and COL5A2 mutations by standard Sanger sequencing, using MLPA and SNP array analyses. The proband fulfilled the major diagnostic criteria for cEDS: smooth and hyperextensible skin, large atrophic scars, and joint hypermobility (Beighton score 7/9). Other clinical manifestations included epicanthus, high palate, hypoplastic uvula, easy bruising, bilateral molluscoid pseudotumor, sporadic dislocations, arachnodactyly, scoliosis, pectus excavatum and pes planus. The father and one sister of the patient showed comparable phenotypes.

MLPA, using the SALSA MLPA kits P331-A1 and P332-A1, showed the duplication of exons 1-11. SNP array analysis, using the Affymetrix Human Mapping GeneChip 6.0 arrays, was performed to refine the boundaries and the duplication size and revealed an about 191 kb duplication including also the COL5A1 proximal promoter region and spanning bases chr9:137,442,686-137,633,699/Hg19 Genome Build. The duplication was inherited from proband's affected father and was found also in patient's affected sister. Our data indicate that screening for large genomic rearrangements in COL5A1, and potentially in COL5A2, have to be included in the diagnostic flowchart for cEDS and could increase the mutation detection rate.

DNA copy number alterations and PPARG amplification in a patient with multifocal bladder urothelial carcinoma.

D. Conconi¹, E. Panzeri¹, S. Redaelli¹, G. Bovo³, M. Volante⁴, P. Viganò⁵, G. Strada⁵, L. Dalprà², A. Bentivegna¹

¹*Department of Neuroscience and Biomedical Technologies, University of Milan-Bicocca, Monza-Italy*

²*Medical Genetics Laboratory, S. Gerardo Hospital, Monza-Italy*

³*Department of Pathology, S. Gerardo Hospital, Monza-Italy*

⁴*Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin at San Luigi Hospital, Orbassano, Turin-Italy*

⁵*Urology Division, Bassini ICP Hospital, Milano-Italy*

Bladder cancer is the seventh most common cancer worldwide and over 90% are transitional cell carcinoma (TCC). At the first time of diagnosis at least 70% of TCC present as superficial bladder cancer. Because the clinical outcome of superficial bladder tumors is relatively unpredictable, there is a pressing need to identify markers that may predict tumor recurrence and progression and new treatment strategies. We present a unique case of a 67-years old male who underwent total cystectomy after repeated trans-urethral resections of the bladder for multifocal non-muscle invasive bladder cancer. The first and the third tumor were diagnosed as high grade non-infiltrating (HGNI), while the second as carcinoma in situ (CIS). We performed both array comparative genomic hybridization and a targeted chromosomal profile by UroVysion in order to detect copy number alterations (CNAs) that may be involved with tumor recurrence and progression. The overall data from this study provide new evidence for the monoclonal origin of urothelial tumor multifocality as several genetic changes were found in different tumors of the same patient. From the analysis of shared CNAs two gained regions emerged at 3p25.2 and 12q23.2, including PPARG and ASCL1 genes, respectively. The copy number level of these genes would seem inversely mutually correlated and highly dependent on histological grade, because the highest level of amplification at 3p25.2 was evidenced in the two HGNI samples, while the highest level of copy number gain at 12q23.2 was reported in the CIS. We provide new evidence on the role of PPARG in initiation and maintenance of bladder cancer. For the first time we also suggest a possible explanation for the elevated expression of PPARG in this type of tumor through a focal high level amplification at 3p25.2. Furthermore, a new gene, ASCL1, emerged as a potential candidate to assist PPARG in bladder carcinogenesis.

SINDROME DI LEOPARD: CARATTERIZZAZIONE DI DUE FAMIGLIE ITALIANE CON MUTAZIONI RICORRENTI P.T468M/P NEL GENE PTPN11

L. PEZZANI¹, M. RITELLI¹, N. CHIARELLI¹, C. DORDONI¹, M. VENTURINI², A. BREZZI², P. CALZAVARA-PINTON², G. TADINI³, M. COLOMBI¹

¹*Sez. di Biologia e Genetica, Dip. di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università degli Studi di Brescia, Brescia*

²*Clinica Dermatologica, Spedali Civili di Brescia e Università degli Studi di Brescia, Brescia*

³*Centro Malattie Cutanee Ereditarie, U.O. Dermatologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Ca' Granda - Osp. Maggiore Policlinico di Milano, Milano*

La sindrome di LEOPARD (multiple lentigines, electrocardiographic conduction abnormalities, ocular hypertelorism, pulmonary stenosis, abnormal genitalia, retardation of growth, sensorineural deafness; MIM *151100) è una malattia rara autosomica dominante a penetranza completa. È caratterizzata dalla presenza di lentiggini con insorgenza intorno ai 4-5 anni su tutta la superficie corporea, anomalie cardiache, tra cui stenosi della valvola polmonare, anomalie di conduzione e cardiomiopatia ipertrofica, facies triangolare con ipertelorismo, impianto basso dei padiglioni auricolari, prognatismo e labbra carnose. Altre manifestazioni meno frequenti sono anomalie scheletriche, ritardo di crescita, sordità neurosensoriale e malformazioni genitali. Nella maggior parte dei casi si riscontrano mutazioni nel gene PTPN11, che codifica per la tirosin fosfatasi SHP-2, una proteina non transmembrana ubiquitaria, che fa parte del pathway delle MAPK, coinvolta nella crescita, differenziamento e sopravvivenza cellulare. Nell'85% dei casi si riscontrano mutazioni missenso negli esoni 7, 12 o 13. Presentiamo due famiglie italiane affette da sindrome di LEOPARD. Nella prima sono affetti il padre e la figlia, che presentano lentiggini diffuse insorte intorno ai 10 anni, chiazze caffelatte multiple, facies, pectus carinatum. L'anamnesi familiare ha rilevato la presenza di un altro figlio, deceduto all'età di 9 anni per stenosi polmonare congenita, presumibilmente affetto. Il sequenziamento del gene PTPN11 ha rivelato nell'esone 12 la presenza della mutazione più frequentemente osservata, c.1403C>T (p.T468M).

Nella seconda famiglia la madre (probanda) e due figli sono affetti. I tre pazienti presentano lentiginosi diffusa, lieve scoliosi, pectus excavatum, facies con ipertelorismo, prognatismo e labbra carnose, cute soffice e ipermobilità articolare. Il fratello e la madre della probanda sono stati riferiti affetti. L'analisi molecolare ha evidenziato la presenza della mutazione c.1402A>C, che altera anch'essa la treonina in posizione 468 (p.T468P). Questi risultati confermano l'eterogeneità clinica della patologia e l'hot-spot mutazionale p.T468 nell'esone 12 di PTPN11.

IDENTIFICATION OF A LARGE DELETION INVOLVING THE PROMOTER REGION OF THE ABHD5 GENE IN A CHANARIN-DORFMAN PATIENT

S. Missaglia¹, D. Tavian¹, E.R. Valadares², E.D. Fagundes³, R.Q. Roque⁴, B. Giardina⁵

¹*Lab. of Human Molecular Biology and Genetics, Catholic University of the Sacred Heart, Milan*

²*Dep. of Propedêutica Complementar, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil*

³*Dep. of Pediatrics, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil*

⁴*Ambulatório de Erros Inatos do Metabolismo, Hosp. das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil*

⁵*Lab. of Clinical Molecular Diagnostics, Inst. of Biochemistry and Clinical Biochemistry, Catholic University, Rome*

Chanarin-Dorfman Syndrome (CDS), also known as Neutral Lipid Storage Disease with Ichthyosis (NLSD-I), is a rare autosomal recessive lipid storage disease. This syndrome is characterized by non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE), hepatomegaly and liver steatosis. Additional clinical features include muscle weakness, ataxia and sometimes neurosensory hearing loss, subcapsular cataracts, nystagmus, strabismus and mental retardation. Patients are often born as collodion babies. ABHD5 gene mutations have been identified as the cause of CDS. This gene codifies for the α/β -hydrolase domain-containing protein 5 (ABHD5), a co-activator of the patatin-like phospholipase domain-containing protein 2 (PNPLA2). PNPLA2 is a lipase, associated to the lipid droplets surface, that catalyzes the initial step of triacylglycerols lipolysis.

In a five-year-old girl of Brazilian origin, we have identified a homozygous novel deletion in the promoter region of ABHD5 gene. This genomic rearrangement affects also the exon 1, which contains the translation initiation site. Proscan 1.7 software was used to analyse the sequence spanning 5kb upstream from the ATG starting codon. Two putative promoter sequences have been identified at about 5 and 0.3 Kb, comprising some transcription factors as AP-2, Sp1, GCF, NF-D and UCE.2. ABHD5 expression was detected by comparative RT-PCR analysis from the peripheral blood of CDS patient, her parents and a control subject. In the affected patient, the large deletion completely abrogates ABHD5 gene expression. In order to investigate the molecular mechanism causing the rearrangement, the RepeatMasker software was used: Alu sequences and LTR elements were identified near to the deletion breakpoint.

Our results show that the novel large deletion encompasses the putative promoter sequence and the ATG starting codon, determining the lack of ABHD5 expression. This might explain the early onset of CDS in the little patient of Brazilian origin described here. High density of Alu and LTR repetitive sequences, identified in the ABHD5 promoter region, may play a key role in mechanism leading to this complex genomic rearrangement.

DISTURBO RETICOLARE DELLA PIGMENTAZIONE LEGATO ALL'X CON SEGNI SISTEMICI: I PRIMI DUE CASI ITALIANI

L. PEZZANI¹, M. BRENA², M. CALLEA³, M. COLOMBI¹, G. TADINI²

¹*Sez. di Biologia e Genetica, Dip. di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università degli Studi di Brescia, Brescia*

²*Centro Malattie Cutanee Ereditarie, U.O. Dermatologia Pediatrica, Fondazione IRCCS Ca' Granda - Osp. Maggiore Policlinico di Milano, Milano*

³*S.C.O Odontostomatologia e Chirurgia Maxillo-Facciale, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste*

Il disturbo reticolare della pigmentazione legato all'X con segni sistemici (X-linked Reticulate Pigmentary Disorder with systemic manifestations, XLPDR, MIM %301220), originariamente chiamata Amiloidosi cutanea familiare o Amiloidosi cutanea X-linked, è una patologia estremamente rara, a trasmissione X-linked dominante. Il gene coinvolto non è stato identificato, ma analisi di linkage ne hanno permesso il mappaggio nell'intervallo Xp21-p22. Sono stati descritti meno di 30 casi. I maschi affetti presentano un'iperpigmentazione generalizzata ad aspetto reticolare, asintomatica, durante la prima infanzia e una facies con attaccatura bassa dei capelli e sopracciglia arcuate. Questi pazienti sviluppano severe manifestazioni sistemiche quali, in ordine di frequenza, infezioni respiratorie ricorrenti fin dai primi mesi di vita (per cui spesso sono sospettate la fibrosi cistica o un'immunodeficienza), patologie gastrointestinali di grado variabile, ritardo di crescita, discheratosi corneale con fotofobia severa e importante riduzione del visus, ipoidrosi e numerose problematiche oro-dentali quali ipodonzia, displasia e difficoltà di deglutizione. Lo sviluppo psicomotorio è nella norma. Nelle femmine la patologia è caratterizzata esclusivamente dalla presenza di iperpigmentazione a disposizione blaschkoide, morfologicamente simile allo stadio III dell'Incontinentia Pigmenti, senza alcun coinvolgimento sistemico. Tale aspetto assume notevole importanza nell'ambito della consulenza genetica per donne con segni dermatologici compatibili con Incontinentia Pigmenti, senza segni di atrofia, storia di vescicolazione, prurito, bruciore o verrucosità a livello delle lesioni pigmentate.

Riportiamo i primi due pazienti italiani affetti da XLPDR, un bambino di 4 anni e la madre di 37 anni. La donna presenta dalla nascita poche chiazze iperpigmentate asintomatiche non atrofiche lungo le linee di Blaschko per cui era stata posta in precedenza la diagnosi di una forma lieve di Incontinentia Pigmenti, che non è stata indagata dal punto di vista istologico o genetico. Il figlio presenta una pigmentazione generalizzata ad aspetto reticolare, facies sindromica e numerose manifestazioni cliniche tipiche della XLPDR.

DETECTION OF HIGH LEVEL OF AUTOZYGOSITY IN A GROUP OF ITALIAN SCHIZOPHRENIA PATIENTS

M. Traversa¹, C. Magri¹, R. Gardella¹, P. Valsecchi², E. Sacchetti², M. Gennarelli³, S. Barlati¹

¹*Division of Biology and Genetics, Department of Biomedical Sciences and Biotechnology, Brescia*

²*Department of Mental Health, Brescia Spedali Civili, Brescia*

³*Genetics Unit, IRCCS San Giovanni di Dio, Fatebenefratelli, Brescia*

Schizophrenia has a strong genetic component but genetic architecture of the disease is still unclear. The numerous Genome Wide Association Studies (GWASs) and the recent Next Generation Sequencing Studies (NGSSs) revealed that schizophrenia risk is unlikely to be predominantly influenced by common variants or variants just outside the range detectable by GWASs. Rather it seems predominantly influenced by multiple rare and private genome variants.

The analysis with Genotype Colour of the SNP array data of our cohort of 180 schizophrenia patients and 171 healthy controls of Italian origin revealed the presence of 166 large runs of homozygosity (ROHs) consequence of autozygosity.

The ROHs frequency was significant different between the two groups (χ^2 , $p = 2.7 \times 10^{-5}$), actually 113 ROHs (68%) were detected among patients and only 53 (32%) among controls. This observation suggests that at least a portion of the genetic variability of our schizophrenia samples could be due to the presence of homozygous rare deleterious alleles inherited identical from each parent. To test this hypothesis we verify if autozygosity could be a risk factor for schizophrenia.

Although the distribution range of ROHs among patients (from 1 to 14 ROHs/per person) were larger than in controls (from 1 to 6 ROHs/per person), the higher number of ROHs among patients were not due to a generalized increased level of autozygosity ($p=0.794$), rather to the presence of 6 outlier samples with significant high levels of autozygosity. This result suggests that at least in these 6 patients the clinical phenotype could be due to the presence of multiple homozygous deleterious variants.

This result, combined with Copy Number Variations (CNVs) described in the same sample (Magri et al., 2010), allow us to conclude that rare forms of variation in the genome account for at least 10% of the genetic variability in this cohort of patients with schizophrenia.

NEUROFIBROMATOSI TIPO 1 E COMORBILITÀ: L'IMPORTANZA DI GUARDARE OLTRE I CRITERI DIAGNOSTICI.

C. Cesaretti¹, G. Melloni¹, M. Sciacco², L. Tresoldi³, M. Brambilla⁴, S. Di Geronimo⁵, E. Cristini⁶, L. Trespidi⁷, M. Caroli⁸, U. Verga⁹, M. Filopanti⁹, F. Natacci¹

¹UOD Genetica Medica, Fondazione IRCCC Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

²UO Neurologia, Fondazione IRCCC Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

³UO Oculistica, Fondazione IRCCC Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

⁴UO Chirurgia Generale 1, Fondazione IRCCC Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

⁵UO Radiologia, Fondazione IRCCC Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

⁶UO Ortopedia, Fondazione IRCCC Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

⁷UO Ostetricia e Ginecologia 1, Fondazione IRCCC Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

⁸UO Neurochirurgia, Fondazione IRCCC Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

⁹UO Endocrinologia, Fondazione IRCCC Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

La neurofibromatosi 1 (NF1) è una malattia genetica a trasmissione autosomica dominante, con prevalente interessamento neurocutaneo e possibili complicanze oculistiche, ortopediche, internistiche e oncologiche. L'incidenza è pari a 1/2500 e 1/3300.

La diagnosi di neurofibromatosi tipo 1 è clinica e si basa sulla presenza di almeno due dei criteri maggiori stabiliti dall'NIH Consensus Conference del 1988. Fanno parte della condizione altre caratteristiche cliniche comuni e complicanze, caratterizzate per avere un esordio età dipendente.

Sebbene le complicanze e le problematiche tipiche dell'età pediatrica siano ben note, gli studi relativi all'età adulta sono meno numerosi e focalizzati soprattutto alle problematiche oncologiche. Obiettivo del presente studio è quello di contribuire alla descrizione della storia naturale della patologia, con un focus sull'età adulta, grazie ai dati sistematicamente raccolti in 10 anni di esperienza di coordinamento del percorso diagnostico-assistenziale di pazienti NF1 adulti. La precisa conoscenza del quadro clinico anche nell'età adulta, è la base per poter garantire una corretta consulenza genetica e impostare un'ideale presa in carico assistenziale.

Verranno presentati i dati relativi alla coorte di pazienti NF1, seguita presso il nostro Centro; si tratta di 240 pazienti adulti, di cui 152 sono donne e 88 uomini, di età variabile tra 18 e 70 anni. L'analisi dettagliata dei dati clinici della coorte conferma che si tratta di una condizione a interessamento multisistemico, in cui la componente di predisposizione tumorale si accompagna alla presenza di altre complicanze. Le più frequenti riguardano la sfera neurologica e cardiovascolare e la loro diagnosi è stata presintomatica nella maggior parte dei casi e possibile solo grazie all'esecuzione di regolari accertamenti previsti dal follow up, garantiti dal percorso multidisciplinare costruito in aderenza alle indicazioni regionali per la diagnosi e l'assistenza di NF1 (http://malattierare.marionegri.it/images/downloads/PDTA/PDTA_schede/neurofibromatosi_tipo_i.pdf).

MULTIPLEX LIGATION DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION AS FIRST TIER SCREENING FOR TURNER SYNDROME DETECTION

F. Del Vecchio Blanco¹, M. Savarese¹, L. Perone², C. Pisano¹, A. Grandone³, L. Perrone³, V. Nigro¹

¹*Dipartimento di Patologia Generale- Laboratorio di Genetica Medica, II Università degli Studi Di Napoli*

²*Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM)*

³*Dipartimento di Pediatria II, Università degli Studi Di Napoli*

Turner syndrome (TS) is one of the most common genetic conditions affecting females, with an incidence of one in 1500–2000 live births. TS occurs when an entire X-chromosome or a portion of it is deleted in all the cells or in a subset of them (TS mosaicism).

Patients affected by Turner syndrome show abnormalities in reproductive function as well as a number of other clinical manifestations such as renal abnormalities, structural cardiac problems, and short stature. It has been estimated that one in 50–100 girls with short stature have TS; as reported in literature, short girls have to be tested for this condition.

The early diagnosis allows the initiation of GH therapy, so that an improvement of adult stature can be achieved.

At the moment, cytogenetic analysis by karyotype is the standard test used to

diagnose TS. Karyotype analysis is labor intensive and is impractical for large-scale population. In contrast, multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) based on relative quantification of different DNA target sequences in a single reaction is a quantitative method, faster and cheaper.

MLPA technique for X quantification and conventional karyotyping have been compared in order to verify if classical cytogenetic analysis could be replaced by MLPA as the first tier screening.

Up to now a cohort of females were analyzed in a double blind manner by MLPA and conventional cytogenetics. The MLPA kit (SALSA P106), includes 47 MLPA probes with amplification products between 130 and 481 nucleotide on 16 different X genes (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).

All the samples analyzed show concordant results and until now only in one case a normal karyotype corresponded to a doubtful MLPA result. Sensitivity of MLPA was 100% and specificity 95,6%.

In conclusion our data suggest that MLPA represent a rapid, economic, automated, reliable and accurate method to diagnose Turner syndrome in girls with short stature, not requiring culturing cells.

REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL TRASPORTATORE DELLO IODIO (NIS) IN CELLULE DI CARCINOMA MAMMARIO "TRIPLE NEGATIVE" IN SEGUITO A TRATTAMENTO CON SAHA

C. Puppini¹, E. Lavarone¹, F. Baldan¹, G. Damante¹

¹*Dipartimento di Scienze Mediche e Biologiche, Università di Udine, Italia*

I carcinomi mammari definiti "triple negative" costituiscono circa il 10-15 % dei carcinomi mammari e sono così chiamati perché non esprimono i recettori ormonali per l'estrogeno (ER), per il Progesterone (PR), e mancano del recettore di membrana HER2-neu. Per questo tipo di tumore le terapie a disposizione sono limitate in quanto le cellule tumorali triple negative non sono sensibili né alle terapie ormonali né ai farmaci biologici, ma solo alla chemioterapia.

L'obiettivo di questo studio è stato l'analisi del trasportatore dello iodio (NIS) come possibile bersaglio terapeutico nel trattamento di questo tipo di tumore, in quanto essendo il NIS espresso nei carcinomi della mammella, si può ipotizzare l'utilizzo del radioiodio per la diagnosi e la terapia dei tumori triple negative.

In questo lavoro si è valutata la possibilità di incrementare l'espressione genica di NIS in cellule di carcinoma della mammella "triple negative" (MDA 157 e MDA 468) mediante il trattamento con un inibitore delle deacetilasi istoniche, SAHA. L'espressione del NIS risulta aumentata nella linea cellulare MDA 468, sia a livello di mRNA che di proteina. Studi di trasfezione in entrambe le linee di carcinoma mammario "triple negative" hanno evidenziato che questo aumento non è dovuto ad un'azione trascrizionale del promotore.

È stato valutato il profilo di modificazioni post-traduzionali degli istoni a livello del promotore di NIS dopo trattamento con SAHA: la modifica epigenetica più rilevante risulta l'aumento dell'acetilazione dell'istone H3 nelle cellule che mostrano un incremento di espressione di NIS. Sono state valutate anche alcune metilazioni istoniche (H3K9me3, H3K27me3, H3K4me3): nessuna di queste presenta associazione con l'azione del SAHA nelle due linee cellulari.

Questi dati indicano: 1) l'inibitore delle acetilasi istoniche (SAHA) può rappresentare un promettente agente terapeutico per il trattamento dei carcinomi "triple negativi"; 2) i modelli correnti che descrivono la relazione tra attivazione trascrizionale e modificazioni istoniche non sono coerenti con l'attivazione del NIS da parte del SAHA.

MUTATIONAL SPECTRUM OF C1 INHIBITOR GENE IN ITALIAN PATIENTS WITH HEREDITARY ANGIOEDEMA

V. Bafunno¹, M. Bova², S. Loffredo², A. Petraroli², F. Sessa¹, M. Margaglione¹, G. Marone², M. Triggiani²

¹*Medical Genetics, Dep of Clinical and Experimental Medicine, University of Foggia, Foggia, Italy*

²*Div. of Clinical Immunology and Allergy and Center for Basic and Clinical Immunology Research (CISI), University of Naples Federico II, Naples, Italy*

INTRODUCTION

Hereditary angioedema (HAE) due to C1-inhibitor (C1-INH) deficiency (HAE types I and II) is a rare, autosomal dominant genetic disorder characterized by recurrent attacks of subcutaneous and/or submucosal edema. Type I HAE (85% of cases) is characterized by functional and antigenic C1-INH deficiency. Type II HAE, (15% of cases) is characterized by normal or upper normal C1-INH antigenic levels but no functional activity. Type I and II HAE affected individuals carry a mutation in the C1-INH gene (C1NH, SERPING1; OMIM #606860). The C1NH gene maps onto chromosome 11q12-q13.1, and it is organized into 8 exons and 7 introns, most of them particularly rich in repetitive Alu sequences. More than 300 mutations in C1NH gene have been identified. We studied the genetic profile of a cohort of 32 individuals with HAE due to C1-inhibitor deficiency living in Campania, Italy.

MATERIAL AND METHODS

Our study cohort consisted of 11 unrelated patients and 21 clinically affected subjects belonging to 7 different families. The age range was between 6 and 73. 26 of them were affected by type I HAE, 6 by type II HAE. The diagnosis of HAE was based on serum levels of functional/antigenic C1-INH and C4 in combination with clinical symptoms. Genetic analysis was performed by direct DNA sequencing method using the BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1 and an ABI Prism 3100 genetic analyzer.

RESULTS

Overall, we identified 15 different mutations responsible for the disease: 8 missense (p.I252V, p.G471E, p.R444C, p.W243R, p.A436T, p.G471R, p.R444H, p.M-22T) 5 nonsense (p.K276X, p.R472X, p.E20X, p.K22X, p.Q415X), 1 frame-shift (p.S41fsX57) and 1 small deletion (p.T280del). All subjects were heterozygous for the mutations identified. Four of these mutations, p. W243R, p. S41fsX57, p.M-22T and p. Q415X are firstly described in our study. To predict the pathogenicity of unpublished missense variants, in silico analysis was performed by querying different databases, such as PolyPhen, SIFT, PANTHER, MuPro, Mutation taster.

CONCLUSIONS

We have identified 15 different mutations related to HAE confirming the heterogeneity of C1NH mutations of this disease. Moreover, four of these mutations are firstly described in our study.

UTILIZZO DELL'ARRAY CGH PER IL CONTROLLO DI CARIOTIPI ALTERATI

F. Crsoti¹, S. Redaelli², N. Villa¹, E. Sala¹, S. Lissoni¹, E. Gautiero¹, L. Dalprà¹

¹*U.S. Genetica Medica, Osp. San Gerardo, Monza*

²*Dip. Chirurgia e medicina interdisciplinare, Univ Milano-Bicocca, Monza*

Dal 2010 nel U.S. di Genetica Medica Ospedale San Gerardo, sono stati eseguiti 250 cariotipi molecolari pre (21) /post natale (229). Per 42 campioni (16.8%) l'indicazione all'analisi era riscontro di cariotipo convenzionale alterato apparentemente bilanciato (19 casi - 45.2%) o sbilanciato (23 casi - 54.7%). Per 4 campioni (1.6%) con cariotipo normale e fenotipo patologico, si riscontrava una alterazione in aCGH; ripetuto il cariotipo ad alta risoluzione veniva rilevata la presenza della alterazione. Tutti i campioni dati sbilanciati con cariotipo convenzionale sono stati confermati in aCGH, nella maggior parte dei casi riposizionando l'alterazione citogenetica osservata. Dei 19 casi apparentemente bilanciati, 15 (78.9%) sono stati confermati come tali, 7 di questi casi erano alterazioni de novo (6 in diagnosi prenatale ed un caso post natale con ritardo mentale). 4 casi (21.1%) sono risultati sbilanciati. Due casi presentano traslocazioni tripla (uno pre e uno post natale), con delezione trovata su un cromosoma coinvolto in una delle traslocazioni ma in un punto diverso del cromosoma. Un caso presenta traslocazione ereditata, con delezione trovata su un altro cromosoma. L'ultimo caso la bambina presentava una traslocazione de novo (simil robertsoniana) coinvolgente il cromosoma 13 e cromosoma 22 con dubbio di sbilanciamento: il cromosoma 13 è risultato deletato.

Sulla base dei dati presentati si può concludere che la maggior parte delle traslocazioni de novo che sembrano apparentemente bilanciate e/o sbilanciate con il cariotipo convenzionale sono confermate anche in aCGH. In presenza di traslocazioni coinvolgenti più cromosomi apparentemente bilanciate nello stesso paziente è fortemente consigliato confermare il cariotipo con tecniche molecolari.

Impatto della consulenza genetica in donne con storia familiare di carcinoma mammario

L. Godino¹, M. Bianconi¹, E. Razzaboni², D. Turchetti¹

¹U.O. Genetica Medica, Policl. Sant'Orsola Malpighi, Bologna

²Centro per lo studio dei tumori familiari della mammella e dell'ovaio, Centro Oncologico Modenese., Modena

La crescente consapevolezza del ruolo della familiarità nel rischio di Carcinoma Mammario (CM) induce un aumento della richiesta di consulenza genetica oncologica (CGO) per CM e in Emilia-Romagna è partito uno specifico programma organizzato. Frequente motivo di preoccupazione è il possibile impatto psicologico sfavorevole della comunicazione del rischio. Una recente revisione sistematica della letteratura¹ mostra che la valutazione del rischio familiare di CM riduce l'ansia, migliora l'accuratezza della percezione del rischio e aumenta le conoscenze a riguardo; mancano però dati sulla realtà italiana.

Abbiamo indagato l'impatto della CGO in donne con familiarità per CM attraverso un'intervista telefonica semi-strutturata. Delle 102 donne sane che hanno eseguito la CGO per storia familiare di CM a Bologna dal 2003 al 2011, 82 (80,4%) sono entrate nello studio; l'età media era 46 anni (range 24-86), il rischio relativo di CM rispetto alla popolazione generale, stimato con modello di Tyrer-Cuzick, era ≤ 2 nel 34,6%, tra 2 e 3 nel 56,8% e ≥ 3 nell'8,6%.

Dallo studio è emerso che la maggior parte delle donne intervistate ritiene che le informazioni siano state molto/estremamente/abbastanza chiare (90,2%) e utili (76,8%). Il 40,2% delle intervistate afferma che il proprio rischio percepito è diminuito in seguito alla CGO mentre per il 6,1% è aumentato. Del resto, su 26 donne per cui era disponibile il rischio percepito pre-CGO, 24 sovrastimavano il proprio rischio, con un rapporto rischio percepito/rischio oggettivo variabile da 1,5 a 8,8.

La maggioranza delle intervistate (85,4%) ritiene che le informazioni ricevute non abbiano determinato decisioni importanti per la propria salute, ma il 78% ha comunque aderito al programma di sorveglianza consigliato. Le informazioni ricevute sono state per lo più condivise con i familiari, soprattutto i genitori, senza apparente impatto sfavorevole.

Complessivamente, questi dati supportano l'impatto favorevole della CGO sulla consapevolezza, sulla percezione del rischio e sull'adesione ai programmi di sorveglianza delle donne con familiarità.

1. Hilgart JS, Coles B, Iredale R. (2012) Cancer genetic risk assessment for individuals at risk of familial breast cancer. The Cochrane Library, Issue 2

Analisi MLPA del gene CREB-binding protein (CREBBP) in un paziente con la sindrome di Rubinstein-Taybi

F. Cali¹, P. Failla², V. Chiavetta¹, A. Ragalmuto¹, G. Ruggeri¹, P. Schinocca¹, C. Schepis³, V. Romano⁴, C. Romano²

¹*U.O. Lab. di Genetica Medica, Attività di Genetica Molecolare, IRCCS Associazione OASI M. SS, Troina, Italia*

²*U.O. di Pediatria e Genetica Medica, IRCCS Associazione OASI M. SS, Troina, Italia*

³*U.O. di Dermatologia, IRCCS Associazione OASI M. SS, Troina, Italia*

⁴*Dip. di Fisica, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italia*

La sindrome di Rubinstein-Taybi è una rara malattia congenita autosomica dominante caratterizzata da ritardo della crescita postnatale, ritardo dello sviluppo psicomotorio, anomalie scheletriche, peculiare morfologia facciale ed un aumento del rischio oncogeno. La prevalenza alla nascita è 1 su 125.000 nati vivi. La malattia può essere associata a mutazioni nel gene che codifica per la proteina CREB-binding localizzato nella regione cromosomica 16p13.3. Recenti studi hanno dimostrato che pazienti con quoziente intellettivo basso e tratti autistici possono avere grandi delezioni. Sulla base di queste osservazioni, abbiamo usato la Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) per ricercare delezioni che interessano il gene CREB-binding in un paziente con sindrome di Rubinstein-Taybi e abbiamo identificato una delezione in eterozigosi che causa la rimozione di cinque esoni (esoni 17-21) codificanti per il dominio istone acetiltransferasi. Noi proponiamo, come primo approccio diagnostico, l'uso del metodo MLPA nel sottogruppo di pazienti con la sindrome di Rubinstein-Taybi con quoziente di intelligenza basso e fenotipo autistico.

ESX1: MARCATORE MOLECOLARE PREDITTIVO DI SPERMATOGENESI RESIDUA IN SOGGETTI AZOOSPERMICI

A. Pansa¹, M. Miozzo², S. Melis³, D. Giacchetta³, P. Colapietro¹, M. Castiglioni³, G.M. Colpi³, S. Sirchia¹, S. Tabano²

¹Lab. Genetica Medica, Dip. di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano

²Dip. di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, UO di Patologia Molecolare, Fondazione IRCCS ca' Granda Osp. Maggiore Policlinico, Milano

³U.O.C. Urologia II – Andrologia e Riproduzione Assistita, A.O. San Paolo, Milano

INTRODUZIONE: Nonostante siano noti vari geni implicati nella spermatogenesi, le cause genetiche dell'infertilità maschile nel 40% circa dei casi restano tutt'ora sconosciute.

Tecniche chirurgiche di TESE/microTESE (Testicular Sperm Extraction) permettono di recuperare spermatozoi in circa il 40% dei pazienti con azoospermia non ostruttiva (NOA), anche se, al momento, non ci sono né parametri clinici pre-operatori né marcatori molecolari utili a predire la presenza di spermatogenesi residua in assenza di gameti rilevabili nel liquido seminale.

Come precedentemente dimostrato con metodica semi-quantitativa dal nostro gruppo (Bonaparte E, et al. 2010), esiste una correlazione positiva tra espressione del gene ESX1 nel testicolo di soggetti NOA, la presenza di foci di spermatogenesi residua e il recupero chirurgico di spermatozoi. ESX1 (Xq22.2) è un gene homeobox espresso nel testicolo, cervello, polmone e nella placenta.

SCOPO: Valutazione dei livelli di espressione di ESX1 in biopsie testicolari e liquido seminale come marcatore di spermatogenesi in soggetti infertili.

METODI E CASISTICA: Real-time PCR per la valutazione quantitativa dei livelli di mRNA di ESX1. Previa approvazione del consenso informato, sono state analizzate le biopsie testicolari e il corrispondente liquido seminale di 30 soggetti azoospermici, suddivisi sulla base del difetto di spermatogenesi, e 9 campioni di liquido seminale di soggetti normospermici.

RISULTATI E CONCLUSIONI: Nelle biopsie testicolari, il confronto tra dato molecolare (espressione ESX1), istologico e recupero di spermatozoi in sede operatoria ha evidenziato una concordanza significativa nel 77% dei soggetti ($p < 0.05$). L'analisi dell'espressione di ESX1 nei campioni di liquido seminale ha mostrato una differenza di espressione significativa tra soggetti normospermici e azoospermici ($p < 0.001$), indicando che ESX1 è un buon marcatore dello stato di spermatogenesi anche nel liquido seminale.

L'utilizzo di questo marcatore, valutabile con un test non invasivo su liquido seminale, potrebbe essere utile nella pratica clinica a selezionare quei pazienti azoospermici con maggiori possibilità di recupero chirurgico, sulla base di una ridefinizione della loro probabilità a priori.

ANALISI MOLECOLARE E CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO IN FAMIGLIE CON IPERFENILALANINEMIE

R. Trunzo¹, R. Santacroce¹, G. D'Andrea¹, V. Longo¹, G. De Girolamo¹, C. Dimatteo¹, A. Leccese¹, V. Lillo², M. Margaglione¹

¹Lab. Genetica Medica, U.O. Ospedali Riuniti di Foggia, Foggia

²Osp. Pediatrico Giovanni XXIII, Bari

Obiettivi: L' Iperfenilalaninemia (HPA) è una patologia genetica con significativa eterogeneità allelica e variabile espressione fenotipica, effetto di una complessità strutturale, funzionale e genica dell'enzima Fenilalanina Idrossilasi (PAH). Lo studio è finalizzato all' identificazione delle mutazioni responsabili della carenza di PAH in pazienti con HPA (con valori di Fenilalanina nel sangue <7 mg/dl), provenienti dal Sud Italia, individuati mediante lo screening neonatale, e all'identificazione di criteri diagnostici più efficaci ed immediati da mettere a disposizione dei pazienti per un eventuale trattamento alimentare specifico ed appropriato.

Materiali e Metodi: Sono stati studiati 26 bambini con forme mild di HPA con livelli di fenilalanina nel sangue compresi fra 2 e 7 mg/dl, diagnosticati presso l'Ospedale Pediatrico Giovanni XXIII (Bari). La strategia generale per la genotipizzazione dei probandi ha previsto l'analisi molecolare a carico del gene PAH per la ricerca di mutazioni causative che possano spiegare il loro fenotipo clinico.

Risultati: I difetti trovati nel gene PAH coprono 10 mutazioni missense (di cui una non descritta), 1 delezione e 3 mutazioni di splicing. Nei pazienti con un solo dosaggio superiore a 2mg/dl e i successivi sempre nella norma è stata riscontrata o una sola mutazione in eterozigosi ereditata da uno dei due genitori o assenza completa di mutazioni mentre nei pazienti con valori sempre superiori a 2mg/dl , ma mai superiori a 6mg/dl, sono state individuate due differenti mutazioni ed in particolare un'associazione fra una mutazione descritta come causativa di PKU classica (in condizione di omozigosi) e una mutazione causativa di HPA non PKU o la coesistenza di 2 mutazioni descritte come responsabili di HPA.

Conclusioni: L'individuazione di queste 14 mutazioni nel gene PAH conferma ed estende l'idea di una marcata eterogeneità mutazionale del deficit di PAH in Puglia. La loro conoscenza approfondita e la eventuale correlazione genotipo fenotipo fra le mutazioni presenti nei probandi e il loro quadro clinico potrebbe fornire un denominatore comune nella valutazione dei fenotipi metabolici e facilitare la diagnosi, la prognosi e individuare un test per lo stato di portatore nella popolazione.

Un nuovo caso di triplicazione intracromosomica de novo in 15q11q13 dovuta ad un riarrangiamento cromosomico complesso in un paziente con lieve ritardo dello sviluppo psicomotorio

I. Bestetti¹, C. Castronovo¹, M. Crippa¹, D. Rusconi¹, D. Giardino¹, S. Russo¹, L. Larizza², R. Sangermani³, M.T. Bonati⁴, P. Finelli⁵

¹Laboratorio di Citogenetica Medica e Genetica Molecolare, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano, Italia

²Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

³Ambulatorio di Neuropediatria, Ospedale San Carlo Borromeo, Milano, Italia

⁴Ambulatorio di Genetica Clinica, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano, Italia

⁵Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia

La regione prossimale del cromosoma 15q rappresenta una delle regioni genomiche più instabili in quanto prona a diversi riarrangiamenti strutturali, tra i quali le triplicazioni intracromosomiche in 15q11q13 sono i più rari, essendo stati ad oggi riportati solo dieci casi. Presentiamo il caso di un bambino di 19 mesi giunto all'attenzione del medico genetista per epilessia, stereotipie motorie e ritardo lieve-moderato dello sviluppo. L'esame obiettivo non ha evidenziato dismorfismi né tratti autistici. L'analisi cromosomica è risultata nella norma così come la RM dell'encefalo.

L'analisi array-CGH ad alta risoluzione ha permesso di identificare due acquisizioni contigue de novo in 15q11q13: una duplicazione di 1.1 Mb in 15q11.2, compresa tra le Low Copy Repeats (LCR) BP1 e BP2, e una triplicazione di 6.8 Mb in 15q11.2q13.1 tra le LCR BP2 e BP4. L'analisi dei microsatelliti ha dimostrato l'origine materna della triplicazione che ha coinvolto entrambi i cromosomi 15 materni. La successiva caratterizzazione del riarrangiamento tramite analisi BAC-FISH dual-color ha evidenziato tre ripetizioni in tandem BP2-BP4, delle quali quella intermedia ha orientamento invertito, e due ripetizioni BP1-BP2, delle quali una è localizzata tra la seconda e la terza ripetizione BP2-BP4.

Nonostante non sia possibile effettuare una precisa correlazione genotipo-fenotipo a causa della scarsità di dati presenti in letteratura e delle diverse metodiche con cui sono state effettuate le caratterizzazioni molecolari, riteniamo che il quadro neurologico del probando sia più lieve rispetto a quello dei dieci pazienti ad oggi descritti. Lo studio condotto potrà contribuire ad ampliare le conoscenze sul fenotipo correlato alla triplicazione segmentale 15q11q13, e sui possibili meccanismi coinvolti nella formazione delle anomalie cromosomiche strutturali coinvolgenti questa regione.

CARE DELIVERY VALUE CHAIN: UN NUOVO METODO DI VALUTAZIONE IN SANITÀ. IL VALORE COME STRUMENTO DI MISURAZIONE DELL'ATTIVITÀ DI UNA STRUTTURA SEMPLICE DIPARTIMENTALE DI GENETICA MEDICA

L. Battistelli¹, G. Barletta², M. Tremosini¹, L. Sangiorgi¹

¹*Struttura Semplice Dipartimentale di Genetica medica e Malattie Rare Ortopediche, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna*

²*Gene.Sys, Prato*

Come in altri settori, anche in sanità la misurazione delle performance è un tema particolarmente critico. La natura complessa, intrinsecamente multi-disciplinare e multi-professionale delle organizzazioni sanitarie ha portato ad una trasformazione dell'ottica del budget, spostando la negoziazione dagli aspetti economico-finanziari, agli insiemi di indicatori capaci di incorporare elementi di efficienza, di appropriatezza, di efficacia, di qualità e sicurezza. La business economic analysis risulta quindi utile per raccogliere ed elaborare informazioni in merito ai costi e al valore che il percorso assistenziale genera lungo tutto l'iter ospedaliero. Il progetto si basa sulla analisi del valore della Struttura Semplice Dipartimentale di Genetica Medica attraverso un nuovo modello, il Care Delivery Value Chain, che definisce il Valore come rapporto tra gli Outcome generati dal processo assistenziale e i Costi sostenuti (What Is Value in Health Care? - Michael E. Porter, Ph.D. – The new England Journal of Medicine . September 2010). Il metodo definisce un quadro completo per la gestione delle performance e fornisce la base per la costruzione di un Framework valutativo applicabile a modelli simili con ordini temporali differenti. L'analisi del valore segue un processo in quattro stadi che ha visto il coinvolgimento degli operatori, dei Medici Dirigenti e dei pazienti in prima persona. L'insieme completo degli indicatori è stato ordinato in una gerarchia a tre livelli. La parte più alta è generalmente la più importante, con risultati di livello inferiore che riflettono una progressione contingente in caso di "successo" ai livelli superiori. In seguito abbiamo definito gli strumenti di misurazione degli indicatori. L'importanza di ogni livello, e la dimensione degli indicatori variano in base alle condizioni cliniche e, talvolta, secondo il sottogruppo di pazienti. Una volta delineata la scala degli indicatori e i metodi di misurazione, per schematizzare e rendere di facile lettura e applicabilità il modello lungo tutto il percorso di cura del paziente utilizzeremo lo strumento della Catena del Valore. I costi verranno determinati tramite lo strumento dell'Activity Based Costing lungo tutto il percorso assistenziale.

MREE11A, OBFC2B, EEF1E1 : NUOVI GENI COINVOLTI NEL PATHWAY DEL RIPARO DEL DNA DI BRCA1

C. Guglielmi¹, I. Cerri¹, A. Collavoli², E. Falaschi², L. Spugnesi¹, P. Aretini², M. Tancredi¹, M.A. Caligo²

¹*Dipartimento di Oncologia, dei Trapianti e delle Nuove Tecnologie in Medicina, Pisa*

²*Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana (Div.di Anatomia Patologica e di Diagnostica Molecolare ed Ultrastrutturale)*

Introduzione. Le varianti M1775R e A1789T sono due missenso localizzate entrambe all'interno del dominio BRCT di BRCA1, la prima di significato patogenetico noto, la seconda classificata come probabile deleteria per la prima volta dal nostro gruppo. In un precedente lavoro di microarray sono stati confrontati i profili di espressione genica di cellule HeLa trasfettate con le due varianti e cellule HeLa trasfettate con BRCA1 wt identificando per la variante M1775R e la A1789T rispettivamente 201 e 313 geni differenzialmente espressi. Nove geni, scelti perchè coinvolti nel processo di trasformazione neoplastica, sono stati validati mediante RT-qPCR e di cinque è stato anche confermato il livello proteico mediante analisi di W.Blot. Abbiamo successivamente scelto tre geni implicati nel riparo del DNA (MRE11A, OBFC2B, EEF1E1) e li abbiamo testati per un saggio di "Homologous Recombination" in vitro. Su due di questi geni (OBFC2B e EEF1E1) è stata anche condotta un'analisi mutazionale germline in casi di carcinoma mammario familiari BRCA1/2 wt. Materiali e Metodi. Cloni HeLa contenenti un substrato di ricombinazione (hprtDRGFP) sono stati trasfettati con siRNA diretti contro i geni MRE11A, OBFC2B e EEF1E1. Il livello di ricombinazione omologa valutato come numero di cellule GFP-positive tramite analisi al FACS è stato paragonato a quello di cellule inattivate per BRCA1 e di controllo (cellule inattivate per HPRT e cellule trasfettate con uno Scrambled Negative Control Duplex). L'analisi mutazionale è stata condotta su campioni di sangue periferico di 39 probandi selezionati da famiglie ad alto rischio, wt per BRCA1 e BRCA2 e affette da tumore alla mammella. Risultati e Conclusioni. In cellule inattivate per BRCA1 la percentuale di eventi di ricombinazione omologa è dello 0,068 % (SD 0.02 Kruskal-Wallis test). In cellule inattivate per i geni MRE11A, OBFC2B e EEF1E1 c'è una riduzione del numero di cellule GFP-positive rispettivamente del 46.8 %, 35% e 47.5 % rispetto ai controlli. Questi risultati insieme ad altri dati noti dalla letteratura ci suggeriscono che questi tre geni potrebbero essere coinvolti nel pathway di BRCA1. L'analisi mutazionale condotta su OBFC2B e EEF1E1 ha evidenziato alcuni polimorfismi mai descritti ma nessuna mutazione patogenetica.

DIAGNOSI PRENATALE SU CSV E CONTAMINAZIONE MATTERNA. CONFRONTO TRA DATI CITOGENETICI E MOLECOLARI

L. Sbaiz¹, C. Mari¹, F. Lombardo¹, A.M. Sedita¹, M. Duvant¹, C. Michielotto¹, C. Luciano¹, V. Asnaghi¹, S. Siviero¹, M. Grosso¹, M. Salvego¹, G. Restagno¹

¹S.S. *Diagnosi e Consulenza Genetica, Città della Salute e della Scienza, Presidio O.I.R.M.-SAnna, Torino*

La diagnosi citogenetica su prelievo di villi coriali ha il vantaggio di essere eseguita in epoca precoce, ed è richiesta in genere in gravidanze a rischio elevato per anomalie cromosomiche o per la diagnosi di malattie genetiche. Nei feti 46,XX non è possibile escludere la contaminazione da parte di cellule di origine materna, con conseguente possibilità di errore diagnostico. Obiettivi. Calcolare la reale incidenza di contaminazione materna comparando i risultati del cariotipo e della QF-PCR su tracciato fetale e materno. Metodi. Dopo un consensus, a giugno 2011 è stata introdotta l'analisi del tampone buccale materno. Sono stati modificati l'informativa ed il consenso informato per il prelievo di villi coriali. Il DNA da villi coriali e da tampone buccale viene estratto con estrattore automatico Qiacube; l'amplificazione degli STRs (short tandem repeats) effettuata con il kit Devyser Compact V.3, i frammenti analizzati su sequenziatore automatico 3500DX Genetic Analyzer. I tracciati dei feti che risultano di sesso femminile vengono confrontati con il tracciato materno. Risultati. Da giugno 2011 a giugno 2012 sono stati analizzati 977 prelievi di villi coriali, di cui 512 sono risultati 46,XY e 465 46,XX. Il 4,4% dei casi mostrava trisomia 21, 1,4% trisomia 18 e 0,7% trisomia 13. Le trisomie vengono confermate con una seconda estrazione e amplificazione partendo dalla provetta madre. La contaminazione materna è stata accertata nel 5% dei casi 46XX alla prima estrazione, percentuale che si riduce al 2,6% dopo una seconda estrazione da altri frammenti di villo. I dati citogenetici indicano una contaminazione materna nel 2% dei casi. Conclusioni. I risultati della QF-PCR indicano che la contaminazione materna è superiore a quella accertabile con il cariotipo, che evidenzia la contaminazione materna solo nei casi di feti maschi. Mediante QF-PCR ed il confronto tra tracciato fetale e tracciato materno sono evidenziate anche le contaminazioni da parte di cellule materne nei feti di sesso femminile. Nella casistica descritta sarebbero stati erroneamente refertati 13 casi di feti di sesso femminile avendo analizzato unicamente cellule di origine materna. In questi casi è stata proposta una consulenza genetica e l'eventuale ripetizione del prelievo.

ATRX MUTATION IN TWO ADULT BROTHERS WITH NON-SPECIFIC INTELLECTUAL DISABILITY IDENTIFIED BY EXOME SEQUENCING

M.F. Bedeschi¹, S. Moncini², M. Crippa³, P. Castronovo², M. Calvello¹, G. Scuvera¹, P. Finelli³, M. Venturin²

¹*UOD Genetica Medica, Fondazione IRCCC Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano*

²*Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy*

³*Laboratorio di Citogenetica Medica e Genetica Molecolare, Istituto Auxologico Italiano, Cusano Milanino (MI), Italy*

Here we describe two adult brothers affected by mild non-specific intellectual disability. They are second and third born of healthy, non consanguineous parents. The first brother is healthy. Family history is unremarkable for mental retardation (MR) or birth defects. Both pregnancies had a regular course and both brothers were born by natural delivery. Neonatal period was normal. At 8 months both brothers presented seizures and they began to take antiepileptic drugs. One brother took an antipsychotic drug since he was 26 yrs old. Clinical examination, performed at 38 and 36 yrs respectively, showed minor facial anomalies such as microcephaly, long face, small forehead, bushy eyebrows, nasal root protrusion and prominent nasal tip, thickened helix, arched palate, besides 4th and 5th hand finger brachydactyly and broad toes. Brain MRI in the 36 yrs old brother was normal, while in the 38 yrs old brother revealed cerebellar vermis atrophy. Renal and cardiac ultrasound, as well as ophthalmologic assessment and ABR audiometry, were normal. Karyotype, FISH for subtelomeric rearrangements and FMR1 analysis were normal in both cases.

We performed array-CGH analysis that revealed no copy-number variations potentially associated with MR. Subsequent exome sequence analysis (Illumina platform) showed the presence of the c.324C>T (p.R37X) mutation in the ATRX gene in both the affected brothers but not in the healthy brother. Traditional sequencing confirmed the presence of the mutation in the affected brothers and showed that the mother is healthy carrier.

Mutations in the ATRX gene, mapped to Xq13, cause the X-linked alpha thalassaemia mental retardation (ATR-X) syndrome, a severe clinical condition usually associated with profound MR, facial dysmorphism and alpha thalassaemia. However, the syndrome is clinically heterogeneous and some mutations, including the c.324C>T, are associated with a broad phenotypic spectrum, with patients displaying a less severe phenotype with only mild MR. In the case presented here, exome sequencing provided an effective strategy to achieve a molecular diagnosis of ATR-X syndrome, which otherwise would have been difficult to consider due to the mild non-specific phenotype and the absence of a family history with typical severe cases.

Deep replication and extensive fine mapping using the ImmunoChip significantly expands the genetic architecture of multiple sclerosis

S. D'Alfonso¹, F. Martinelli Boneschi², N. Barizzone¹, M. Leone³, F. Esposito², L. Corrado¹, M. Sorosina², C. Agliardi⁴, V. Martinelli², A. Di Sapia⁵, M. Salvetti⁶, P. Brambilla², P. Cavalla⁷, D. Galimberti⁸, G. Comi², . PROGEMUS⁹, . PROGRESSO¹⁰

¹Department of Health Sciences and Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD), University of Eastern Piedmont, Novara, Italy

²Department of Neurology & Laboratory of Neurogenetics of complex disease, CNS Inflammatory Unit, Institute of Experimental Neurology, Scientific Institute San Raffaele, Milan, Italy

³Department of Neurology, Ospedale Maggiore, Novara, Italy

⁴Laboratory of Molecular Medicine and Biotechnology, Don C. Gnocchi Foundation ONLUS, IRCCS S. Maria Nascente, Milan, Italy

⁵Neurologia 2 -CRESM, AOU San Luigi, Orbassano (Torino), Italy

⁶Center for Experimental Neurological Therapy (CENTERS), Neurology and Department of Neurosciences, Mental Health and Sensory Organs, Università La Sapienza, Roma, Italy

⁷MS Center, Department of Neuroscience, AOU S. Giovanni Battista & University of Turin, Torino, Italy

⁸Department. of Neurological Sciences, Ospedale Maggiore Policlinico, University of Milan, Italy

⁹PROGEMUS (PROgnostic GENetic factors in MULTiple Sclerosis)

¹⁰PROGRESSO (Italian network of Primary Progressive Multiple Sclerosis)

Multiple sclerosis (MS) is a chronic debilitating autoimmune disease of the central nervous system. More than a third of the established MS susceptibility loci are also associated with at least one other organ specific autoimmune disease. This remarkable overlap enabled the development of the ImmunoChip, a custom built Illumina genotyping array that includes a total of 196,524 SNPs designed to allow the fine mapping, by genotyping all available flanking variation, and deep replication of 186 loci established to be relevant in at least one of the 12 autoimmune diseases, including 38 loci that are already established as being associated with MS susceptibility in a recent large Genome Wide Association Study (GWAS) (IMSGC, WTCCC2, Nature 2011).

We have typed the ImmunoChip in 17,097 MS cases and 20,055 controls from twelve countries, including 1000 MS patients and 1000 controls from Italy.

We identified genome wide significant ($P < 5 \times 10^{-8}$) evidence of association in 18 of the fine mapped regions not already established as relevant in multiple sclerosis, including Chr2q32 containing the STAT4 gene ($p = 6.08 \times 10^{-9}$). In the replication section of the ImmunoChip a further 28 independent loci outside of these fine-mapping regions also show evidence of association with genome-wide significance.

These results clearly evidenced that the genetic architecture underlying susceptibility to multiple sclerosis is polygenic with implicated genes being overwhelmingly immunological. Through the ImmunoChip we have substantially doubled the list of MS associated loci and fine mapped more than 40 of these associated regions providing evidence in the identification of the sequence variations primarily associated with MS susceptibility.

46,XX/ 46, XX, dir dup 9 (q22q33): A NEW CASE IN PRENATAL DIAGNOSIS

R. Bruno¹, S. Rossi¹, M.I. Ferreri¹, A. Valetto¹, F. Morelli¹, C. Cosini¹, L. Morelli¹, P. Simi¹

¹*Cytogenetics and Molecular Genetic Unit, A. O. U. Pisana*

Complete and partial trisomy 9 is the fourth most common chromosomal disorder.

A variable duplication length of 9q, from band q22 to q32, is reported in literature associated with specific clinical findings, such as craniofacial abnormalities (beaked nose, deeply set eyes, prominent maxilla and receding small chin), failure to thrive, pyloric stenosis, gastro-oesophageal reflux and various defects in cardiovascular, central nervous, gastrointestinal and renal systems, sometimes it is also characterised by growth hormone deficiency.

Complete trisomy 9 is related to spontaneous abortion, instead partial trisomy has usually a better prognosis, with few reported cases of reaching adulthood.

We reported a case of a de novo 9q duplication mosaicism, revealed by amniocentesis. The mother was 27 years old and amniocentesis was performed at the sixteenth week of gestation. It was the first pregnancy. Ultrasound gynecological examination didn't show fetal abnormalities. The chromosome analysis of the cultured amniotic fluid cells was 46XX/ 46, XX, dir dup 9 (q22q33). Parents' karyotypes were normal and maternal contamination was excluded through molecular analysis of amniotic fluid.

The duplicated chromosomal fragment was then characterized by micro-array CGH: it had a size of 24 Mb and it extended from 9q22.32 to 9q33.1. In this case the use of array-CGH was important for definition of the break-points on chromosome 9. Pregnancy was immediately terminated. Morphological analysis of fetus revealed facial dysmorphisms and the examination of placenta showed an irregular morphology with vascular dystopia, which may be associated with chromosomal abnormalities.

In literature there are few cases of 9q duplication mosaicism detected in prenatal diagnosis, therefore it's difficult to speculate about the value of mosaicism and how it could influence clinical phenotype.

THE E3-UBIQUITIN LIGASE TRIM50 MODULATES THE AGGRESOME FORMATION BY ALTERING ITS ACETYLATION LEVEL

C. Fusco¹, L. Micale¹, M. Monti³, B. Augello¹, M.T. Pellico¹, C. Maffeo¹, F. Cozzolino³, A. Calcagni², P. Pucci³, G. Merla¹

¹*Medical Genetics Unit, IRCCS Casa Sollievo Della Sofferenza Hospital, 71013 San Giovanni Rotondo, Italy*

²*Telethon Institute of Genetics and Medicine, 80131 Naples, Italy*

³*CEINGE Advanced Biotechnology and Department of Organic Chemistry and Biochemistry, Federico II University, 80131 Napoli, Italy*

TRIM50 is hemizygous in patients affected by Williams Beuren syndrome, a neurodevelopmental genomic disorder, caused by a 1.5-1.8 Mb deletion at 7q11.23. We recently demonstrated that TRIM50 encodes a cytoplasmic E3-ubiquitin ligase that catalyzes the binding of specific substrates to the ubiquitin. Recently we showed that TRIM50 forms highly labile and dynamic cytoplasmic bodies able to localize to and promote the recruitment and aggregation of polyubiquitinated proteins to the aggresome in response to proteasome inhibition, by strengthen its interaction with HDAC6. Using deficient mouse embryo fibroblasts (MEF) we showed that this localization is mediated by HDAC6. Furthermore, using Trim50-deficient MEFs we revealed that TRIM50 regulates the clearance of polyubiquitinated proteins localized to the aggresome.

Here we demonstrated that lysine acetylation is an important post-translational protein modification that regulates TRIM50 E3-ubiquitin ligase activity. Bioinformatic analysis and cellular assays showed that the evolutionary conserved TRIM50 K372 residue is acetylated and that the acetylation is involved in proper TRIM50 aggresome localization. Further we found that HDAC6 functions as a TRIM50 deacetylase in a microtubule dependent manner, and that the acetylation competes for TRIM50 ubiquitination.

In summary we added a new layer in the TRIM50 regulation, demonstrating that TRIM50 enzymatic activities may be regulated by acetylation and that its aggresome localization is mediated by the HDAC6 deacetylase activity.

FOLLOW UP A 2 ANNI IN UN BAMBINO CON TRISOMIA 10p PURA. QUADRO CLINICO E PATTERN NEURORADIOLOGICO

M.E. Scapillati², M. Bertoli¹, V. Alesi¹, G. Fariello², C. Haass², D. Darelli¹, S. Latini¹, G. Barrano¹, M. Finocchi², A. Novelli³

¹*UOSD Genetica Medica, Ospedale San Pietro Fatebenefratelli, Roma*

²*UOS Pediatria e Neonatologia, Ospedale San Pietro Fatebenefratelli, Roma*

³*Istituto CSS-Mendel e IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza*

La trisomia 10 p pura è una condizione estremamente rara. La maggior parte dei casi è rappresentata dal prodotto sbilanciato di traslocazioni reciproche familiari, in cui il quadro clinico è complicato da sbilanciamenti cromosomici aggiuntivi, rendendo più difficile la definizione dei segni e sintomi dovuti alla sola duplicazione del braccio corto del cromosoma 10.

Presentiamo un caso di trisomia 10p pura insorta de novo. Bimbo nato da TC a 31SG+5giorni per IUGR. Appar 6/8. All'EO: ipotonia generalizzata e note peculiari del viso. Deviazione ulnare delle mani e delle dita delle mani.

Le ecografie cerebrali hanno mostrato un'iperecogenicità periventricolare bilaterale ed un aumento degli spazi pericefalici. RMN encefalo: asimmetrica di sviluppo degli emisferi cerebrali, morfologia rudimentale delle scissure silviane (dx>sin).

L'analisi del cariotipo ha evidenziato un corredo cromosomico con un cromosoma 21 derivativo, caratterizzato dalla presenza di materiale eucromatico aggiuntivo in corrispondenza del centromero. La caratterizzazione mediante aCGH ha permesso di definire il materiale cromosomico in eccesso come trisomia del braccio corto di un cromosoma 10 (10p15.3->p11.1, estesa circa 39 Mb).

Le RMN, eseguite a 40 giorni, a 1 e 2 anni, hanno progressivamente definito la presenza di un quadro di tipo malformativo, con aspetto di displasia corticale perisilviana destra. In particolare, a 2 anni: asimmetrica di posizione delle scissure silviane con aspetto dismorfico a destra, corteccia ispessita e aspetto maldefinito della giunzione bianco/grigia ("blurring"). Polimicrogiria/pachigiria della sostanza grigia corticale a livello frontale. Sella turcica dismorfica, ipoplasia del tronco.

Durante il follow up si è evidenziato grave ritardo di accrescimento e grave compromissione dello sviluppo psicomotorio: a 2 anni assenza di contatto visivo, linguaggio fermo alla lallazione e assenza di marcia autonoma.

In letteratura il quadro neuroradiologico riscontrato, talora descritto in pazienti adulti indirizzati all'esame neuroradiologico per sintomatologia convulsiva, non è ad oggi stato descritto in associazione della trisomia 10p.

VARIABLE PHENOTYPE IN 17q12 MICRODELETIONS: CHARACTERIZATION OF AN ATYPICAL CASE

P. PALUMBO¹, V. ANTONA², O. PALUMBO¹, M. PICCIONE², M. CARELLA¹, G. CORSELLO²

¹*Medical Genetics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG), Italy*

²*Operative Unit of Pediatrics and Neonatal Intensive Therapy, Mother and Child Department, University of Palermo, Palermo*

Microdeletions of 17q12 including the hepatocyte nuclear factor 1beta (HNF1B) gene, as well as point mutations of this gene, are associated with the renal cystis and diabetes (RCAD) syndrome (OMIM 137920) and genitourinary alterations. Microdeletions encompassing HNF1B were also identified as a cause of Mayer-Rokitansky-Kuester-Hauser-Syndrome (MRKH, MIM 277000) and, recently, were associated with intellectual disability, autistic features, cerebral anomaly and facial dysmorphism.

In this report, we describe a patient with overgrowth, repetitive and compulsive-like behaviors, intellectual disability, and serious speech delay carriers of a 17q12 de novo deletion occurred on maternal allele, detected by SNP array. Although the deletion encompasses the HNF1B gene, the patient doesn't show renal cystis, diabetes or MRKH syndrome. To the best of our knowledge this is the first reported 17q12 deletion case without renal anomaly, genital anomaly and/or diabetes in a patient that instead shows overgrowth, autistic behaviour and speech delay.

Our case confirms the non penetrance and variable expressivity of this deletion, its complex clinical variability, and is also useful to delineate the phenotypes associated to the deletion that often include neurobehavioral disorders.

LA STORIA GENETICA DELLA POPOLAZIONE SARDA RICOSTRUITA DA DATI GENOME-WIDE

G. Fiorito¹, C. Di Gaetano⁵, F. Rosa¹, S. Guarrera¹, D. Cusi³, F. Frau⁶, C. Barlassina³, C. Troffa⁴, G. Argiolas⁴, R. Zaninello⁴, M.F. Ortu⁴, N. Glorioso⁴, A. Piazza⁵, G. Matullo⁵

¹*HuGeF Human Genetics Foundation Turin, Italy*

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

³*Department of Health Sciences, University of Milan, Italy*

⁴*Hypertension and Related Diseases Center, AOU, University of Sassari, Italy*

⁵*HuGeF Human Genetics Foundation Turin, Italy, Department of Medical Sciences, University of Turin, Italy*

⁶*Department of Health Sciences, University of Milan, Italy, Hypertension and Related Diseases Center, AOU, University of Sassari, Italy*

Il popolamento umano della Sardegna è stato da sempre oggetto di studi approfonditi da parte degli antropologi e dei genetisti. Tale popolazione, infatti, costituisce uno degli outlier genetici nell'analisi delle popolazioni europee e l'isolamento, l'aumentata prevalenza di alcune malattie genetiche, e la sua struttura genetica la rendono un soggetto ideale anche per studi di associazione. I dati finora accumulatisi in letteratura non hanno trovato una concordanza per quel che riguarda la presenza o meno di omogeneità genetica interna all'isola. In questo lavoro sono stati analizzati 1077 individui provenienti dalle principali aree linguistiche della Sardegna tipizzati per più di un milione di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs). Il campione sardo è stato confrontato con la popolazione dell'Italia peninsulare e altre popolazioni europee, confermandone l'unicità. Abbiamo infatti identificato alcuni SNPs che evidenziano un'elevata distanza genetica, misurata mediante F_{st} , tra l'isola e il resto dell'Italia; tra questi risultano particolarmente interessanti quelli localizzati in geni precedentemente indicati come loci correlati all'altezza in età adulta, quali ADAMTSL3 e BNC2, e valori elevati di F_{st} sono stati riscontrati anche per polimorfismi all'interno del gene SOD1, coinvolto nello sviluppo della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA). Inoltre i sardi sembrerebbero caratterizzati da un certo grado di omogeneità genetica interna, così come risulta dall'analisi delle componenti principali, dalle percentuali di ancestry stimate mediante il software ADMIXTURE, e dalla stima dei parametri λ (inflation factor) e F_{st} . L'impiego di uno dei più ampi data-sets esistenti, ha permesso di valutare con maggiore precisione il grado di stratificazione genetica della Sardegna.

UNA DELEZIONE NEL GENE TUSC3 E' ASSOCIATA A DISABILITA' INTELLETTIVA SINDROMICA

A. Novelli¹, L. Bernardini¹, S. Loddo¹, V. Doccini², V. Parisi¹, T. Filippi², A. Battaglia²

¹*Istituto CSS-Mendel, Roma*

²*IRCCS Stella Maris, Pisa*

Mutazioni puntiformi o delezioni intrageniche nel gene TUSC3 sono state identificate in individui con forme di ritardo mentale autosomico recessivo (ARMR) non sindromico.

Abbiamo individuato, mediante analisi di SNP-array (Human GeneChip 6.0, Affymetrix), una microdelezione in omozigosi di 203 Kb in 8p22, che comprende il primo esone del gene TUSC3, in un paziente affetto da ritardo mentale. I genitori, non consanguinei, ma provenienti entrambi da un piccolo paese siciliano, sono risultati portatori della stessa microdelezione in eterozigosi. Il probando aveva lievi caratteristiche dismorfiche (vortice capillifero medio-parietale, fronte leggermente prominente, filtro ipoplasico, orecchie leggermente anteverse, irsutismo su arti e dorso, mani piccole, reticolo venoso superficiale, criptorchidismo a sinistra) e ritardo cognitivo moderato. In particolare, risultava compromessa la comunicazione, con inappropriato inventario fonetico, gravi distorsioni fono-articolatorie e disprassia dell'apparato bucco-fonatorio. La comprensione era limitata a semplici frasi e presentava instabilità motoria, elevata tendenza all'irritabilità e alla distrazione, tratti di ansia e un disturbo oppositivo-provocatorio. I genitori risultavano normali.

TUSC3 codifica per una subunità del complesso oligosaccariltransferasi legato al reticolo endoplasmatico, che catalizza un tappa fondamentale nel processo di N-glicosilazione delle proteine. Questo è il quarto caso di alterazione di TUSC3 che causa ARMR e la terza famiglia in cui è stata descritta la delezione. Sebbene il meccanismo patogenetico non sia ancora stato chiarito, il nostro caso conferma l'importanza del ruolo di TUSC3 nell'eziologia della disabilità intellettiva e suggerisce che delezioni comprendenti questo gene siano più comuni di quanto atteso.

OSTEOPATIA STRIATA CON SCLEROSI CRANICA: CARATTERIZZAZIONE CLINICO-MOLECOLARE DI UN CASO FAMILIARE

S.B. Maitz¹, E. Cattaneo¹, S. Ciceri², P. Radice², P. Cianci¹, M. Mariani¹, D. Perotti², A. Selicorni¹

¹*UOS Genetica Pediatrica, Fondazione MBBM, S. Gerardo, Monza*

²*Unit of Molecular bases of genetic risk and genetic testing, Dep. of Preventive and Predictive Medicine, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italy*

LM viene inviata alla nostra attenzione a 7 mesi con il sospetto clinico di osteopetrosi, variante ad esordio precoce in assenza di anomalie ematologiche. Il padre è riferito essere affetto da osteopetrosi benigna. Alla nascita LM presenta ventricolomegalia, laringomalacia, DIV, ipotonia e dismorfismi, in particolare macrodolicocefalia, costrizione bitemporale, bozze frontali prominenti e mid-face appiattita. L'accrescimento staturoponderale è regolare con importante macrocefalia; lo sviluppo psicomotorio è ritardato. I primi accertamenti eseguiti mostrano inoltre un'ipoacusia trasmissiva bilaterale con TC encefalo che evidenzia "aspetto ispessito e disomogeneo del basicranio e del massiccio facciale; forami ottici modestamente ridotti d'ampiezza; parete canale carotico ispessito con esubero di osso; pneumatizzazione mastoidea pressoché assente". Alla RMN encefalo anomalo andamento dei condotti uditivi interni. Per questa ragione viene eseguito presso altro Centro analisi genetica del gene CLCN7 che risulta negativa. Un Rx scheletro mostra dei reperti non caratteristici di osteopetrosi, ma evidenzia un modesto addensamento delle metafisi con all'interno evidenti strie longitudinali radiotrasparenti. Le caratteristiche cliniche di LM, l'ispessimento del basicranio e la presenza di striature metafisarie ci consentono di porre un sospetto diagnostico di osteopatia striata con sclerosi cranica, patologia X-linked dominante, causata da mutazioni del gene WTX. Si esegue analisi molecolare del gene WTX che evidenzia la mutazione 1072 C>T (R358X). La rivalutazione clinico-radiologica del padre consente di evidenziare un diffuso aumento della radiopacità delle ossa craniche con aumento di spessore della diploe e otosclerosi. Alle radiografie degli arti sono presenti evidenti strie longitudinali metafisarie. La ricerca della mutazione di WTX nel padre sia su sangue periferico che mucosa buccale è risultata negativa. Questo caso conferma l'esistenza di un fenotipo maschile oligosintomatico della condizione, a volte definibile solo su base clinica per la difficoltà a evidenziare il difetto molecolare se presente in forma di mosaicismo a bassa quota.

Screening genetico per tumore della mammella eredo-familiare: esperienza di una popolazione

R. Asproni¹, M. Monne¹, G. Piras¹, A. Uras¹, G. Latte¹

¹UOC Ematologia, Laboratorio Specialistico Ematologia, PO "San Francesco"- ASL Nuoro

INTRODUZIONE. Il registro tumori della provincia di Nuoro 2003-2005 riporta che ogni anno vengono diagnosticati 152 nuovi casi di cancro della mammella (CM) e 20 di carcinoma ovarico. I casi attesi di CM eredo-familiare sono 17 ogni anno. Riportiamo i risultati di uno studio genetico-epidemiologico volto a valutare l'entità delle forme eredo-familiari di CM nella provincia di Nuoro e individuare i soggetti che possano beneficiare di programmi di sorveglianza dedicati.

METODI. Nel periodo 2006-2009, nell'ambito di progetti di ricerca sanitaria finalizzata, abbiamo somministrato un questionario breve sulla familiarità per tumori alle donne in attesa della visita mammografica. Circa il 23% delle donne sono state ricontattate e indirizzate alla consulenza genetica. Per ciascun probando è stato ricostruito l'albero genealogico e calcolato il rischio di essere portatore di mutazioni nei geni BRCA (BoADICEA e BRCAPRO). I soggetti con una probabilità >10% sono stati considerati eleggibili al test genetico e le donne portatrici di una mutazione patogenetica sono state inserite nel programma di sorveglianza con RMN.

RISULTATI. Sono stati somministrati n.1112 questionari. La familiarità per tumore della mammella era presente in 615 donne di cui 250 erano eleggibili per la consulenza genetica. Sono state identificate 67 (26,8%) famiglie a rischio genetico a cui è stato proposto il test per BRCA. Di queste, 8/67 (11,9%) sono risultate portatrici di una mutazione patogenetica, mentre 59 probande sono risultate negative o carrier di una mutazione a significato clinico incerto. Tra le famiglie positive sono stati identificati 19 portatori, di cui 15 sani che sono stati avviati al programma di sorveglianza con RMN.

CONCLUSIONI. Nella nostra popolazione circa il 23% delle donne sane che si sottopongono a screening mammografico appartiene ad una famiglia a rischio genetico e il 3,2% risulta portatrice di una mutazione BRCA. E' importante che le donne che manifestano preoccupazione per la loro storia familiare possano accedere ad un servizio di consulenza genetica oncologica che consenta di discernere tra i casi che necessitano di rassicurazione e quelli a rischio moderato/alto che possono accedere al test genetico e beneficiare di programmi di sorveglianza specifici.

LOW FREQUENCY OF ANOCTAMIN MUTATIONS IN A LARGE COHORT OF DYSTROPHIC PATIENTS

M. Savarese¹, G. Di Fruscio¹, A. Torella¹, T. Giugliano¹, M. Iacomino¹, F. Del Vecchio Blanco¹, A. Cuomo¹, R. Erpice¹, G. Piluso¹, V. Nigro¹

¹*Dipartimento di Patologia Generale, Seconda Università di Napoli, Naples, Italy*

The limb-girdle muscular dystrophies (LGMDs) are a group of disorders characterized by clinical and genetic heterogeneity. Among the different forms of LGMD, the first distinction is between the dominant, LGMD1, and the recessive, named LGMD2. Recently, the LGMD2L form has been associated with recessive mutations in the ANO5 gene. This gene encodes a protein, anoctamin 5, that seems to act as a calcium-activated chloride channel. Recent studies have shown that the LGMD2L is one of the most common LGMDs in Nord Europe.

To calculate the frequency of ANO5 mutations in our cohort of about a thousand patients, we performed a genetic analysis on this gene.

In the first step, to screen the most common mutations located in exons 5 and 20, we sequenced these two exons on 180 unrelated patients, selected from our cohort because of the pattern of inheritance and their phenotypes. This screening evidenced only three patients with the recurrent mutations (c.191 dupA and c.2272 C>T), confirming that these mutations are rarer in the rest of the world than in northern European population because of a founder effect.

Subsequently, by Sanger sequencing, we sequenced whole coding region of ANO5 gene in one hundred patients already screened for the exons 5 and 20. Other 128 patients were analyzed by next generation sequencing after a custom enrichment.

We identified both known and novel mutations, never described in literature, spanning different exons of the ANO5 gene. This suggests that the simple screening of one or two recurrent mutations is not effective. Moreover, our study shows that a low number of dystrophic patients bear mutations in ANO5 gene and evidences a low genotype-phenotype correlation. However, ANO5 gene has to be included in a large next generation analysis, investigating a high number of genes involved in neuromuscular disorders at the same time.

IDENTIFICAZIONE DI UNA NUOVA MUTAZIONE NEL GENE SMPX IN UN PAZIENTE AFFETTO IPOACUSIA NEUROSENSORIALE BILATERALE POSTVERBALE

M. Salvatore¹, B. Benedetta², M. Carella¹, Z. Leopoldo¹, L. Elisabetta⁴

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

²*Audiologia, AOU Meyer, Firenze*

³*SOD Audiologia, AOU Careggi, Firenze*

⁴*UO Genetica Medica, AOU Meyer, Firenze*

Le sordità non sindromiche sono la principale causa di sordità genetica. In base alle modalità di trasmissione, esse si distinguono in: 1) Autosomiche recessive (DFNB), nell'80% dei casi, la maggior parte delle quali caratterizzate da ipoacusia neurosensoriale e prelinguale di grado medio o profondo (insorgenza 0-15 anni); 2) Autosomiche dominanti (DFNA), nel 20% dei casi, caratterizzate da ipoacusia neurosensoriale progressiva e più frequentemente postlinguale, generalmente meno gravi delle forme recessive (insorgenza intorno 10-40 anni); 3) X-linked (DFNX), nell' 1-2% dei casi, caratterizzate da ipoacusia prelinguale più frequente e più grave nel sesso maschile; 4) Mitocondriali, caratterizzate da ipoacusia neurosensoriale bilaterale di grado severo o profondo (insorgenza intorno 5-50 anni).

Diversi sono i geni associati alle forme autosomiche recessive e dominanti, mentre solo tre geni sono noti per le forme legate al cromosoma X. Di recente un quarto locus è stato riportato sul cromosoma X (DFNX4) e mutazioni nel gene SMPX sono state identificate in pazienti affetti da ipoacusia progressiva. Il gene SMPX codifica per una proteina di 88 aminoacidi che non presenta domini funzionali noti, ma si ipotizza un suo ruolo di protezione nelle cellule cigliate della coclea stimulate da sollecitazioni meccaniche esercitate durante il processo di elaborazione uditiva. L'assenza o il malfunzionamento della proteina SMPX, quindi, provocherebbe un danno a livello delle cellule cigliate interne causando una perdita progressiva dell'udito. Si riporta l'analisi mutazionale del gene SMPX (NM_014332.2) in un paziente con ipoacusia di grado grave-profondo ad andamento progressivo. L'analisi, effettuata mediante sequenziamento diretto, ha rivelato la presenza della mutazione c.436delG:p.(Val68SerfsX12) che genera un codone di stop prematuro 12 aminoacidi a valle della delezione. La mutazione segrega nella famiglia e rappresenta il secondo caso di delezione di una base nel gene SMPX in soggetto affetto da sordità grave. Tale risultato, in aggiunta a quanto riportato in letteratura, suggerisce di inserire l'analisi mutazionale del gene SMPX nella diagnostica molecolare delle ipoacusie X-linked.

EXOME SEQUENCING IN PAZIENTI CON CARDIOMIOPATIE FAMILIARI

F. Girolami¹, M. Benelli¹, S. Bardi¹, G. Marseglia¹, C. Pescucci¹, F. Gerundino¹, I. Olivotto², F. Torricelli¹

¹*SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze*

²*Centro di Riferimento Miocardiopatie, AOU Careggi, Firenze*

Premessa.

Le cardiomiopatie ereditarie rappresentano la principale causa di malattia del miocardio con oltre 50 geni coinvolti (> 15 geni per la CMI, >30 per la CMD e >10 per la ARVC) e grande eterogeneità genetica. La Next Generation Sequencing (NGS), risulta potenzialmente adatta per studiare tali disordini genetici complessi.

Scopo dello Studio.

Scopo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare mediante Whole Exome Sequencing (WES) 12 pazienti affetti da Cardiomiopatie familiari ad esordio giovanile (8 CMI, 1CMD, 1ARVC, 2 con forme non classificabili), risultati negativi alla diagnostica genetica standard.

Materiali e Metodi.

Dopo arricchimento del DNA genomico mediante TruSeqTMExome Enrichment Kit (Illumina San Diego CA, USA), è stata effettuata la corsa in paired-end su piattaforma Illumina HiScan SQ e la conseguente analisi bioinformatica per l'identificazione di varianti di singolo nucleotide e inserzioni/delezioni. Il successivo filtraggio delle chiamate è stato eseguito considerando la frequenza nella popolazione (ESP6500 e 1KGP), la funzione, la conservazione (GERP e PhyloP) e la predizione del danno sulla proteina (MutationTester, Polyphen, SIFT, AGVGD, NNSplice, NetGene2). Al fine di dare una priorità ai geni risultati dal filtraggio, sono stati consultati i database NCBI-Gene e HGMD. Infine ove possibile è stata testata la cosegregazione.

Risultati.

Sono state individuate 188283 varianti nei 12 campioni studiati (15690/campione). Per ciascun campione è stato ottenuto un coverage medio nel target di circa 30X. Il filtraggio ha evidenziato 1569 varianti (138/campione). La prioritizzazione dei geni ha portato ad identificare in totale 51 varianti (4/campione) "high priority" di cui 5 precedentemente descritte in letteratura. Nonostante si tratti di dati preliminari, alcune delle varianti identificate si ritengono fortemente candidate per un ruolo patogenetico.

Conclusioni.

Questi dati preliminari mostrano le elevate potenzialità del WES nella comprensione delle basi genetiche delle cardiomiopatie e forniscono spunti di discussione sulla possibilità di utilizzare tale tecnologia in diagnostica, in particolare per quei casi negativi all'analisi genetica standard.

SNPs-ARRAY: THE UTILITY OF GETTING WHOLE GENOME GENOTYPE INFORMATION

M. MIROBALLO¹, P. PALUMBO¹, T. PALLADINO¹, R. STALLONE¹, L. ZELANTE¹, M. CARELLA¹, O. PALUMBO¹

¹*Medical Genetics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG), Italy*

²*Department of Biology, University of Bari, Bari, Italy*

Chromosomal microarray analysis has become an indispensable component of constitutional cytogenetic laboratory testing. SNP-based microarrays, with their added ability to detect genome-wide allele states, gain more widespread diagnostic use. In addition to specific genotype data, analysis of SNP allele patterns is useful to: (i) confirm CNV calls, (ii) increase sensitivity in detecting mosaicism, and (iii) detect excess of homozygosity. Although excessive homozygosity is not diagnostic of any pathological condition, LCSH (Long Contiguous Stretch of Homozygosity), according to their size, frequency and distribution throughout the genome, may have several meaning eligible of further investigation strategies. LCSH regions found throughout the genome, are usually assumed to represent regions identical by descent (IBD). These regions could harbor homozygous recessive mutation in a disease gene, or, in case of LCSH region shared between affected peoples, represent a recessive disease locus. Finding a gene of interest in an LCSH, although certainly not diagnostic of a homozygous mutation in that gene, may help to prioritize follow-up testing for multigenic disorders. Furthermore, when associated to NGS data, LCSH may be useful to focus the bioinformatics analysis on these regions. The higher the number and the size of LCSH, the greater the presumed parental consanguinity, which degree can be approximately estimated by a simple computational method.

If one or more regions of LCSH are found mainly on a single chromosome, they could represent uniparental disomy (UPD). UPD can occur as either isodisomy (iUPD), heterodisomy (hUPD) or, more often, a mixture of both conditions. While at genotype level iUPD results in a loss of heterozygosity (LOH) found on proband, hUPD needs trio analysis. In these cases, especially if the chromosome is associated with imprinted gene disorders and particularly when the clinical features of the patient are consistent with the syndrome of interest, the follow-up investigation strategy consist in performing microsatellite analysis.

In the present study we will report some examples of the diagnostic utility in analyzing LCSH detected by SNPs-Array.

RENE POLICISTICO AUTOSOMICO DOMINANTE: RISULTATI DELL'ANALISI MOLECOLARE IN UNA CASISTICA TOSCANA

S. Falconi¹, C. Giuliani¹, M. Trafeli¹, A. Gozzini¹, E. Pelo¹, L. Cirami², F. Torricelli¹

¹*SOD Diagnostica Genetica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze*

²*DAI-Specialità Medico-Chirurgiche / Nefrologia dei Trapianti e Dialisi, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze*

L'ADPKD (Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease) è una malattia autosomica dominante dovuta, nell'85% dei casi, a mutazioni del gene PKD1 (16p13.3) responsabile della forma più grave e precoce e, nel 15% dei casi, a mutazioni del gene PKD2 (4q21) associato ad una forma meno severa e a più lento decorso. La diagnosi genetica dell'ADPKD è complicata non soltanto dalla particolare struttura di PKD1, (46 esoni, un trascritto di circa 14kb e 6 pseudogeni ad omologia di sequenza superiore al 75%), ma anche da un'elevata eterogeneità mutazionale che implica l'identificazione di mutazioni "private" e di varianti di significato patogenetico incerto.

Ad oggi, presso la SOD Diagnostica Genetica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, è stato eseguito il sequenziamento automatico della regione non duplicata di PKD1 e del gene PKD2 in 52 pazienti non consanguinei con diagnosi clinica di ADPKD. Una variante di sequenza è stata evidenziata nel 21% dei pazienti analizzati (11/52).

In particolare sono state riscontrate le varianti c.11498_11500del, c.10895_10898del, c.11615A>T e c.11137dup su PKD1 e c.404G>T, c.1319+1G>A, c.1446-49delCTTT, c.1704dup, c.916C>T, c.965G>A e c.1960C>T su PKD2.

Di queste risultano descritte sull'"ADPKD Mutation Database" (<http://pkd.mayo.edu>) le varianti c.916C>T, c.1319+1G>A, c.1446_1449delCTTT, c.965G>A e c.1960C>T come patogenetiche e la variante c.404G>T con significato indeterminato; le varianti c.11498_11500del, c.10895_10898del, c.11615A>T e c.11137dup non sono invece presenti, e assumono pertanto un significato patogenetico incerto.

Nel tentativo di definire la probabile correlazione esistente tra difetto molecolare e sintomatologia clinica dell'ADPKD abbiamo cercato di associare, per ogni probando della nostra casistica, il fenotipo al difetto molecolare identificato, servendoci dei risultati del sequenziamento genico e delle informazioni anamnestiche raccolte in sede di consulenza genetica.

SINDROME DI PALLISTER-KILLIAN CON ESASOMIA 12p A MOSAICO

A. Zonta¹, F. Sirchia¹, P. Vigliano², G. D'Alessandro¹, E. Savin¹, T. Scopacasa¹, D. Russo¹, G. Gai¹, P. Albini³, G. Tadini⁴, N. Migone⁵, E. Grosso¹

¹SCDU Genetica Medica, Az. Osp. Città della Salute e della Scienza di Torino

²SC Neuropsichiatria Infantile, Ospedale Martini Nuovo, Torino

³SCDU Dermosifilopatia, Az. Osp. Città della Salute e della Scienza di Torino

⁴Centro Malattie Cutanee Ereditarie, Università di Milano

⁵Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino

La Sindrome di Pallister-Killian (PKS) è caratterizzata da ritardo mentale, epilessia, ipotonia neonatale, strie di ipo/iperpigmentazione cutanea, tratti peculiari del volto e malformazioni diaframmatiche, anorettali e cardiache dovuta alla presenza di tetrasomia/esasomia a mosaico 12p.

Il nostro paziente, che presentava alla nascita plica palmare unica a destra e displasia bilaterale dell'anca, ci è stato riferito per ipocromia cutanea a disposizione blaschkoide su tutto il tegumento, ipertelorismo, filtro naso-labiale allungato con labbro superiore sottile, radice nasale allargata e attaccatura alta dei capelli. Lo sviluppo neurologico è adeguato all'età. Un'ecografia addominale e un'ecocardiografia sono risultate nella norma.

I genitori (analizzati in precedenza per poliabortività) presentano entrambi un cariotipo normale. Il cariotipo del bambino su sangue periferico è risultato normale. L'esame cromosomico su fibroblasti cutanei ha evidenziato 3 linee cellulari: 47,XY,+mar[14]/48,XY,+2mar[4]/46,XY[27]. La FISH su fibroblasti cutanei con sonda painting per il cromosoma 12 e sonda per la regione subtelomerica 12p ha mostrato che il cromosoma marcatore è un isocromosoma formato dai bracci corti di un cromosoma 12 [i(12p)].

Fino ad oggi in letteratura sono stati riportati solo altri due casi viventi di PKS con esasomia 12p a mosaico associata o meno a tetrasomia 12p. In base ai dati oggi disponibili non è evidente una stretta correlazione tra la percentuale di cellule con esasomia e la gravità dei segni. Il paziente da noi descritto rappresenta un caso lieve, il cui accertamento è avvenuto per l'ipocromia blaschkoide, e non ha presentato ipotonia neonatale, crisi convulsive, malformazioni addominali o cardiache; lo sviluppo psicomotorio è risultato inoltre adeguato all'età a cinque anni. Il caso da noi presentato conferma quindi l'ampia variabilità fenotipica della PKS e le difficoltà diagnostiche in assenza di un fenotipo grave.

Va sottolineata infine l'importanza della biopsia cutanea per il cariotipo su fibroblasti in presenza di ipocromia cutanea a disposizione blaschkoide e di altre malformazioni o di sospetta PKS poiché le indagini su sangue periferico possono non documentare lo stato di tetrasomia/esasomia a mosaico.

Labiopalatoschisi, ipospadia e aplasia cutis in neonato con delezione 8q23.3-q24.12

M. Bertoli¹, V. Alesi¹, C. Consigli², E. Sorrentino², M. Pacella², E. Dedja², S. Morara¹, A. Orchi¹, G. Barrano¹, A. Novelli³

¹*UOSD Genetica Medica, Ospedale San Pietro Fatebenefratelli, Roma*

²*UOS Pediatria e Neonatologia, Ospedale San Pietro Fatebenefratelli, Roma*

³*Istituto CSS-Mendel e IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza*

La delezione 8q24.1 (o Sindrome di Langer-Giedion) è una sindrome rara da geni contigui, associata a esostosi multiple, capelli radi, epifisi delle falangi a cono, ritardo di crescita postnatale, e ritardo mentale.

Presentiamo il caso di un bimbo con Sindrome di Langer-Giedion diagnosticata alla nascita successivamente all'analisi di cariotipo ed approfondimento mediante arrayCGH eseguite per l'associazione di labiopalatoschisi, ipospadia e criptorchidismo e aplasia cutis del vertice.

Nato a 36 settimane di gestazione, da taglio cesareo eseguito d'urgenza per alterazione del tracciato cardiocografico, con misurazioni nella norma per l'età gestazionale, Apgar 8/9.

L'analisi di aCGH, ha messo in evidenza una microdelezione sul braccio lungo del cromosoma 8, nella regione 8q23.3 # 8q24.12 estesa circa 5,4 Mb e comprendente i geni TRPS1 ed EXT1 (regione critica per la Sindrome di Langer-Giedion). La microdelezione è insorta de novo.

A 7 mesi, dopo il primo intervento per labiopalatoschisi, è in buone condizioni generali, le misure antropometriche sono nella norma, si alimenta senza difficoltà e lo sviluppo psicomotorio è adeguato alla sua età. L'esame radiologico total body non ha al momento riscontrato alcuna anomalia ossea.

È descritto in letteratura solo un altro caso di Sindrome di Langer-Giedion associato a labiopalatoschisi in letteratura (Tiberio G. et al 1999), mentre il caso presentato è il primo, a nostra conoscenza, che si presenta con questa associazione di malformazioni congenite multiple (ipospadia e criptorchidismo, labiopalatoschisi e aplasia cutis).

ANOMALIE CEREBRALI E REGRESSIONE TESTICOLARE : UNA NUOVA SINDROME ?

M. Rossi¹, A. Labalme¹, G. Blanchard², R. Bouvier³, A. Vasiljevic³, L. Guibaud⁴, P. Bretones⁵, M. Till¹, V. Des Portes², D. Sanlaville¹, Y. Morel⁶, P. Ederly¹

¹Centre de référence des anomalies du développement, Service de Génétique, CHU de Lyon, France.

²Service de Neuropédiatrie, CHU de Lyon, France.

³Service d'Anatomie Pathologique, CHU de Lyon, France.

⁴Service d'Imagerie Pédiatrique et Fœtale, CHU de Lyon, France.

⁵Service d'Endocrinologie Pédiatrique, CHU Lyon, France.

⁶Service d'Endocrinologie Moléculaire et Maladies Rares, CHU de Lyon, France.

Riportiamo il caso di una sindrome polimalformativa che, a nostra conoscenza, non è stata descritta finora in letteratura. Il paziente 1 presenta un fenotipo caratterizzato da micropene senza ipospadia, anorchidia; ritardo psicomotorio severo; spasticità; epilessia; dismorfismi; ipoacusia; probabile retinopatia; atrofia cerebrale, ipoplasia del corpo calloso e cavità cistiche periventricolari.

La gravidanza successiva della coppia è stata interrotta a 34SA per una recidiva: il feto (paziente 2) presenta degli organi genitali ambigui, un'atrofia testicolare; un'ipoplasia del corpo calloso, delle cavità cistiche cerebrali; qualche punto di calcificazione periarticolare.

Gli esami realizzati nel paziente 1 (cariotipo, telomeri, analisi dei geni SRY, SF1, ARX, ATRX, screening metabolico esaustivo, pattern d'inattivazione del cromosoma X nella madre) sono risultati normali.

Un'analisi mediante array CGH (105k, Agilent®) ha messo in evidenza una delezione (17)(q21.33) di 29kb, ereditata dal padre, che include i geni NME1 e NME2. Tali geni sono espressi durante la spermatogenesi e nel sistema nervoso. Per valutare una loro eventuale implicazione, abbiamo realizzato un'analisi di microsatelliti, che ha mostrato che l'allele non deletato nel locus NME1/2 è identico nei due fratelli affetti. Tale risultato, compatibile con un'eredità autosomica recessiva, ha motivato la realizzazione di un'analisi molecolare dei geni NME1/2 che, tuttavia, non ha messo in evidenza alcuna mutazione. Uno studio in exome sequencing è previsto.

La diagnosi differenziale include la sindrome genitopatellare, causata da mutazioni dominanti del gene KAT6B, e caratterizzata da ipoplasia scrotale, ipo-aplasia delle rotule, ipoplasia/agenesia del corpo calloso, ritardo psicomotorio, contratture articolari ed anomalie renali. Le principali differenze includono la presenza, nei nostri pazienti, di rotule normali, segni di retinopatia, cavitazioni cistiche cerebrali e l'assenza d'anomalie renali.

In conclusione, riportiamo i risultati preliminari di uno studio di caratterizzazione fenotipica e molecolare di una sindrome ereditata in modo autosomico recessivo o legato all'X, caratterizzata dall'associazione di una regressione testicolare ed un'encefalopatia.

IDENTIFICAZIONE MEDIANTE EXOME SEQUENCING DI UNA VARIANTE DEL GENE RBMXL1 IN UNA FAMIGLIA AFFETTA DA ATASSIA CEREBELLARE PURA

A. Legati¹, C. Magri¹, M. Traversa¹, S. Barlati¹, M. Colombi¹, R. Gardella¹

¹*Sez. di Biologia e Genetica, Dip. Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università degli Studi di Brescia*

Le atassie cerebellari ereditarie sono un gruppo eterogeneo di malattie neurologiche caratterizzate dalla perdita di coordinazione dei movimenti, frequentemente associata a sintomi di natura non cerebellare, quali neuropatie periferiche, spasticità muscolare, etc. Si distinguono forme a trasmissione autosomica dominante e recessiva, X-linked e mitocondriale. Nelle forme recessive sono stati identificati più di 20 geni-malattia, ma in circa la metà dei pazienti il difetto molecolare rimane sconosciuto.

Abbiamo analizzato una famiglia con due sorelle affette da una forma di atassia cerebellare pura (senza coinvolgimenti extracerebellari) e presumibilmente, data la consanguineità dei genitori, a trasmissione recessiva. Per identificare il gene-malattia abbiamo condotto un'analisi di genome-wide scan con gli SNP-array 250K Affymetrix sulle due probande, il fratello non affetto e i genitori. Mediante homozygosity mapping sono state identificate due regioni candidate, in 1p22.3-p21.2 e 6p12.1-q14.1, nessuna delle quali contiene geni noti per l'atassia. Poiché in queste regioni mappano almeno 130 geni, si è deciso di procedere all'analisi di exome sequencing sul DNA delle due probande. Rispetto al dbSNP134 sono state identificate 51 nuove varianti omozigoti comuni alle due sorelle affette, di cui 8 non sinonime, tutte di tipo missense. Di queste, solo una è risultata mappare all'interno delle regioni candidate: la transizione 89.448.356 C>A sul cromosoma 1, all'interno del gene RBMXL1 (RNA binding motif protein, X-linked-like1), che causa la sostituzione G385V, predetta come dannosa dal software SIFT.

Le funzioni di RBMXL1 non sono note ma, in base all'omologia con RBMX, si presume possa intervenire nei processi di splicing e di riparo del DNA. Alterazioni in geni che partecipano a questi meccanismi sono state riportate come causa di alcune forme di atassia. Questi dati preliminari indicano che RBMXL1 potrebbe rappresentare un nuovo gene coinvolto nell'atassia.

INTERAZIONE TRA POLIMORFISMO VNTR NEL 3' NON TRADOTTO DEL GENE PER IL TRASPORTATORE DELLA DOPAMINA (DAT) E PERCEZIONE DELLE CURE MATERNE SULL'ATTIVITÀ PREFRONTALE E LA CONNETTIVITÀ CEREBRALE DURANTE L'ELABORAZIONE EMOTIVA NELL'UOMO

L. Sinibaldi¹, P. Taurisano², G. Blasi³, R. Romano³, F. Sambataro⁶, L. Fazio², B. Gelao³, G. Ursini², L. Lo Bianco⁴, A. Di Giorgio⁵, F. Ferrante³, A. Papazacharias³, A. Porcelli³, T. Popolizio⁵, A. Bertolino²

¹*Istituto Mendel, IRCCS "Casa Sollievo della Sofferenza", San Giovanni Rotondo, Foggia*

²*Dipartimento di Neuroscienze e Organi di Senso, Università "Aldo Moro", Bari; IRCCS "Casa Sollievo della Sofferenza", San Giovanni Rotondo, Foggia*

³*Dipartimento di Neuroscienze e Organi di Senso, Università "Aldo Moro", Bari*

⁴*Dipartimento di Neuroscienze e Organi di Senso, Università "Aldo Moro", Bari; Dipartimento di Neuroscienze, Università della Marche, Ancona*

⁵*IRCCS "Casa Sollievo della Sofferenza", San Giovanni Rotondo, Foggia*

⁶*Brain Center for Motor and Social Cognition, Istituto Italiano di Tecnologia, Parma*

Premessa: un ruolo cruciale nell'elaborazione delle emozioni è svolto a livello di circonvoluzione frontale inferiore, nucleo striato ed amigdala, dall'attività del neurotrasmettitore dopamina (DA) e dalle cure ed attenzioni ricevute dalla madre. La ricaptazione della DA dallo spazio sinaptico è eseguita dal trasportatore della DA (DAT), la cui espressione è influenzata dalla variazione del numero di ripetizioni in tandem (VNTR) di una sequenza di 40 nucleotidi all'interno del 3' non tradotto del gene DAT, presente per lo più in due forme alleliche da 9 e 10 ripetizioni.

Scopo dello studio: valutare l'eventuale interazione tra cure materne percepite e genotipo del 3'VNTR di DAT sull'attività cerebrale, durante elaborazione di stimoli emotivi suscitati dalla visione di espressioni facciali avverse (come paura o rabbia).

Materiali e Metodi: 61 controlli sani sono stati genotipizzati per il 3'VNTR di DAT e suddivisi in due categorie per numerose e limitate cure materne ricevute. I soggetti studiati sono stati sottoposti a risonanza magnetica funzionale durante l'esecuzione di un compito di valutazione del genere (maschile o femminile) di immagini di volti che esprimevano rabbia, paura o espressione neutra.

Risultati: è stata rilevata un'interazione tra l'espressione del volto, il genotipo VNTR di DAT e le cure materne percepite a livello della circonvoluzione frontale inferiore sinistra, per cui limitate cure materne ed omozigosi per l'allele da 10 ripetizioni sono risultati associati ad una maggiore attività durante l'elaborazione dei volti con espressioni avverse. Questa maggiore attivazione è anche inversamente correlata al controllo emotivo, misurato tramite Big Five Questionnaire. Inoltre, le cure materne ed il genotipo DAT delineano una doppia dissociazione tra connettività della circonvoluzione frontale inferiore e dell'amigdala, per cui sia la differenza di genotipo che di cure materne ricevute caratterizzano la connettività del soggetto, rilevando l'interazione tra ambiente e variante genetica.

Conclusioni: i risultati suggeriscono che la percezione del legame precoce con i genitori possa interagire con il genotipo del 3'VNTR del gene DAT nella modulazione dell'attività cerebrale nella ricezione di stimoli emotivamente rilevanti.

SINDROME DI ROTHMUND-THOMSON: CARATTERIZZAZIONE CLINICO-MOLECOLARE DI TRE NUOVI PAZIENTI

E.A. Colombo¹, L. Fontana¹, G. Roversi², G. Negri¹, M. Paradisi³, D. Castiglia³, A. Locatelli⁴, G. Zambruno³, L. Larizza¹

¹*Genetica Medica, Dip. di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano, Milano*

²*Dip. di Chirurgia e Medicina Interdisciplinare, Università di Milano Bicocca, Monza*

³*Istituto Dermatologico dell'Immacolata-IRCCS, Roma*

⁴*Ospedali Riuniti, Bergamo*

La sindrome di Rothmund-Thomson (RTS) è una rara genodermatosi a trasmissione autosomica recessiva. Al segno cardine del poichiloderma si associano bassa statura, alterazioni scheletriche, invecchiamento precoce, cataratta e predisposizione al cancro, in particolare osteosarcoma. Il gene RECQL4 è mutato nei 2/3 dei pazienti. I pazienti con mutazione, difetti scheletrici e suscettibilità al cancro sono definiti RTS di tipo II mentre quelli privi di mutazione, con cataratta e senza aumentato rischio di tumori, RTS di tipo I.

Riportiamo l'analisi clinica e molecolare di 3 nuovi pazienti: 2 fratelli italiani di 8 e 1 anno e un giovane sudamericano di 17 anni. L'analisi molecolare del caso familiare ha identificato nella bimba, che all'età di 4 anni presentava poichiloderma e lievi difetti scheletrici, e nel fratello la presenza della nuova mutazione di stop c.2272C>T nell'esone 13 (p.R758*), ereditata dal padre, e della delezione nell'esone 14 c.2493_2494delAT (p.H831Rfs51*) di origine materna, entrambe nel dominio elicastico. Entrambi gli alleli mutanti predicono proteine tronche non funzionali. L'analisi dei trascritti è conforme alla predizione per la delezione materna ma non per la mutazione paterna che codifica per un trascritto alternativo che subisce lo skipping in frame della porzione di esone 13 contenente l'alterazione. Tale trascritto è rilevabile anche nei controlli, ma paziente e padre portatore ne mostrano maggiori livelli probabilmente a causa della perdita funzionale dell'ESE in cui è localizzata la c.2272C>T.

Studi di fragilità cromosomica spontanea e l'applicazione del cytome assay sui linfociti della bimba hanno evidenziato un aumento dei segni di instabilità genomica: micronuclei, buds e ponti nucleoplasmatici.

Il terzo paziente, caratterizzato da marcato poichiloderma su volto e arti superiori ma privo di alterazioni scheletriche, esemplifica l'eterogeneità clinica e allelica di RTS. L'analisi molecolare ha evidenziato la nuova mutazione missenso c.3265G>T (p.S1078M) in omozigosi nell'esone 18, fuori dal dominio elicastico. E' in corso l'analisi dei trascritti per stabilirne il significato patogenetico, compatibile con la presenza di una proteina RECQL4 ed in accordo col fenotipo clinico lieve del paziente.

ANOMALIE CROMOSOMICHE MULTIPLE IN UNA PAZIENTE CON FENOTIPO COMPLESSO: RUOLO DELL'ARRAY-CGH

P. Fontana¹, A. Casertano², G. Minopoli², G. Cappuccio², A. Rossi², A. Conti³, P. Tedeschi³, A. Mormile³, L. Nitsch³, G. Andria², R. Genesio³, D. Melis²

¹*Area funzionale di Genetica Medica A.O.U. Federico II di Napoli*

²*Dipartimento di Pediatria A.O.U. Federico II di Napoli*

³*Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare A.O.U. Federico II di Napoli*

Le anomalie cromosomiche complesse sono riarrangiamenti strutturali coinvolgenti due o più cromosomi, spesso riportati come casi unici. Possono essere ereditate o de novo e, sebbene rare, la loro caratterizzazione è importante per la diagnosi di pazienti complessi e l'identificazione di carrier asintomatici. Descriviamo una paziente ora 18enne giunta all'osservazione a 21 mesi per ritardo psico-motorio e displasia congenita dell'anca. Tra 3 e 5 anni di vita si delinea coinvolgimento oculare con ptosi, nistagmo, exotropia, degenerazione tapetoretinica. Si palesano lassità legamentosa, dilatazione della radice aortica e iperelasticità cutanea, suggestivi di disordine connettivale. A 6 anni per rilievo di marcato ispessimento delle rocche petrose si pone diagnosi di osteopetrosi intermedia; a 12 la paziente sviluppa epilessia con assenze complesse e un quadro di piastrinopenia e piastrinopatia tipo δ -storage pool. Negli anni la curva di crescita subisce una progressiva deflessione, mentre controlli radiografici testimoniano un ingravescente incurvamento bilaterale di femore, tibia e ulna. Negli anni, la paziente ha effettuato cariotipo, FISH per s.Jacobsen, esame molecolare del gene COL2A1 (s.Stickler), studio della biosintesi del collagene da fibroblasti in coltura, indagini senza esiti patologici. Ha infine praticato array CGH, che evidenzia le seguenti delezioni de novo: 1q41, 1q43, 9p24.3, 21q22.12. Diverse alterazioni fenotipiche della paziente possono essere spiegate dalla monosomia di alcuni geni contenuti nelle regioni interessate. Al gene PROX1 (1q41) viene riconosciuto un ruolo importante nello sviluppo embrionale encefalico, cardiaco e retinico; mutazioni in TGFB2 (1q41) sono descritte in vitreoretinopatie e alterazioni della matrice connettivale; CHRM3 (1q43) causa anomalie scheletriche tra cui displasia dell'anca e scoliosi. KANK1 (9p24.3) e RCAN1 (21q22.12) appaiono importanti nello sviluppo del SNC. La piastrinopatia storage-pool si associa a mutazioni in RUNX1 (21q22.12). Il lavoro intende evidenziare l'importanza dei test genomici di ultima generazione nei pazienti con fenotipi complessi e multidistrettuali, che sfuggono all'inquadramento diagnostico dal punto di vista clinico e costituiscono nuove sfide per la consulenza genetica e riproduttiva.

CLINICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PTEN HAMARTOMA TUMOR SYNDROME IN ITALIAN PATIENTS

M. Patruno¹, R. Bagnulo¹, D. Varvara¹, F.C. Susca¹, P. Lastella², G.M. Lenato², A. Stella¹, N. Resta¹

¹ *UOC Laboratorio di Genetica Medica, AOU Consorziale Policlinico di Bari, Bari*

² *Centro Sovraziendale Malattie Rare, AOU Consorziale Policlinico di Bari, Bari*

Mutations in PTEN gene are responsible for a heterogeneous group of disorders, with often overlapping clinical features, commonly referred to PTEN hamartoma tumor syndrome (PHTS).

The aim of the present study was to provide the molecular characterization of PHTS Italian patients, to correlate the pathogenic PTEN mutation with the phenotype manifestations, and to carry out a comparison of clinical spectrum between mutation-positive and mutation-negative.

Samples on 83 subjects were collected for PTEN testing by Medical Genetics Unit of Policlinico Hospital of Bari.

Germline PTEN mutations were found in 27/83 subjects (32%): 21 were point mutations, scattered across the whole gene, and 6 were large deletions. Large deletions including PTEN locus are poorly described thus far. Breakpoint characterization through CGH analysis revealed that 4 of them encompassed contiguous genes (2.25-4.49 Mb). Noteworthy, three genomic deletions also included a second well-known tumor suppressor gene (BMPR1A).

Mutation carriers showed a wide variability in clinical features, with no clear relationship with either mutation position or type. Among the 24 individuals carriers of non-involving-BMPR1A mutation, 10 subjects had clinical features of CS, 5 of BRRD, 3 autism spectrum disorders with macrocephaly, 2 macrocephaly, 2 multiple tumors, 1 macrocephaly with lipomas and 1 gastrointestinal polyps. The three BMPR1A-involving-deletion carriers presented clinical features typical of juvenile polyposis syndrome with a more severe clinical course and more pronounced extraintestinal manifestations, such as macrocephaly, mental retardation and facial dysmorphisms. Of all 27 mutation carriers, 14 met the Revised Cowden Syndrome Consortium Diagnostic Criteria (51%).

LE DISFERLINOPATIE NEL SUD ITALIA

A. Taglia¹, S. Aurino², A. Palladino¹, E. Picillo¹, L. Passamano¹, E. Viggiano¹, M. Scutifero¹, G. Piluso², V. Nigro², L. Politano¹

¹Cardiomiologia e Genetica Medica - Dip. di Medicina Sperimentale - Seconda Università di Napoli, Napoli

²Dip. di Patologia Generale - Lab. di Genetica Medica - Seconda Università di Napoli, Napoli

Il termine "disferlinopatie" si riferisce ad un gruppo di Distrofie muscolari autosomiche recessive causate da mutazioni nel gene della disferlina, che provocano l'assenza della proteina a livello del sarcolemma della fibrocellula muscolare. La ridotta o completa assenza di espressione della disferlina a livello del sarcolemma consente di porre diagnosi di disferlinopatia e di indirizzare l'indagine molecolare, per la ricerca di mutazioni nel gene corrispondente. Lo screening genetico è di particolare importanza sia per l'accuratezza diagnostica, sia per la consulenza genetica ed un appropriato trattamento.

Le Disferlinopatie possono manifestarsi sia con il quadro clinico della Distrofia muscolare dei Cingoli 2B (LGMD2B), sia con il quadro clinico della Miopatia di Miyoshi (MM). In questa sede descriviamo il fenotipo di 34 pazienti, di età compresa tra 11 e 56 anni, con mutazioni nel gene della disferlina, provenienti dalla Campania e dalle altre Regioni del Sud Italia. Il 60% dei casi è familiare, con 4 pazienti cugini di primo grado, 1 coppia di gemelli dizigoti e 5 coppie di fratelli. Poiché in nessuno dei casi di origine campana, i genitori sono consanguinei, è postulata la presenza di una "founder mutation". Circa il 50% dei pazienti presenta un fenotipo distale tipico della Miopatia di Miyoshi, mentre il 35% circa presenta un fenotipo LGMD2B.

Due pazienti – arrivati alla nostra osservazione per presenza di "iperCKemia isolata" - non presentavano debolezza o atrofia muscolare. La diagnosi in questi due ultimi casi è stata possibile grazie alla biopsia muscolare, resasi necessaria per gli elevati livelli di CK (fino a 50 volte il valore massimo normale). Nessun paziente presentava interessamento cardiaco, mentre circa il 50% di essi presentava un coinvolgimento respiratorio, di grado variabile. Si propone una possibile correlazione tra tipo di mutazione e fenotipo corrispondente.

ARRAY-CGH:SINDROMI NOTE, VARIANTI PRIVATE ENUOVE SINDROMI

E. Belligni¹, E. Di Gregorio¹, E. Biamino¹, A. Calcia¹

¹*Dip. Genetica, Biologia e Biochimica, Università di Torino*

Abbiamo analizzato un gruppo di 513 pazienti affetti da ritardo delle acquisizioni neuromotorie/deficit cognitivo, associato a malformazioni congenite e/o dimorfismi mediante array-CGH (60 K, Agilent). Le varianti individuate, non riportate nel Database of Genomic Variants (DGV) come anomalie comuni nella popolazione sana, sono state suddivise in quattro gruppi:

1) 46 pazienti (8,9%) hanno una sindrome da microdelezione/microduplicazione nota, o un riarrangiamento che coinvolge un gene malattia noto. Tra le più frequenti del 22q11.21 (n.6), del/dup 15q13.3 (n.2+2), del/dup 16p11.2 (n.3+4), del 17p21.31 (n.2), del 1p36 (n. 2), del 1q21.1 (n. 1), del 3q29 (n.1), del 7q11.23 (S. di Williams-Beuren, n.2). Tra le delezioni/duplicazioni, che interessano geni malattia noti, sono stati identificati: una dup. NSD1 (controparte S. di Sotos), una del. CREBBP (S. di Rubinstein-Taybi), una del. NF2, una del. PITX2 (S. di Rieger), e una del. ANKRD11 (S. KBG).

2) In 23 casi (4,5%) è stata identificata una delezione e/o duplicazione di estensione superiore a 7 Mb (intervallo 7.5-29 Mb). In due casi il riarrangiamento era a mosaico (>30%), nei restanti, le regioni cromosomiche coinvolte sono risultate di difficile studio mediante cariotipo standard. Cinque dei 23 casi, sono soggetti portatori di un cromosoma derivativo, secondario ad una traslocazione bilanciata e confermata successivamente mediante FISH in uno dei genitori.

3) In 15 casi (3%) è stata identificata un delezione o duplicazione (150 Kb-1,4 Mb) considerata potenzialmente patogenetica perché di dimensioni maggiori di 400 Kb e contenente almeno un gene candidato. Dieci soggetti mostravano un riarrangiamento de novo, mentre in cinque segregava in più membri affetti. Tra quest' ultime segnaliamo: (i) una delezione atipica di 1,3 Mb in 3q29 (13 geni coinvolti); (ii) una delezione di 500 Kb in 5q12.3 (5 geni coinvolti); (iii) delezione di 1,4 Mb in 16p13.12p12.3 (14 geni coinvolti).

4) Infine, sono state individuate 52 CNV a significato incerto (da 110 a 900 Kb).

I risultati da noi ottenuti sottolineano l'importanza dell'array-CGH come analisi di primo livello nei pazienti con fenotipo complesso e come strumento di identificazione di nuovi geni candidati per disturbi neuro-comportamentali.

STUDIO DEI MECCANISMI PATOGENETICI DELL'ATASSIA SPINOCEREBELLARE TIPO 28

C. Mancini¹, P. Roncaglia², N. Lo Buono¹, E. Gazzano³, A. Bartoletti Stella⁴, E. Mariani⁴, M. Calvaruso⁹, L. Iommarini⁵, A. Brussino¹, C. Cagnoli¹, H. Krmac⁶, G. Stevanin⁷, S. Forlani⁷, A. Funaro¹, A. Durr⁷, A. Porcelli⁵, D. Ghigo³, G. Gasparre⁴, G. Gustincich⁶, A. Brusco¹⁰

¹Dip. Scienze Mediche, Università di Torino

²European Bioinformatics Institute, Cambridge, United Kingdom;

³Dip. Oncologia, Università di Torino

⁴Dip. Scienze Mediche e Chirurgiche, Pol.Universitario S.Orsola-Malpighi, Bologna

⁵Dip. Biologia Evoluzionistica Sperimentale, Università di Bologna

⁶Neurobiology Sector, SISSA/ISAS, Trieste, Italy;

⁷CRICM, UPMC/Inserm UMR_S 975, CNRS UMR 7225 GHU Pitié-Salpê-trière, Paris, France;

⁸SCDU Genetica Medica, Città della Salute e della Scienza, Torino

⁹Dip. Scienze Mediche e Chirurgiche, Pol.Universitario S.Orsola-Malpighi, Bologna, Dip. Biologia Evoluzionistica Sperimentale, Università di Bologna

¹⁰Dip. Scienze Mediche, Università di Torino, SCDU Genetica Medica, Città della Salute e della Scienza, Torino

L'Atassia SpinoCerebellare tipo 28 (SCA28, OMIM#604581) è una malattia autosomica dominante caratterizzata da atassia cerebellare progressiva e difetti oculomotori. Il gene mutato, AFG3L2 (cr18p11.21), codifica per la proteina omonima componente del complesso mitocondriale m-AAA proteasi (ATPases Associated with a variety of cellular Activities).

Mediante analisi del profilo di espressione genica (microarray) sono stati confrontati gli RNA estratti da linee linfoblastoidi (LCL) di quattro pazienti SCA28 (mutazioni T654I, M666T, M666V e G671R) e sei controlli sani.

Gli LCL SCA28 hanno mostrato un profilo di espressione alterato rispetto ai controlli per 117 geni, che con l'aiuto delle risorse di Gene Ontology e NCBI sono stati raggruppati in cluster omogenei: i geni alterati sono coinvolti nella 1) regolazione della crescita cellulare; 2) apoptosi 3) risposta agli stress ossidativi.

Il coinvolgimento di questi pathways è stato confermato con esperimenti funzionali sugli LCL di sette pazienti e sette controlli sani:

1) La cinetica di proliferazione cellulare degli LCL SCA28 è rallentata rispetto ai controlli ($p < 0,001$) e l'analisi del ciclo cellulare ha evidenziato un incremento del 15% di cellule in fase G0/G1 nelle linee dei pazienti ($p < 0,001$).

2) Le linee SCA28 hanno una aumentata mortalità cellulare: solo il 40% delle cellule SCA28 risulta vitale contro il 60% dei controlli ($p < 0,005$).

3) I livelli di perossidazione lipidica delle linee SCA28 in condizioni basali sono aumentati rispetto alle linee di controlli sani ($p < 0,05$).

Infine l'analisi della funzionalità mitocondriale non ha al momento evidenziato alcun difetto specifico a carico dei mitocondri degli LCL SCA28.

In conclusione, l'analisi di espressione genica, seppur effettuata su cellule non di origine neuronale ha permesso di identificare tre pathways correlabili con la malattia.

La diminuzione della crescita e proliferazione cellulare, l'aumento della mortalità e l'incremento dei livelli di stress ossidativo dimostrati nelle linee dei pazienti infatti potrebbero spiegare parte della patogenesi della SCA28 ed essere di aiuto nello sviluppo di futuri approcci terapeutici.

PERCORSO DI STESURA ED APPROVAZIONE DI INFORMATIVE E CONSENSI PER TEST GENETICI DA PARTE DEL COMITATO ETICO: L'ESPERIENZA DELLA U.O. DI GENETICA MEDICA DI FERRARA

A. Armaroli¹, S. Bigoni¹, S. Fini¹, M. Neri¹, F. Gualandi¹, S. Benedetti², F.M. Avato², A. Ferlini¹

¹1UO di Genetica Medica-Azienda Ospedaliero Universitaria S.Anna di Ferrara,

²2UO di Medicina Legale e delle Assicurazioni-Azienda Ospedaliero Universitaria S.Anna di Ferrara

Ogni intervento medico è volontario e richiede esplicito consenso, come sancito dall'articolo 13 della Costituzione Italiana (unico paese europeo) e dal codice di deontologia medica. Il test genetico rappresenta un intervento medico con peculiari implicazioni etiche, sociali, psicologiche e riproduttive. Da ciò la necessità (formulata nelle linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità nel 1998) che il paziente sia informato riguardo il tipo di test proposto, lo scopo, i limiti, i risultati attesi, le eventuali implicazioni etiche e sociali. Tale informazione deve essere completa, accessibile, accurata, comprensibile (ESHG, 2010) ed in nessun modo deve essere condizionata la libera scelta del paziente (consenso) se sottoporsi o meno al test proposto. In Italia, così come nel resto d'Europa, vi è una grande difformità nella formulazione dei moduli di raccolta del consenso e non esistono linee guida univoche.

In collaborazione con la UO di Medicina Legale della Azienda Ospedaliera di Ferrara, è stato intrapreso un percorso mirato ad affrontare le problematiche relative alla corretta informazione al paziente e alla raccolta del consenso nell'ambito specifico dei test genetici. Le diverse tipologie di test genetico (determinazione dell'assetto cromosomico in epoca pre e post-natale; caratterizzazione dell'assetto genotipico di geni e regioni genomiche pre e post-natale) sono state analizzate dal punto di vista etico, della tutela della privacy e dell'identità biologica di ciascun soggetto, sia esso maggiorenne, minorenne o nascituro.

Risultato di tale lavoro collaborativo è stata la redazione di quattro moduli di consenso, con relativi fogli informativi, corrispondenti a ciascuna delle tipologie di test genetico normalmente proposti nella pratica clinica.

Tali documenti sono stati sottoposti alla revisione del Comitato Etico che ne ha dato l'approvazione all'utilizzo nella routine clinica (verbale 7/2012 del 26/07/2012).

Il lavoro svolto può rappresentare un punto di partenza per formulare proposte che consentano di uniformare a livello nazionale le modalità e procedure di informativa e acquisizione del consenso dell'avente diritto in ambito di test genetici.

ALE-HSA21: a pilot integrated database for human chromosome 21

M. Scarpato¹, R. Esposito¹, D. Evangelista², M.R. Ambrosio¹, M. Aprile¹, R. Aversa¹, C. Angelini², A. Ciccodicola¹, V. Costa¹

¹*CNR, Inst. of Genetics and Biophysics "A. Buzzati-Traverso" (IGB), Naples, Italy*

²*CNR, Ist. per l'Applicazione del Calcolo "Mauro Picone" (IAC), Naples, Italy*

Transcriptome studies by next-generation sequencing largely indicate most of transcription occurs outside gene boundaries and untranslated regions (5' and 3' UTRs) regulate both transcription and translation, suggesting that correct gene annotations are crucial to bridge the gap between sequence and biology. The parallel discovery - by RNA-Seq - of new classes of non-coding RNAs, and the pervasive transcription in intronic/intergenic regions, has revealed the importance of de novo discovery of transcriptional units. Conversely, the huge amount of genomic/genetic data provided by large-scale studies, and the lack of a unique user-friendly resource, possibly designed for users with no experience in genetics field, make often difficult to access complete information about one or few genes without browsing different databases.

Thus, starting from in silico analysis of our recent RNA-Seq dataset of trisomic cells, enriched for HSA21 genes, we are setting-up an integrated database, ALE-HSA21 (AnALysis of Expression of HSA21), which contains specific sections with structural, sequence and functional data for each splice variant (~500) of RefSeq HSA21 genes.

In brief, it provides 1) a detailed gene description, including (for each splice variant) reference number, genomic coordinates, information about encoded protein and the involvement in human genetic diseases; 2) sequences of coding exons, introns, 5' and 3' UTRs and promoters, easily downloadable for each transcript, including novel splice isoforms, extended 5' and 3' UTRs for some HSA21 genes, identified in our RNA-Seq study and validated by RT-PCR; 3) a systematic in silico characterization of transcription factors' binding sites in gene promoters, exonic and intronic regulatory elements and miRNAs' regulatory binding sites in 3' UTRs. Moreover, an updated catalogue of single nucleotide polymorphisms, adenosine methylation sites and gene expression data is also provided for each transcript.

Clearly, we focused our analysis on HSA21 genes due to its role in Down syndrome, but we believe such pilot database may represent a good model for further analyses aimed to collect and share large-scale gene annotation studies.

DELEZIONE INTERSTIZIALE CLONALE DEL CROMOSOMA 20 NEL MIDOLLO OSSEO DI PAZIENTI CON SINDROME DI SHWACHMAN-DIAMOND: PERDITA DEL GENE EIF6 E PROGNOSI FAVOREVOLE

R. Valli¹, B. Pressato¹, C. Marletta¹, L. Mare¹, G. Montalbano¹, F. Lo Curto¹, F. Pasquali¹, E. Maserati¹

¹*Genetica Umana e Medica, Dip. Medicina Clinica e Sperimentale, Università dell'Insubria, Varese*

La sindrome di Shwachman-Diamond (SDS), autosomica recessiva (OMIM #260400), è causata da mutazioni del gene SBDS in circa il 90% dei casi. E' una malattia multisistemica con insufficienza del midollo osseo (MO), neutropenia, trombocitopenia ed anemia di gravità variabile, e con un rischio attorno al 30%, di sviluppare una sindrome mielodisplastica (SMD) e una leucemia mieloide acuta (LMA). Nel midollo osseo (MO) anomalie cromosomiche clonali, soprattutto a carico dei cromosomi 7 e 20, sono frequenti: più comuni sono un isocromosoma per le braccia lunghe del cromosoma 7, i(7)(q10), e una delezione delle braccia lunghe del cromosoma 20, che si è dimostrata interstiziale, int del(20)(q11.21q13.32). Il significato di queste anomalie in relazione al rischio di SMD/LMA è discusso: la presenza di i(7)(q10) è stata associata a rischio scarso e prognosi migliore, con una spiegazione molecolare convincente (Minelli et al, 2009). Una prognosi relativamente buona è stata suggerita anche per l'altra anomalia comune, la int del(20) (Crescenzi et al, 2008).

Nella biogenesi dei ribosomi la proteina SBDS si lega alla GTPasi EFL1 provocando il rilascio della proteina EIF6 dalla subunità 60S del ribosoma, permettendo così il legame con la subunità 40S e permettendo la formazione di ribosomi attivi (Finch et al, 2011): le mutazioni causali della SDS interferirebbero con questo meccanismo. Il gene che codifica per EIF6 è localizzato sul cromosoma 20, nella banda q11.22, all'interno del segmento perso nella int del (20). Abbiamo dimostrato mediante FISH e array-comparative genomic hybridization (a-CGH) la perdita di EIF6 sia nei 14 pazienti della nostra serie con la larga delezione ricorrente, int del (20)(q11.21q13.32), ma anche in un paziente che presentava una delezione interstiziale differente, più piccola (q11.21-q11.23). Proponiamo che la prognosi favorevole dei pazienti con int del (20) sia dovuta ad effetto gene/dose per la proteina EIF6 nelle cellule del clone anomalo nel MO, con una sorta di meccanismo di salvataggio iniziato dalla perdita acquisita di materiale cromosomico.

Genetic Analysis of Malignant Migrating Partial Seizure in Infancy (MMPEI) Syndrome Etiology by Whole-Exome Sequencing

F. Rizzo¹, M.R. De Filippo², M. Ravo¹, G. Marchese¹, A. Weisz¹, G. Coppola³

¹*Laboratory of Molecular Medicine and Genomics and UOC Molecular Pathology and Medical Genomics, University of Salerno, Faculty of Medicine, Salerno, Italy*

²*Fondazione IRCCS SDN, Napoli, Italy*

³*Department of Medicine and Surgery, University of Salerno, Salerno, Italy*

Malignant migrating partial seizure in infancy (MMPEI) is a rare, severe early infantile-onset epileptic encephalopathy. The main clinical features are seizure onset in the first 6 months of life, with occurrence of almost continuous migrating polymorphous focal seizures, combined with multifocal ictal electroencephalography discharges and progressive deterioration of psychomotor development. Magnetic resonance imaging and standard neurometabolic evaluation of affected children do not reveal specific alteration, and the etiology of this severe disease still remains unknown. Seizure in MMPEI are refractory to conventional treatment with antiepileptic drugs, and overall developmental prognosis is poor, with the majority of affected patients dying before the second year of age. MMPEI is a genetically heterogeneous disorder with both deletions and point mutations of the voltage-gated sodium channel gene SCN1A, duplication of 16p11.2 and deletion of the PLCB1 gene found to be associated with the syndrome in sporadic cases.

Six probands with confirmed diagnosis of MMPEI were selected and their DNA subject to sequence capture-based enrichment and whole exome sequencing. Data were then analyzed by a stepwise filtering approach, to screen the identified variants in order to select those likely to be implicated in the disorder. The datasets were searched for genes displaying non synonymous variants, splice site mutations or coding Indels, and then compared to the dbSNP database and data from unaffected controls, available from public databases, to exclude common variants. Algorithms for variant effect prediction have been applied to exclude non noxious variants. In addition to qualitative analysis, which can detect point mutations and indels, data were also evaluated for quantitative sequence analysis, in order to assess the presence of copy number variations. Data analysis identified several unknown variants common to each of the six individuals, as well as variants present in a subgroup of proband genomes. This approach allowed the identification of potential new candidate genes involved in the development of this syndrome, that are now being further evaluated by combining different genetic and molecular approaches.

STUDIO DEL RUOLO DEI MICRORNA MIR-204/211 NELLA FUNZIONE OCULARE IN CONDIZIONI FISIOLOGICHE E PATOLOGICHE

I. Conte¹, S. Carrella¹, R. Avellino¹, S. Barbato¹, M. Karali¹, N. Meola¹, E. Marrocco¹, F.G. Salierno¹, M. Pizzo¹, Y. D'agostino¹, E. Surace¹, S. Banfi¹

¹*Istituto Telethon di Genetica e Medicina -TIGEM-, Napoli*

I microRNA (miRNA) sono RNA di piccole dimensioni (19-25 nucleotidi), che svolgono un ruolo importante nel controllo dell'espressione genica. Ci siamo proposti di chiarire il ruolo funzionale dei miRNA nel controllo dello sviluppo e della funzione dell'occhio nei vertebrati e di verificare un loro possibile ruolo nella patogenesi di malattie oculari ereditarie. Recentemente abbiamo stabilito la rilevanza specifica di un miRNA, miR-204, in molteplici aspetti dello sviluppo e funzione dell'occhio nei vertebrati. Utilizzando una varietà di approcci funzionali nel pesce Medaka (*Oryzias latipes*), abbiamo dimostrato in vivo che il miR-204 modula l'espressione del gene Meis2 e questo ha un impatto sullo sviluppo dell'occhio. La sua inattivazione infatti è in grado di determinare l'insorgenza di microftalmia e coloboma. Questo studio ha evidenziato che il miR-204 partecipa nello sviluppo del cristallino mediante il controllo del gene Ankrd13A che a sua volta regola il corretto movimento delle cellule nella formazione delle fibre primarie e secondarie della lente. Tramite analisi trascrittomiche ottenute mediante sequenziamento di nuova generazione, abbiamo verificato il suo impatto sulla corretta guida degli assoni retinici durante la formazione del nervo ottico. Infine, abbiamo determinato che l'assenza del miR-204 determina alterazioni a carico dei fotorecettori retinici. Per avere una visione completa nel ruolo del miR-204, abbiamo esteso questo studio anche ai mammiferi. Nel genoma di medaka, il miR-204 è presente in due copie identiche; nel genoma dei mammiferi, una delle due copie acquista differisce di una singola base rispetto al miR-204 e diventa miR-211. In accordo con i dati osservati nel medaka, l'analisi preliminare su topi knock-out per il miR-211 evidenzia una alterazione dello strato dei fotorecettori con una netta riduzione del numero di coni. Questo difetto morfologico è anche accompagnato da una riduzione della funzionalità della retina evidenziata dall'analisi effettuata mediante elettroretinogramma (ERG). Questi dati confermano che miR-204 e il suo paralogo miR-211 svolgono molteplici funzioni nella retina e rappresentano dei candidati per la patogenesi di malattie oculari ereditarie, sia anomalie di sviluppo che forme degenerative.

RIARRANGIAMENTI CRIPTICI DEL CROMOSOMA X IN PAZIENTI CON MENOPAUSA PRECOCE EVIDENZIATI DALL' ANALISI FRAXA

F. Forzano¹, D. Colia², V. Pisaturo², V. Uliana¹, M. Malacarne³, S. Cavani³, C. Viaggi³, M. Grasso³, M. Mucciolo⁴, L. Pucci⁵, M.A. Mencarelli⁶, M. Costa², A. Renieri⁶, F. Faravelli¹, F. Mari⁶

¹SSD Genetica Genetica Medica, E.O Galliera, Genova

²SSD Fisiopatologia preconcezionale e prenatale, E.O Galliera, Genova

³SC Laboratorio di Genetica, E.O Galliera, Genova

⁴Genetica Medica, Università di Siena, Siena

⁵Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena

⁶Genetica Medica, Università di Siena, Siena e Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena

La menopausa precoce (Premature Ovarian Failure, POF) è una condizione eterogenea che può essere causata da anomalie cromosomiche, in particolare a carico del cromosoma X, o da alterazioni monogeniche come la condizione di pre-mutazione del gene FMR1.

Descriviamo due pazienti valutate per ridotta funzionalità ovarica nelle quali l'esame cromosomico standard era risultato nella norma. In entrambe l'analisi molecolare del gene FMR1 aveva rilevato invece la presenza di una delezione comprendente il gene FMR1 e sequenze fiancheggianti. L'analisi array-CGH eseguita con piattaforma 8x60K (Agilent) ha consentito di definire in entrambe la presenza di un riarrangiamento complesso a carico del cromosoma X: la prima mostrava una duplicazione di circa 28M a carico del braccio corto (Xp22.33-Xp21.2) ed una delezione di circa 21 Mb a carico del braccio lungo (Xq27); la seconda presentava una duplicazione di circa 11,5 Mb a carico del braccio corto (Xp22.33-Xp22.2) e una delezione di circa 16 Mb a carico del braccio lungo (Xq27.1-Xq28).

Nella prima paziente, è stato evidenziato un riarrangiamento originatosi de novo, a carico del cromosoma paterno.

Nella seconda paziente il riarrangiamento è stato ereditato dalla madre, con menopausa all'età di 40 anni.

BIOBANCHE GENETICHE E MALATTIE RARE: UNA RISORSA PER I PAZIENTI, LE ASSOCIAZIONI E LA COMUNITÀ SCIENTIFICA

E. Picillo¹, A. Taglia¹, E. Viggiano¹, P. D'Ambrosio¹, L. Politano¹

¹*Cardiomiologia e Genetica Medica - Dip. di Medicina Sperimentale - Seconda Università di Napoli, Napoli*

Le malattie rare (MR) riguardano circa 40 milioni di individui negli Stati membri della Comunità Europea. Per la loro rarità e la conseguente mancanza di informazioni ad esse connesse, i pazienti affetti da MR non beneficiano delle stesse risorse mediche disponibili per gli altri pazienti. Le "biobanche genetiche" sono Unità di Servizio, senza scopo di lucro diretto, finalizzate alla raccolta e alla conservazione di materiale biologico umano utilizzato per diagnosi genetica, studi sulla biodiversità e ricerca. Esse sono un'importante fonte di risorse per diagnosi e ricerca, da quella di base alla sperimentazione di terapie geniche. Le biobanche genetiche, costituite per l'interesse di singoli gruppi, attirano l'attenzione del mondo scientifico essendo una risorsa preziosa in rapporto allo sviluppo delle conoscenze sul genoma umano.

Le finalità di una biobanca genetica sono:

- Favorire l'identificazione di mutazioni causa di malattie e la collezione di individui con caratteristiche genomiche utili a capire le basi genetiche di malattie complesse e la predisposizione all'insorgenza di patologie
- Mettere a disposizione della farmacogenetica campioni utili per studiare variazioni genomiche associate a differenti risposte ai farmaci
- Centralizzare la raccolta di campioni di specifiche patologie genetiche indispensabili per la sperimentazione in vitro di terapie innovative
- Offrire ai ricercatori un servizio per lo sviluppo dei loro studi e favorire la comunicazione e gli scambi tra i diversi gruppi di scienziati.

Come espressione di questa esigenza sono nati nel 2001 il Network Europeo di Biobanche Genetiche per le Malattie rare -EUROBIOBANK – e, nel 2007 il Telethon Network di Biobanche genetiche con 10 biobanche nazionali, compresa la Biobanca del Servizio di Cardiomiologia e Genetica Medica, per ottimizzare le collezioni di campioni esistenti e crearne di nuove, potenziare i Servizi di biobanche a beneficio dei progetti di ricerca sulle malattie rare, lavorare insieme - Associazioni di Famiglie e Pazienti, Medici e Ricercatori affinché le Biobanche possano diventare parte integrante di Strutture pubbliche, ospedaliere e/o universitarie, ed essere inserite stabilmente nel loro bilancio.

IMPATTO PSICOLOGICO DELLA DIAGNOSI DI UN'ANOMALIA CRIPTICA DEI CROMOSOMI: RISULTATI DI UNO STUDIO QUALITATIVO

F. Houdayer¹, M. Gargiulo², M. Frischmann³, M. Cordier¹, S. Dupuis-Girod¹, G. Lesca¹, M. Till¹, A. Labelme¹, D. Sanlaville¹, P. Ederly¹, M. Rossi¹

¹*Centre de Référence des Anomalies du Développement, Service de Génétique, CHU de Lyon, France.*

²*Institut de Myologie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, France*

³*Association Française contre les Myopathies, Evry, France*

L'attività di consulenza genetica del nostro Centro prevede la presenza sistematica di una psicologa. In questo contesto, abbiamo condotto uno studio sull'impatto psicologico nei genitori dei pazienti, dell'annuncio di un'anomalia cromosomica criptica (ACC) patogenica.

Abbiamo realizzato interviste semi-strutturate (metodo descrittivo qualitativo fondamentale), valutando due aspetti dell'ACC: l'ereditarietà e la presenza di un nome patronimico. 60 genitori (38 madri, 22 padri) hanno partecipato, insieme a 5 genetisti.

I 5 medici concordano sulla difficoltà dell'annuncio di diagnosi poste mediante arrayCGH. Le sindromi da microdelezione più note, spesso associate a nomi patronimici, sono in genere sospettate clinicamente e confermate mediante FISH. Le patologie diagnosticate tramite arrayCGH, spesso definite da formule citogenetiche, sono globalmente più rare e meno caratterizzate sul piano fenotipico e prognostico.

In presenza di un nome, 83% dei genitori è in grado di dare una definizione della malattia. L'annuncio di un'ACC definita da una formula citogenetica non sembra favorire nei genitori una rappresentazione mentale della patologia: la maggioranza ha grande difficoltà a definire e descrivere la malattia. Nel 13% dei casi, la diagnosi genetica non sembra avere "alcun significato", fino alla messa in discussione della significatività etiologica.

L'annuncio di un'ACC trasmessa può amplificare un sentimento di colpa. L'annuncio di un'ACC de novo può introdurre una rottura nel sentimento di trasmissione verticale genitore-figlio. Inoltre, la somiglianza sindromica può essere vissuta in maniera dolorosa, come prevalente sulla somiglianza familiare.

In conclusione, questo studio mostra che l'annuncio di ACC causa un impatto psicologico molto significativo nei genitori, la cui appropriazione della diagnosi sembra essere particolarmente difficile per le ACC rare diagnosticate tramite arrayCGH. Tali problematiche rischiano di essere esacerbate dalla diffusione di altre tecniche diagnostiche ad alta risoluzione (exome sequencing). Un approccio multidisciplinare all'annuncio diagnostico, come la consulenza in binomio genetista/psicologo, garantisce una presa in carico globale del paziente e della famiglia.

INVESTIGATING THE GENETIC BASIS OF POLAND SYNDROME BY EXOME SEQUENCING

M.A. Mencarelli¹, V. Bizzarri¹, S. Amabile¹, S. Amitrano¹, E. Pasquetti¹, D. Alocci², G. Barlacchi², M. Bruttini¹, D. Lazzeri³, L. Bianciardi¹, C. Lo Rizzo¹, C. Di Marco¹, I. Giani⁴, M. Bianchini², F. Scarselli², F. Ariani¹, F. Mari¹, A. Renieri¹

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

²*Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione, University of Siena, Siena, Italy*

³*Plastic and Reconstructive Surgery Unit, Hospital of Pisa, Pisa, Italy*

⁴*Pediatria, Ospedali Riuniti Valdichiana Senese, Montepulciano, Siena, Italy*

Poland syndrome has been described as unilateral absence or hypoplasia of the pectoralis muscle, most frequently involving the sternocostal portion of the pectoralis major muscle and a variable degree of ipsilateral hand and digit anomalies. Incidence was reported to be 1/30000-32000 births with an higher prevalence in males and a male to female ratio estimated between 2:1 and 3:1. Although most cases of PS are sporadic, familial recurrence has been observed. Familial cases include vertical transmission from parent to offspring, affected siblings from unaffected parents and affected cousins from healthy parents. The etiology is currently unknown. Different pathogenetic mechanism have been hypothesized including vascular defect due to an insult during early embryologic stages, dominant inheritance with incomplete penetrance and autosomal lethal gene surviving by mosaicism. During genetic counseling, we recently evaluated a family with 3 affected members in three generations: a 7 months old boy with hypoplastic pectoralis muscles on the left side, his mother with a pectoral muscle defect and the maternal grandmother with moderate breast asymmetry. Other 7 sporadic cases with different involvement ranging from isolated unilateral muscle hypoplasia to chest wall deformities and hand defects, were previously evaluated and DNA samples collected. Whole exome sequencing in 4 patients was performed using the Illumina platform. Data were filtered against dbSNP132 and control populations (1000 Genomes Project Consortium; <http://www.1000genomes.org/data>). In-house software was developed to analyze the exome sequencing data. The program allows filtering for mutation type and allows a comparison of whole exome sequencing data among patients and controls. Five genes, affected by distinct variants, resulted shared by 4 affected individuals. Three of these genes have an interesting function resulting good candidates for the disease. The first one regulates endothelial cell signaling and vascular function; the second one has a pivotal role in organ size control and the last controls smooth muscle cells proliferation. Segregation analysis is now ongoing in order to identify the causative gene(s) of this rare condition whose molecular basis has been elusive until now.

MONITORAGGIO CITOGENETICO NELLA SINDROME DI SHWACHMAN-DIAMOND: VALORE PROGNOSTICO DELLE ANOMALIE CLONALI MIDOLLARI

B. Pressato¹, R. Valli¹, C. Marletta¹, L. Mare¹, G. Montalbano¹, L. Marengli¹, F. Lo Curto¹, F. Pasquali¹, E. Maserati¹

¹*Genetica Umana e Medica, Dip. Medicina Clinica e Sperimentale, Università dell'Insubria, Varese*

La sindrome di Shwachman-Diamond (SDS) è una "inherited bone marrow failure syndrome" (IBMFS), autosomica recessiva (OMIM #260400), causata da mutazioni del gene SBDS nel 90% dei casi, che comporta un rischio di evoluzione in sindrome mielodisplastica (SMD) e leucemia mieloide acuta (LMA) attorno al 30%. Nel midollo osseo (MO) sono spesso presenti anomalie cromosomiche clonali, soprattutto dei cromosomi 7 e 20: più frequenti un isocromosoma per le braccia lunghe del cromosoma 7, i(7)(q10), e una delezione delle braccia lunghe del cromosoma 20, che si è dimostrata interstiziale, int del(20)(q11.21q13.32). Il significato della presenza di tali anomalie in relazione al rischio di SMD/LMA è discusso: sia i(7)(q10) che int del(20) sono stati associati a rischio scarso e prognosi favorevole. Va sottolineato che gli effetti delle anomalie clonali sono ovviamente confinati alle cellule del clone anomalo nel MO: sarebbe perciò azzardato considerare i(7)(q10) e int del(20) segni prognostici positivi in assoluto. Inoltre il quadro citogenetico midollare varia nel decorso della malattia.

I dati di 22 casi con un'evoluzione nel tempo dei cloni con anomalie cromosomiche porta alle seguenti conclusioni:

- In nessun caso ha avuto luogo un'evoluzione clonale: anomalie aggiuntive a i(7)(q10) o a int del(20) non sono state mai osservate.
- I cambiamenti del quadro citogenetico durante il follow-up sono avvenuti in tutti i casi con l'acquisizione di anomalie in cloni indipendenti:
 - 8 pazienti con i(7)(q10) e 4 con int del(20) hanno acquisito altri cloni anomali: 3 rimanevano in condizioni stabili e non gravi, 3 sviluppavano aplasia midollare, 6 evolvevano in SMD e LMA.
 - la presenza di i(7)(q10) e di int del(20) sembra essere mutuamente esclusiva: in 6 pazienti il cambiamento comportava la presenza delle due anomalie in cloni indipendenti; 4 pazienti rimanevano in condizioni stabili e non gravi, 2 sviluppavano una SMD.
 - 2 pazienti con delezione o traslocazione del cromosoma 7 hanno acquisito una trisomia 21, in cloni indipendenti, e sono evoluti in SMD/LMA.

Si conferma l'instabilità del cariotipo nella SDS, che coinvolge in modo preferenziale i cromosomi 7 e 20, dovuta ad un effetto mutatore delle mutazioni causali, e associata al rischio di SMD/LMA.

STUDIO DI DUE CASI CON DUPLICAZIONE Xq: FENOTIPO CLINICO E RUOLO DELLA INATTIVAZIONE DEL CROMOSOMA X

S. Bigoni¹, S. Brioschi¹, B. Buldrini¹, A. Bonfatti¹, V. Aiello¹, R. Gruppioni¹, L. Rocchetti³, A. Marsciani², A. Armaroli¹, S. Fini¹, F. Gualandi¹, A. Ferlini¹

¹*U.O. Genetica Medica, Az. Ospedaliera Universitaria-Ferrara*

²*U.O. Pediatria, Dip. Mat. Infantile, AUSL-Rimini*

³*U.O. Genetica Medica A.V. Romagna*

La espressione delle manifestazioni cliniche nelle femmine con duplicazione Xq varia notevolmente in relazione alla dimensione del segmento coinvolto ed ai processi di inattivazione del cromosoma duplicato. Le grosse duplicazioni intracromosomiche del cromosoma X osservate con metodiche di citogenetica classica sono rare anche se la prevalenza non è nota in considerazione della possibilità di quadri asintomatici.

Il processo di inattivazione del cromosoma X (XCI) costituisce un fondamentale elemento nella modulazione del fenotipo, grossi riarrangiamenti strutturali come delezioni o duplicazioni sono generalmente associate ad un modello di inattivazione preferenziale (skewing) del cromosoma X riarrangiato che determina un fenotipo normale. In rari casi la mancanza di inattivazione preferenziale

o la incompletezza del processo di inattivazione a livello del segmento duplicato determina un fenotipo patologico.

Riportiamo due casi sintomatici con duplicazione Xq giunti alla nostra osservazione e caratterizzati a livello molecolare con aCGH.

Il primo caso (38 aa), con duplicazione di 44 Mb "de novo" che comprende il segmento Xq22-q27, presenta un fenotipo caratterizzato da bassa statura proporzionata, lievi dimorfismi con macrocefalia, obesità ed irregolarità mestruali.

Il secondo caso, una bambina di 7 aa, con duplicazione di 24 Mb che comprende il segmento Xq25-28, presenta ritardo psicomotorio prevalentemente cognitivo e bassa statura con scarsa risposta al GH.

Studi di inattivazione del cromosoma X mediante analisi di metilazione del gene AR (Xq13) e di inattivazione segmentaria mediante incorporazione di BrdU sono attualmente in corso al fine di verificare la presenza di disomie funzionali alla base del quadro clinico.

MICRODELEZIONE DEL CLUSTER GENICO HOXA IN UNA PAZIENTE CON ASSOCIAZIONE MURCS

M.G. Giuffrida¹, L. Bernardini¹, D. Pompili¹, P. Castelluccio², S. Loddo¹, M.L. Cavaliere², A. Novelli¹

¹*Istituto Mendel; Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza", IRCCS, Roma, Italia*

²*Genetica Medica; Azienda Ospedaliera di Rilievo Nazionale "A. Cardarelli", Napoli, Italia*

La sindrome di Mayer-Rokitanski-Küster-Hauser (MRKH) presente in 1/4500 femmine nate vive, rappresenta la più grave forma di aplasia dell'utero, della cervice e della parte superiore della vagina, con caratteri sessuali secondari normali. Può presentarsi isolata o associata ad anomalie renali, scheletriche e uditive e, più raramente, a difetti cardiaci e digitali. In questo caso si parla di associazione MURCS (Müllerian duct aplasia, Renal Dysplasia and Cervical Somite anomalies) o sindrome di MRKH di tipo II (OMIM 601076). Ad oggi la patogenesi è poco nota.

Nell'associazione MURCS la presenza di altre malformazioni suggerisce il coinvolgimento di geni implicati nello sviluppo, come quelli della famiglia HOX e WNT. Mutazioni di WNT4 sono state correlate ad una forma di aplasia mulleriana associata a virilizzazione. Analisi mutazionali dei geni HOX sono invece risultate negative.

È giunta alla nostra attenzione una donna con associazione MURCS, ritardo psicomotorio ed epilessia. Nata da genitori non consanguinei alla 36^a settimana di gestazione, da parto indotto farmacologicamente e con parametri auxologici normali, presentava assenza del meato uretrale esterno con seno uro-genitale comune e ipoplasia renale monolaterale con reflusso vescico-ureterale bilaterale. All'esame obiettivo, all'età di 36 anni, mostrava: dismorfismi facciali, bassa statura, scoliosi, brachidattilia di mani e piedi. Amenorrea primaria normogonadotropica con reperto ecografico di utero ipoplasico bicorne, otosclerosi corretta con timpanoplastica a destra, ipoacusia neurosensoriale a sinistra ed ipoacusia di tipo misto a destra, deficit cognitivo-prestazionale, epilessia parziale con secondaria generalizzazione. Parziale incontinenza urinaria.

L'analisi di array-CGH ha evidenziato una microdelezione di 98 kb in 7p15.2 che include i 10 membri della famiglia dei geni HOXA e suggerisce che questo sia il primo caso di MURCS causato dall'aploinsufficienza dell'intero cluster di tali geni.

Il ritardo mentale e l'epilessia non rientrano nel quadro clinico della MURCS. È possibile ipotizzare che queste due caratteristiche siano da attribuire alla presenza di ulteriori tre microdelezioni. In particolare una microdelezione in 19p13.2, di circa 410 kb che include 19 geni.

DETECTION OF ALLELE-SPECIFIC GENE EXPRESSION BY NEXT GENERATION SEQUENCING

V. Mijatovic¹, L. Xumerle¹, P. Prandini¹, A. Mori¹, C. Zusi¹, R. Galavotti¹, R. Ciccone², O. Zuffardi², E. Trabetti¹, P.F. Pignatti¹, G. Malerba¹

¹*Dep. of Life and Reproductions Sciences, Sec. of Biology and Genetics - University of Verona, Verona, Italy*

²*Dep. of Molecular Medicine, Medical Genetics - University of Pavia, Pavia, Italy*

Next-generation sequencing (NGS) provides robust, comparable and highly informative expression profiling data. Some studies observed that variation of gene expression between alleles is common, and this variation may contribute to human variability. The goal of the present study was to investigate whether NGS can be used to detect differential allele expression. Currently we analyzed a total of 34 samples of lymphoblastoid cell libraries prepared within the frame of an ongoing project searching for genetic factors associated with Autism in our laboratories. Seventy-five (75) base-pair (bp) sequence paired-end reads were generated for each sample. Only deeply covered single nucleotide polymorphisms (dcSNPs) were examined, (i.e. 100 or more reads). Afterwards, only heterozygous dcSNPs (het-dcSNPs), defined as dcSNPs with a coverage of at least 10 reads for each allele were selected. Finally, allele-specific expression variation (ASEV) loci were defined as het-dcSNPs with allele coverage ratio of 1:3 or higher between the 2 alleles. Then we selected markers that appeared to be ASEV loci shared (i.e. more than ~75% of the examined individuals) through the examined subjects.

Preliminary results suggest 11619 ASEV SNPs. When stratifying the subjects by affection status, and applying a more restrictive SNP selection criteria, we observed that 3 loci (CCT6P2, PSMA2P3 and GSPT2 gene regions) showed to be ASEV in both groups. We plan to extend the analysis to other samples including leukemia, heart and skeletal muscle cells and to profile ASEV loci for cases and controls. We also aim to investigate how mapping programs affect SNPs and ASEV loci detection. Moreover multiple heterozygous genotypes of the same gene will be studied together to confirm the differences in allele expression and detect the phase of alleles. The method can be improved searching for the smaller differences of gene expression introducing a more sophisticated statistics based on read-counts and considering the quality value of the nucleotide call.

In conclusion we are developing a reliable tool to integrate information from polymorphic loci with gene expression. This could increase our knowledge of hereditary factors involved in regulatory systems of gene expression.

INTERSTITIAL 22q13 DELETIONS NOT INVOLVING SHANK3 GENE: A NEW GENE CONTIGUOUS SYNDROME?

V. Disciglio¹, M.A. Mencarelli¹, M. Mucciolo¹, E. Ndoni¹, E. Frullanti¹, A. Marozza¹, C. Di Marco¹, C. Lo Rizzo¹, M. Baldassari¹, A. Massarelli², V. Canocchi², B.M. Anderlid³, K. Metcalfe⁴, C. Le Caignec⁵, A. David⁵, A. Fryer⁶, O. Boute⁷, V. Pecile⁸, R. Battini⁹, A. Novelli¹⁰, M. Fichera¹¹, C. Romano¹², F. Mari¹, A. Renieri¹

¹*Medical Genetics Unit, Biotechnology Department, University of Siena, Italy*

²*Dip. di Pediatria, Osp. Valdichiana, Montepulciano, Italy*

³*Department of Clinical Genetics, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden*

⁴*Manchester Academic Health Sciences Centre, Manchester Biomedical Research Centre, St Mary's Hospital, Manchester, UK*

⁵*Service de génétique médicale, Institut de biologie, Nantes, France*

⁶*Department of Clinical Genetics, Alder Hey Children's Hospital, Liverpool, and Liverpool Women's Hospital, Liverpool, UK*

⁷*Institut de Génétique Médicale, Hopital Jeanne de Flandre, Lille, France*

⁸*S.C. Medical Genetics, Institute for Maternal and Child Health IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste, Italy*

⁹*Department of Developmental Neuroscience, IRCCS Stella Maris, Calambrone Pisa, Italy*

¹⁰*IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, Mendel Institute, Rome, Italy*

¹¹*Laboratory of Genetics Diagnosis, IRCCS Oasi M. SS., Troina, Italy*

¹²*Unit of Pediatrics and Medical Genetics, IRCCS Associazione Oasi M. SS., Troina, Italy*

Phelan-McDermid Syndrome (22q13.3 deletion syndrome) is a contiguous gene disorder resulting from deletion of the distal long arm of chromosome 22. This syndrome is characterized by developmental delay, hypotonia, delayed or absent speech, autistic-like behaviour, normal to accelerated growth and peculiar facial features. SHANK3, a gene included within the minimal critical region, is thought to be a candidate gene for the major neurological features of this syndrome. Here we report the clinical and molecular data of nine patients with overlapping interstitial deletion in 22q13 not involving SHANK3. After identification of the 22q13 deletion in Patient 1, a search for further patients revealed eight individuals with overlapping deletions using the DECIPHER database (<http://decipher.sanger.ac.uk>) and the Database of Human CNVs (<http://gvarianti.homelinux.net/gvarianti/index.php>). All these interstitial deletions overlap with the largest terminal deletions, but not with the smallest terminal deletions. The deletion sizes and breakpoints varied considerable between the different patients, with the largest deletion spanning 6,9Mb and the smallest deletion spanning 2,7Mb. Eight out of nine patients have a de novo deletion and in the other one patient the origin of deletion is unknown. In one case, in addition to the copy number loss on 22q13.2q13.33, a copy number gain on 22q13.1 (820Kb) and a ring chromosome 19 were identified. The clinical features of our patients are similar to the terminal 22q13.3 deletion syndrome including developmental delay (9/9 or 100%), speech delay (8/9 or 89%), hypotonia (7/9 or 78%), feeding problems (6/9 or 67%). Moreover almost of all patients presents mild facial features, while three patients show autism (33%). This study suggests that there are additional haploinsufficient genes in the 22q13 region that contribute to cognitive and speech development and are involved in the phenotype of the at least the larger 22q13 deletions. Moreover, since the deletions in our patients do not involve SHANK3 gene, we speculate the possibility of the existence of a new gene contiguous syndrome proximal to smallest terminal deletions, in the 22q13 region. The molecular data and the clinical phenotype of these patients will be discussed.

DELEZIONE RECESSIVA DI GENI CONTIGUI NEL CROMOSOMA 16 (16p13.3) CAUSA OSTEOPETROSI AUTOSOMICA RECESSIVA IN UN PAZIENTE GIORDANO

E. Maserati¹, A. Pangrazio², A. Frattini³, R. Valli¹, L. Susani², A. Villa², P. Vezzoni², W. Al-Herz⁴, C. Sobacchi²

¹*Genetica Umana e Medica, Dip. Medicina Clinica e Sperimentale, Università dell'Insubria, Varese, Italia*

²*CNR-IRGB Milan Unit, Milano, Istituto Clinico Humanitas IRCCS, Rozzano, Italia*

³*CNR-IRGB Milan Unit, Milano, Genetica Umana e Medica, Dip. Medicina Clinica e Sperimentale, Università dell'Insubria, Varese, Italia*

⁴*Pediatric Dept, Faculty of Medicine, Kuwait University, Kuwait City, Allergy and Clinical Immunology Unit, Pediatric Dept, Al-Sabah Hospital, Kuwait City, Kuwait*

L'osteopetrosi autosomica recessiva (ARO) è una malattia genetica eterogenea causata da un ridotto riassorbimento osseo ad opera degli osteoclasti. Mutazioni nel gene che codifica per un canale del cloro (CICN7) sono responsabili non solo di una sostanziale porzione di pazienti affetti da ARO, ma anche di forme di osteopetrosi caratterizzate da differenti modalità di trasmissione ereditaria e severità.

La mancanza di una chiara correlazione genotipo/fenotipo comporta un'estrema difficoltà nel fornire una corretta consulenza genetica per i portatori di osteopetrosi CICN7-dipendente.

Riportiamo la caratterizzazione della prima delezione interstiziale in stato di omozigosi nel cromosoma 16p13.3, identificato mediante array Comparative Genomic Hybridization (a-CGH) in un paziente di origini giordane affetto da ARO.

Nonostante la delezione coinvolgesse altri geni oltre al gene CICN7, il probando mostrava il classico fenotipo osteopetrotico, anche se la morte prematura del probando stesso non ha permesso più precise indagini cliniche.

L'identificazione di questa nuova delezione genomica che comprende la quasi totalità del gene CICN7 è di rilevanza clinica, specialmente nel campo della diagnosi prenatale e suggerisce la possibilità che questo tipo di mutazioni (estese delezioni genomiche) possano essere state sottostimate fino ad ora.

Questi dati sottolineano, inoltre, la necessità di approcci alternativi nell'analisi genetica anche degli altri geni che causano osteopetrosi.

DUE NUOVE CASI DI SINDROME DA MICRODELEZIONE 17q21.31

S. Cavani¹, G. Cavarretta², M. Piccione³, M. Gentile⁴, C. Viaggi¹, A. Pansini⁴, V. Consiglio⁵, G. Corsello²

¹Lab. di Genetica, E.O. Ospedali Galliera, Genova

²Dip. Materno Infantile, Università degli Studi, Palermo

³Centro Riferimento Reg. per le Malattie Genetiche, A.O. Osp. Riuniti Villa Sofia-Cervello- Università degli Studi, Palermo

⁴U.O.C. Lab. Genetica Medica, Dip. Materno Infantile- ASL, Bari

⁵Centro Riferimento Reg. per le Malattie Genetiche, A.O. Osp. Riuniti Villa Sofia-Cervello, Palermo

La monosomia 17q21.31, inclusa tra le nuove sindromi da microdelezione/microduplicazione recentemente descritte, è caratterizzata da ritardo dello sviluppo, ipotonia nell'infanzia, comportamento amichevole/amabile e dimorfismi facciali, sebbene il fenotipo facciale evolva con l'età. La delezione ha la stessa frequenza nei maschi e nelle femmine.

La presenza di LCRs a livello della regione 17q21.31 suggerisce che alla base della microdelezione ci sia un meccanismo di ricombinazione omologa non allelica.

Il tratto comunemente deletato ha un'ampiezza di dimensioni comprese tra 500-650 kb ed include almeno sei geni: C17orf69, CRHR1, IMP5, MAPT, STH E KIAA1267. Inoltre, la delezione interessa un'inversione polimorfica di 900 kb.

In questo lavoro descriviamo due pazienti, rispettivamente un maschio di 4 anni ed una femmina di 15 mesi, in cui, mediante analisi di array-CGH, è stata riscontrata una microdelezione 17q21.31.

Lo studio dei genitori è attualmente in corso.

Nel primo paziente, l'esame obiettivo evidenzia, alla nascita: radice del naso schiacciata, ipertelorismo, bocca ampia, orecchie piccole a basso impianto, criptorchidismo bilaterale, ipotonia muscolare generalizzata, agenesia parziale del corpo calloso, idronefrosi bilaterale. All'età di 4 anni sono presenti: filtro nasale largo e spesso, ponte nasale prominente, punta del naso arrotondata, labbro superiore sottile, clinodattilia del V dito di mani e piedi, otoemissioni acustiche assenti bilateralmente, grave compromissione neuromotoria.

Nel secondo caso, la paziente presenta: fronte alta, occipite prominente, rime palpebrali antidown, epicanto, ipertelorismo, micrognatia, padiglioni auricolari a basso impianto ruotati posteriormente, ritardo dello sviluppo.

In entrambi i casi il riarrangiamento interessa il tratto comunemente deletato nella sindrome da microdelezione 17q21.31.

I nostri dati confermano che la sindrome da microdelezione 17q21.31 si associa ad un fenotipo clinicamente riconoscibile che include ritardo dello sviluppo e dimorfismi facciali.

DESCRIZIONE DI UNA CASISTICA DI PAZIENTI CON SINDROME CHARGE: CRITERI CLINICI SUGGERITIVI PER UN COINVOLGIMENTO DI CHD7

G. Cappuccio¹, A. Casertano¹, A. Rossi¹, G. Minopoli¹, R. Taurisano¹, P. Boemio¹, A. Maffè², S. Ungari², G. Andria¹, D. Melis¹

¹*Dipartimento di Pediatria A.O.U. Federico II di Napoli*

²*Unità di Genetica e Biologia Molecolare, Ospedale Santa Croce e Carle, Cuneo*

INTRODUZIONE: La sindrome di CHARGE (S.CHARGE), si caratterizza per l'associazione non casuale di specifiche caratteristiche fenotipiche. La diagnosi è clinica, e si pone in caso di soddisfacimento di 4 criteri maggiori (coloboma, anomalie delle ossa temporali, malformazioni cardiache, atresia delle coane, ritardo di crescita, ipoplasia dei genitali) o 3 maggiori e 3 minori (anosmia, labiopalatoschisi, fistola tracheoesofagea, paralisi nervi cranici, scoliosi) secondo Blake, oppure tutti i maggiori (coloboma, atresia coane, anomalie auricolari) o 2 maggiori e 2 minori (disfunzioni romboencefaliche, disfunzioni ipotalamico-ipofisarie, anomalie mediastiniche, ritardo mentale) secondo Verloes. Il gene CHD7 è mutato nel 33-100% dei pazienti a seconda dei criteri di selezione utilizzati.

PAZIENTI: 10 pazienti con sospetta S.CHARGE sono stati sottoposti a sequenziamento del gene CHD7 e in casi selezionati a ricerca di delezioni con MLPA.

RISULTATI: L'analisi molecolare era positiva in 5 pazienti di cui 3 soddisfacevano i criteri clinici e in 2 il sospetto clinico, seppur non comprovato dai criteri suddetti, veniva confermato dall'analisi molecolare che ha mostrato in un caso una mutazione esonica, nell'altro una variante intronica patologica. Nei restanti l'analisi molecolare è risultata negativa. Le seguenti caratteristiche sono più frequenti nei pazienti con analisi molecolare positiva: anomalie cardiache (80% vs 60%), deficit dei nervi cranici (100% vs 60%) e fistole tracheoesofagee (40% vs 0%), mentre nei pazienti negativi sono risultate più frequenti anomalie endocrinologiche (60% vs 40%) schisi orofacciali (80% vs 20%), atresia delle coane (60% vs 0%), anomalie auricolari (80% vs 60%).

CONCLUSIONI: L'analisi molecolare ha confermato la diagnosi clinica nel 50% dei pazienti rivelandosi particolarmente utile in quelli con fenotipo più lieve. La presenza di anomalie cardiache, deficit dei nervi cranici e fistole tracheoesofagee indirizzerebbe in prima battuta verso l'analisi molecolare di CHD7. Viceversa il riscontro di schisi orofacciali, atresia delle coane, anomalie auricolari e anomalie endocrinologiche suggerirebbe di iniziare l'approfondimento diagnostico con indagini di più ampio spettro, considerando un possibile ruolo patogenetico di altri loci.

MUTAZIONI DI CDKN1C IN PAZIENTI CON SINDROME DI BECKWITH-WIEDEMANN E IN PAZIENTI CON SEVERO IUGR

L. Calzari¹, S. Russo¹, A. Mussa², M.T. Divizia³, M.A. Police⁸, S. Di Candia⁵, A.C. Borrelli⁹, L. Memo⁶, A. De Crescenzo⁷, C. Izzi⁴, G.B. Ferrero², A. Riccio⁷, L. Larizza¹

¹Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Auxologico Italiano, MI

²Dipartimento di Pediatria, Endocrinologia Pediatrica, Università di Torino, TO

³Laboratorio di Genetica Molecolare, Istituto Neurologico Gaslini, GE

⁴Il Divisione di Nefrologia, Spedali Civili, Brescia

⁵Dipartimento di Pediatria, Ospedale San Raffaele, MI

⁶Unità di Patologia Pediatrica e Neonatale, Ospedale San Martino, Belluno

⁷Dipartimento di Scienze Ambientali, Università Federico II, Napoli

⁸Laboratorio di Genetica Medica, Osp Moscati, Avellino

⁹Dipartimento di Pediatria, Università Federico II, Napoli

Il gene CDKN1C (cyclin dependent kinase inhibitor 1) localizzato in 11p15.5 all'interno di un cluster di geni sottoposti ad imprinting, codifica per una proteina che funziona come potente inibitore di molti complessi chinasi (Cdk) che agiscono nella fase G1 del ciclo cellulare regolando negativamente la progressione alla fase S. Il gene ha un'espressione monoallica materna, controllata dal trascritto non coding KCNQ1OT1, che costituisce uno dei 2 centri dell'imprinting (IC2) della regione 11p15.5. La proteina è costituita da 3 domini funzionali CDK binding domain all'estremità NH2, PAPA domain e PCNA domain all'estremità COOH. Difetti epigenetici e genetici che disregolano l'imprinting in tale regione e mutazioni del gene CDKN1C sono alla base della sindrome di Beckwith-Wiedemann caratterizzata da iperaccrescimento e maggiore rischio di tumori pediatrici.

Riportiamo uno studio molecolare e clinico di 10 famiglie BWS con mutazioni nel gene CDKN1C, identificate in una coorte selezionata di pazienti negativi alle alterazioni genetiche ed epigenetiche note. Lesioni di CDKN1C giustificano una minoranza di pazienti BWS probabilmente sottostimata. Rilevante come 8/9 casi (in un paziente non è stato possibile studiare i genitori) rivelino trasmissione materna focalizzando l'importanza dell'estensione della consulenza genetica ai familiari e del test di sequenziamento in diagnosi prenatale. Si riportano tre casi diagnosticati in corso di gravidanza (3/17) e l'occorrenza di fenotipi incompleti in presenza di mutazione. In 2 ampie famiglie è evidente elevata espressività clinica. In 5/10 probandi (50%) le mutazioni descritte non sono presenti in letteratura, ma una di queste ricorre in due probandi non relati anche per area geografica.

Mutazioni missenso nel terzo dominio dello stesso gene sono state associate alla sindrome IMAGE caratterizzata da elevato ritardo di crescita, ipoplasia surrenalica congenita e anomalie genitali. Mutazioni di differente tipo anche nello stesso dominio hanno effetti differenziali sulla progressione nel ciclo cellulare e sui processi dello sviluppo generando sindromi opposte. E' in corso lo studio di una selezionata coorte di 25 pazienti con severo ritardo di crescita intrauterino, per valutarne l'eventuale occorrenza.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF TWO NOVEL LARGE DELETIONS IN THE F11 GENE RESPONSIBLE FOR FXI DEFICIENCY

V. Rimoldi¹, G. Soldà¹, F. Peyvandi², R. Asselta¹, S. Duga¹

¹*Dip di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milano*

²*U.O.S. Dipartimentale per la Diagnosi e la Terapia delle Coagulopatie, A. Bianchi Bonomi Hemophilia and Thrombosis Center, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Università degli Studi di Milano and Luigi Villa Foundation, Milan, Italy*

Hereditary coagulation factor XI (FXI) deficiency (MIM*264900) is an autosomal bleeding disorder characterized by reduced levels of FXI in plasma. Although FXI deficiency is classified among rare coagulation diseases (prevalence 1:10⁶), it is one of the most common inherited disorders among Ashkenazi Jews. Spontaneous bleeding is rare, even in patients with severe deficiency (FXI activity in plasma less than 15 IU/dL), and usually occurs only after trauma or surgery.

The genetic basis of FXI deficiency is represented by mutations (including missense, nonsense, splicing, and indels) spread throughout all the 15 exons of the FXI gene (F11). To date, more than 190 mutations affecting FXI production, dimerization, secretion, and function have been identified; nevertheless, large gene rearrangements have been so far reported only in five patients.

In this work, we investigated two families with hereditary FXI deficiency: one with severe phenotype and the other with mild disease. In the first family we identified an 8.5-Kb deletion involving exons 11 to 15 (in the homozygous state) whose precise breakpoints were characterized by long PCR assays. Sequencing of the breakpoints revealed a complex rearrangement (deletion-inversion-deletion), probably mediated by the presence of Alu Jo- and Alu Sg- repeats.

In the second family, of Italian origin, no mutations were found after sequencing of the whole F11 coding region plus splice junctions. The observed extended region of homozygosity suggested the presence of a heterozygous deletion covering the whole gene, which was confirmed by semi-quantitative real-time PCR. To define the extent of the deletion, a series of real-time PCR assays (at various distances from both ends of the gene) were used. The obtained results indicated that the deletion breakpoints must lie somewhere between approximately 35-40 Kb downstream and between 3.5-7.5 Kb upstream of F11, the nearest gene at the 5' end (KLKB1) being present on both chromosomes.

In conclusion, we here describe two F11 large deletions leading to FXI deficiency. Detailed knowledge on these mutations, which could hinder the molecular diagnosis when in the heterozygous state, is particularly helpful for genes not routinely screened for large deletions.

Genetic screening of 24 Italian FV-deficient patients: molecular characterization of novel identified mutations in the F5 gene

E.M. Paraboschi¹, C. Dall'Osso¹, I. Guella¹, F. Peyvandi², S. Duga¹, R. Asselta¹

¹*Dip. di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milano*

²*U.O.S. Dipartimentale per la Diagnosi e la Terapia delle Coagulopatie, A. Bianchi Bonomi Hemophilia and Thrombosis Center, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Università degli Studi di Milano and Luigi Villa Foundation, Milan, Italy*

Factor V (FV) deficiency is a rare autosomal recessive disorder characterized by low levels of functional and immunoreactive FV in plasma, associated with bleeding symptoms varying from mild to severe. To date, more than 100 mutations have been described along the gene encoding for FV (F5) but only a few have been functionally characterized.

In this work, we have investigated the molecular basis of FV deficiency in 24 Italian unrelated patients, 9 of whom affected by a severe form of the disease. Sequencing of the F5 gene disclosed 22 mutations, at the homozygous or heterozygous state, leading to FV deficiency. Ten mutations (3 nonsense, 1 splicing, 5 missense, and 1 frameshift) were hitherto unknown. Additionally, 5 individuals were carrier of the HR2 haplotype, a F5 allele defined by a group of more than 10 linked genetic polymorphisms, responsible for a mild form of FV deficiency.

Whilst the identified nonsense and frameshift mutations (W1797X, S1849X, L1908X, V381QfsX1) introduce premature stop codons, thus likely resulting in unstable transcripts and eventually in low protein synthesis, the pathogenic role of missense and splicing mutations was experimentally verified. Missense mutations (N409D, D1669G, G1867R, C2033Y, C2038Y) were investigated by in-vitro expression of mutant FVs in COS-1 cells, followed by SDS-PAGE of immunoprecipitated proteins, as well as by enzyme immuno assays on cell lysates and conditioned media. Our results showed that all mutations impair FV secretion, leading to a quantitative defect (i.e. a concomitant reduction of functional and immunologic FV levels). The role of the splicing mutation (c.5879-11C>A/c.5879-12C>A) on F5 pre-mRNA splicing is currently being investigated by producing the mutant transcript in HeLa cells. Bioinformatics analyses suggest that the mutation, localized in the polypyrimidine tract, might cause exon 20 skipping.

Very interestingly, 4 mutations (R1133X, Y1702C, c.248+1G>A, and G1902D), already described in the literature, were each identified in two unrelated patients of our cohort, suggesting that these variants may be recurrent in the Italian population.

In conclusion, this work reports the identification and the functional consequences of 10 novel genetic defects responsible for FV deficiency.

DETECTION OF ALLELE-SPECIFIC GENE EXPRESSION BY NEXT GENERATION SEQUENCING

V. Mijatovic¹, L. Xumerle¹, P. Prandini¹, A. Mori¹, C. Zusi¹, R. Galavotti¹, R. Ciccone², O. Zuffardi², E. Trabetti¹, P.F. Pignatti¹, G. Malerba¹

¹*Dep. of Life and Reproductions Sciences, Sec. of Biology and Genetics, University of Verona, Verona, Italy*

²*Dep. of Molecular Medicine, Medical Genetics, University of Pavia, Pavia, Italy*

Next-generation sequencing (NGS) provides robust, comparable and highly informative expression profiling data. Some studies observed that variation of gene expression between alleles is common, and this variation may contribute to human variability. The goal of the present study was to investigate whether NGS can be used to detect differential allele expression. Currently we analyzed a total of 34 samples of lymphoblastoid cell libraries prepared within the frame of an ongoing project searching for genetic factors associated with Autism in our laboratories. Seventy-five (75) base-pair (bp) sequence paired-end reads were generated for each sample. Only deeply covered single nucleotide polymorphisms (dcSNPs) were examined, (i.e. 100 or more reads). Afterwards, only heterozygous dcSNPs (het-dcSNPs), defined as dcSNPs with a coverage of at least 10 reads for each allele were selected. Finally, allele-specific expression variation (ASEV) loci were defined as het-dcSNPs with allele coverage ratio of 1:3 or higher between the 2 alleles. Then we selected markers that appeared to be ASEV loci shared (i.e. more than ~75% of the examined individuals) through the examined subjects. Preliminary results suggest 11619 ASEV SNPs. When stratifying the subjects by affection status, and applying a more restrictive SNP selection criteria, we observed that 3 loci (CCT6P2, PSMA2P3 and GSPT2 gene regions) showed to be ASEV in both groups. We plan to extend the analysis to other samples including leukemia, heart and skeletal muscle cells and to profile ASEV loci for cases and controls. We also aim to investigate how mapping programs affect SNPs and ASEV loci detection. Moreover multiple heterozygous genotypes of the same gene will be studied together to confirm the differences in allele expression and detect the phase of alleles. The method can be improved searching for the smaller differences of gene expression introducing a more sophisticated statistics based on read-counts and considering the quality value of the nucleotide call. In conclusion we are developing a reliable tool to integrate information from polymorphic loci with gene expression. This could increase our knowledge of hereditary factors involved in regulatory systems of gene expression.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE MEDIANTE MLPA E RT-PCR DI UNA NUOVA DELEZIONE β^0 TALASSEMICA CON Hb A2 NELLA NORMA: LA ITALIAN ($\epsilon\gamma\delta\beta$) 0 -THALASSEMIA.

G. Musollino¹, R. Prezioso¹, C. Scarano², G. Piluso³, F. Del Vecchio Blanco³, V. Nigro³, G. Lacerra¹

¹*Istituto di Genetica e Biofisica "Adriano Buzzati-Traverso", CNR, Napoli*

²*Azienda Ospedaliero-Universitaria, Foggia*

³*Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli*

Le talassemie sono disordini ereditari dovuti alla riduzione o assente sintesi di catene globiniche. Le β -talassemie, caratterizzate dall'aumento di Hb A2, sono nel 90% dei casi di tipo puntiformi e nel 10% di tipo delezionali.

Presentiamo una famiglia con fenotipo ematologico di α -talassemia (microcitemia, poliglobulia e Hb A2 nella norma), che all'analisi molecolare mostrava normale sequenza dei geni α - e β -globinici e assenza delle più frequenti delezioni α - o β -talassemiche.

L'analisi del cluster dei geni α - e β -globinici mediante MLPA (MRC Holland) non ha evidenziato presenza di delezioni a carico dei geni α -globinici, ma ha rivelato la presenza di una nuova delezione che rimuove tutto il cluster β -globinico. E' in corso la mappatura del breakpoint mediante Real Time Quantitativa e dati preliminari indicano che il 5' breakpoint è in una regione posta circa 30 kb a 5' del gene beta e che la delezione ha una estensione di almeno 130 kb. L'analisi di sequenza dei breakpoints sarà effettuata su frammenti di long range PCR.

La delezione è stata denominata Italian ($\epsilon\gamma\delta\beta$) 0 -thalassemia poiché è la prima di questo tipo identificata in Italia. Si tratta di un tipo di delezione molto raro spesso identificato in singole famiglie.

L'utilizzo di protocolli MLPA ha permesso di evitare la mancata diagnosi di beta talassemia e si rivela molto utile per risolvere casi ambigui in cui l'analisi molecolare con protocolli classici non ha evidenziato nessuna mutazione e potrebbe, come nel nostro caso, favorire l'identificazione di nuove delezioni.

MICROELEZIONE DE NOVO IN 16p11.2 IDENTIFICATA MEDIANTE ARRAYCGH IN UN PAZIENTE CON SINDROME DI FLOATING-HARBOR

F. Gerundino¹, C. Giachini¹, G. Marseglia¹, C. Pescucci¹, M. Benelli¹, C. Antonelli², F. Torricelli¹

¹*SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze*

²*UO Neuropsichiatria Infantile, AOU Careggi, Firenze*

La sindrome di Floating-Harbor (FHS, OMIM#136140) è una malattia rara caratterizzata da una triade clinica: dismorfismi facciali, bassa statura con ritardo dello sviluppo osseo e ritardo del linguaggio. Le caratteristiche facciali comprendono viso triangolare, filtro corto, bocca larga con labbra sottili, naso bulboso con base larga, columella ampia. In letteratura sono riportati circa 50 casi di FHS la maggior parte dei quali è sporadica, ma sono stati descritti anche alcuni casi familiari con trasmissione autosomica dominante. La diagnosi si basa principalmente sul fenotipo clinico, in particolare sull'individuazione dei dismorfismi facciali caratteristici.

Descriviamo il caso di una bambina di 3 anni e 4 mesi, terza figlia di genitori non consanguinei, nata alla 39 settimana di gestazione da gravidanza normodecorsa. Il peso alla nascita era di 2.730 kg (<10th centile), non sono state riferite complicazioni perinatali (APGAR 9 a 5'). La paziente presenta ritardo motorio, ritardo dello sviluppo e ritardo del linguaggio con caratteristiche facciali peculiari, tra cui: volto triangolare, collo corto e tozzo, micrognatia, ipoplasia medio-facciale, ponte nasale stretto e lungo, naso grosso 'a patata' con radice del naso larga, bocca con labbra sottili e filtro corto e liscio, orecchie con impianto basso rotate posteriormente. Attualmente i parametri di crescita sono superiori al 10° percentile.

L'analisi mediante CGH Array ha evidenziato una delezione de novo in 16p11.2 di circa 186 kb \pm 0.2 Mb che coinvolge il gene SRCAP (OMIM#611421). Recentemente, sono stati descritti 13 pazienti con diagnosi clinica di FHS e mutazioni troncanti in eterozigosi del gene SRCAP (Hood RL et al, 2012). Il fenotipo della paziente si sovrappone ai casi descritti, rappresentando il primo caso di delezione del gene SRCAP associato a FHS.

Metabolic control of breast cancer cell response to Tamoxifen

M.R. Ambrosio¹, V. D'Esposito², V. Costa¹, M. Aprile¹, D. Liguoro³, F. Passaretti², F. Beguinot², A. Ciccodicola¹, P. Formisano²

¹*CNR, Inst. of Genetics and Biophysics "A. Buzzati-Traverso" (IGB), Naples, Italy.*

²*DBPCM, Univ. of Naples Federico II, Naples, Italy.*

³*CNR, Inst. of Experimental Endocrinology and Oncology "G. Salvatore" (IEOS), Naples, Italy.*

It has recently become clear that obesity and type 2 diabetes are associated with an increased frequency of many cancers. Adipocytes are largely represented in microenvironment of several tumors, possibly providing a number of signals and resources to tumor cells. Hence, it has been hypothesized that the metabolic milieu and the adipocyte-released factors may affect the growth and the malignant phenotype of cancer cells including their responsiveness to anti-neoplastic drugs. Understanding how metabolic perturbations may affect cellular response to anti-cancer agents is of crucial importance to avoid unsuccessful cancer treatment. Thus, we have investigated whether metabolic environmental modifications and adipocyte-released factors could influence Tamoxifen (Tam) breast cancer cell response.

Breast cancer cell lines (MCF7) were cultured with different concentrations of glucose, palmitic acid or adipocyte conditioned medium (adipo-CM) and cell viability was analyzed upon Tam treatment. We have obtained evidence that MCF7 cultured in low glucose medium (LG, 5.5mM) were more Tam-sensitive than cells cultured in high glucose medium (HG, 25mM). In particular, 100nM Tam treatment in LG significantly increased cell death compared to the same treatment in HG. The incubation of MCF7 with palmitic acid further reduced Tam-sensitivity. Similarly, adipo-CM increased Tam-resistance in MCF7.

Interestingly, as assessed by Bio-plex assay, adipo-CM contained higher amounts of IL-8, RANTES and IGF-1. Quantitative Real-time PCR showed a concomitant increase in their mRNA levels, suggesting RANTES, IL-8 and IGF-1 represent good candidates given their known involvement in obesity-related complications as well as in cancer progression and drug resistance.

Our data clearly show that diabetes-associated metabolic perturbations may interfere with the response of breast cancer cells to Tam. In light of this, and since gene expression studies may help to evaluate the impact of metabolic conditions on Tam response of breast cancer cells, we are planning to perform a RNA-Seq experiment on a next-generation sequencing platform, to fully characterize the transcriptome of breast cancer cells under different metabolic conditions.

DELETION OF THE OVERLAPPING GENES G6PD AND NEMO CAUSES SEVERE FORM OF INCONTINENTIA PIGMENTI ASSOCIATED TO NERVOUS SYSTEM DELAYED DEVELOPMENT AND LEARNING DISABILITY

M.I. Conte¹, S. Raimo¹, M. Paciolla¹, A. Pescatore¹, E. Esposito¹, M.G. Miano¹, F. Fusco¹, M.v. Ursini¹

¹*Institute of Genetics and Biophysics "Adriano Buzzati-Traverso", IGB-CNR, Naples, 80131, Italy*

Incontinentia Pigmenti (IP, OMIM 308300) is a X-linked dominant neuroectodermal disease, lethal in males, associated with skin defects. As a variable frequency the extracutaneous manifestations may occur.

IP is caused by DNA rearrangements in the Xq28 NEMO/IKBKG locus or by point mutations in the NEMO coding region. NEMO encodes for the NEMO/IKKgamma protein, which acts as a regulatory subunit of the Inhibitor of the KappaB Kinase (IKK) complex required for the canonical NF-kB (Nuclear Factor kappaB) pathway activation.

The NEMO gene has a unique genomic organization: in the centromeric direction, it partially overlaps the G6PD gene; in the telomeric direction, it is part of a Low Copy Repeat (LCR1), whose duplicated copy, the LCR2, located in opposite direction to gene, contains its truncated and non functional copy pseudoNEMO, known to be a reservoir for mutation causing IP. The NEMO locus is also characterized by a high frequency of repeated sequences, micro/macro-homologies and tandem repeats.

We investigated on a group of 20 molecularly unsolved IP subjects and we identified seven unique de novo deletions varying from 4.8kb to about 115kb in length. Each deletion removes partially or completely both IKBKG/NEMO and the overlapping G6PD therefore, uncovering the first deletions disrupting the G6PD gene which were found in patients with IP. Genomic analysis at the breakpoint sites indicated that other mutational forces, such as Non-Allelic homologous recombination (NAHR), Non-Homologous End Joining, Alu-Alu-mediated recombination events might enhance the vulnerability of IP locus to produce de novo pathological IP alleles.

We describe a IP patient with learning disabilities due to neonatal seizures. In the DNA of this patient we revealed a 36bp deletion in NEMO exon 4 that alters the open reading frame of NEMO protein producing a premature stop codon (p.Q145X). Breakpoint sequence analysis showed micro-homologies (CCAG) at the breakpoints, a non-B DNA structure (tetraplex) in the deleted region that may induce DNA strand lesions and an additional T nucleotide at junction point.

These findings support a Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS) mechanism producing such de novo pathological IP alleles.

DISSECTION OF THE MECHANISMS INFLUENCING THE EXPRESSION OF PROTEIN KINASE C ALPHA (PRKCA), A GENE ASSOCIATED WITH MULTIPLE SCLEROSIS

E.M. Paraboschi¹, T. Tabaglio¹, V. Rimoldi¹, S. D'Alfonso², E. Scarpini³, D. Gemmati⁴, G. Soldà¹, S. Duga¹, R. Asselta¹

¹*Dip. di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milano*

²*Dept. of Medical Sciences and IRCAD, Eastern Piedmont University, Novara, Italy*

³*Dept. of Pathophysiology and Transplantation, University of Milan, Fondazione Cà Granda, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy*

⁴*Center Hemostasis & Thrombosis, University of Ferrara, Ferrara, Italy*

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory, demyelinating disease of the central nervous system with a putative autoimmune pathogenesis and complex inheritance, whose genetic and environmental risk factors are still largely unknown. Apart from the human leukocyte antigen region, the PRKCA gene, encoding the protein kinase C alpha, has been involved in MS both by linkage and association studies in different populations. Moreover, we previously showed that MS patients have significantly reduced PRKCA levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) compared to age- and sex-matched healthy controls. To better understand the role of PRKCA in MS predisposition, we decided to characterize in more detail the regulation of this gene.

Since a GCC microsatellite is located in PRKCA promoter region, we explored whether a different number of GCC repeats could influence gene expression both in vitro, by cloning different GCC alleles in a luciferase vector, and in vivo, by analyzing PRKCA expression in a cohort of healthy controls. These experiments showed that the microsatellite is important for the regulation of gene expression, longer alleles driving a higher expression compared to shorter ones. Strikingly, the allele associated with the higher expression levels resulted to be protective (OR=0.12, 95% CI=0.015-0.94) in a case-control association study involving 410 patients and 660 controls.

The alternative splicing pattern of PRKCA was analysed by long-range RT-PCR experiments on PBMCs. We evidenced the presence of at least six different transcripts, 4 in-frame and 2 out-of-frame, whose levels differed between cases and controls. Treatments with Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) inhibitors showed that transcripts bearing premature termination codons are down-regulated by NMD.

Finally we characterized a miRNA (miR-634) located within PRKCA intron 15. In-vitro experiments demonstrated that this miRNA is transcribed from an independent promoter and is able to target one of PRKCA alternative 3'UTRs, thus adding a further layer of complexity to PRKCA expression regulation.

ELEVATA SENSIBILITÀ DIAGNOSTICA DELL'ARRAY-CGH ED IDENTIFICAZIONE DI VARIANTI DI POTENZIALE SIGNIFICATO PATOGENETICO IN UNA CASISTICA DI PAZIENTI SELEZIONATI CON RITARDO MENTALE ASSOCIATO AD ANOMALIE CONGENITE MULTIPLE

R. Genesio¹, A. Mormile¹, V.M. Ginocchio², G. Cappuccio², A. Casertano², G. Minopoli², A. Rossi², L. Nitsch¹, G. Andria², D. Melis²

¹*Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare A.O.U. Federico II di Napoli*

²*Dipartimento di Pediatria A.O.U. Federico II di Napoli*

INTRODUZIONE: L'Array-CGH (aCGH) ha migliorato la sensibilità diagnostica in pazienti con ritardo mentale (RM) ed anomalie congenite multiple (MCA). Il tasso diagnostico medio (con l'uso di sonde oligonucleotidiche) è di circa il 15-20%. Copy-number variation (CNV) sono definite di incerto significato clinico, quando non associate (in letteratura e in Database specifici) ad un fenotipo peculiare e non riportate in Database di varianti benigne.

PAZIENTI E METODI: E' stato condotto uno studio prospettico su 153 pazienti arruolati, dal 2002 al 2011 (82 M, 71 F, età media: 9.5 ± 4.7 anni), con ritardo mentale associato a malformazioni congenite. In questi è stata applicata la flow-chart diagnostica: cariotipo, X-Fragile, aCGH e, ove indicato, esami neuroradiologici e test di screening metabolici. Per l'aCGH nel 62.1% dei pazienti è stato utilizzato il Chip BAC, nel 37.9% sonde oligonucleotidiche.

RISULTATI: L'aCGH ha evidenziato CNV con significato patogenetico in 31 pazienti con cariotipo negativo (12.6% con tecnica BAC e 32.8% con sonde oligonucleotidiche).

CNV di significato incerto sono state identificate in 20 pz (13.1%); il confronto di 4 coppie di pazienti con alterazioni cromosomiche e caratteristiche fenotipiche sovrapponibili suggerisce la verosimile patogenicità delle CNV identificate.

CONCLUSIONI: Il tasso diagnostico medio dell'aCGH è risultato essere superiore a quello riportato in letteratura. L'applicazione dell' aCGH su un campione di pazienti selezionato (mediante valutazione specialistica dismorfologica con esclusione di pazienti con un fenotipo compatibile con quadri sindromici specifici) permette un miglior utilizzo della metodica. CNV di incerto significato clinico impongono cautela nell'interpretazione del risultato. La presenza di aberrazioni cromosomiche sovrapposte e di caratteristiche fenotipiche comuni a più di un paziente possono suggerire un ruolo patogenetico delle anomalie citogenetiche l'interpretazione dei risultati. Si sottolinea l'estrema utilità dell'aCGH come indagine di prima scelta in pazienti con quadri clinici complessi, caratterizzati da RM associato ad anomalie multiple.

LA DIAGNOSI PRENATALE NON INVASIVA PER LA DETERMINAZIONE DEL FATTORE RH E DEL SESSO FETALE

F. Gerundino¹, C. Giachini¹, S. Frusconi¹, C. Pescucci¹, G. Marseglia¹, E. Pelo¹, F. Torricelli¹

¹*SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze*

Scopo di questo lavoro è l'ottimizzazione di protocolli per la determinazione del:

1) fattore Rh fetale, al fine di sottoporre a immunoprofilassi anti-D solo le donne con feto RhD positivo;
2) sesso fetale nelle patologie X-linked, per effettuare la diagnosi prenatale invasiva solo nel caso di feto maschio. E' previsto l'arruolamento di 100 donne in gravidanza a partire dall'ottava settimana di gestazione. L'analisi molecolare viene eseguita sul DNA fetale circolante estratto da 400 ul di plasma materno (QIAamp® DSP Virus Kit). La determinazione del fattore Rh consiste nell'amplificazione dell'esone 5 e 7 del gene RHD mediante Real-Time PCR (TaqMan). L'analisi di questi due esoni permette di evitare il rischio di falsi risultati nei soggetti Rh negativi che non presentano la delezione completa del gene RHD. Infatti, mentre nella popolazione caucasica la maggior parte dei soggetti Rh negativi presentano la delezione completa del gene RHD, in altre popolazioni l'inattivazione del gene può essere determinata da delezioni parziali, mutazioni o riarrangiamenti. La determinazione del sesso fetale consiste nell'amplificazione dei geni SRY e DSY14. Come controllo si utilizza la B-actina (controllo di PCR) e per l'analisi dell'RHD anche il gene DSY14 (controllo interno utile solo in caso di feto maschio). Dal momento che entrambi i protocolli si basano sulla valutazione della presenza/assenza di amplificato, la mancanza di un controllo interno specifico per il DNA fetale pone il dubbio, in caso di assenza di segnale di amplificazione per tutti i target in analisi (es. feto Rh negativo femmina), circa la presenza/quantità sufficiente di DNA fetale. Pertanto, al fine di evitare falsi negativi, l'ottimizzazione di entrambi i protocolli prevede l'amplificazione del promotore del gene RASSF1A, che risulta ipermetilato nel DNA fetale ed ipometilato nel DNA derivato dai leucociti. Questo consente, mediante digestione enzimatica metilazione-sensibile seguita da Real-Time PCR specifica per RASSF1A, di ottenere un segnale di amplificazione specifico per il DNA fetale, indice della presenza di target nel campione. In assenza di amplificazione del gene RASSF1A il protocollo prevede un nuovo prelievo di sangue in epoca gestazionale più avanzata.

La sindrome displasia ectodermica - sindattilia con o senza labiopalatoschisi è causata da mutazioni nei geni codificanti nectina-1 o nectina-4.

E. Agolini¹, P. Fortugno², M. El Hachem², G. Zambruno³, F. Brancati⁴

¹*Istituto CSS-Mendel, Fondazione Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo*

²*Dip. di Medicina Pediatrica, UO di Dermatologia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma*

³*Lab. di Biologia Molecolare e Cellulare, Istituto Dermopatico dell'Immacolata, Roma*

⁴*UOC di Genetica Medica, Policlinico Tor Vergata, Roma*

L'associazione tra anomalie strutturali dei denti e dei capelli, alopecia e parziale sindattilia delle dita delle mani e/o dei piedi definisce la sindrome da displasia ectodermica-sindattilia (EDSS1; OMIM #613573), una condizione autosomica recessiva descritta in non più di 5 famiglie al mondo. Il gene responsabile di questa displasia ectodermica sindromica è PVRL4, codificante per la nectina-4, una molecola di adesione coinvolta nella formazione delle giunzioni aderenti. Descriviamo 3 nuove famiglie provenienti da diversi paesi per un totale di 4 individui affetti da displasia ectodermica associata a sindattilia. L'analisi del gene PVRL4 eseguita in questi pazienti ha permesso l'identificazione di due nuove mutazioni, in particolare un cambio di senso in omozigosi che porta alla formazione di una proteina tronca, presente in un fratello e in una sorella, figli di genitori consanguinei Libanesi ed una delezione in omozigosi dell'esone 2 del gene, in una paziente Danese nata da genitori non consanguinei. In quest'ultima, mediante analisi SNP-array è stata identificata una regione di omozigosi di circa 1.8 Mb che interessa il gene PVRL4 indicativa di un effetto del fondatore nella popolazione Danese. La peculiarità di questo riarrangiamento è legata inoltre al fatto che la perdita di materiale genomico è associata all'inserzione di una sequenza retrotrasponibile SINE.

Il paziente risultato negativo all'analisi di PVRL4 è stato indagato attraverso sequenziamento del gene PVRL1, paralogo di PVRL4, le cui mutazioni sono responsabili della sindrome Zlotogora-Ogur o CLPED1 (OMIM #225000) che associa displasia ectodermica a labio-palatoschisi. In questo soggetto, nato da genitori consanguinei, è stato possibile identificare una nuova mutazione di stop in omozigosi in PVRL1. Questo caso è atipico poiché non sono presenti anomalie della cavità orale generalmente associate a mutazioni di PVRL1.

I risultati ottenuti ampliano lo spettro mutazionale dei geni PVRL 1 e 4, permettono una ridefinizione clinico-molecolare delle displasie ectodermiche causate da alterazioni delle nectine 1 e 4 (nectinopatie) e suggeriscono una flow-chart diagnostica per questo nuovo gruppo di displasie ectodermiche con sindattilia cutanea +/- labiopalatoschisi.

UNCOVERING RECESSIVE LIKELY PATHOGENIC VARIANTS, USING MICRODELETION SYNDROMES WITH UNUSUAL PHENOTYPES

M. Mucciolo¹, S. Amabile¹, X. Bonilla², M. Guipponi², F. Santoni², C. Di Stefano³, C. Di Marco¹, B. Gentilin⁴, F. Lalatta⁴, M.C. Digilio⁵, E. Lapi⁶, J. Hayek⁷, N. GIORDANO⁸, N. Giordano⁸, C. Ciuoli⁹, G. Di Cairano⁹, M. Messina¹⁰, F. Mari¹, A. Renieri¹, S. Antonarakis²

¹Medical Genetics, University of Siena, Siena, Italy

²Department of Genetic Medicine and Development, University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland

³Neonatal Intensive Care Umberto 1 Hospital, Nocera Inferiore, Italy

⁴Medical Genetics Unit, Fondazione IRCCS Cà Granda, Osp. Maggiore Policlinico, Milan, Italy

⁵Medical Genetics and Pediatric Cardiology, Bambino Gesù Hospital, Rome, Italy

⁶Medical Genetics Unit, Children's Hospital Anna Meyer, Firenze, Italy

⁷Child Neurology Unit, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italy

⁸Department of Internal Medicine, Endocrine-Metabolic Sciences and Biochemistry, University of Siena, Italy

⁹Department of Internal Medicine, Endocrinology and Metabolism, Section of Endocrinology and Metabolism, University of Siena, Italy

¹⁰Department of Pediatrics, Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Medicine, Pediatric Surgery Unit, "S. Maria alle Scotte" Hospital, University of Siena, Italy

Accumulating evidence from a decade of array-CGH analysis demonstrated that the single model attributing disease phenotype to a single pathogenic copy number variation (CNV) does not fill all cases. From the literature we know that the same genomic rearrangement associates with a set of diagnosis of different severity or with a complete normal phenotype, such as the 22q11.2 microdeletion syndrome. There is growing appreciation that CNVs can be viewed as contributing to the pathogenesis of "recessive" diseases rather than simply functioning as dominant variants with reduced penetrance. Among our cohort of patients we selected three unrelated patients showing the classical 22q11.2 deletion but an atypical phenotype: Cayler syndrome, MURCS and a very severe intellectual deficit associated with polydactyly. We hypothesized that a second event in the non-deleted allele can be responsible for the atypical phenotype. In order to confirm this hypothesis we analysed by Next Generation Sequencing (NGS) these three patients. The region deleted in VCFS was captured by liquid hybridization using custom made reagents and sequenced this entire 3 Mb genomic region to sufficient depth. We found no obvious likely pathogenic mutation in the Cayler patient, but the analysis is ongoing. In the patient with ID and polydactyly we found a non synonymus mutation in the MED15 gene (c.2141 G>A, p.R714H). MED15 part of the Mediator complex is involved in the regulated transcription of nearly all RNA polymerase II-dependent genes. High transcript levels of this gene were revealed in the frontonasal mass, pharyngeal arches and limb bud in mouse. Moreover, mutations in MED15 were associated with schizophrenia. Then we hypothesized that MED15 could be responsible for the polydactyly and the severe intellectual deficit presented by our patient. Finally, in the patient with MURCS phenotype we found a mutation in a non coding RNA, representing a natural occurring read-through transcription between SEPT5 (septin 5) and GP1BB (glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide). We suppose from the encode data it appears that this conserved element could represent an enhancer. To demonstrate our hypothesis luciferase assays and analysis of 9 additional patients with MURCS association is ongoing.

L'APLOINSUFFICIENZA DEL GENE RBFOX1 IN UN CASO CON DEFICIT INTELLETTIVO, CARATTERISTICHE FACIALI PECULIARI E DISTURBO DEL LINGUAGGIO

C. Giachini¹, F. Gerundino¹, G. Marseglia¹, C. Pescucci¹, M. Benelli¹, M.R. Scordo², B. Federighi², V. Scandurra², E. Lapi³, F. Torricelli¹

¹*SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze*

²*UO Neuropsichiatria Infantile, AOU Careggi, Firenze*

³*UO Genetica Medica, APU Meyer, Firenze*

Le variazioni del numero di copie (CNVs, Copy NumberVariations) che coinvolgono geni implicati nello sviluppo del sistema nervoso possono essere responsabili di diversi fenotipi neuropsichiatrici, come riportato in diversi studi presenti in letteratura. Nel presente lavoro si descrive una paziente in cui è stata evidenziata mediante CGH array una delezione di 576 kb in 16p13.3. La delezione determina aploinsufficienza del gene RBFOX1 (RNA binding protein, fox-1 homolog 1). Tale gene codifica per una proteina che lega l'RNA espressa in maniera specifica a livello cerebrale e muscolare, che risulta implicata nella regolazione degli eventi di splicing dei pre-RNA di diversi geni critici per lo sviluppo e per l'attivazione neuronale. In questo studio si descrive una paziente di 20 anni, nata a 37 settimane di gestazione con parametri auxologici nella norma, che ha presentato sofferenza perinatale (I.A.:5-8) e successivamente ritardo dello sviluppo psico-motorio, immaturità relazionali con inibizione e disturbo del linguaggio e degli apprendimenti, sfumati segni cerebellari, convulsioni febbrili e successive alterazioni EEG con fotosensibilità (senza crisi epilettiche). Il fenotipo della paziente è caratterizzato da: macrocrania relativa, viso triangolare, rime palpebrali down-slating, filtro corto, bocca piccola, palato ogivale, morso aperto, affollamento dentario. Inoltre, si evidenzia la presenza di collo corto, cubito valgo, scoliosi e iperlordosi lombare. Alterazioni rare del numero di copie a carico di RBFOX1 sono state precedentemente associate a disturbi dello sviluppo, deficit intellettivo, disturbi da deficit dell'attenzione, lineamenti dismorfici non specifici e autismo. Il quadro fenotipico della paziente in oggetto fornisce una ulteriore evidenza sull'importante ruolo del gene RBFOX1 nello sviluppo del sistema nervoso.

Nicolaides-Baraitser syndrome: an emerging clinical entity.

C. Lo Rizzo¹, E. Pasquetti¹, L. Dosa¹, M. Baldassarri¹, C. Di Marco¹, G. Carignani¹, F. Cristofoli², R. Vivarelli³, M. Vascotto³, P. Rubegni⁴, M. Fimiani⁴, J. Hayek⁵, M. Dotti⁶, P. Balestri³, A. Marozza⁷, M. Mencarelli¹, J. Vermeesch², A. Renieri¹, F. Mari¹

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

²*Center for Human Genetics, Catholic University Leuven, University Hospital Gasthuisberg, Leuven, Belgium*

³*Pediatric Unit, University of Siena, Siena, Italy*

⁴*Department of Clinical Medicine and Immunological Science, Dermatology Section, University of Siena, Siena, Italy*

⁵*Child Neuropsychiatry Unit, University Hospital, AOUS, Siena, Italy*

⁶*Department of Neurological, Neurosurgical and Behavioural Sciences, University of Siena, Italy*

⁷*Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italy*

The first case of Nicolaides-Baraitser syndrome (NBS; MIM 601358) was described in 1993 but only recently this syndrome has been well delineated. Main clinical features include severe intellectual deficit (ID) with absent or limited speech, microcephaly, seizures, short stature, sparse hair, typical facial morphology, brachydactyly, prominent finger joints and broad distal phalanges. The main differential diagnosis is Coffin–Siris syndrome. All cases have been sporadic thus far. In 2012 Van Houdt et al. identified de novo mutations in the SMARCA2 gene in some patients with NBS. SMARCA2 encodes the core catalytic unit of the SWI/SNF ATP-dependent chromatin remodeling complex that is involved in the regulation of gene transcription. We describe 7 unreported patients with clinical features of NBS, 3 females and 4 males, aged from 11 months to 33 years. All patients showed ID with greater impairment of language, structured with few single words. All patients showed a friendly personality. Some of them, however, developed periods of aggression and social withdrawal. Four of them had epilepsy, seizures type was variable and often drug-resistant. Growth parameters were variable: OFC was below the 3rd percentile in 4 patients, one of these patients presented also short stature. The common facial features included typical triangular face, low frontal hairline, downslanting palpebral fissures, long eyelashes, thick eyebrows, anteverted nares with prominent columella, long philtrum, large mouth, thin upper lip and thick lower lip. There was evidence of coarsening of the facial traits with age. Patients showed also sparse hair, prominent interphalangeal joints and brachydactyly. SMARCA2 analysis demonstrated the presence of a de novo pathogenic mutation in two patients while resulted negative in three cases. For two of them the analysis is still ongoing. In the negative patients a mutation in the other genes involved in the same pathway of SMARCA2 could be hypothesized. It is worth bringing to the attention of the clinical geneticists the features of this condition since our collection of a relative large number of individuals with NBS in a short time span demonstrates that NBS is more common than was originally anticipated.

IL CARIOTIPO MOLECOLARE IN DIAGNOSI PRENATALE: L'ESPERIENZA DELLA SOD DIAGNOSTICA GENETICA

C. Pescucci¹, G. Marseglia¹, F. Gerundino¹, E. Pelo¹, C. Giachini¹, M. Benelli¹, E. Lisi¹, F. Sbernini¹, D. Parrini¹, M. Betti¹, R. Casano¹, F. Torricelli¹

¹*SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze*

Dal 2010 al I semestre 2012 sono state eseguite presso la SOD Diagnostica genetica 102 indagini prenatali con arrayCGH. Sono stati effettuati 72 test (71%) su villo coriale, 24 (23%) su amniociti, 2 (2%) su sangue fetale e 4 (4%) su tessuto abortivo. Le principali indicazioni all'esecuzione del test sono state le seguenti: malformazioni fetali multiple (20.5%), approfondimento diagnostico in riarrangiamenti cromosomici apparentemente bilanciati (18.5%), caratterizzazione molecolare di marcatori soprannumerari (8.8%), malformazione cerebrale isolata (4.9%), malformazione cardiaca isolata (5.8%), precedente gravidanza con riarrangiamento cromosomico (5.8%), valore della translucenza nucale (NT) superiore al 99° centile (34%), altre malformazioni (1.7%). Sono risultati positivi all'indagine il 14% dei casi con malformazioni multiple (3/21), il 23% dei casi con riarrangiamenti cromosomici apparentemente bilanciati de novo (3/13), il 66.6% dei marcatori soprannumerari (6/9). I casi con unica indicazione all'indagine $NT \geq 99^\circ$ centile sono risultati tutti negativi. Abbiamo inoltre evidenziato una variante di non chiaro significato patogenetico (VOUS): una delezione de novo (circa 690 kb) in una regione deserta di geni, tuttavia localizzata al breakpoint prossimale di una traslocazione de novo apparentemente bilanciata. L'utilizzo dell'arrayCGH in diagnosi prenatale si conferma un valido strumento per la ricerca di sbilanci cromosomici criptici nei feti con cariotipo normale e anomalie ultrasonografiche e risulta fondamentale per la caratterizzazione molecolare dei marcatori soprannumerari. Infatti, questo tipo di indagine può permettere di definire origine, contenuto genico e porzione eucromatinica eventualmente presente nel marcatore, contribuendo in maniera essenziale alla corretta definizione diagnostica. Inoltre, l'esecuzione del cariotipo molecolare si rivela un approfondimento necessario nei riarrangiamenti cromosomici de novo apparentemente bilanciati.

DIVERSI LIVELLI DI ESPRESSIONE DELL'ISOFORMA 1 DELLA NEUROFIBROMINA DISCRIMINANO I PAZIENTI NF1 CON FENOTIPO LIEVE RISPETTO AI PAZIENTI CON FENOTIPO GRAVE: POSSIBILE UTILIZZO COME MARCATORE PROGNOSTICO?

P. Boemio¹, B. Granese¹, R. Taurisano¹, A. Casertano¹, G. Minopoli¹, A. Rossi¹, G. Andria¹, D. Melis¹

¹Dipartimento di Pediatria A.O.U. Federico II di Napoli

INTRODUZIONE:La neurofibromatosi tipo I (NF1) è una patologia multisistemica a carattere progressivo e ad ereditarietà autosomica dominante, causata dalla mutazione inattivante del gene neurofibromina (Nf1). Nella NF1 non è stata individuata una chiara correlazione genotipo-fenotipo, tranne nel caso di delezioni dell'intero gene, associate ad un fenotipo più severo. Sono state identificate sei isoforme della Nf1, prodotte attraverso lo splicing alternativo dei suoi esoni; queste presentano un livello di espressione quantitativo, diverso nei vari tessuti. L'isoforma 1 è espressa principalmente nelle cellule di Schwann. Alcuni studi, hanno evidenziato un significativo aumento dell'isoforma I, nelle cellule di carcinoma del colon, nei tumori ectodermici e nel carcinoma ovarico. **SCOPO:**studiare i livelli di espressione dell'isoforma 1 del gene Nf1, nei leucociti estratti da sangue periferico, in un gruppo di pazienti affetti da NF1. **METODI:** Sono stati studiati 5 pazienti con fenotipo lieve (identificato dalla presenza di sole macchie caffè latte e/o freckling ascellare, familiarità, noduli di Lisch) 2 M e 3 F, dell'età media di 11,29 anni(range 6,42-22,83 anni) e 14 con fenotipo grave (identificato dalla presenza di neurofibromi profondi e/o glioma del nervo ottico, feocromocitoma o altre neoplasie, ritardo mentale, disturbi della pubertà) 8 F e 6 M, dell'età media di 24,7 anni(range 7,5- 53,4 anni).L'estrazione dell'RNA è stata eseguita da sangue periferico usando il RiboPureTM-Blood Kit, la sintesi del cDNA con il kit High-Capacity ArchiveTM, la Real-time PCR quantitativa relativa, con chimica di reazione TaqMan®, i primer e le sonde del tipo Minor Groove Binder (Applied Biosystems).**RISULTATI:**I pazienti con fenotipo grave hanno valori medi di espressione dell'isoforma 1 significativamente più alti rispetto ai pazienti con fenotipo lieve (0,64 +/- 0,11/0,15 vs 0,25 +/-0,07/0,1;p=0,02). **CONCLUSIONI:**I risultati ottenuti, se confermati su una casistica più ampia, potrebbero portare ad identificare un livello soglia e fornire uno specifico giudizio prognostico nei pazienti con NF1. Tale dato potrebbe permettere di personalizzare il programma di follow-up dei singoli pazienti, tuttavia non è possibile escludere del tutto il ruolo dell'età.

Synergistic functions of p53 and TAp73 α in regulating Otx1 expression during breast cancer stem cell differentiation.

I.S. Pagani¹, A. Terrinoni², V. Serra², I. Zucchi³, C. Pirrone⁴, D. Pigni⁴, A.M. Chiaravalli⁵, F. Pasquali⁴, F. Lo Curto⁴, C. Capella⁵, G. Melino⁶, G. Porta⁴

¹*Dip. Medicina Sperimentale e Chirurgia, Università Tor Vergata, Roma*

²*IDI-IRCCS, Lab. di Biochimica, Dip. Medicina Sperimentale e Chirurgia, Università Tor Vergata, Roma*

³*CNR, Milano*

⁴*Dip. Medicina Clinica e Sperimentale, Varese*

⁵*Anatomia e Istologia Patologica, Osp. di Circolo, Varese*

⁶*MRC, Toxicology Unit, Leicester, UK*

Tp53, Tp63 and Tp73 family members encode for transcription factors which control genome integrity inducing cell-cycle arrest, senescence, apoptosis or cell differentiation. They take part in cell response and in tumor suppression. Wild-type p53 protein is a growth modulator and its inactivation is a critical event in malignant transformation. Indeed p53 has developmental and differentiation functions, and its over-expression in tumor cells induces asymmetrical division avoiding self-renewal of cancer stem cells and promoting their differentiation. Instead loss of function of p53 leads to the symmetric division, resulting in tumor growth (1).

Otx1 is an homeobox gene involved in central nervous system development, and when deregulated, is involved in the pathology of B-cells Non-Hodgkin Lymphomas (2), and it used as tumor marker in the nodular/desmoplastic sub-type of medulloblastoma (3).

For the first time we showed that Otx1 is over-expressed in ductal and lobular invasive breast cancers and that is involved in adult mammary gland development. We demonstrated that p53 directly regulates Otx1 gene expression, and that this pathway is involved in LA7 breast cancer stem cell differentiation (4). The LA7 cells have the capacity to differentiate into all of the cell lineages of the mammary gland, and to form heterogeneous tumors and metastasis in NOD-SCID mice. LA7 cells treated with differentiating agents, such as DMSO, are able to form hemispherical polarized dome-shaped structures, that recapitulate the cellular changes occurring during the mammary gland development in pregnancy (5).

Here we showed that the TAp73 isoform of p73, like p53, is able to bind the p53 responsive element on the Otx1 promoter, leading to the LA7 cell differentiation and the asymmetric division of cancer stem cells. We further demonstrated that Otx1 and TAp73 are over-expressed in ductal and lobular invasive breast carcinomas, with correlation in triple negative breast cancers and in metastasis.

We will show this correlation and their role in cell differentiation.

1-Cicalese A, et al: Cell (2009)

2-Omodei D, et al: American J Pathol (2009)

3-De Haas T, et al: J neuropathol exp neurol (2006)

4-Terrinoni A, et al: Oncogene (2011)

5-Zucchi I, et al: Proc Natl Acad Sci U S A (2008)

STUDY OF PLASMA METABOLITES LEVELS SUGGESTS THE INVOLVEMENT OF ARGINASE AND CARNITINE-PALMITOYLTRANSFERASE-L PATHWAYS IN AUTISM

G. Malerba¹, R. Wang-Sattler², E. Trabetti¹, J. Adamski³, P. Prandini¹, L. Xumerle¹, C. Zusi¹, A. Pasquali¹, R. Galavotti¹, P.F. Pignatti¹, T. Illig⁴

¹*Sez. di Biologia e Genetica, Dip. di Scienze della Vita e Riproduzione, Università degli Studi di Verona, Italy*

²*Research unit of Molecular Epidemiology, Helmholtz Zentrum München, 85764 Neuherberg, Germany*

³*Institute of Experimental Genetics, Genome Analysis Center, Helmholtz Zentrum München, 85764 Neuherberg, Germany*

⁴*Hannover Unified Biobank, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany*

Autism spectrum disorders (ASDs) are a group of pervasive neurodevelopmental disorders whose etiology is not known. Metabolomics might help in giving new insights on the pathogenesis of the disease.

In this study, within the frame of the Italian Autism Network (ITAN), plasma samples of 39 discordant ASD sibpairs, composed by an autistic male child and his unaffected brother, were measured for 188 metabolites concentration based on targeted metabolomics approach with the AbsoluteIDQTM p180 kit (BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck, Austria). Single metabolite analysis did not show any significant association with autism after correction for multiple testing. Since the most important associations, although not significant, involved carnitine ($p=0.02$) and ornithine ($p=0.013$), we investigated some combinations of these metabolites to estimate the activity of enzymes involving such metabolites. We found that the Arginine activity ($p=0.046$) and Carnitine-palmitoyltransferase-I activity (CPT-1, $p=0.035$) resulted to be independent factors associated with the disease status ($p=0.019$, $R^2=0.076$). CPT-1 is rate-limiting step in the uptake of fatty acids into mitochondria and arginase activity has been previously associated with inflammation.

These preliminary results suggest that a group of metabolites including carnitine, ornithine and arginine may serve as candidate biomarkers for ASD and that CPT-1 and arginase activity might be associated with ASD. Future genetic investigations might focus on these pathways in detail.

MUTAZIONI SOMATICHE DI BRAF IN PAZIENTI AFFETTI DA MELANOMA MALIGNO METASTATICO ED EFFICACIA CLINICA DEGLI APPROCCI TERAPEUTICI A BERSAGLIO MOLECOLARE CON INIBITORI DI BRAF

G. Ponti¹, G. Pellacani², L. Simi³, R. Depenni⁵, A. Spallanzani⁵, F. Gelsomino⁵, A. Pollio⁴, S. Borsari², A. Fabiano², V.D. Mandel², A. Tomasi¹, G. Luppi⁵

¹Università di Modena e Reggio Emilia, Dip. di Medicina Diagnostica, Clinica e di Sanità Pubblica

²Università di Modena e Reggio Emilia, Clinica Dermatologica

³Università di Firenze, Dip. di Fisiopatologia Clinica, Unità di Biochimica Clinica

⁴Università di Napoli, Dip. di Scienze Odontostomatologiche e Maxillo Facciali, Unità di Medicina Orale

⁵Università di Modena e Reggio Emilia, Dip. di Oncologia

L'introduzione di terapie a bersaglio molecolare ha rivoluzionato la prognosi dei pazienti affetti da melanoma metastatico. Attualmente è possibile determinare lo status molecolare del melanoma analizzando geni quali C-KIT, BRAF ed N-RAS per la scelta di strategie terapeutiche mirate. Mutazioni di BRAF si riscontrano in circa il 50% dei melanomi: tra queste la V600E e la V600K sono maggiormente frequenti e ben studiate nei protocolli di sperimentazione di fase II/III con inibitori di BRAF. Questi ultimi (Dabrafenib e Vemurafenib) hanno dimostrato efficacia nell'indurre risposte obiettive. Presentiamo le preliminari valutazioni delle correlazioni tra tipologie di mutazioni somatiche del gene BRAF riscontrate in una coorte di melanomi in stadio IV e le risposte cliniche a tali inibitori selettivi.

A partire dal giugno 2011, 19 pazienti (10M e 9F; età media 55 anni) affetti da melanoma stage IV BRAF+ sono stati arruolati in protocolli terapeutici con Dabrafenib (150 mg 2 volte/die) o Vemurafenib (960 mg 2 volte/die) presso l'Università di Modena. Il restaging strumentale veniva eseguito a 8 settimane.

In 18 pazienti sono state riscontrate mutazione hot spot V600E (c.1799T>A), in due differenti pazienti sono state individuate le rare mutazioni V600M (c.1798G>A) e V600R (c.1790T>G). Nell'unico paziente con una doppia mutazione (V600E; V600M) la terapia con Dabrafenib ha indotto una rapidissima risposta clinica. In due casi la mutazione in BRAF, inizialmente negativa, è stata poi riscontrata in una successiva analisi.

I dati preliminari evidenziano una risposta obiettiva già nelle primissime settimane di terapia e buona tolleranza sia nei pazienti con mutazioni V600E che in quelli con le rare mutazioni V600M e V600R. 15 pazienti con follow-up di almeno 8 settimane hanno presentato un periodo di sopravvivenza medio libero da progressione di 7 mesi. In 9 pazienti persiste ad oggi la risposta terapeutica.

La doppia mutazione di BRAF potrebbe costituire un fattore prognostico positivo per la risposta agli inibitori di BRAF. Nei casi negativi alla ricerca mutazionale, dovrebbe essere routinariamente impiegate indagini più approfondite atte ad evidenziare non solo la presenza della comune V600E ma anche delle varianti meno comuni degli esoni 11 e 15.

TRPC6 MUTATIONS IN CHILDREN WITH STEROID RESISTANT NEPHROTIC SYNDROME AND ATYPICAL PHENOTYPE

M. Gigante¹, G. Caridi², E. Montemurno³, S. Diella¹, M. d'Apolito⁴, F. Aucella⁵, L. Massella⁶, G. Messina⁷, E. Ranieri¹, G.M. Ghiggeri², L. Gesualdo³

¹Department of Medical and Surgical Sciences, University of Foggia, Italy

²Division of Nephrology, Laboratory on Pathophysiology of Uremia, G. Gaslini Institute, Genoa, Italy

³Department of Emergency and Organ Transplantation, University of Bari, Italy

⁴Institute of Pediatrics, University of Foggia, Italy

⁵Division of Nephrology, Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy

⁶Department of Nephrology and Urology, Bambino Gesù Children's Hospital and Research Institute, Italy

⁷Division of Nephrology, Giovanni XXIII Hospital and Department of BioMedicine of Developing Age, University of Bari, Italy

BACKGROUND AND OBJECTIVES. The discovery of genes involved in podocyte development and function was crucial for understanding mechanisms of glomerular kidney diseases that cause various degrees of proteinuria and, potentially, the progression to end stage renal disease (ESRD). The list of genes involved in nephrotic syndrome is rapidly increasing and includes at least 7 molecules associated with variable inheritance. Mutations in the TRPC6 gene have been recently identified as the cause of late-onset autosomal-dominant focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). In order to extend the screening, we analyzed TRPC6 in 33 Italian children with sporadic early-onset of Steroid Resistant Nephrotic Syndrome (SRNS) and 13 Italian families with adult-onset FSGS.

METHODS. TRPC6 mutation analysis was performed through PCR and sequencing. The effect of the detected amino acid substitutions were analyzed by bioinformatics tools, site direct mutagenesis, transfection and intracellular calcium measurement. The expression levels of TRPC6 and nephrin proteins were also evaluated on renal tissue by confocal microscopy.

RESULTS. Three heterozygous missense mutations (c.374A>G_p.N125S; c.653A>T_p.H218L; c.2684G>T_p.R895L) were identified. The first new mutation, p.H218L, was found in a 18 year-old boy who presented a severe form of FSGS at the age of 8 years. The second, p.R895L, a new de novo mutation, was identified in a girl with collapsing glomerulosclerosis at the age of 2 years. The former mutation, p.N125S, was found in 2 siblings with early onset SRNS at the age of 4 and 14 years. Renal immunofluorescence revealed up-regulated expression of TRPC6 and loss of nephrin in glomeruli. The intracellular calcium concentrations were significantly higher in the cells expressing all mutant TRPC6 channels compared with cells expressing wild type TRPC6.

CONCLUSIONS. Our findings suggest that TRPC6 variants can also be detected in children with early onset and sporadic SRNS (4/33). Moreover, in one case a new de novo TRPC6 mutation was associated with a rare severe form of childhood collapsing glomerulosclerosis with rapid progression to uremia.

Descrizione e valutazione dell'Aplotipo HLA in una famiglia multi-generazionale affetta da Sclerosi Multipla

S. De Benedetti¹, V. Mantero², R. Marazzi², L. La Mantia², C. Spreafico³, C. Erminio⁴, P. Primignani¹, G. Lando⁵, E. Agostoni², A. Protti², S. Penco¹

¹*Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Genetica Medica, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano*

²*Dipartimento di Neuroscienze, Divisione di Neurologia, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano*

³*Unità di Neurologia, Ospedale di Desio, Desio, Monza Brianza*

⁴*Dipartimento di Neuroscienze, Divisione di Neuroradiologia, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano*

⁵*Dipartimento di Medicina Trasfusionale, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano*

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia demielinizzante autoimmune e infiammatoria del Sistema Nervoso Centrale. Diversi studi di popolazione e di famiglie hanno evidenziato il coinvolgimento di fattori genetici nell'eziologia della malattia; il rischio di recidiva nei fratelli di individui affetti è stato trovato essere tra il 20 e il 40% e l'indice di concordanza tra i gemelli monozigoti è sei volte superiore che nei dizigoti. Infine circa il 20% dei pazienti affetti da Sclerosi Multipla ha almeno un parente affetto. Nonostante i fattori genetici siano importanti nell'eziologia della SM, questa non può essere considerata una patologia genetica ereditaria. In letteratura sono stati riportati solo pochi casi di famiglie multi-generazionali in cui gli individui malati si presentano in più di una generazione.

Descriviamo una famiglia con cinque individui tutti di sesso femminile, affetti da Sclerosi Multipla attraverso due generazioni. Non si riscontrano unioni tra consanguinei. La famiglia è originaria di un piccolo paese dell'Italia Meridionale da cui, nell'ultimo secolo, si è verificata una forte emigrazione nel Nord Italia. La diagnosi di malattia nei cinque soggetti affetti è stata posta in tempi diversi. Il DNA dei soggetti disponibili è stato analizzato per valutare l'aplotipo HLA (Human Leukocyte Antigen): il risultato ottenuto ha mostrato la presenza di almeno un allele HLA-DRB1*15:01 in tutti gli individui affetti da SM. L'allele HLA-DRB1*15:01, in particolare è stato dimostrato specifico per il sesso femminile. Un aggregato familiare multi-generazionale come quello in esame può essere molto utile per lo studio di una malattia complessa come la Sclerosi Multipla. Ci proponiamo di utilizzare questa famiglia per ulteriori indagini volte ad approfondire la conoscenza delle componenti genetiche che sottendono a questa patologia.

Next-generation DNA sequencing for BCR-ABL1 breakpoint detection in CML

I.S. Pagani¹, C. Pirrone², D. Pigni², F. D'Avila³, D. Braga³, S. Lupoli³, M. Barcella³, C. Barlassina³, F. Pasquali², F. Lo Curto², F. Passamonti⁴, G. Porta²

¹*Dip. Medicina Sperimentale e Chirurgia, Università Tor Vergata, Roma*

²*Dip. Medicina Clinica e Sperimentale, Università dell'Insubria, Varese*

³*Dip. Scienze della Salute, Università degli Studi, Milano- Fondazione Filarete*

⁴*Ematologia, Ospedale di Circolo, Varese*

CML is characterized by the Philadelphia chromosome (Ph), resulting from the t(9;22)(q34;q11) balanced reciprocal translocation that generates the BCR-ABL1 fusion protein (1). Detection of BCR-ABL1 fusion gene is critical for the diagnosis of chronic myeloid leukemia and to follow the disease progress in patients under therapy. Traditional cytogenetic techniques (G-banded cytogenetics, spectral karyotyping and FISH) lack sensitivity to detect genomic rearrangements and provide limited resolution of breakpoint positions (2). Up to now we identified junction sequences by two different methods: a Long-range PCR (3) and a PCR system originally developed for genome walking that allows to fragment, ligate to adapters, amplify genomic DNA and finally sequence breakpoint (4). However, those methods are too expensive and laborious for diagnostic purposes. Conventional DNA sequencing has been used to explore genetic elements and structures but the high sequencing costs and the low throughputs have historical limited in-depth analysis of a broad range of genomic elements, making the development of new sequencing strategies necessary (5). Next-generation sequencing (NGS) technologies are transforming the field of genomic science and DNA sequence enrichment enables targeted NGS. We applied targeted NGS to resolve sequence breakpoints in BCR-ABL1 fusion gene in CML patients and K562 cell line with known breakpoints. For this purpose we used Agilent Sure Select Enrichment and Illumina paired-end sequencing.

(1) Shibata et al. *Genome Medicine* (2010) 2:70

(2) Campbell et al *Nature Genetics* (2008) 6:40

(3) Ross et al. *Leukemia* (2010); 24: 1719-1724.

(4) Mattarucchi E et al. *Journal of Molecular Diagnostics* (2009) 11: 482-487

(5) Fullwood et al. *Genome Res.* 2009 19: 521-532

Thank's to AIL-Varese, Bergamo

Why “diagnostic packages” in clinical practice? Implications of the use of one-step NGS test for MECP2, CDKL5, FOXP1 and MEF2C in the spectrum of Rett syndrome

F. Mari¹, E. Grillo¹, C. Lo Rizzo¹, E. Pasquetti¹, G. Carignani¹, M. Bruttini¹, M.A. Mencarelli¹, I. Meloni¹, A. Marozza², F. Ariani¹, A. Renieri¹

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

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

Technological advancement is fully changing the approach of the medical geneticist regarding the application of genetic testing. Traditionally the clinical geneticist uses to think of the most likely diagnosis and asks for a specific genetic test. This approach is successful for diseases with a single causative gene and clinical homogeneity. Only in a few cases with genetic and clinical heterogeneity the diagnosis is confirmed by the first test required. More frequently a long step by step process is necessary to achieve the molecular diagnosis. In many cases the geneticist is able to classify the patient in a group of diseases rather than directly in a precise molecular and clinical diagnosis. In this work we want to report our experience concerning the set up of a diagnostic test related to the group of diseases including classic Rett syndrome (MECP2 gene) and variants: the Zappella variant (MECP2 gene), the early onset seizure variant (CDKL5 gene), the congenital variant (FOXP1 gene) and Rett-like phenotypes (MEF2C gene). In particular, we want to emphasize how the use of this one-step test has allowed us to reach the diagnosis in cases that otherwise would not have been diagnosed. Very recently, we had the chance to evaluate a 2 years and 3 months old girl who showed developmental delay since the sixth month of life, typical Rett stereotypic hand movements and absence of epilepsy. According to the clinical criteria there would have been no indications to perform the analysis of the CDKL5 gene in this patient. However, clinically driven by a suspicion of a condition belonging to Rett spectrum, we decided to test the patient using a protocol of Next Generation Sequencing (Roche, 454 GS Junior) enabling the simultaneous detection of mutations in the 4 above mentioned genes. The analysis showed the presence of a de novo CDKL5 nonsense mutation: c.868C>T (p.Q290X). Our “lumping approach” allowed us to rapidly achieve a genetic diagnosis in this family and to provide a clear preconceptional genetic counselling to the parents seeking for a second child. We therefore believe that the one-step NGS test is of great help to the clinician because it enhances the clinical intuition allowing to quickly check the correct diagnosis within a spectrum of pathologies.

Identificazione di due nuove mutazioni nel gene NOTCH3 in due pazienti italiani affetti da CADASIL

L. Mosca¹, F. Rivieri², R. Tanel³, A. Bonfante⁴, C. Ajmone⁵, P. Primignani¹, E. Manfredini¹, A. Marocchi¹, S. Penco¹

¹S.S. Genetica Medica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

²Servizio di Genetica Medica, Ospedale S. Chiara, Trento

³Dipartimento di Malattie Neurologiche, Ospedale S. Chiara, Trento

⁴Unità di Genetica Medica, Ospedale San Bassiano, Bassano del Grappa, Vicenza

⁵SS Servizio di Consulazione Psicologica e Psicoterapia, Dipartimento di Salute Mentale, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

La CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) è una malattia ereditaria autosomica dominante la cui frequenza nella popolazione italiana non è ben definita. Si tratta di una patologia cerebrovascolare caratterizzata da ischemie multiple sottocorticali e sofferenza della sostanza bianca (leucoencefalopatia), talora associata ad attacchi emicranici.

La penetranza della malattia sembra essere del 100%, ma l'espressività clinica è ampiamente variabile anche nell'ambito di una stessa famiglia; le principali manifestazioni cliniche consistono in emicrania con aura, attacchi ischemici ricorrenti, decadimento cognitivo e disturbi psichiatrici.

L'età media di insorgenza si situa nella terza-quarta decade di vita, il decorso è solitamente progressivo ed ha un esito fatale in alcuni anni.

La CADASIL è causata dalla presenza di mutazioni nel gene NOTCH3 (cromosoma 19p13.2-p13.1) che codifica per una proteina di membrana probabilmente coinvolta in meccanismi di signalling intercellulari; le mutazioni patogenetiche sono state finora riportate solo su esoni che codificano per ripetizioni EGF-like (esoni 2/24) e risultano in un'aggiunta o rimozione di un residuo di cisteina.

Il test genetico costituisce il gold standard della diagnostica e dovrebbe essere preceduto dalla consulenza genetica secondo le linee guida per la malattia di Huntington.

Riportiamo qui l'identificazione tramite sequenziamento diretto di due nuove mutazioni localizzate negli esoni 6 e 15 del gene NOTCH3; entrambe le varianti sono in accordo con la natura stereotipa delle mutazioni causative di CADASIL e questo supporta il loro ruolo patogenetico.

I due soggetti portatori delle varianti sono entrambi originari del nord Italia, hanno una storia familiare positiva e presentano caratteristiche cliniche e di risonanza magnetica tipiche per CADASIL.

In conclusione, i nostri dati sottolineano l'importanza del sequenziamento diretto del gene NOTCH3 quale strumento utile e prezioso per la diagnosi di CADASIL e, nei due casi clinici descritti, per l'identificazione di nuove mutazioni.

MUTAZIONE DI SPLICING NEL GENE OPHN1 DETERMINA LA PRODUZIONE DI TRE TRASCritti ALTERNATIVI ED ALTRETTANTE ISOFORME PROTEICHE NON FUNZIONANTI

F. Pirozzi¹, M. Enea¹, G. Zanni², P. Billuart³, E. Tabolacci¹, A. Brancaccio⁴, M.G. Bigotti⁴, G. Neri¹, P. Chiurazzi¹

¹*Istituto di Genetica Medica, Università Cattolica, Roma*

²*Istituto di Medicina Molecolare, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma*

³*Institut Cochin, Université Paris Descartes, Genetic and Development, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris, France*

⁴*Istituto di Biochimica e Biochimica Clinica, Università Cattolica e Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare (CNR), Roma*

Il gene OPHN1 (ARHGAP41) è deletato o presenta mutazioni loss-of-function in una forma di ritardo mentale X-linked con ipoplasia cerebellare congenita. OPHN1 codifica per una GAP caratterizzata da tre domini (BAR, Plekstrin-Homology, GAP), condivisi con tre paraloghi (ARHGAP42, ARHGAP10 e ARHGAP26). Il dominio C-terminale di ogni paralogo è invece differente. Clinicamente i pazienti presentano ritardo mentale di grado moderato associato a strabismo e talvolta ad epilessia. In una famiglia italiana con tre pazienti abbiamo identificato una mutazione di splicing in OPHN1 che determina la produzione di una proteina, apparentemente stabile, con 16 aminoacidi in più [Hum. Mutat. 2011; 32:E2294-307. PMID: 21796728]. La mutazione consiste in una delezione di due nucleotidi all'inizio dell'introne 7-8 che abolisce il sito donatore di splicing. L'amplificazione mediante RT-PCR aveva inizialmente rivelato solo la presenza di un frammento più lungo, che include 48 nucleotidi dell'introne 7 e termina prima di uno sito di splicing criptico. I 48 nucleotidi codificano per 16 aminoacidi che sono inclusi in-frame tra due regioni coiled-coil nel dominio BAR. Considerato che tipicamente la perdita di un sito donatore determina exon skipping dell'esone precedente, abbiamo disegnato dei nuovi primers e ripetuto la RT-PCR, riuscendo così ad individuare due nuove isoforme con assenza dell'esone 7 (delta 7) o di entrambi gli esoni 7 ed 8 (delta 7-8). L'isoforma più lunga (che include i 48 nucleotidi dell'esone 7-8) è sempre presente, ma il trascritto delta 7 è maggiormente rappresentato. L'analisi bioinformatica suggerisce che lo skipping dell'esone 7 determina la perdita senza frameshift di 35 aminoacidi dalla posizione 200 alla posizione 234 della proteina. Tali aminoacidi comprendono la seconda metà della terza alfa-elica e la prima metà della quarta alfa-elica del dominio BAR, probabilmente essenziali per la dimerizzazione di OPHN1 ed il suo funzionamento. Abbiamo quindi preparato dei costrutti contenenti i domini BAR e PH della proteina wild-type e delta 7 per esprimere in vitro la proteina e valutare l'effetto della mutazione con metodiche biochimiche.

Caratterizzazione molecolare del gene LDLR in pazienti ipercolesterolemici

C. Tarlarini¹, G. Mombelli², S. Marzo¹, C. Sirtori², L. Calabresi², S. Penco¹

¹S.S. *Genetica Medica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio - Ospedale Niguarda Ca' Granda - Milano*

²*Centro Universitario per le Dislipidemie Grossi Paoletti - Ospedale Niguarda Ca' Granda - Milano*

L'ipercolesterolemia familiare (FH) è una malattia autosomica dominante causata principalmente da alterazioni nel gene LDLR che codifica per il recettore delle LDL (low density lipoprotein).

Le alterazioni patologiche a livello della proteina riducono la funzionalità del recettore LDL che perde la capacità di rimuovere le particelle LDL, che si accumulano nel sangue. L'elevato livello di c-LDL determina la formazione di xantomi tendinei, xantelasmi, arco adiposo corneale ed inoltre accelera lo sviluppo dell'aterosclerosi a livello della parete delle arterie contribuendo ad aumentare il rischio di patologie coronariche.

La frequenza nella popolazione di soggetti eterozigoti è di 1/500, mentre gli omozigoti per questa patologia sono molto rari (< 1/1.000.000). E' molto importante l'identificazione e il trattamento dei pazienti affetti da FH con farmaci ipolipidemizzanti (statine) in modo da ridurre la mortalità dovuta ad eventi coronarici .

Il test genetico costituisce il gold standard della diagnostica nella FH in quanto consente una diagnosi inequivocabile di malattia. Il gene LDLR è localizzato sul cromosoma 19p13.2, è composto da 18 esoni e codifica per una proteina di 860 aminoacidi. Ad oggi sono state riportate più di 1000 mutazioni lungo tutto il gene LDLR. Il 65% di queste sono mutazioni missenso, il 24% sono piccoli riarrangiamenti(<100bp) e l'11% sono grandi riarrangiamenti (>100bp).

Presentiamo l'esperienza frutto della collaborazione tra il Centro Universitario per le Dislipidemie Grossi Paoletti e la S.S. di Genetica Medica all'interno dell'Ospedale Niguarda Ca' Granda di Milano. Ad oggi abbiamo identificato 27 differenti mutazioni nel gene LDLR patognomiche della malattia. Delle 25 mutazioni localizzate nelle regioni codificanti, 20 sono mutazioni puntiformi e 5 sono piccole delezioni/inserzioni. Sono state individuate anche 2 mutazioni a livello delle regioni di splicing dell'esone 11 e dell'esone 14.

UN CASO DI DISPLASIA CAMPOMELICA CON MUTAZIONE DE NOVO DEL GENE SOX9

C. Barone¹, G. Bartoloni², A.M. Baffico³, L. Indaco⁴, E. Pappalardo⁵, A. Cataliotti Del Grano⁴, M. Baldi³, C. Ettore⁴, I. Mura³, G. Ettore⁵, S. Bianca⁴

¹*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania - Scuola di Specializzazione in Genetica Medica Università degli Studi Messina - Catania*

²*Patologia Diagnostica Fetale Malformativa e Perinatale, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania*

³*Laboratorio di Genetica Umana - E.O.Ospedali Galliera Genova*

⁴*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania*

⁵*UOC Ostetricia e Ginecologia Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania*

Introduzione

La displasia campomelica (CD) è una displasia scheletrica, autosomica dominante a penetranza completa. Generalmente è sporadica de novo con rari casi di ricorrenza con mutazioni germinali. E' caratterizzata da incurvamento di femori e tibie, ipoplasia scapolare, torace stretto con 11 paia di coste, anomalie del cingolo pelvico e piedi torti. Altre caratteristiche sono macrocefalia, ipertelorismo, ponte nasale depresso, orecchie a basso impianto, palatoschisi e faccia appiattita, XY sex reversal. È causata da mutazioni della regione codificante di SOX9 e più raramente da altri riarrangiamenti cromosomici coinvolgenti SOX9. Considerando la gravità della patologia, diventa fondamentale la diagnosi prenatale ecografica che evidenzia la brevità delle ossa lunghe.

Caso clinico

La paziente 30enne, giungeva in consulenza alla 21a settimana di gestazione per riscontro ecografico prenatale di brevità ed incurvamento di femori e tibie e piede torto bilaterale. Il cariotipo fetale era 46,XX. La coppia decideva per l'IVG. L'autopsia fetale confermava le anomalie scheletriche con caratteristici spuntoni ossei nella parte mediana di entrambe le tibie evidenziando anche macrocefalia, ipertelorismo, ponte nasale depresso, microretrognatia, orecchie a basso impianto e faccia appiattita. L'Rx fetale evidenziava 11 paia di coste. Su DNA estratto da muscolo fetale si eseguiva analisi molecolare del gene SOX9 che evidenziava, nell'esone 1, la mutazione c.358C>T (p.Arg120Cys) allo stato eterozigote. Tale mutazione, de novo, non risulta ad oggi descritta in letteratura; tuttavia si ritiene che correli con la CD in quanto localizzata in un dominio funzionale importante per l'attività della proteina (DNA binding domain, HMG1/2 high mobility group box). Inoltre, nell'aminoacido adiacente, era stata precedentemente descritta una mutazione causa di CD.

Conclusioni

La corretta diagnosi di una displasia scheletrica in epoca prenatale, basandosi esclusivamente sui riscontri ecografici, risulta spesso complessa e, la conferma Rx, si ottiene generalmente solo dopo l'IVG o il parto. Nel nostro caso, la diagnosi molecolare di CD da mutazione de novo, ha permesso di offrire alla coppia un counseling corretto definendo un rischio di ricorrenza per CD dell'1%.

Expression of Tp53, Otx1 and Otx2 genes in normal retina and in retina affected by proliferative vitreoretinopathy.

I.S. Pagani¹, C. Pirrone², D. Pigni², S. Donati³, D. Borroni³, F. Pasquali², F. Lo Curto², C. Azzolini³, G. Porta²

¹*Dip. Medicina Sperimentale e Chirurgia, Università Tor Vergata, Roma*

²*Dip. Medicina Clinica e Sperimentale, Università dell'Insubria, Varese*

³*Clinica Oculistica, Dip. Scienze Morfologiche e Chirurgiche, Università dell'Insubria, Varese*

Adult mammalian retina has some degree of regenerative potential. The properties of stem cells (SCs) to differentiate or to self-renewal depend to their ability to make asymmetric or symmetric division under control of regulatory genes. The p53 protein plays an important role in the regulation of division polarity of SCs, playing developmental and differentiation functions. This protein induces cellular differentiation regulating division in stem cells, leading to asymmetric division, while its loss of function leads to the symmetric division, resulting in cellular growth. Otx1 and Otx2 homeobox genes are involved in the eye development, driving multipotent SCs and progenitor cells towards the differentiation of specific cells in retina. The aim of our study was to determine the genetic pathway in normal retina mouse, healthy human adult retina and in retina affected by proliferative vitreoretinopathy (PVR), evaluating expression levels of Otx1, Otx2 and Tp53 genes, through quantitative Real-time reverse transcriptase PCR analysis and immunohistochemistry. Moreover, we analysed Otx1, Otx2 and Tp53 gene expression levels in MIO-m1 spontaneous immortalized Muller cells line, specialized radial glial cells involved in the maintenance of retina homeostasis. MIO-M1 cells exhibit extensive proliferation in vitro and are capable to differentiate into a variety of retinal progenitors. We found in mouse retina and, for the first time, in human healthy retina expression of Otx1, Otx2 and Tp53 genes. The immunohistochemical analysis of human healthy retina showed the presence of Otx proteins in many layers of the retina, confirming the hypothesis of their role in acting as survival factor. We showed Otx2 over-expression, and Otx1-Tp53 down-regulation, in surgically removed retina of patients affected by proliferative vitreoretinopathy respect to normal adult retina. In retinas with PVR the high level of Otx2 expression suggests the role of this gene in proliferation of retina stem cells in order to have new cells in place of the death ones. Finally, we found the presence of Tp53-Otx1 pathway in MIO-m1 Muller cells but no expression of Otx2 gene. Those analysis could be very interesting in further studies aimed on novel therapies in retinal diseases.

Identificazione di una nuova delezione nel gene MGC4607 in una famiglia affetta da angiomi cavernosi cerebrali

M.S. Cigoli¹, E. Manfredini¹, P. Primignani¹, A. Zarabla³, A. La Camera², A. Marocchi¹, M. Cenzato², O. Mecarelli³, S. Penco¹

¹S.S. *Genetica Medica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano*

²S.C. *Neurochirurgia, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano*

³*Dipartimento di Neurologia e Psichiatria, Policlinico Umberto 1- UOC Neurofisiopatologia e Malattie Neuromuscolari SAPIENZA Università di Roma*

Gli Angiomi Cavernosi Cerebrali (CCM) sono lesioni vascolari caratterizzate da un'anomala dilatazione dei capillari. La loro prevalenza nella popolazione è stimata tra lo 0.1 e lo 0.5%.

La maggior parte di queste lesioni è localizzata all'interno del SNC, ma possono trovarsi anche a livello cutaneo, della retina, epatico e vertebrale. La sintomatologia degli Angiomi Cavernosi dipende sia dalla localizzazione che dalla grandezza delle lesioni: i sintomi più comuni sono attacchi epilettici, deficit neurologici ed emorragie. Gli Angiomi Cavernosi si presentano sia in forma sporadica che familiare. Quest'ultima ha una modalità di trasmissione autosomica dominante con penetranza incompleta ed espressività variabile.

Si definisce affetto un soggetto in cui la risonanza magnetica (RM) risulti positiva, anche in assenza di sintomatologia. Le forme familiari si differenziano dalle forme sporadiche per la presenza di angiomi multipli e/o per la presenza di almeno un familiare affetto.

Studi di linkage hanno evidenziato l'associazione con tre loci e successivamente l'identificazione dei tre geni causativi la malattia: KRIT1 sul cromosoma 7q (CCM1), MGC4607 sul cromosoma 7p (CCM2) e PDCD10 sul cromosoma 3q (CCM3). Descriviamo una famiglia giunta in consulenza genetica in seguito al riscontro in RM di angiomi cavernosi sintomatici. L'analisi molecolare nella probanda, ha evidenziato la presenza di una delezione nell'esone 4 del gene MGC4607. Il test molecolare è stato esteso anche ai familiari che ne hanno fatto richiesta. Questo caso sottolinea la necessità di effettuare un lavoro integrato tra figure professionali con competenze diverse, per poter elaborare un valido percorso di assistenza clinica ed una corretta comunicazione delle possibili anomalie genetiche e delle loro implicazioni.

Tp53 family and Otx homeobox gene expression in cancer.

I.S. Pagani¹, C. Pirrone², D. Pigni², F. De Stefano³, A. Marando³, A.M. Chiaravalli³, C. Capella³, F. Pasquali², F. Lo Curto², G. Porta²

¹*Dip. Medicina Sperimentale e Chirurgia, Università Tor Vergata, Roma*

²*Dip. Medicina Clinica e Sperimentale, Università dell'Insubria, Varese*

³*Anatomia ed Istologia Patologica, Ospedale di Circolo, Varese*

Normal development and cancer share many properties: both processes involve alterations in cell proliferation and differentiation, cell death, neovascularization, cell motility and invasion. Thus, genes involved in normal development are also frequently associated with neoplasia (1). Otx genes are differentially expressed in proliferating cells in embryo and in adult tissues, and are over-expressed in tumors (2). Otx1 and Otx2 genes are involved in medulloblastoma pathology in which their expression correlates with clinicopathologic classification (3). Otx2 is expressed in retinoblastoma tumors (2) and Otx1 is over-expressed in the nodular/desmoplastic sub-type of medulloblastoma and in B-cell Non-Hodgkin Lymphoma(NHL) (4). Tp53 family members are involved in different types of tumors. While p53 is frequently mutated during tumorigenesis (in over 50% of human tumors), p63 and p73 are rarely mutated. p63 locus is amplified in squamous cell carcinomas and p73 is over-expressed in many tumor types including breast (5). The classic histopathological differentiation grade of a tumor remains one of the most important prognostic factors to predict patient survival and tumor markers have assumed an increasingly significant role in the detection, diagnosis, treatment, and monitoring of some types of cancer. In our study, we analyzed a large series of human neoplastic and non-neoplastic tissues collected from different parts of the body: head and neck, skin and respiratory, gastrointestinal and urinary tract by quantitative Real Time-PCR technique and immunohistochemistry in order to define tissue distribution of Otx1, Otx2 and Tp53 family, their role in tumor differentiation and possible use as tumor markers. Otx genes resulted to be prevalently expressed in some types of nose, salivary gland and skin tumors.

(1) Coletta RD et al *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* (2004) 9: 39-53.

(2) Glubrecht DD et al *Journal of Neurochem.* (2009) 111(1):250-63.

(3) De Haas T et al *Journal of neuropathology and experimental neurology* (2006) 65: 176-186.

(4) Omodei D et al *American J Pathol* (2009) 175: 2609-2617.

(5) Chee-Onn Leong *Review p53, p63 and p73 Network in Breast Cancers.*

Caratterizzazione molecolare del gene ETFDH in una paziente con Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency (MADD)

F. Avemaria¹, I. Sartori², L. Tassi², M. Cossu², M.C. Patrosso¹, A. Marocchi¹, S. Penco¹

¹S.S. *Genetica Medica, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Ospedale Niguarda Cà Granda, Milano*

²*Centro Chirurgia Epilessia "Claudio Munari", Dipartimento di Neuroscienze, Ospedale Niguarda Cà Granda, Milano*

La Multiple Acyl-CoA Dehydrogenase Deficiency (MADD), conosciuta anche come Acidemia Glutarica di tipo II, è una malattia a trasmissione autosomica recessiva del metabolismo degli acidi grassi e degli aminoacidi.

MADD può essere classificata sulla base dell'età di insorgenza dei sintomi in diverse forme: neonatale (tipo I e II con o senza anomalie congenite) o ad insorgenza adulta con un fenotipo clinico più lieve (tipo III).

La sintomatologia è caratterizzata da cisti multiple al fegato, ipoglicemia, acidosi metabolica ed aciduria organica soprattutto durante le crisi di stress metabolico.

Mutazioni nelle subunità α o β (ETFA e ETFB) del gene ETF (electron transfer flavoprotein), o nel gene ETFDH (electron transfer flavoprotein dehydrogenase) sono responsabili dell'insorgenza di questa patologia.

Alcuni pazienti (RR-MADD) con mutazioni nel gene ETFDH, rispondono positivamente al trattamento terapeutico con riboflavina.

Descriviamo il caso di una paziente con esordio a 17 anni con LSM (Lipid Storage Myopathy), un basso livello di carnitina e con un quadro biochimico e istochimico in accordo con diagnosi di MADD, ma con un fenotipo clinico atipico e più complesso: perdita della vista, debolezza muscolare, atassia cerebellare, epilessia, deficit para e ortosimpatico e riduzione delle funzioni cognitive. La paziente trattata con riboflavina ha migliorato le sue condizioni cliniche, neurofisiologiche e biochimiche.

L'analisi del gene ETFDH effettuata sulla probanda ha portato all'identificazione di una mutazione in eterozigosi nell'esone 6 e di un SNP in omozigosi nell'esone 3, che non sono sufficienti a spiegare la patologia. Si potrebbe ipotizzare che essa sia causata dalla presenza di mutazioni negli altri 2 geni, ETFA e ETFB, o in regioni del promotore o introniche distanti dal sito di splicing o verosimilmente a qualche altro difetto genetico sconosciuto.

Il nostro caso mostra che non tutti i casi di RR-MADD sono dovuti a mutazioni in ETFDH, ma che il trattamento con riboflavina può comunque dimostrarsi efficace. Inoltre, una diagnosi precoce è importante per raggiungere una migliore risposta al trattamento.

Metabolic effects of TiO₂ nanoparticles, a common component of sunscreens and cosmetics, in a human keratinocyte cell line.

G. Porta¹, P. Tucci², I. Iavicoli³, I.S. Pagani⁵, M. Agostini⁴, A. Rufini⁴, A.E. Willis⁴, G. Melino⁴

¹*Dip. Medicina Clinica e Sperimentale, Università dell'Insubria, Varese*

²*Università della Calabria/Toxicology Unit, MRC, Leicester, UK*

³*Roma*

⁴*Toxicology Unit, MRC, Leicester, UK*

⁵*Dip. Medicina Sperimentale e Chirurgia, Università Tor Vergata, Roma*

As the applications of industrial nanoparticles are being developed, the concerns on their potential risks to human health are increasing. Oxidative stress is known to play important roles in engineered nanomaterial-induced cellular toxicity. However, the proteins and the metabolic pathways involved in the nanoparticles-mediated oxidative stress and toxicity are largely unknown. To identify these pathways, a metabolomics study was conducted using a cultured human keratinocyte cell line, HaCaT, treated with titanium dioxide nanoparticles at different concentrations (5, 50 and 100 µg/ml). Utilizing Mass Spectrometry, we identified several biochemical pathways that were altered and we found that the main substrates included some key proteins involved in cellular stress response. In addition, uptake of the nanoparticles into the cultured cells was observed and titanium dioxide nanoparticles seemed to penetrate into the cytoplasm and locate in the peri-region of the nucleus as aggregated particles, which may induce direct interactions between the particles and cellular molecules, to cause adverse biological responses.

Identificazione di pazienti affetti da Sindrome di Lynch tra soggetti con diagnosi di CRC in giovane età: esperienza nella Regione Puglia

P. Lastella¹, M. Patruno², D. Varvara², D. Loconte², S. Rizzi⁴, L. Vincenti⁵, C. Di Gregorio³, C. Sabbà¹, N. Resta², A. Stella²

¹*Centro Sovraziendale per le Malattie Rare, AOU Consorziiale Policlinico di Bari, Bari*

²*UOC Laboratorio di Genetica Medica, AOU Consorziiale Policlinico di Bari, Bari*

³*Dipartimento ad attività integrata di Laboratori, Anatomia Patologica e Medicina Legale, Sezione di Anatomia Patologica, AOU Policlinico di Modena, Modena*

⁴*UOC Gastroenterologia Ospedaliera, AOU Consorziiale Policlinico di Bari, Bari*

⁵*UOC Chirurgia Generale "C. Righetti", AOU Consorziiale Policlinico di Bari, Bari*

Questo studio si propone di stabilire se un approccio basato su consulenza genetica, analisi MSI e IHC, indirizzato ad ogni soggetto con diagnosi di CRC ≤50 anni, permetta di individuare pazienti affetti da Sindrome di Lynch (LS) con sufficiente sensibilità e specificità. Si è inoltre valutata l'efficacia di un protocollo di sorveglianza nel ridurre il rischio di nuove neoplasie in pazienti già sintomatici e prevenire il rischio di un primo tumore negli asintomatici, al momento dell'analisi molecolare. Sono stati arruolati 56 probandi con diagnosi di CRC, nel periodo 2006-2011 e raccolte informazioni dettagliate sulla storia familiare per tre generazioni consecutive; in particolare, numero, tipo, sede dei tumori, età alla diagnosi e al decesso. 22/56 pazienti rispettavano i criteri di Amsterdam II (AC+), i restanti 34 sono stati arruolati esclusivamente in base all'età alla diagnosi. Per ogni paziente è stato raccolto un campione di sangue e tessuto tumorale. L'MSI è stata condotta mediante pentaplex-PCR ed analisi al sequenziatore automatico. 29/56 tumori sono stati classificati come MSI-H (22AC+/7AC-). L'analisi mutazionale, mediante DHPLC ed MPLA, è risultata conclusiva in tutti i 29 casi con MSI-H (23 in MLH1, 5 in MSH2, 1 MSH6). La consulenza post-test è stata effettuata per i 29 probandi e per le rispettive famiglie, e l'analisi molecolare estesa a 228 familiari di I grado, di cui 104 sono risultati portatori di mutazione (46%). 87/104 hanno accettato di sottoporsi ad adeguata sorveglianza strumentale. Alla prima valutazione, sono stati identificati 9 carcinomi e 29 lesioni preneoplastiche intestinali (di cui 4 erano adenomi con elevato grado di displasia). Circa il 3% di tutti CRC diagnosticati all'anno sono associati alla LS, sebbene non esista una prevalenza stimata della sindrome. La selezione dei pazienti Lynch basata sui soli criteri clinici ne potrebbe sottostimare la reale incidenza. Come dimostrato in questa casistica, il sospetto di LS andrebbe formulato anche solo in presenza di un CRC in giovane età e confermato da MSI ed IHC, come screening di primo livello. Un adeguato protocollo di sorveglianza multi-organo permette l'identificazione di lesioni pre-tumorali, evitando interventi demolitivi e terapie adiuvanti.

Chronic Myeloid Leukemia: molecular monitoring of residual disease by genomic DNA compared to conventional cytogenetic and mRNA analysis in follow-ups up to 8 years

I.S. Pagani¹, C. Pirrone², D. Pigni², O. Spinelli³, A. Bussini³, T. Intermesoli³, F. Pasquali², F. Lo Curto², A. Lanfranchi⁴, F. Porta⁴, A. Rambaldi³, G. Porta²

¹*Dip. Medicina Sperimentale e Chirurgia, Università Tor Vergata, Roma*

²*Dip. Medicina Clinica e Sperimentale, Università dell'Insubria, Varese*

³*USC Ematologia, Osp. Riuniti, Bergamo*

⁴*Dip. di Oncoematologia e Unità BMT, Spedali Civili, Brescia*

Chronic Myeloid Leukemia is a clonal myeloproliferative disorder characterized by the reciprocal translocation t(9;22)(q34;q11) that produces BCR-ABL1 fusion gene coding for a deregulated tyrosine-kinase with tumorigenic activity.

The first line therapy of CML is Imatinib mesylate which inhibits proliferation pathway of BCR-ABL1 protein but produces serious side effects (1). To evaluate the degree of response to therapy and to highlight the possible persistence of disease after treatment, patient should be monitored routinely (2). The gold standard for diagnosing CML is cytogenetic analysis, a direct not-sensitive method to detect Ph-positive cells. Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) based on mRNA is the most sensitive technique available for the detection of BCR-ABL1 transcripts and it is used to follow the progression of CML after initial diagnosis and treatment. However mRNA levels are not directly related to number of leukemic cells and the negative result is difficult to interpret, because undetectable levels of chimeric transcript can reflect either an effective elimination of leukemic cells, or the presence of a leukemic cell transcriptionally silent.

We developed a novel highly sensitive method to identify quiescent leukemic cells through quantitative real-time PCR (Q-PCR) based on the DNA (1).

We monitored eight CML patients in the early chronic phase and in follow-ups up to 8 years under Imatinib treatment. We carried out patient specific Q-PCR assays to monitor minimal residual disease, testing the same samples in parallel by cytogenetic analysis and by standard qRT-PCR.

In all positive samples for chimeric transcript we measured positive levels of corresponding genomic DNA. In 13% of samples, with undetectable levels of mRNA, we showed the persistence of quiescent leukemic cells with Q-PCR.

Finally we showed a patient with undetectable levels of both mRNA and DNA in three several consecutive follow-ups.

In conclusion the DNA genomic Q-PCR is a sensitive and direct technique to identify quiescent leukemic cells and possible candidates to stop imatinib therapy.

1- Mattarucchi E et al. Journal of Molecular Diagnostics (2009)

2- Goldman. Current Opinion in Hematology (2005)

Thank's to AIL Varese, Bergamo

Prevalence of Beckwith-Wiedemann syndrome in Piedmont

A. Mussa¹, S. Russo³, A. De Crescenzo⁷, N. Chiesa¹, C. Molinatto¹, A. Selicorni⁴, L. Richiardi⁵, L. Larizza⁶, M. Cirillo Silengo¹, A. Riccio⁷, G.B. Ferrero¹

¹*Department of Pediatrics, University of Torino, Torino, Italy*

²*Laboratory of Medical Cytogenetics and Molecular Genetics, Istituto Auxologico Italiano, Cusano Milanino, Italy.*

³*Department of Environmental Science, Second University of Naples, Caserta, Italy*

⁴*Ambulatorio di Genetica, Clinica Pediatrica, Università Milano Bicocca, A.O. S. Gerardo Fondazione MBBM, Monza*

⁵*Department of Medical Sciences, University of Turin, Italy*

⁶*Department of Health Science, University of Milan, Milan, Italy*

⁷*Institute of Genetics and Biophysics Buzzati-Traverso, CNR, Naples, Italy*

Background # Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS, OMIM #130650) is the most common genetic overgrowth disorder encompassing a wide range of features including macrosomia, abdominal wall defects, renal anomalies, macroglossia, nevus flammeus, ear anomalies, hemihyperplasia and cancer predisposition. Data on its epidemiology are scanty, and current estimates of its occurrence show wide variability. **Objective #** The aim of the study is to assess the prevalence of BWS syndrome in Piedmont, a region counting 4 432 571 residents according to 2009 data of the National Institute for Statistics (ISTAT) **Methods #** We included all patients diagnosed with BWS born in Piedmont from 1997 to 2009 through a search in the Italian Registry for Rare Diseases. This source was further validated with data from the Regional Clinical Genetics services network and survey in extra-regional Clinical Genetics centres, laboratories and BWS patients association. All cases were reviewed, the BWS diagnosis was clinically assessed and each patient was scored according to the clinical diagnostic criteria currently employed. The cohort was analysed by specific molecular tests, including a first step analysis of the methylation pattern at the two critical imprinted regions on the chromosome 11p15.5, subsequent microsatellite analysis for chromosome 11 paternal uniparental disomy (UPD), and CDKN1c gene sequencing. **Results #** The search located 46 clear-cut cases of BWS born across the 13-year period, providing a prevalence of 1:10 340 live birth (95% confidence interval 1:7 752#13 698 live births). Among the 40 patients who underwent molecular tests, 70.7% turned positive showing hypomethylation of the imprinting center (IC) 2 (n=12, 29.3%), paternal UPD 11, n=10, 24.4%), IC1 hypermethylation (n=6, 14.6%), CDKN1c mutation (n=1, 2.4%), whereas 29.3% had negative molecular test. **Conclusions #** We report the first estimate of BWS prevalence based on diagnostic criteria and molecular test. The reliability of this study is based on the large population studied for a reasonably long period of time. The approximate figure of 1:10 000 live births herein provided is the highest reported to date.

OFD1 REGULATES BROAD PARACRINE SIGNALING BY CONTEXT-SPECIFIC PROTEASOMAL DEGRADATION OF SIGNALING MEDIATORS

M. Morleo¹, Y. Liu², I.C. Tsai², E.C. Oh², C.C. Leitch³, F. Massa¹, B.H. Lee⁴, D.S. Parker², D. Finley⁴, N.A. Zaghoul³, N. Katsanis², B. Franco⁵

¹*Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Napoli*

²*Center for Human Disease Modeling, Duke University, Durham, USA*

³*Department of Medicine, Division of Endocrinology, Diabetes, and Nutrition, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, USA*

⁴*Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, USA*

⁵*Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Napoli, Dip. di Pediatria, Università Federico II, Napoli*

Primary cilia play important roles in paracrine signal transduction relevant to developmental and homeostatic processes. Dysfunction of these processes contributes to the phenotypes observed in ciliopathies including, among others, Oro-facio-digital type I (OFDI) and Bardet-Biedl (BBS) syndromes. OFDI is associated to mutations in the OFD1 transcript which codifies for a basal body/centrosomal protein which has been shown to be crucial for cilia formation. Our in silico analysis revealed that OFD1 is highly co-expressed with transcripts associated to the proteasome pathway, and with a subset of centrosomal-associated transcripts, including the BBS1 and BBS4 transcripts found to be mutated in BBS syndrome. Given that co-expressed genes may also be functionally related, we hypothesized that OFD1 and other centrosomal/basal body proteins (e.g. BBS1 and BBS4) could also have a proteasome dependent role and thus mediate protein degradation. Indeed we demonstrated that impairment of proteasomal degradation leads to accumulation of components of the Sonic Hedgehog (Shh) pathway in *Ofd1* deficient models. In addition, OFD1 depleted in vivo and in vitro models also display increased levels of components of the Notch, Wnt and NF- κ B signaling pathways. Interestingly, we observed an accumulation of Notch, Wnt and NF- κ B signaling mediators also in either BBS1 or BBS4 deficient models. Using a biochemical approach, we demonstrated that: a) loss of OFD1 and BBS4 perturbs the degradation of both ubiquitin-dependent and -independent proteasomal targets; b) BBS4 and OFD1 interact with proteasomal subunits and c) loss of these proteins leads to depletion of multiple regulatory subunits from the centrosomal proteasome. Consistently, we were able to ameliorate BBS and OFDI established Notch and Wnt signaling defects in vivo, either by overexpression of proteasome subunits or by treating mutants with the chemical proteasome agonist. Taken together, our data indicate that basal body-proteasome regulation is a common mechanism governing the regulation of paracrine signaling, and suggest that activation of the proteasome might be of clinical benefit to some ciliopathy patients.

LIPODISTROFIA FAMILIARE PARZIALE TIPO DUNNIGAN

C. Barone¹, S. Benedetti², A. Calogero³, M. Ferrari⁴, E. Mazzola¹, G. Trimarchi¹, T. Mattina¹

¹*Genetica Medica – Università di Catania Centro di Riferimento Regionale per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico- Vittorio Emanuele di Catania*

²*Diagnostica e Ricerca San Raffaele SpA, Milano*

³*Endocrinologia, Andrologia, Medicina Interna – Università di Catania - Dip Scienze mediche e pediatriche, A.O.U. Policlinico- Vittorio Emanuele di Catania*

⁴*Università Vita-Salute San Raffaele, Unità di Genomica per la Diagnostica delle Patologie Umane Centro di Genomica Traslazionale e Bioinformatica, Istituto Scientifico San Raffaele,*

Introduzione

La lipodistrofia familiare parziale tipo Dunnigan (OMIM 151660) appartiene al gruppo delle lipodistrofie parziali con insulino-resistenza ed è caratterizzata da progressiva perdita, in epoca postpuberale, del tessuto adiposo sottocutaneo negli arti, nel tronco e nell'addome. Si osserva un accumulo di grasso nel volto, nel collo e nelle regioni intra-addominali. Altre manifestazioni cliniche includono l'ipertrofia muscolare in particolare dei polpacci, acanthosis nigricans e, nelle donne, sindrome dell'ovaio policistico, con irsutismo ed irregolarità del ciclo mestruale. L'insulino-resistenza può portare al diabete e ad una grave ipertrigliceridemia con rischio elevato di pancreatite acuta, aterosclerosi precoce e steatosi epatica. Tale patologia è caratterizzata da alterazioni della lamina A e C, proteine nucleari codificate per splicing alternativo dal gene LMNA.

Caso clinico

Riportiamo il caso di una paziente, primogenita di genitori sani non consanguinei, giunta in consulenza all'età di 21 anni per la presenza di irregolarità del ciclo mestruale, epatomegalia con steatosi epatica diffusa, ipertrigliceridemia, ipertransaminasemia. L'esame obiettivo evidenziava acne, tessuto adiposo sottocutaneo scarsamente rappresentato a livello dell'addome e degli arti e accumulo di grasso nel volto e nel collo. Le analisi del cariotipo, del FRAXA e dei geni SRY, FGFR1, e KAL1 risultavano tutte nella norma. L'analisi della regione codificante e delle giunzioni esone-introne del gene LMNA ha evidenziato la variazione nucleotidica eterozigote c.1444C>T nell'esone 8, che causa la sostituzione aminoacidica p.Arg482Trp. Tale variante è stata precedentemente riportata in soggetti affetti da lipodistrofia.

Conclusioni

La diagnosi di lipodistrofia familiare parziale tipo Dunnigan, come nel caso della nostra paziente, impone una tempestiva presa in carico assistenziale clinica e terapeutica per monitoraggio e prevenzione del rischio cardiovascolare.

The homozygous mutation p.Phe110Leu of the cardiac Troponin T gene (TNNT2) can be associated with pure restrictive cardiomyopathy

N. Marziliano¹, F. Orsini², V. Motta², S. Veronese¹, C. Giannattasio³, P.A. Merlini³

¹*Unità Ricerche CLiniche-Cardiologia IV, AO Ospedale Niguarda Cà Granda*

²*Laboratorio di Patologia Molecolare, AO Ospedale Niguarda Cà Granda*

³*Cardiologia IV, AO Ospedale Niguarda Cà Granda*

Pure restrictive cardiomyopathy (RCM) is a very rare disease clinically characterized by impaired relaxation and left ventricular (LV) filling, dilation of both atria and absence of significant LV hypertrophy. This phenotype typically recurs in RCM caused by Desmin (DES; MIM *125660) gene defects and is further characterized by atrio-ventricular block (AVB) and intramyocyte desmin accumulation; in a certain proportion of patients, peripheral myopathy coexists. Pure RCM was also causally linked to Troponin I gene mutations (TNNT3; MIM+191044), which, however, more often cause HCM with or without restrictive LV filling.

Recently, two cases of pure RCM were associated with Troponin T gene mutations (TNNT2; MIM *191045), and one with alpha cardiac actin (ACTC1; MIM +102540) gene mutations.

A comprehensive collection of the mutations/polymorphism and related phenotypes of the TNNT2 gene is available at the cardiogenomics website. Of note, six mutations (p.Ile79Asn, p.Arg92Gln, p.Arg92Trp, p.Ala104Val, p.Asp160Glu and IVS15-1G>A) are associated with sudden death in the setting of hypertrophic cardiomyopathy (HCM). In addition to the mentioned codons 92, 94 and 278, the codon 110 can result in to different mutations namely F110L, F110I and F110V presenting controversial phenotypes according to different authors: thus the clinical characteristics and prognosis of patients with such mutations still are not known.

We here describe the clinical phenotype associated with the mutation p.Phe110Leu (F110L) of the TNNT2 gene within an Italian family in which the proband with pure RCM carried the above mutation in homozygous status.

A quantitative-PCR protocol rapidly detects aGAL deletions/duplications in patients with Anderson-Fabry disease

F. Orsini², V. Motta², P.A. Merlini³, C. Giannattasio³, S. Veronese², N. Marziliano¹

¹*Unità Ricerche Cliniche-Cardiologia IV, AO Ospedale Niguarda Cà Granda*

²*Laboratorio Patologia Molecolare, AO Ospedale Niguarda Cà Granda*

³*Cardiologia IV, AO Ospedale Niguarda Cà Granda*

The Anderson-Fabry disease (AFD, MIM #301500) is a rare form of X-linked (Xq22.1) glycosphingolipidosis due to a reduced/absent activity of the lysosomal enzyme-galactosidase A (GLA) with systemic involvement.

In about 3-5% of AFD cases is reported only the involvement of the myocardium leading to left ventricular hypertrophy [LVH]. After a multidisciplinary workup, the diagnosis of AFD can be readily made in male patients by measuring the GLA activity with enzymatic assays on peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and sera samples. However, this analysis can fail in case of mutations leading to a residual GLA activity. In addition, heterozygous female patients might show lower but normal ranges of GLA activity. Mutation analysis by sequencing the GLA gene is the golden standard to confirm the clinical diagnosis.

The GLA gene is made up of 7 exons for a total size of 12kb. A comprehensive list of reported mutations associated with AFD can be seen at: The Human Gene Mutation Database, National Center for Biotechnology Information Database and Cincinnati Children's Research Foundation Database). Moreover, alternative splicing due to mid-intronic mutations or intra-gene rearrangements leading to a deletions or duplications of single up to several exons have been described. Direct conventional sequencing might fail in identifying such mutations in heterozygous females because of the presence of the wild type GLA allele. By means of the MLPA technique (Multiple Ligation-dependent Probe Amplification) the detection rate of the GLA mutations has been improved.

In this report we evaluated the efficacy of the Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR) on a cohort of 100 female patients presenting with hypertrophic cardiomyopathy (HCM) with no classical sarcomeric mutations and additionally tested for the GLA gene with Sanger sequencing with negative results. By applying the qRT-PCR method, we eventually found two patients with a deletion respectively of the exon 6 and 7 of the GLA gene.

Clinical and bio-molecular characteristics of a Caucasian male with typical presentation of the Anderson-Fabry disease and carrier of p.His186Pro GLA gene variant: SNP or causative mutation?

V. Motta¹, F. Orsini¹, P.A. Merlini³, C. Giannattasio³, D. Ardissino⁴, F. Pigazzani⁴, F. Notarangelo⁴, N. Marziliano²

¹Laboratorio di Patologia Molecolare, AO Ospedale Niguarda Cà Granda

²Unità Ricerche Cliniche-Cardiologia IV, AO Ospedale Niguarda Cà Granda

³Cardiologia IV, AO Ospedale Niguarda Cà Granda

⁴AO-Universitaria di Parma

Anderson-Fabry Disease (AFD; OMIM 301500) is a rare X-linked lysosomal storage disease due to mutations in the GLA gene that result in deficiency of the enzyme α -galactosidase A, leading to progressive intracellular accumulation of glycosphingolipids thus presenting classically as a multiorgan disease.

In this study, we identified a novel GLA mutation (p.His186Pro) occurring at the codon position 186 that was previously reported in the Bantu population associated to a genetic change with no clinical relevance (p.His186Arg).

The proband is a 54-year-old Italian male patient admitted to hospital because of unexplained recurrent episodes of ventricular tachycardia. After clinical examination we found the typical AFD multiorgan involvement (hypertrophic cardiomyopathy, kidney failure, angiokeratoma, cornea verticillata and neurological signs) with family history suggestive for AFD. Although we could not assess a co-segregation analysis within the family since the affected first-degree relatives were died, the novel mutation was not detectable in 500 Caucasian healthy controls (1000 chromosomes). The residual α -GAL A activity was very low both in plasma and in leukocytes. In silico evaluations showed a high conservation of the codon 186 within mammals and upon modelling a predicted disruption of the alpha-helix domain harbouring the 186 amino acid residue.

Taken together, the combination of the proband clinical symptoms and molecular data strongly support the evidence that p.His186Pro is a novel pathogenic GLA gene mutation although the same codon with a different amino acid change (p.His186Arg) has been previously described in the SNP database in the Bantu population with non clinical signs of AFD.

NANOPARTICELLE DI TiO₂: VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI SUL DNA SPERMATICO

L. Rocco¹, I.V. Valentino¹, G. Acurzio¹, F. Cesaroni¹, V. Stingo¹

¹*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e Farmaceutiche (STABIF), Seconda Università di Napoli*

Il declino delle potenzialità riproduttive osservato nella popolazione mondiale maschile è stato più volte associato all'aumentata emissione nell'ambiente di sostanze inquinanti. Il rilascio di nanoparticelle (NP), da rifiuti industriali o dallo smaltimento di quelli di origine commerciale e di uso domestico, risulta elevato, dato l'aumento della loro produzione su scala mondiale. La nanoparticella biossido di titanio (TiO₂) si presenta come una polvere cristallina incolore, tendente al bianco, scarsamente solubile. Le piccole dimensioni sono una delle cause delle sue peculiari caratteristiche fisico-chimiche. Nello studio che presentiamo abbiamo evidenziato i danni al DNA in spermatozoi umani esposti in vitro a due concentrazioni differenti (10 e 1 mg/L) e per diversi tempi di esposizione (15', 30' e 45') della nanoparticella. Il liquido seminale è stato sottoposto prima a valutazione del numero e motilità delle cellule nemespermiiche e poi incubato con il TiO₂. La genotossicità è stata valutata mediante il Comet Test, il Diffusion Assay, la reazione TUNEL e la RAPD-PCR, quest'ultima utilizzata per calcolare la Stabilità Genomica del Templato (GTS,%). I primi tre test valutano l'integrità cromatinica e la frammentazione del DNA, mentre la RAPD-PCR considera il numero di polimorfismi (apparizione di bande e scomparsa di bande) presenti nei profili dei campioni trattati in relazione al numero totale di bande presenti nel profilo del controllo negativo. Cambiamenti in questi valori sono stati espressi come percentuale rispetto al controllo, posto pari al 100%. I risultati ottenuti da tutti i test hanno evidenziato una perdita dell'integrità del DNA spermatico già dopo 15'. Il danno risulta maggiore dopo esposizione alla concentrazione più elevata di TiO₂, e non è tempo dipendente. I risultati del nostro lavoro forniscono informazioni utili a valutare il potenziale genotossico di questo contaminante ambientale sul liquido seminale umano, arricchendo i dati in letteratura attualmente assenti e potrebbero essere considerati un ottimo punto di partenza per indagare sulle possibili malformazioni che altre classi di nanomateriali possono esercitare sull'integrità del DNA spermatico e di conseguenza sul tasso di infertilità.

MUTATIONAL SPECTRUM OF HEREDITARY HAEMORRHAGIC TELANGIECTASIA IN THE ITALIAN POPULATION

G.M. Lenato¹, P. Lastella¹, P. Suppressa¹, R. Bagnulo², A. Stella², R. Valerio¹, C. Sabbà¹, N. Resta²

¹*Centro Sovraziendale Malattie Rare, Unità di Geriatria, Policlinico, Università di Bari*

²*Unità di Genetica Medica, Policlinico, Università di Bari*

BACKGROUND: Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia (HHT), or Rendu-Osler-Weber syndrome, is a rare vascular dysplasia, with an autosomal-dominant inheritance pattern, affecting 1-2:10,000 individuals. The disease manifests itself with localized arterio-venous shunts affecting different organs (mainly nose, oral cavity, skin, lung, liver, brain, GI tract). Heterozygous germline mutations in Endoglin (ENG) or ALK1/ACVRL1 gene are known to be responsible for this disorder, ultimately resulting in the characteristic arterio-venous malformations. Numerous causative mutations have been described thus far, most of them being family-specific and distributed throughout the coding sequences of both genes. Disease severity shows incomplete penetrance and considerably variable expressivity. Furthermore, patients with germline mutations in SMAD4 gene are often affected by overlapping clinical features of both HHT and Juvenile Polyposis, a disorder known as JP-HHT Combined Syndrome.

AIM: To provide data regarding the mutational spectrum of ENG and ALK1/ACVRL1 gene in the Italian population and to correlate phenotypic manifestations with affected gene and mutation type.

METHODS: Patients were recruited by HHT Referral Centre of University Hospital of Bari. Mutational screening was performed by Denaturing High Performance Liquid Chromatography and Multiple Ligation-Dependent Probe Amplification.

RESULTS: One-hundred and seventy-five probands with certain HHT diagnosis and 566 familiars were recruited. A disease-causing mutation was identified in 152 probands (86.8%). A greater number of mutations was found in ALK1/ACVRL1 than in ENG gene, accounting for 54 (35.5%) versus 98% (64.5%), respectively, in keeping with all previous observations regarding Mediterranean countries. Among the 23 mutation-negative individuals, a SMAD4 mutation was found in two patients, both of them showing features of JP-HHT Combined Syndrome.

Most mutations in both genes were small changes, ranging from missense mutations and short in-frame deletion to truncating mutations, such as nonsense mutations, short frameshift mutations and splice site defects. Only four probands were found to carry a whole-exon deletion, namely two ENG probands, one ALK1/ACVRL1 probands, and one SMAD4 proband, respectively.

Sindrome di Loeys-Dietz associata a nuova mutazione in TGFBR2: descrizione di un'ampia famiglia con casi a lunga sopravvivenza

M. Valiante¹, S. Majore¹, A. Cortese², M. Ritelli³, S. Morlino¹, M. Colombi³, A. Morrone⁴, P. Grammatico¹

¹*U.O.C. Lab. di Genetica Medica, Dip. di Medicina Molecolare, Sapienza Università di Roma, A.O. San Camillo-Forlanini, Roma*

²*U.O.S. Diagnostica Centrale di Alta Tecnologia, A.O. San Camillo-Forlanini, Roma*

³*Sez. di Biologia e Genetica, Dip. di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università di Brescia*

⁴*Direzione Generale, A.O. San Camillo-Forlanini, Roma*

La sindrome di Loeys-Dietz (SLD) è una condizione mendeliana rara, di recente identificazione, associata a mutazioni in eterozigosi in 4 differenti geni (TGFBR1, TGFBR2, SMAD3, TGFB2). Si tratta di una patologia clinicamente eterogenea, non ancora caratterizzata in tutti i suoi aspetti. Il fenotipo della SLD comprende principalmente: coinvolgimento vascolare sistemico (tortuosità e aneurismi arteriosi), manifestazioni scheletriche (scoliosi, lassità articolare, aracnodattilia, piede torto), anomalie cranio-facciali (palatoschisi/ugola bifida, craniosinostosi, ipertelorismo), segni cutanei (cicatrici distrofiche, cute traslucida).

La malattia è stata suddivisa in SLD tipo I e SLD tipo II sulla base della presenza o meno di un coinvolgimento cranio-facciale. In realtà, lo spettro delle manifestazioni cliniche è molto ampio sia in ambito extra che intra-familiare.

Viene presentata una genealogia nella quale la SLD, associata ad una mutazione non precedentemente descritta nel gene TGFBR2, segrega in almeno tre generazioni. I pazienti sono stati valutati presso l'ambulatorio di Genetica Clinica della U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica della Università La Sapienza presso l'A.O. San Camillo-Forlanini di Roma. Il quadro clinico mostra estrema variabilità, esprimendosi nell'arco di un continuum fenotipico che varia da forme appena sfumate e a lunga sopravvivenza a condizioni molto gravi ad esordio precoce e morte improvvisa.

Una adeguata osservazione clinica, unita all'utilizzo di indagini di diagnostica per immagini e di test genetici mirati, può contribuire alla identificazione anche di quei soggetti affetti da SLD nei quali la spia di patologia è costituita da segni comuni e apparentemente casuali. Ciò risulta di fondamentale importanza per una corretta presa in carico del paziente.

Unraveling the role of the OFD1 protein in protein synthesis and mTOR pathway activation

D. Iaconis¹, M. Monti², P. Pucci², M. Pende³, B. Franco¹, B. Franco⁴

¹*The Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Napoli*

²*CEINGE, Biotechnologie Avanzate-Napoli and Dip. di Chimica Organica e Biochimica*

³*Inserm, U845, Paris, France and Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, UMRS-845, Paris, France*

⁴*Medical Genetics, Department of Pediatrics, Federico II University, Naples, Italy.*

The Oral-Facial-Digital type I syndrome is a rare syndromic form of inherited renal cystic disease caused by mutations in the OFD1 gene and belongs to the growing number of disorders ascribed to dysfunction of primary cilia. We generated a murine model by crossing the *Ofd1*^{fl} line with a transgenic line ubiquitously expressing a tamoxifen-inducible CreERTM protein. We induced *Ofd1* inactivation at P0 that resulted in viable mice characterized by renal cystic disease starting from P10. We demonstrate that primary cilia initially form and then disappear after the development of cysts, suggesting that the dysfunction of primary cilia is a consequence rather than the primary cause of renal cystic disease. Immunofluorescence and western blotting analysis revealed upregulation of the mTOR pathway in both dilated and non dilated renal structures. mTOR is involved in regulating protein synthesis. The use of both in vitro and in vivo systems allowed us to demonstrate that OFD1 has a role in the formation of the pre-initiation complex of translation (PIC). We showed that OFD1 colocalizes at the centrosome with PIC subunits. We also demonstrated that OFD1 is present in polysomes extracted from kidneys and physically interacts with subunits of the eIF3 complex. Microarray experiments performed on mRNA extracted from polysomes of mutant kidneys indicate impaired translation for a number of transcripts. All together our results shed light on the pathogenetic mechanisms underlying this rare inherited form of renal cystic disease and propose new possible link between renal cystic disease and deregulation of the mTOR pathway.

UN CASO DI TRISOMIA 12p IN DIAGNOSI CITOGENETICA PRENATALE

D. Costagliola¹, M. Ferrara ¹, F. Mottola ¹, A. Napolitano ¹, T. Suero¹, L. Rocco¹

¹*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Ambientali, Biologiche e Farmaceutiche (STABIF), Seconda Università di Napoli*

Le traslocazioni consistono nel trasferimento di materiale genetico tra due o più cromosomi diversi. Possono essere bilanciate, ovvero lo scambio non comporta perdita o aggiunta di materiale genetico, per cui i portatori non manifestano in genere alcun segno clinico, o non bilanciate nel caso in cui uno o più cromosomi hanno subito perdita o acquisizione di materiale genetico. Un soggetto portatore di una traslocazione bilanciata, pur essendo fenotipicamente normale, ha un rischio più elevato di procreare figli affetti da anomalie gravi a causa di un errato appaiamento dei cromosomi durante la meiosi. Presentiamo il caso di una paziente gravida di 36 anni pervenuta alla nostra osservazione a 17 settimane di gestazione per esame citogenetico prenatale su liquido amniotico, a rischio di generare prole affetta da patologia cromosomica da mal segregazione, in quanto portatrice di una traslocazione bilanciata tra il braccio corto del cromosoma 12 e il braccio lungo del cromosoma 21. La storia clinica della paziente include tre aborti spontanei e due interruzioni terapeutiche di gravidanza a causa dello sbilanciamento dell'assetto cromosomico, che è risultato in una trisomia 12p con evidenti malformazioni fetali. Anche l'esame citogenetico prenatale dell'attuale gravidanza, mediante tecnica di bandeggio GTG, ha mostrato la stessa alterazione del cariotipo delle precedenti gravidanze, con la presenza di un cromosoma derivativo da traslocazione sbilanciata (che coinvolge un cromosoma della coppia 12 e uno della coppia 21) e con un braccio corto del cromosoma 12 in sovrannumero. Il risultato dell'analisi del cariotipo fetale è dunque 46,XX,+12,der(12;21)(p10;q10)mat. La trisomia 12p è una patologia cromosomica estremamente rara, caratterizzata da dimorfismo cranio facciale caratteristico, ritardo di crescita post-natale, ipotonia neonatale, ritardo psicomotorio costante, di solito di grado medio-severo, mani corte e larghe e possono associarsi talora malformazioni cardiache e renali. Il rischio di un nuovo aborto dopo due episodi di aborto spontaneo è stimato intorno al 26% e dopo tre episodi sale al 30%. Ciò nonostante la possibilità che la paziente in esame possa generare un figlio, per giunta fenotipicamente normale, non è da escludere.

ASSOCIAZIONE TRA POLIMORFISMI DEL GENE RANK E LA NEUROARTROPATHIA DI CHARCOT: UNO STUDIO CASO-CONTROLLO

M. Pascente¹, D. Pitocco², G. Ghirlanda², G. Zelano¹

¹*Ist. Anatomia Umana e Biologia cellulare, Univ. Cattolica, Roma*

²*Ist. Diabetologia, Univ. Cattolica, Roma*

BACKGROUND

La neuroartropatia di Charcot è una disabilitante complicanza del diabete. La sua patogenesi è ancora sconosciuta. Un suo tratto clinico peculiare è dato dalla riduzione della densità minerale ossea a livello del piede, che sembrerebbe dovuta ad un continuo riassorbimento osseo determinato da una sbilanciata attività degli osteoclasti/osteoblasti. Nel mantenimento di questo equilibrio un ruolo fondamentale è svolto dal sistema costituito dal recettore attivatore di NF- κ B (RANK) e dal suo ligando (RANKL). Polimorfismi a carico di tali geni sono già stati coinvolti nella patogenesi dell'osteoporosi.

OBIETTIVI

Valutare il ruolo di RANK nel determinare la suscettibilità alla neuroartropatia di Charcot.

DISEGNO SPERIMENTALE E METODI

Uno studio caso controllo è stato condotto includendo 59 soggetti affetti da neuroartropatia di Charcot (gruppo Ch), 41 con neuropatia diabetica senza neuroartropatia di Charcot (gruppo ND) e 103 controlli sani al fine di valutare l'impatto di due polimorfismi di singolo nucleotide (SNPs) del gene RANK (rs8083511 and rs12956952) sul rischio di sviluppare la neuroartropatia di Charcot.

RESULTATI

Per quanto riguarda rs8083511, un'associazione statisticamente significativa è stata trovata tra l'allele C e la neuroartropatia di Charcot, così come un'associazione positiva con l'allele A di rs12956952, suggerendo un ruolo protettivo per gli alleli A e G. Ruolo confermato dall'analisi della frequenza del doppio omozigote AA + GG (5% in Ch) che risultò significativamente più bassa in Ch comparato con H (0.16 [0.05–0.4], P = 0.002) e con ND (0.17 [0.05–0.58], P = 0.006), mentre non ci furono differenze tra H e ND (1.12 [0.32–2.2], P = 0.396).

CONCLUSIONI

Questo è il primo studio che mostra un'associazione tra il gene RANK, coinvolto nella regolazione del rimodellamento osseo, e la neuroartropatia di Charcot. L'identificazione di fattori genetici che contribuiscono allo svilupparsi della neuroartropatia di Charcot può aiutarci a meglio comprendere la sua patogenesi ed a definire migliori strategie di prevenzione e trattamento, anche considerando che attualmente non è disponibile un terapia farmacologica in grado di arrestare il progredire della malattia.

Approcci farmacologici per tre patologie mitocondriali

M. Doimo¹, V. Pertegato¹, V. Giorgio², A. Casarin¹, C. Cerqua¹, F. Pierrel³, P. Bernardi², E. Trevisson¹, L. Salvati¹

¹*Dip. Salute Donna e Bambino, Univ. di Padova*

²*Dip. Scienze Biomediche, Univ. di Padova*

³*IRTSV/LCBM CEA Grenoble*

La terapia delle malattie genetiche ed in particolare delle malattie mitocondriali è tuttora problematica. Tuttavia, in questi ultimi anni sono stati sviluppati diversi approcci farmacologici che, con diverse modalità di azione, hanno ottenuto importanti risultati. In generale il vantaggio di questo tipo di approccio è che ha costi notevolmente inferiori rispetto alla terapia genica o alle cellule staminali (che peraltro finora non hanno fornito risultati eclatanti) e spesso possono essere utilizzati farmaci o sostanze già in commercio.

In questo lavoro presentiamo i dati ottenuti in modelli cellulari di tre diverse patologie mitocondriali: la sdr. NARP/MILS, l'atrofia girata della retina e della coroide (GA), ed una forma particolare di deficit di Coenzima Q causato da mutazioni nel gene COQ6.

Abbiamo dimostrato che il trattamento con benzafibrato, un farmaco comunemente usato nelle iperlipidemie, è in grado di ripristinare la respirazione cellulare, il potenziale di membrana, i livelli di ATP cellulare, ed in generale il metabolismo aerobio, in cellule di 3 pazienti con la mutazione T8993G del gene per la subunità 6 dell'ATPasi codificato dal mtDNA (una delle più frequenti patologie mitocondriali). L'effetto del farmaco è specie/specifico (non funziona in cellule murine) e probabilmente è dovuto allo stimolo della sintesi delle subunità della catena respiratoria codificate dal mtDNA e non ad un aumento generalizzato della biogenesi mitocondiale come ipotizzato precedentemente.

A conferma di ciò, il benzafibrato non ha effetto sull'ornitina aminotransferasi (OAT), un enzima della matrice mitocondriale, mutato nella GA. In questo caso invece il trattamento con AICAR, un composto in grado di stimolare la biogenesi mitocondriale in toto, aumenta i livelli di OAT di 2-3 volte nelle cellule di pazienti GA con parziale attività residua.

Infine dimostriamo che l'acido vanillico, una sostanza comunemente utilizzata come aromatizzante, è in grado di bypassare il difetto enzimatico nella biosintesi di coenzima Q nel caso della maggior parte delle mutazioni del gene COQ identificati in pazienti. Pur essendo disponibile per questa patologia una terapia efficace, l'acido vanillico ha una biodisponibilità molto maggiore del CoQ10 attualmente utilizzato.

Characterization of novel Alu-mediated rearrangements in MSH2 gene associated with a Lynch syndrome phenotype

F. Duraturo¹, L. Raffaella¹, M. De Rosa¹, P. Izzo¹

¹*Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche Università di Napoli Federico II*

INTRODUCTION:

Mutations in the MLH1 and MSH2 genes are the most frequent cause of Lynch syndrome. The Lynch syndrome is an autosomal disease and it is the most common hereditary form of cancer accounting for 5%-10% of all colon cancers. In many populations, large genomic rearrangements account for approximately 10% of mutations in the MLH1 and MSH2 genes.

METHODS:

DNA diagnostics of large genomic rearrangements was based on Multiple Ligation dependent Probe Amplification (MLPA). Subsequent analyses of deletion and duplication breakpoints were performed using Real time PCR, long-range PCR, PCR, and DNA sequencing.

RESULTS:

In set of 63 unrelated Lynch patients, large genomic rearrangements were found in 3 probands. Two different types of rearrangements were detected, both are novel rearrangements, not described in literature so far. For the two rearrangements, we characterized their exact extent and breakpoint sequences.

CONCLUSIONS:

Sequence analysis of deletion and duplication breakpoints indicates that both rearrangements are ALU-sequences mediated. This study shows that large rearrangements contribute little to the burden of inherited predisposition to colon cancer in the southern Italian Lynch patients.

ASSOCIATION BETWEEN GENETIC VARIANTS AND A PROGNOSTIC MARKER IN MULTIPLE SCLEROSIS

N. Barizzone¹⁶, M.A. Leone¹⁷, F. Esposito⁴, A. Lucenti¹, H.F. Harbo¹⁸, A. Goris⁷, I. Kockum⁸, A. Bang Oturai⁹, E. Gulowsen Celius⁵, I. Mero¹⁸, B. Dubois⁷, T. Olsson⁸, T. Olsson⁸, H.B. S ndergaard⁹, D. Cusi¹⁰, S. Lupoli¹⁰, B.K. Andreassen¹¹, . the International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, the Wellcome Trust Case Control Consortium², K. Myhr¹², F. Guerini¹³, . the PROGEMUS Group¹⁴, . the PROGRESSO Group¹⁵, G. Comi¹⁹, F. Martinelli-Boneschi¹⁹, S. D'Alfonso¹⁶

¹SMS Centre, SCDU Neurology, AOU "Maggiore della Carità", Novara, Italy

²Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases IRCAD, University of Eastern Piedmont, Novara, Italy

³Department of Health Sciences, University of Eastern Piedmont, Novara, Italy

⁴Department of Neurology &, Scientific Institute San Raffaele, Italy Laboratory of Neurogenetics of complex disease, CNS Inflammatory Unit, Institute of Experimental Neurology, Scientific Institute San Raffaele, Milan, Italy

⁵Department of Neurology, Oslo University Hospital, Ullev l, Oslo, Norway

⁶Institute of Clinical Medicine, University of Oslo, Oslo, Norway

⁷Laboratory for Neuroimmunology, Section of Experimental Neurology, KU Leuven, 3000 Leuven, Leuven, Belgium

⁸Department of Clinical Neurosciences, Centre for Molecular Medicine CMM, Karolinska Institutet, Karolinska Hospital, Stockholm, Sweden

⁹Danish Multiple Sclerosis Center, section 6311 Copenhagen University Hospital, Rigshospitalet Copenhagen, Denmark

¹⁰Dept of Health Sciences, University of Milano, Milan, Italy

¹¹Department of Clinical Molecular Biology and Laboratory Sciences (EpiGen) and Department of Biostatistics, University of Oslo, Oslo

¹²The Norwegian multiple sclerosis registry and biobank, Department of Neurology, Haukeland University Hospital, Bergen, Norway, and the KG Jebsen Centre for MS-research, Department of Clinical Medicine, University of Bergen, Bergen, Norway

¹³Laboratorio di Medicina Molecolare e Biotecnologie Fondazione Don C. Gnocchi ONLUS I.R.C.C.S. S. Maria Nascente, Milan, Italy

¹⁴The other PROGEMUS (PROgnostic GENetic factors in MULTiple Sclerosis) Consortium members are: Paola Naldi (MS Centre, AOU "Maggiore della Carità", Novara), Daniela Galimberti, Roberto Bergamaschi (Fondazione "Istituto Neurologico C. Mondino" - IRCCS, Pavia), Elio Scarpini (Department of Neurological Sciences, Centro Dino Ferrari, University of Milan, Fondazione Ca` Granda, Ospedale Maggiore Policlinico, Milan/Milan), Antonella Sapiro (Orbassano), Domenico Caputo (Milan), Gabriella Rosso (Cuneo), Susanna Cordera (Aosta), Paola Cavalla (Turin), Donata Benedetti (Verona), and RRoberto Cavallo (Turin). Donata Benedetti (Verona), and Marco Salvetti (Centre for Experimental Neurological Therapies CENTERS Neurology and Department of Neurosciences, Mental Health and Sensory Organs, Sapienza University Roma, Italy" 23204,15,"The other PROGRESSO (Italian network of Primary Progressive Multiple Sclerosis) Consortium members are: Ruggero Capra (Brescia), Angelo Ghezzi (Gallarate), Pietro Annovazzi (Gallarate), and Gabriella Coniglio (Potenza), .Giuseppe Liberatore, Mariaemma Rodegher, Lucia Moiola, Bruno Colombo, Marta Radaelli, Paolo Rossi and Vittorio Martinelli (Department of Neurology, Scientific Institute San Raffaele, Milan, Italy)

¹⁶SMS Centre, SCDU Neurology, AOU "Maggiore della Carità", Novara, Italy, Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases IRCAD, University of Eastern Piedmont, Novara, Italy

¹⁷Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases IRCAD, University of Eastern Piedmont, Novara, Italy, Department of Health Sciences, University of Eastern Piedmont, Novara, Italy

¹⁸Department of Neurology, Oslo University Hospital, Ullev l, Oslo, Norway, Institute of Clinical Medicine, University of Oslo, Oslo, Norway

¹⁹Department of Neurology &, Scientific Institute San Raffaele, Italy Laboratory of Neurogenetics of complex disease, CNS Inflammatory Unit, Institute of Experimental Neurology, Scientific Institute San Raffaele, Milan, Italy, The other PROGRESSO (Italian network of Primary Progressive Multiple Sclerosis) Consortium members are: Ruggero Capra (Brescia), Angelo Ghezzi (Gallarate), Pietro Annovazzi (Gallarate), and Gabriella Coniglio (Potenza), .Giuseppe Liberatore, Mariaemma Rodegher, Lucia Moiola, Bruno Colombo, Marta Radaelli, Paolo Rossi and Vittorio Martinelli (Department of Neurology, Scientific Institute San Raffaele, Milan, Italy)

The presence of IgG oligoclonal bands (OCB) in the cerebrospinal fluid is a distinctive characteristic of Multiple Sclerosis (MS), found in 48-100% of patients in European populations. MS patients positive for OCB (OCB+) have a worse prognosis in comparison to OCB negative (OCB-). The presence of a genetic influence on the OCB phenotype is suggested by the association with HLA-DRB1*15 in several populations, with Odds Ratios (OR) for OCB+ vs OCB- ranging from 1.7 to 3.4. We aimed to explore the genetic differences between Italian MS patients with and without OCB.

We analysed 1177 Italian MS patients (1038 OCB +, 139 OCB-). The percentage of OCB+ patients (88%) in our sample was in the range of that found in Southern Europe and HLA DRB1*15 was confirmed to be associated with OCB+ (p=0.03 OR=1.6; 95%CL=1.1-2.4). In a subset of these patients (818 OCB+, 107 OCB-) we tested also the association of 52 non-HLA SNPs, previously associated with MS susceptibility (IMSGC-WTCCC2 Nature 2011), both as a single marker and as a combination using a weighted Genetic Risk Score (wGRS). Even though none of the single 52 non-HLA MS susceptibility loci was associated with OCB status, the wGRS mean was significantly (p=0.0008) higher in OCB+ (7.67) than in OCB- (7.41) patients even after removing DRB1*15 (p=0.009), indicating that the combination of the different MS susceptibility factors could have an influence also on the development of OCB+ phenotype. Finally, we used a subset of these patients as a discovery sample to perform a GWAS with OCB status in the Italian population. This sample set included 562 (513 OCB+, 49 OCB-) patients from two Italian consortia (PROGEMUS and PROGRESSO), a subset of the IMSGC-WTCCC2 GWAS. Replication of the Italian best signals was performed in silico using data from the previously published GWAS

from independent populations from Scandinavia (1367 OCB+, 161 OCB-) and Belgium (317 OCB+, 39 OCB-). After the meta-analysis, the strongest signal was a SNP on 6q ($p=9.4 \times 10^{-7}$) outside the HLA region (65 Mb), at 300kb to C6orf167/MMS22L, a gene involved in the regulation of genome stability and DNA repair. In conclusion, our data support the hypothesis that HLA genes and possibly other non-HLA genes predispose to the development of OCB in MS patients.

COMPOUND HETEROZYGOSITY OF THE NOVEL -186C>T MUTATION IN THE COL7A1 PROMOTER AND THE RECURRENT C.497INSA MUTATION LEADS TO GENERALISED DYSTROPHIC EPIDERMOLYSIS BULLOSA

S. Quinzani¹, M. Ritelli¹, N. Chiarelli¹, C. Dordoni¹, M. Venturini², P. Calzavara-Pinton², M. Colombi¹

¹*Division of Biology and Genetics, Dep. of Biomedical Sciences and Biotechnology, Medical Faculty, University of Brescia, Brescia, Italy*

²*Dep. of Dermatology, University Hospital Spedali Civili, Brescia, Italy*

Dystrophic epidermolysis bullosa (DEB) is a rare genodermatosis characterised by trauma-induced blister formation beneath the lamina densa in the papillary dermis. Other clinical findings include atrophic scarring, milia formation, fusion of digits, nail dystrophy and contractures. DEB comprises 13 variants with different mucocutaneous involvement. All variants result from either dominant or recessive (RDEB) mutations in the COL7A1 gene, which encodes type VII collagen (COLVII). COLVII is the major component of anchoring fibrils (AFs), which ensure dermal–epidermal junction (DEJ). To date, 636 distinct mutations throughout this gene have been reported, and general genotype–phenotype correlations have been defined.

We report an Italian RDEB patient (generalised subtype) with a mild phenotype who is compound heterozygous for a novel -186C>T mutation in the COL7A1 promoter and the recurrent c.497insA mutation. On examination he presented with haemorrhagic blisters, atrophic scars on trauma exposed sites, nail loss, bilateral pseudosyndactyly of the hands, mild dysphagia of solid food, and gastro-oesophageal reflux without oesophageal stenosis. Microscopic examination of uninvolved skin revealed that AFs were poorly developed in the DEJ and IF with the anti-COLVII LH7:2 antibody showed slightly reduced and patchy staining. The -186C>T mutation is the second in the COL7A1 promoter reported to date; the first was the -187C>T identified in heterozygosity in a patient with severe generalised RDEB phenotype. Both mutations are in the same consensus sequence for the Sp1 transcription factor, but they have different effects on COL7A1 transcription: the -187C>T completely abrogates the transcription of the mutated allele, whereas the -186C>T leads to a reduction of the transcription. The mild patient's phenotype is therefore explained by the remaining mRNA from the mutated allele, that allows the production of sufficient amount of protein to prevent severe RDEB but not sufficient to escape DEB. This work underlines that COL7A1 promoter mutation are very rare, but this region should be investigated in RDEB patients with only a heterozygous mutation identified.

FISH HER2 E MEDICINA PERSONALIZZATA

E. Sala¹, F. Saccheri¹, F. Crosti¹, N. Villa¹, E. Gautiero¹, A. Brenna², L. Dalprà¹

¹*U.S. di Genetica Medica, Osp. San Gerardo, Monza*

²*U.O. di Anatomia Patologica, Citologia, Genetica Medica, Osp. San Gerardo, Monza*

L'amplificazione e sovraespressione di HER2/neu si verifica in circa il 25-30% dei tumori mammari e sono associate ad una scarsa prognosi. Farmaci diretti contro HER2 sono efficaci in pazienti con neoplasia HER2 positiva, sia attraverso immunocistochimica (score 3+) sia per amplificazione genica. La sovraespressione della proteina her2 predice la risposta a regimi terapeutici che contengono antracicline o taxani. Esistono casi per i quali lo status di HER2 non risulta chiaramente determinabile e pertanto sono necessarie indicazioni per interpretare il più correttamente possibile il livello di amplificazione, al fine di operare adeguate scelte terapeutiche. In seguito alla definizione di eterogeneità tumorale da parte del College of American Pathologists, una nuova visione interpretativa ha iniziato a farsi strada tra gli operatori. Starczynski et al. (2012) pubblicano un'ampia raccolta di diverse situazioni che rendono variegato il panorama legato alla deregolazione di HER2 nella neoplasia mammaria. Una rivisitazione della nostra casistica ha permesso di ritrovare anche eventi non documentati, che riteniamo necessitano di attenta valutazione. Nel nostro laboratorio sono stati analizzati, mediante FISH per HER2, 489 casi di neoplasia mammaria, 10 con HIC negativa (2,0%), 17 con score 1+ (3,5%), 399 con score 2+ (81,6%), 36 con score 3+ (7,4%) e 27 con determinazione non nota (5,5%). In un solo caso si è avuto fallimento (0,2%). In tutti i gruppi è stata osservata amplificazione di HER2 anche se in percentuali differenti. Il ritrovamento più frequente è rappresentato dalla presenza di polisomia 17, ma anche la monosomia, confinata alla popolazione cellulare amplificata oppure presente generalmente nel campione, risulta numericamente importante. Eventi rari sono rappresentati dalla coamplificazione del centromero 17 e di HER2 così come la perdita del gene, che determina un rapporto gene/centromero <1,0. E' possibile che queste diverse caratteristiche biologiche delle neoplasie relativamente a HER2 si traducano in altrettante discrete categorie di pazienti che beneficiano di regimi farmacologici differenti. Un attento follow-up potrebbe stabilire quante e quali di queste caratteristiche rivestano un ruolo importante dal punto di vista sia prognostico che terapeutico.

APPLICAZIONE DELLA FISH NELLA DIAGNOSTICA DEL RIARRANGIAMENTO EML4-ALK

E. Sala¹, F. Saccheri¹, N. Villa¹, F. Crosti¹, R. Solano¹, V. Lucchini², L. Dalprà¹

¹*U.S. di Genetica Medica, Osp. San Gerardo, Monza*

²*U.O. di Anatomia Patologica, Citologia, Genetica Medica, Osp. San Gerardo, Monza*

La proteina ALK (anaplastic lymphoma kinase) è una chinasi transmembrana che ha assunto un ruolo in neoplasie diverse dal linfoma anaplastico e di recente è stato proposto il termine "ALKoma" per radunare le neoplasie che presentano alterazioni di ALK. Circa il 3-7% dei pazienti che presentano carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) presentano proteina di fusione EML4-ALK. I pazienti con gene di fusione EML4-ALK presentano caratteristiche particolari: generalmente non sono fumatori, presentano esordio in giovane età e non appartengono a gruppi etnici particolari, come osservato per es. in associazione con mutazioni EGFR. Recentemente il farmaco crizotinib, un inibitore dell'attività tirosin chinasi di ALK, è arruolato come farmaco in trials di fase III e sembra indurre un'importante risposta clinica in pazienti con riarrangiamento EML4-ALK. Dall'inizio del 2012 nel nostro laboratorio sono stati analizzati 46 campioni, 28 soggetti di sesso maschile e 18 soggetti di sesso femminile per gene chimerico EML4-ALK mediante FISH dual color con sonda ALK/EML4 t(2;2); inv(2) fusion probe (ditta Kreatech). La diagnosi istologica era di adenocarcinoma polmonare in 20 casi (43.8%), 15 metastasi (32.6%), 4 con differenziazione mucinosa (8.7%), 3 con aspetti papillari (6.5%) e 4 casi con diagnosi varia (8.7%). Il 15.2% dei pazienti analizzati presenta riarrangiamento EML4-ALK con una percentuale di nuclei compresa tra il 12% e l'80%. L'80.4% dei pazienti mostra polisomia per i loci analizzati con nuclei che presentano da 3 a 8 segnali. Il 21.7% dei soggetti presenta perdita del locus EML4 in una percentuale di nuclei compresa tra il 13 e il 39. Per contro solo il 4.3% dei pazienti presenta corrispondente perdita del locus ALK con una percentuale di nuclei compresa tra 11 e 15. Un solo paziente positivo al riarrangiamento presenta contemporanea perdita del locus EML4 nel 17% dei nuclei indagati. Pur non rappresentando la tecnica di elezione per l'analisi del riarrangiamento EML4-ALK in campioni diversi dal tessuto paraffinato, riteniamo che la FISH rappresenti un valido approccio per selezionare i pazienti eleggibili all'uso del crizotinib, e per identificare eventualmente sottocategorie di soggetti che necessitano di terapie farmacologiche differenziate.

SINDROME DA MICRODUPLICAZIONE 22q11.2: TRE NUOVI CASI, DUE FAMILIARI ED UNO "DE NOVO"

P. Castelluccio¹, M.A. Pisanti¹, G. Fioretti¹, A. De Luca¹, M. Malacarne², C. Viaggi², M. Gentile³, A. Pansini³, A. Capalbo⁴, K. Frezza⁴, M.L. Cavaliere¹

¹U.O.C Genetica Medica, A.O.R.N. "A. Cardarelli", Napoli

²U.O.C. Laboratorio di Genetica, E. O. Ospedali Galliera, Genova

³U.O.C. Laboratorio Genetica Medica, A.S.L., Bari

⁴Laboratorio di Genetica Medica, Fondazione Casa Sollievo della Sofferenza, ICSS Mendel, Roma

La sindrome dup22q11.2 presenta segni clinici talora condivisi con la sindrome del22q11.2 (cardiopatie congenite, anomalie genitourinarie, insufficienza velofaringea e alcuni dimorfismi facciali), RSPM/RM, difficoltà di apprendimento/memorizzazione, iperattività, disturbo del linguaggio.

Caso I: ipertelorismo, rima antimongola, filtro alto, labbra sottili, micrognatia, padiglioni auricolari ampi, cardiopatia congenita, iposomia, scoliosi, brachidattilia con clinodattilia del V dito, ipoacusia neurosensoriale, calico-pielectasia destra, pene recurvatum, ipospadia, lieve RSPM, assenza di disturbi comportamentali. Nel sospetto di DGS (ipocalcemia neonatale) la FISH ha mostrato microdup 22q11.2 ereditata dalla madre, di 2,9 Mb, come da a-CGH.

Caso II: ipertelorismo, rima antimongola, naso insellato, filtro alto, micrognatia, iperaccrescimento, RSPM e disturbo autistico. L'a-CGH ha mostrato dup22q11.2 (3,3 Mb) de novo.

Caso III: macrocrania, anomalo attacco del capillizio, ipertelorismo, rime palpebrali ristrette lieve ptosi destra, columella appiattita, filtro alto, labbro superiore sottile, iperaccrescimento, RM lieve e notevole iperattività, ipoplasia corpo calloso. L'impianto anomalo del capillizio in madre, sorella e nonna materna, variamente associato a stipsi, l'iperattività in uno zio materno orientavano per sindrome FG. L'analisi di mutazione dei geni MED12-CASK-UBF3B è risultata negativa; mentre l'a-CGH ha mostrato dup22q11.2 atipica, di circa 252 Kb (gene TBX1 non incluso), di derivazione materna e dup8q22.1, di circa 142 Kb ereditata dal padre (macrocrania). Nel 90% dei casi di S. da del22q11.2 la del è circa 3Mb e include 40 geni compreso TBX1; nel 7-8% è 1,5 Mb; nel 2% è presente delezione atipica per ampiezza e posizione. Pertanto nei casi I e II risultano iperespressi gli stessi geni che in aploinsufficienza determinano fenotipo DGS. Nel caso III la microduplicazione atipica, che non include geni noti, è la più piccola in letteratura e la sua patogenicità potrebbe essere spiegata dalla compresenza della seconda CNV derivata dal padre, secondo il modello "second hit". I presenti casi confermano la variabilità del fenotipo e sottolineano la possibilità di iperaccrescimento (Courtenis 2008) e disturbo autistico.

ANALISI DEL DNA LIBERO FETALE NEL PLASMA MATERNO PER DETERMINARE SESSO E RhD FETALI

E. Picchiassi¹, F. Tarquini¹, M. Centra¹, L. Pennacchi¹, V. Bini², F. Galeone¹, G.C. Di Renzo¹, G. Coata¹

¹*S.C. Clinica Ostetrica e Ginecologica, Università di Perugia, Perugia*

²*Dip.di Medicina Interna, Università di Perugia, Perugia*

Dalla fine degli anni '90 ad oggi si è assistito ad una rivoluzione nella prospettiva della diagnosi prenatale, in quanto la scoperta del DNA libero fetale (fDNA) nel circolo periferico materno durante la gravidanza ha consentito lo sviluppo di test genetici non invasivi per la determinazione del sesso e genotipo RhD fetale.

In alcuni Paesi Europei, l'impiego di questi test innovativi è entrato nella routine clinica riducendo le procedure invasive nei casi di gravidanze a rischio di malattie legate al cromosoma X e l'immunoprofilassi nei casi di madri RhD negative con feto RhD negativo.

In questo lavoro portiamo l'esperienza del nostro laboratorio di Biochimica e Biologia Molecolare Prenatale nel fornire un approccio non invasivo per la determinazione del sesso fetale (Gender test) e del genotipo RhD fetale (RhD test).

I test Gender e RhD, sviluppati nel nostro laboratorio, sono stati eseguiti su 513 e 216 gestanti, rispettivamente a 10-16 settimane di gravidanza. Da ogni campione di sangue periferico è stato preparato il plasma e estratto il DNA, analizzato mediante real-time PCR utilizzando primer e sonde specifiche per la sequenza DYS14 del cromosoma Y, per le sequenze degli esoni RhD5 e RhD7 e per il gene di riferimento telomerasi.

Sesso e RhD fetali sono stati stabiliti usando criteri di interpretazione basati sul numero di replicati positivi e sulla concentrazione del fDNA; i risultati sono poi stati verificati con l'esito dell'amniocentesi o con l'accertamento del fenotipo dopo la nascita del bambino.

Il Gender test ha raggiunto un 100% di sensibilità e 96% di specificità mostrando un'eccellente performance e la possibilità di introdurlo nella routine diagnostica di tutte le gestanti al primo trimestre, come primo step diagnostico propedeutico alle successive analisi genetiche volte all'accertamento delle malattie X-linked e alle successive analisi ecografiche volte all'identificazione di patologie fetali caratterizzate da alterato sviluppo degli organi genitali.

L'RhD test ha dato risultati molto incoraggianti raggiungendo un 96% di sensibilità e 95% di specificità, suggerendo che è necessario implementare il test riducendo al minimo i risultati falsi negativi che potrebbero rappresentare il punto critico del test.

Rilevanza delle traslocazioni cromosomiche nella Leucemia Linfatica Cronica: la nostra esperienza.

C. Giudici¹, R. Lingeri¹, S. Macchi¹, D. Armenante¹

¹*U.O. Genetica, Az.Osp."S.Anna", Como*

La Leucemia Linfatica Cronica (LLC) è una delle malattie oncoematologiche maggiormente indagate in citogenetica, allo scopo di individuare nella popolazione affetta quei pazienti che svilupperanno una forma più aggressiva, a dispetto dell'andamento per lo più indolente della patologia, e di indirizzare la scelta terapeutica, essendo da tempo noto che la delezione 17p/p53 determina resistenza alla chemioterapia tradizionale basata su agenti alchilanti ed analoghi delle purine. Le Linee-guida internazionali per la diagnosi e il trattamento della LLC ed anche le ultime Linee-guida europee per la Citogenetica elaborate dall'E.C.A. (European Cytogenetists Association) riportano come indicata nella valutazione prognostica della LLC la sola FISH; ciononostante la citogenetica convenzionale è innegabilmente in grado di offrire un contributo prezioso ed insostituibile nella caratterizzazione biologica della malattia.

E' infatti ormai riconosciuto che la FISH (soprattutto se esclusivamente interfascica) con un limitato set di sonde mirate a regioni note per il loro coinvolgimento nella LLC non dà ragione della complessità e dell'eterogeneità dell'assetto cromosomico che spesso contraddistingue questi pazienti. In modo particolare non vengono identificate le traslocazioni, da alcuni anni a questa parte ritenute un forte fattore prognostico indipendente negativo.

Nel presente lavoro verrà presentata la nostra casistica, con particolare accento proprio sulla rilevanza del cariotipo convenzionale, ottenuto con successo prossimo al 100% anche da colture di sangue periferico, opportunamente stimulate. In accordo con i dati della letteratura, la presenza di traslocazioni cromosomiche è stata evidenziata nel 30% dei casi studiati (n=50).

Bibliografia:

- 1) Hallek M et al. Blood 2008;111:5446-56
- 2) Mayr C et al. Blood 2006;107:742-51.
- 3) Karakosta M et al. Cancer Genet Cytogenet 2010;198:66-70.
- 4) Krings Rocha C et al. Leuk Res 2011;35:e25.

IL DEFICIT DELLA UBIQUITINA LIGASI UBE3B È ASSOCIATO AD UNA SINDROME CON BLEFAROFIMOSI-RITARDO MENTALE A TRASMISSIONE AUTOSOMICA RECESSIVA

M.L. Dentici¹, L. Basel-Vanagaite², R. Ramirez-Solis³, A. Segref⁴, H. Thiele⁵, A. Edwards⁶, F.R. Lepri¹, P. Nürnberg⁵, C. Kubisch⁷, D.J. Adams³, G. Borck⁷, B. Dallapiccola¹

¹*Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Roma*

²*Raphael Recanati Genetics Institute, Rabin Medical Center, Petah Tikva, Israel*

³*Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK*

⁴*Institute for Genetics, University of Cologne, Germany*

⁵*Cologne Center for Genomics, University of Cologne, Germany*

⁶*Wellcome Trust Centre for Human Genetics, University of Oxford, UK*

⁷*Institute of Human Genetics, University of Ulm, Germany*

Le sindromi con blefarofimosi e ritardo mentale (BMRs) comprendono sottotipi clinicamente ed eziologicamente eterogenei. Nel 2011 abbiamo descritto una nuova forma di BMRs a trasmissione autosomica recessiva (AR) in una coppia fratello-sorella, caratterizzata da microcefalia, dismorfismi facciali (blefarofimosi, ptosi, rime palpebrali rivolte verso l'alto, telecanto, ipertelorismo, orecchie retrorotate con elice ripiegato, micrognazia), grave difficoltà di alimentazione, ritardo di crescita e psicomotorio. Abbiamo successivamente arruolato altri due pazienti appartenenti a 2 famiglie. I 4 pazienti condividevano i dismorfismi cranio-facciali caratteristici, anomalie ectodermiche (capelli sottili, sopracciglia rade e cute sottile) e grave difficoltà di alimentazione. Le tappe dello sviluppo psicomotorio erano significativamente ritardate ed il linguaggio era assente. Due pazienti presentavano bassi livelli di colesterolo, che si sono successivamente normalizzati. Numerose indagini metaboliche/genetiche, inclusi il dosaggio dei precursori del colesterolo e CGH-array ad alta risoluzione, erano negative. L'analisi esomica, eseguita su 2 pazienti non correlati, e la successiva analisi bioinformatica, ha identificato le mutazioni in omozigosi nel gene UBE3B. Questo gene è un paralogo di UBE3A, che codifica per una ubiquitina ligasi E3 le cui funzioni sono poco conosciute. Il meccanismo patogenetico è stato confermato attraverso l'analisi di sequenziamento diretto del gene che ha identificato le mutazioni negli altri due soggetti con BMRs. Tutte le mutazioni identificate producono una proteina tronca che abolisce l'attività della ligasi E3. Modelli murini e studi su *oxi-1*, l'ortologo di UBE3B in *Caenorhabditis elegans*, hanno convalidato il ruolo patogenetico di UBE3B nello sviluppo neuronale.

In conclusione, questo studio ha permesso di identificare nelle mutazioni omozigoti del gene UBE3B le basi molecolari di una rara forma di BMRs, a conferma del ruolo cruciale del processo di ubiquitinazione nello sviluppo e nella funzione neuronale.

46832 ANALISI CROMOSOMICHE SU VILLO CORIALE: ESISTE UNA CORRELAZIONE TRA CPM, TFM ED ETA' DELLA GESTANTE?

F. Malvestiti¹, E. Gaetani¹, C. Agrati¹, M.B. Grimi¹, J.C.P. Ferreira², S. Gross³, F.R. Grati¹, M. Federico¹, G. Simoni¹

¹*Toma Advanced Biomedical Assays, Busto Arsizio, Varese*

²*Maternal Fetal Unit of the Obstetrics and Gynecology department, Jacobi Medical Center, New York*

³*Maternal Fetal Unit of the Obstetrics and Gynecology department, Jacobi Medical Center, New York & Albert Einstein University, New York*

La villocentesi, come tecnica di diagnosi prenatale invasiva, viene eseguita nel primo trimestre di gravidanza, permettendo l'analisi del cariotipo fetale in epoca gestazionale precoce rispetto all'amniocentesi. Nel caso in cui venga riscontrata una discrepanza feto-placentare, occorre estendere l'analisi ad un prelievo di liquido amniotico: infatti nell'1-2% dei casi di villo coriale (CVS) si osserva un mosaicismismo cromosomico causato da un evento di non-disgiunzione postzigotico. In base alla distribuzione della linea cellulare anomala, tale mosaicismismo può risultare confinato alla placenta (CPM) o può coinvolgere l'embrione (TFM).

L'età materna rappresenta l'indicazione all'analisi citogenetica più frequente in corso di diagnosi prenatale, in quanto, come noto, il rischio empirico di incorrere in una aneuploidia fetale aumenta con l'età della gestante; infatti la relazione tra età ed anomalie cromosomiche numeriche non a mosaico viene attribuita a fenomeni di invecchiamento dell'oocita.

Molto scarsi sono invece i dati della letteratura internazionale relativi ad un'eventuale correlazione tra errori post-zigotici, in grado di generare un mosaicismismo cromosomico ed età materna; tuttavia nel lavoro di Simoni e Sirchia del 1994, sono riportati dati che avvalorano l'ipotesi di un aumento della frequenza dei mosaici cromosomici al CVS con l'aumentare dell'età.

Nel presente studio sono stati presi in considerazione 46832 casi di villo coriale consecutivi pervenuti presso il nostro laboratorio dal 2000 al 2010; sono stati riscontrati 650 casi di CPM e 87 di TFM. Tale casistica è stata suddivisa sulla base dell'età materna (< o = 30 anni, 31-35 anni, 36-40 anni, > 40 anni) al fine di verificare se esiste una differenza statisticamente significativa tra età della gestante e CPM/TFM. Inoltre, abbiamo valutato se vi è una correlazione tra l'età ed il tipo di tessuto coinvolto (citotrofoblasto e/o mesenchima).

CARATTERIZZAZIONE CROMOSOMA 1 AD ANELLO SOPRANNUMERARIO MEDIANTE ARRAY-CGH IN DIAGNOSI PRENATALE

E. Nalesso¹, S. Gomirato¹, K. Marchioro¹, R. Ciccirella², M. Petrella², M. Duca¹, L. Michelotto¹, G. Abatangelo¹, L. Cardarelli¹

¹Laboratorio Analisi Citotest - Consorzio GENiMED - Sarreola di Rubano (PD)

²ULSS12 Veneziana - Osp. SS. Giovanni e Paolo, Venezia

Lo scopo di questo studio consiste nella caratterizzazione di un piccolo marcatore soprannumerario mediante l'applicazione dell'array-CGH in diagnosi prenatale.

La gestante di 39aa, con due precedenti aborti spontanei, ha eseguito villocentesi alla 12sg per età. L'analisi ha evidenziato, nel 60% delle metafasi analizzate, una linea a 47 cromosomi con piccolo cromosoma marcatore, ad anello, di natura non definibile con le tecniche convenzionali. Il cariotipo parentale era normale. Il mosaicismo (40%) è stato confermato successivamente su liquido amniotico, l'anomalia coinvolgeva anche i tessuti fetali.

Sui villi si è proceduto contemporaneamente alla caratterizzazione molecolare mediante FISH e ad analisi array-CGH.

Per le analisi sono state utilizzate piattaforme ad oligo 180K (Agilent, software Agilent Cytogenomics). Per le FISH sono state utilizzate sonde alfoidi e painting (Cytocell).

Grazie agli array è stato possibile definire il cariotipo fetale, che è risultato: 47,XY,+mar.ish r(1)(wcp1+).arr 1p13.2p13.1(115,428,193-117,119,460)x3,1p12(118,104,974-120,520,278)x3,1p11.2? p11~q11(120,903,623-?121,322,318~142,617,943)x3[56] /46,XY[30]dn.

Il marcatore comprendeva tre segmenti del cromosoma 1, coinvolgenti delle sequenze eucromatiche oltre che la regione centromerica. La paziente, discussi in consulenza i risultati ottenuti, ha optato per l'ITG (18sg). L'esame macroscopico del feto non ha evidenziato anomalie maggiori.

Questo studio conferma l'abilità degli array nel chiarire/identificare anomalie cromosomiche che non possono essere comprese correttamente o rilevate mediante la routine di analisi citogenetica prenatale, permettendo la precisa identificazione delle regioni cromosomiche sbilanciate e dei geni in esse contenute con una miglior valutazione del rischio di anomalie congenite.

E' una tecnica estremamente utile che va comunque utilizzata con cautela dato il limite che presenta nell'interpretazione di eventuali CNV di dubbio significato prognostico. Inoltre, in particolare su villi coriali, la sua applicazione può essere complicata dalla presenza di mosaicismi confinati o di bassa entità.

CPM E TFM RICONTRATI IN 119 CASI DI VILLO CORIALE CON CORREDO A 46 CROMOSOMI ED ANOMALIE STRUTTURALI

C. Agrati¹, E. Gaetani¹, F. Malvestiti¹, M.B. Grimi¹, F.R. Grati¹, F. Maggi¹, G. Simoni¹

¹*Toma Advanced Biomedical Assays, Busto Arsizio, Varese*

Il mosaicismo cromosomico su villo coriale si riscontra nell'1-2% dei casi. Per definire il cariotipo fetale, in tali situazioni, è necessaria l'esecuzione di un' amniocentesi di conferma: la linea cellulare anomala, infatti, può rimanere confinata al solo tessuto placentare (CPM) o essere presente anche nel feto (TFM). La maggior parte dei CPM e TFM descritti in letteratura prendono in considerazione esclusivamente le aneuploidie, mentre, nel presente studio abbiamo valutato solo le anomalie strutturali apparentemente bilanciate o sbilanciate presenti in un corredo a 46 cromosomi o a 45 in caso di traslocazione robertsoniana. Riportiamo un totale di 119 casi estrapolati da una casistica di circa 50000 CVS consecutivi, eseguiti in un periodo di 10 anni. In tutti i casi è stata eseguita un' amniocentesi di conferma. La frequenza dei TFM nei cariotipi sbilanciati è risultata pari al 5%. Verranno descritte le anomalie strutturali bilanciate osservate, le frequenze dei diversi tipi di anomalie strutturali sbilanciate nei CPM e TFM, ed, inoltre, si confronteranno tali percentuali con quelle coinvolgenti le anomalie numeriche.

Novel and Recurrent EVC and EVC2 Mutations in Ellis-van Creveld syndrome and Weyers Acrofacial Dysostosis

M.C. D'Asdia¹, I. Torrente¹, F. Consoli¹, R. Ferese¹, M. Magliozzi¹, L. Bernardini¹, V. Guida¹, M.C. Digilio¹, B. Marino¹, B. Dallapiccola¹, A. De Luca¹

¹*Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy*

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

³*Bambino Gesù Children Hospital, IRCCS, Rome, Italy*

⁴*Division of Pediatric Cardiology, Department of Pediatrics, "Sapienza" University, Rome, Italy*

⁵*Eleonora Lorillard Spencer-Cenci Foundation, Rome, Italy*

Ellis van Creveld syndrome and Weyers acrofacial dysostosis are allelic disorders caused by mutations in EVC or EVC2 genes. We illustrate the results of direct analysis of whole EVC and EVC2 genes' coding regions in 32 unrelated families with clinical diagnosis of Ellis van Creveld syndrome and in 2 families with Weyers acrofacial dysostosis. We identified mutations in 27/32 (84%) cases with Ellis van Creveld syndrome and 2/2 cases with Weyers acrofacial dysostosis. Of the Ellis van Creveld syndrome cases, 20/27 (74%) had a mutation in EVC and 7/27 (26%) in EVC2 genes. The two subjects with Weyers acrofacial dysostosis had a heterozygous mutation in the last exon of EVC2. In total, we detected 25 independent EVC and 11 independent EVC2 mutations. Nineteen EVC mutations (19/25, 76%) and 4 EVC2 mutations (4/11, 36%) were novel. Also one EVC2 gene mutation found in Weyers acrofacial dysostosis was novel. In 5 unrelated cases with a clinical diagnosis of Ellis van Creveld syndrome, we did not find any mutation in either EVC or EVC2 genes. Current findings expand the Ellis van Creveld syndrome and Weyers acrofacial dysostosis mutation spectra, and provide further evidence that the last exon of EVC2 gene is a hot spot for Weyers acrofacial dysostosis mutations. Accordingly, EVC2 exon 22 should be analyzed with priority by mutation screening in individuals with a suspected diagnosis of Weyers acrofacial dysostosis. Maria Cecilia D'Asdia and Isabella Torrente contributed equally to this work.

Mutation analysis of CDK5 and CDK5R1 genes identifies novel CDK5R1 3'-UTR variants in patients with non-syndromic mental retardation

S. Moncini¹, P. Castronovo¹, A. Murgia², S. Russo³, M.F. Bedeschi⁴, A. Selicorni⁵, P. Riva¹, M. Venturin¹

¹*Dip. di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milano*

²*Dip. Salute della Donna e del Bambino, Università degli Studi di Padova, Padova*

³*Lab. di Citogenetica e Genetica Molecolare, Istituto Auxologico Italiano, Milano*

⁴*Fondazione IRCCS Ca' Granda, Osp. Maggiore Policlinico, Milano*

⁵*U.O.S Genetica, Clinica Pediatrica, Fondaz. Monza Brianza per il Bambino e la Mamma, Osp. San Gerardo, Univ. degli Studi Milano-Bicocca, Monza*

CDK5 and its activator p35, encoded by CDK5R1 gene, are highly expressed in the CNS where they have a fundamental role in neuronal migration and differentiation during CNS development. Their important role in CNS development and function, and their involvement in the pathogenesis of neurodegenerative disorders, make CDK5 and CDK5R1 two strong candidate genes for the onset of mental retardation. We carried out a mutation screening of CDK5 and CDK5R1 coding regions, as well as of CDK5R1 3'-UTR, on a cohort of 360 patients with non-syndromic mental retardation (NS-MR) using DHPLC and direct sequencing. We recently demonstrated that the 3'-UTR has a key role in the post-transcriptional regulation of CDK5R1 expression, through the binding of protein factors such as nELAV proteins and of microRNAs belonging to miR-15/107 family. This evidence prompted us to include this region in the mutational analysis. We found one silent mutation in CDK5, and three silent and two missense conservative mutations in CDK5R1 coding regions. Four novel variations in the intronic regions of CDK5 were also found but they were never predicted to cause any splicing defect. Interestingly, we found nine heterozygous variations in CDK5R1 3'-UTR: among these, six were single base substitutions and three were small deletions. None of these variations was present in 450 healthy controls. Of particular interest is the deletion of one predicted miR-15/107 family binding site, found in one patient. Luciferase constructs containing the mutations observed in CDK5R1 3'-UTR will be used to verify if these variations have an effect on CDK5R1 expression levels and therefore constitute susceptibility variants for NS-MR.

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE SIALIDASE PROTEIN FAMILY AND STUDY OF ITS GENETIC VARIABILITY IN HUMAN EXOMES: NEW INSIGHTS INTO ENZYME PROPERTIES AND IDENTIFICATION OF NEW PUTATIVE MUTANT ALLELES OF THE NEU1 DISEASE GENE

E. Giacomuzzi¹, R. Bresciani², V. Ravasio¹, R. Schauer³, E. Monti², G. Borsani¹

¹*Dip. Scienze Biomediche e Biotecnologie, sez. Biologia e Genetica, Università degli Studi di Brescia, viale Europa 11, 25123 Brescia, Italia*

²*Dip. Scienze Biomediche e Biotecnologie, sez. Biochimica e Chimica Clinica, Università degli Studi di Brescia, viale Europa 11, 25123 Brescia, Italia*

³*Institute of Biochemistry, Christian-Albrechts University, D-24098 Kiel, Germany*

Sialidases are glycohydrolases present from virus to mammals that remove sialic acid from oligosaccharide chains. Four different sialidase forms are known in vertebrates: the lysosomal NEU1, the cytosolic NEU2 and the membrane-associated NEU3-4. These enzymes modulate the cell sialic acid content and are involved in several cellular processes and pathological conditions. Molecular defects in NEU1 are responsible for sialidosis (MIM #256550), a Mendelian disease characterized by lysosomal storage disorder and neurodegeneration. Today more than 50 sialic acid variants are known and the gain/loss of specific sialoconjugates have been proposed as key events in the evolution of deuterostomes and *Homo sapiens*, as well as in the host-pathogen interactions. Using an *in silico* approach, we have reconstructed the evolution of the sialidase family in metazoan and identified and characterized sialidase orthologs from 21 different organisms. We also identified a new form of the enzyme, named NEU5, representing an intermediate step in the evolution leading to the modern NEU2-4 proteins. Our study provides new insights into the mechanisms that shaped the substrate specificity and other peculiar properties of mammalian sialidases.

Moreover, we decided to analyze the genetic variability of the four sialidases NEU1-4 within the human population, to identify variants that could play a role in modulating the enzymes activity and/or other cellular properties. This is of particular interest in the case of NEU1, since an impaired activity of this enzyme is causative of sialidosis and galactosialidosis. We used the large datasets available from 1000 Genome Project and NHLBI Exome Sequencing Project, which combines for a total of about 7500 individual exomes, to analyze sequence variants (SNVs) present in the four sialidase genes. We annotate these variants respect to their possible functional role and then focused on rare missense and loss-of-function variants present in NEU1 as possible causative mutations for sialidosis. This approach exploits the wealth of data generated by NGS projects for the discovery of new rare alleles associated with known mendelian diseases, and can be useful to facilitate the identification of the causative mutations in patients without a molecular diagnosis.

Immunodeficienza e agenesia del corpo calloso in una bimba con inv dup del(8p)

R. Calzone¹, I. Bernardo², D. De Brasi³, M. Colantuoni¹, C. Sepe¹, V. Altieri¹, G. Peperna¹, L. Falco², A. Zatterale¹

¹*U.O.C. di Genetica – P.S. “Elena d’Aosta” – ASL Napoli 1 Centro*

²*TIN - AORN “Sant’Anna e San Sebastiano” - Caserta*

³*Dipartimento di Pediatria Sistemica e Specialistica AORN “Santobono-Pausilipon” - Napoli*

Nei pazienti con agenesia del corpo calloso è frequente il riscontro di anomalie cromosomiche e/o riarrangiamenti subtelomerici. I riarrangiamenti che interessano il braccio corto del cromosoma 8 possono associarsi ad anomalie nello sviluppo e ritardo mentale di grado variabile.

Riferiamo il caso di una bimba, unicogenita di genitori giovani non consanguinei, nata a termine da parto cesareo di elezione, dopo gravidanza caratterizzata da gestosi e diabete gestazionale. Il peso alla nascita era 2180g (< 5°). Veniva ricoverata in TIN per piastrinopenia, poi risoltasi spontaneamente. Per l’associazione con dismorfismi facciali veniva richiesto esame del cariotipo, che rivelava la presenza di inv dup del(8p). Il cariotipo dei genitori risultava normale all’esame citogenetico standard e allo studio dei telomeri 8p. L’anamnesi familiare era negativa.

All’ecografia transfontanellare si evidenziava agenesia del corpo calloso.

La piccola veniva poi ricoverata presso il Dip. di Pediatria per pianto inconsolabile durante la poppata con rigurgito abbondante, crisi di cianosi e mucositi (malattia da reflusso gastroesofageo).

I parametri auxologici a tre mesi mostravano un marcato ritardo di crescita (<25°), mentre i parametri vitali erano validi. La valutazione dismorfologica evidenziava una facies peculiare caratterizzata da macrocrania, naso insellato, ipertelorismo, orecchie a impianto basso e retrorotate; bocca ampia con macroglossia ed ipoplasia mandibolare relativa; collo corto e tozzo; apparente rizomelia. L’esame neurologico confermava ipotonia lieve, tetraiperreflessia con Babinski bilaterale, limitazione nella mobilizzazione passiva degli arti. L’EEG in sonno mostrava anomalie irritative centro-occipitali. PEV patologici. Otoemissioni acustiche patologiche. Deficit di IgA, IgG1 e IgG3.

L’agenesia del corpo calloso non ha una prognosi univoca in quanto può essere associata a manifestazioni cliniche variabili da una normalità border-line a grave ritardo psicomotorio. In considerazione delle serie conseguenze che di solito comporta la contemporanea presenza di dup e del 8p, la bambina viene seguita in follow-up immunologico, neurologico e gastro-enterologico-pediatrico. Il rischio di ricorrenza è stato valutato trascurabile per la coppia genitoriale.

SIGN - NETWORK GENETICO SLOVENO-ITALIANO

M. Cassina¹, L. Salviati¹, B. Peterlin², M. Clementi¹

¹*Genetica Clinica ed Epidemiologica, Dipartimento di Salute Donna e Bambino, Università di Padova*

²*Istituto di Genetica Medica, Università di Lubiana*

La direttiva europea sull'assistenza sanitaria transfrontaliera permetterà ai pazienti residenti in Paesi dell'UE di ricevere cure mediche in altri Stati membri, ottenendo il rimborso delle spese. I pazienti affetti da malattie rare, che necessitano di consulenze e cure specialistiche, ne trarranno particolare beneficio. La direttiva, che dovrà essere recepita dagli Stati europei entro il 25 ottobre 2013, mira inoltre a garantire qualità e sicurezza nell'assistenza sanitaria.

Il progetto SIGN, di durata triennale (2011-2014), si inserisce nell'ambito del Programma per la Cooperazione Italia-Slovenia, con lo scopo di migliorare l'accessibilità e la qualità dei servizi di genetica nella macroregione italo-slovena e garantire uguali possibilità di diagnosi e assistenza ai pazienti con malattie genetiche.

All'iniziativa aderiscono il Dipartimento di Salute Donna e Bambino dell'Università di Padova, la Clinica Universitaria di Golnik (Slovenia), il C.R.O. di Aviano, il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche dell'Università di Udine, l'IRCCS "Burlo Garofolo" di Trieste, l'Ospedale di Izola (Slovenia) e il Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica dell'Università di Ferrara. Capofila del programma è l'Istituto di Genetica Medica dell'Università di Lubiana.

Il primo step del progetto è in corso e riguarda la mappatura delle competenze cliniche e diagnostiche in genetica dei singoli centri ospedalieri partecipanti all'iniziativa e la stesura di linee guida comuni per la valutazione dei pazienti affetti da malattie genetiche.

Il progetto SIGN, andando oltre alla direttiva europea sulle cure transfrontaliere, si propone inoltre di sviluppare sistemi di telemedicina per fornire, a distanza, servizi di genetica nelle aree che ne sono prive e per consultare personale qualificato in genetica clinica mediante l'uso di tecnologie innovative dell'informazione in campo medico.

Altro obiettivo del progetto è infine la disseminazione delle conoscenze per sensibilizzare la popolazione e gli specialisti del settore riguardo le nuove possibilità diagnostiche che possono essere offerte ai pazienti.

Valutazione comparativa di parametri di instabilità cromosomica nell'Anemia di Fanconi

O. Catapano¹, R. Calzone², A. Lioniello², V. Altieri², E. Montone², M. Lanzillo¹, A. Zatterale²

¹Associazione Italiana per la Ricerca sull'Anemia di Fanconi, Napoli.

²Servizio di Genetica – P.S. “Elena d’Aosta” – ASL Napoli 1 Centro

L'Anemia di Fanconi (AF) è caratterizzata dalla presenza di instabilità cromosomica (IC) indotta da agenti clastogeni quali il diepossibutano (DEB). Sebbene la sensibilità a tali agenti sia un fenomeno peculiare dei pazienti AF, l'accuratezza della diagnosi può essere compromessa da fattori quali la presenza di mosaicismi somatici, l'iperespressione di siti fragili, i trattamenti chemioterapici, una scarsa esperienza specifica del citogenetista. In particolare il mosaicismi somatici pone problemi nel management clinico del paziente.

Abbiamo pertanto condotto uno studio retrospettivo su 1030 test al DEB eseguiti dal 1994 al 2011 presso l'UOC di Genetica dell'ASL Napoli 1 per valutare il potere discriminante nei confronti dei mosaicismi somatici, dei parametri di IC finora utilizzati dalla comunità scientifica (% di cellule aberranti, n° di rotture/n° di cellule totali, n° di rotture per cellula aberrante, % di cellule con riarrangiamenti), in raffronto a quello dei parametri proposti da Castella et al, 2011 (% di cellule multiaberranti, n° di rotture per cellula multiaberrante, CFI = chromosome fragility index).

Entrambi i set di parametri sono risultati efficaci nel discriminare i pazienti affetti dai non affetti. Il CFI, proposto da Castella et al. come discriminante per i casi border line, e quindi indicativo di mosaicismi somatici, non è risultato in grado di discriminare i pazienti negativi dai possibili mosaicismi somatici. Pertanto una diagnosi di mosaicismi somatici va comunque validata mediante test al DEB e western blotting su almeno un tessuto diverso dal sangue periferico e da analisi di mutazione, ove possibile.

Laddove si voglia prendere in considerazione il CFI è necessario che ogni laboratorio stabilisca il proprio cut-off di riferimento. Si sottolinea comunque l'importanza che il test al DEB sia eseguito secondo un protocollo rigoroso, presso centri con specifica esperienza in grado di valutare adeguatamente eventuali fattori interferenti.

In futuro le nuove tecnologie di Next Generation Sequencing potrebbero essere applicate per lo screening contemporaneo dei geni candidati per l'AF e l'individuazione di nuovi geni.

MICRODELEZIONE 9q33 IN UN FETO CON SEX REVERSE E CARDIOPATIA CONGENITA

M. Alfonsi¹, C. Palka², E. Morizio¹, A. Soranno¹, V. Gatta³, S. Franchi³, I. Antonucci³, L. Stuppia³, G. Palka¹, G. Calabrese¹

¹*Dip. Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche. Università "G. D'Annunzio", Chieti*

²*Dip. Pediatria. Università "G. D'Annunzio", Chieti*

³*DISPUTer. Università "G. D'Annunzio", Chieti.*

Descriviamo il caso di un feto che, all'esame ecografico, presentava una cardiopatia caratterizzata da difetto del setto interventricolare e trasposizione dei grossi vasi.

L'amniocentesi ha evidenziato un cariotipo maschile diploide 46,XY. L'analisi in FISH ha mostrato un normale numero di copie delle regioni critiche DiGeorge I e II, rispettivamente sui cromosomi 22q11 e 10p14. L'esame autoptico del feto ha confermato le anomalie precedentemente osservate ed ha evidenziato la presenza di genitali femminili.

L'analisi array-CGH, con sonde BAC ad una risoluzione di 575 Kb, ha rilevato la presenza di una microdelezione de novo di 6,97 Mb della regione 9q33.1-q33.3, confermata tramite FISH e MLPA. Tale riarrangiamento coinvolge una serie di geni tra cui NR5A1 e MEGF9. Mutazioni di NR5A1 sono state descritte in pazienti con cariotipo maschile e diverse forme di disturbi della differenziazione sessuale. Ad oggi mutazioni del gene MEGF9 non sono state descritte in alcuna patologia. Tuttavia, uno studio di linkage, effettuato su un'ampia famiglia con cardiopatia congenita, ha mostrato un'associazione con il cromosoma 9q21q33. Tale regione comprende 402 geni. Tra questi sono stati selezionati 9 geni candidati, tra cui MEGF9. In conclusione, questo caso mostra un'associazione, non descritta in precedenza, tra una delezione comprendente i geni MEGF9 e NR5A1, ed un fenotipo caratterizzato da cardiopatia congenita e sex reverse.

DIFETTI DI IMPRINTING GENOMICO NELLE SINDROMI DI BECKWITH-WIEDEMANN E SILVER-RUSSELL: RUOLO DEGLI ELEMENTI AGENTI IN CIS E DEI FATTORI AGENTI IN TRANS

A. De Crescenzo¹, V. Citro⁶, A. Sparago², F. Cerrato¹, O. Palumbo³, M. Carella³, O. Zuffardi⁴, Y. Yaron⁵, A. Riccio¹

¹Lab. di Genetica, Dip. di Scienze Ambientali, Seconda Università degli Studi di Napoli, Caserta

²Lab. di Genetica, Istituto di Genetica e Biofisica "Adriano Buzzati Traverso" - CNR, Napoli

³Unità di Genetica Medica, IRCCS, Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)

⁴Fondazione "Istituto Neurologico Nazionale C. Mondino", IRCCS, Pavia

⁵Unità di Diagnosi Prenatale, Istituto di Genetica, Tel Aviv Sourasky Medical Center, Tel Aviv, Israele

⁶Dip. di Biologia Funzionale e Strutturale, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli

La Sindrome di Beckwith-Wiedemann (BWS) e la Sindrome di Silver-Russell (SRS) sono disordini della crescita caratterizzati da opposti fenotipi e difetti molecolari a carico del cluster di geni imprintati della regione cromosomica 11p15.5. Molti casi di BWS e SRS mostrano difetti (sia ipo- che iper-) di metilazione in uno dei due Centri di controllo dell'Imprinting (IC1 e IC2) del cluster. Queste alterazioni aboliscono le differenze epigenetiche tra gli alleli materno e paterno degli IC e conducono ad alterazioni dell'espressione genica e al fenotipo patologico. Grazie all'analisi di un'ampia casistica, abbiamo dimostrato che in alcuni casi di BWS l'ipermetilazione di IC1 è associata a delezioni di 1.4-2.2 kb di origine materna all'interno della stessa regione. Tali mutazioni eliminano alcuni siti di legame (CTS) per la proteina CTCF predisponendo questa regione regolativa all'ipermetilazione nelle prime fasi dell'embriogenesi. Un'accurata analisi degli alleli mutanti sia nei pazienti che in cellule coltivate ci ha permesso di dimostrare un'interessante relazione genotipo-fenotipo in questa classe di pazienti. L'ipometilazione di IC2 è il difetto molecolare più frequente della BWS. L'alterazione reciproca (ipermetilazione di IC2) non è mai stata dimostrata nella SRS. Abbiamo tuttavia identificato di recente una delezione di 60 kb che elimina la regione IC2 sul cromosoma paterno in un caso di IUGR severa ricorrente. La microdelezione è de novo ed è stata dimostrata in due feti di gravidanze successive entrambe interrotte alla 27a settimana per crescita estremamente ritardata e morte intaruterina. La delezione abolisce l'espressione di KCNQ1OT1, un RNA non codificante necessario per l'imprinting dei geni adiacenti. Pure essendo evidente il difetto di metilazione, nella maggioranza dei casi di BWS e SRS non si riscontrano mutazioni degli IC. Risultati ottenuti nel topo indicano che il mantenimento della metilazione degli IC nelle prime fasi di sviluppo embrionale dipende da fattori agenti in trans. Stiamo investigando il possibile ruolo di tali fattori nell'origine dei difetti di imprinting della BWS e SRS mediante sequenziamento dell'esoma nel DNA dei pazienti.

A RESTRICTED SPECTRUM OF MUTATIONS IN THE SMAD4 TUMOR-SUPPRESSOR GENE UNDERLIES MYHRE SYNDROME

V. Caputo¹, M. Niceta², C. Carta², A. Ciolfi¹, M.L. Dentici³, E. Belligni⁴, L. Garavelli⁵, L. Boccone⁶, D. Melis⁷, M. Silengo⁴, B. Dallapiccola³, M. Tartaglia²

¹*Sapienza Università di Roma, Rome, Italy*

²*Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy*

³*Ospedale Bambino Gesù, Rome, Italy*

⁴*Università di Torino, Turin, Italy*

⁵*IRCCS Arcispedale Santa Maria Nuova, Reggio Emilia, Italy*

⁶*Ospedale Microcitemico, Cagliari, Italy*

⁷*Università "Federico II", Naples, Italy*

Myhre syndrome is a developmental disorder characterized by reduced growth, generalized muscular hypertrophy, facial dysmorphism, deafness, cognitive deficits, joint stiffness and skeletal anomalies. Here, by performing exome sequencing of a single affected individual coupled to a hypothesis-driven filtering strategy, we establish that heterozygous mutations in SMAD4, which encodes for a transducer mediating TGF β and BMP signaling branches, underlie this rare Mendelian trait. Two recurrent de novo SMAD4 mutations were identified in eight unrelated subjects. Both mutations were missense changes altering Ile500 within the evolutionary conserved MAD homology 2 domain, a well known mutational hot spot in malignancies. Structural analyses suggest that the substituted residues are likely to perturb the binding properties of the mutant protein to signaling partners. While SMAD4 has been established as a tumor suppressor gene somatically mutated in pancreatic, gastrointestinal and skin cancers, and germline loss-of-function lesions and deletions of this gene have been documented to cause disorders predisposing to gastrointestinal cancer and vascular dysplasias, the present report identifies a previously unrecognized class of mutations in the gene with profound impact on development and growth.

UN CASO DI TRISOMIA 18p IN DIAGNOSI PRENATALE CARATTERIZZATO MEDIANTE ARRAY-CGH

C. Palka¹, M. Alfonsi², E. Morizio², A. Soranno², P. Guanciali-Franchi², F. Chiarelli¹, G. Palka², G. Calabrese²

¹*Dip. Pediatria Università "G. D'Annunzio", Chieti*

²*Dip. Scienze Mediche, Orali e Biotecnologiche. Università "G. D'Annunzio", Chieti*

Descriviamo il caso di un feto che all'esame del cariotipo standard da liquido amniotico, eseguito per età materna avanzata, ha presentato un cromosoma marker soprannumerario omogeneo. L'analisi in FISH ha mostrato sul marker la presenza del centromero 13/21; tuttavia l'esame con le sonde painting dei suddetti cromosomi è risultata negativa. L'array-CGH con sonde BAC ad una risoluzione di 575 kb (Technogenetics), ha evidenziato una duplicazione di circa 14 Mb della regione cromosomica 18p11.32-p11.21, confermata mediante FISH e SKY.

Il cariotipo finale è risultato 47,XY,+mar.ish der(13 o 21)t(13 o 21;18)(D13Z1+)(D21Z+)(wcp18+).

L'analisi del cariotipo dei genitori ha mostrato che la madre, fenotipicamente normale, presenta lo stesso cromosoma soprannumerario in tutte le 20 metafasi analizzate. All'ecografia morfologica in XX settimana non è stata evidenziata alcuna anomalia, per cui la coppia ha deciso di proseguire la gravidanza. Il riarrangiamento cromosomico rilevato è paragonabile a una trisomia pura del braccio corto del cromosoma 18 (+18p). Ad oggi, tale alterazione cromosomica è stata descritta in 9 pazienti, associata con uno sviluppo mentale da normale a lievemente ritardato e assenza di dismorfismi facciali e/o anomalie congenite. Questo è il primo caso caratterizzato mediante array-CGH, per cui studi molecolari effettuati su altri pazienti saranno utili per chiarire il significato clinico di questa non comune trisomia.

NO EVIDENCE FOR A ROLE OF CYSTATIN β DODECAMER REPEAT EXPANSION IN JUVENILE MYOCLONIC EPILEPSY

P. Tarantino¹, F. Cavalcanti¹, M. Gagliardi², G. Annesi¹, R. Michelucci³, A. Bianchi⁴, A. Gambardella¹, . on behalf of Italian League against Epilepsy⁵

¹*Institute of Neurological Sciences, National Research Council, Cosenza, Italy*

²*University of Magna Graecia, Catanzaro, Italy*

³*Division of Neurology, "Bellaria" Hospital, Bologna*

⁴*Division of Neurology, Ospedale "S. Donato" Arezzo, Arezzo*

⁵*Lega Italiana contro l'Epilessia*

OBJECTIVE: Juvenile myoclonic epilepsy (JME) is a common form of idiopathic generalized epilepsy (IGE) that has a relevant genetic contribution, but so far genes related to JME families remain largely unknown. JME shares electro-features with Unverricht-Lundborg disease (EPM1) that is a form of the progressive myoclonic epilepsy characterized by myoclonus, epilepsy and progressive neurologic deterioration. EPM1 is caused by mutations in the gene that codes for cystatin β , an inhibitor of cysteine protease. The most common mutation in EPM1 is an expansion of a dodecamer repeat located in a non coding region upstream of the transcription start site of the cystatin β gene. Since JME and EPM1 are both myoclonic epilepsies, we investigated the role of dodecamer repeat expansion in patients with JME.

MATERIALS AND METHODS: Thirty-five patients (26 women; mean age: 22.4, + 6.3; mean age at onset: 15.7 + 3.5) with JME were enrolled. Twenty-four had a positive family for JME or IGE. DNA was extracted by standard methods. Dodecamer repeat expansion was amplified by expand long template PCR system and detected by electrophoresis analysis. All subjects provided written informed consent, as required by ethics committees in each epilepsy centre of all the participating investigator.

RESULTS: The analysis of the dodecamer repeat expansion did not evidence any expanded alleles in all 35 patients with JME.

CONCLUSION and DISCUSSION: Our study did not support a role for cystatin β dodecamer repeat expansion in JME. It remains to be clarified if the so-called minor EPM1 mutations might account for a proportion of the genetic susceptibility to JME.

Diagnosi presintomatica di leucemia prolinfocitica a cellule T (T-PLL)

M. Colantuoni¹, M.L. Vigliotti², V. Altieri¹, A. Lioniello¹, V. Sollazzo¹, A. Abbadessa², A. Zatterale¹

¹U.O.C. di Genetica – P.S. “Elena d’Aosta” – ASL Napoli 1 Centro

²U.O.C. Oncoematologia – A.O.R.N. “Sant’Anna e San Sebastiano” - Caserta

La T-PLL è una rara, aggressiva neoplasia post-timica con scarsa risposta ai trattamenti convenzionali e breve sopravvivenza. Ha natura sistemica; si manifesta con splenomegalia, linfadenopatia generalizzata, infiltrati epidermici. Anomalie citogenetiche distintive sono l’inversione paracentrica 14q, la trisomia 8q e la delezione 6q.

Riportiamo un caso di T-PLL diagnosticato in un paziente asintomatico nel corso di esami per oligospermia. Il cariotipo da sangue periferico presentava anomalie aggiuntive alle più frequenti anomalie cromosomiche della T-PLL, definite mediante SKY, FISH paint 8p/8q e sonde telomeriche 6q:

45,XY,del(6)(q21),der(8)t(8;8)(p21;q21),-11,inv(14)(q11q32)[2]/45,idem,der(1)inv(1)(q24q43)t(1;14)(q24;q?32)[8]/46,XY[2]

Il paziente veniva riferito dal consulente genetista all’ematologo. L’E.O. era negativo con conta linfocitaria nella norma. L’immunocitofluorimetria su sangue periferico e su midollo evidenziava una popolazione (57%) dei linfociti totali con fenotipo CD3+, CD4-, CD8+, CD5+, CD2+ e restrizione clonale per TCRvβ14; l’esame istologico non mostrava una chiara infiltrazione linfoide. Il cariotipo da sangue midollare mostrava un quadro in evoluzione confermando le anomalie già riscontrate. Ulteriore evoluzione clonale mostrava il cariotipo dopo un anno, perdurando assenza di sintomatologia:

44,X,-Y,der(1)inv(1)(q24q43),t(1;14)(q24;q?32),del(6)(q21),der(8)t(8;8)(p21;q21),-11,inv(14)(q11q32)[15]/46, XY[20]

Si decideva per un attento monitoraggio senza terapia, durante il quale i linfociti aumentavano fino a 51000/mmc dopo 23 mesi di FU. Il paziente continuava a godere pieno benessere ma all’esame clinico mostrava adenopatie inguinali ed ascellari. La biopsia linfonodale e del midollo confermava la diagnosi di T-PLL. In seguito al riscontro di splenomegalia, ingrovescente adenopatia ed aumento ulteriore dei bianchi, in assenza di donatore familiare compatibile, il paziente ha iniziato trattamento FLU-CAM ottenendo allo stato remissione completa e cariotipo normale. Questo caso evidenzia l’importanza che gli esami genetici vengano sempre valutati da un genetista in grado di considerare il referto sotto tutti i profili e come la precocità della diagnosi favorisca l’esito delle terapie, modificando prognosi consolidate.

Deletions in the last part of CACNA1A gene are associated with juvenile-onset hemiplegic migraine.

G.S. Grieco¹, S. Gagliardi¹, I. Ricca¹, A. Spalice², A. Bersano³, G. Nappi⁴, C. Cereda¹

¹Laboratory of Experimental Neurobiology, C. Mondino National Institute of Neurology Foundation, IRCCS, Pavia, Italy

²Child Neurology Division Dept of Pediatrics La Sapienza University Rome Italy

³Emergency Neurology, C. Mondino National Institute of Neurology Foundation, IRCCS, Pavia, Italy

⁴Headache Science Center, C. Mondino National Institute of Neurology Foundation, IRCCS, Pavia, Italy

Introduction. Familial hemiplegic migraine type 1 (FHM-1) is a monogenic form of migraine with aura that is characterized by recurrent attacks of a migraine headache with transient hemiparesis during the aura phase. Additional symptoms are epilepsy and cerebellar ataxia. FHM is caused by mutations in the CACNA1A, ATP1A2 and SNC1A in autosomal dominant heredity.

Here we report in three patients (case 1, 2, 3) deletions in the last portion of CACNA1A gene. All patients suffer from juvenile-onset hemiplegic migraine attacks. Case 1 presented the first hemiplegic attack at the age of 18 months and he suffers from epilepsy. Case 2 and 3 experienced the first attack of hemiplegic migraine at 14 and 32 years respectively.

Methods. All the CACNA1A exons were amplified and automatically sequenced, samples were also analyzed with MLPA assay and all MLPA data were verified by Real Time PCR.

Results and Discussion. Sequencing analysis not showed any point mutations in all three genes. Case 1 showed the presence of an heterozygous deletion from exon 37 to 47 of the CACNA1A gene. In Case 2 we detected a deletion in heterozygosis from exon 41 to exon 43. Case 3 evidenced the presence of an heterozygous deletion in exon 47.

The deleted allele is predicted to lead a truncated protein or to absence of the protein caused by mRNA instability. Deletion of the final part has already been described in myoclonic epilepsy of infancy, another channelopathy in the SCN1A gene. In all our cases a deletion in CACNA1A gene is associated with an early disease onset. The negative sequencing of all 47 exons suggests a possible role of chromosomal rearrangement in CACNA1A gene in early disease onset.

RIARRANGIAMENTI DEL GENE ALK NEL CARCINOMA POLMONARE

B. Bernasconi¹, V. Martin², F. Franzi³, D. Sabatino³, L. Mazzucchelli², F. Sessa¹, M.G. Tibiletti¹

¹*Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Morfologiche, U.O. Anatomia Patologica, Università dell'Insubria, Varese, Italy;*

²*Institute of Pathology, Locarno, Switzerland;*

³*U.O. Anatomia Patologica, Ospedale di Circolo, Varese, Italy.*

L'attivazione della chinasi Anaplastic lymphoma (ALK) è stata descritta come evento oncogenico primario in diversi tumori e avviene principalmente attraverso un riarrangiamento cromosomico (inversione, delezione o traslocazione). Riarrangiamenti di ALK sono presenti nel 3-7% dei non-small cell lung cancer e sono correlati a rapida e prolungata risposta alla terapia con crizotinib, un inibitore tirosinchinasico di ALK e MET. La positività viene determinata mediante FISH utilizzando sonde split signal. La valutazione in interfase risulta spesso difficoltosa, viste le caratteristiche citogenetiche del riarrangiamento. Per questo il cut-off funzionale per selezionare i pazienti da trattare è stato definito al 15% di nuclei con split pattern o delezione della regione 5' del gene. Abbiamo studiato 62 casi di adenocarcinomi polmonari provenienti da due centri diversi (26 Locarno; 36 Varese), di cui 33 campioni biotici, per i quali, in particolare, è stata effettuata un'attenta revisione morfologica. La FISH è stata condotta per tutti i casi utilizzando la sonda ALK split signal DAKO (Dakocytomation). Per 28 casi è stata utilizzata in doppio anche la sonda ALK Abbott (Abbott Molecular). Dieci campioni commerciali sono stati utilizzati come controlli negativi (Abbott Molecular). Gli esperimenti di FISH sono stati valutati secondo le raccomandazioni SIGU 2010. Nove casi su 62 (14.5%) hanno rivelato presenza di un riarrangiamento del gene ALK. In dettaglio: 3 casi avevano split pattern, 4 delezione del 5' e 2 casi mostravano la presenza di entrambe le anomalie. La percentuale di cellule positive variava dal 23 al 97%. 56 casi (90.3%) mostravano polisomia del gene ALK (da 3 a 10 copie) e 3 casi amplificazione (5%), in concomitanza o meno alla presenza di un riarrangiamento. I risultati ottenuti nei casi valutati con entrambe le sonde erano sovrapponibili. L'analisi FISH era ottimale anche sui campioni biotici. In 7 casi (13.2%) considerati negativi, la percentuale di cellule riarrangiate è risultata superiore al cut-off ottenuto sul pool di controllo (8%). Questo risultato suggerisce considerazioni circa l'impatto sulle scelte terapeutiche della presenza di piccole popolazioni cellulari riarrangiate, soprattutto nella valutazione di campioni biotici.

SINDROME DI NOONAN E SINDROMI CORRELATE: ASPETTI CLINICI E MOLECOLARI IN UN'AMPIA COORTE DI PAZIENTI

M.A. Pisanti¹, P. Castelluccio¹, D. De Brasi¹, G. Fioretti¹, P. Friso¹, S. Ruoppo¹, G. Limongelli², C. Rossi³, M. Tartaglia⁴, M.L. Cavaliere¹

¹*U.O.C. Genetica Medica, A.O.R.N. "A. Cardarelli", Napoli*

²*U.O.C. Cardiologia S.U.N., Ospedale Monaldi-A.O. dei Colli, II Università, Napoli*

³*U.O. Genetica Medica, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Napoli*

⁴*Dipartimento Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, I.S.S., Roma*

La NS e le sindromi correlate, incluse nel gruppo delle NCFCS per lo spettro fenotipico variamente condiviso, riconoscono patogenesi comune in quanto causate da mutazioni germinali in eterozigosi in geni che codificano proteine aventi un ruolo chiave nell'attivazione del pathway RAS-MAPK (RASopatie). Mutazioni a carico dei geni PTPN11, SOS1, KRAS, NRAS, RAF1, BRAF, SHOC2, MEK1 e CBL sono state documentate in circa il 75% dei pazienti con diagnosi clinica di NS, che rappresenta la RASopatia piu' frequente con un'incidenza nella popolazione generale di 1 su 1000/2500 nati vivi.

Il follow-up clinico-stumentale di un'ampia coorte di pazienti afferenti alla U.O.C di Genetica Medica dell'A.O.R.N. "A. Cardarelli" prevedeva l'esame fisico, antropometrico, neurologico e cardiologico, nonché la valutazione del dismorfismo cranio-facciale, delle anomalie ectodermiche e muscolo-scheletriche.

L'analisi molecolare del gene PTPN11 ha mostrato mutazioni de novo in 2 pazienti, familiari in 8; l'analisi molecolare del gene SOS1 ha evidenziato mutazione de novo in 1 paziente; due differenti mutazioni de novo del gene BRAF sono state riscontrate in 2 pazienti; il gene CBL è risultato mutato in 4 membri della stessa famiglia (padre e 3 figli). Lo studio molecolare del gene PTPN11 ancora in corso per 9 pazienti, è risultato negativo in 16 per i quali è in attesa dei risultati degli altri geni coinvolti. La stenosi polmonare valvolare (SPV) e i difetti settali sono le CC piu' frequenti nei nostri pazienti, nessuno dei quali presenta cardiomiopatia ipertrofica (CMPI) nè canale atrio-ventricolare (CAV)

Le anomalie ectodermiche e i difetti cognitivi sono piu' frequenti nei pazienti con mutazione SOS1 e BRAF. Nessuno dei pazienti ha sviluppato patologie onco-ematologiche o neoplasie solide.

Ulteriori correlazioni genotipo-fenotipo saranno eventualmente segnalate dopo completamento dello studio molecolare.

LONG QT SYNDROME GENE VARIANTS IN SUDDEN INFANT DEATH SYNDROME: PRELIMINARY DATA FROM AN INTERNATIONAL STUDY

R. Insolia¹, F. Greco², M. Torchio², A. Ghidoni¹, E. Mastantuono², M. Cohen³, P. Cox⁴, I. Scheimberg⁵, L. Crotti¹, R. Coombs⁶, P.J. Schwartz¹

¹*Dep. of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*

²*Molecular Cardiology Lab., Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia, Italy*

³*Sheffield Childrens Hospital, UK*

⁴*Birmingham Womens Hospital, UK*

⁵*The Royal London Hospital, UK*

⁶*Sheffield Teaching Hospitals, UK*

Background: Sudden infant death syndrome (SIDS) remains the leading cause of mortality in the first year of life. By definition the cause of death is still unknown. We previously demonstrated in anonymous tissue from Norwegian SIDS that nearly 10% of cases diagnosed as SIDS carry functionally significant genetic variants in long QT syndrome (LQTS) genes. Our first goal is with full parental consent to molecularly investigate 300 SIDS cases, enrolled in the UK, and next to offer a genetic and cardiological assessment to the families of positive cases.

Materials and Methods: We received autopsy tissue of SIDS cases recruited from databases held in Sheffield, Birmingham and London together with families recruited from the news letters of the Foundation for Study of Infant Death. Through DHPLC and sequence analysis we screened the main LQTS genes KCNQ1, KCNH2 and SCN5A. Genetic variants were verified in a panel of internal controls and in three publicly available exome databases (1,000 Genome Project, NHLBI GO Exome Sequencing Project, Exome Chip Design). Here, we report the preliminary data on the first 46 samples.

Results: A total of 7 missense variants were identified in 7 (15%) SIDS cases. Four genetic variants, absent in the reference exome databases, were identified respectively in KCNH2 (3 variants) and SCN5A genes: accordingly, they can be considered as putative LQTS-susceptibility mutations. In addition, 3 SIDS cases carried 3 already described genetic variants in SCN5A. Two of them were previously associated with SIDS with a demonstrated functional effect, and the third variant evidenced an altered effect in a specific splice isoform of the sodium gene. We are currently performing the electrophysiological cellular studies to define functional effect in the novel variants.

Conclusions: The preliminary data from this ongoing international study confirm the contribution of LQTS in a relevant number of SIDS cases. On completion our study will establish if the identified mutations have arisen de novo or whether there is a clinical risk of sudden death in the families. This study will clarify the role of prospective LQTS genetic screening in SIDS victims, and its implications for national resources.

Indagine sulle conoscenze e l'atteggiamento verso la Genetica Medica degli infermieri italiani

L. Godino¹, H. Skirton², D. Turchetti¹

¹*U.O. Genetica Medica, Policl. Sant'Orsola Malpighi, Bologna*

²*School of Nursing and Midwifery, Faculty of Health, Education and Society, Plymouth University, UK*

In molti Paesi l'infermiere (Genetic Nurse) è parte integrante dei servizi di Genetica, dove ha un ruolo fondamentale nello svolgimento delle attività cliniche. In Italia, l'auspicabile inserimento di tale figura nei Servizi di Genetica Clinica è ancora lontano, sebbene esistano sporadiche esperienze su base locale e sebbene la figura dell'infermiere nei servizi di Genetica Clinica sia prevista dai Disciplinari per l'Accreditamento delle Strutture di Genetica Clinica. Fondamentale per tale integrazione, è la sensibilizzazione degli infermieri circa il loro possibile ruolo nelle attività di Genetica. Per verificare conoscenze e atteggiamento degli infermieri verso la Genetica, è stato condotto nel 2010 un primo studio nel territorio bolognese per mezzo di un questionario autosomministrato al personale infermieristico ed ostetrico. Nel 2011 tale studio è stato esteso a tutti gli infermieri italiani mediante un questionario online, in Survey MonkeyTM, il cui link è stato diffuso attraverso i social network Facebook e Twitter, attraverso l'invio a mailing list e volantaggio negli ospedali bolognesi. Nel primo studio, il questionario è stato completato da 102 infermieri e ostetriche. Per quanto riguarda la consulenza genetica, il 24% afferma di non sapere di che cosa si tratti, il 61% dichiara che è una procedura informativo-consultiva, il 15% una procedura diagnostica. Il 62% afferma che l'infermiere non ha nessun ruolo in ambito genetico; un 28% gli attribuisce un ruolo informativo e di sostegno, per il restante 10% il suo ruolo è scarso o legato alla sola raccolta di dati. Al secondo studio hanno partecipato 385 infermieri, 131 dei quali (40,4%) hanno risposto correttamente a quattro su cinque domande di conoscenze genetiche. Questo dato non cambia con il variare dell'età, ma varia positivamente in correlazione con il titolo accademico conseguito. Tuttavia, solo il 26,8% dei partecipanti sostiene che vi sia un ruolo rilevante per la professione infermieristica nella genetica clinica. Da questi studi emerge che sebbene gli infermieri dimostrino di avere delle buone basi sulle conoscenze genetiche, necessitano di maggiore formazione su aspetti più specifici e soprattutto sulla trasferibilità di tali informazioni nella pratica infermieristica.

Saccsin-related ataxia caused by the novel missense mutation Arg272His in a patient from Southern-Italy

F. Cavalcanti¹, A. Nicoletti², G. Annesi¹, P. Tarantino¹, M. Gagliardi³, G. Mostile², V. Dibilio², F. Falcone¹, G. Lucia¹, A. Quattrone⁴, A. Gambardella¹, M. Zappia²

¹*Institute of Neurological Sciences, National Research Council, Cosenza, Italy*

²*Department of Neurosciences, University of Catania, Catania, Italy*

³*University of Magna Graecia, Catanzaro, Italy*

⁴*Institute of Neurology, Department of Medical Sciences, University of Magna Graecia-Catanzaro, Italy*

Objective: Autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS) is an early-onset cerebellar ataxia with spasticity, amyotrophy, nystagmus, dysarthria, and peripheral neuropathy. SACS is the only gene known to be associated with the ARSACS phenotype. The gene was initially reported to be encoded by a single gigantic exon. Recently eight additional exons were identified upstream of the giant exon. The SACS protein product, saccsin, is believed to integrate the ubiquitin-proteasome system and Hsp70 chaperone machinery. Recent studies indicates a role for saccsin in regulation of mitochondrial dynamics. To date, more than 70 different mutations, predominantly located in the giant exon, have been identified worldwide; of these only seven, exclusively located in the giant exon, were identified in Italian patients. We screened the SACS gene in a patient from Southern-Italy with ARSACS.

Materials and methods: A 36 years-old woman affected by spastic ataxia was examined. Clinical and genetic analyses were performed.

Results: The authors identified a novel homozygous variation c.815G>A in the SACS gene which results in the missense mutation p.Arg272His (R272H) in a patient from Southern-Italy. This mutation was present in heterozygosis in both unaffected parents as in one unaffected sibling and in several unaffected relatives. The missense mutation R272H was not detected among 200 control chromosomes. R272H missense mutation falls in the seventh coding exon of the SACS gene, hence not in the carboxyterminal giant coding exon which contains most reported saccsin mutations.

Discussion and conclusions: The authors report a novel SACS mutation, R272H, in a Sicilian family with ARSACS phenotype. The phenotype of our patient closely resembled the classic phenotype. R272H represents the first described Italian mutation located upstream of the giant exon of the SACS gene. The residue is completely conserved in evolution. Although it is also in a well-conserved region of the protein, no functional domain is defined for this region.

Traslocazione coinvolgente il gene APC in una famiglia con Sindrome di Turcot

N. Sahnane¹, B. Bernasconi¹, I. Carnevali¹, A. Viel², D. Furlan¹, A.M. Chiaravalli³, M.G. Tibiletti³

¹*Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Morfologiche, U.O. Anatomia Patologica, Università dell'Insubria, Varese, Italy;*

²*Dipartimento di Ricerca Preclinica e Epidemiologica, Centro di Riferimento Oncologico - IRCCS*

³*U.O. Anatomia Patologica, Ospedale di Circolo, Varese, Italy.*

La sindrome di Turcot (ST) è una sindrome di predisposizione al cancro, le cui manifestazioni principali sono una poliposi diffusa del colon e tumori del sistema nervoso centrale (SNC). Le basi molecolari della ST sono dovute a mutazioni del gene APC associato alla FAP o a mutazioni di uno dei geni del Mismatch Repair (MMR) associati alla sindrome di Lynch. I tumori del SNC associati a mutazioni costituzionali del gene APC sono prevalentemente medulloblastomi, mentre mutazioni costituzionali dei geni MMR si associano all'insorgenza di glioblastomi. Descriviamo una estesa famiglia affetta da ST con manifestazione di polipi coloretali, carcinomi coloretali e un astrocitoma. L'analisi dei microsatelliti eseguita su diversi campioni di polipi adenomatosi con displasia moderata di due pazienti non ha evidenziato instabilità dei microsatelliti e l'analisi immunostochimica degli stessi polipi ha evidenziato una normale espressione dei geni MMR consentendo di escludere il coinvolgimento dei geni del mismatch repair in questa famiglia. Il test genetico mediante sequenziamento diretto dei geni APC e MUTYH non ha evidenziato varianti patogenetiche di questi geni. Analogamente, l'analisi MLPA del gene APC ha dimostrato l'assenza di delezioni o duplicazioni esoniche. L'analisi cromosomica convenzionale eseguita sia sui soggetti con poliposi che sui soggetti sani di questa famiglia ha evidenziato una traslocazione t(5;7), apparentemente bilanciata, che cosegrega con la ST. L'analisi FISH con 3 sonde BAC che coprono il gene APC ha confermato il coinvolgimento del gene APC nella traslocazione. I risultati dell'analisi FISH e del test MLPA sul cDNA del gene APC hanno permesso di caratterizzare il punto di rottura della traslocazione a livello dell'introne 7-8 del gene. Le analisi del trascritto di APC mediante Real-Time PCR e mediante PCR digitale hanno confermato il dimezzamento dei livelli di trascritto per sequenze geniche distali all'esone 7.

La dimostrazione che t(5;7) è l'evento patogenetico in questa famiglia ha permesso di proporre l'analisi cromosomica convenzionale e molecolare come test predittivo agli altri membri della famiglia e di attuare una corretta prevenzione clinica.

IDENTIFICAZIONE DI MUTAZIONI NEL GENE ATP1A3 IN PAZIENTI CON EMIPLEGIA ALTERNANTE

F. Gurrieri¹, F.D. Tiziano¹, S. Fiori¹, L. Di Pietro¹, E. Abiusi¹, E.L. Heinzen², D. Goldstein², M.A. Mikati³, A.M. van den Maagdenberg⁴, . Consorzio IBAHC⁶, G. Neri¹

¹*Ist Genetica Medica, Università Cattolica S. Cuore, Roma*

²*Center for Human Genome Variation, Duke University School of Medicine, Durham, NC, USA*

³*Division of Pediatric Neurology, Duke University Medical Center, Durham, NC, USA*

⁴*Leiden University Medical Centre, Leiden, Olanda*

L'Emiplegia Alternante (EA) è un raro disturbo del neurosviluppo caratterizzato da episodi accessuali ricorrenti di emiplegia, associati a epilessia, distonia, ritardo psicomotorio, disartria. Si presenta per lo più in forma sporadica, anche se raramente sono riportate famiglie nelle quali il fenotipo segrega in modo autosomico dominante.

In collaborazione con gruppi Olandesi, Francesi e Statunitensi, abbiamo sequenziato gli esomi di un piccolo gruppo di pazienti con EA allo scopo di individuare mutazioni in geni condivisi. L'analisi dell'esoma ha indicato che 11 pazienti condividevano mutazioni nella regione codificante del gene ATP1A3, indicandolo come principale candidato per l'EA. In base a questo risultato, il sequenziamento dello stesso gene è stato esteso ad un totale di 104 pazienti con EA: si è osservato che circa l'80% dei pazienti presenta mutazioni nello stesso gene, e che il 60% delle mutazioni è rappresentato da 2 alterazioni ricorrenti, D801N e E815K.

Il gene ATP1A3 codifica per una ATPasi neuronale Na⁺/K⁺ dipendente ed è responsabile anche di un'altra patologia neurologica: la sindrome con distonia-parkinsonismo ad esordio precoce (DYT12). Le mutazioni responsabili di DYT12, a trasmissione autosomica dominante, sono localizzate in domini della proteina diversi rispetto a quelli coinvolti nella EA. L'analisi funzionale della proteina mutata ha mostrato che essa è quantitativamente ridotta in DYT12, mentre mantiene livelli normali in EA. In entrambe le patologie è presente una riduzione dell'attività ATPasica in vitro.

In conclusione, l'identificazione del gene ATP1A3 come principale responsabile di EA, pone le basi per una migliore comprensione della patogenesi e per la ricerca di strategie terapeutiche mirate.

Acknowledgements Lo studio è stato promosso e finanziato con il supporto di:

A.I.S.E.A. Onlus (R. Vavassori, F. Franchini)

Consorzio I. B. A. H. C: C. Zucca, M. Bassi (Istituto Scientifico Medea, Lecco); M. Giannotta, G. Gobbi (Ospedale Maggiore, Bologna); T. Granata, N. Nardocci (Istituto Neurologico Besta, Milano); E. De Grandis, E. Veneselli (Ospedale G. Gaslini, Genova); F. Vigeveno (Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma).

A. F. H. A.: D. Poncelin, S. Nicole, (INSERM, Parigi)

ANALISI DI MUTAZIONE DEI GENI BRCA1/2 IN FAMIGLIE CON TUMORE DELLA MAMMELLA EREDITARIO

M. Piane¹, C. Bozzao¹, M. Rapazzotti Onelli¹, C. Savio¹, G. Alfedi¹, F. Libi¹, V. Pensotti³, A. Bonifacino², L. Chessa¹

¹*U.O. Genetica Medica, Dipartimento Medicina Clinica e Molecolare, Sapienza Università di Roma*

²*U.O. Senologia, Dipartimento Sc. MedicoChirurgiche e Medicina Traslazionale, Sapienza Università di Roma*

³*IFOM, Milano*

Il carcinoma mammario ereditario rappresenta il 5-10% di tutte le neoplasie mammarie. I test genetici per la ricerca di mutazioni nei geni BRCA1 (MIM#113705) e BRCA2 (MIM# 600185) consentono, all'interno delle famiglie con evidente predisposizione ereditaria al cancro della mammella, l'identificazione dei portatori, che devono essere indirizzati agli opportuni programmi di sorveglianza e/o prevenzione.

Negli anni 2007-2011 presso la U.O. di Genetica Medica dell'Azienda Ospedaliera Sant'Andrea sono state effettuate 138 consulenze genetiche oncologiche (CGO) in pazienti affette da carcinoma mammario o con familiarità per tumore della mammella. Nell'ambito della CGO è stata valutata l'eleggibilità delle pazienti al test genetico per la ricerca di mutazione nei geni BRCA1/2 in base alla storia familiare, ai criteri tabellari e a modelli predittivi. La probabilità per ogni paziente di essere portatore di mutazione in uno dei due geni è stata calcolata utilizzando il software BRCAPRO (University of Texas <http://www.stat.duke.edu/~gp/brcapro.html>). Il test è stato proposto alle pazienti la cui probabilità di mutazione è risultata >10%; in sede di CGO sono risultate eleggibili al test 82 pazienti (60%). La ricerca delle mutazioni predisponenti nei geni BRCA1/2 è stata condotta mediante sequenziamento diretto degli esoni codificanti e delle regioni introniche adiacenti (+/-20bp). L'analisi MLPA per la ricerca di riarrangiamenti genomici è ancora in corso. Il 16% dei pazienti selezionati per il test sono risultati portatori di mutazione patogenetica: 5 nel gene BRCA1 e 8 nel gene BRCA2. Sono state inoltre identificate 23 varianti alleliche nel gene BRCA1, di cui 3 UV (varianti a significato patogenetico incerto) localizzate negli esoni codificanti +/-20bp e 44 varianti nel gene BRCA2, di cui 15 UV localizzate negli esoni codificanti +/-20bp. L'interpretazione del risultato e la consegna del referto in sede di consulenza ha completato il percorso diagnostico ed indirizzato la paziente, a seconda del risultato ottenuto, verso l'appropriata sorveglianza oncologica.

SUSCETTIBILITÀ GENETICA ALLA PSICOSI IN RELAZIONE ALL'USO DI CANNABIS: REVISIONE SISTEMATICA DELLA LETTERATURA

V. Uliana¹, A. Tomassini², R. Pollice³, M. Gennarelli⁴, C. Bonvicini⁵, F. Faravelli⁶, M. Casacchia², E. Di Maria⁷

¹SSD Genetica Medica, EO Ospedali Galliera, Genova e Dottorato di ricerca in Medicina traslazionale, Università di L'Aquila

²Dip. di Scienze della Salute, Università di L'Aquila e Dottorato di ricerca in Medicina traslazionale, Università di L'Aquila

³Dip. di Scienze della Salute, Università di L'Aquila

⁴IRCCS Centro S. Giovanni di Dio - Fatebenefratelli, Brescia e Dip. di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università di Brescia

⁵IRCCS Centro S. Giovanni di Dio - Fatebenefratelli, Brescia

⁶SSD Genetica Medica, EO Ospedali Galliera, Genova

⁷SSD Genetica Medica, EO Ospedali Galliera, Genova e Dip. di Scienze della Salute, Università di Genova

La psicosi può essere interpretata come un fenotipo complesso, causato da una suscettibilità in parte geneticamente determinata e dall'esposizione a fattori ambientali di rischio. Le analisi di genetica formale hanno evidenziato un'elevata ereditabilità nelle psicosi, che nella schizofrenia è stimata fino all'80-85%. Gli studi epidemiologici suggeriscono che uno dei fattori ambientali implicati nelle psicosi è l'assunzione di cannabis. La relazione tra cannabis e psicosi può essere indagata applicando il modello di interazione gene-ambiente (GxE). La letteratura recente si è focalizzata sull'identificazione di varianti genetiche che modulano l'effetto della cannabis nello sviluppo di psicosi.

Abbiamo effettuato una revisione sistematica degli studi primari che riportano le misure dirette del rischio genetico nell'associazione tra cannabis e psicosi e che abbiano considerato l'utilizzo di cannabis come un fattore ambientale secondo il modello GxE. La ricerca sistematica mediante PubMed utilizzando una ricerca combinata ha individuato 187 documenti, dei quali 113 sono stati esclusi in quanto non rispondenti ai criteri. Dei 74 articoli esaminati, 60 erano review; 14 studi primari sono stati inclusi e considerati nel processo di estrazione dei dati.

Di questi riportiamo una sinossi strutturata, con popolazione studiata, disegno dello studio, valutazione dell'uso di cannabis, varianti genetiche esaminate, misure di esito e sintesi dei risultati. Tutti gli studi hanno applicato l'approccio gene candidato: il gene COMT è il più studiato; altri geni esaminati sono CNR1, BDNF e SLC6A4; uno studio ha utilizzato un approccio a più stadi ed ha identificato un nuovo gene candidato, AKT1. Gli studi sono risultati molto eterogenei, soprattutto in termini di progettazione e di scelta delle misure di esito. I risultati sono talvolta contrastanti.

Discutiamo lo stato e le limitazioni delle ricerche genetiche sull'interazione tra cannabis e psicosi, concludendo che sono necessari nuovi studi primari per effettuare una sintesi efficace dei risultati. Dovrebbe inoltre essere incoraggiata l'armonizzazione dei dati, integrata con l'utilizzo di tecnologie genetiche e di metodi bioinformatici di recente sviluppo.

IDENTIFICAZIONE DI NUOVI GENI COINVOLTI NELLE DISTROFIE MUSCOLARI DEI CINGOLI MEDIANTE ARRAYS E SEQUENZIAMENTO DI NUOVA GENERAZIONE (NGS)

A. Torella¹, F. Del Vecchio Blanco³, M. Dionisi², A. Garofalo³, M. Iacomino³, M. Mutarelli², M. Savarese¹, G. Piluso¹, V. Nigro¹

¹Dip. di Patologia Generale-Lab. di Genetica Medica, Seconda Università degli Studi di Napoli, Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM)

²Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM)

³Dip. di Patologia Generale-Lab. di Genetica Medica, Seconda Università degli Studi di Napoli

Campioni di DNA di soggetti affetti da distrofia muscolare sono stati da noi analizzati per i geni responsabili di LGMD: il 30% dei pazienti presentava una mutazione nel gene CAPN3, il 10% nel gene DYSF, il 10% nei geni dei sarcoglicani e un altro 10% negli altri geni noti LGMD:LGMD2A-N. Una significativa percentuale di pazienti con LGMD non aveva alcuna mutazione nei 18 geni LGMD scoperti finora. In particolare, il 40% dei pazienti non ha una diagnosi molecolare. La spiegazione è da ricercare nell'elevata eterogeneità genetica. Le tecniche tradizionali presentano l'inconveniente di concentrare la ricerca delle mutazioni su un singolo gene alla volta. Inoltre, gli attuali esami genetici sono lunghi, costosi e senza effetti. I nuovi potenti approcci per l'analisi del DNA, come la next-generation sequencing (NGS) sono in procinto di rivoluzionare il campo con un singolo strumento in grado di analizzare l'intero genoma umano per molte volte.

La nostra ricerca ha combinato analisi di linkage basata su SNP array e la tecnologia NGS al fine di scoprire mutazioni "orfane" di LGMD.

I pazienti oggetto di studio sono stati selezionati secondo i seguenti criteri: a)diagnosi clinica di LGMD; b)diagnosi molecolari non concluse, c)la maggior severità della malattia;

Tutti gli altri casi sono stati studiati mediante 8x60k Motor Chip, un array-CGH basato su oligonucleotidi con una copertura esonica completa dei geni coinvolti nelle malattie neuromuscolari che permette di individuare delezioni o duplicazioni deleterie. Gli esomi di 16 soggetti appartenenti a 7 diverse famiglie sono stati sequenziati mediante NGS utilizzando la piattaforma SOLID e, in parallelo, (1 famiglia) l' Illumina HiSeq2000. Un certo numero di mutazioni sono state identificate. In particolare quattro membri affetti di una famiglia con ereditarietà AD (LGMD1F) presentano una singola mutazione (frame-shift) non trovata negli altri membri della famiglia o controlli. In una seconda famiglia LGMD con ereditarietà AR abbiamo recentemente identificato una mutazione missenso in omozigosi nel gene ACADVL che è condivisa da tutti i membri affetti della famiglia e da altri pazienti provenienti dalla stessa area geografica.

DELEZIONI 11q: DESCRIZIONE DI UN CASO CON FOLLOW-UP DI OLTRE 10 ANNI E REVISIONE DELLA LETTERATURA

N. Villa¹, S. Redaelli², E. Sala¹, S. Lissoni¹, R. Solano¹, R. Nacinovich³, M. Bomba³, F. Neri³, P. Stoppa³, F. Broggi³, A. Selicorni⁴, L. Dalprà¹

¹*U.S. Genetica Medica, A.O. San Gerardo, Monza*

²*Dip. di Chirurgia e Medicina Interdisciplinare, Univ. Milano-Bicocca*

³*Neuropsichiatria Infantile, A.O. San Gerardo, Monza*

⁴*U.O.S. Genetica Clinica Pediatrica, Fondazione MBBM S. Gerardo, Monza*

In citogenetica, il ritrovamento di monosomia interstiziale 11q pura è un riscontro raro e occasionale. Qui descriviamo cariotipo e clinica di un bambino con delezione 11q interstiziale de novo indagato alla nascita e seguito fino ai 12 anni. Il cariotipo, richiesto per lievi dismorfismi e ipotonia, risultava 46,XY,del(11)(q13.5q21) con la citogenetica tradizionale e rivisitato con aCGH (180K con SNPs) mostrava una perdita 11q14.3q22.3 (92,434,372-109,584,301). I dati auxologici alla nascita erano nella norma. Segnalati episodi ricorrenti di broncospasmo, cianosi e desaturazione risoltisi spontaneamente. La crescita staturale continuava nell'infanzia ai limiti inferiori, a 12 anni era sotto il 3° centile, mentre il peso era compreso tra il 75° e il 90° centile (BMI=22,9). All'esame fisico presentava dismorfismi facciali, mani piccole, lieve miopia, schisi del palato molle e voce nasale. Da recenti indagini endocrinologiche emergeva un deficit di GH isolato e veniva iniziata terapia sostitutiva. L'esame neurologico a 1 mese di vita mostrava l'assenza di disfunzioni maggiori. Le sue tappe motorie sono state: controllo del capo a 4 mesi, posizione seduta senza supporto a 8 mesi, cammino a carponi a 11 mesi, posizione eretta con assistenza a 13 e cammino da solo a 24 mesi. Con l'età si consolidava il ritardo dello sviluppo, soprattutto riguardante il linguaggio. Il monitoraggio neuropsichiatrico, fino ai 12 anni, evidenzia l'acquisizione nel tempo di una buona autonomia personale e sociale e partecipazione in modo competitivo alle attività curriculari ed extracurriculari.

Dal 1975, anno della prima pubblicazione, ad oggi sono reperibili in letteratura 32 casi di monosomia pura 11q13-23 di cui solo 5 con caratterizzazione molecolare. Sulla base dell'ampia variabilità sia clinica (fenotipi normali in casi familiari e quadri clinici gravi) che di regione cromosomica coinvolta, non è possibile individuare aspetti clinici comuni e neppure una "small overlapping region" citogenetica essendo alcune delezioni più centromeriche ed altre più telomeriche, alcune di grandi dimensioni ed altre piccole.

ANALISI DEL CARIOTIPO IN 150 COPPIE CON POLIABORTIVITA': CASISTICA GENNAIO-LUGLIO 2012

M. Salierno¹, R. Farvelli¹, M. Calafati¹, A.L. Gambardella¹, A. Rosolia¹

¹Analisi Cliniche Mater Dei

²Analisi Cliniche Mater Dei

³Analisi Cliniche Mater Dei

⁴Analisi Cliniche Mater Dei

⁵Analisi Cliniche Mater Dei

PREMESSA I riarrangiamenti cromosomici sono alterazioni strutturali che possono dare origine a: delezioni, duplicazioni, inversioni e traslocazioni. Diversi studi hanno dimostrato che il 50% degli aborti spontanei precoci è legato ad anomalie cromosomiche. Tra queste le più frequenti sono le trisomie (27%), le poliploidie (10%), la monosomia del cromosoma X (9%), mentre i riarrangiamenti strutturali in toto vi partecipano solo per il 2% nelle gravidanze clinicamente riconosciute. **SCOPO DELLO STUDIO** Correlazione tra caratteristiche cliniche di coppie con storia di aborti spontanei ricorrenti e anomalie cromosomiche. **MATERIALI e METODI** L'analisi del cariotipo di 150 coppie, pervenute da gennaio a luglio 2012, è stata effettuata mediante la coltura di linfociti da sangue periferico e bandeggio GTG. I cromosomi sono stati sottoposti a digestione enzimatica con tripsina e colorati con Giemsa. I punti di rottura delle traslocazioni rilevate sono stati confermati con tecniche di citogenetica molecolare (FISH). **RISULTATI** La tecnica di bandeggio GTG ha evidenziato la presenza di 6 diverse traslocazioni bilanciate nei 300 cariotipi analizzati. L'analisi del cariotipo e la FISH, hanno fornito i seguenti risultati: 46,XY,t(4;18)(q21;q21,1); 46,XY,t(2;7)(q23;q32); 46,XX,t(5;6)(p15.1;q24); 46,XX,t(1;14)(q42;q22); 46,XX,t(13;18)(q21;q11.3); 46,XX,t(12;18)(q15;q12). **CONCLUSIONI** I cariotipi delle coppie analizzate hanno evidenziato in 6 casi su 300 (2%) una diversa traslocazione cromosomica bilanciata reciproca quale causa di aborto. Le traslocazioni reciproche sono riarrangiamenti strutturali di due cromosomi della stessa coppia o di coppie diverse, una persona su 625 risulta esserne portatore. Tali riarrangiamenti, bilanciati nei portatori, potrebbero sbilanciarsi nel feto con conseguenze fenotipiche relative ai cromosomi coinvolti e ai segmenti cromosomici duplicati e/o deleti. L'aumento di coppie con storia clinica di aborti spontanei e difficoltà riproduttive ha determinato un incremento della richiesta di approfondimento diagnostico trovando nell'analisi del cariotipo una metodica indispensabile. I nostri risultati concordano con i dati presenti in letteratura circa la percentuale (2%) con cui i riarrangiamenti cromosomici strutturali sono la causa di aborti spontanei.

LA SINDROME DI COWDEN INCONTRA LA SINDROME DI BIRT-HOGG-DUBE': DIFETTI GENETICI SPECULARI IN DUE TUMORI ONCOCITICI SINDROMICI

L.M. Pradella¹, M. Lang¹, I. Kurelac¹, E. Mariani¹, F. Guerra¹, A. MacKay², J.S. Reis-Filho², M. Seri¹, D. Turchetti¹, G. Gasparre¹

¹*Dip. Scienze Ginecologiche Ostetriche e Pediatriche, U.O. Genetica Medica, Policlinico Universitario S.Orsola-Malpighu, Via Massarenti 9, 40138 Bologna, Italy*

²*Molecular Pathology Team, The Breakthrough Breast Cancer Research Centre, ICR, A10 237 Fulham Road, London, SW3 6JB, UK*

La Sindrome di Birt-Hogg-Dubè (BHD), causata da mutazioni costituzionali di FLCN, è una malattia autosomica dominante caratterizzata dalla comparsa di fibrofolliculomi cutanei, cisti polmonari, pneumotorace spontaneo e tumori renali. L'associazione tra lesioni cutanee ed aumentato rischio di tumori caratterizza anche la Sindrome di Cowden (CS), malattia autosomica dominante causata da mutazioni germinali di PTEN.

I pazienti BHD e CS possono sviluppare oncocitomi, tumori rari di origine epiteliale fenotipicamente caratterizzati da iperplasia mitocondriale. Dal punto di vista funzionale, gli oncocitomi sporadici presentano un disassemblaggio della catena respiratoria dovuto a mutazioni patogene nei geni del DNA mitocondriale (mtDNA). La caratterizzazione genetica di un oncocitoma parotideo e di uno tiroideo sviluppati, rispettivamente, da un paziente BHD e da un paziente CS ha mostrato che la lesione BHD conserva l'allele wild-type di FLCN ma perde un allele di PTEN, mentre l'oncocitoma del paziente CS mostra perdita di eterozigosi di FLCN.

L'analisi eseguita mediante Array-CGH ha mostrato che entrambi i tumori presentano elevata stabilità genomica, il che tende ad escludere che le perdite delle regioni cromosomiche di PTEN/FLCN rappresentino un evento casuale.

Concludendo, si può avanzare l'ipotesi che FLCN, analogamente a PTEN, possa comportarsi in maniera discordante rispetto al meccanismo del Two Hits e possa, quindi, appartenere all'emergente classe di oncosoppressori aploinsufficienti. Inoltre, questo dato suggerisce, per la prima volta, un ruolo della doppia eterozigosi PTEN/FLCN nella trasformazione oncocitica associata alle sindromi CS e BHD e la propone come un meccanismo molecolare alternativo rispetto a quello indotto dalle mutazioni patogene dell'mtDNA, che rappresentano, invece, la caratteristica genetica degli oncocitomi sporadici

Role of miR-15/107 family of microRNAs on p35/CDK5 pathway in Alzheimer's disease

S. Moncini¹, M. Lunghi¹, F. Fontana², M. Denti², P. Riva¹, M. Venturin¹

¹*Dip. di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milano*

²*Centre for Integrative Biology, Università degli Studi di Trento, Trento*

A major neuropathological hallmark in Alzheimer's disease (AD) is the presence of neurofibrillary tangles composed of hyperphosphorylated Tau. CDK5 kinase has a key role in this abnormal phosphorylation of Tau and therefore has been implicated in AD neurofibrillary degeneration. CDK5 is activated by p35 or its proteolytic product, p25. p35 is encoded by the CDK5R1 gene, which displays a very large and conserved 3'UTR. We previously showed that CDK5R1 3'UTR is important for the control of its expression through the binding of miR-103/107 microRNAs. MiR-103/107 belong to the miR-15/107 family, a group of highly conserved miRNAs sharing the identical AGCAGC seed sequence, suggesting a role in the control of CDK5R1 expression for the whole miR-15/107 group.

In support of this hypothesis, we show that the transfection of SK-N-BE cells with LNA molecules specific for miR-103/107 or for the entire miR-15/107 group lead to a significant increase of CDK5R1 transcript levels, compared to the untransfected cells. Also, a significant reduction in p35 levels can be observed after transfection of miR-103, miR-15a and miR-16 precursors compared to control and scramble transfected cells.

Recent papers support the hypothesis that downregulation of these miRNAs is involved in AD pathogenesis, particularly affecting Tau phosphorylation. Thus, we hypothesize that reduced levels of miR-15/107 members lead to Tau hyperphosphorylation via upregulation of p25/p35 levels and consequent enhanced CDK5 kinase activity. We are studying CDK5R1 and miR-15/107 expression and the CDK5 phosphorylation activity on Tau in frozen brain tissues from AD patients and controls. In preliminary experiments, we extracted RNA from hippocampal, temporal cortex and cerebellum tissues of 8 AD patients and two healthy controls and measured the expression miR15/107 miRNAs, as well as of miR-34a, which has no regulatory function on CDK5R1. All miRNAs except miR-34a showed lower expression levels in AD patients compared to the controls in hippocampal tissue.

The possible involvement of miR-15/107 family in the control of p35/CDK5 pathway and in the pathogenesis of AD can identify a new potential target to be exploited for the setting up of innovative pharmacological therapies.

Project supported by FIRB2008.

CORNELIA DE LANGE X-LINKED: NUOVE ALTERAZIONI DI SMC1A, SPETTRO MUTAZIONALE ED ESPRESSIONE ALLELE-SPECIFICA PER LA COMPrensIONE DELL'ESPRESSIVITÀ CLINICA

I. Parenti¹, M. Masciadri², D. Rovina¹, J. Azzollini¹, A. Cereda⁴, L. Garavelli⁴, G. Limongelli⁵, A. Selicorni³, S. Russo², L. Larizza¹, C. Gervasini¹

¹*Genetica Medica, Dip. di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano, Milano*

²*Laboratorio di Citogenetica Medica e Genetica Molecolare, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano*

³*Dip. Pediatrico, Università Milano Bicocca, Fondazione MBBM, Osp. S. Gerardo, Monza*

⁴*Dip. Materno infantile –Genetica Clinica- Arcispedale S.Maria Nuova Reggio Emilia*

⁵*Dip. di Cardiologia, Ospedale Monaldi, Seconda Università di Napoli, Napoli*

La Sindrome di Cornelia de Lange (CdLS) è un raro disordine multisistemico caratterizzato da facies tipica, ritardo di crescita e psicomotorio e malformazioni agli arti. Il 55% dei pazienti presenta mutazioni del gene NIPBL (5p13.2), il 5% del gene SMC1A (Xp11.22). I pazienti con CdLS X-linked mostrano grave compromissione cognitiva senza malformazioni agli arti. SMC1A sfugge all'inattivazione del cromosoma X con livelli di espressione dell'allele "inattivo" compresi tra 15 e 30%; ciò spiega in parte la variabilità clinica dei pazienti di sesso femminile. La flowchart diagnostica CdLS prevede lo screening dei geni NIPBL e SMC1A. L'analisi di SMC1A condotta su 191 pazienti NIPBL-negativi ha portato all'identificazione di 8 pazienti (1#, 7#) portatori di 7 diverse mutazioni, 5 delle quali mai descritte. Tali mutazioni sono missenso (6) o delezioni in frame (1), nessuna coinvolgente il dominio hinge. Gli 8 pazienti mostrano elevata variabilità fenotipica. I trascritti di 8 controlli e 4 pazienti femmine con 4 diverse mutazioni di SMC1A, sono stati analizzati a livello di ciascuna mutazione (pazienti) e per lo SNP rs1264011 (pazienti e controlli) tramite Pyrosequencing per valutare un'eventuale espressione allelica differenziale. L'analisi dei trascritti ha evidenziato livelli di espressione dell'allele wild-type superiori rispetto al mutato, con media percentuale di espressione di 67/33 nelle pazienti e 53/47 nei controlli. A oggi, il numero di mutazioni di SMC1A descritte è di 28 in 45 diversi pazienti (80% sporadici, 20% familiari). L'espansione del repertorio mutazionale conferma l'assenza di mutazioni troncanti e di alterazioni del dominio hinge. Nei pazienti con CdLS X-linked è stata confermata mediante RT-PCR e Western-blotting la presenza del trascritto aberrante e della proteina mutante, lasciando supporre una funzione residua della proteina mutata nei maschi e un probabile effetto dominante negativo nelle femmine. L'espressione preferenziale dell'allele wild-type rispetto al mutato evidenziata suggerisce un nuovo meccanismo di modulazione fenotipica in particolare nelle femmine SMC1A-mutate. È in corso l'analisi quantitativa dei trascritti mediante real-time PCR e delle proteine SMC1A con Western-blotting semiquantitativo.

PROTEIN PATHWAY ACTIVATION ANALYSIS OF LEUKEMIA-ASSOCIATED JAK1 MUTANTS BY REVERSE-PHASE PROTEIN MICROARRAY (RPMA)

V. Fodale¹, E. Flex¹, E. Stellacci¹, E. Policicchio¹, J. Deng², E.F. Petricoin², M. Tartaglia¹

¹*Istituto Superiore di Sanità, Roma*

²*George Mason University, Manassas, VA, USA*

The Janus kinase 1 (JAK1) is a cytoplasmic tyrosine kinase that noncovalently associates with a variety of cytokine receptors and plays a nonredundant role in lymphoid cell precursor proliferation, survival and differentiation. We documented that somatic mutations in JAK1 occur in individuals with acute lymphoblastic leukemia (ALL) (Flex et al. 2008, *J Exp Med* 205:751-8). JAK1 mutations were more prevalent among adult subjects with T-cell precursor ALL, where they accounted for approximately 20% of cases, and were associated with poor response to therapy and overall prognosis. In order to understand the molecular and cellular mechanisms by which aberrant JAK1 function contributes to leukemogenesis we analyzed the signaling architecture of BaF3 cell lines stably expressing a series of leukemia-associated JAK1 gene mutations affecting different domain of the kinase by Reverse-phase Protein Microarray (RPMA). Cells were serum starved for 16 hours and lysed before and after induction with IL-3 for 20 minutes. RPMA analysis was performed to determine the phosphorylation/activation state of 102 different key signaling proteins involved in the major intracellular signal transduction pathways.

Statistical analysis revealed that the A634D substitution, affecting the pseudo-kinase domain, resulted in a different phosphorylation pathway profile compared to the wt protein.

Characterization of the consequences of leukemia-associated JAK1 mutants on the protein signaling network may help to identify new therapeutic targets for ALL. The present findings further document that functional protein pathway activation mapping using RPMA represents a powerful approach to uncovering the extent and branching of intracellular signaling dysregulation driven by aberrant function of signal transducers, and can successfully be used to elucidate the specific events associated with different mutations affecting the same protein.

Sindrome di Allan-Herndon-Dudley (AHDS) in due generazioni, causata da mutazione missense nel gene MCT8. Variabilità fenotipica con presenza di normali livelli sierici di T3

L. Boccone¹, V. Dessi², A. Meloni¹, G. Loudianos¹

¹*Osp Regionale Microcitemie, ASL 8, Cagliari*

²*Dip. di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università di Cagliari*

La S.Allan-Herndon-Dudley (AHDS) è una condizione X-linked caratterizzata da grave ritardo mentale, disartria, movimenti atetoidi, ipoplasia muscolare e paraplegia spastica associata ad alterazione dei livelli plasmatici degli ormoni tiroidei, in particolare ad alti valori di FT3.

E' legata a mutazioni del gene MCT8 che codifica per un trasportatore dell'ormone tiroideo (T3).

Noi descriviamo una famiglia con la presenza di mutazioni nel gene MCT8, p.A224T, in tre generazioni consecutive. In due generazioni è stata rilevata la mutazione allo stato emizigote in due maschi con anomalie neurologiche quali ritardo mentale, ipotonia assiale, ipertonìa degli arti e movimenti atetoidi. Uno di loro presentava il profilo ormonale tiroideo tipico dell'AHDS con alti valori di FT3, mentre l'altro mostrava livelli degli ormoni tiroidei nel range della normalità.

La mutazione è stata rilevata allo stato eterozigote in tre femmine che presentavano normali livelli ormonali tiroidei. I nostri risultati mostrano la difficoltà nel porre diagnosi di AHDS in pazienti con ritardo mentale X-linked sulla base dei soli aspetti clinici ed esami ormonali e suggeriscono l'importanza della ricerca di mutazioni nel gene MCT8 in pazienti con grave ritardo mentale, ipotonia assiale, distonia, paraplegia spastica e movimenti atetoidi anche se con profilo ormonale tiroideo normale.

MUTAZIONI MISSENSO NEL TRASPORTATORE ABCB6 CAUSANO LA PSEUDOIPERKALEMIA FAMILIARE

I. Andolfo¹, S. Alper², J. Delaunay³, C. Auriemma¹, R. Russo¹, M.R. Esposito¹, A. Sharma², B. Shmukler², D. Vandorpe², C. Brugnara⁴, L. De Franceschi⁵, A. Iolascon¹

¹CEINGE, *Biotechnologie Avanzate; Dip. di Biochimica e Biotechnologie Mediche, Università degli studi di Napoli "Federico II", Napoli, Italia*

²*Div. of Nephrology, Beth Israel Deaconess Med. Cen; Dep. of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA 02215, USA*

³UMR_S 779, INSERM, *Faculté de Médecine Paris-Sud, Université Paris-Sud, 94275 Le Kremlin-Bicêtre, Paris, France*

⁴*Dep. of Lab. Medicine, Children's Hospital Boston; Dep. of Pathology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA*

⁵*Dip. di Medicina, Università di Verona, Piazzale Lo Scuro 10, Verona, Italia*

La pseudoiperkalemia familiare isolata (FP; MIM 609153) consiste nell'aumento della concentrazione di potassio nel sangue, quando questo è tenuto ad una temperatura inferiore a 37°C. Questa condizione è trasmessa in maniera autosomica dominante e non è associata a segni o sintomi clinici, eccetto che per anomalie nella forma degli eritrociti. La FP fu descritta per la prima volta in una grande famiglia (detta FP Lille) di origine fiamminga (Dagher G, et al., 1989; Vantghem MC, et al., 1991). Tramite analisi di linkage, il locus causativo fu mappato sul cromosoma 2 (2q35-q36) (Carella M, et al., 2004). Successivamente, furono descritti i casi FP Chiswick e FP Falkirk, che mostravano un incremento marcato dell'MCV (Haines PG, et al., 2001).

L'identificazione del gene causativo della FP è stato eseguito tramite mappaggio genico funzionale e analisi di sequenza nelle tre grandi famiglie prima descritte. Tramite questo approccio abbiamo identificato due nuove mutazioni missenso, in eterozigosi, in uno stesso codone del gene ABCB6 in 20 individui affetti. Questo gene codifica per un trasportatore delle porfirine espresso sulla membrana degli eritrociti, già descritto come causativo di coloboma oculare e del gruppo sanguigno Lan (-/-) (Krishnamurthy PC, et al., 2006; Helias V, et al., 2012).

L'espressione dell'mRNA e della proteina ABCB6 aumenta durante il differenziamento eritroide dei precursori CD34+ e delle linee di eritroleucemia HEL e K562. Entrambe le mutazioni non alterano l'espressione di ABCB6 ed inoltre, la localizzazione cellulare della proteina resta invariata sia nei globuli rossi maturi sia nei precursori eritroidi. Tuttavia, analisi in silico della proteina ABCB6 hanno predetto cambiamenti della struttura tridimensionale per entrambe le mutazioni. L'over-espressione delle forme mutanti di ABCB6 in cellule K562 determina alterazioni del contenuto cationico cellulare rispetto alla forma wilde type.

Questo studio dimostra per la prima volta che mutazioni nel gene ABCB6 causano la pseudoiperkalemia familiare isolata.

UN CASO DI SINDROME DA DELEZIONE DI GENI CONTIGUI (SINDROME DI SOTOS COMPLICATA DA NEFROCALCINOSI)

L. Boccone¹, M. Mascia²

¹*U.O. D.H. e Ambulatorio di Genetica Clinica e Malattie Rare - Osp. Microcitemico – Cagliari*

²*Scuola di specializzazione in Genetica Medica - Osp. Microcitemico - Cagliari*

La Sindrome di Sotos è una sindrome da iperaccrescimento caratterizzata da segni facciali peculiari, macrocefalia, età ossea avanzata rispetto all'età cronologica, ritardo dello sviluppo di vario grado da lieve a severo. Segni clinici minori possono comprendere convulsioni, malformazioni cardiache e renali (più comunemente reflusso vescico-ureterale), scoliosi. Nel 90% dei casi è responsabile della sindrome una mutazione de novo nel gene NSD1 (nuclear receptor SET domain-containing protein) e fino a circa il 10% dei casi è causata da una microdelezione nella regione cromosomica 5q35.

In questo lavoro descriviamo un caso di una paziente di 2 anni che giunse alla nostra osservazione per iperaccrescimento, ritardo dello sviluppo psicomotorio e sospetta encefalopatia anossico-ischemica perinatale. All'esame obiettivo si rilevava un accrescimento staturale-ponderale al di sopra del 90°centile e macrocrania (98°centile). Con il forte sospetto diagnostico di S.Sotos si eseguiva lo studio molecolare che evidenziava una delezione del gene NSD1 (analisi degli esoni da 2 a 23 del nsd1 mediante DHPLC e sequenziamento diretto delle varianti cromatografiche, metodo di indagine MLPA). Per la definizione dell'ampiezza e dei confini della delezione è stata effettuata anche l'analisi mediante array CGH che ha mostrato una delezione di 2.022 Mb alle bande q35.2q35.3 di un cromosoma 5.

Dai nostri esami diagnostici effettuati la paziente risultava essere inoltre affetta da nefrocalcinosi midollare renale con ipercalciuria. Nella regione cromosomica interessata dalla delezione è infatti presente il gene SLC34A1 che codifica per un cotrasportatore Sodio-Fosfato di membrana delle cellule tubulari renali prossimali.

Si può concludere che la delezione cromosomica del nostro caso descritto, che interessa sia il gene NSD1 che il gene SLC34A1, giustifica la sindrome da geni contigui caratterizzata dalla presenza sia della S.Sotos che della nefrocalcinosi di cui in letteratura sono stati riportati allo stato attuale solo due casi.

RUOLO DI EPIMUTAZIONI COSTITUZIONALI E SOMATICHE DEL GENE MLH1 IN PAZIENTI CON SOSPETTA SINDROME DI LYNCH

F. Crucianelli¹, R. Tricarico¹, D. Turchetti², C. Di Gregorio³, S. Civitelli⁴, M. Genuardi¹

¹Sez. Genetica Medica, Dip. Fisiopatologia Clinica, Univ. Firenze

²Genetica Medica, Dip. Scienze Ginecologiche, Ostetriche e Pediatriche, Univ. Bologna

³Anatomia Patologica, AOU Policlinico Univ. Modena

⁴Dip. Chirurgia, Univ. Siena

Circa il 5-10% dei carcinomi coloretali (CCR) presenta metilazione del promotore del gene del mismatch repair (MMR) MLH1. Questa alterazione epigenetica è stata riscontrata anche in DNA costituzionale come rara causa di predisposizione a tumori dello spettro della sindrome di Lynch (LS). La frazione di casi di sospetta LS attribuita ad epimutazioni di MLH1 è compresa tra 0,6 e 13%. Per determinare il ruolo di difetti epigenetici in una casistica di sospetta LS, abbiamo analizzato campioni biologici di tessuto tumorale e normale (leucociti, in tutti i casi; mucosa del colon in 1 caso) di una serie di pazienti selezionati in base alle seguenti caratteristiche: 1) positività per Revised Bethesda Criteria per sospetta LS; 2) alterata/assente espressione della proteina MLH1 (con o senza alta instabilità microsatellitare) nel campione neoplastico; 3) assenza di mutazioni di sicuro significato patogenetico del gene MLH1. In totale sono stati analizzati 21 casi indipendenti, 7 dei quali presentavano varianti di significato incerto (VUS) missenso di MLH1, potenzialmente patogenetiche. Lo studio della metilazione di MLH1 è stato eseguito su DNA genomico da leucociti periferici e su DNA tumorale, isolato da tessuto incluso in paraffina, mediante metodica MS-MLPA, utilizzando kit specifico per i geni MMR (ME011 kit, MRC Holland, Amsterdam). Metilazione costituzionale di tutte le sonde corrispondenti al gene MLH1 è stata riscontrata in un caso, che non presentava varianti di sequenza di MLH1, clinicamente caratterizzato dallo sviluppo di tumori multipli (endometrio, pelvi renale, mammella e retto) dopo i 50 anni di età con storia familiare negativa per neoplasie. In 6/15 casi di cui è stato analizzato il DNA tumorale con MS-MLPA è stata riscontrata ipermetilazione somatica di MLH1; di questi casi, 1 era quello della paziente con metilazione costituzionale, 1 era di un paziente poi risultato essere affetto da sindrome di Cowden, e 1, debolmente positivo, era di una paziente con una VUS missenso potenzialmente patogenetica. I risultati ottenuti potranno contribuire a definire le caratteristiche cliniche e molecolari da valutare nell'ambito dell'iter di selezione per l'individuazione di epimutazioni costituzionali di MLH1 in soggetti con sospetta LS.

FORMAZIONE DE NOVO DI UN CROMOSOMA X ISODICENTRICO: MOSAICISMO 46,X,idic(X)(q24)/45,X IN UNA PAZIENTE AFFETTA DA MENOPAUSA PRECOCE CON FENOTIPO TURNER-LIKE

T. Granata¹, E. Colao¹, D. Nocera¹, E. Luciano¹, F. Trapasso¹, R. Iuliano¹, N. Perrotti¹, P. Malatesta¹

¹*U.O. Genetica Medica, A.O. Mater Domini, Catanzaro*

La Sindrome di Turner è una patologia cromosomica femminile causata dall'assenza di uno dei cromosomi X o di parte di esso. Delle donne affette, circa la metà ha un assetto cromosomico 45,X, il 5-10% presenta alterazioni strutturali di uno solo dei cromosomi X e, il resto, numerose combinazioni a mosaico associate a caratteristiche fenotipiche variabili. I segni clinici tipici includono bassa statura, insufficienza ovarica pre-puberale, mancato sviluppo degli organi sessuali secondari, infertilità, dismorfismi cranio-facciali, coartazione dell'aorta e patologie addizionali quali diabete e ipotiroidismo. I riarrangiamenti cromosomici più comuni sono associati alla formazione di isocromosomi dell'X, con perdita, totale o parziale, di uno dei bracci e duplicazione, totale o parziale, dell'altro. I cromosomi X isodicentrici, dovuti a delezione del braccio lungo Xq e quindi a duplicazione dell'Xp, non sono comuni ed in condizioni di mosaicismo, complicano fortemente la correlazione cariotipo-fenotipo. Nella formazione degli isocromosomi si ha sempre perdita del materiale genetico localizzato sul tratto deleto e acquisizione di quello presente sul braccio duplicato. Generalmente, quando l'isodicentrico è in un mosaico con 45,X il fenotipo è altamente variabile, con o senza segni turneriani, e legato alla distribuzione del mosaico nelle cellule e al meccanismo di inattivazione dell'X. Attualmente, le manifestazioni cliniche della TS sono viste soprattutto come il risultato dell'aploinsufficienza dei geni localizzati nelle regioni pseudoautosomiche dell'X. Questo lavoro è il risultato di un'indagine genetica condotta su una giovane paziente con menopausa precoce, diabete mellito di tipo 2 e tiroidite cronica autoimmune, senza alterazioni scheletriche e variazioni staturali al disotto della norma. L'analisi del cariotipo, tramite tecniche di citogenetica classica, ha evidenziato un mosaico 46,X,rea(X)/45,X e la successiva applicazione della FISH ha permesso di capire meglio il riarrangiamento subito da una delle X permettendo di convertire la formula del cariotipo in 46,X,idic(X)(q24)/45,X. Dalle valutazioni fatte in relazione alle anomalie riscontrate nella paziente, un simile contesto cromosomico, potrebbe correlarsi ad un fenotipo Turner-like.

Epidemiologia molecolare ed identificazione di nuove varianti causative della Anemia Diseritropoietica Congenita di tipo II (CDA II)

R. Russo¹, M.R. Esposito¹, A. Gambale¹, C. Langella¹, F. Vitiello¹, A. Iolascon¹

¹*CEINGE Biotechnologie Avanzate, Napoli, Italia; Dip. di Biochimica e Biotechnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli, Italia*

L'anemia diseritropoietica congenita di tipo II (CDA II) è una malattia autosomica recessiva caratterizzata da eritropoiesi inefficace, il cui gene causativo, SEC23B, è stato identificato nel 2009 (Schwarz, 2009). La prevalenza della CDA II in Europa mostra sostanziali variazioni tra le diverse nazioni. Ad oggi, più di 60 differenti mutazioni in 134 casi indipendenti sono state descritte, ma solo due, E109K e R14W, sembrano avere una particolare ricorrenza (Iolascon, 2011; Russo, 2011; Punzo, 2011; Liu, 2012).

In questo lavoro abbiamo descritto 16 nuovi casi non imparentati tra loro e 9 mutazioni non ancora annotate, ampliando in tal modo la casistica mondiale di pazienti CDA II a 164 casi totali (150 non imparentati). Di tale casistica, la coorte di pazienti da noi caratterizzata rappresenta il 67.7%, composta da 111 individui affetti (100 non imparentati) con un totale di 40 differenti mutazioni. È interessante sottolineare che il 13.3% dei casi (20/150 pazienti) ha un pattern di ereditarietà incompleto, presentando mutazioni in un solo allele. Ciò induce a ipotizzare il coinvolgimento delle regioni regolatorie del gene SEC23B nonché la possibile presenza di riarrangiamenti genomici come ulteriore meccanismo patogenetico della CDA II.

Scopo ulteriore dello studio è stato quello di caratterizzare la distribuzione geografica a livello mondiale di tutte le varianti causative di CDA II descritte tra il 2009 e il 2012. Tale analisi ha evidenziato da un lato la presenza di un elevato numero di mutazioni private, dall'altro l'esistenza di multipli effetti fondatori in diverse aree geografiche del globo. In particolare, il bacino del Mediterraneo (Marocco, Israele, Italia) mostra frequenze elevate di due mutazioni, E109K e R14W, come già descritto (Amir, 2011; Russo, 2011). Nelle regioni dell'Asia meridionale, India e Pakistan, la mutazione Y462C copre il 100% degli alleli; analogamente, le mutazioni R18H e A524V sembrano particolarmente comuni (50% degli alleli) in Polinesia Francese e Nuova Zelanda.

Complessivamente, questi risultati costituiscono un valido strumento per realizzare una diagnosi molecolare mirata di CDA II.

NUOVA MUTAZIONE NEL DOMINIO CATALITICO DI MMP2 (MATRIX METALLOPROTEINASE 2) IN DUE FRATELLI CON OSTEOLISI MULTICENTRICA, NODULI SOTTOCUTANEI E ARTROPATIA NELLO SPETTRO TORG-WINCHESTER

J. Azzollini¹, C. Gervasini¹, A. Fratoni², I. Parenti¹, L. Pietrogrande³, L. Larizza¹

¹*Genetica Medica, Dip. di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano, Milano*

²*U.O. Pediatria, A.O. G. Salvini, presidio di Rho*

³*U.O. Complessa di Ortopedia e Traumatologia, Osp. San Paolo, Milano*

La sindrome di Torg-Winchester e la variante Nodulosi-Artropatia-Osteolisi (OMIM #259600) sono condizioni autosomiche recessive molto rare (<40 casi descritti) caratterizzate da uno spettro fenotipico che include osteolisi multicentrica, localizzata soprattutto a mani e piedi, noduli sottocutanei fibro-adiposi, artropatia con contratture articolari ingravescenti e altre caratteristiche come bassa statura, facies grossolana, opacità corneali e iperpigmentazione cutanea. Alla base di queste condizioni sono state identificate, a partire dal 2001, mutazioni a carico di un unico gene, MMP2 (16q13), che codifica per una metalloproteinasi della matrice. Fino ad ora sono state descritte solo 8 mutazioni (3 troncanti, 3 missenso, 1 splicing, 1 delezione in-frame) in 8 famiglie di diversa provenienza geografica.

Sono giunti alla nostra osservazione due fratelli italiani (43f, 37m), figli di genitori sani e consanguinei, con quadro clinico sovrapponibile ed esordio tra 3 e 6 anni con osteoporosi e noduli sottocutanei palmo-plantari. Dall'adolescenza sono comparse retrazioni tendinee e artralgie agli arti superiori ad andamento progressivo, osteolisi alle falangi dei piedi, strie cutanee fibrose e iperpigmentate. La sorella mostra pterigio oculare bilaterale dai 30 anni d'età.

Sulla base del quadro clinico e della condivisione di marcatori polimorfici nella regione cromosomica di MMP2, abbiamo condotto l'analisi mutazionale dell'intero gene tramite sequenziamento diretto. E' stata identificata in entrambi una nuova mutazione missenso in omozigosi nell'esone 8, c.1228G>C p.G410R. Tale sostituzione è localizzata nel dominio catalitico di MMP2, in una regione estremamente conservata evolutivamente. La medesima alterazione non è stata riscontrata in 260 individui di controllo ed è predetta patogenetica da strumenti bioinformatici (Mutation Taster, PolyPhen-2).

Tra le 8 mutazioni descritte 3 risiedono nel dominio catalitico (p.E404K, p.V400del, p.G406D) in pazienti con fenotipo Winchester: p.G410R rappresenta la prima alterazione del dominio catalitico associata a fenotipo Torg-NAO, avvalorando la complessità dell'associazione genotipo-fenotipo.

Si prevede di effettuare l'analisi del trascritto e della proteina mutante mediante saggio funzionale specifico.

CLASSIFICAZIONE EZIOPATOGENETICA DELLE MALFORMAZIONI CONGENITE DELL'ARTO SUPERIORE: DATI SU 455 PAZIENTI AFFERENTI ALL'AMBULATORIO MULTIDISCIPLINARE AD ESSE DEDICATO

D. Carli¹, P. Ferrari², A. Elmakky¹, S. Sartini³, T. Fairplay³, G.L. Di Gennaro⁴, M. Lando³, G. Bianconi⁵, S. Bernasconi⁶, A. Landi³, A. Percesepe¹

¹*Genetica Medica, Modena*

²*Pediatria, Modena*

³*Chirurgia della Mano, Modena*

⁴*Ortopedia, IOR, Bologna*

⁵*Psicologia Clinica, Modena*

⁶*Pediatria, Parma*

Dati specifici sull'incidenza dei diversi tipi di Malformazioni Congenite dell'Arto Superiore (MCAS) non sono disponibili, a causa della grande variabilità nella nosografia, prevalentemente morfologica, embriologica o proiettata al trattamento.

Scopo dello studio è di fornire una classificazione eziopatogenetica di una casistica afferente all'Ambulatorio Multidisciplinare delle MCAS del Policlinico di Modena al fine di valutarne l'applicabilità nel semplificare ed omogeneizzare i gruppi.

A tal fine sono stati considerati i casi afferenti al suddetto Ambulatorio nel periodo 2004-2012. I pazienti sono stati stratificati sulla base delle variabili cliniche e suddivisi in 2 categorie sulla base dell'eziologia genetica o multifattoriale della malformazione.

Su 455 casi di MCAS, in 191 è stata ipotizzata una base puramente genetica, mentre i restanti 264 casi sono stati classificati ad eziologia multifattoriale. Tra le due categorie non sono risultate differenze significative tra i sessi, mentre nei casi ad eziologia genetica è risultata significativamente maggiore la frequenza di casi familiari, con malformazioni bilaterali, simmetriche, con coinvolgimento degli arti inferiori e con altre malformazioni congenite e/o dismorfismi. Sia nelle forme genetiche che multifattoriali i difetti di formazione sono risultati i più frequenti (N=287, 29% vs 71% per le due classi eziologiche, rispettivamente), seguiti da quelli di separazione (N=107, 61% vs 39%), di accrescimento (N=37, 54% vs 46%) e dalle forme generalizzate (N=24, 100% vs. 0%). Un'ulteriore suddivisione dei difetti di formazione è stata possibile per i casi ad eziologia genetica (N=82), data la selettività del quadro e la specificità dell'asse interessato: nel 59% si è trattato di difetti radiali, nel 23% centrali, nel 18% ulnari. Nelle MCAS ad eziologia multifattoriale tale suddivisione non è stata possibile data l'aspecificità dei difetti.

I risultati mostrano 2 classi eziologiche di MCAS differenti per le caratteristiche cliniche del paziente, per il tipo di difetto e per le modalità di interessamento dell'asse colpito. Questi dati possono essere d'ausilio nell'inquadramento diagnostico, nell'indicazione a eseguire test genetico e nella valutazione del rischio di ricorrenza.

CISTINURIA: UN RARO CASO CON GENOTIPO AAB. CONSIDERAZIONI SULL'ESECUZIONE DEL TEST DIAGNOSTICO GENETICO-MOLECOLARE

F. Benedicenti¹, P. De Bonis², F. Stanzial¹, F. Inzana¹, L. Bisceglia²

¹*Serv. di Consulenza Genetica dell'Alto Adige, Dip. di Pediatria, Osp. "S. Maurizio", Bolzano*

²*U.O.C. Genetica Medica, IRCCS Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza", S. Giovanni Rotondo (FG)*

INTRODUZIONE: la cistinuria (Cu) è una rara malattia AR, caratterizzata da urolitiasi cistinica e dovuta a un difettoso riassorbimento tubulare della cistina e degli aminoacidi dibasici, i cui livelli urinari risultano notevolmente aumentati. La Cu di tipo A (CuA) è causata da mutazioni (μ) del gene SLC3A1: genotipo (Gt) AA; quella di tipo B (CuB) da μ del gene SLC7A9: Gt BB. Tra queste 2 forme non ci sono differenze cliniche ma gli eterozigoti (Hz) per la CuA hanno di solito normali (N) livelli di aminoaciduria (aa-uria), mentre molti Hz per la CuB mostrano un fenotipo escretore (FE): moderato aumento dei livelli urinari di cistina e aminoacidi dibasici. Sono inoltre noti rari casi di Cu con Gt misto AAB o BBA.

CASO CLINICO: probanda (P) di 24a con urolitiasi cistinica, Hz composta per 2 μ di SLC3A1 (M467T/Y151N) ed Hz per 1 μ di SLC7A9 (T123M): Gt AAB. Madre con aa-uria N, Hz per la Y151N: Gt A. Padre non-afetto, con FE, doppio Hz per la M467T e la T123M: Gt AB. Partner della P con aa-uria N ed esito negativo dell'analisi di SLC3A1 e SLC7A9.

COMMENTI: non conoscendo il fenotipo dei genitori (G), nella P si è partiti con l'analisi di SLC3A1. L'identificazione di 2 μ note, confermate nei G, ha fatto ritenere conclusa l'analisi e porre una diagnosi di CuA, che è stata messa in discussione dal risultato dell'aa-uria paterna: FE non riconducibile alla sola M467T. Nella P è stato quindi analizzato SLC7A9 ed è stata identificata la μ poi confermata anche nel padre. Ciò sottolinea l'opportunità di valutare l'aa-uria in entrambi i G dei P. L'esistenza di Cu con Gt AAB e BBA dovrebbe comunque essere un'indicazione ad analizzare nei P entrambi i geni, indipendentemente dal profilo dell'aa-uria dei G e dal riscontro di 2 copie mutate dello stesso gene. Infatti, in presenza di 2 G con FE (probabile Gt B), 1 di loro o entrambi potrebbero essere Hz anche per 1 μ di SLC3A1 e, in presenza di 2 G non-escretori (probabile Gt A), 1 di loro o entrambi potrebbero essere Hz anche per 1 μ di SLC7A9 associata ad aa-uria N. Sebbene nelle Cu a Gt misto la μ nel 2° gene non influenzi la gravità della malattia, essa influenza la stima del rischio di ricorrenza: nel partner di un individuo affetto con Gt AAB o BBA (o Hz AB) è indicato analizzare i 2 geni.

ANALYSIS OF THE ROLE OF CRIPTO IN COLON CARCINOMA DEVELOPMENT USING CRIPTO HETEROZYGOUS MICE AS MODEL SYSTEM

E. Giorgio¹, A. Liguoro¹, A. Barbieri², L. D'Orsi¹, G. Palma², C. Arra², G.L. Liguori¹

¹*Istituto di Genetica e Biofisica "A. Buzzati-Traverso" CNR Napoli*

²*Istituto Nazionale Tumori Fondazione "G Pascale" Napoli*

Cripto, also named Teratocarcinoma derived growth factor 1 (Tdgf1), is the founding member of the EGF-CFC family of structurally related proteins that have been identified in several vertebrate species. Cripto plays an important role during early embryo development and also during cancer progression. Cripto is expressed with high frequency in different human epithelial cancers, mainly breast and colon cancers. Moreover, in the plasma of healthy volunteers low levels of Cripto were detected, whereas a statistically significant increase was found in patients with colon and breast carcinoma. Functional data indicate that downregulation of Cripto expression in coloncarcinoma cell lines affects transformed phenotype. On the other hand, Cripto overexpression induces apoptosis both in vitro, in HC-11 mouse mammary epithelial cells and in vivo in mouse mammary gland. In the latter case, however, mice develop breast adenocarcinoma after a long latency period. These results suggest that Cripto is involved in the control of cell proliferation and/or apoptosis during tumor progression, but the mechanism involved is still unclear. Our main goal is to explore in vivo the role of Cripto in colon tumor progression and study the mechanism involved. At this purpose, we have chosen an experimental mouse model to analyse the development of colon cancer, based on the mutagenic agent azoxymethane (AOM) that exerts colonotropic carcinogenicity. We analysed both wt and Cripto heterozygous mice generated in our laboratory, while the Cripto^{-/-} mice die during early embryonic life. Wt and Cripto heterozygotes respond differentially to AOM treatment, meaning that Cripto haploinsufficiency affects colon cancer development. Surprisingly, Cripto^{+/-} mice show reduced apoptosis and develop tumors at a higher frequency, with increased multiplicity and tumor area than wt mice. These results suggest that Cripto heterozygotes have a higher susceptibility to AOM for the development of colon tumors and provide the first in vivo functional evidence of a role of Cripto in colon cancer.

LIPOMATOSI MULTIPLA SIMMETRICA: DESCRIZIONE DI UN PAZIENTE CON ESPRESSIVITÀ CLINICA ECLATANTE

M. Della Monica¹, F. Lonardo¹, F. Acquaviva¹, M. Pinelli², M.G. Di Gregorio¹, P. Fontana², G. Scarano¹

¹*U.O. Genetica Medica, A.O.R.N. "Gaetano Rummo" Benevento*

²*Scuola Spec. Genetica Medica, Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi "Federico II", Napoli*

Una massa in sede sottocostale dx si manifesta in un paziente adulto all'età di 45 anni e, dopo l'asportazione chirurgica, si rivela essere un lipoma semplice. L'intervento non risulta risolutivo in quanto successivamente, in modo lento, costante, progressivo, si evidenziano sempre nuove formazioni al collo, al tronco, agli arti in modo speculare e simmetrico. Le diverse bonifiche chirurgiche sono inutili per la rapida ricomparsa delle formazioni. Il fenotipo attuale del paziente è falsamente florido, con aspetto "pseudo-atletico", ma le masse, voluminose, comportano una significativa riduzione dell'autonomia personale e lavorativa oltre a sintomatologia dolorosa da compressione. La storia personale rivela esposizione al fumo (30 sigarette/die) e consumo di alcool (1 lt di vino + 2-3 birre/die). La storia familiare non è contributiva.

Il quadro clinico è compatibile con la diagnosi di Lipomatosi multipla simmetrica familiare (Multiple Symmetric Lipomatosis, MSL anche conosciuta come malattia di Madelung o sindrome di Launois-Bensaude o anche lipomatosi benigna simmetrica, OMIM 151800). La condizione è relativamente rara (o forse sottostimata) con un'incidenza nel bacino del Mediterraneo di 1/25.000, preferenza del sesso maschile ed età d'insorgenza tra i 30 e i 60 anni. La causa non è nota, anche se presumibilmente ha una patogenesi multifattoriale. E' significativamente associata con l'assunzione di alcool o con altri disturbi metabolici (anomala tolleranza al glucosio, eccessiva secrezione di insulina, dislipidemia, acidosi renale tubulare, enzimopatia epatica, disendocrinopatie) e può complicarsi ulteriormente con sintomi da neuropatie somato-sensoriali o con sindrome mediastinica dovuta all'infiltrazione di tessuto adiposo nel mediastino. I casi descritti in letteratura sono poche centinaia. A seconda della disposizione delle masse, si è proposta una classificazione in forma prossimale (interessamento solo dei cingoli), centrale (arti e tronco), distale (parte terminale degli arti). Il caso da noi descritto è uno dei pochi a presentare un quadro clinico così eclatante e completo (forma prossimale e centrale).

DIAGNOSI PRENATALE PER SINDROME DELLE ARTERIE TORTUOSE: IDENTIFICAZIONE DI UNA NUOVA MUTAZIONE NEL GENE SLC2A10 IN CORSO DI GRAVIDANZA A RISCHIO

M. Della Monica¹, M. Ritelli², N. Chiarelli², F. Acquaviva¹, M. Pinelli³, M. Colombi²

¹*U.O. Genetica Medica, A.O.R.N. "Gaetano Rummo" Benevento*

²*Sezione di Biologia e Genetica, Dip di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Brescia*

³*Scuola di Spec. in Genetica Medica, Dip di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi "Federico II", Napoli*

La sindrome delle arterie tortuose (ATS, MIM #208050) è una malattia rara del tessuto connettivo a trasmissione autosomica recessiva, caratterizzata da tortuosità e allungamento delle arterie di medio e grande calibro, con propensione alla formazione di aneurismi, dissecazione vascolare e stenosi delle arterie polmonari. Sono caratteristici alcuni segni cranio-facciali (viso allungato, blefarofimosi, micrognazia, palato ogivale e naso a becco), cute elastica e iperestensibile, ernie, alterazioni scheletriche, ipermobilità articolare, contratture congenite, cheratocono e ipotonia generalizzata. L'ATS è dovuta a mutazioni nel gene SLC2A10, che codifica per il trasportatore facilitato del glucosio 10 (GLUT10). Il ruolo di GLUT10 nella patogenesi della malattia non è ancora definito, anche se diverse evidenze suggeriscono che le mutazioni di SLC2A10 con la perdita di funzione di GLUT10 influenzino la biosintesi di diverse proteine e dei proteoglicani della matrice extracellulare, con conseguente disorganizzazione. Una nuova ipotesi propone che GLUT10 sia un trasportatore di vitamina C. Sono state finora riportate 19 mutazioni del gene SLC2A10 in 35 famiglie. Solo due casi sono stati diagnosticati in epoca prenatale. Riportiamo un caso di consulenza genetica prenatale per ATS, richiesta da genitori non consanguinei nel primo trimestre della seconda gravidanza. Il primo figlio era deceduto all'età di 11 mesi in seguito ad un intervento cardiocirurgico con diagnosi di "sindrome delle arterie tortuose con stenosi periferiche". Allo scopo di individuare la possibile condizione di portatore nei genitori, è stata effettuata l'analisi molecolare del gene SLC2A10. L'indagine ha evidenziato in entrambi la presenza in eterozigosi della mutazione novel c.1465G>C (p.G489R) nell'esone 4 del gene. La mutazione è causale poiché sostituisce un amino acido altamente conservato nel dominio transmembrana 12 del GLUT10. Questi risultati hanno confermato la diagnosi clinica del primo figlio deceduto e hanno permesso di offrire la diagnosi prenatale per la gravidanza in corso. L'esame molecolare del DNA fetale ottenuto da amniociti ha evidenziato la presenza in eterozigosi della mutazione causale escludendo la presenza della malattia nella gravidanza in corso.

AGENESIA DELLA MANO SINISTRA, MARKER CROMOSOMICO DE NOVO A MOSAICO E DISOMIA UNIPARENTALE MATERNA SEGMENTALE DEL CROMOSOMA 14

F. Lonardo¹, V. Pecile², A.M. Nardone⁵, D. Postorivo³, M.A. Police⁴, M. Ciavarella¹, M. Maioli¹, F. Scarano⁵, P. Fontana⁵

¹*U.O. Genetica Medica, A.O.R.N. "Gaetano Rummo" Benevento*

²*Lab. di Genetica Medica, IRCSS Pediatrico Burlo Garofolo, Trieste*

³*U.O. Lab. di Genetica Medica, Policlinico Tor Vergata, Roma*

⁴*U.O. Lab. di Genetica Medica, A.O.R.N. San Giuseppe Moscati, Avellino*

⁵*Scuola di Spec. in Genetica Medica, Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi "Federico II", Napoli*

Una coppia di genitori non consanguinei (madre 41 anni, padre 61 anni) richiede la consulenza genetica per la figlia secondogenita nata con agenesia della mano sinistra. L'anamnesi familiare non è significativa. Durante la gravidanza lo studio cromosomico fetale su colture di amniociti (effettuato presso altra struttura) evidenziava un cariotipo femminile con la presenza di un piccolo marker soprannumerario. Il marker non veniva ulteriormente caratterizzato perché interpretato come "verosimilmente costituito quasi esclusivamente da eterocromatina". L'esame ecografico morfostrutturale del feto non segnalava anomalie significative.

Alla nascita, a 37 settimane, la bambina presentava un peso di 2052 g, agenesia della mano sn, alcune varianti fenotipiche (micrognatia, impianto basso delle orecchie, ipertelorismo), ipotonia, iporeflessia, disturbi della suzione. Lo studio citogenetico su colture di linfociti mostrava la presenza, nel 30% delle cellule esaminate, del marker monocentrico, bisatellitato. La FISH consentiva di stabilire che il marker derivava dalla regione pericentromerica del cromosoma 14 o del cromosoma 22. L'array-CGH, ad una risoluzione di 75-100 Kb, non individuava sbilanciamenti genomici sicuramente patogenetici. L'indagine molecolare per disomia uniparentale del cromosoma 14 evidenziava una disomia uniparentale materna con perdita di eterozigotità per alcuni marcatori. L'esame mediante SNP-array consentiva di confermare questo dato, caratterizzando meglio la disomia, che risulta essere di tipo segmentale.

La Disomia Uniparentale materna del cromosoma 14 causa un fenotipo caratterizzato da ritardo di crescita (pre e postnatale), lassità articolare, ritardo psicomotorio, segni dismorfici minori della faccia, delle mani e dei piedi, pubertà precoce con un quadro clinico simile alla sindrome di Prader-Willi e denominato "Temple syndrome". Nella nostra paziente sono presenti il ritardo di crescita e le varianti fenotipiche corrispondenti alle descrizioni della letteratura, mentre rimane da comprendere la possibile relazione fra l'UPD14 materna e l'agenesia della mano.

CARATTERI FENOTIPICI SPECULARI IN CNV RECIPROCHE 16P11.2

F. Acquaviva¹, P. Magini², M. Seri², A.M. Nardone³, D. Pompili⁴, F. Scarano⁵, F. Lonardo¹, G. Scarano¹

¹U.O. Genetica Medica, A.O.R.N. "Gaetano Rummo" Benevento

²Dip. di Scienze Ginecologiche, Ostetriche e Pediatriche, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Bologna

³U.O. Lab. di Genetica Medica, Policlinico Tor Vergata, Roma

⁴Mendel Laboratory, Casa Sollievo della Sofferenza Hosp., IRCCS San Giovanni Rotondo

⁵Scuola di Spec. in Genetica Medica, Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi "Federico II", Napoli

Riportiamo i casi di due pazienti di sesso femminile con riarrangiamenti reciproci nella regione 16p11.2.

L.A., di anni 8, si presenta in sovrappeso (BMI:18,8; BMI/età: 87pc), con circonferenza cranica > 75pc, padiglioni auricolari semplificati, epicanto, cubito valgo, sindattilia II/III dita dei piedi, iperlordosi lombare, ritardo mentale grave (WISC-III=41).

M.S., di anni 15, peso normale (BMI: 18,6; BMI/età: 27pc), microcefalia (OFC >3pc), malocclusione dentaria, ipercifosi dorsale, clinodattilia del V dito delle mani e ritardo mentale grave (WISC-III=31).

L'aCGH ha identificato in L.A. una delezione 16p11.2, de novo, di 711 kb. In M.S. è stata identificata una duplicazione 16p11.2, de novo, di 597 kb oltre ad una delezione 11q14.1, estesa 587 kb, ereditata dalla madre affetta da disturbi psichiatrici.

La delezione in 11q14.1 di M.S. coinvolge un unico gene, DLG2, considerato un gene di suscettibilità per schizofrenia e per disturbi bipolari che è stato identificato, attraverso GWAS, in un paziente con schizofrenia insorta a 25 anni.

Nella regione 16p11.2 sono descritte in letteratura CNVs, estese circa 600-700 kb, sia in duplicazione che in delezione. Questi riarrangiamenti reciproci si sono dimostrati associati ad un ampio spettro di disturbi neurocomportamentali, tra cui ritardo dello sviluppo psicomotorio o mentale, disturbi dello spettro autistico (ASD, ADHD), epilessia e schizofrenia. In alcuni casi sono riportati anche tratti fenotipici speculari. Le delezioni si associano, per esempio, ad obesità e macrocefalia mentre le duplicazioni ad anoressia e microcefalia.

Entrambe le nostre pazienti mostrano quadri clinici compatibili con i rispettivi riarrangiamenti ed in particolar modo mostrano anche alcune delle caratteristiche speculari come l'indice di massa corporea e la circonferenza cranica. Un recente lavoro, in modelli murini e di zebrafish, ha inversamente correlato il dosaggio del gene KCTD13, incluso nella CNV, con la circonferenza cranica. I casi sopra descritti sembrano supportare questa ipotesi anche in uomo.

Infine, particolare attenzione deve essere posta nel counselling di M.S. complicato oltre che dal doppio riarrangiamento anche dalla possibile insorgenza tardiva della sintomatologia psichiatrica.

RITARDO MENTALE E DISMORFISMI. IL CONTRIBUTO DELL'ARRAY-CGH ALLA DIAGNOSI

M. Pinelli⁵, V. Brugiati², A. Capalbo³, C. Lombardi¹, M.R. Abate², V. Alesi⁴, F. Lonardo¹

¹*U.O. Genetica Medica, A.O.R.N. "Gaetano Rummo" Benevento*

²*U.O. Lab. di Genetica Medica, Policlinico Tor Vergata, Roma*

³*Mendel Laboratory, Casa Sollievo della Sofferenza Hosp., IRCCS San Giovanni Rotondo*

⁴*Centro Ricerche-Unità di Genetica Medica, Ospedale San Pietro Fatebenefratelli, Roma*

⁵*Scuola di Spec. in Genetica Medica, Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi "Federico II", Napoli*

La array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) è uno strumento molto efficace per l'identificazione delle anomalie citogenetiche che comportano aggiunta o perdita di materiale genomico. Ha ormai un importante ruolo nella ricerca delle cause genetiche di ritardo mentale, ritardo dello sviluppo psicomotorio e altri disturbi dello sviluppo. Abbiamo esaminato con aCGH un gruppo di 212 pazienti presso la nostra struttura selezionati secondo i seguenti criteri: presenza di disturbo dello sviluppo psicomotorio associato ad anomalie morfologiche. In sintesi, il 59% avevano ritardo mentale di qualsiasi grado, 74% una manifestazione neuropsichiatrica (ritardo mentale, ritardo dell'apprendimento, disturbi comportamentali, disturbi dello spettro autistico, epilessia), 53% dismorfismi facciali o altre alterazioni minori, 1,2% avevano malformazioni cardiache, 22% microsomia o macrosomia, 12% microcefalia o macrocefalia.

In 52 pazienti sono state identificate 57 CNV ritenute patologiche (in alcuni pazienti più di una) costituite da delezioni (28), duplicazioni (26) e delezioni-duplicazioni (3). Tutti i cromosomi sono interessati ad eccezione del 18, 19, 20, 21. E' interessante notare che sono state osservate delle regioni hotspot per alterazioni genomiche: Xp (5 alterazioni), 6q (5), 16p (4), 16q (4) e 2p (4). Inoltre per le regioni 16p11, 16q24, 2p16, 8p23, Xp22 sono state identificate, in differenti pazienti sia delezioni che duplicazioni compatibili con un meccanismo "mirror" di formazione. In due casi sono state identificate aneuploidie del cromosoma X in pazienti di piccola età in assenza di clinica evidente. Alcune di queste regioni sono già state associate con quadri di autismo-ritardo mentale come la 16p11.2 (Weiss LA et al 2008), 16q24.3 (Willemsen MH et al 2010), 2p16.3 (Hyung-Goo Kim et al 2008), Xp22.3 (Li F et al 2010), 8p23 (Chien WH et al 2010; Nucaro A et al 2011). Altre alterazioni, come la dup(13q32.1), la del(14q27q28.1) e la dup(4q23), non ci risulta che siano state associate ad alcun fenotipo neuropsichiatrico.

RIARRANGIAMENTI SPECULARI NELLA REGIONE XP22.31

P. Fontana³, M. Della Monica¹, A.M. Nardone², F. Scarano³, F. Lonardo¹, G. Scarano¹

¹*U.O. Genetica Medica, A.O.R.N. "Gaetano Rummo" Benevento*

²*U.O. Lab. di Genetica Medica, Policlinico Tor Vergata, Roma*

³*Scuola di Spec. in Genetica Medica, Dip di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi "Federico II", Napoli*

Delezioni e duplicazioni della regione Xp22.31 sono state più volte associate a fenotipi patologici che spaziano dal ritardo mentale, all'autismo, a note dismorfiche, ad anomalie congenite (Li, Tekin et al 2012). Tali alterazioni genomiche sono state riscontrate in percentuale significativamente più alta nei pazienti con ritardo mentale (0,37%) rispetto ai soggetti sani (0,15%), suggerendo un ruolo predisponente piuttosto che causativo di patologia. Descriviamo due pazienti con riarrangiamenti perfettamente speculari nella regione Xp22.31. La paziente DE, femmina di anni 5, manifesta disturbi comportamentali, alterazioni del sonno, lieve ritardo nell'acquisizione delle tappe dello sviluppo, obesità. L'aCGH ha identificato una delezione Xp22.31 ereditata dal padre. CM, maschio di anni 9, presenta ritardo dello sviluppo, difficoltà comportamentali e relazionali, obesità; l'aCGH ha rilevato una duplicazione Xp22.31 di origine materna. Lo sbilanciamento nel numero di copie dei geni contenuti nella regione in esame si conferma avere un peso nello sviluppo di disordini intellettivi, sia la delezione che la duplicazione della regione implicata possono dare luogo a ritardo (Faletra, 2012).

I riarrangiamenti sono stati ereditati da genitori sani, evidenziando una penetranza incompleta e un'espressività variabile, rendendo ardua la consulenza genetica e riproduttiva. L'interazione con altri geni potrebbe essere necessaria perché si manifesti il fenotipo patologico. I geni contenuti nella regione e deleti in DE sono STS, causativo di ittiosi, PNPLA4, associato ad obesità, VCX, poco caratterizzato ma espresso solo in cellule germinali maschili, HDHD1A, fosfatasi specifica per nucleotidi di RNA e VCX3A, che in letteratura è candidato come causativo di ritardo e per cui è stata dimostrata una funzione nella neuritogenesi. Tutti ad eccezione di VCX3A sono compresi nell'area duplicata in CM. Riteniamo sia utile studiare altri geni, in particolare, HDHD1A e verificare il coinvolgimento del promotore di VCX3A con studi di espressione, come già descritto (Hosomi, 2007). Infine l'analisi aCGH del nonno paterno del pz 2 potrebbe contribuire alla definizione del ruolo patogenetico del riarrangiamento.

MEROMELIA INTERCALARE POSTASSIALE ISOLATA IN FETO CON DELEZIONE TERMINALE 4Q

G. Scarano¹, M. Della Monica¹, C. Lombardi¹, M. Ciavarella¹, F. Scarano², M. Maioli¹, F. Lonardo¹

¹U.O. Genetica Medica, A.O.R.N. "Gaetano Rummo" Benevento

²Scuola Spec. Genetica Medica, Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi "Federico II", Napoli

Diagnosi prenatale richiesta per incremento della Translucenza nucale nella II gravidanza di donna di 34 anni. Anamnesi familiare e personale irrilevante. Cariotipo fetale: 46,XX,del(4)(q32)dn. FISH, normale, delle regioni subtelomeriche di 4q conferma trattarsi di una delezione terminale ed escludere una malsegregazione di una traslocazione parentale bilanciata, causa della del4q nel 14% dei casi. L'esame ecografico fetale rivelava un difetto in assenza dell'arto superiore di sinistra. La gravidanza veniva interrotta alle 19 settimane. L'esame clinico del feto mostrava la presenza di ipoplasia arto superiore sinistro: blocco del gomito, ipoplasia marcata dell'avambraccio che termina in un abbozzo di mano con due dita fra cui il pollice. La RX total body confermava l'assenza di ulna e ultime tre dita. L'autopsia escludeva anomalie degli organi interni. L'aCGH su DNA fetale mostrava due sbilanciamenti: duplicazione a derivazione materna, verosimilmente non causativa e del4q terminale di 29.5 MB (q32.1q35.2). Il feto quindi presentava soltanto un difetto in riduzione dell'arto superiore sinistro:meromelia intercalare postassiale.

La delezione 4q è rara, 1 su 100000 è l'incidenza stimata. I 170 casi noti hanno espressività clinica molto variabile: dismorfismi facciali, sequenza di Pierre-Robin, labiopalatoschisi isolata, cardiopatie congenite, anomalie renali, difetti delle dita e difetti scheletrici. Sono state proposte quali regioni critiche la regione 4q33 indicata in passato e 4q35.1 di recente per un pz con fenotipo clinico completo, tranne la presenza dell'ulna, dovuto a del4q35.1 di 465 kb. A conferma che una buona correlazione genotipo-fenotipo non è ancora raggiunta è il caso in esame. E'peculiare per l'estensione della delezione, tra le più ampie finora note e, dato più interessante, per il fenotipo clinico limitato al difetto dell'arto in assenza di anomalie facciali, palatali e degli organi interni. D'altronde, il difetto scheletrico rilevato è riportato soltanto in altri 6 pazienti con diagnosi postnatale ma in tutti associato alle altre anomalie seppure in misura diversa.

DOPPIO RIARRANGIAMENTO GENOMICO DISTALE AL LOCUS DELLA SINDROME DG/VCFG

M.G. Di Gregorio¹, D. Orteschi², M. Della Monica¹, C. Lombardi¹, M. Ciavarella¹, F. Scarano³, M. Maioli¹, F. Lonardo¹, M. Zollino²

¹*U.O. Genetica Medica, A.O.R.N. "Gaetano Rummo" Benevento*

²*Istituto di Genetica Medica, Università Cattolica Sacro Cuore, Roma*

³*Scuola di Spec. in Genetica Medica, Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi "Federico II", Napoli*

Descriviamo il caso di una ragazza di 15 anni e 5 mesi con un doppio riarrangiamento genomico de novo, evidenziato mediante metodica array-CGH. Il doppio riarrangiamento consiste in una duplicazione (0,3 Mb), e di una delezione contigua (1,2 Mb) nella regione 22q11.2 distale alla regione comunemente deleta nella sindrome di Di George/Velo-Cardio-Facciale (DG/VCF).

La paziente ha presentato un basso peso alla nascita, un piccolo DIV risoltosi in maniera spontanea e un normale sviluppo motorio. All'esame clinico presenta bassa statura, scapole alate, valgismo bilaterale del ginocchio, piede piatto bilaterale, astigmatismo ipermetropico e caratteristiche cranio-facciali peculiari (sopracciglia arcuate, ipertelorismo oculare, ponte nasale ampio, filtro labiale liscio, labbro superiore sottile, micrognatia) ed un ritardo mentale lieve.

La regione deleta nella nostra paziente comprende 27 geni, tra i quali il gene MAPK1. L'aploinsufficienza di MAPK1 è già stata correlata con dismorfismi cranio-facciali e difetti cardiaci tronco-conali in pazienti con delezione distale 22q11.2 sovrapponibile a quella osservata nella nostra paziente. La duplicazione comprende approssimativamente 18 geni, tra i quali i geni CKRL, PIK4CA, SNAP2, notoriamente coinvolti nello sviluppo di alcuni aspetti del fenotipo della sindrome DG/VCF. La regione duplicata è parzialmente sovrapposta ad una duplicazione più centromerica, recentemente descritta in un paziente con ritardo motorio, disturbi del linguaggio e lievi dismorfismi facciali.

RIARRANGIAMENTO CROMOSOMICO COMPLESSO IN PAZIENTE SINDROME DISMORFICA E RITARDO MENTALE

F. Lonardo¹, M. Maioli¹, E. Morizio², M. Ciavarella¹, L. Militti², M. Della Monica¹, G. Calabrese², G. Scarano¹

¹*U.O. Genetica Medica, A.O.R.N. "Gaetano Rummo" Benevento*

²*Istituto di Genetica Medica, Università degli Studi "G. D'Annunzio", Chieti*

Descriviamo il caso di un bambino di 7 anni e 10/12 con ritardo psicomotorio, ipoacusia bilaterale, microcefalia e note dismorfiche.

L'esame citogenetico standard ha evidenziato una traslocazione complessa apparentemente bilanciata de novo tra i cromosomi 2, 3 e 9 con 5 diversi punti di rottura. FISH e SKY hanno consentito di confermare e di precisare il riarrangiamento. Un array-CGH ad una risoluzione di 75-100 kb non ha evidenziato sbilanciamenti genomici.

I riarrangiamenti cromosomici vengono definiti "complessi" quando presentano tre o più punti di rottura, che coinvolgono due o più cromosomi. E' possibile dividerli in tre gruppi in base al numero di breakpoints ed al tipo di riarrangiamento. Il primo gruppo comprende i cosiddetti scambi a tre vie (three-way exchanges), con tre rotture in tre cromosomi. Il secondo comprende gli scambi a due vie che coinvolgono più cromosomi in due distinte traslocazioni. Il terzo comprende i riarrangiamenti particolarmente complessi, con molti punti di rottura e molti cromosomi coinvolti. Recentemente è stata proposta una nuova classificazione in quattro gruppi, che prende in considerazione il rapporto tra numero di rotture e numero di cromosomi, insieme ad altri elementi di complessità.

I CCRs (Complex Chromosomal Rearrangements) sono molto rari nell'uomo. Finora ne sono stati descritti circa 250 casi, con un fenotipo molto variabile. Il quadro clinico può essere del tutto normale, oppure essere caratterizzato da anomalie congenite multiple e ritardo mentale. Nei portatori di forme apparentemente bilanciate sono spesso presenti poliabortività o infertilità.

Nella maggior parte dei casi il riarrangiamento è de novo, ma sono stati riportati anche casi familiari, che mediamente presentano meno cromosomi coinvolti e meno breakpoints.

Nel nostro paziente rimane ancora da chiarire se la traslocazione complessa sia la causa delle anomalie fenotipiche presenti. Bisogna considerare che nelle anomalie cromosomiche all'aumentare della complessità e del numero di rotture aumenta il rischio di microdelezioni e microduplicazioni, ma aumenta anche la probabilità che qualche gene venga danneggiato nella sua struttura o nella sua espressione. Questa evenienza va valutata con ulteriori esami.

DIAGNOSI PRENATALE DI INVERSIONE PARACENTRICA 19P

M. Ciavarella¹, E. Morizio², A. Novelli³, C. Lombardi¹, L. Militti², M. Maioli¹, M. Della Monica¹, F. Lonardo¹, G. Calabrese², G. Scarano¹

¹U.O. Genetica Medica, A.O.R.N. "Gaetano Rummo" Benevento

²Istituto di Genetica Medica, Università degli Studi "G. D'Annunzio", Chieti

³Mendel Laboratory, Casa Sollievo della Sofferenza Hosp., IRCCS San Giovanni Rotondo

Descriviamo un caso di diagnosi prenatale di inversione paracentrica del braccio corto del cromosoma 19 nel feto di sesso maschile di una paziente che ha richiesto l'esame citogenetico per età superiore a 35 anni. I due punti di rottura sono stati identificati in p12 e p13.3, rispettivamente (bandeggio RHG, risoluzione 450-500 bande). Il cariotipo dei genitori ha evidenziato la stessa inversione nel padre. L'esame FISH con sonde locus-specifiche e mediante multicolor banding ha confermato i risultati dell'esame citogenetico..

Un esame mediante array-CGH ad una risoluzione di 60 kb per le delezioni e 80 kb per le duplicazioni (CytoChip ISCA 4x180K) non ha evidenziato sbilanciamenti genomici.

L'esame ecografico morfo-strutturale non ha evidenziato anomalie fetali. La coppia, dopo una consulenza genetica che ha preso in esame il significato ed i rischi del riarrangiamento individuato, ha deciso di continuare la gravidanza. Le inversioni paracentriche sono rare (0,9-4,9 su 10.000 nati) e possono essere difficili da individuare perché la morfologia generale del cromosoma rimane invariata. Solitamente non comportano anomalie fenotipiche, in quanto il riorientamento del segmento cromosomico non altera la funzione della porzione di genoma interessata. In alcuni casi è possibile che uno o entrambi i punti di rottura siano all'interno di geni. In altri casi contestualmente all'inversione può avvenire una microdelezione oppure una microduplicazione. In altri casi ancora il riarrangiamento può alterare i rapporti tra geni e sequenze di regolazione. In questi casi il fenotipo può essere alterato. Le inversioni paracentriche vanno inoltre distinte attentamente dalle inserzioni intracromosomiche, il cui rischio riproduttivo può arrivare al 50%. Presentiamo questo caso per sottolineare l'importanza, in diagnosi prenatale, di poter offrire un percorso diagnostico completo, che parte da un accurato esame citogenetico standard, continua con i necessari approfondimenti diagnostici, e si completa con la consulenza genetica, allo scopo di aiutare la coppia a comprendere il significato biologico e clinico di quanto osservato, in modo da consentire scelte consapevoli sia in relazione alla gravidanza in corso che a quelle future, anche in ambito familiare.

STUDIO CLINICO-MOLECOLARE DI 55 PAZIENTI CON DISTURBI DELLO SPETTRO AUTISTICO/DISABILITA' INTELLETTIVA MEDIANTE MLPA ED ARRAY-CGH

I. Isidori¹, C. Spapperi¹, V. Ottaviani¹, I. Manes¹, D. Rogai¹, A. Mencarelli¹, M. Schippa¹, C. Gradassi¹, P. Prontera¹, G. Stangoni², C. Ardisia¹, E. Donti¹

¹*Centro di Riferimento Regionale di Genetica Medica, Azienda Ospedaliera ed Università di Perugia, Perugia*

²*S.C. di Neonatologia, Azienda Ospedaliera di Perugia, Perugia*

La World Health Organization ha inserito i disturbi dello spettro autistico (ASDs) nel gruppo più ampio delle disabilità intellettive (ID), anche se la loro diagnosi clinica rimane fortemente legata alla presenza dei tipici deficit nelle aree della comunicazione e del linguaggio. L'incidenza degli ASDs è incrementata negli ultimi anni, anche in relazione alla maggior sensibilità e conoscenza dei medici, e quindi l'autismo è diventato un problema socio-sanitario rilevante.

Anche se l'eziopatogenesi è ancora incerta, la componente genetica degli ASDs è inequivocabile: studi su gemelli dimostrano un'ereditabilità dell'80% e nel 10% dei casi è possibile riconoscere una causa genetica maggiore. Le alterazioni genetiche riscontrabili sono sia quantitative (CNVs) che qualitative (SNPs) e possono interessare più regioni genomiche e/o geni.

Questo lavoro riporta i risultati di uno screening molecolare, condotto mediante MLPA ed array-CGH (aCGH), di pazienti con ASD/ID pervenuti al Centro di Riferimento Regionale di Genetica Medica nell'ultimo anno. La flow-chart prevede un primo inquadramento clinico-dismorfologico, utile all'identificazione di sindromi clinicamente riconoscibili associate ad ASD (Rett, Angelman, X-Fragile, etc.), a cui fanno seguito le suddette analisi molecolari.

Lo screening mediante MLPA, effettuato su 35 pazienti, ha utilizzato i sistemi disponibili per lo studio dell'ASDs sindromico e non sindromico (MLPA kit P343-P396-P106, MRC-Holland), individuando 2/35 (5.7%) casi positivi: uno con delezione de novo nella regione 15q13.3 e uno con duplicazione del gene OPHN1 (Xq12). L'analisi molecolare mediante aCGH (Cytochip 4x44K, Blugnome), effettuata su 20 pazienti, ha permesso di identificare altri 4 casi positivi 4/20 (20%), quindi nel complesso la sensibilità dell'MLPA e dell'aCGH, su una casistica selezionata di pazienti con ASD/ID, è pari a 6/55 (11%). Questi dati confermano l'utilità di includere pazienti con ASD in un percorso di screening molecolare.

Risultati dell'analisi mutazionale di PTEN in diversi quadri fenotipici

D. Turchetti¹, L. Amato¹, L. Pradella¹, Y.B. Mordehai¹, S. Miccoli¹, R. Zuntini¹, M. Seri¹

¹*U.O. Genetica Medica, AOU di Bologna Policlinico S.Orsola-Malpighi*

Le mutazioni costituzionali del gene PTEN causano quadri clinici eterogenei, tra cui la Sindrome di Cowden (CS) e l'associazione Macrocefalia/Ritardo Mentale. All'espansione delle conoscenze sull'ampio spettro fenotipico delle mutazioni di PTEN corrisponde un aumento delle richieste di analisi mutazionale di questo gene, il che rende necessario definire criteri di appropriatezza. La Cleveland Clinic, che ha sviluppato per i pazienti adulti un modello probabilistico online, raccomanda l'esecuzione del test in presenza di una probabilità di mutazione >3%.

Abbiamo rivalutato la casistica di pazienti sottoposti ad analisi mutazionale di PTEN presso l'UO Genetica Medica dell'AOU di Bologna per verificare il riscontro di mutazioni in base alla presenza di specifici criteri clinici e alla probabilità calcolata col modello di Cleveland.

Dal 2006 ad oggi sono stati sottoposti ad analisi di PTEN (sequenziamento di tutti gli esoni, delle giunzioni introne-esone e del promotore + MLPA) 50 pazienti: 33 adulti e 17 bambini. Degli adulti, 9 soddisfacevano i criteri dell'International Cowden Consortium ed erano quindi classificati come CS, mentre 24 mancavano di un solo criterio per raggiungere la diagnosi piena ed erano classificati come CS-like. Un bambino presentava segni di sindrome Proteus, mentre gli altri 16 presentavano macrocefalia (>97°centile) e ritardo psicomotorio o disturbo dello spettro autistico, in associazione o meno con altri segni. In 8 dei 9 pazienti con CS conclamata è stata identificata una mutazione patogenetica di PTEN. In nessuno degli altri pazienti adulti o pediatrici sono state identificate mutazioni. Le probabilità stimate dal Cleveland per i portatori di mutazione andavano da 7 a 99%, quelle dei pazienti senza mutazione identificata da <1 a 29%. Adottando come soglia una probabilità del 7% avremmo testato solo 11 pazienti adulti, che comprendevano gli 8 mutati (sensibilità 100% e specificità 73%).

Questi dati, seppur relativi a un campione limitato, depongono contro l'appropriatezza dell'analisi di PTEN non solo negli adulti che non soddisfano pienamente i criteri diagnostici, ma anche nei casi pediatrici di macrocefalia associata a ritardo mentale o disturbi dello spettro autistico.

EVALUATION OF SHORT TANDEM REPEAT GENETIC MARKERS FOR QUALITATIVE CHIMERISM ANALYSIS POST ALLOGENIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN A WOMAN SUBMITTED IN THE IVF PROGRAMME

A.M. Roccazzello¹, S. Chamayou², A. Guglielmino², E. Insirello¹, G. Tringali¹

¹*I.R.M.A. Istituto Ricerca Medica e Ambientale*

²*U.M.R. Unità di Medicina della Riproduzione*

Introduction: Bone marrow transplantation and hematopoietic stem cell transplantation are procedures in which progenitor cells capable of reconstituting normal bone marrow function are transplanted to a patient. For any subject who has a history of successful allogeneic BMT or HSCT, blood is not suitable for personal identification or kinship study because of a conversion to complete donor type (chimerism). Recently, bone marrow and peripheral blood stem cells were noted to have the potential to 'trans-differentiate' or 'dedifferentiate' into neural, bone, muscular, cartilage, liver, gut, alveolar, buccal, epidermal or endothelial cells, the so-called 'adult stem cell plasticity phenomenon'. In this study, sequence-specific primer-based PCR amplified short tandem repeat (STR) analysis technique was used to determine parental testing to confirm or not the suspect of "plasticity phenomenon" occurs in a woman transplanted at eight years old, and submitted with successfully at 34 years old in the IVF program for a pregnant. The suspicion arises from the medical history of the woman who had undergone pre transplant several cycles of radio-chemotherapy and in the course of its growth was classified as a woman with amenorrhea.

Multiplex PCR Amplification of STR Loci: The AmpFISTR Identifier kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) was used to amplify genomic DNA at 16 different STR microsatellite loci in a single multiplexed PCR reaction, according to the supplier's protocol. The PCR products were resolved by capillary electrophoresis using an ABI Prism 310 DNA sequencer (Applied Biosystems). Fluorescent peak heights were quantified using ABI Prism GeneScan analysis software.

Results and discussion: The genetic discrepancies for the mother-child relationship in blood sample were observed in 6 out of 15 STR loci, all 6 loci are present in saliva and buccal swab woman's chimeric samples. This results excludes the initial suspect of plasticity phenomenon: the oocyte is not derived from a stem cell of the donor who has generated the fertilized oocyte but, from the point of view of forensic studies, gives as forensic DNA databases grow and more people undergo bone marrow transplants, the risk of a miscarriage of justice increases.

ANALISI DELLE FREQUENZE ALLELICHE HLA-A, -B, -C, -DRB1, DQA1 E DQB1 E STIMA DELLE FREQUENZE APLOTIPICHE MEDIANTE ALGORITMO EM IN UN CAMPIONE DI INDIVIDUI SARDI AFFERENTI AL CENTRO REGIONALE DI RIFERIMENTO TRAPIANTI - CAGLIARI

F. Alba², S. Lai², L. Cappai², M. Mulargia³, R. Littera¹, R. Porcella², D. Valentini², R. Maddi², M. Serra², V. Loi², L. Cancedda², C. Carcassi³

¹*Centro Regionale Trapianti, Ospedale R. Binaghi - ASL 8, Cagliari, Italy*

²*Genetica Medica, Ospedale R. Binaghi, ASL 8, Cagliari*

³*Cattedra di Genetica Medica, Dipartimento di Scienze Mediche Internistiche - Università degli Studi di Cagliari, Italy*

La determinazione delle frequenze alleliche e aplo-tipiche ai loci polimorfici HLA è un importante punto di partenza per prendere decisioni in merito alla più idonea strategia di ricerca del donatore per pazienti in lista d'attesa per trapianto di cellule staminali ematopoietiche.

Lo studio degli alleli e degli aplo-tipi HLA è importante anche per la determinazione della predisposizione genetica ad alcune patologie.

Per tali ragioni, abbiamo analizzato le frequenze alleliche e aplo-tipiche HLA di classe I e II in 121 individui non correlati, appartenenti alla Popolazione Sarda, registrati presso il Centro Regionale di Riferimento Trapianti di Cagliari.

La tipizzazione HLA dei loci A, B, C, DRB1, DQA1 e DQB1 è stata eseguita con metodiche a livello di alta risoluzione (PCR-SSP; SBT).

I dati sono stati successivamente analizzati col software Arlequin 3.11 che implementa l'algoritmo EM (Expectation-Maximization algorithm) per l'inferenza degli aplo-tipi.

I loci analizzati, come atteso, sono in linkage disequilibrium fra loro (livello di significatività = 0,0500) e per ciascuno di essi non sono state riscontrate deviazioni dall'equilibrio di Hardy-Weinberg.

Sono stati identificati e caratterizzati per la loro frequenza 23 alleli HLA-A*, 30 HLA-B*, 20 HLA-C*, 22 HLA-DRB1*, 13 HLA-DQA1* e 15 HLA-DQB1*.

Il software ha dedotto 131 aplo-tipi HLA-A-B-C-DRB1-DQA1-DQB1 dei quali 16 mostravano una frequenza maggiore dell'1%.

Fra questi ultimi, i sei più frequenti sono rispettivamente:

A*30:02-B*18:01-C*05:01-DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (14,46%); A*02:05-B*58:01-C*07:18-DRB1*16:01-DQA1*01:02-DQB1*05:02 (6,61%); A*33:01-B*14:02-C*08:02-DRB1*01:02-DQA1*01:01-DQB1*05:01 (3,72%); A*02:01-B*18:01-C*07:01-DRB1*01:01-DQA1*01:01-DQB1*05:01 (1,65%); A*02:01-B*18:01-C*12:03-DRB1*11:01-DQA1*05:05-DQB1*03:01 (1,65%); A*24:02-B*18:01-C*05:01-DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 (1,65%).

L'elevato grado di concordanza di tali risultati con quelli riportati da Contu et al. (Tissue Antigens 1992; 40: 165-174) che pure si fermava ad un livello di tipizzazione in bassa risoluzione, certifica l'efficacia del calcolo da noi utilizzato.

Un opportuno ampliamento delle dimensioni del campione fornirà informazioni più complete sull'immunogenetica della Popolazione Sarda.

Studio di un caso clinico mediante citogenetica convenzionale e molecolare (F.I.S.H.)

D. Dell'Edera¹, E. Vitullo², M. Maremonti¹, A. Malvasi³, A. Tinelli⁴, A.A. Epifania²

¹*U.O.D. Laboratorio di Citogenetica e Genetica Molecolare – ASM P.O. di Matera.*

²*U.O.C. Laboratorio di Patologia clinica – ASM P.O. di Matera.*

³*U.O. di Ostetricia e Ginecologia Clinica Santa Maria – Bari.*

⁴*U.O. di ostetricia e Ginecologia Ospedale Vito Fazzi – Lecce.*

Presentazione del caso clinico

Il soggetto di sesso femminile (17 anni di età) presentava severo ritardo dello sviluppo psico-fisico; microbrachicefalia con fronte alta e piatta, arcate orbitarie superiori ipoplasiche, sopracciglia sottili nel terzo medio; facies ipotonica, rotondeggiante, larga e piatta con ptosi e rime palpebrali corte (blefarofimosi), inclinate verso il basso; naso piccolo con sella ipoplasia, filtro corto, bocca mantenuta in posizione aperta, palato ogivale; iperlassità articolare; enuresi. Tali caratteristiche suggerivano lo studio del cariotipo.

Studio del cariotipo

L'esame del cariotipo ha rivelato la presenza di un cromosoma 20 anomalo (al telomero del braccio lungo era presente una porzione aggiuntiva di eucromatina).

l'analisi mediante FISH impiegando sonde commerciali della ditta VYSIS (whole chromosome painting library:WCP) del cromosoma 20 ha confermato che la porzione in eccesso non apparteneva al cromosoma 20; inoltre nessun altro segnale è stato rilevato su gli altri cromosomi. Tuttavia, non si poteva escludere la perdita di parte del cromosoma 20. Per verificare quanto detto abbiamo deciso di testare con alcune sonde telomeriche 20q. Queste sonde ibridano sul 20q normale, ma non su quello anomalo, né su altri cromosomi. Dunque, il cromosoma 20 anomalo ha perso una parte del telomero di dimensioni comprese tra 475Kb e 1.4 Mb. Per capire l'origine del frammento presente sul cromosoma 20 abbiamo utilizzato una sonda WCP del cromosoma 10 con esito positivo. Utilizzando sonde telomeriche del cromosoma 10p e del 10q si è osservato che il frammento in questione è una porzione distale del 10q (di circa 26Mb).

Discussione e risultati

Da quanto detto risulta che la paziente presenta un cariotipo con una trisomia parziale del cromosoma 10 associata ad una monosomia parziale del 20qter.

La trisomia parziale del braccio lungo (distale) del cromosoma 10 è una sindrome ben definita (Varda NM et al, 2003). Le caratteristiche cliniche di questa cromosomopatia correlano con il quadro clinico osservato nella paziente in oggetto. Purtroppo, non è stato possibile stabilire se tale riarrangiamento abbia una origine parentale o de novo in quanto i genitori della paziente si sono rifiutati di sottoporsi all'esame.

A MENTAL RETARDATION IN A RARE HOMOZYGOUS VARIEGATE PORPHYRIA

M. Savino¹, G. Cappucci¹, M. Carella², M. Miroballo², O. Palumbo², F. Aucella³, L. Di Mauro¹, C.C. Guida³

¹*U.O. of Transfusion Medicine and Clinical Laboratory-CSS Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo (FG), Italy*

²*Medical Genetics-CSS Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo (FG), Italy*

³*U.O. of Nephrology and Dialysis – Interregional Reference Center for prevention, surveillance, diagnosis and therapy of Porphyrin-CSS Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo (FG), Italy*

Variegate porphyria (VP), one of the acute hepatic porphyrias, is characterized by a partial defect in the activity of protoporphyrinogen oxidase (PPOX), the penultimate enzyme in the heme biosynthetic pathway. Clinically, VP is characterized by cutaneous manifestations including increased photosensitivity, blistering, skin fragility, and post-inflammatory hyperpigmentation. VP is usually inherited as an autosomal dominant trait and incomplete penetrance, as not all persons carrying a mutation in the PPOX gene display the clinical phenotype. A rare homozygous variant of VP has been reported, characterized by severe PPOX deficiency, onset of photosensitization in early childhood, skeletal abnormalities of the hand, and, less constantly, short stature, mental retardation, and convulsions.

We report on clinical and molecular genetic studies in two affected siblings with intellectual disability, severe psychomotor developmental delay, growth retardation, and increased photosensitivity manifesting in early infancy.

The clinical features of the patients were consistent with a microdeletion/duplication syndrome, thus a SNP Array analysis has been performed. Although there were no pathogenic aberrations at copy number level, genotype analysis showed a homozygosity region in 1q23 shared by the two affected siblings. This region was 6Mb in length and included PPOX gene. This finding, together with elevated levels of urinary, plasmatic porphyrins and the specific plasma fluorescence emission spectrum, prompted us to perform the molecular analysis of PPOX gene responsible of the PV. The mutation analysis of coding region of PPOX gene allowed us to identify an homozygote missense mutation consisting in a G to A transition in exon 10 (c. 1072G>A) causative of the amino acid substitution p.G358R. The mutation c.1072G>A was previously identified in a severely affected patient compound heterozygote for two different missense mutations. In our case the G to R substitution was detected, for the first time, in a homozygote pattern. To date only few cases of homozygote VP have been described, therefore our study offers a molecular explanation to clarify the early onset and the severity of the clinical manifestations of variegate porphyria in two patients with intellectual disability.

ANALISI MOLECOLARE DEL GENE TMPRSS6 IN 31 SOGGETTI AFFETTI DA IRIDA: ETERogeneITÀ GENETICA E ALLELICA E IDENTIFICAZIONE DI NUOVE MUTAZIONI

L. De Falco¹, M. Bruno¹, F. Scarano², F. Vitiello², A. Iolascon³

¹*CEINGE Biotechnologie Avanzate, Napoli, Italia*

²*Dip. di Biochimica e Biotechnologie Mediche, Università Federico II, Napoli, Italia;*

³*CEINGE Biotechnologie Avanzate, Napoli, Italia, Dip. di Biochimica e Biotechnologie Mediche, Università Federico II, Napoli, Italia;*

Le mutazioni nel gene TMPRSS6, localizzato sul cromosoma 22 (22q12.3–13.2), sono responsabili dell'anemia da deficienza di ferro refrattaria al ferro, nota come IRIDA.

Il gene TMPRSS6 codifica per la proteina Matriptase-2, espressa prevalentemente nel fegato e costituita da un dominio N-terminale intracitoplasmatico, un dominio transmembrana, un dominio extracellulare costituito da 2 domini CUB, 3 domini LDLR e un dominio serin proteasico (SP).

Matriptase 2 agisce da regolatore negativo della sintesi di epcidina, rilasciata dal fegato e principale regolatore dell'omeostasi sistemica del ferro.

I pazienti IRIDA assorbono un'insufficiente quantità di ferro dalla dieta, non rispondono a trattamenti con ferro orale e solo parzialmente al ferro per via endovenosa, hanno bassi valori di ferro sierico e ferritina ed elevati livelli di epcidina, regolatore chiave dell'omeostasi sistemica del ferro.

Ad oggi sono state descritte 35 mutazioni del gene TMPRSS6 in soggetti IRIDA (missenso, nonsense, frameshift e mutazioni di splicing), molte caratterizzate funzionalmente.

Abbiamo reclutato 24 famiglie con fenotipo IRIDA, con uno o più soggetti affetti (31). 21 pazienti (70%) sono risultati omozigoti o composti eterozigoti per 15 diverse mutazioni del gene TMPRSS6: 7 missenso, 3 nonsense, 4 frameshift e 1 mutazione di splicing.

5 sono nuove mutazioni: 2 missenso, nei domini LDLR e SP, rispettivamente, 2 nonsense e una di splicing causanti una prematura terminazione della traduzione.

10 pazienti (30%) sono risultati negativi per mutazioni del gene TMPRSS6, quindi si ipotizza che un altro gene possa essere responsabile del fenotipo IRIDA.

La caratterizzazione di nuove mutazioni nel gene TMPRSS6 ha confermato l'eterogeneità allelica del disordine e messo in evidenza la comparsa di un fenotipo clinico solo dopo il periodo neonatale. Ciò probabilmente è legato alla persistenza dei globuli rossi fetali fino a 2-3 mesi di vita dopo il passaggio da un assorbimento per via parenterale, attraverso la madre, ad un assorbimento per via orale dopo la nascita. I nostri dati infine suggeriscono che, nonostante le mutazioni in eterozigosi del gene TMPRSS6 non sono in grado da sole di indurre un fenotipo IRIDA, alcune di esse ne aumentano la suscettibilità.

PRRT2 MUTATION CAUSES PAROXYSMAL KINESIGENIC DYSKINESIA AND HEMIPLEGIC MIGRAINE IN MONOZYGOTIC TWINS

A. Terracciano¹, C. Castiglioni², I. Lopez², F. Riant³, E. Bertini¹

¹*Unit of Neuromuscular Disorders, Laboratory of Molecular Medicine, Bambino Gesù Children's Research Hospital IRCCS, Rome, Italy*

²*Unit of Neurology, Dep.t of Pediatrics, Clínica las Condes, Santiago, Chile*

³*Laboratoire de Génétique Moléculaire Hôpital Lariboisière, Paris, France*

PRRT2 gene mutations have recently been identified as a causative gene of Paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD), a rare movement disorder characterised by the occurrence of chorea, dystonia or athetosis triggered by sudden action. Some patients have additional intermittent neurologic disorders like infantile convulsions. The association with migraine has been rarely reported in this condition. Here we report the coexistence of PKD and hemiplegic migraine in twins harbouring a heterozygous mutation in PRRT2.

Two monozygotic twins manifesting PKD together with repeated episodes of migraine with some severe attacks of hemiplegic migraine have been followed and treated for more than 10 years.

Molecular genetic analysis disclosed the c.649_650insC, p.R217Pfs*8 heterozygous mutation in both twins. This mutation was segregating from the mother who likewise harboured the same mutation c.649dupC although she had never manifested PKD but complained of rare common migraine attacks in her past history.

The association of PKD and hemiplegic migraine has been previously reported in one large family, associated to febrile convulsions and afebrile seizures in some individuals, but our report relates this association of symptoms to a mutation in PRRT2. The co-occurrence of both hemiplegic migraine and PKD in monozygotic twins expands the phenotypic spectrum of intermittent manifestations related to PRRT2 and perhaps suggests an additional causing gene for hemiplegic migraine.

DELEZIONE DEL GENE TRIM 32 IN ETEROZIGOSI COMPOSTA CON UNA MUTAZIONE DI STOP: UN CASO CLINICO

M. Neri¹, R. Selvatici¹, C. Scotton¹, A. Armaroli¹, D. De Grandis², F. Gualandi¹, A. Ferlini¹

¹*Sezione di Genetica Medica, Università di Ferrara, Ferrara, Italia*

²*UILDM Verona, Servizio di consulenza Neurologica, Verona, Italia*

Le distrofie dei cingoli (LGMD) sono un gruppo clinicamente e geneticamente eterogeneo di patologie; la LGMD2H è tra le meno frequenti ed è dovuta a mutazioni nel gene TRIM32. Descriviamo una paziente di 35 anni che dall'età di 25 anni riferisce una progressiva difficoltà nel salire le scale e debolezza muscolare; i valori dell'enzima CK muscolare sono di poco superiori alla norma. La RMN muscolare mostra sostituzione adiposa dei muscoli glutei e atrofia nei muscoli retto femorale, nei tre muscoli vasti e nel bicipite femorale. La biopsia muscolare evidenzia un pattern aspecifico di fibre atrofiche e ipertrofiche; l'immunoistochimica per distrofina, sarcoglicani, disferlina e caveolina è nella norma. Abbiamo eseguito analisi mediante ibridazione genomica comparativa (CGH) utilizzando uno specifico array – sviluppato nell'ambito del progetto europeo NMD Chip - che esplora 50 geni noti per essere responsabili di miopatie ereditarie. La paziente è risultata eterozigote per una delezione dell'intero gene TRIM 32; mediante sequenziamento diretto sull'altro allele abbiamo identificato la mutazione non senso c.1837 C> T (R613X). Questa mutazione non è descritta in letteratura ed è situata nel dominio NHL, dove si localizzano le altre mutazioni associate ad un quadro di LGMD2H.

Nella nostra paziente il quadro clinico e immunoistochimico non erano suggestivi per una specifica forma di LGMD e la diagnosi molecolare è stata possibile utilizzando una metodica "high throughput" ed un array mirato alla analisi di 50 geni noti causare patologie neuromuscolari.

WHOLE EXOME SEQUENCING (WES) COME STRUMENTO DIAGNOSTICO NELLE MIOPATIE MIOFIBRILLARI

M. Neri¹, M. Bovolenta¹, C. Scotton¹, T. Castrignanò², G. Vattemi³, E. Kotelnikova⁴, L. Merlini¹, F. Gualandi¹, A. Ferlini¹

¹*Sezione di Genetica Medica, Università di Ferrara*

²*CASPUR, Roma*

³*Sezione di Neurologia, Università di Verona*

⁴*ARIADNE Genomics Inc, USA*

Le miopatie miofibrillari (MFM) sono un gruppo clinicamente e geneticamente eterogeneo di malattie neuromuscolari; sono noti 6 geni malattia ma circa il 50% dei pazienti risulta negativo alla analisi molecolare. Abbiamo studiato 21 pazienti con una diagnosi clinica di MFM e negativi alla analisi molecolare mediante sequenziamento e array CGH di 5 dei 6 geni noti causare la patologia (desmina, alfa B cristallina, miotilina, ZASP, BAG3); in 5 di questi pazienti abbiamo effettuato WES con tecnologia Illumina GAIIe. I dati ottenuti sono stati filtrati utilizzando una lista di 880 geni candidati prodotti dalla analisi mediante "MedScan interactome pathway " un software sviluppato da Ariadne Genomics. In questi 880 geni abbiamo cercato SNPs e DIPs in eterozigosi (in considerazione della modalità di trasmissione autosomica dominante della patologia) ed escluso quelli riportati in dbSNP come polimorfismi. Abbiamo identificato in 2 pazienti 2 variazioni nella filamina C (FLNC) ed in 2 pazienti 2 variazioni nella titina (TTN); tutte le variazioni identificate non sono riportate in letteratura. Mutazioni nella FLNC sono riportate in altri casi di MFM mentre la TTN, il gene più grande noto, è associata ad una forma di distrofia dei cingoli (LGMD2J) ma non al fenotipo MFM. Nell'ultimo paziente infine abbiamo identificato tre variazioni in tre geni candidati con possibile significato patogenetico. In conclusione, nel caso di patologie con una nota eterogeneità genetica come le MFM l'utilizzo di WES unito a specifici filtri bioinformatici permette di raggiungere la diagnosi molecolare in una percentuale elevata di pazienti risparmiando tempo e risorse.

STUDIO DI UNA FAMIGLIA CON RICORRENZA DI PARKINSON ED ATASSIA: APPROCCIO COMBINATO DI SEQUENZIAMENTO DELL'ESOMA (WES) E ANALISI DEI DATI MEDIANTE UNA LISTA DI GENI CANDIDATI

M. Neri¹, M. Bovolenta¹, C. Scotton¹, D. De Grandis², T. Castrignanò³, B. Dalla Piccola⁴, F. Gualandi¹, A. Ferlini¹

¹*Sezione di Genetica Medica, Università di Ferrara*

²*UILDM Verona, Servizio di consulenza Neurologica*

³*CASPUR, Roma*

⁴*Ospedale Bambino Gesù, Roma*

Abbiamo studiato una famiglia in cui fratello e sorella presentano manifestazioni di Parkinson giovanile, ritardo cognitivo, atassia e obesità con variabilità clinica. L'analisi molecolare di SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, DRPLA, GM1, GM2, GCH1 ha escluso mutazioni in questi geni; l'analisi di linkage negli affetti ha escluso il coinvolgimento dei geni PARK2, PARK3 e PARK7.

E' stata effettuata analisi mediante WES con tecnologia Illumina GAlle in un affetto, nel fratello e nella madre sana. I dati ottenuti mediante WES sono stati filtrati per una lista di 143 geni noti o che potrebbero essere associati a Parkinson, atassia cerebellare e obesità. Sono state considerate le variazioni in omozigosi o eterozigosi composta nell'affetto e non sono state escluse quelle presenti nel dbSNP. Dalla analisi sono emerse 43 variazioni in omozigosi in 41 geni e 82 variazioni in eterozigosi composta in 39 geni; applicando ulteriori filtri il numero di possibili variazioni patogenetiche è stato ridotto. In particolare è rimasta una unica variazione in omozigosi che è stata esclusa perché non presente nella sorella affetta. Le variazioni in eterozigosi composta sono risultate 12 in 3 geni tra cui LRRK2 noto causare una forma di Parkinson a trasmissione dominante; LRRK2 è stato escluso come gene malattia in questa famiglia in quanto affetti e sani condividono le stesse variazioni in eterozigosi composta. E' in corso la validazione delle altre variazioni identificate.

Danno ossidativo e genotossico in soggetti con β -talassemia

E. Ferro¹, G. Visalli², R. Civa¹, M.A. La Rosa¹, G. Randazzo Papa³, B. Baluce², D.G. D'Ascola⁴, B. Piraino¹, C. Salpietro¹, A. Di Pietro²

¹Dipartimento di Scienze Pediatriche Mediche e Chirurgiche, Policlinico Universitario di Messina

²Dipartimento di Igiene, Policlinico Universitario di Messina

³A.S.P. N.5, Messina

⁴U.O.C. Centro Microcitemia, Ospedale Riuniti di Reggio Calabria

Introduzione. Nelle β -talassemie l'anemia cronica e l'ipossia tissutale aumentano l'assorbimento enterico di ferro ed alterano la funzionalità mitocondriale. La regolare terapia emotrasfusionale migliora i livelli di emoglobina ma determina emosiderosi che aumenta la produzione di specie ROS.

Obiettivi. Lo studio vuole valutare il danno ossidativo cellulare e la conseguente genotossicità in soggetti con talassemia major ed intermedia.

Materiali e Metodi. Sono stati reclutati 113 pazienti di anni 33.8 ± 9.7 (media \pm SD), afferenti ai centri di Microcitemia dell'Ospedale Riuniti di Reggio Calabria e del Policlinico Universitario di Messina. Di questi, 92 sono pazienti trasfusi ed in trattamento con terapia ferrochelante, mentre 21 sono soggetti con talassemia intermedia, occasionalmente trasfusi. Dieci soggetti sono stati arruolati come controlli sani. Il danno ossidativo cellulare è stato determinato mediante il dosaggio dei ROS endocellulari, di 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), del potenziale transmembranario mitocondriale ($\Delta\psi_m$) e della perossidazione lipidica. La genotossicità è stata determinata mediante il CBMN assay e la Comet assay.

Risultati. I dati mostrano degli aumentati livelli di ROS e idroperossidi lipidici nei pazienti talassemici rispetto ai controlli, in particolare nei soggetti non trasfusi. Questi presentano un significativo decremento del $\Delta\psi_m$ a sottolineare un deficit energetico e la sovrapproduzione di ROS a livello della catena respiratoria che caratterizzano la marcata anemia ed ipossia. I livelli di 8-oxo-dG sono aumentati nei pazienti rispetto ai controlli, ma non differiscono significativamente tra trasfusi e non. Entrambi i biomarker di genotossicità sottolineano il ruolo mutageno del sovraccarico di ferro. Gli elevati valori di %TDNA e la frequenza di micronuclei sono significativamente aumentati nei soggetti politrasfusi.

Discussioni. Il nostro studio di biomonitoraggio conferma il danno ossidativo nei soggetti con talassemia major e rileva un inaspettato danno ossidativo cellulare in quelli con talassemia intermedia. In aggiunta al sovraccarico di ferro, l'aumentata produzione mitocondriale di ROS, indotta dall'ipossia, gioca un ruolo importante nel determinare il danno ossidativo nelle β -talassemie.

POLIMORFISMI DEL GENE FSHR IN UOMINI FERTILI ED INFERTILI

L. Tamburino¹, S. La Vignera¹, V. Tomaselli², D. Valenti¹, N. Barone¹, C. Campagna¹, E. Vicari¹, A.E. Calogero¹

¹*Sez. di Endocrinologia, Andrologia e Medicina Interna e Dottorato di Ricerca in Medicina Sperimentale Clinica e Fisiopatologia cellulare, Policlinico G. Rodolico e Dip. di Scienze Mediche e Pediatriche, Università di Catania, Catania*

²*Dip. Scienze Politiche e Sociali, Università di Catania, Catania*

L'ormone follicolo-stimolante (FSH) è l'ormone che determina lo sviluppo delle cellule germinali. Nell'uomo, l'azione dell'FSH si esplica, insieme a quella del testosterone, stimolando tutte le fasi della spermatogenesi, attraverso il legame con il suo recettore specifico (FSHR), localizzato sulle cellule di Sertoli. Il gene FSHR è localizzato nel cromosoma 2p21 e comprende dieci esoni e nove introni. Lo screening del gene FSHR ha rilevato diversi "single nucleotide polymorphisms" (SNPs) localizzati sia nel promotore sia nel tratto codificante. Lo scopo del nostro studio era di valutare la frequenza di due polimorfismi nel codone 307 (Thr307Ala) e nel codone 680 (Asn680Ser) dell'esone 10 del gene FSHR e la loro possibile influenza sui livelli di FSH e sulla conta spermatica in 81 uomini siciliani di cui 48 con oligoastenoteratozoospermia (OAT) (gruppo di uomini infertili) e 33 con normozoospermia (gruppo controllo di uomini fertili). L'identificazione dei polimorfismi era condotta con l'analisi di sequenza del frammento amplificato con PCR (polymerase chain reaction) contenente ogni specifico SNP. Gli ormoni della funzione riproduttiva sono stati misurati nel gruppo di uomini infertili e nel gruppo controllo con normozoospermia. La frequenza dei genotipi FSHR alle posizioni 307 e 680 nel gruppo di uomini con OAT è risultata 22,9% (Thr/Thr-Asn/Asn), 56,3% (Thr/Ala-Asn/Ser) e 20,8% (Ala/Ala-Ser/Ser), mentre nel gruppo fertile è stata 36,4%, 42,4% e 21,2% rispettivamente. Nessuna differenza significativa è stata trovata nella distribuzione dei genotipi tra i gruppi di soggetti analizzati. Le concentrazioni di FSH e di altri parametri andrologici non differivano tra soggetti con differenti genotipi all'interno di ogni gruppo. I nostri dati mostrano che nella popolazione siciliana, i polimorfismi Thr307Ala e Asn680Ser del gene FSHR non sono correlati con i livelli di FSH né con il danno spermatogenetico.

Generazione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) mediante vettori adenovirali helper-dipendenti

P. Annunziata¹, N. Pastore¹, P. Piccolo¹, D. Palmer², P. Ng², N. Brunetti-Pierri³

¹*Telethon Institute of Genetics and Medicine, Naples, Italy*

²*Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA*

³*Dipartimento di Pediatria, Università Federico II di Napoli, Naples, Italy*

Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSCs) hanno un grande potenziale per la medicina rigenerativa e per ottenere modelli cellulari rilevanti per lo studio delle malattie umane. Le iPSCs sono state generate da cellule somatiche sia murine che umane utilizzando vettori virali (retrovirus, lentivirus e adenovirus di prima generazione), DNA plasmidico o RNA codificanti per specifici fattori di trascrizione e le proteine ricombinanti corrispondenti ai fattori di reprogramming. Per applicazioni terapeutiche l'uso di vettori integranti nel genoma pone preoccupazioni per il rischio di trasformazione neoplastica delle cellule derivate dalle iPSCs legato alla mutagenesi inserzionale. Per superare questo ostacolo sono stati sviluppati sistemi non virali che tuttavia hanno come limite la bassa efficienza. In questo studio, per generare iPSCs da cellule somatiche murine ed umane, abbiamo utilizzato i vettori adenovirali helper-dipendenti (HDAd) non-integranti, che sono privi di sequenze codificanti virali e hanno un'ampia capacità di clonaggio. Abbiamo generato un singolo vettore HDAd, che esprime i quattro fattori di reprogramming (OCT4, SOX2, KLF4, e c-MYC) sotto il controllo del promotore del Citomegalovirus (CMV), per infettare fibroblasti embrionali (MEF) derivanti dai topi transgenici Nanog-GFP, in cui il gene reporter GFP è sotto il controllo del promotore embrionale Nanog, e i fibroblasti umani. L'infezione dei MEF con il vettore HDAd ha generato iPSCs, con la tipica morfologia e positive per GFP, dopo 14 giorni dall'inizio del trattamento. La RT-PCR ha confermato l'espressione dei geni staminali Oct4 e Nanog. Analogamente abbiamo ottenuto cloni di iPSCs dai fibroblasti umani, come dimostrato dall'immunofluorescenza per marcatori staminali (TRA 1-81, TRA 1-60, SSEA3 e SSEA4) e dalla RT-PCR per i geni OCT4, DPPA5 e REX1. Il metodo di reprogramming basato su HDAd appare generare cloni di iPSCs più rapidamente rispetto ai metodi attualmente disponibili che non comportano integrazione genomica. Il reprogramming indotto da vettori HdAd potrebbe essere un metodo sicuro e rapido per la generazione e lo studio di cellule staminali paziente-specifiche, con potenziali applicazioni per una vasta gamma di patologie umane.

IL DISTURBO DEL LINGUAGGIO IN UN BAMBINO CON SINDROME 49,XXXXY

M. D'Aurora¹, A. Serafini², R. Lardani², F. Zulli³, M. Corsano³

¹Dip. di Neuroscienze ed Imaging, Università degli Studi "G. d'Annunzio", Chieti

²Dip. di Riabilitazione Neurologica, Gruppo Policlinico Abano Terme, Chieti

³Centro di Riabilitazione Ambulatoriale "San Stef. Ar.", Gruppo Policlinico Abano Terme, Atri

La sindrome 49,XXXXY è una rara aneuploidia con prevalenza di 1:85.000 bambini di sesso maschile delineata per la prima volta da Fraccaro nel 1960 descrivendo una costellazione di anomalie congenite presenti a livello cardiaco, scheletrico, endocrino e del sistema nervoso centrale in contrasto con la sindrome di Klinefelter (47, XXY).

Ad oggi, i pochi studi scientifici della letteratura internazionale descrivono gli aspetti intellettivi e adattivi di questa rara sindrome. Nel nostro lavoro presentiamo un bambino di 4 anni con sindrome 49,XXXXY per descriverne il profilo cognitivo-comportamentale secondo una prospettiva neuropsicologica che delinea principalmente le difficoltà verbali.

La valutazione psicodiagnostica è stata effettuata mediante ricorso a scale psicometriche standardizzate. Per la valutazione dello sviluppo intellettuale è stata somministrata la Griffiths Mental Development Scales (sviluppo locomotorio, personale-sociale, udito-linguaggio, coordinazione oculo-motoria, performance, ragionamento pratico). Per l'esame del linguaggio è stato somministrato il Test di Valutazione del Linguaggio (fonologico, morfo-sintattico, costruzione della frase). Per la valutazione delle abilità motorio-prassiche è stato somministrato il Protocollo delle Abilità Prassiche e della Coordinazione Motoria (schemi di movimento, funzioni cognitive adattive). Per la valutazione del profilo comportamentale sono state somministrate le Vineland Adaptive Behavior Scales (adattamento, abilità quotidiane, comunicazione, socializzazione, abilità motorie) ai genitori del bambino.

Il bambino ha manifestato un lieve ritardo dello sviluppo intellettuale con maggiori difficoltà principalmente a livello delle abilità linguistiche espressive e delle abilità locomotorie. Il profilo comportamentale è risultato compromesso sul versante ricettivo e relazionale.

Rispetto agli studi presenti nella letteratura scientifica internazionale, le analisi quantitative e qualitative delle difficoltà cognitivo-comportamentali del nostro caso clinico non si limitano alla descrizione del profilo intellettuale ed adattivo bensì forniscono significativi elementi per delineare il pattern delle abilità verbali universalmente compromesse nella sindrome 49,XXXXY.

INFLUENZA DEI GENI KIR, E DEI LORO SPECIFICI LIGANDI, SULLO SVILUPPO DEL MIELOMA MULTIPLO E SULLA RISPOSTA AL TRAPIANTO AUTOLOGO DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE

R. Littera¹, A. Ledda², M. Martino³, S. Lai¹, L. Cappai¹, R. Porcella¹, C. Culigioni⁴, F. Alba¹, R. Maddi¹, G. Milone⁵, G. La Nasa², C. Carcassi⁴

¹*Centro Regionale Trapianti, Osp. R. Binaghi - ASL 8, Cagliari, Italy*

²*Cattedra di Ematologia, Centro Trapianti Midollo Osseo, Osp. R. Binaghi - ASL 8, Dipartimento di Scienze Mediche Internistiche, Università di Cagliari, Italy*

³*Centro Trapianti Midollo Osseo "Alberto Neri", AO "Bianchi-Melacrino-Morelli" - Reggio Calabria, Italy*

⁴*Cattedra di Genetica Medica, Osp. R. Binaghi, Dipartimento di Scienze Mediche Internistiche, Università di Cagliari, Italy.*

⁵*Istituto Ematologia ed Emofilia, Osp. Ferrarotto - Catania, Italy*

INTRODUZIONE

L'attività citotossica dei linfociti Natural Killer (NK) è regolata da una complessa rete di recettori di superficie aventi funzioni antagoniste di attivazione e di inibizione; tra questi recettori i principali e più studiati sono rappresentati dai recettori Killer Immunoglobulin-like (KIRs). Esistono due principali aplotipi dei geni KIR. L'aplotipo A è caratterizzato dalla presenza di un solo gene KIR attivatore (2DS4).

Circa il 65% dei soggetti omozigoti per l'aplotipo KIR A presenta linfociti NK privi di recettori KIR attivatori sulla superficie cellulare perchè hanno le varianti delete del KIR2DS4 (alleli *003-*009).

SCOPO DELLO STUDIO

Valutare l'influenza dei geni KIR, soli o in combinazione con i loro specifici ligandi, sullo sviluppo del Mieloma Multiplo (MM) e sulla risposta al autologo HSCT.

MATERIALI E METODI

112 pazienti affetti da MM e 181 controlli sani, sono stati tipizzati per i loci HLA di I e II classe e per il genotipo KIR. Inoltre sono state determinate le varianti all'eliche del KIR2DS4 allo scopo di identificare i pazienti privi di recettori KIR attivatori sulla superficie NK.

RISULTATI

Nei pazienti affetti da MM, si evidenziano differenze statisticamente significative nelle frequenze dei geni KIR rispetto alla popolazione di controllo. In particolare risultano elevate le frequenze dei geni KIR inibitori (P = 0.007): l' 86.6% dei pazienti con MM (97/112) presenta un genotipo KIR con 6-7 geni inibitori rispetto al 59% del gruppo di controllo (109/181).

Inoltre l'influenza dei geni KIR inibitori sullo sviluppo del mieloma appare significativa non solo in termini quantitativi ma anche qualitativi. In particolare i recettori inibitori KIR 2DL2 e 2DL3 hanno una frequenza notevolmente superiore rispetto al gruppo di controllo (KIR2DL2: P = 0.007, HR 2.7, 95%CI 1.3-2.7 e KIR2DL3: P = 0.01, HR 8.0, 95%CI 1.1-60.9).

CONCLUSIONI

Nella nostra casistica, seppur limitata, le elevate frequenze di geni KIR ad attività inibitoria osservate nei pazienti con MM fanno ipotizzare una minore attività citotossica dei linfociti NK e una minore capacità di lisare le cellule mielomatose favorendo l'insorgenza della malattia.

CGH ARRAY IN ADULT PATIENTS WITH INTELLECTUAL DISABILITY? AN ANSWER FOR THE FAMILY

M.R. Calvello¹, M. Baccarin², S. Gueneri², G. Scuvera¹, F. Natacci¹, V. Bianchi¹, F. Lalatta¹, M.F. Bedeschi¹

¹Medical Genetics Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

²Medical Genetics Laboratory, Cytogenetic Laboratory, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

Background: Array comparative genomic hybridization (CGH array) has become the first-line diagnostic tool for patients with intellectual disability (ID), particularly when an exact diagnosis cannot be found until adulthood.

Case reports: here, we report three adult patients with ID and minor facial anomalies who came to our attention on their family members demand for diagnostic definition. The first probandus is a 29 years old girl with intellectual disability, dysmorphic features and hirsutism. The second probandus is a 47 years old man with ID, short stature, severe obesity and bilateral cryptorchidism. The third probandus is a 49 years old woman with ID, behavioural disorders, poliabortivity and toes anomalies. In both first two cases, an exact diagnosis was requested by their sisters for a recurrence risk counselling. In the third case, family members asked for help in presence of severe social problems of the probandus.

Methods: Array comparative genomic hybridization (Array-CGH) was performed with SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 60K with about 130 KB resolution. Assembly used: feb.2009 (GRch37/hg19).

Results: CGH array (aCGH) has detected in all cases an etiopathogenetic chromosomal alteration and, particularly, revealed a 1p36 deletion in the first case, a 15q26.2q26.3 deletion in the second case and a 8p23.3p23.1 deletion in the third case.

Conclusion: detecting an underlying genetic cause in adult patients with ID and minor facial anomalies is primary for:

- a specific diagnosis, which allows a precise definition of adult phenotypes caused by etiopathogenetic chromosomal alterations;
- an improvement of natural history of specific chromosomal syndromes;
- an adequate management and a proper follow up of adult patients with ID secondary to specific chromosomal alterations, empowering to acquire needed services and support;
- an accurate recurrence risk counselling for their family members.

Thus, we confirm the role of aCGH as a first-line diagnostic tool in adult patients with ID. Moreover, we can also consider aCGH as an often helpful answer for the family.

Differential gene expression and metformin efficacy in patients with type 2 diabetes

D. Bailetti¹, A. Masotti², M. Copetti³, O. Ludovico⁴, M.G. Farina⁵, V. Proto¹, L. Da Sacco², A. Palena⁴, S. De Cosmo⁴, L. Frittita⁵, V. Trischitta¹, S. Prudente¹

¹*IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza -Unità di Ricerca sul Diabete, Istituto CSS-Mendel, Roma*

²*Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Laboratorio di Espressione Genica e Microarrays, Roma*

³*IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, Unità di Biostatistica, San Giovanni Rotondo*

⁴*IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, Unità di Endocrinologia, San Giovanni Rotondo*

⁵*Dipartimento di Bio-medicina clinica e molecolare, Università di Catania, Catania*

Aims:

Although metformin is the “first choice” oral hypoglycemic agent (OHA) in patients with type 2 diabetes (T2D), a great inter-individual variability efficacy is observed. Our aim was to identify molecular mechanisms underlying such variability. Our hypothesis was that differences in mRNA expression profiles could address this issue. Accordingly, we measured mRNAs levels in white blood cells from patients with T2DM, before and after metformin treatment, and then looked for association between metformin efficacy and differential expression of genes belonging to unique molecular and/or physiological pathway(s).

Methodology:

In 70 patients with T2D all OHAs were discontinued for 5 days and then metformin was given for 3 months. Whole gene expression was evaluated before and after metformin treatment by using Affymetrix Gene Chips. Random Forest (RF) analyses were performed to detect the most differentially expressed genes. Bioinformatic and pathways analyses were carried out by the R Bioconductor suite and several classification tools.

Results:

The RF procedure was employed on RMA normalized data. Two lists of genes (1000 genes each) were obtained with a statistical significance of at least 0.05: the first list contained the genes correlating with the glycemic variation expressed as percentage; the second list contained the genes differentially expressed between patients when stratified as ‘responders’ and not-responders’ Overall, the dichotomous trait analysis was used to confirm data from the continuous trait analysis. Both lists were independently analyzed and genes functionally classified by Gene Ontology classification performed by DAVID. Only one pathway (i.e the Spliceosome pathway, hsa:03040), resulted highly significant by both continuous ($p=1.56 \times 10^{-5}$) and dichotomous ($p=6.40 \times 10^{-4}$) trait analysis. This pathway was more significantly ($p=4.53 \times 10^{-8}$) represented by the list of genes negatively correlated with metformin efficacy than the whole list including both positively and negatively correlated genes. This subset of 19 genes has been further validated by realtime qPCR.

Conclusion: This work might pave the way for new and/or better tailored metformin treatment in T2D.

Iperinsulinismo congenito: analisi clinica e molecolare di una grande coorte di pazienti italiani

F. Faletra¹, E. Athanasakis¹, A. Morgan², F. Fornasier¹, X. Biarnes³, R. Parini⁴, F. Furlan⁴, A. Burlina⁶, A. Maiorana¹, C. Dionisi-Vici⁵, L. Giordano⁶, P. Gasparini¹

¹*Institute for Maternal and Child Health - IRCCS "Burlo Garofolo", Via dell'Istria 65/1, 34100 Trieste, Italy*

²*Department of Medical Sciences, University of Trieste, Piazzale Europa 1, 34100 Trieste, Italy*

³*Laboratory of Biochemistry, Institut Químic de Sarrià (IQS), Via Augusta 390, ES 08017 Barcelona, Spain*

⁴*Rare Metabolic Diseases Unit, San Gerardo Hospital, Via Pergolesi 33, 20090 Monza, Italy*

⁵*Bambino Gesù Children's Hospital, Piazza Sant'Onofrio 4, 00165 Rome, Italy*

⁶*University Hospital, Division of Metabolic Disorders, Via Giustiniani 3, 35128 Padova, Italy*

L'iperinsulinismo congenito (CHI) è una malattia genetica caratterizzata dalla presenza di un'ipoglicemia profonda dovuta a una secrezione inappropriata di insulina. Si tratta di una malattia eterogenea classificata in due sottogruppi principali: "canalopatie" dovuta a difetti del canale del potassio ATP-sensibile, codificato dai geni ABCC8 e KCNJ11, e "metabolopatie", causate da mutazioni di diversi geni (GCK, GLUD1, HNF4A e HADH) e coinvolti in diverse vie metaboliche. Per chiarire l'eziologia genetica dell'iperinsulinismo congenito nella popolazione italiana, abbiamo condotto un'analisi clinica e di sequenziamento di tutti i geni finora correlati al CHI in un'ampia coorte di 36 pazienti: 29 con Iperinsulinismo congenito classico (HI) e 7 con iperinsulinismo-iperammoniemia (HI/HA). Sono state trovate ventisette mutazioni in quindici pazienti con la forma classica e cinque mutazioni in cinque pazienti con la forma associata all'iperammoniemia. I nostri dati confermano il ruolo fondamentale del canale del potassio ATP-sensibile nella patogenesi della malattia anche nei casi italiani (~70% delle mutazioni), mentre la restante percentuale dei casi deve essere attribuita agli altri geni. Una migliore conoscenza delle basi molecolari dell'iperinsulinismo congenito porterebbe a migliorare le strategie per lo screening genetico ed il calcolo del rischio di ricorrenza. Inoltre, l'analisi genetica potrebbe anche aiutare a distinguere le due forme istopatologiche di CHI, che porterebbe ad un netto miglioramento nel trattamento e nella consulenza genetica. Tra i casi negativi sono stati selezionati 2 pazienti con la forma classica e 2 con la forma associata ad iperammoniemia. Nel tentativo di evidenziare nuovi geni malattia sono stati studiati tramite Next Generation Sequencing (Illumina Hi-Seq). L'analisi dei dati ottenuti al momento non ha ancora fornito risultati conclusivi.

GSD 1B , FIBROSI CISTICA E DUPLICAZIONE 22Q11: QUALE CORRELAZIONE GENOTIPO/FENOTIPO?

F. Menni¹, L. Ballarati², F. Bonarrigo¹, L. Roviada¹, F. Manzoni¹, C. Sabatini¹, G. Chiarelli¹, D. Milani³

¹*Dip. di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti, Fond IRCCS- Cà Granda- Osp. Maggiore Policlinico, Milano*

²*Laboratorio di Citogenetica Medica e Genetica Molecolare IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano*

³*UOD Genetica Medica, IRCCS, Fondazione IRCCS- Cà Granda- Ospedale Maggiore Policlinico, Milano*

Descriviamo il caso di un bambino di 10 anni affetto da fibrosi cistica e glicogenosi (GSD) tipo Ib, nato da genitori consanguinei (cugini IV grado). La diagnosi di fibrosi cistica è stata effettuata alla nascita da screening neonatale e confermata mediante analisi molecolare ($\Delta F508$ omozigote). La GSD, sospettata fin dall'epoca neonatale (ipoglicemia persistente inferiore a 2 mmol/L dopo digiuno di 2-3 ore correlata a iperlattacemia) è stata confermata mediante analisi molecolare solo 9 anni dopo. Il dosaggio enzimatico effettuato a 10 mesi era infatti risultato nella norma. La complessità del quadro clinico e l'assenza di risultati enzimatici conclusivi avevano nel frattempo posto indicazione all'esecuzione di ulteriori indagini diagnostiche. Il bambino presentava infatti neutropenia grave nonostante terapia con granulochine, infezioni da germi multi resistenti a terapia, splenomegalia con ipersplenismo in assenza di varici esofagee, tale da richiedere splenectomia all'età di 7 anni. A causa delle compromesse condizioni generali era stata posta l'indicazione a doppio trapianto fegato/polmone. E' stato pertanto effettuato studio enzimatico su biopsia epatica dell'attività della catena respiratoria mitocondriale indicativo per deficit parziale del complesso I. A completamento diagnostico e' stato inoltre eseguito array-CGH che ha evidenziato una duplicazione della regione cromosomica 22q11.21 (nucleotidi 17270271-19835417) de novo. Il riscontro avvenuto mediante analisi degli array rende conto della complessità del fenotipo e permette di interpretare e giustificare segni ritenuti atipici delle patologie di base anche se considerate in combinazione tra loro.

aCGH: QUANDO LA RISPOSTA NON È SCONTATA

M. Cerutti¹, F. Menni ¹, S. Guez¹, G. Chiarelli¹, F. Novara², C. Pantaleoni³, S. D'arrigo³, B. Molteni³, V. Saletti³, M. Estienne⁴, D. Milani⁵

¹*Dip di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti, Fond IRCCS- Cà Granda- Osp Maggiore Policlinico, Milano*

²*Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia*

³*Divisione di Neurologia dello Sviluppo , Fondazione IRCCS C.Besta, Milano*

⁴*Divisione di Neuropsichiatria Infantile , Fondazione IRCCS C.Besta, Milano*

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

L'analisi mediante array-CGH può svelare la presenza di anomalie del patrimonio genetico correlabili con certezza alla genesi di patologie note. Con una certa frequenza accade tuttavia che l'esame non sia direttamente conclusivo. Può infatti mettere in evidenza delezioni o duplicazioni che, sulla base delle conoscenze attuali, non sono rapidamente e univocamente interpretabili in quanto di dimensioni molto limitate, in regioni poco conosciute, o comprendenti geni le cui alterazioni non sono state mai descritte nell'uomo. In questi casi vengono valutati alcuni parametri al fine di stabilire una possibile correlazione tra anomalia genetica ritrovata e quadro clinico dell'affetto (contenuto genico della regione coinvolta, presenza di altri soggetti che presentino un quadro clinico simile e portatori di alterazione a carico della medesima regione, presenza di altri soggetti portatori della medesima alterazione nel nucleo familiare, affetti o non affetti).

Presentiamo sei casi clinici di pazienti in età pediatrica, affetti da ritardo di sviluppo psicomotorio variabilmente associato ad altri segni e sintomi, giunti alla nostra attenzione per una interpretazione dell'array-CGH, che aveva mostrato alterazioni di piccole dimensioni, mai descritte in letteratura.

Lo studio delle regioni coinvolte ha mostrato la presenza di geni espressi nel sistema nervoso centrale. In assenza di diagnosi alternative, abbiamo concluso per una possibile patogenicità delle alterazioni riscontrate con il limite nella definizione di certezza dovuto all'assenza di precedenti segnalazioni in letteratura.

E' pertanto evidente l'importanza di una attenta, approfondita e precisa analisi dei risultati, ai fini dell'inquadramento diagnostico e della definizione del rischio riproduttivo per i familiari.

A NEW STOP CODON MUTATION IN EXON 15 OF THE APC GENE IN AN ITALIAN FAMILY WITH FAMILIAL ADENOMATOUS POLYPOSIS

M. Greco¹, L. Schirosi¹, M. Pellegrino², S. Mariano¹, P. Tarantino¹, S. Mauro¹

¹*U.O.C. Lab. di Genetica Medica, Polo Oncologico Giovanni Paolo II ASL-LECCE,*

²*U.O. Anatomia Patologica Osp. Vito Fazzi ASL-LECCE*

Familial adenomatous polyposis (FAP) is an autosomal dominant disorder characterized by the detection of hundreds of adenomatous polyps in the colon and rectum of affected individuals. Untreated, colorectal cancer develops general in the fourth decade of life as a consequence of additional event related to the original germline mutation.

The genetic basis of FAP is a germline mutations of the Adenomatous Polyposis Coli (APC) gene, a tumor suppressor gene located on the long arm of chromosome 5 in band q21. The coding region contains 15 exons for a protein of 310 kDa.

APC protein has different cellular functions, it plays a central role in Wnt signaling, in part regulating the degradation of β -catenin and transcription of a number of important cell-proliferation genes. It plays a role also in cell-cell adhesion, stability of the microtubular cytoskeleton in addition to cell cycle regulation and possibly apoptosis.

Here we report the case of a family with a new mutation in APC gene identified in each analyzed member of the family with confirmed diagnosis of intestinal polyposis.

The proband was affected by colon-rectal cancer and underwent to surgery for subtotal colectomy. In the same family, other 3 members were affected by intestinal polyposis, while the grandmother died for colon-rectal cancer.

Genomic DNA from affected patients was isolated from peripheral blood leukocytes as well as from proband's formalin fixed and paraffin embedded histological sections of colon-rectal cancer. Mutation analysis of exon 1-15 of the APC gene was performed using direct sequencing technology and revealed the presence of a new mutation at position c.2126, in exon 15 of APC gene, never reported in literature. This mutation causes a frame shift in the coding sequence resulting in a premature stop codon (p.G721Efs X6) and generating a truncated protein lacking about 75% of its part. According to literature data, this mutation is located in the gene sequence coding a regulatory domain involved in β -catenin homeostasis.

In absence of a functional APC protein, β -catenin is stabilized and accumulates in the cytoplasm. This results in uncontrolled transcriptional activation, which may contribute to cell proliferation and cancer progression.

EARLY CLINICAL SIGNS LEADING TO SUSPICION OF EHLERS DANLOS SYNDROME (EDS) IN A COHORT OF AFFECTED PATIENTS IN PEDIATRIC AGE.

M. Cerutti¹, F. Bonarrigo¹, F. Menni¹, B. Marinelli², A. Bassotti³, S. Guez¹

¹*Dep. of medical-surgical phis. and transplantation, Fond IRCCS- Cà Granda- Osp Maggiore Policlinico, Milano*

²*Center Molecular- Genetic Epidemiology, Dep. of Environmental and Occupational Health, Un. di Milano, Fond IRCCS- Cà Granda Osp Maggiore Policlinico, Milan*

³*Ehlers-Danlos disease regional center, Dep of Preventive Medicine, Fond IRCCS- Cà Granda- Osp Maggiore Policlinico, Milan*

EDS is difficult to diagnose in children in case of absence of a family history. We describe the more useful clinical signs to anticipate the diagnosis. Clinical evaluation has been carried out on a cohort of 26 patients from 2 to 16 years (10 females and 16 males) affected by EDS. 16 of them have a family history and 6 patients out of this group were typified for the molecular (gene COL5A1-COL3A1) and/or biochemical profile. 11.5% of them have shown malformations at the ultrasound examinations in the prenatal period. Neonatal course has been complicated with respiratory distress in 11.5%, and two of them showed poor sucking. Skin appears velvety, hyperextensible (30%), smooth (30.7%) and paste (19%). Furthermore, it is fragile and often tears after trivial trauma (7%). Scars are extended, atrophic, translucent, often referred as cigarette papers scars (5%). Easy bruising is common (30%). Joint hypermobility occurs in all the children and 2 of them show shoulder dislocation. We also describe flat-footed (26%), scoliosis (38%) and problems in cervical vertebra or increased spinal motility (15%). No patient has mental retardation, but muscle hypotonia may cause delay in motor development (23%). 11% have also reported language disorder due to alteration in the pronunciation of words (11%). No cardiac problems were found in the prenatal age while mitral regurgitation or alterations of heart valves are described in 23%; 2 children had arrhythmias. A shaded clinic and the absence of painful symptom or functional impotence that characterize adult can delay diagnosis in children.

IL TRASFERIMENTO DEL GENE REGOLATORE DELL'AUTOFAGIA TFEB AGLI EPATOCITI CORREGGE LA MALATTIA EPATICA DA DEFICIT DI α -1-ANTITRIPSINA

N. Pastore¹, K. Blomenkamp², F. Annunziata¹, P. Piccolo¹, F. Vetrini³, E. Polishchuk¹, S. Iacobacci³, R. Polishchuk³, J. Teckman², A. Ballabio¹, N. Brunetti-Pierri¹

¹*Telethon Institute of Genetics and Medicine, Naples, Italy*

²*Department of Pediatrics, Washington University School of Medicine, St. Louis Children's Hospital, St. Louis, MO, USA*

³*Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA*

Il deficit di α -1-antitripsina (AAT), dovuto alla mutazione missenso (Lys342Glu) che altera il folding proteico, è la causa genetica piú comune di malattia epatica nei bambini e l'unico trattamento attualmente disponibile è il trapianto di fegato. Il fattore di trascrizione EB (TFEB) è un gene che regola la funzione lisosomiale, l'autofagia e promuove la clearance cellulare. In questo lavoro abbiamo valutato se il trasferimento del gene codificante per TFEB alle cellule epatiche incrementa la degradazione di α -1-antitripsina mutata (ATZ). Abbiamo iniettato un vettore adenovirale helper-dipendente (HDAd) esprime TFEB sotto il controllo di un promotore fegato specifico (HDAd-TFEB) nei topi PiZ, che esprimono il gene umano ATZ e ricapitolano le caratteristiche della malattia epatica osservata nell'uomo. Il trasferimento del gene TFEB ha portato ad una riduzione a lungo termine dell'accumulo dell'ATZ nei topi PiZ, come mostrato da una marcata riduzione della colorazione PAS e dei globuli contenenti ATZ. La correzione del fenotipo epatico è associata ad un incremento del flusso autofagico e della biogenesi lisosomiale epatica, come indicato dall'aumento di espressione di LAMP1, dalla riduzione di SQSTM1/p62, dalla riduzione del numero di autofagolisosomi, e dalla microscopia elettronica con immunogold che ha evidenziato un incremento del segnale dell'ATZ negli autofagolisosomi. I fegati dei topi trattati con il vettore HDAd-TFEB hanno mostrato inoltre una marcata riduzione della forma monomerica dell'ATZ, secondaria alla ridotta espressione dell'mRNA dovuta ad una riduzione dell'attivazione dell'NF κ B e della IL-6, interrompendo pertanto un circolo vizioso che aggrava il danno epatico mediante un incremento della trascrizione di ATZ. Infine, i topi iniettati con HDAd-TFEB presentavano riduzione dell'apoptosi e della fibrosi epatica, che sono caratteristiche fondamentali della malattia epatica da deficienza di AAT. In conclusione, il trasferimento del gene TFEB al fegato conduce a clearance dell'ATZ e correzione del fenotipo epatico ed è quindi una nuova ed interessante strategia per la terapia della malattia epatica dovuta a deficit di AAT.

RENAL FAILURE IN LATE DIAGNOSIS OF FABRY DISEASE: IRREVERSIBILITY DESPITE ENZYME REPLACEMENT THERAPY (ERT)

F. Menni¹, C. Sabatini¹, G. Chiarelli¹, F. Manzoni¹, F. Paglialonga²

¹*Dip di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti, Fond IRCCS- Cà Granda- Osp Maggiore Policlinico, Milano*

²*UOD Nefrologia e Dialisi, Fond IRCCS- Cà Granda- Osp Maggiore Policlinico, Milano*

We describe a patient with Fabry disease diagnosed at 11 years of age as a result of the discovery of renal failure. In 2006 the child was hospitalized for palmar and plantar burning sensation. Investigations revealed chronic renal failure, cardiomyopathy and an hemodialysis program was started. A renal biopsy was performed with evidence of storage in glomerules and blood vessel. He was underfed (BMI 13,8 Wt -4SD, Ht -3,76SD). A Fabry disease was suspected and confirmed by enzyme dosage: low levels of alpha galactosidase (1,68 nmol/h/mg protein-n.v.100-800). GLA mutation confirmed the disease and the mother was identified as a carrier.

ERT was started in Romania in 2007 with beta agalsidase, every two weeks. After one year he showed an improvement of general status, of cardiomyopathy, but persistence of renal failure. He arrived in Italy at 17 years of age after stop of therapy of 3 months with inability to work due to acroparestesia, cardiomyopathy and hypohydrosis. We started ERT with agalsidase alfa 50 mg/Kg every two week. After 3 months of treatment amelioration of acroparestesia and cardiomyopathy was noticed. He continued hemodialysis 3 times per week.

Due to his renal condition, he was nominated for a renal transplant.

INTRA FAMILIAL PHENOTYPIC VARIABILITY IN EHLERS DANLOS SYNDROME (EDS)

M. Cerutti¹, F. Bonarrigo¹, D. Milani², B. Marinelli³, A. Bassotti⁴, F. Menni¹, S. Guez¹

¹*Dip Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti, Fond IRCCS- Cà Granda- Osp Maggiore Policlinico, Milano*

²*UOD Medical Genetic, Fondazione IRCCS- Cà Granda- Ospedale Maggiore Policlinico, Milan,*

³*Center of Molecular and Genetic Epidemiology, Dep of Environmental and Occupational Health, Univ di Milano, Fond Cà Granda, IRCCS Osp Maggiore Policlinico, Milano*

⁴*Ehlers-Danlos disease regional center, Dep of Preventive Med, Fond IRCCS- Cà Granda- Osp Maggiore Policlinico, Milan*

Among all the pediatric cases with EDS included in our observation, 61% are family cases and the remaining part are sporadic cases. In some families, we have observed an evolution of the clinical features, after some generations, toward both an improvement and a worsening of symptoms. We describe two typical family cases. The first one is of a woman who is affected by EDS, classified as Classical Type. She has a very elastic, smooth and velvet skin, with atrophic scars that are disproportionate compared to traumas. She develops a history of frequent joint subluxation, especially in childhood, polyarticular laxity and mild scoliosis. Her daughter shows a severe muscle hypotonia associated with right wide-ranging scoliosis, bilateral flat-footed and hip dysplasia with necrosis of femoral head. She can't walk due to her clinical condition. Considering the daughter's features, we suppose to change the classification of the syndrome from Classical Type to kyphoscoliosis type. In the second family, the father has a mutation of the COL5A1. His clinical features are characterized by smooth, velvet and elastic skin, atrophic scars and keloids. He also has bilateral flat-footed and joint hypermotility. His two daughters show the same mutation as that of the father but they have very poor and mild symptoms characterized only by a mild pronators syndrome. We can conclude that the correlation between genotype and phenotype, also in the same family, can show a strong variability.

TERAPIA CON FENILBUTIRRATO PER IL DEFICIT DI PIRUVATO DEIDROGENASI

R. Ferriero¹, G. Manco², E. Lamantea⁴, E. Nusco¹, M. Ferrante³, P. Sordino³, L. Bonafe⁵, P. Stacpoole⁶, B. Lee⁷, M. Zeviani⁴, N. Brunetti-Pierri¹

¹*Telethon Institute of Genetics and Medicine, Naples, Italy*

²*Institute of Protein Biochemistry, IBP, Naples, Italy*

³*Stazione Zoologica Anthon Dohrn, Naples, Italy*

⁴*Besta Institute, Milan, Italy*

⁵*University of Lausanne, Lausanne, Switzerland*

⁶*University of Florida, Gainesville, USA*

⁷*Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA*

Il deficit del complesso della piruvato deidrogenasi (PDH) è il più comune disordine genetico che porta ad acidosi lattica. La fosforilazione di specifici residui di serina della subunità E1 α della PDH da parte delle piruvato deidrogenasi chinasi (PDK) inattiva l'enzima, mentre la defosforilazione ne ripristina l'attività. Attraverso studi in vitro ed in vivo abbiamo scoperto che il fenilbutirrato incrementa l'attività enzimatica della PDH riducendo la porzione di enzima fosforilato attraverso l'inibizione della PDK. Fibroblasti umani wild-type incubati con fenilbutirrato hanno mostrato livelli ridotti di E1 α fosforilata rispetto alle cellule non trattate ed un aumento dell'attività enzimatica della PDH. Il fenilbutirrato, somministrato per via orale a topi C57Bl/6 wild-type, induce un aumento significativo dell'attività del complesso e una riduzione di E1 α fosforilata nel cervello, muscolo e fegato rispetto ai topi trattati con placebo. Utilizzando enzimi ricombinanti, abbiamo riscontrato che il fenilbutirrato impedisce la fosforilazione di E1 α inibendo la PDK, fornendo una spiegazione molecolare dell'azione del fenilbutirrato sull'attività della PDH. Inoltre il fenilbutirrato aumenta l'attività della PDH nei fibroblasti di pazienti con deficit della piruvato deidrogenasi e corregge il fenotipo dei zebrafish *noa*^{m631} che sono deficienti per la PDH a causa di una mutazione missenso nella subunità E2 del complesso della PDH. La somministrazione cronica del fenilbutirrato è generalmente ben tollerata nell'uomo e questo farmaco potrebbe essere efficace per la terapia dei pazienti con deficit di PDH.

CITOGENETICA MOLECOLARE SU TESSUTO ABORTIVO CON TECNOLOGIA XMAP KARYOLITE BOBS

R. Genesisio¹, A. Mormile¹, G. Leone¹, R. Cicatiello¹, G. Maruotti², R. Tortora¹, A. Conti¹, L. Nitsch¹

¹*Dip. di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, Università di Napoli Federico II*

²*Dip. di Ostetricia e Ginecologia, Università di Napoli Federico II*

Le patologie cromosomiche sono responsabili del 40% degli aborti spontanei. L'esame citogenetico del prodotto abortivo, di scarsa utilità in caso di riarrangiamenti cromosomici familiari rivelabili dal cariotipo parentale, trova giustificazione nel fatto che aborti ricorrenti potrebbero essere associati a difetti della disgiunzione meiotica per anomalie del check-point o anomalie parentali a mosaico nella linea germinale. Poiché l'analisi citogenetica classica di tessuto abortivo può fallire, per fallimento della coltura cellulare, sono state introdotte recentemente tecniche alternative di citogenetica molecolare. Presentiamo qui una casistica di 28 biopsie da aborti spontanei e 4 da aborti terapeutici, analizzate con la tecnica citofluorimetrica xMAP, denominata Karyolite Bacs-on-Beads, che utilizza, per ciascun cromosoma, da 9 a 12 cloni BAC immobilizzati su biglie magnetiche. Tutti i campioni sono stati analizzati parallelamente con citogenetica classica, ma 7 campioni non hanno avuto risposta citogenetica per il fallimento della coltura cellulare. La diagnosi con Karyolite è stata ottenuta per tutti i campioni analizzati, mostrando un detection rate del 34%. Non sono stati correttamente diagnosticati con Karyolite una triploidia e 2 riarrangiamenti bilanciati di origine parentale, in accordo con i limiti noti della tecnica. Per contro, 3 aneuploidie non sono state diagnosticate dalla citogenetica classica per fallimento della coltura cellulare. Per le altre 25 diagnosi eseguite con entrambe le tecniche c'è stata una perfetta concordanza di risultato. Solo 3 degli 11 risultati patologici avrebbero potuto essere diagnosticati con FISH su nuclei interfasicci per le aneuploidie più comuni. Inoltre, ed è il dato più interessante, la tecnica Karyolite è stata in grado di riconoscere e caratterizzare entro 72 ore dal prelievo, oltre a 8 aneuploidie, 3 riarrangiamenti di cui 2 markers sovranumerari. Concludiamo, quindi che il cariotipo mediante Karyolite BoBs TM è una tecnica rapida, accurata, non costosa e di facile interpretazione. Se i cloni BAC fossero disegnati in regioni cromosomiche più subteleriche, la tecnica potrebbe fornire anche utili informazioni in caso di traslocazioni sbilanciate di piccole dimensioni, non rilevabili dal cariotipo parentale.

Assessing the contribution of the SCN1B gene as a cause of Brugada syndrome among 145 Italian patients.

M.T. Ricci¹, S. Menegon¹, S. Vatrano¹, G. Mandrile¹, P. Carvalho², C. Giustetto², D. Giachino¹

¹*Genetica Medica, Dip. di Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli Studi di Torino e AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano*

²*Cardiologia, Dip. di Scienze mediche, Città della Salute e della Scienza, Università degli Studi di Torino*

Brugada syndrome (BrS) is an autosomal dominant arrhythmogenic cardiopathy characterized by a typical ST segment elevation in the right precordial leads of the electrocardiogram and predisposition to malignant events in the absence of structural heart disease. Beside the main responsible gene SCN5A, which encodes the heavy chain of the voltage-gated Sodium channel Nav5.1, mutations in an increasing number of minor genes has been reported in few families, but their contribution to BrS has been poorly investigated. We have focused our attention to SCN1B, which encodes the β 1 subunit of the channel and its soluble β 1B isoform. SCN1B mutations have been associated not with BrS only but also with other arrhythmic phenotypes as cardiac conduction disease, sudden infant death syndrome, atrial fibrillation, and also with genetic epilepsy with febrile seizures plus spectrum disorders (GEFS+).

We screened for SCN1B mutations 145 BrS patients with WT SCN5A status.

We sequenced all six SCN1B exons, including the alternatively spliced exon 3A, and classified variants as neutral or putatively pathogenic according to their presence in online variants databases and bioinformatic predictions. No other cases of BrS, arrhythmias or seizures were present in the families of variants carriers: for this reason, no co-segregation or genotype-phenotype studies were possible.

Of three identified non-synonymous variants, S15Y and A197D were novel and absent in online databases, including NHLBI GO ESP (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), while a third, C211Y, was present in ESP at low frequency (MAF: 0.03); noteworthy, this variant had been previously described in a patient with partial epileptic crisis (Orrico et al 2009).

In addition, in another patient we found a synonymous change (c.588G>A, G196G) that was absent in the dbSNP and ESP datasets.

Our findings of a low prevalence of SCN1B mutations is in agreement with previous reports. However, it can be noted that the prevalence of SCN1B vs SCN5A among BrS patients fits well with the ratio of their coding lengths.

Further studies aimed to identify other candidate BrS genes are needed to improve the impact of genetic testing in risk stratification and clinical management and reveal possible genotype-phenotype correlations.

VETTORI ADENOVIRALI HELPER-DIPENDENTI PER LA TERAPIA GENICA DELL'IPEROSSALURIA PRIMARIA DI TIPO I

R. Castello¹, S. d'Aria¹, R. Borzone¹, P. Piccolo¹, P. Annunziata¹, N. Brunetti-Pierri¹

¹*Telethon Institute of Genetics and Medicine, Naples, Italy*

L'iperossaluria primaria di tipo I (PH1) è una malattia congenita del metabolismo, causata dal deficit dell'enzima perossomiale alanina:gliossilato aminotrasferasi (AGXT), espresso negli epatociti. La deficienza di AGXT provoca l'accumulo di gliossilato che nel citosol è convertito dall'enzima gliossilato reduttasi-idrossipiruvato reduttasi (GRHPR) in glicolato o dalla lattato deidrogenasi (LDH) in ossalato, un metabolita tossico per molti tessuti ed in particolare per il rene. Nei pazienti affetti da PH1 l'ossalato si accumula nel parenchima renale formando calcoli e provocando insufficienza renale. L'unica terapia disponibile è il trapianto combinato di fegato e reni, ma questa procedura è molto invasiva e rischiosa. Pertanto è necessario sviluppare terapie alternative e la terapia genica è un'opzione interessante per la PH1. A tale scopo, abbiamo valutato l'efficacia dei vettori adenovirali helper-dipendenti (HDAd) per la terapia genica diretta al fegato nel modello murino di PH1, deficiente per l'Agxt. Abbiamo generato due vettori HDAd: un vettore HDAd-AGXT esprime il gene AGXT umano e un vettore HDAd-Grhpr esprime il gene Grhpr murino. In entrambi i vettori, l'espressione del gene terapeutico è controllata da una cassetta di espressione epatocita-specifica. Nei topi PH1 iniettati con entrambi i vettori abbiamo osservato una significativa riduzione o normalizzazione dell'ossalato urinario. Nei topi PH1 iniettati con HDAd-Grhpr abbiamo osservato un concomitante incremento del glicolato sierico, dimostrando così che l'overespressione di Grhpr induce una diversione del flusso metabolico verso metaboliti non tossici. Le analisi istologiche hanno dimostrato che i topi trattati presentano una riduzione dei calcoli renali. In conclusione, i risultati del nostro studio preclinico dimostrano l'efficacia della terapia genica con vettori HDAd per il trattamento della PH1. I risultati ottenuti con il vettore HDAd-Grhpr suggeriscono che questo vettore può essere efficace nei pazienti con PH1 che hanno un maggiore rischio di sviluppare reazioni immunologiche contro l'AGXT (e.g. pazienti CRIM negativi) e che l'aumento di espressione del gene Grhpr può essere sfruttata per ridurre l'iperossaluria nei pazienti con PH1.

NEUROFIBROMATOSI DI TIPO 1 E SINDROME DI LEGIUS: DIAGNOSI MOLECOLARE DIFFERENZIALE IN ETÀ PEDIATRICA

G. Piluso¹, C. Santoro², T. Giugliano¹, G. Pellino², C. Pisano¹, S. Perrotta², G. Lama², V. Nigro¹

¹*Dipartimento di Patologia Generale, Seconda Università degli studi di Napoli, Napoli*

²*Dipartimento di Pediatria "F. Fede", Centro di Riferimento Regionale Campano per la Neurofibromatosi in età pediatrica, Seconda Università degli Studi di Napoli, Napoli*

Le RASopatie sono disordini dello sviluppo caratterizzati da mutazioni in geni coinvolti nel pathway di attivazione di Ras/MAPK. Pur nella loro unicità, esse hanno segni clinici comuni, come le manifestazioni cutanee.

Macchie caffè latte e lentiginosi sono due dei criteri diagnostici della Neurofibromatosi di tipo 1 (NF1), una condizione autosomica dominante ad elevata variabilità fenotipica, anche intrafamiliare, e comparsa dei segni clinici età dipendente. La sindrome di Legius, con mutazioni dominanti in SPRED1, presenta anch'essa macchie caffè latte e lentiginosi, in assenza di neurofibromi e di altre manifestazioni tumorali della NF1.

Tra i pazienti che soddisfano i criteri diagnostici per NF1 ma senza mutazioni identificabili nel gene, circa il 5-23% ha mutazioni in SPRED1. La diagnosi differenziale è quindi fondamentale in età pediatrica per un corretto counseling e follow up.

Riportiamo i risultati dell'analisi di un'estesa coorte di pazienti pediatrici, investigati con un protocollo combinato di RT-PCR/sequenziamento su RNA estratto da leucociti del sangue periferico e MLPA su DNA genomico, che consente d'identificare un'ampia classe di mutazioni nei geni NF1 e SPRED1.

Abbiamo analizzato i campioni di 140 pazienti pediatrici, di cui 117 con diagnosi clinica di NF1 familiare/sporadica e 23 con diagnosi dubbia.

In totale, 100 pazienti presentavano mutazioni in NF1 con 87 differenti mutazioni ed il 56% di nuove mutazioni. Di questi, il 9% avevano delezioni/duplicazioni in NF1 evidenziate per MLPA. 3 pazienti erano mutati in SPRED1, con una nuova mutazione (c.49_53delGTGCG) identificata in una famiglia costituita da 40 soggetti in 5 generazioni, di cui 15 clinicamente affetti.

Nei 23 casi con diagnosi dubbia, l'analisi molecolare identificava mutazioni in NF1 nel 22% dei casi (5/23) ed in SPRED1 nell'13% dei casi (3/23).

La diagnosi molecolare è quindi utile per dirimere il sospetto diagnostico specie nei primi anni di vita, quando non sono ancora presenti alcuni tipici segni discriminanti tra NF1 e s. di Legius. Sarà utile valutare il rapporto costo/beneficio, considerando che la diagnosi genetica precoce può comportare un risparmio economico per il S.S.N., ad esempio modificando la periodicità di esami strumentali costosi.

RITARDO MENTALE E AUTOZIGOSITA': VECCHI ATTORI E NUOVE STRATEGIE

P. d'Adamo¹, V. Pecile², I. Gandin², F. Faletra², L. Cleva², P. Gasparini¹

¹*Universita' di Trieste*

²*Genetica Medica, IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste*

Una regione di omozigosità (ROH) è definita come uno stretch continuo di DNA senza eterozigosità nello stato diploide. Queste regioni sono per lo più il frutto di consanguineità più o meno recenti nei genitori e sono state correlate a fenomeni di "inbreeding depression" in molti fenotipi complessi. Abbiamo analizzato 315 soggetti con ritardo mentale sia isolato che associato a malformazioni o epilessia per verificare l'eventuale correlazione tra il carico di omozigosità (e quindi la presenza di molte varianti geniche in omozigosi) e la gravità del quadro clinico. I soggetti sono stati genotipizzati con vetrini ILLUMINA ad alta densità (da 300K a 700k SNP per soggetto) e analizzati al fine di escludere eventuali CNVs patogenetiche. Dopo questo primo filtro sono stati individuati i parametri ottimali per il confronto di dati provenienti da vetrini a densità diversa e questi parametri sono stati utilizzati per la rilevazione delle zone di omozigosità. I risultati sono stati molto incoraggianti. I soggetti con ritardo mentale isolato, ad esempio, hanno una lunghezza media delle ROH inferiore a quelli con un quadro clinico più compromesso e in alcuni casi sono stati individuati geni già correlati a ritardo mentale presenti nelle ROH di soggetti affetti. Inoltre sono state rilevate zone di omozigosità presenti solamente nei soggetti affetti e non in un gruppo di soggetti di controllo. Lo studio all'interno di queste zone ha evidenziato alcuni geni interessanti che, potenzialmente, possono contribuire al quadro clinico dei soggetti studiati o determinarlo. Nonostante l'esiguità del campione non consenta confronti statistici "robusti", ci sono evidenze che le ROH vanno considerate come dei veri e propri fattori di rischio, e costituiscono un utile strumento per la ricerca di geni potenzialmente patogenetici.

SURVEY OF KRAS, BRAF AND PIK3CA GENES MUTATIONAL STATUS IN 209 CONSECUTIVE CASES OF ITALIAN COLORECTAL CANCER PATIENTS

C. Bozzao¹, D. Varvara¹, M. Piglionica², R. Bagnulo¹, G. Forte¹, M. Patruno¹, S. Russo³, D. Piscitelli³, A. Stella¹, N. Resta¹

¹*Sez. di Genetica Medica, Dip. di Biomedicina dell'Età Evolutiva, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Bari*

²*Sez. di Medicina Legale, Dip. di Medicina Interna e Pubblica, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Bari*

³*Sez. di Anatomia Patologica, Dip. di Anatomia Patologica, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Bari*

The molecular testing for KRAS and BRAF mutations in tumor tissue is a fundamental tool to identify patients with metastatic colorectal cancer (CRC) eligible for anti-EGFR monoclonal antibody therapy. We here report a molecular analysis by HRM analysis and direct sequencing of KRAS, BRAF and PIK3CA hotspot mutations in 209 Italian CRC patients. 110 (51%) patients potentially non-responders to anti-EGFR therapy were identified: 90/209 patients (43%) harboring KRAS mutations, 13/117 (11.1%) patients with V600E BRAF mutation, and 7/209 patients (3.3%) with mutations in PIK3CA exon 20. The prevalence of BRAF and PIK3CA mutations was significantly higher in patients older than 65 years ($P=0.014$ and $P=0.018$), while patients with triple-negative tumor were significantly younger than the mutation carriers ($P=0.000011$). Mutated patients presented also a trend for a preferential localization of the tumor at the colon site ($P=0.026$). Moreover, although on a relatively small number of samples, we report the presence of a discordant mutational profile between primary tumors and secondary lesions (3/9 patients), suggesting the possibility to test also other available tissues in order to better define the targeted therapy efficacy. Further correlations of specific clinical features with tumor mutational profile could be helpful to predict the response of CRC patients to moAbs therapy.

SINDROME DI KLINEFELTER E TROMBOFILIA GENETICA

C. Barone¹, A. Cataliotti Del Grano², L. Indaco², C. Ettore², N. Cutuli³, B. Barrano², C. Barone², G. Milana³, S. Bianca²

¹*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania - Scuola di Specializzazione in Genetica Medica Università degli Studi Messina - Catania*

²*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania*

³*Laboratorio Genetica Molecolare AOU Policlinico-OVE, Catania*

Introduzione:

La sindrome di Klinefelter è caratterizzata generalmente da un cariotipo 47,XXY esistono forme più rare con differenti assetti cromosomici. L'incidenza è di circa 1/1000 nati maschi. I segni clinici sono caratterizzati da un interessamento prevalente a carico della sfera sessuale con segni clinici più evidenti dopo la pubertà dati da ipoplasia testicolare, sterilità, statura elevata, ginecomastia, e raramente ritardo mentale caratterizzato prevalentemente da disturbi comportamentali e di adattamento. In letteratura sono stati riportati alcuni casi con presenza di eventi vascolari trombotici ed associate mutazioni trombofiliche genetiche.

Caso clinico:

Riportiamo due casi di TVP poplitea femorale in due soggetti affetti da SK con cariotipo 47,XXY.

In entrambi i casi la TVP si è verificata durante terapia ormonale sostitutiva. L'esame per trombofilia genetica evidenziava nel primo probando, 35enne, una eterozigosi per la mutazione G1691A-Leiden del fattore V della coagulazione, una doppia eterozigosi per le mutazioni C677T ed A1298C del gene MTHFR ed una eterozigosi del profilo polimorfico 455G>A del gene FGB. Nel secondo paziente, 32enne, si evidenziava una eterozigosi per la mutazione G20210A del gene fattore II della coagulazione, una omozigosi per la mutazione C677T del gene MTHFR ed una eterozigosi del profilo polimorfico 455G>A del gene FGB.

Conclusioni:

I casi clinici da noi riportati sottolineano l'importanza di eseguire lo screening per l'esame trombofilico genetico nei pazienti con SK prima dell'inizio di terapia ormonale per la valutazione del rischio tromboembolico e per l'eventuale attuazione di terapia di profilassi.

DELEZIONE 10p11.23 IN UN CASO DI RITRADO DELLO SVILUPPO PSICOMOTORIO, RITARDO DEL LINGUAGGIO, STRABISMO E DISMORFIE

C. Barone¹, D. Luciano², A. Cataliotti Del Grano³, L. Castiglia², L. Indaco³, L. Grillo², C. Ettore³, C. Barone³, B. Barrano³, M. Fichera⁴, S. Bianca³

¹*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania - Scuola di Specializzazione in Genetica Medica Università degli Studi Messina - Catania*

²*IRCCS Associazione Oasi Maria SS. Troina*

³*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania*

⁴*IRCCS Associazione Oasi Maria SS. Troina- Genetica Medica, Università degli Studi di Catania*

Introduzione:

Circa il 3% dei bambini presenta dismorfie maggiori la cui eziologia rimane in molti casi sconosciuta. Recentemente l'utilizzo di tecniche genome-wide in ampie coorti di pazienti con anomalie congenite ha permesso di identificare aberrazioni genomiche patogenetiche. Attraverso tale approccio è emerso che la rara delezione interstiziale 10p11.23-p12.1 si presenta con una correlazione genotipo-fenotipo caratteristica che permette di definirla come una nuova sindrome.

Caso clinico:

Riportiamo un caso giunto in consulenza all'età di 5 anni per la presenza di ritardo dello sviluppo psicomotorio e ritardo del linguaggio. All'esame obiettivo si evidenziava inoltre la presenza di strabismo e dismorfie localizzate prevalentemente nella regione maxillo-facciale. L'esame del cariotipo non mostrava la presenza di anomalie citogeneticamente evidenziabili. Si decideva quindi di eseguire esame molecolare mediante array-CGH che ha evidenziato una delezione nella regione cromosomica 10p11.23 di circa 576 Kb. Tale delezione risulta de novo ed essere verosimilmente la causa del fenotipo patologico della paziente. La delezione, confermata per MLPA, coinvolge due geni codificanti proteine: WAC e BAMBI.

Conclusioni:

Okamoto et al (2012), riportano due casi di microdelezioni 10p11.23-p12.1, sovrapposte per 957 kb, che includono 4 geni codificanti proteine: ARMC4, MPP7, WAC e BAMBI. In entrambi i casi viene riferito ritardo dello sviluppo psicomotorio e le caratteristiche fenotipiche risultano sovrapponibili in particolare nella regione maxillo-facciale: bozze frontali prominenti, retrusione porzione mediale del volto, orecchie basso impiantate, ponte nasale ampio, bocca grande con angoli rivolti verso il basso. WAC è uno dei geni candidati per il ritardo dello sviluppo psicomotorio, mentre il ruolo degli altri tre geni è ad oggi sconosciuto.

Il nostro caso, con il solo coinvolgimento dei geni WAC e BAMBI e con la presenza di strabismo, non descritto in altri casi clinici con tale delezione, contribuisce quindi ulteriormente alla definizione del quadro clinico nei casi di delezione 10p11-p12 e conferma l'importante ruolo diagnostico dell'array-CGH in pazienti con ritardo mentale e/o anomalie multiple.

CYTOLOGIC, CYTOGENETIC AND GENOMIC STUDY OF TUMOR STEM CELL LINES FROM GLIOBLASTOMA MULTIFORME AND EVALUATION OF ANTINEOPLASTIC DRUGS EFFECTS

V. Butta¹, G. Riva¹, S. Baronchelli³, S. Redaelli¹, L. Paoletta¹, C. Cilibrasi¹, M. Lavitrano¹, L. Dalprà², A. Bentivegna¹

¹*Department of Surgery and Director of Interdisciplinary Medicine, University of Milan-Bicocca, Monza*

²*Medical Genetics Laboratory, S. Gerardo Hospital, Monza*

³*Science and Technology Park, IRCCS MultiMedica, Milano*

Cancer is a disease based on several levels of genomic alterations, such as DNA mutations, chromosomal aberrations, copy number alterations (CNAs) and epigenomic changes. Glioblastoma multiforme (GBM) is a grade IV astrocytoma and the most common malignant brain tumor. GBM heterogeneity is mirrored by the presence of distinct sub-populations of cells showing different tumorigenic capabilities: glioma stem cells (GSCs) are believed to be the real driving force of tumor initiation, progression and relapse.

This study focuses on the genomic analysis of 7 tumor stem-like cell lines isolated from GBM, by means of conventional cytogenetics and array comparative genomic hybridation (aCGH) in order to unravel their complexity and to deeply understand GBM heterogeneity. Moreover, we evaluated cytomorphological parameters (mitotic index, ploidy and polymorphic nuclei) of GSC lines after treatment with valproic acid (a histone deacetylase inhibitor) and Paclitaxel (a microtubule-stabilizing agent).

Several shared cytogenetic and genomic alterations were found among the GSC lines and linked to GBM pathogenesis. Specifically, polysomy of chromosome 7, loss of chromosome 10 and loss of 9p21.3 locus (CDKN2A and CDKN2B) are aberration related to highly relevant pathways of GBM tumorigenesis. In addition, a minimal deleted region at 1p36.31 was common among the seven GSC lines, including CAMTA1 gene, a putative tumor suppressor gene, specific for cancer stem-like cells.

VPA administration showed a decrease of mitotic index (MI) in all the cell lines analyzed both at 24 and 48hs of treatment. PTX treatment showed differences in MI: two cell lines were insensitive also at 48hs of exposure, three lines displayed a time-dependent decrease of MI compared to untreated control cells and in two cell line PTX treatment induces an accumulation of metaphases in chromosome preparations.

Analysis of chromosome segregation errors, spindle polarity and symmetry abnormalities and chromatid segregation errors are in progress; abnormal chromosome segregation at mitosis, in fact, is one way by which neoplastic cells accumulate the many genetic abnormalities required for tumor development.

DELEZIONE 8q21.11 ED IPERMELANOSI DELL'IRIDE

C. Barone¹, L. Indaco², L. Castiglia³, A. Cataliotti Del Grano², O. Galesi³, C. Ettore², O. Correnti⁴, C. Barone², B. Barrano², M. Fichera⁵, S. Bianca²

¹*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania - Scuola di Specializzazione in Genetica Medica Università degli Studi Messina - Catania*

²*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania*

³*IRCCS Associazione Oasi Maria SS. Troina*

⁴*UOC Oculistica, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania*

⁵*IRCCS Associazione Oasi Maria SS. Troina - Genetica Medica, Università degli Studi di Catania*

Introduzione:

La microdelezione 8q21.11 si presenta con un fenotipo clinicamente riconoscibile caratterizzato da faccia tonda, guance piene, fronte alta, ptosi, opacità corneali, ali nasali iposviluppate, filtro breve, labbro superiore ad arco di cupido, angoli della bocca rivolti verso il basso, micrognatia, orecchie grandi e basso impiantate, lievi anomalie delle dita delle mani e dei piedi. Si osservano frequentemente disabilità intellettiva, ipotonia e disturbi del comportamento.

Caso clinico:

Riportiamo il caso di un paziente giunto in consulenza all'età di 9 anni per la presenza di disabilità intellettiva, disturbi del comportamento, DIV ed ipoplasia del corpo calloso. All'esame obiettivo si evidenziavano faccia tonda, fronte ampia, ptosi, ipermelanososi dell'iride sinistra, ipertelorismo, epicanto, ali nasali iposviluppate, filtro breve, angoli della bocca rivolti verso il basso, orecchie grandi e basso impiantate, micropene. Venivano esibiti referti di analisi regione 22q11.2, FGFR3 e riarrangiamenti subtelomerici risultati tutti nella norma. Si decideva di eseguire esame del cariotipo che evidenziava un assetto cromosomico 46,XY,del(8)(q21.11q22.1). L'array-CGH confermava la delezione 8q21.11q22.1 di 17,2 Mb. Tale delezione, de novo, risulta essere causa del fenotipo patologico del paziente.

Conclusioni:

Palomares et al (2011), riportano otto casi di microdelezioni 8q21.11 con fenotipo caratteristico di tale microdelezione, ed una minima regione di overlap di 539.7 Kb. In tale intervallo è presente il gene ZFX4, candidato come causativo della ptosi congenita bilaterale isolata. Due dei pazienti presentavano gravi anomalie dell'occhio: microftalmia, afachia, cataratta, atrofia del nervo ottico, opacità corneale, sclerocornea. Taysi et al (1979) riportano un paziente con delezione interstiziale 8q12-q22 e grave microftalmia bilaterale. La microdelezione 8q21 avrebbe quindi una presentazione fenotipica variabile il cui estremo dello spettro clinico porterebbe a gravi anomalie di sviluppo dell'occhio. Il nostro caso, con la presenza di ipermelanososi monolaterale dell'iride, non descritta in altri casi clinici con tale delezione, contribuisce quindi ulteriormente alla definizione del quadro clinico nei casi di delezione 8q21.11.

GENOME-WIDE PHARMACOGENOMICS ANALYSIS OF EARLY ANTIPSYCHOTIC (RISPERIDONE) RESPONSE IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA

C. Magri¹, A. Minelli², M. Traversa¹, P. Valsecchi³, C. Congiu², E. Sacchetti⁴, M. Gennarelli¹

¹*Sez. Biologia e Genetica, Dip. Scienze Biomediche e Biotecnologie, Univ. degli Studi di Brescia, Brescia*

²*U.O. Genetica, IRCCS San Giovanni di Dio, Fatebenefratelli, Brescia*

³*Dip. di Salute Mentale, A.O. Spedali Civili di Brescia, Brescia*

⁴*Div. di Psichiatria, Dip. Materno Infantile e Tecnologie Biomediche, Univ. degli Studi di Brescia, Brescia.*

Schizophrenia (SZ) patients response to antipsychotic treatments is extremely variable. Therefore, identification of genetic markers helping in predicting the early treatment response is of extremely interest since it might allow reducing ineffective medications, adverse events and health care expenses associated with delays in remission. Drug response is usually evaluated with the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) that considers three main domains: positive, negative and general psychopathology. However, a consistent literature has proposed factor structure of PANSS up to seven domains in order to better characterize clinical profiles and treatment response.

We performed a genome wide association study on 86 SZ patients in monotherapy with risperidone, whose symptoms improvement was measured after two weeks using the five (Marder et al., 1997) and seven (Emsley et al., 2003) factors models.

When the allele frequency was considered, no single nucleotide polymorphisms (SNPs) achieved a genome wide significant association p-value ($p < 5 \times 10^{-8}$) with the PANSS total score, or with the five and seven factors models. However, an association p-value ($p = 6.88 \times 10^{-8}$) very close to the threshold for declaring significance was observed for a SNP inside the metabotropic glutamate receptor 7 (GRM7) gene and the positive factor cluster of the Emsley scale. Seven model showed that risperidone gave a worst amelioration of positive symptoms after two weeks treatment in recessive homozygous subjects (-11.00) compared to others (-26.20) ($p = 1.50 \times 10^{-6}$), the same trend was observed when the Marder positive factor cluster was tested ($p = 3.94 \times 10^{-6}$).

Although this preliminary result should be confirmed in other larger replication samples, is, however, interesting in the light of the fact that glutamatergic system dysfunction is one of the major hypotheses to explain the pathogenesis of schizophrenia. In conclusion, this study suggests that a better characterization of endophenotypes using factor model analysis of PANSS could be useful in pharmacogenomics of antipsychotic drugs response.

FAMIGLIA ITALIANA CON DOPPIA ETEROZIGOSI PER MUTAZIONI NEI GENI BRCA1 E BRCA2

M.T. Vietri¹, M. De Paola¹, G. Caliendo¹, G. Porcaro¹, G. D'Elia¹, A. De Rosa¹, M. Cioffi¹

¹*Patologia clinica e Molecolare Facoltà di Medicina e Chirurgia Seconda Università degli studi di Napoli*

Mutazioni nei geni BRCA1 o BRCA2 predispongono allo sviluppo del carcinoma della mammella e/o dell'ovaio ereditari e di altre neoplasie (colon, prostata, laringe, pancreas, melanoma).

La probabilità di riscontrare in uno stesso paziente mutazioni patologiche in entrambi i geni BRCA è molto bassa. Ad oggi sono stati riportati pochi casi di doppia eterozigosi (DH), soprattutto nella popolazione Ashkenazi.

SCOPO:

In questo studio descriviamo una famiglia italiana con DH nei geni BRCA.

MATERIALI E METODI:

La probanda è una donna di 43 anni con K mammario bilaterale, sottoposta a 32 anni a mastectomia destra, che dopo un mese ha presentato un K mammario sinistro. Nella sua famiglia ricorrono casi di K della mammella, ovaio, laringe, intestino, vescica, prostata e leucemia.

RISULTATI:

L'analisi di sequenza ha mostrato la presenza in BRCA1 della mutazione IVS8+2t>a e in BRCA2 della mutazione K994X. Inoltre in BRCA2 abbiamo identificato una variante intronica, IVS4-57a>g, non descritta precedentemente.

L'analisi genetica è stata proposta ai genitori della paziente per determinare la provenienza delle mutazioni. La madre è risultata negativa, mentre il padre (72 anni) sano è portatore di entrambe le mutazioni e della nuova variante. Il test genetico è stato eseguito su altri membri della famiglia paterna: una cugina (39 anni) con K della mammella è risultata essere positiva per entrambe le mutazioni nei geni BRCA e per la nuova variante, mentre una zia e una sorella sane sono negative. L'analisi in silico mediante NNSPLICE, ha mostrato che la nuova variante intronica non altera il sito di splicing; essendo stata osservata solo nei portatori di DH, suggerirebbe una co-segregazione con la mutazione.

CONCLUSIONI:

In questa famiglia coesistono fenotipi diversi nei portatori di DH: la probanda ha sviluppato un K mammario bilaterale, la cugina un K mammario, mentre il padre è sano.

Pertanto, in accordo con altri studi, sembra non esserci un fenotipo più aggressivo o un'insorgenza precoce di malattia rispetto ai portatori di una singola mutazione in BRCA1 o 2.

Al fine di non sottostimare casi di DH è importante non limitarsi all'identificazione della prima mutazione in uno dei due geni BRCA, ma estendere l'analisi ad entrambi.

GENETIC ANALYSIS OF HYPOPLASTIC LEFT HEART SYNDROME REVEALS MUTATIONS IN TWO GENES RELEVANT FOR ENDOTHELIAL TO MESENCHYMAL TRANSITION

M.E. Sana¹, E. Zeisberg², I. Friehs³, D. Marchetti¹, L. Pezzoli¹, S. Marcora⁴, D. Federici⁴, L. Galletti⁴, P. Ferrazzi⁵, P. Del Nido³, M. Iascone¹

¹*USSD Lab. Genetica Medica, Ospedali Riuniti, Bergamo, Italy*

²*Department of Cardiology and Pneumology, University Medical Center of Goettingen, Georg-August University, Goettingen, Germany*

³*Department of Cardiac Surgery, Children's Hospital Boston, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts*

⁴*USSD Cardiochirurgia Pediatrica, Ospedali Riuniti, Bergamo, Italy*

⁵*Dip. Cardiovascolare, Ospedali Riuniti, Bergamo, Italy*

Hypoplastic left heart syndrome (HLHS) is one of the most common and lethal congenital cardiac anomalies, characterized by hypoplasia of left sided structures of the heart including LV, mitral valve and aorta. There is strong evidence of genetic aetiology in HLHS, although very little is understood about the underlying molecular mechanisms. Using genomics as well clinical studies, our work aims to identify new genes contributing to HLHS pathogenesis and explaining clinical and anatomical variability. We have analyzed by whole-exome sequencing the entire genomic coding regions of 11 unrelated parents-child trios (33 subjects) affected by HLHS, all well phenotypically characterized. We have identified two de novo mutations that respectively impair NOTCH pathway involved in heart valve development and WNT pathway that controls the ventricular chambers formation. We have computed the free energy of unfolding and the difference in stability for the wild-type and mutant architectures. This in silico 3D modelling pointed to the pathogenicity of identified variants.

Our results confirm a fundamental role of NOTCH pathway in HLHS pathogenesis, as previously reported by our group. Moreover, the identification of mutations in WNT pathway shows that at least two different molecular defects interfering with endothelial to mesenchymal transition and development of the AV valves and the ventricular chamber are at basis of HLHS. These findings are complementary to studies in our newly established animal model of endocardial fibroelastosis, which also hint to a role of aberrant endothelial to mesenchymal transition in the development of HLHS. Our study may lead to a more appropriate classification of patients on the basis of molecular defect potentially useful for therapeutic management.

A DE NOVO X;8 TRANSLOCATION IN A PATIENT WITH PSYCHOMOTOR RETARDATION AND CONGENITAL CEREBELLAR HYPOPLASIA CREATES A PTK2-THOC2 FUSION GENE AND KNOCKS DOWN THOC2 EXPRESSION BY TRANSCRIPTIONAL INTERFERENCE

E. Di Gregorio¹⁷, F. Bianchi¹⁸, A. Schiavi⁴, A. Chiotto¹⁸, M. Rolando⁵, L. Verdun⁶, E. Grosso², S. Cavaliere², A. Calcia¹, D. Lacerenza¹, O. Zuffardi¹⁹, S.F. Retta⁹, G. Stevanin²⁰, C. Marelli²⁰, A. Durr²⁰, S. Forlani²⁰, J. Chelly¹², F. Montarolo¹³, F. Tempia¹³, H.E. Beggs¹⁴, L. Haixlin¹⁵, S. Squadrone¹⁶, M.C. Abete¹⁶, N. Migone¹⁷, A. Brussino¹⁷, N. Ventura⁴, F. Di Cunto¹⁸, B. Alfredo¹⁷

¹Department of Genetics, Biology and Biochemistry, University of Torino

²S.C.d.U. Medical Genetics, Città della Salute e della Scienza, Torino, Italy

³Molecular Biotechnology Center, Torino, Italy

⁴Dep. of Experimental Medicine and Biochemical Science, School of Medicine, University of Rome "Tor Vergata", Italy

⁵Servizio di Neuropsichiatria Infantile, ASL TO3, Italy

⁶S.C.d.U. Anatomia Patologica, Città della Salute e della Scienza, Torino, Italy

⁷Genetica Medica, Università di Pavia, Pavia, 27100 PV, Italy

⁸Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico C. Mondino, Pavia, 27100 PV, Italy

⁹Dep. of Clinical and Biological Sciences, University of Turin, Orbassano, Italy

¹⁰INSERM, UMR_S975 (formerly U679), Paris, France

¹¹UPMC Univ Paris 06, UMR_S975, Centre de Recherche Institut du Cerveau et de la Moelle, CNRS 7225, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

¹²Université Paris Descartes, Institut Cochin - Hôpital Cochin, Paris - France

¹³Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi (NICO), University of Turin, Turin, Italy

¹⁴Department of Ophthalmology, University of California San Francisco, San Francisco, CA 94122, USA

¹⁵Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, USA

¹⁶C.Re.A.A., Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Torino

¹⁷Department of Genetics, Biology and Biochemistry, University of Torino, S.C.d.U. Medical Genetics, Città della Salute e della Scienza, Torino, Italy

¹⁸Department of Genetics, Biology and Biochemistry, University of Torino, Molecular Biotechnology Center, Torino, Italy

¹⁹Genetica Medica, Università di Pavia, Pavia, 27100 PV, Italy, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico C. Mondino, Pavia, 27100 PV, Italy

²⁰INSERM, UMR_S975 (formerly U679), Paris, France, UPMC Univ Paris 06, UMR_S975, Centre de Recherche Institut du Cerveau et de la Moelle, CNRS 7225, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

Non-progressive congenital ataxias are rare and heterogeneous neurologic syndromes due to genetic or acquired causes. We identified, with standard karyotype, a balanced de novo translocation involving chromosomes Xq25 and 8q24 in a girl affected by a non progressive form of congenital ataxia with cognitive impairment and cerebellar hypoplasia. Breakpoints definition showed that the Protein Tyrosine Kinase 2 gene (PTK2) is interrupted on chromosome 8 and its promoter is translocated, on chromosome X, 2 kb upstream of the THOC2 gene, which encodes for a component of the evolutionary conserved THO multiprotein complex, involved in nuclear mRNA export.

The translocation generates a fusion transcript lacking the initial ATG of both PTK2 and THOC2 genes and causes their mRNA and protein reduction. We demonstrated, after induction of PTK2 expression in patient's fibroblast, that THOC2 down-regulation was caused by transcriptional interference mechanism.

Taking into account our experimental and literature data, we suggested that PTK2 haploinsufficiency did not cause the patient's phenotype and we decided to better characterize the role of THOC2 in the CNS cells, using different experimental models. The downregulation of the THOC2 orthologue in *C.elegans* produced functional defects in specific sensory neurons. Moreover, THOC2 knockdown in primary rat hippocampal neurons increased neurite extension. Finally, THOC2 knockdown in neuronal stem cells (LC1) increased their in vitro growth rate without modifying apoptosis levels. Altogether, these data indicate that THOC2 can play specific functions in neuronal cells and suggest that THOC2 hypomorphic mutations may affect normal neural network formation, leading to cognitive impairment and cerebellar congenital hypoplasia.

DELEZIONI 22q11.2 (DIGEORGE/VELO-CARDIO-FACCIALE) DI AMPIEZZA ATIPICA: CARATTERISTICHE FENOTIPICHE

M.C. Digilio¹, G. D'Elia¹, F.R. Lepri¹, R. Capolino¹, M.L. Dentici¹, B. Marino², A. Angioni¹, B. Dallapiccola¹

¹*Genetica Medica e Citogenetica, Osp. Pediatrico Bambino Gesù, IRCCS, Roma*

²*Dip. Pediatria, Cardiologia Pediatrica, Univ. Sapienza, Roma*

La sindrome da delezione 22q11.2 (del22) è caratterizzata da cardiopatia congenita, anomalie del palato, difetti immunitari, difficoltà di apprendimento, dismorfie facciali. Si ritiene che la del22 si crei per ricombinazione allelica non-omologa legata alla presenza nella regione cromosomica "critica" di duplicazioni segmentali, denominate A,B,C,D, usate per definire i breakpoints e le delezioni risultanti. La maggior parte dei pazienti con del22 ha una delezione di 3 Mb coinvolgente le regioni A,B,C,D. Dagli anni '90 la diagnosi è effettuata mediante FISH, con sonde commerciali (N25 e TUPLE) che mappano nelle regioni A e B. Con l'introduzione della tecnica MLPA è divenuto possibile definire l'ampiezza della delezione e diagnosticare le delezioni atipiche. Scopo del nostro studio è stata l'analisi delle caratteristiche cliniche dei pazienti con del22 atipiche. Tra gennaio 2010-maggio 2012, 103 pazienti con del22 diagnosticati con FISH sono stati rianalizzati con MLPA, 28 nuovi casi di del22 sono stati diagnosticati con MLPA. Del22 coinvolgente la regione A è stata diagnosticata in 5/131 (3.8%) casi, delezione A+B in 2/131 (1.5%), delezione C in 1/131 (1.5%), caso familiare coinvolgente padre e due figli. Pazienti con delezione A: cardiopatia congenita in 3/5 (interruzione dell'arco aortico in 2, difetto interventricolare sottoartico in 1), insufficienza velo-faringea in 1/5, ritardo mentale in 0/5 (QI medio 91), dismorfie facciali lievi in 4/5. Pazienti con delezione A+B: cardiopatia congenita in 2/2 (tetralogia di Fallot); insufficienza velo-faringea in 1/2, ritardo mentale in 1/2, dismorfie facciali lievi in 1/2. La famiglia con delezione C: cardiopatia congenita in 0/3; insufficienza velo-faringea in 0/3, ritardo mentale in 3/3, dismorfie facciali lievi non tipiche di del22 in 3/3. In conclusione: 1) la delezione A è risultata associarsi ad un fenotipo cardiaco tipico troncoconale, specie interruzione arco aortico (probabilmente legato al coinvolgimento del gene TBX1), quoziente intellettivo normale, dismorfie facciali lievi; 2) la delezione A+B aveva fenotipo del22 classico; 3) la delezione C è risultata caratterizzarsi da difetto cognitivo, fenotipo comportamentale da del22, dismorfie facciali diverse da del22 classica, assenza di cardiopatia.

ANALISI GENETICA IN 672 PAZIENTI ITALIANI AFFETTI DA CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA

S. Bardi¹, F. Girolami¹, C. Romolini¹, I. Olivotto², F. Torricelli¹

¹SOD Diagnostica Genetica AOU Careggi, Firenze

²Centro di Riferimento Regionale per le Cardiomiopatie- AOU Careggi, Firenze

Premessa.

La Cardiomiopatia Ipertrofica (CMI) è una malattia cardiaca con base genetica. La prevalenza è di 1/500 e rappresenta la causa piu' comune di morte improvvisa in età giovanile. Viene trasmessa con modalità autosomica dominante e in circa il 60% dei pazienti è causata da varianti in geni sarcomerici.

Scopo dello Studio.

Nel presente lavoro sono riportati i risultati dello screening molecolare in un'ampia casistica di pazienti con CMI familiare in circa 12 anni di attività.

Materiali e Metodi.

672 pazienti sono stati analizzati mediante sequenziamento Sanger dei geni MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, ACTC1, TPM1, MYL2 e MYL3.

Risultati.

Nel 61% (410/672) dei pazienti è stata identificata una variante causativa della malattia. MYBPC3 è risultato essere il gene prevalente (32%), a seguire MYH7 (18%) e TNNT2 (3%). I geni MYL2, MYL3, ACTC1, TPM1, TNNI3, sono risultati positivi complessivamente nel 3% dei casi. Nel 5% (34/672) dei pazienti è stato identificato un genotipo complesso. L'analisi di MYBPC3 ha permesso l'identificazione di 105 varianti (61 missense, 18 frameshift, 15 splicing e 11 nonsense). Per il 73% (76/105) si tratta di varianti "private". Per la variante c.772 G>A, (p.Glu258Lys), identificata nel 9% dei pazienti, è stato dimostrato un effetto fondatore in Toscana. L'analisi di MYH7 ha permesso l'identificazione di 81 varianti missense di cui 43 nuove. Nel gene TNNT2 sono state individuate 13 varianti (10 missense, una di frameshift, una di splicing e una nonsense) di cui 4 non descritte in letteratura. Inoltre il test genetico è stato esteso ai familiari dei probandi: complessivamente sono stati analizzati 485 soggetti e in 283 è stata riscontrata la variante familiare di cui 137/283 (48%) sono risultati affetti da CMI.

Conclusioni.

In conclusione l'analisi genetica dei principali geni sarcomerici risulta idonea a caratterizzare la maggior parte delle CMI familiari. Il gene prevalente è MYBPC3 dove le varianti "private" sono molto frequenti. Risulta importante estendere il test genetico ai familiari. Studi di sequenziamento massivo mediante NGS potrebbero risultare utili per spiegare l'eziologia dei pazienti risultati negativi all'analisi genetica standard.

How genetic can guide diagnostic criteria: the case of Brugada syndrome

M. Torchio², S. Savastano³, A. Vicentini³, R. Rordorf³, B. Petracci³, S. Castelletti¹, F. Dagradi¹, A. D'Errico², E. Mastantuono², C. Dossena¹, P. Schwartz¹, L. Crotti¹

¹*Dep. of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy*

²*Molecular Cardiology Lab., Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia, Italy*

³*Cardiology, Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia, Italy*

Background: Brugada syndrome (BrS) is traditionally diagnosed considering a specific ECG pattern, i.e. coved-type ST segment elevation ≥ 2 mm in at least two of the right precordial leads (V1-V3). However, these diagnostic criteria remain controversial, especially for the weight to give to the appearance of the classic ECG pattern in higher intercostal spaces or in one vs two precordial leads. Accordingly, our goal was to test whether the likelihood of identifying a disease-causing mutation may differ according to the diagnostic criteria used.

Methods: Comprehensive open reading frame and splice site mutational analysis of SCN5A was performed, through DH-PLC and sequencing, in 89 unrelated BrS patients. The appearance of a coved type ST elevation with a J point ≥ 2 mm in at least one precordial lead (V1-V2) in either 4th, 3rd or 2nd intercostal space (ICS) was considered diagnostic. Each mutation was verified in a panel of internal controls and in three publicly available exome databases (1,000 Genome Project, NHLBI GO Exome Sequencing Project, Exome Chip Design)

Results: A disease-causing mutation was identified in 18/89 (20%) patients. Among the patients with a diagnostic pattern ECG, a SCN5A mutation was identified in 12/55 (22%) of those with a diagnostic pattern in the 4th ICS and in 6/34 (18%) of those with a diagnostic pattern only in the 3rd or 2nd ICS (but not in the 4th ICS) ($p=NS$). Additionally, no differences between one vs two diagnostic leads were observed: 8/37 (22%) vs 10/52 (19%) ($p=NS$).

Conclusions: The percentage of BrS patients with SCN5A mutations is not different according to the diagnostic criteria used. Thus, we suggest that the appearance of a BrS pattern in the higher intercostals spaces or in only one precordial lead should be considered diagnostic in order to increase sensitivity without losing specificity. The one presented is a good example of how genetic can guide clinical diagnostic criteria.

Germline mosaicism for a splicing mutation in Neurofibromatosis type 1

E. Trevisson¹, M. Forzan¹, A. Bruson¹, C. Rigon¹, M. Clementi¹

¹*Genetica Clinica, Dipartimento Salute della Donna e del Bambino, Unievrstà di Padova*

We describe the molecular analysis of a family in which Neurofibromatosis 1 (NF1) occurred in two of four siblings born to unaffected parents.

The family presented with two sisters fulfilling the diagnostic criteria for NF1 (Consensus development Conference of neurofibromatosis Arch Neurol 1988;45:575-578): the first patient displayed multiple café-au-lait spots and died at age 9 for a malignant peripheral nerve sheath tumor originated from a plexiform neurofibroma of the right lower limb. The younger sister was also diagnosed with Neurofibromatosis 1 for the presence of multiple café-au-lait spots, axillary and inguinal freckling and optic nerve glioma.

FISH analysis for the NF1 region on 17q11.2 excluded the presence of a whole gene deletion. Molecular analysis of the NF1 gene from DNA leukocytes of the younger patient showed the heterozygous mutation c.IVS10a+1G>A, that was previously reported to affect the correct splicing of the gene (De Luca et al. 2004 Hum Mutat;23:629).

We then analyzed the DNA extracted from tumor paraffin tissue of the older sister and found the same NF1 splicing mutation; microsatellite analysis showed the loss of heterozygosity of the other allele.

Linkage analysis revealed that the two affected siblings shared the same maternal allele, arguing for a germline mosaicism in the probands' mother. The NF1 mutation identified in the two siblings was absent in multiple maternal tissues as shown by a PCR-RFLP assay.

Our results are consistent with a germline mosaicism with the NF1 splicing mutation occurring solely in the germline of the mother. The clinical data also corroborate this finding since exhaustive physical examination of the mother and slit-lamp analysis of her eyes failed to detect any sign of segmentary NF1.

This is the third report of a germline mosaicism characterized so far at the molecular level. Germline mosaicism is very rare in NF1 but has important implications in genetic counselling since it can explain the recurrence of NF1 in offspring of unaffected parents.

EFFETTI SUL FENOTIPO DELLA SOSTITUZIONE GLY530SER NEL GENE COL5A1: PROPOSTA DI UNO STUDIO MULTICENTRICO

F. Ponti¹, E. Pedrini¹, M. Maioli¹, E. Abelli¹, M. Gnoli¹, M. Tremosini¹, L. Sangiorgi¹

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

La Sindrome di Ehlers Danlos (EDS) è una malattia autosomica dominante del tessuto connettivo contraddistinta da iperelasticità della pelle, cicatrizzazione atrofica e ipermobilità articolare.

Mutazioni a carico dei geni Col5A1/COL5A2 codificanti rispettivamente le catene $\alpha 1/\alpha 2$ del collagene V, sono responsabili della patologia.

L'analisi molecolare tramite sequenziamento diretto del gene COL5A1 in 130 pazienti con sospetta EDS o alcuni segni compatibili ha permesso di individuare la presenza di una mutazione germinale missenso in eterozigosi dell'esone 13 (c.1588G>A, p.Gly530Ser), già descritta; tale variante genera una sostituzione aminoacidica nella regione N-terminale del collagene $\alpha 1(V)$, importante per la regolazione della formazione delle fibrille collagene. Nonostante l'evidenza biochimica di una leggera alterazione strutturale a carico del collagene V (Giunta et al, 2002), la sostituzione G530S è tuttora considerata una variante di significato non chiaro (Symoens, 2012: Hum Mut). Nella famiglia descritta da Giunta et al. la sua presenza in eterozigosi è correlata con manifestazioni cliniche lievi come cute lassa, sottile e ritardata cicatrizzazione; in letteratura viene riportato un solo caso della mutazione in omozigosi in una forma lieve di EDS.

La frequenza di tale variante nella popolazione generale valutata in alcuni lavori è stimata tra il 2% e l'8%. (Malfait et al. 2005; Mitchell et al. 2009)

Per stimare l'incidenza ed un possibile effetto di tale alterazione, la sua presenza è stata ricercata su 130 pazienti con sospetto diagnostico di diverse forme di Ehlers Danlos e 123 controlli sani; i risultati ottenuti hanno evidenziato frequenze del 15% e del 5.6% rispettivamente.

Percentuali significative sono state riscontrate associando la presenza dell'alterazione con alcuni segni clinici distintivi quali cute lassa (13.6%), fragilità tissutale (12.8%) e ritardata cicatrizzazione (16%).

Visti i risultati ottenuti, proponiamo la realizzazione di uno studio multicentrico a livello italiano al fine di validare il dato su una popolazione statisticamente significativa e chiarire così il ruolo effettivo e l'eventuale importanza che tale mutazione potrebbe avere a fini diagnostici.

Inv dup del(8p):descrizione di un nuovo caso

M.R. Sansò¹, F. Di Nuovo¹, M.G. Grimoldi², L. Montaldi³, F. Raviglione³, M. Micanti⁴, G. Trifirò⁴, A. Fratoni⁴

¹*Dip.dei Servizi Diagnostici e Terapeutici, U.O. di Anatomia Patologica e Citogenetica, P.O. di Garbagnate Milanese, A.O.G.Salvini*

²*Lab.di Citogenetica, Dipartimento Di Medicina Chirurgia ed Odontoiatria, A.O.San Paolo, Università degli Studi di Milano.*

³*U.O.di Neuropsichiatria Infantile, P.O.di Rho,A.O.G.Salvini*

⁴*Dip.Materno Infantile,U.O. di Pediatria,P.O. di Rho, A.O.G.Salvini*

L'inv dup del(8p) è un riarrangiamento cromosomico complesso ed ha una frequenza di 1/10.000-30.000 nati.

La sua genesi sembra essere dovuta alla ricombinazione omologa non allelica (NAHR) fra i cluster dei geni recettori dell'olfatto(OR) localizzati in 8p23.

L'inv dup del(8p) si forma in seguito alla rottura asimmetrica di un cromosoma 8 dicentrico 8qter-cen-8p::8p-cen-8qter derivato da una anomala ricombinazione meiotica. Fattore predisponente potrebbe essere la presenza in uno dei genitori dell' inversione criptica paracentrica del braccio corto di un cromosoma 8 in corrispondenza della regione p23, polimorfismo genomico con una frequenza del 26% nella popolazione europea.

L'inv dup del(8p) è associata all' agenesia del corpo calloso, ai dismorfismi facciali, all'ipotonia e al severo ritardo mentale. Riportiamo il caso di un bambino di 3 mesi nato con parto cesareo da genitori non consanguinei.

Il cariotipo da sangue periferico del bambino ha evidenziato la duplicazione invertita del braccio corto di un cromosoma 8 in corrispondenza della regione p23.1-p11.2 confermata per mezzo di FISH whole chromosome painting per il medesimo cromosoma e la delezione del braccio corto del cromosoma 8 in corrispondenza della regione p23.1-pter confermata per mezzo di FISH con sonda subtelomerica specifica:

46,XY,inv dup del(8)(qter->p23.1::p23.1->p11.2:).ish inv dup del(8)(wcp8+,489D14+,dJ580L5-)

Il cariotipo standard da sangue periferico dei genitori è risultato normale.

Il bambino presenta agenesia del corpo calloso, tratti dismorfici a carico del volto (attaccatura anteriore dei capelli bassa, ipertelorismo, radice nasale ampia, padiglioni auricolari a basso impianto, micrognazia), ipotono assiale e plagiocefalia.

Lo spettro fenotipico del probando potrebbe essere ulteriormente complicato da severo ritardo mentale, autismo o epilessia a causa della disregolazione e/o aploinsufficienza dei geni MCPH1(8p23.1),CSMD1(8p23.2) e DLGAP2(8p23.3), localizzati nella regione duplicata e deleta del braccio corto del cromosoma 8.

Ci proponiamo di verificare se uno dei genitori sia portatore eterozigote dell'inversione criptica paracentrica del braccio corto del cromosoma 8 alla regione p23 per poter fornire una consulenza genetica più completa.

L'EXOME SEQUENCING IDENTIFICA UNA NUOVA MUTAZIONE NEL GENE DYNC2H1 IN DUE GEMELLI AFFETTI DA SINDROME DI JEUNE

C. Cossu¹, F. Incani², V. Fàa³, A. Coiana¹, L. Saba², M. Masala¹, A. Picciau¹, M.L. Serra¹, M.C. Rosatelli¹

¹*Dip. di Sanità Pubblica, Medicina Clinica e Molecolare, Università degli Studi di Cagliari*

²*Lab. di Genetica Molecolare, Osp. Regionale per le Microcitemie, ASL 8 Cagliari*

³*Ist. di Ricerca Genetica e Biomedica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Cagliari*

La Sindrome di Jeune (ATD) è una rara condrodisplasia ad ereditarietà autosomica recessiva. Il fenotipo è caratterizzato da malformazioni scheletriche con polidattilia, riduzione delle costole e della gabbia toracica che causano insufficienza respiratoria spesso letale nel primo anno di vita, a cui si possono associare degenerazione retinica, anomalie epatiche e renali e ritardo mentale. L'identificazione di mutazioni nei geni IFT80, DYNC2H1, TTC21B e WDR19 ha determinato l'inserimento dell'ATD nel gruppo delle "ciliopatie", patologie causate da mutazioni a carico di geni essenziali per la sintesi e la funzionalità delle ciglia. L'ATD è una patologia geneticamente eterogenea per la quale molti casi non sono stati definiti. Nel nostro centro sono stati diagnosticati due gemelli dizigoti, di origine sarda, affetti da una forma grave di ATD che ha portato alla morte di uno dei due dopo circa sei mesi di vita. Al fine di chiarire la patogenesi molecolare della malattia la famiglia è stata inclusa in un progetto di exome sequencing.

Il sequenziamento è stato effettuato con l'Exome Capture kit Agilent e l'HiSeq2000. I dati grezzi sono stati mappati con il software BWA sulla versione hg19 del genoma umano. SNPs e In/Dels sono stati annotati con ANNOVAR. Le varianti sono state analizzate filtrando quelle non presenti nei database di SNPs e quelle potenzialmente patologiche. La patogenicità è stata predetta con il software PolyPhen-2.

L'analisi dell'esoma ha evidenziato la presenza di una variante (c.G3694A) non descritta nel gene DYNC2H1 (MIM603297). La variante, rilevata in omozigosi nei gemelli affetti e assente nei fratelli sani, è una mutazione missenso che causa la sostituzione di un residuo di acido aspartico con un residuo di asparagina (p.D1232N) in corrispondenza di un dominio ad α elica nella regione N-terminale 2. Studi effettuati sul Dictyostelium indicano che il dominio è responsabile del processo di omodimerizzazione delle catene pesanti. L'identificazione di una nuova mutazione nel gene DYNC2H1 conferma il ruolo delle dineine nell'eziopatogenesi dell'ATD. Studi funzionali sono in corso al fine di chiarire in che modo la mutazione determini un'alterazione nella funzionalità o nella stabilità della proteina nell'uomo.

DYSREGULATION OF FAS AND FASL IN CHORDOMA: STUDY IN ZEBRAFISH ANIMAL MODEL

L. Ferrari¹, A. Pistocchi², L. Libera¹, S. Milanesi¹, N. Boari³, P. Mortini³, F. Cotelli², P. Riva¹

¹*Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano. Milano*

²*Dipartimento di Bioscienze Sezione di Citologia e Zoologia, Università degli Studi di Milano. Milano*

³*Dipartimento di Neurochirurgia, San Raffaele Scientific Institute, Università Vita-Salute San Raffaele, Milano*

Chordoma is a rare malignant bone tumor arising from notochord remnants, characterized by local invasiveness and variable tendency for recurrence. As the apoptotic pathway mediated by FAS-FASL was found to be involved in notochordal cells regression, we studied their expression in 34 chordomas and observed that most of them express FAS, but not FASL. To investigate the role of FAS/FASL pathway during notochord development and possible implications in tumorigenesis when this pathway is affected, we performed in vivo studies on zebrafish model. After the analysis of fas-fasl homologue genes expression by RT-PCR in whole embryos and larvae, we found that while fas was maternally and zygotically expressed, fasl showed a stage-specific expression. We observed the expression of fasl mRNA and protein in the notochord at different developmental stages by means of in situ hybridization and immunohistochemistry. We then performed functional studies on both wild type and ET30 zebrafish lines through the silencing of fas and fasl genes by Morpholino oligos injections, to investigate their role in notochord differentiation and regression. ET30, a transgenic line displaying a fluorescent notochord, allowed us to observe notochord anomalies such as packed notochordal cells, curved bodies and bent tail in the injected embryos and larvae from 48 hpf. We also observed morphological alterations in morphants notochord structure at perinotochordal sheath level, showing an anomalous wavy strand. Moreover, the notochord morphology in fas/fasl morpholinos injected embryos is characterized by bigger notochordal cells compared to standard control injected larvae. The analysis of the vertebrae mineralization showed vertebral fusions in the morphants. This evidence is suggestive of a notochordal tissue disorganization that might represent one of the first steps of anomalous cellular masses formation. We are going to analyze the expression of matrix molecules to evaluate the effect of fas/fasl silencing on this structure, during notochord differentiation. This study, providing new insights on notochord development, will elucidate molecular mechanisms of chordoma tumorigenesis, furthermore it will address both the identification of prognostic markers and pharmacological targets.

THE KCNQ1 rs2074238 POLYMORPHISM IS A MODIFIER OF CARDIAC RISK IN LONG QT SYNDROME

M. Pedrazzini¹, L. Crotti², S. Duchatelet⁴, F. Dagradi³, A. Vicentini³, R.A. Peat⁴, I. Denjoy⁴, H. Itoh⁶, M. Berthet⁴, S. Ohno⁷, C. Monti⁵, E. Mastrantuono³, P. Brink⁹, A. Goosen⁹, H. Swan¹⁰, L. Toivonen¹⁰, A. Lahtinen⁸, K. Kontula⁸, W. Shimizu¹¹, M. Horie⁶, A.L.J. George¹², P. Guicheney⁴, P.J. Schwartz³

¹Molecular Cardiology Lab, Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia Italy

²Dep. of Molecular Medicine, University of Pavia, Italy

³Dep. of Cardiology, Fondazione IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia Italy

⁴INSERM, UMR S956, Paris, France

⁵Dep. of Public Health, Neurological Sciences, Experimental and Forensic Medicine, Division of Biostatistics and Clinical Epidemiology, University of Pavia, Italy

⁶Dep. of Cardiovascular and Respiratory Medicine, Shiga University of Medical Science, Shiga, Japan

⁷Dep. of Cardiovascular Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

⁸Research Program in Molecular Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland

⁹Dep. of Medicine, University of Stellenbosch, South Africa

¹⁰Dep. of Cardiology, University of Helsinki, Helsinki, Finland

¹¹Dep. of Cardiovascular Medicine, National Cerebral and Cardiovascular Center, Osaka, Japan

¹²Dep. of Pharmacology and Medicine, Vanderbilt University, Nashville Tennessee, USA

Background

The congenital Long QT syndrome (LQTS) is an inherited disorder, usually regarded as rare, with clinical variability characterized by prolongation of the QT interval on electrocardiogram and increased risk for life-threatening arrhythmias. The most frequent forms are autosomal dominant and the majority of patients are carriers of private heterozygous mutations in the genes KCNQ1 (LQT1, 40-50%) and KCNH2 (LQT2, 35-45%) encoding the α subunits of ionic channels underlying the major potassium currents responsible for repolarization of cardiac myocytes. Stratifying the risk of cardiac events is important for the clinical management of the LQTS patients. Recent genome wide association studies (GWAS) have shown that common or rare genetic variants in different genes can modulate QTc (QT corrected for heart rate) in healthy populations

Methods

We selected and genotyped, through TaqMan assay, 25 polymorphisms described as influencing either QTc in healthy populations (21 SNPs) or adrenergic responses (2 SNPs and 2 deletions) in a matched case-control study including 112 LQTS patient duos from France, Italy and Japan centers. Duos were composed of two relatives harboring the same LQT1 or LQT2 heterozygous mutation; one of whom experienced cardiac events whereas the other was asymptomatic and untreated.

Results

Carriers of the KCNQ1 rs2074238 T-allele tended to have shorter QTc ($p=3.43 \cdot 10^{-5}$). This effect was restricted to the Caucasian population because the SNP was not polymorphic in our Japanese cohort. Interestingly, the rs2074238 T-allele was in addition significantly associated with a decreased risk of cardiac events (OR=0.34 [0.19-0.61], $p=1.42 \cdot 10^{-4}$).

The findings were then validated in two independent founder populations one from South Africa and the other from Finland totaling 174 symptomatic and 162 asymptomatic LQTS patients.

Conclusion

Our results provide the evidence that KCNQ1 rs2074238 polymorphism could be the first independent risk modifier conferring protection against cardiac events in LQTS patients. This finding may be clinically useful towards a novel approach for risk stratification in LQTS patients.

HEPARAN SULFATES IN HUMAN CARTILAGE: FIRST STRUCTURAL DESCRIPTION THROUGH A BIOCHEMICAL APPROACH, A ROADMAP TO MULTIPLE OSTEOCHONDROMA PATHOGENESIS

A. Parra¹, N. Veraldi², I. Giorgi¹, A. Bisio², L. Sangiorgi¹

¹*S.S.D. Genetica Medica e Malattie Rare Ortopediche, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna*

²*Istituto di Ricerche Chimiche e Biochimiche "G. Ronzoni", Milano*

Autosomal dominant Multiple Osteochondromas (MO) is one of the most common skeletal disorders involving the meta-epiphyseal areas of the endochondral ossifying bones. The great variability in size and number of cartilage capped lesions reflects the clinical heterogeneity and variable severity of MO. Malignant transformation in peripheral chondrosarcoma is estimated to occur in 1-5% of patients. Although the mechanism at the basis of OC's development is not yet completely understood, MO is caused by mutations in EXT1 and EXT2 genes, encoding glycosyltransferases that catalyze polymerization of heparan sulfate (HS) chains of proteoglycans.

Before the analysis of the pathological samples a description of the healthy structure of human HSs has to be performed. Recently, in a collaborative study between Istituto G.Ronzoni and Istituto Ortopedico Rizzoli, a flexible and effective method for HS isolation has been set up starting from rabbit cartilaginous tissues and now can be extended to human cartilaginous tissues [Parra A. et al. 2012 Glycobiology].

Human cartilage pure HS fractions were fully characterised for their mono and disaccharide composition by mono and bidimensional NMR spectroscopy and by HPLC-mass spectrometry following their complete enzymatic depolymerization with specific lyases.

As seen in rabbit cartilage also human cartilage has some special features, in particular the most important finding is that both in articular, but principally in growth plate cartilage the HS extracted has a structure different from usual HSs, with a particularly higher degree of sulfation and therefore more similar to usually described "heparin".

The sulfation degree is lower than rabbit cartilage, but sufficient to inhibit complete depolymerisation by lyases.

With these preliminary data and subsequently with a more complete analysis, including fetal growth plate cartilage, we will try to give a complete portrait of HSs in human cartilage by mean of NMR quali/quantitative structural characterization and HPLC/mass spectrometry of the relative content of different di-oligosaccharidic constituents of healthy HSs.

This is the first report of the molecular structure of HSs in human cartilage where they play, fundamental roles in many developmental processes.

ACETILAZIONE E DEACETILAZIONE DELLA PROTEINA AIRE E IMPLICAZIONI FUNZIONALI

M.L. Serra¹, F. Incani², A. Meloni³, D. Corda², C. Cossu¹, T. Cabras⁴, I. Messana⁴, M.C. Rosatelli¹

¹*Dip. di Sanità Pubblica, Medicina Clinica e Molecolare, Università degli Studi di Cagliari*

²*Lab. di Genetica Molecolare, Osp. Regionale per le Microcitemie, ASL 8 Cagliari*

³*Ist. di Ricerca Genetica e Biomedica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Cagliari*

⁴*Dip. di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Sez. di Biochimica, Università degli Studi di Cagliari*

Il gene AIRE "Autoimmune Regulator", è un fattore di trascrizione espresso nelle cellule medullari timiche (MEC) dove controlla l'espressione di numerosi antigeni caratteristici degli organi periferici. Mutazioni del gene AIRE sono responsabili della Sindrome Poliendocrina Autoimmune di Tipo I (APECED o APS-1), una rara patologia particolarmente frequente in alcune popolazioni geneticamente isolate come i Finlandesi, gli Ebrei Askenazi e i Sardi. I pazienti affetti da questa sindrome soffrono di diverse manifestazioni autoimmuni organo-specifiche che colpiscono in genere gli organi endocrini. La funzione della proteina AIRE nella genesi di questi fenomeni autoimmuni è ad oggi poco conosciuta.

Numerosi studi hanno dimostrato che AIRE è in grado di interagire con vari coattivatori trascrizionali e fattori acetiltransferasici (CBP) per regolare l'espressione ectopica di antigeni self nel timo.

In precedenti studi abbiamo dimostrato che AIRE interagisce con altre proteine del complesso acetilasico (p300 e pCAF) che ne aumentano la sua capacità transattivante e con il complesso deacetilasico (HDAC1, HDAC2, SIN3A) ed è essa stessa acetilata.

Per poter valutare il significato di questa modificazione sulla funzione della proteina AIRE abbiamo eseguito esperimenti di spettrometria di massa (MS/MS) che hanno permesso di identificare i siti di acetilazione. Dall'analisi risulta che 11 delle 24 lisine della proteina presentano un aumento della massa di 42kda compatibile con l'acetilazione.

Attualmente stiamo valutando il ruolo di questa modificazione mutando alcune di queste lisine in particolari domini, con aminoacidi che mimano sia lo stato non-acetilato (R) sia lo stato iperacetilato (Q).

Abbiamo inoltre eseguito esperimenti di trasfezione in cellule Cos-1, co-trasfettando la proteina AIRE con le proteine HDAC1 e HDAC2, e il livello di acetilazione della proteina AIRE risulta notevolmente diminuito. Questo dato dimostra che gli HDACs sono responsabili della deacetilazione di AIRE, stato compatibile con un'inibizione della sua capacità transattivante.

Gli studi sull'acetilazione di AIRE e il suo coinvolgimento nel complesso co-repressorio con attività deacetilasica permetteranno di delineare meglio il suo ruolo nella genesi dei fenomeni autoimmuni.

A NOVEL MUTATION OF THE GLOMULIN GENE IN AN ITALIAN FAMILY WITH AUTOSOMAL DOMINANT CUTANEOUS GLOMUVENOUS MALFORMATIONS

E. Disabella¹, M. Diegoli², R. Borroni¹, M. Grasso¹, C. Giorgianni¹, M. Tagliani¹, A. Pilotto¹, M. Concardi¹, I. Puccio¹, A. Cerica³, V. Brazzelli³, E. Arbustini¹

¹*Centro Malattie Genetiche Cardiovascolari, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia*

²*Dip. Medicina Molecolare – Università di Pavia, Pavia*

³*Dermatologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia*

Glomuvenous malformations (GVM) are hamartomas characterized histologically by glomus cells, which should be distinguished from glomus tumors. Familial GVM are rare, often present as multiple lesions, and exhibit familial aggregation, with autosomal dominant transmission. GVM are caused by mutations of the glomulin (GLMN) gene on chromosome 1p21-p22. Their development is thought to follow the 'two-hit' hypothesis, with a somatic mutation required in addition to the inherited germline mutation.

We describe a novel GLMN mutation in an Italian family with GVM in which some members present with the less commonly observed phenotype of solitary lesions. A second somatic 'hit' mutation in GLMN was not discovered in our family.

We further provide histological, immunohistochemical and electron microscopic data exhibiting the classic features of GVM. The diagnosis of GVM is critical because of distinction from venous malformations and blue rubber bleb nevus syndrome, which may demonstrate clinical similarities but require different treatment.

Coinvolgimento mitocondriale in soggetti con disturbi dello spettro autistico.

C. Scuderi¹, F. Castello¹, M. Lo Giudice¹, E. Borgione¹, S. Giusto², M. Zingale³, G. Barbarino¹, R. Pettinato⁴, G.A. Vitello², F. Di Blasi³, M. Savio³, S.A. Musumeci²

¹*U.O. Malattie Neuromuscolari, Dip. per il Ritardo Mentale, IRCCS Oasi Maria SS, Troina*

²*U.O. Neurologia, Dip. per il Ritardo Mentale, IRCCS Oasi Maria SS, Troina*

³*U.O. Psicologia, Dip. per il Ritardo Mentale, IRCCS Oasi Maria SS, Troina*

⁴*U.O. Pediatria e Genetica Medica, Dip. per il Ritardo Mentale, IRCCS Oasi Maria SS, Troina*

Le encefalomiopatie mitocondriali sono disordini del metabolismo ossidativo, spesso con coinvolgimento multisistemico. Le forme infantili si presentano con difetti di sviluppo, ritardo mentale e dismorfismi. I disturbi dello spettro autistico (ASD) sono disordini del neurosviluppo, ad eziologia eterogenea, caratterizzati da deficit nell'interazione sociale e nella comunicazione e da comportamenti ripetitivi e stereotipati.

ASD sono stati associati a disfunzioni mitocondriali, tuttavia i dati della letteratura sono basati su singoli case report o limitati a piccoli campioni o ad aspetti specifici.

Nel presente studio abbiamo sottoposto a biopsia muscolare 12 pazienti (2 con disturbo autistico e 10 con ASD) con segni clinici di malattia neuromuscolare. Tutti presentavano RM ed ipotonia muscolare, 5 aumento dell'acido lattico e 2 delle CPK, 9 anomalie di tipo miogeno o neurogeno all'EMG, 7 anomalie EEGrafiche e 9 atrofia cerebrale ed alterazioni della sostanza bianca alla RMN encefalo.

L'esame istologico del muscolo ha mostrato alterazioni di tipo miogeno o neurogeno in 11 pazienti ed anomalie mitocondriali variamente associate, quali accumulo di lipidi, proliferazione mitocondriale e fibre deplete alla COX, in 6. All'indagine biochimica 3 pazienti presentavano riduzione di uno o più complessi della catena respiratoria. Infine, studi genetici hanno rivelato delezioni multiple del mtDNA in 1 paziente, un nuovo cambiamento nucleotidico 9234A>G nel gene COX 3 in un secondo e la mutazione nota 4320C>T nel tRNA Isoleucine in un terzo.

Nel presente lavoro abbiamo identificato anomalie mitocondriali nel 58% (7/12) del campione esaminato. Sono necessari ulteriori studi in un gruppo più ampio di soggetti, per confermare l'ipotesi di un nesso eziologico tra ASD e disfunzioni mitocondriali.

Genetic analysis of Dishevelled 2 and Dishevelled 3 in human Neural Tube Defects

V. Capra¹, P. De Marco¹, E. Merello¹, A. Consales¹, G. Piatelli¹, A. Cama¹, Z. Kibar²

¹*U.O. Neurochirurgia, Istituto G. Gaslini, Genova*

²*Department of Obstetrics and Gynecology, CHU Sainte Justine Research Center and University of Montreal, Montreal, Canada*

Neural Tube Defects (NTDs) are severe malformations affecting 1/1000 live births. The planar cell polarity (PCP) pathway controls the neural tube closure and has been implicated in the pathogenesis of NTDs both in animal models and human cohorts. Recently, our research group has demonstrated the link between some of the PCP genes, such as VANGL1/2, PRICKLE1, CELSR1, and FZD6, and human NTDs. The PCP pathway, a highly conserved, non-canonical Wnt-frizzled-dishevelled signaling cascade, plays a key role in establishing and maintaining polarity in epithelial and non-epithelial tissues in vertebrates. The multifunctional protein Dishevelled (Dsh in fly, XDsh in *Xenopus*, and Dvl1, Dvl2 and Dvl3 in mammals) is involved in both the canonical Wnt signaling pathway as well as the PCP pathway. In mouse disruption of Dvl2 alone (Dvl2^{-/-}) or Dvl2 and Dvl3 (Dvl2^{-/-};Dvl3^{+/-}, Dvl2^{+/-};Dvl3^{-/-}) results in incomplete neurulation, suggesting a role for Dishevelled in neural tube closure. In view of these data, we investigated if the human orthologs genes, DVL2 and DVL3, could play a role in NTDs pathogenesis by re-sequencing a large cohort of 473 NTDs patients. Rare variants were genotyped in 639 ethnically-matched controls. Prediction and understanding of the downstream effects of the non-synonymous variants was done using computational methods. We identified seven rare missense mutations that were absent in all controls analyzed. Two of these mutations, p.Tyr667Cys and p.Ala53Val, identified in DVL2 were predicted to be detrimental in silico. Significantly, a one bp insertion (c.1801_1802insG) in exon 15 of DVL2 predicted to lead to the truncation of the protein was identified in a patient with a complex form of caudal agenesis. All the pathogenic DVL2 mutations were identified in sporadic cases without reported family history and were private. When the parents were available, the mutation was inherited from an unaffected parent, demonstrating incomplete penetrance of the mutations. The identification of rare functional variants in DVL2 suggests an independent role of this gene in the pathogenesis of a minority of NTDs patients and underscore the value of candidate gene re-sequencing to understand the genetic contribution in these birth defects.

ELEVATI LIVELLI DI MIR-145 CORRELANO CON UNA DIMINUITA ESPRESSIONE DI SMAD3 IN PAZIENTI CON FIBROSI CISTICA

F. Megiorni¹, S. Cialfi², G. Cimino², R. De Biase², C. Dominici², S. Quattrucci², A. Pizzuti¹

¹*Dipartimento di Medicina Sperimentale, SAPIENZA Università, Roma*

²*Dipartimento di Pediatria e Neuropsichiatria Infantile, SAPIENZA Università, Roma*

I microRNA (miRNA) sono recentemente emersi come importanti molecole regolatorie nella Fibrosi Cistica (FC), una delle malattie genetiche più comuni nella popolazione caucasica, in cui i tessuti/organi respiratori sono spesso soggetti a gravi infezioni ed infiammazioni. Al fine di determinare il ruolo dei miRNA nella patogenesi della malattia, abbiamo analizzato il profilo di espressione di alcuni specifici miRNA nell'epitelio nasale di pazienti FC e controlli sani. L'analisi di Real Time PCR quantitativa (Q-PCR) ha dimostrato che l'espressione di miR-145 e miR-494 era significativamente up-regolata nei soggetti FC rispetto a quelli non-FC ($p=0.001$). Solo i livelli aumentati di miR-494 correlavano con la diminuzione del trascritto CFTR ($r=-0.536$, $p=0.00179$, correlazione di Pearson), sostenendo il ruolo di regolatore negativo di questo microRNA sulla sintesi di CFTR. Utilizzando un approccio computazionale, abbiamo identificato SMAD3, un elemento chiave del processo infiammatorio mediato da TGF-beta1, come possibile target di miR-145. Saggi di luciferasi in vitro hanno confermato che l'espressione del gene reporter di un costrutto contenente il 3'-UTR di SMAD3 era inibita da miR-145 di circa il 60% ($p<0.001$). Inoltre, i livelli di miR-145 erano inversamente correlati con l'espressione del trascritto SMAD3 nel tessuto nasale dei pazienti FC ($r=-0.559$, $p=0.00196$, correlazione di Pearson). I nostri dati confermano l'importanza dei miRNA nella patogenesi della Fibrosi Cistica e suggeriscono che la deregolazione dei miRNA possa giocare un ruolo nella gravità della malattia delle vie aeree modulando da una parte i livelli di CFTR stesso e dall'altra importanti molecole coinvolte nella risposta infiammatoria. miR-494 e miR-145 potrebbero, quindi, essere potenziali biomarcatori e target terapeutici nell'ambito della FC.

ADENOMA EPATICO E SINDROME DI WOLF-HIRSCHHORN: DESCRIZIONE DI 2 CASI

S.B. Maitz¹, G. Prunotto¹, P. Cianci¹, A. Cereda¹, A. Selicorni¹

¹*UOS Genetica Pediatrica, Fondazione MBBM, S. Gerardo, Monza*

Riportiamo due casi di pazienti affetti da S. di Wolf-Hirschhorn (WHS), nei quali è stato riscontrata la presenza di adenoma epatico nel corso del follow-up.

MS: maschio, 21 anni. Diagnosi di WHS nei primi anni di vita: delezione terminale 4p16.3, di circa 8 Mb, "de novo". Tratti craniofacciali tipici, ritardo di crescita staturponderale, ritardo neuromotorio e del linguaggio ed epilessia. Unica malformazione maggiore: ectopia crociata del rene di sinistra. All'età di 20 anni riscontro ecografico di lesioni iperecogene nodulari a livello epatico, con vie biliari e funzionalità epatica nella norma. Eseguita RMN addome: lesioni compatibili con adenomi epatici. La maggiore (circa 4.6 cm) localizzata nel VI segmento epatico. Altre lesioni sono state identificate nella regione subdiaframmatica del lobo sinistro (3.3 cm, 2.2 cm e 1.6 cm) e nel IV segmento (2.7 e 1.4 cm). Segnalato inoltre un piccolo angioma capillare nella regione subcapsulare del lobo destro (circa 11 mm). Attualmente il paziente esegue monitoraggio ecografico e biomorale periodico delle lesioni e la situazione è stabile. Markers tumorali negativi.

CV: femmina, 19 anni. Diagnosi di WHS a 2 anni di vita: microdelezione de novo 4p16.3. Tratti craniofacciali tipici, grave ritardo di crescita staturponderale, psicomotorio e del linguaggio ed epilessia. Non malformazioni maggiori. All'età di 11 anni riscontro clinico di epatomegalia, eseguita ecografia addome, che ha documentato la presenza di una massa disomogenea (7x7,5 cm) nel lobo destro del fegato, estesa nei vasi intraepatici e nella vena porta, associata ad un'altra lesione nel lobo sinistro di circa 2.8 cm. Eseguita TC addominale, che ha confermato la presenza di lesioni al IV e VIII segmento del fegato, compatibili con adenoma multifocale. Due anni dopo riscontro radiologico di ingrandimento delle lesioni, in particolare nel lobo destro, con vie biliari intraepatiche, colecisti e vena porta compresse. Attualmente fegato quasi completamente sostituito da lesioni (tra i 3 ed i 7 cm), bilobalmente locate, con parenchima residuo ipertrofico.

L'adenoma epatico non è mai stato descritto sino ad ora in pazienti affetti da WHS.

PICCOLO CROMOSOMA MARCATORE SOVRANNUMERARIO (sSMC) DEL CROMOSOMA 1 : DESCRIZIONE DI UN CASO E REVIEW DELLA LETTERATURA

I. Caliendo¹, M. Ingenito¹, M. Calabrese¹, C. Mastellone¹, P. Olivieri¹, C. Fabbriatore¹, G. Pellegrino¹, G. Franzese⁴, L. Nitsch², R. Genesisio², G. Leone², C. Di Stefano³

¹*U.O. Genetica Molecolare e Citogenetica ASL Salerno*

²*Dip. di Patologia Cellulare e Molecolare L. Califano Università degli Studi Federico II Napoli*

³*U.O. Terapia Intensiva Neonatale Ospedale Umberto 1 Nocera Inferiore*

⁴*Dip. Pediatria Università Magna Grecia Catanzaro*

sSMC sono descritti in pazienti che presentano i segni clinici di una malattia o di una sindrome genetica. Possono derivare da diversi cromosomi. Sono descritte piccole trisomie prossimali di 1p e 1q, in questi vi è grande variabilità clinica legata al contenuto genetico, alla percentuale di mosaicismo ed alla possibile presenza di Disomia Uniparentale (UPD) dei cromosomi omologhi al marcatore. Presentiamo il caso di una bambina in cui è stato riscontrato un sSMC che deriva dal cromosoma 1. La probanda al momento della nascita presentava delle lievi dismorfie: padiglioni auricolari piccoli ed a basso impianto, lieve micrognazia, epicanto bilaterale, ipotonia assiale ed opistotono. Dalle colture da sangue periferico, allestite secondo i protocolli standard della Citogenetica Convenzionale (CC), il cariotipo è 46,XX[80]/47,XX,+mar[20]. A tre mesi presenta crescita normale, ipotonia lieve e persistono opistotono e dismorfismi. L'sSMC è stato caratterizzato eseguendo tecniche di citogenetica molecolare: la Multicolor Fluorescent In Situ Hybridization (M-FISH) e la FISH con sonde painting e centromeriche specifiche per il cromosoma 1. Con l'Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) sono stati definiti i punti di rottura dell'sSMC. Il risultato finale ha mostrato che il nostro marker è presente nel 17% dei linfociti e comprende un tratto di circa 7Mb del cromosoma 1 che si estende dalla regione 1p13.2 a 1q10, ed ha inoltre una duplicazione della regione Xq27.2, ampia 732 Kb. Nella regione Xq27.2 vi sono 6 geni OMIM, che non appaiono correlati con il fenotipo. Nella regione, che costituisce l'sSMC descritto, sono compresi 44 geni OMIM. I pochi casi descritti con duplicazione 1p prossimale, hanno una grandezza maggiore della nostra, ed il fenotipo è variabile. Il nostro fenotipo è "mild", ma difficile da definire come outcome vista l'età della probanda e sembra essere correlato alla grandezza della duplicazione ed al contenuto genico. Non sembra esserci correlazione dalla letteratura, con UDP del cromosoma 1. Sono in corso ulteriori indagini per definire tale regione, questo perché le conseguenze fenotipiche di un sSMC de novo sono difficili da definire. Tale programma ci permetterà di eseguire una adeguata consulenza genetica ed un appropriato follow-up della paziente.

MODELLO IN VITRO PER L'ISOLAMENTO E L'ANALISI DEGLI ERITROBLASTI FETALI DA SANGUE PERIFERICO MATERNO NELLA DIAGNOSI PRENATALE NON INVASIVA

M. Masala¹, A. Picciau¹, M. Massidda¹, L. Saba², C. Cossu¹, M.C. Rosatelli¹

¹*Dip. di Sanità Pubblica, Medicina Clinica e Molecolare, Sez. di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università degli Studi di Cagliari;*

²*Lab. di Genetica Molecolare, Osp. Regionale per le Microcitemie, Cagliari;*

La presenza di cellule fetali e di DNA fetale libero nel sangue materno, sin dalle prime settimane di gravidanza, ha suscitato interesse per lo sviluppo di metodologie non invasive per la diagnosi prenatale di malattie genetiche.

Nell'ambito di un progetto finalizzato alla diagnosi prenatale non invasiva, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulla possibilità di isolare eritroblasti fetali dal sangue periferico materno. A tale scopo, sono state coinvolte 50 coppie a rischio per β -Talassemia pervenute presso il nostro centro per sottoporsi a diagnosi prenatale tramite villocentesi. Ad ogni donna, in epoca gestazionale intorno alla 10^a settimana, è stato effettuato un prelievo di 20ml di sangue. Al fine di isolare gli eritroblasti fetali, i campioni sono stati sottoposti a lisi selettiva degli eritrociti adulti mediante cloruro d'ammonio. L'esiguo numero di cellule fetali isolate attraverso questa metodica, ha reso necessaria una valutazione dell'efficienza del sistema. Abbiamo quindi sviluppato un modello in vitro che prevede l'utilizzo di una miscela tra 20ml di sangue periferico di adulto e sangue fetale contenente circa 25 eritroblasti, numero paragonabile alla condizione fisiologica in 10^a settimana.

Tale miscela è stata sottoposta a lisi selettiva eritrocitaria e successivamente ad arricchimento attraverso l'utilizzo dell'anticorpo di membrana CD45 e la tecnica MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) per la deplezione dei leucociti. La frazione residua è stata poi citocentrifugata su vetrini e sottoposta a colorazione di Kleihauer. Gli eritroblasti fetali identificati sono stati isolati attraverso un microscopio a microdissezione laser e successivamente genotipizzati e nel 100% dei campioni è stata confermata l'origine fetale delle cellule isolate.

Il modello ha mostrato un'elevata capacità di recupero delle cellule fetali iniziali stimata intorno all'80%.

Sono in corso esperimenti di trasferimento di questo modello alla condizione fisiologica in campioni di sangue di donne in epoca gestazionale precoce.

RARE EXON 10 DELETION IN POLH IN AN ITALIAN FAMILY WITH XERODERMA PIGMENTOSUM, VARIANT TYPE

E. Disabella¹, M. Diegoli², R. Borroni³, M. Grasso¹, C. Giorgianni¹, M. Tagliani¹, A. Pilotto¹, A. Scarabotto¹, M. Concardi¹, I. Puccio¹, E. Arbustini¹

¹*Centro per le Malattie Genetiche Cardiovascolari, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia*

²*Dip. Medicina Molecolare, Università di Pavia, Pavia*

³*Dermatologia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia*

Xeroderma pigmentosum (XP) is a rare autosomal recessive disease characterized by photosensitivity, skin cancers and occasionally ocular and neurologic abnormalities. Approximately 20% of patients are of the XP variant (XPV) type, showing later onset of skin cancer. The gene involved in XPV is POLH encoding for polymerase η , that permits translesion synthesis in regions of DNA damage due to ultraviolet irradiation.

We describe a 52-year old male proband born to non-consanguineous, currently healthy parents from southern Italy, who came to clinical attention at age 44 for widespread freckling on his skin since childhood. Later, several in situ and invasive melanomas were removed from his sun-exposed skin. Two sisters had undergone excision of multiple cutaneous malignancies. All patients did not exhibit neurological signs.

The proband and family members received genetic counseling and testing after informed consent.

Complete sequence analysis of XPA, XPC, and XPD/ERCC2 genes and exons 1-9 and 11 of POLH gene did not reveal pathological mutations. No product amplification was evident for exon 10 of POLH. Amplification of exon 10 cDNA by PCR yielded two bands of appropriate size for heterozygous (522bp and 352bp) and one band for homozygous (352bp) siblings and wild-type controls. Direct sequencing of the 352bp amplicon showed a 170-nucleotide deletion between positions 1075 and 1244 of cDNA, corresponding to POLH exon 10. The proband and his 2 affected sisters showed homozygous deletion of exon 10. Non-affected siblings tested heterozygous. The mutation harbored by our family predicts the p.Asn359ValfsX32 protein mutation, with defective polymerase activity. Immunohistochemical analysis with an antibody recognizing amino acids 414 to 713 of polymerase η showed severely reduced expression in skin sections of the proband compared to normal control skin.

Exon 10 deletion in POLH was described only in an XPV family of southern Italian (Sicilian) descent and in two families from Algeria. Two other patients, one from Tunisia and one from the USA are compound heterozygous for the same exon 10 deletion in POLH. The proximity of Algeria and Tunisia to southern Italy seems to suggest a possible founder mutation. Further haplotype analysis could support our hypothesis.

CONDRODISPLASIA PUNCTATA BRACHITELEFALANGICA X-LINKED RECESSIVA: DIAGNOSI NEONATALE IN DUE GEMELLI DIZIGOTI

S.B. Maitz¹, T. Fedeli², M. Migliavacca², M. Grimaldi³, A. Cereda¹, F. Zucchetti¹, F. Mazzoleni⁴, A. Bozzetti⁴, A. Selicorni¹

¹*UOS Genetica Pediatrica, Fondazione MBBM, S. Gerardo, Monza*

²*U.O Terapia Intensiva e Patologia Neonatale, Fondazione MBBM, A.O. S.Gerardo Monza*

³*Neuroradiologia, Servizio di Radiodiagnostica, Ospedale San Gerardo, Monza, Italy*

⁴*Cattedra e UO di Chirurgia Maxillo Facciale A., O. S Gerardo Monza*

La Cndrodisplasia Punctata Brachitelefalangica X-linked recessiva (CPBXR) è una condizione clinica caratterizzata da ipoplasia naso-mascellare, bassa statura, brachitelefalangia e presenza di calcificazioni epifisarie nei primi mesi di vita.

G.R. e G.N. sono primogeniti di una coppia di genitori sani non consanguinei. La gravidanza bicoriale, biamniotica è normodecorsa. I controlli ecografici avevano mostrato la presenza di anomalie del profilo facciale nel corso dei controlli ecografici del terzo trimestre. Il parto è stato spontaneo. I valori auxologici alla nascita e l'adattamento neonatale dei due gemelli è stato regolare. L'esame obiettivo ha dimostrato la presenza di una evidente ipoplasia naso-mascellare che ha permesso di ipotizzare una diagnosi clinica di Sindrome di Binder. Non sono state evidenziate malformazioni maggiori associate. Poiché la S. di Binder entra in diagnosi differenziale con la CBPXR in seconda giornata di vita è stato richiesto RX scheletro che ha mostrato la presenza di calcificazioni a morfologia allungata, serpiginosa a livello di entrambe le teste femorali in G.N.

In base a questo riscontro è stata richiesta analisi molecolare del gene ARSE che ha mostrato in entrambi la presenza della mutazione c.1743G>A che ha così confermato la diagnosi clinica ipotizzata.

Le indagini di approfondimento strumentale successive hanno permesso di evidenziare un dato patologico ai BAER ed una ipoplasia del dente dell'epistroteo in G.N., complicanze mediche note della storia naturale della CPBXR.

Conclusioni: di fronte ad un neonato con fenotipo clinico Binder-like considerare la diagnosi differenziale con la CPBXR ed eseguire il relativo approfondimento radiologico per la ricerca delle calcificazioni articolari, elemento diagnostico di grande valore che però può essere non più rilevabile dopo i primi mesi di vita.

CARATTERIZZAZIONE GENETICA E CLINICA DELLE POLIPOSIS ADENOMATOSE DEL COLON

S. Miccoli¹, V. Gismondi², L. Ricciardiello³, M. Seri¹, L. Varesco², D. Turchetti¹

¹*U.O. Genetica Medica, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna*

²*S.S. Centro Tumori Ereditari, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova*

³*U.O. Gastroenterologia, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna*

La Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP) è responsabile dell'1% dei casi di carcinoma del colon ereditario: una mutazione germinale del gene APC si riscontra nel 70% circa dei casi con forma classica e nel 20-30% di quelli con forma attenuata. Mutazioni bi-alleleliche del gene MutYH sono responsabili di un altro 2% di casi, che sono pertanto affetti da MutYH Associated Polyposis (MAP).

Dal gennaio 2004 al dicembre 2011 presso il nostro ambulatorio sono stati valutati 68 pazienti con polipi multipli del colon: di questi, 38 presentavano una verosimile poliposi adenomatosa ereditaria e sono stati sottoposti all'analisi mutazionale dei geni APC e/o MutYH. Nel 55% dei pazienti (21/38) è stata riscontrata la mutazione causativa della poliposi, distinguendo pazienti FAP e MAP e consentendo una corretta gestione clinica degli affetti ed un appropriato counselling genetico dei familiari. Nei pazienti FAP (n=15) l'età media alla diagnosi è stata di 35 anni, 11/15 pazienti (73%) hanno familiarità per poliposi e/o CRC con pattern di ereditarietà dominante, la numerosità dei polipi è tale da richiedere la colectomia e 5/15 pazienti (33%) presentano manifestazioni extra-coloniche. Nei pazienti MAP (n=6) l'età media alla diagnosi è 49 anni, 3/6 pazienti (50%) hanno familiarità per poliposi e/o CRC con pattern di ereditarietà recessivo, nella metà dei pazienti la numerosità dei polipi è <100 e 2/6 pazienti (33%) presentano adenoma duodenale. In 2/38 pazienti il test genetico ha rilevato una variante di significato incerto, mentre nei restanti 15/38 pazienti non sono state identificate varianti: in quest'ultimo gruppo, clinicamente più eterogeneo, l'età media alla diagnosi è 48 anni, 10/15 pazienti (67%) non hanno familiarità, in 11/15 pazienti (73%) il numero dei polipi è <100 e nessuno presenta manifestazioni extra-coloniche.

Minore è il numero di polipi e maggiore è l'età alla diagnosi, minore è la probabilità di riscontrare mutazioni con i test disponibili, lasciando incertezza circa il corretto management clinico del paziente e dei familiari. I pazienti con caratteristiche suggestive di poliposi geneticamente determinata senza mutazione identificata saranno oggetto di uno studio mirato ad identificare nuovi geni causativi di poliposi.

INFLUENCE OF PENTRAXIN 3 (PTX3) GENETIC VARIANTS ON MYOCARDIAL INFARCTION RISK AND PTX3 PLASMA LEVELS

E. Barbati¹, S. Pileggi³, C. Specchia⁴, M. Vilella⁵, M.L. Rossi⁶, S. Barlera³, R. Fanelli⁵, C. Garlanda², A. Vilella⁷, M.G. Franzosi³

¹*Department of Inflammation and Immunology, Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano, Milan, Department of Translational Medicine, University of Milan*

²*Department of Inflammation and Immunology, Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano, Milan*

³*Department of Cardiovascular Research, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milan*

⁴*Department of Cardiovascular Research, Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri", Milan, Department of Biomedical Sciences and Biotechnologies, University of Brescia*

⁵*Department of Cardiology, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo*

⁶*Department of Interventional Cardiology, Istituto Clinico Humanitas, IRCCS, Rozzano, Milan*

⁷*Department of Cardiology, F.Lastaria Hospital, Lucera*

BACKGROUND: Pentraxin 3 (PTX3), a prototypic member of long pentraxin family, is rapidly produced by vascular endothelial cells, smooth muscle cells, macrophages and neutrophils in response to inflammatory stimuli. Recent data suggest its protective function by acting on the immune-inflammatory balance in the cardiovascular system. PTX3 plasma concentration is an independent predictor of mortality in patients with acute myocardial infarction (AMI).

Information on the influence of PTX3 genetic variants in human diseases is restricted to infections and female fertility, no data are available on association of PTX3 and AMI.

AIM: We explored in the study population of 1751 AMI cases and 1494 controls the relations between rs2305619, rs3816527 and rs1840680 on the PTX3 gene, the risk of AMI, the PTX3 plasma concentrations and the AMI prognosis.

METHODS: All the subjects were genotyped for the three SNPs and followed-up for three years. Genotype, allele and haplotype frequencies were compared for AMI survivors and controls. Plasma PTX3 levels were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in a subset of 704 AMI cases and 664 controls. For AMI cases, blood was collected at least five days after the onset of symptoms of the last event (the index event or a later event during follow-up). Data were analyzed according to case-control design. A p-value < 0.016 was considered significant to adjust for multiple testing across the three SNPs. **RESULTS:** None of genotypes, alleles or haplotypes was significantly associated with the risk of AMI. However, an analysis adjusted for age and sex revealed that the three PTX3 SNPs and the corresponding haplotypes were significantly associated with different PTX3 plasma levels. Moreover, there was a significant association between PTX3 plasma concentrations and the risk of all-cause mortality at three years in AMI patients (OR=1.10, 95% CI: 1.01-1.20, p=0.02).

CONCLUSIONS: Our study reveals that PTX3 plasma levels are influenced by three PTX3 polymorphisms. Genetically determined high PTX3 levels do not influence the risk of AMI, suggesting that PTX3 concentration itself is unlikely to be even a modest causal factor for AMI. Moreover, our analysis confirms that PTX3 is a prognostic marker after AMI.

Sindrome di Williams e miocardio non compatto: associazione casuale?

M. Bertoli¹, M.E. Scapillati², V. Alesi¹, M. Spinelli², N. De Paola³, C. Haass², G. Barrano¹, C. Palmieri¹, K. Petrilli¹, M. Finocchi², A. Novelli⁴

¹*UOSD Genetica Medica, Ospedale San Pietro Fatebenefratelli, Roma*

²*UOS Pediatria e Neonatologia, Ospedale San Pietro Fatebenefratelli, Roma*

³*Servizio di Cardiologia Pediatrica, Ospedale San Pietro Fatebenefratelli, Roma*

⁴*Istituto CSS-Mendel e IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza*

La sindrome di Williams è una condizione rara (1/20.000 nuovi nati) dovuta ad una delezione sul braccio lungo di un cromosoma 7 (7q11.23) e caratterizzata dall'associazione di facies peculiare, malformazioni soprattutto cardiache, ritardo neurocognitivo. Le cardiopatie più frequenti sono: stenosi valvolare aortica e polmonare, difetti interatriali e interventricolari, ipoplasia aortica.

Descriviamo il caso di un neonato, secondogenito di genitori non consanguinei, nato a termine da taglio cesareo urgente eseguito per alterazioni del tracciato cardiocardiografico. La gravidanza è decorsa regolarmente, e il cariotipo fetale su liquido amniotico, eseguito per età materna avanzata, era maschile normale (46,XY). Alla nascita i parametri antropometrici erano nella norma. Indice di Apgar a 1'8; a 5' 9.

L'esame obiettivo alla nascita evidenziava lievi note dismorfiche, evocative della Sindrome di Williams. Per la presenza di un soffio sistolico veniva eseguito un ecocardiogramma che evidenziava ispessimento, ipertrabecolazione e lacune del miocardio prevalentemente a dx e a carico del setto interventricolare, reperti compatibili con una diagnosi di "miocardio non compatto".

Durante la degenza il neonato non ha presentato altri problemi clinici di rilievo. Non sono state evidenziate malformazioni a carico di altri organi e apparati.

Il sospetto clinico di sindrome di Williams è stato confermato da analisi di FISH della regione critica; la delezione è stata caratterizzata mediante analisi di aCGH.

Il miocardio non compatto è una cardiomiopatia rara, determinata da un arresto dello sviluppo del miocardio durante la vita embrionale (tra la V e l'VIII settimana di gravidanza). E' generalmente descritta come sporadica, anche se in alcuni rari casi è stata ipotizzata una base familiare con un'ampia eterogeneità genetica. L'espressione clinica è molto variabile. I casi diagnosticati in epoca neonatale sono molto rari e a prognosi infausta (il decesso avviene generalmente per scompenso cardiaco, aritmie). Nel nostro caso sono stati sottoposti a screening ecocardiografico i familiari di I grado, risultati negativi. Non sono noti, ad oggi, casi di S. di Williams associati a questa particolare cardiomiopatia.

Un caso di microdup 17q12 in DP mediante aCGH. Utilità di un esito rapido in gravidanza avanzata.

A. Mesoraca¹, G. Di Giacomo¹, A. Cima¹, M. Sarti¹, A. Viola¹, S. Monti¹, M.A. Barone¹, D. Bizzoco¹, P. Cignini², C. Giorlandino²

¹Lab. di Genetica Medica, Artemisia Roma

²Servizio di Diagnosi Prenatale, Artemisia Roma

Si vuole indicare l'utilità dell' aCGH in diagnosi prenatale quale rapido approfondimento nei casi di gravidanze a rischio per segni ecografici positivi, ad epoca gestazionale avanzata. Secondo le recenti linee guida l' uso dell'analisi array-CGH in gravidanza viene consigliato in alcuni casi particolari, ma che anche nel caso di diagnosi prenatale eseguita con urgenza a seguito di dubbi ecografici rilevati alla ecografia morfologica, l'aCGH può trovare un utile impiego nella valutazione, in tempi brevi, del genoma fetale. Ad una donna di 40 anni è stata eseguita un' amniocentesi di urgenza alla 21a settimana a seguito di un esito ecografico patologico con trigonocefalia, megalocrania, cisti meningeali, ipoplasia del corpo calloso, difetto cardiaco e stenosi dell'aorta. È stata eseguita quindi un' amniocentesi d'urgenza e dopo poche ore, mediante l'utilizzo della QFPCR, sono state escluse le patologie cromosomiche principali a carico dei cromosomi 21, 13, 18, X, Y. Contemporaneamente abbiamo allestito l' Array-CGH (array-based Comparative Genomic Hybridization) utilizzando la piattaforma distribuita dalla Technogenetics (Sesto S. Giovanni-MI): Focus Constitutional v1.1 Bluegenome-Cambridge UK. Il risultato di tale test, ottenuto dopo 72 ore dal prelievo, ha evidenziato uno sbilanciamento del numero di copie di sequenze genomiche compatibile con una duplicazione di circa 1,6 Mb sul braccio lungo del cromosoma 17q12 (da 31890682 a 33512626 bp). Nella regione 17q12 vi sono state descritte una serie di patologie tra cui la sindrome da microduplicazione 17q12 (OMIM: 614526) le cui manifestazioni cliniche principali associate sono quelle del sistema nervoso centrale e dello sviluppo cognitivo in generale. Altre manifestazioni cliniche importanti descritte nei casi di microduplicazione 17q12 hanno riguardato l'apparato cardiovascolare e quello renale ed in alcuni casi specifici è stata riscontrata microftalmia, glaucoma, schisi del palato molle, difetto del setto atriale, brachidattilia e clinodattilia del quinto dito. Conclusioni: l'utilizzo in DP della CGH può trovare una grande utilità in quei casi di gravidanze in epoca gestazionale avanzata e quando è utile ottenere un risultato indicativo in attesa della conferma mediante coltura cellulare degli amniociti.

DELEZIONE 16p13.11 DI ORIGINE PATERNA IN UN CASO DI RITARDO DELLO SVILUPPO PSICOMOTORIO, DISTURBO DEL COMPORTAMENTO, STRABISMO E DISMORFIE MINORI

C. Barone¹, A. Capalbo², A. Cataliotti Del Grano³, M. Iannicelli², L. Indaco³, C. Ettore³, C. Barone³, B. Barrano³, A. Novelli², S. Bianca³

¹*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania - Scuola di Specializzazione in Genetica Medica Università degli Studi Messina - Catania*

²*Istituto CSS Mendel e IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, Roma*

³*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania*

Introduzione:

Il cromosoma 16 presenta numerose Low Copy Repeats (LCRs) responsabili di riarrangiamenti genomici ricorrenti. Delezioni di tale regione, riportate in letteratura, si associano ad epilessia, anomalie congenite multiple e disabilità intellettiva mentre le duplicazioni sono implicate nell'insorgenza di autismo, schizofrenia e disabilità intellettiva. Tuttavia il fenotipo associato a Copy Number Variation (CNV) in 16p13.11 non risulta caratteristico ed inoltre delezioni e duplicazioni in tale regione, sono state osservate anche in individui "fenotipicamente normali".

Caso clinico:

Riportiamo un caso giunto all'età di 10 anni per la presenza di ritardo dello sviluppo psicomotorio e disturbo del comportamento. All'esame obiettivo si evidenziava inoltre la presenza di strabismo e dismorfie minori. L'esame del cariotipo non mostrava la presenza di anomalie citogeneticamente evidenziabili. Si decideva quindi di eseguire esame molecolare mediante array-CGH che ha evidenziato una delezione nella regione cromosomica 16p13.11 di circa 1.3 Mb. Il riarrangiamento, confermato mediante qPCR, è stato esteso ai genitori con evidenza di una segregazione paterna. Il padre del probando non presenta anomalie fenotipiche. La delezione, che coinvolge i geni NDE1 (OMIM 614019), MYH11 (OMIM 132900), ABCC6 (OMIM 603234), si sovrappone alla microdelezione ricorrente 16p13.11 considerata un locus di suscettibilità per patologie neurocognitive.

Conclusioni:

Microdelezioni e microduplicazioni nella regione 16p13.11 si presentano con manifestazioni cliniche non caratteristiche. Tale dato, associato alla frequente presenza dello stesso riarrangiamento nei genitori non affetti, può essere dovuto a diversi fattori, come la penetranza incompleta, l'espressività variabile, l'incapacità di riconoscere manifestazioni cliniche sfumate o l'imprinting.

Hannes et al. (2009) riportano che le delezioni ereditate dai genitori clinicamente normali sono suscettibili di essere causale per fenotipo dei pazienti, mentre il ruolo di duplicazioni (de novo o ereditato) nel fenotipo rimane ad oggi incerto. Questa differenza nella conoscenza riguardo la rilevanza clinica della delezione e la duplicazione provoca un cambiamento nella gestione del counseling genetico.

NUOVE COMPLICANZE MEDICHE NELLA SINDROME DI CORNELIA DE LANGE?

A. Scatigno¹, M. Mariani¹, G. Prunotto¹, A. Cereda¹, C. Giussani², M. Grimaldi³, C. Gervasini⁴, A. Selicorni¹

¹*UOS Genetica Pediatrica, Fondazione MBBM, S. Gerardo, Monza*

²*Clinica Neurochirurgica, Ospedale San Gerardo, Università degli Studi Milano-Bicocca, Monza, Italy*

³*Neuroradiologia, Servizio di Radiodiagnostica, Ospedale San Gerardo, via Pergolesi 33, Monza, Italy*

⁴*Genetica Medica, Dip. Scienze della Salute, Università di Milano Polo Ospedale San Paolo, Milano, Italy*

Riportiamo i dati clinici di 4 pazienti affetti da sindrome di Cornelia de Lange (CdLS) che hanno manifestato complicanze inusuali rispetto ai dati riportati in letteratura: anomalie della giunzione atlo-occipitale, neutropenia e tiroidite. AS: diagnosi di CdLS alla nascita, mutazione del gene NIPBL (c.4789G>T), scarso accrescimento staturoponderale, non malformazioni maggiori evidenti, ritardo di sviluppo psicomotorio di grado moderato. Esegue TC ed RMN encefalo e colonna cervicale che mostra sublussazione laterale e rotatoria dell'articolazione atlo-assiale di destra e riduzione in ampiezza del canale spinale; il midollo è angolato ma non vi è evidenza di mielopatia su base compressiva. Per il riscontro di infezioni respiratorie ricorrenti esegue esami ematici che dimostrano la presenza di neutropenia (<1x 10⁹/L). L'aspirato midollare mostra un midollo ricco in cellule, con serie mieloide ben rappresentata con rallentamento maturativo a livello granulocitico non segmentato e note di displasia. È in trattamento cronico con granulokine. VC: diagnosi di CdLS alla nascita, mutazione del gene NIPBL (c.5427G>A), scarso accrescimento staturoponderale, malformazioni maggiori agli arti, ritardo di sviluppo psicomotorio di grado moderato. La RMN encefalo e colonna cervicale mostra malformazione della giunzione atlanto-assiale con accentuazione della curvatura tra l'asse del clivus e il dente dell'epistrofeo che non determina alterazioni di segnale della corda midollare. MS: diagnosi di CdLS alla nascita, mutazione del gene NIPBL (c.6892C>T), scarso accrescimento staturoponderale, ritardo di sviluppo psicomotorio grave. A 16 anni riscontro occasionale di valori compatibili con quadro di tiroidite: TSH 98,412 UI/ml (0,38-4,310), FT3 2.17 pg/ml (2,1-3,8), FT4 0,2 ng/ml (0,82-1,63), Anti-TPO 724 IU/ml (0-100), Anti-TG 547 IU/ml (0-100). VS: diagnosi di CdLS alla nascita, ricerca mutazione dei geni NIPBL ed SMC1 negativa, scarso accrescimento staturoponderale, malformazioni genitali e agli arti, ritardo di sviluppo psicomotorio di grado profondo. All'età di 5 anni riscontro di tiroidite: TSH 477.650 UI/ml (0.85-6.5), FT3 0.5 pg/ml (2,5-5,3), FT4 0,9 pg/ml (9.0-17.0), Anti-TPO 299 UI/ml (0-35), Anti-Tg >3000 IU/ml (0-40). VC e MS sono in trattamento con levotiroxina.

MITOCHONDRIAL DNA VARIANT DISCOVERY AND EVALUATION IN HUMAN CARDIOMYOPATHIES THROUGH NEXT-GENERATION SEQUENCING

M. Tagliani¹, M. Diegoli², M. Zaragoza³, E. Disabella¹, M. Grasso¹, C. Giorgianni¹, C. Canclini¹, A. Pilotto¹, A. Scarabotto¹, R. Semeraro¹, A. Serio¹, E. Arbustini¹

¹*Centro per le Malattie Genetiche Cardiovascolari, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia*

²*Dip. Medicina Molecolare, Università degli Studi di Pavia, Pavia*

³*Genetics & Metabolism Div., Pediatrics Dep. and Center for Mitochondrial and Molecular Medicine and Genetics, University of California Irvine, USA*

INTRODUCTION. Mutations in mitochondrial DNA (mtDNA) may cause maternally-inherited cardiomyopathy and heart failure. In homoplasmy all mtDNA copies contain the mutation. In heteroplasmy there is a mixture of normal and mutant copies of mtDNA. The clinical phenotype of an affected individual depends on the type of genetic defect and the ratios of mutant and normal mtDNA in affected tissues. We aimed at determining the sensitivity of next-generation sequencing compared to Sanger sequencing for mutation detection in patients with mitochondrial cardiomyopathy.

MATERIALS AND METHODS. We studied 18 patients with mitochondrial cardiomyopathy and two with suspected mitochondrial disease. We “shotgun” sequenced PCR-amplified mtDNA and multiplexed using a single run on Roche’s 454 Genome Sequencer.

RESULTS. By mapping to the reference sequence, we obtained 1,300x average coverage per case and identified high-confidence variants. By comparing these to >400 mtDNA substitution variants detected by Sanger, we found 98% concordance in variant detection. Simulation studies showed that >95% of the homoplasmic variants were detected at a minimum sequence coverage of 20x while heteroplasmic variants required >200x coverage. Several Sanger “misses” were detected by 454 sequencing. These included the novel heteroplasmic 7501T>C in tRNA serine 1 in a patient with sudden cardiac death.

CONCLUSIONS. These results support a potential role of next-generation sequencing in the discovery of novel mtDNA variants with heteroplasmy below the level reliably detected with Sanger sequencing. We hope that this will assist in the identification of mtDNA mutations and key genetic determinants for cardiomyopathy and mitochondrial disease.

Difetti genetici multipli dell'asse GH-IGF-1 in un paziente affetto da nanismo con deficit e resistenza al GH

M. Crippa¹, I. Bestetti¹, M. Perotti², M. Bozzola³, S. Pagani³, S. Menabò⁴, L. Baldazzi⁴, C. Picinelli¹, S. Galletti¹, G. Grassi², L. Larizza⁵, A. Pincelli², P. Finelli⁶

¹Laboratorio di Citogenetica Medica e Genetica Molecolare, Istituto Auxologico Italiano, Milano

²Clinica Medica, Ospedale San Gerardo, Università Milano-Bicocca, Milano

³Dipartimento di Pediatria, Università di Pavia, IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

⁴UO Pediatria, A.O. Universitaria di Bologna, Bologna

⁵Dipartimento di Scienze della salute, Università degli Studi di Milano, Milano

⁶Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milano

Riportiamo il caso di un paziente di 66 anni con nanismo ipofisario grave, associato ad ipotiroidismo centrale, deficit di prolattina e PAIS (sindrome da resistenza parziale agli androgeni). Il paziente, che all'esame obiettivo presenta un'altezza di 83 cm, riferisce dimensioni alla nascita appropriate per l'età gestazionale e blocco della crescita staturale a 8 mesi di vita, in assenza di familiarità per malattie endocrine. Le analisi strumentali hanno rilevato un quadro di normalità ipotalamo-ipofisaria, mentre i test biochimici effettuati hanno evidenziato la presenza di difetti multipli dell'asse GH-IGF-1. Infatti il paziente è risultato sia non responsivo ai test di stimolo sia resistente al GH, con valori di IGF-1 al di sotto dell'intervallo di normalità dopo stimolazione con GH. Il paziente è stato quindi inviato presso il nostro laboratorio per eseguire innanzitutto l'analisi citogenetica convenzionale, che ha identificato un cariotipo 46,XY normale, ed in seguito l'analisi array-CGH ad alta risoluzione. Tale analisi ha permesso di escludere la presenza di CNV rare causative del fenotipo del paziente. Poiché il peculiare quadro endocrinologico del paziente era fortemente suggestivo di più difetti genetici, si è proceduto col sequenziamento diretto dei seguenti geni dell'asse GH-IGF-1: POU1F1, che agisce nel segmento superiore dell'asse e GHR, STAT5B, IGF-1 e JAK2, relativi alla metà inferiore dell'asse, potenzialmente responsabili della resistenza all'ormone della crescita. L'analisi di sequenza del gene POU1F1, ha evidenziato la presenza di una mutazione in eterozigosi, riportata in letteratura come variazione patogenetica responsabile del Deficit Combinato degli Ormoni Ipofisari (CPHD1; OMIM 613038). Tale risultato correla col severo deficit di GH e di TSH del paziente, dimostrando la presenza di un primo difetto genetico nell'asse GH-IGF-1, ma è insufficiente a spiegare la marcata resistenza all'ormone della crescita. Poiché l'analisi mutazionale di GHR è risultata negativa è in corso il sequenziamento dei geni STAT5B, IGF-1 e JAK2.

Il paziente descritto rappresenta il secondo caso ad oggi riportato i cui segni clinici suggeriscono la concomitanza di almeno due eventi mutazionali coinvolgenti l'asse GH-IGF-1.

Microdelezioni/microduplicazioni in 15q11.2: 23 nuovi casi e revisione della letteratura

M.P. Recalcati¹, R. Caselli¹, L. Ballarati¹, L. Bernardini², M.T. Bonati³, L. Castiglia⁴, F. Crosti⁵, P. Failla⁴, M. Fichera¹⁰, O. Galesi⁴, D. Greco⁴, S. Maitz⁷, E. Manfredini⁸, A. Novelli², S. Redaelli⁵, C. Romano⁴, A. Selicorni⁷, B. Torres², L. Dalprà⁵, L. Larizza⁹, D. Giardino¹

¹Laboratorio di Citogenetica Medica e Genetica Molecolare, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano

²CSS-Mendel e IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, Roma

³Ambulatorio di Genetica Medica, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano

⁴IRCSS Oasi Maria Santissima, Troina

⁵US Genetica Medica, ospedale S. Gerardo, Monza

⁶Università degli studi di Catania

⁷Centro Genetica Clinica, Fondazione Monza e Brianza Mamma e Bambino, Monza

⁸Dipartimento Materno Infantile, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

⁹Laboratorio di Citogenetica Medica e Genetica Molecolare, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano, Dipartimento di Medicina Chirurgia e Odontoiatria, A.O. San Paolo, Università degli Studi di Milano, Milano

¹⁰IRCSS Oasi Maria Santissima, Troina, Università degli studi di Catania

La regione prossimale 15q è caratterizzata da 5 blocchi di duplicazioni segmentali (BP1-BP5) che mediano eventi di ricombinazione omologa non allelica generando microdelezioni o microduplicazioni ricorrenti. Le microdelezioni mediate da BP1 e BP3 o BP2 e BP3 sono associate alle sindromi di Prader-Willi/Angelman, mentre duplicazioni mediate da BP2 e BP3 sono presenti in circa l'1% dei pazienti autistici. La regione BP1-BP2 contiene i geni TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2 e NIPA1. Variazioni nel numero di copie (CNVs) mediate da BP1 e BP2 sono state identificate in pazienti con fenotipo neurologico variabile caratterizzato principalmente da ritardo del linguaggio e dello sviluppo, disturbi neurologici e comportamentali, dismorfismi e disabilità intellettiva. Nella maggior parte dei casi lo sbilanciamento è ereditato da un genitore che non manifesta il fenotipo o lo manifesta in modo lieve. La presenza di portatori sani e la mancanza di un fenotipo specifico ha reso finora difficile definire il significato patogenetico delle CNVs della regione BP1-BP2, attualmente proposta come regione di suscettibilità a disabilità neurologiche.

Vengono presentati i risultati di uno studio multicentrico condotto con array-CGH in 4 laboratori italiani che ha permesso di raccogliere 23 nuovi casi con CNVs della regione BP1-BP2, di cui 13 delezioni e 10 duplicazioni. Le CNVs, di dimensioni comprese tra 150 kb e 2,2 Mb, comprendono i 4 geni della regione, con l'eccezione di 4 in cui TUBGCP5 non è coinvolto. Le 2 CNV di 2,2 Mb si estendono prossimalmente coinvolgendo anche il gene POTE8.

Lo studio dell'origine parentale delle CNVs, eseguito in 21 casi, ha evidenziato la trasmissione da un genitore in 19 e l'origine de novo in 2, in accordo al modello genetico formulato per patologie del neurosviluppo secondo cui la stessa lesione genetica primaria ha conseguenze fenotipiche diverse a seconda del background genetico.

Al fine di contribuire alla definizione del quadro clinico associato alle CNVs in BP1-BP2 e di eventuali specificità associate a perdita o guadagno genico, il fenotipo dei pazienti verrà dettagliato nel contesto dei dati della letteratura e correlato sia al contenuto genico sia all'origine delle CNVs.

ACTIVATING MUTATIONS IN JAK3 ARE A COMMON EVENT IN ADULT T-CELL LINEAGE ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA AND CONCUR WITH JAK1 MUTATIONS TO CONFER POOR PROGNOSIS

E. Flex¹, T. Hornakova², V. Fodale¹, E. Policicchio¹, E. Stellacci¹, L. Stella³, S. Chiaretti⁴, V. Petrangeli¹, F. Paoloni⁵, C. Carta¹, A. De Luca⁷, A. Vitale⁴, J. Deng⁶, M. Sanchez¹, M. Vignetti⁵, G. Cazzaniga⁸, A. Biondi⁸, E.F. Petricoin⁶, R. Foà⁴, J. Renault², M. Tartaglia¹

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

²Ludwig Institute for Cancer Research and de Duve Institute, Université catholique de Louvain, Bruxelles, Belgium

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

⁴Dip. di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università "La Sapienza", Rome, Italy.

⁵GIMEMA Data Center, GIMEMA Foundation, Rome, Italy.

⁶Center for Applied Proteomics and Molecular Medicine, George Mason University, Manassas, VA.

⁷Mendel Laboratory, Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy

⁸Centro Ricerca M. Tettamanti, Clinica Pediatrica Università di Milano Bicocca, Monza, 20052, Italy

Janus kinases (JAKs) are non-receptor protein tyrosine kinases playing a crucial role in cell response to cytokines and hematopoietic growth factors. While impaired signaling through these proteins is associated with defective lymphoid lineage cell development/function, their acquired enhanced function has been established to contribute to diverse hematologic malignancies. We previously showed that somatic Janus kinase 1 (JAK1) mutations occur in a subset of patients with T-cell precursor ALL (T-ALL). Here, we report that somatically acquired gain-of-function mutations in JAK3 represent a relatively common event in adult T-ALL. JAK3 mutations invariably occurred in T-ALL cases with a JAK1 mutation, identifying a subgroup of patients with poor response to therapy and overall prognosis. Among JAK1 mutation-negative T-ALL, compound heterozygosity or homozygosity due to uniparental isodisomy for JAK3 lesions are frequently observed. Three mutations that were studied promoted JAK3 gain of function and conferred IL3-independent growth in Ba/F3 cells. Such effects were associated with variably enhanced activation of multiple downstream signaling pathways. Our results demonstrate that aberrant signaling through JAK3 contributes to T-ALL, identify enhanced mTOR activity as a critical pathway for their action, and point to TOR inhibitors as possible drugs for treatment of JAK3 mutation-associated ALL.

THE GIMAF PROJECT: A MULTICENTRE NATIONAL NETWORK FOR ANDRSON-FABRY DISEASE

E. Disabella¹, M. Grasso¹, M. Tagliani¹, P. Cassini¹, V. Favalli¹, C. Giorgianni¹, C. Canclini¹, M. Diegoli², A. Scarabotto¹, R. Semeraro¹, A. Serio¹, E. Arbustini¹

¹*Centro per le Malattie Genetiche Cardiovascolari, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia*

²*Dip. Medicina Molecolare – Università degli Studi di Pavia, Pavia*

Anderson-Fabry Disease (AFD) is a glycosphingolipidosis caused by deficient or absent activity of the alpha-galactosidase A (GLA, MIM#301500; gene locus Xp22.1). Although the transmission is X-linked recessive, heterozygous females can also be affected, showing milder and later phenotypes as compared to males.

We generated a national network that includes 51 centres (Cardiology, Neurology, Nephrology, Dermatology, Ophthalmology, Internal Medicine) for clinical, biochemical and genetic screening of AFD. A web-assisted database is currently used to assist the diagnostic work-up.

Up to August 2012, we screened 1631 probands with suspected AFD (M=834, F=797), coming from the cardiology (n.= 450), neurology (n.=733), nephrology (n.= 50), dermatology (n.= 10), ophthalmology (n.= 3) and internal medicine (n.= 127) settings.

Screening includes: clinical evaluation, pre-test genetic counselling, biochemical dosage of GLA activity, genetic testing, post-test counselling, and extension of the screening to relatives in case of positive results.

All patients gave written informed consent for the clinical, and genetic studies, and the institutional ethics committees approved the protocol.

We identified 70 patients with GLA mutations. The initial clinical diagnosis was:

- gastrointestinal disturbances and hypohydrosis in 5 (8.6%),
- hypertrophic cardiomyopathy in 23 (39.6%),
- cryptogenic stroke in 26 (44.8%),
- chronic renal failure and dialysis in 2 (3.4%)
- cornea verticillata in 2 (3.4%).

In male patients the α -galactosidase activity was severely decreased ($< 2\text{nmol/h/mL}$), while in female patients the dosage of enzyme activity was non-informative.

The presenting clinical phenotype in patients diagnosed with AFD can be heterogeneous and involve different organs/tissues; organ-specific markers may address the appropriate work-up for the specific diagnosis of the AFD.

Although our prevalence of GLA mutations (4.2%) and diagnostic contribution justify the screening strategy in high-risk or clinically suspected clinical series, the ideal future scenario should include better clinical characterisation and attention to this diagnostic hypothesis in order to decrease the number of negative tests. A more disease-oriented mindset could spare time and costs.

EPIDERMOLISI BOLLOSA AUTOSOMICA RECESSIVA IN UN PAZIENTE CON SINDROME DI WILLIAMS-BEUREN

C. Barone¹, G. Cipressa², L. Indaco³, D. Castiglia⁴, A. Cataliotti Del Grano³, C. Ettore³, C. Barone³, B. Barrano³, A. Novelli², S. Bianca³

¹*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania - Scuola di Specializzazione in Genetica Medica Università degli Studi Messina - Catania*

²*Istituto CSS Mendel e IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, Roma*

³*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania*

⁴*Laboratorio di Biologia Molecolare e Cellulare IDI-IRCCS Roma*

Introduzione:

La sindrome di Williams–Beuren (OMIM 194050), causata dalla delezione 7q11.23, è caratterizzata da disabilità intellettiva, cardiopatie congenite (70% stenosi sopravvalvolare dell'aorta), dimorfismi facciali, profilo cognitivo e comportamentale specifico. Le dismorfie variano con l'età: i bambini presentano radice nasale piatta, punta globosa rivolta verso l'alto, edema periorbitale mentre gli adulti presentano un viso più stretto e allungato con lineamenti grossolani, bocca ampia con labbra carnose. Possono essere presenti disturbi visivi, stenosi dell'arteria renale, ipercalcemia ed anomalie dentali. L'epidermolisi bollosa (EB) distrofica recessiva (OMIM 120120), causata da mutazioni del gene COL7A1 codificante per il collagene tipo VII, è una grave patologia cutanea che si presenta alla nascita con bolle ricorrenti a livello della sublamina densa sotto la membrana basale, esitando in cicatrici mutilanti, sinechie e contratture cutanee e/o tendinee a carico delle mani (a "muffola"), dei piedi e di altre articolazioni. Possono essere presenti stenosi mucosali del tratto gastrointestinale e coinvolgimento corneale.

Caso clinico:

Riportiamo il caso di un paziente, secondogenito di genitori sani non consanguinei, giunto in consulenza all'età di 30 anni con diagnosi clinica di EB. All'esame obiettivo si evidenziavano mani a muffola con pseudosindattilia e assoluta perdita di funzionalità e dismorfie del viso. Veniva inoltre riferita stenosi sopravvalvolare dell'aorta. Era presente disabilità intellettiva e comportamento amichevole. Si eseguiva DHPLC, sequenziamento nucleotidico del gene COL7A1 che evidenziava in eterozigosi composta le mutazioni c.4783-1G>A (introne 49) e c.4039G>T (p.Gly1347Trpp, esone 34), confermando la diagnosi clinica di EB. Si eseguiva inoltre array-CGH che evidenziava una microdelezione nella regione cromosomica 7q11.23, di circa 1,4 Mb associata a sindrome di Williams-Beuren.

Conclusioni:

Il nostro caso, in cui la diagnosi di EP e di sindrome di Williams-Beuren è stata effettuata all'età di 30 anni, sottolinea la necessità di eseguire una valutazione genetica molto più precoce al fine di gestire in un percorso clinico di follow up già in età pediatrica due patologie complesse.

UNA TECNICA AFFIDABILE ED ECONOMICA PER LA FARMACOGENETICA DELLA RISPOSTA AI FARMACI BIOLOGICI PER L'EPATITE C: GENOTIPIZZAZIONE DELLO SNP rs12979860 DI IL28B MEDIANTE PYROSEQUENZIAMENTO

F. Bertolini¹, B. Mognetti¹, G.M. Saracco³, R. Sebastiano², M. De Marchi², D.F. Giachino²

¹*Farmacologia, Dip. Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli Studi di Torino*

²*Genetica Medica, Dip. Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli Studi di Torino*

³*Gastroenterologia, Dip. Oncologia, Università degli Studi di Torino*

Il trattamento con farmaci biologici dell'epatite C può risultare più o meno efficace a seconda del genotipo virale e di alcuni polimorfismi genetici dell'ospite.

Studi GWAS hanno permesso di individuare sul cromosoma 19 (19q13.13) SNP fortemente associati con la risposta al trattamento dell'infezione cronica da HCV. In particolare un aplotipo del gene IL28B contrassegnato dal polimorfismo rs12979860:C>T è impiegato nella predizione della risposta alla terapia con interferone e ribavirina [Jensen DM, Liver international 2012].

Lo SNP rs12979860 si trova a monte del gene IL28B che codifica l'interferone lambda 3 (IFN- λ 3), una citochina capace di inibire la replicazione dell'HCV attraverso il pathway JAK/STAT, e i cui livelli di espressione sono associati in modo significativo con la capacità dell'organismo di eliminare il virus dell'epatite C (SVR: CC 86%, CT 43% e TT 36%) [Thomas DL, Nature 2009].

Analisi bioinformatiche hanno riscontrato un'elevata omologia (superiore al 95%) tra le sequenze di IL28B e del suo paralogo IL28A adiacente. Lo SNP rs12979860 è caratteristico del solo gene IL28B, mentre alla corrispondente posizione il gene IL28A conserva l'allele ancestrale T [Reynolds JM, PLOS One 2012].

L'elevata omologia riscontrata tra i geni IL28B e IL28A rende essenziale mettere a punto l'amplificazione mirata e specifica del gene IL28B per evitare errori nella determinazione del genotipo.

Abbiamo messo a punto un protocollo per analizzare il genotipo dello SNP rs12979860 utilizzando il Pyrosequencing, un metodo di sequenziamento molto rapido ed efficace per determinare il genotipo dello SNP di interesse, unitamente al suo contesto nucleotidico.

Il prodotto dell'amplificazione ottenuta mediante primer specifici disegnati sulle regioni di discordanza tra IL28A e IL28B è sottoposto a sequenziamento "multiplex" che consente l'analisi dello SNP e contemporaneamente di un sito marcatore non polimorfico discordante tra la sequenza di IL28A e IL28B, mediante l'impiego di una seconda sonda di sequenziamento. La specificità del test è stata comprovata sequenziando lo SNP e il marcatore anche sul prodotto di amplificazione specifico per IL28A in un campione di soggetti normali.

PRKCQ GENE IS ASSOCIATED TO LEPROSY SUSCEPTIBILITY IN BRAZILIAN POPULATIONA.C. Pereira¹, W.L. Silva¹, P. Medeiros¹¹*Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, Brazil*

Leprosy is an infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* and affects skin and peripheral nervous system. The global prevalence of the disease at the beginning of 2011 stood at 192,246 cases. Host genetic factors have an important impact on leprosy risk. Genome wide ligation studies point a locus for leprosy susceptibility on chromosome 10. Herein we conducted an association study for susceptibility to leprosy focusing PRKCQ gene. This gene, located at 10p15 region, encodes a protein kinase C theta that is important for T-cell and transcription factors activation. 762 individuals (406 cases and 356 controls) from Mato Grosso state, central Brazil, were investigated. Five SNPs at PRKCQ gene were genotyped by using fluorescence-based TaqMan technology. The statistical software R for Windows, version 2.14.0, was used for analysis. All markers were in Hardy Weinberg equilibrium. Three markers had positive signal of association: rs4750439 at 3'UTR (OR=0.42; p-value=0.009), rs2236380 at 3'UTR (OR=1.63; p-value=0.027) and rs2236379 (OR=1.36; p-value=0.034) which is a non-synonymous variant. No positive data for association was observed analyzing clinical forms of leprosy as outcome. No synergistic effect was detected by performing haplotype analysis encompassing the three markers. The markers rs2453 and rs6469155 were not associated to leprosy risk. These data point PRKCQ as a possible responsible for the chromosome 10 involvement in the leprosy susceptibility in Brazilian population. Replication studies and functional studies are necessary to confirm these results and to better explain the involvement of PRKCQ gene in leprosy susceptibility. (FAPESP Grant 2009/16873-8)

FOLLOW-UP ASSISTENZIALE DI PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIE GENETICHE: RISPARMIO ECONOMICO INDIRECTO CONSEGUENTE AD UNA ORGANIZZAZIONE COORDINATA

S.B. Maitz¹, A. Facciorusso¹, A. Ravelli¹, A. Cereda¹, A. Scatigno¹, C. Fossati¹, A. Selicorni¹

¹*UOS Genetica Pediatrica, Fondazione MBBM, S. Gerardo, Monza*

Il follow-up assistenziale di bambini affetti da patologia genetica complessa rappresenta una sfida qualitativa importante della nuova organizzazione sanitaria. Sebbene si sottolinei unanimemente l'importanza di una presa in carico globale, di un coordinamento dell'assistenza da parte di Centri Esperti, sul piano amministrativo si sta andando verso una sempre maggiore difficoltà al riconoscimento economico di queste prestazioni coordinate. In regioni quali la Lombardia, ad esempio, si è assistito ad una abolizione della formula del Day Hospital a scopo diagnostico limitando l'accesso alle prestazioni diagnostiche di follow-up assistenziale ad un regime unicamente ambulatoriale.

Riportiamo i dati relativi all'attività di coordinamento delle prestazioni ambulatoriali svolte dalla nostra UOS dal gennaio 2011 al giugno 2012. In tale periodo sono state effettuate 867 prestazioni ambulatoriali coordinate dove pazienti affetti da sindromi genetiche complesse (Neurofibromatosi tipo 1, S. di Williams, Cornelia de Lange, Beckwith-Wiedemann, microdelezione 22q11.2, Noonan, Sclerosi tuberosa, Acondroplasia ecc.) hanno eseguito 2804 prestazioni (esami ematici, esami strumentali, visite specialistiche) con una media di 3,2 prestazioni/die a paziente.

Qualora le famiglie avessero dovuto organizzare autonomamente queste prestazioni è ragionevole immaginare che esse sarebbero state eseguite in giorni diversi. Ne deriva che l'organizzazione coordinata delle stesse ha fatto risparmiare una media di 2,2 giorni lavorativi a famiglia pari a 1907 giorni lavorativi se un solo genitore avesse perso la giornata lavorativa e a 3815 giorni se entrambi i genitori avessero perso la giornata di lavoro. Gli stessi pazienti hanno risparmiato in media 1907 giorni di assenza scolastica e/o dal centro riabilitativo.

Senza considerare i risparmi economici aggiuntivi derivanti dal minor numero di spostamenti di queste famiglie appare quindi evidente come il sostegno concreto ad attività di coordinamento delle prestazioni di follow-up assistenziale a pazienti con malattie genetiche complesse comporterebbe un risparmio economico globale per la società civile nel suo insieme enorme, vantaggio che si aggiunge ad una miglior qualità dell'assistenza stessa al paziente complesso.

COMPLESSA ALTERAZIONE GENETICA IN UN PAZIENTE AFFETTO DA SINDROME DI WILLIAMS-BEUREN E DISTROFIA FACIO-SCAPOLO-OMERALE

L. Boccone¹, S. Murru¹

¹*Osp. Regionale per le Microcitemie, ASL8, Cagliari*

La Distrofia facio-scapolo-omerale (FSHD) e la Sindrome di Williams-Beuren (WBS) sono due malattie genetiche rare, correlate rispettivamente alla contrazione della sequenza ripetuta D4Z4 nel braccio lungo del cromosoma 4 e alla delezione di 1.5-1.8 Kb nella regione cromosomica 7q11.23 contenente circa 28 geni.

In questo lavoro descriviamo il singolare caso clinico di un paziente affetto contemporaneamente da WBS, insorta "de novo", e da FSHD, ereditata per via paterna, ma presente in forma molto più grave rispetto a quella degli altri familiari con segni di Distrofia FSH. Infatti, nonostante il difetto molecolare associato alla FSHD sia identico nel paziente ed in tutti i parenti esaminati e consista in una delezione "borderline" dei repeats D4Z4, il fenotipo FSHD dei familiari è compreso in un range da "asintomatico" a "lieve" e contrasta con la precocità di comparsa dei sintomi, la rapidità di evoluzione della malattia e con la gravità clinica del paziente stesso. E' presumibile che la contemporanea aploinsufficienza di geni in 7q11.23, responsabile della WBS, modifichi in maniera consistente il quadro clinico di Distrofia facio-scapolo-omerale per la ridotta produzione di proteine importanti nella regolazione dell'attività contrattile e metabolica dei muscoli scheletrici. In particolare appare rilevante la riduzione dei prodotti proteici del gene dell' Elastina, del gene LIMK1 e del gene GTFRD1.

Inoltre non tutti i geni rimossi per effetto della delezione WBS sono stati finora identificati e associati a specifici ruoli cellulari. E' possibile che nei prossimi anni si arrivi all' identificazione di ulteriori geni implicati nell' organizzazione del complesso sistema del muscolo sia dal punto di vista strutturale che funzionale.

Analisi mutazionale dei geni POMT1, POMT2 e POMGnT1 in una famiglia con DMC da deficit di alfa-distroglicano

F. Castello¹, M. Lo Giudice¹, E. Borgione¹, F. Di Blasi², G. Barbarino¹, G.A. Vitello³, S.A. Musumeci³, C. Scuderi¹

¹*U.O. Malattie Neuromuscolari, Dip. per il Ritardo Mentale, IRCCS Oasi Maria SS, Troina;*

²*U.O. Psicologia, Dip. per il Ritardo Mentale, IRCCS Oasi Maria SS, Troina*

³*U.O. Neurologia, Dip. per il Ritardo Mentale, IRCCS Oasi Maria SS, Troina*

Le distrofie muscolari congenite (DMC) sono malattie clinicamente eterogenee a trasmissione autosomica recessiva. Presentano esordio neonatale o nei primi mesi di vita e si manifestano con ipotonia, debolezza muscolare diffusa, prevalentemente prossimale, variamente associate a contratture muscolari, artrogriposi multipla congenita, lassità articolare, deformità della colonna ed insufficienza respiratoria. Può essere interessato il muscolo cardiaco e, in alcune forme, è coinvolto il sistema nervoso centrale, esprimendosi clinicamente con ritardo mentale (RM) o altre disfunzioni cognitive, spasticità e crisi epilettiche. Si possono anche accompagnare difetti oculari. Negli ultimi anni è emerso un particolare interesse per forme di DMC dovute a difetti della glicosilazione dell'alfa-distroglicano e sono stati identificati sei geni (FKRP, POMT1, POMT2, POMGnT1, FKTN e LARGE) che codificano per noti o presunti enzimi della glicosilazione. In questo studio presentiamo una famiglia con 3 fratelli ed una cugina affetti da distrofia muscolare congenita, RM, difetti di sviluppo della fossa cranica posteriore e neuropatia. L'esame immunoistochimico ha documentato un deficit dell'alfadistroglicano; i pazienti sono stati, quindi, sottoposti all'analisi mutazionale per i geni POMT1, POMT2 e POMGnT1 mediante sequenziamento. Non sono state identificate mutazioni a carico dei geni POMT1 e POMT2. Infine, l'analisi del gene POMGnT1 ci ha permesso di identificare la mutazione 636C>T (D179VfsX23) in associazione con la mutazione 1813C>T (R605C) in tutti i 4 soggetti. I nostri risultati ampliano lo spettro fenotipo-genotipo associato a mutazioni del gene POMGnT1.

APPROCCI TECNOLOGICI MULTIPLI PER L'IDENTIFICAZIONE DI MUTAZIONI E MECCANISMI PATOGENETICI IN PAZIENTI CON SINDROME DI RUBINSTEIN TAYBI

C. Gervasini¹, G. Negri¹, P. Colapietro¹, F. Forzano², M. Silengo³, C. Picinelli⁴, D. Rusconi¹, L. Basso Ricci¹, L. Garavelli⁵, R. Tenconi⁶, P. Finelli⁴, S. Spina¹, L. Larizza¹

¹*Genetica Medica, Dip. di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano, Milano*

²*Genetica Medica Ospedali Galliera, Genova*

³*Dip. di Pediatria, Università di Torino, Torino*

⁴*Lab. di Citogenetica Medica e Genetica Molecolare, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano*

⁵*Dip. Materno infantile, Genetica Clinica Arcispedale S.Maria Nuova Reggio Emilia*

⁶*Unità di Genetica Clinica, Dip. di Pediatria, Università di Padova, Padova*

La sindrome di Rubinstein Taybi (RSTS, OMIM 180849,613684) è una rara patologia malformativa autosomica dominante, caratterizzata da ritardo di crescita, deficit cognitivi, dismorfismi e anomalie scheletriche tra cui di rilevante valenza diagnostica pollici/alluci slargati. Ad oggi sono noti come causative microdelezioni o mutazioni puntiformi del gene CREBBP in 16p13.3 (55% dei casi) o del suo omologo EP300 in 22q13 (3%).

Nel nostro laboratorio sono stati finora raccolti 170 campioni di pazienti con diagnosi clinica RSTS per i quali è stata messa a punto una flow-chart diagnostico-molecolare che oggi prevede lo screening mediante FISH, DHPLC, sequenziamento diretto e MLPA del gene CREBBP e per i negativi a tale analisi anche del gene EP300. L'analisi aCGH viene utilizzata nei casi negativi e per confermare delezioni evidenziate mediante MLPA e/o FISH.

Tale approccio combinato ci ha permesso di identificare mediante DHPLC e sequenziamento 55 mutazioni puntiformi di cui 41 non pubblicate (25 frameshift, 13 missenso, 13 stop e 4 splicing) e mediante FISH 8 delezioni complete (2 non riportate) del gene CREBBP su 134 pazienti analizzati (47%).

L'analisi MLPA di recente introdotta su un gruppo di 26 pazienti ha permesso di identificare un'altra delezione che si estende dall'esone 12 di CREBBP fino al gene adiacente TRAP1. L'analisi dei breakpoints di questa delezione e di un'altra whole gene, non ancora riportata conferma il dato dell'estrema variabilità (per dimensione e breakpoints) delle delezioni della regione CREBBP.

L'analisi avviata su un gruppo iniziale di 12 pazienti CREBBP-negativi del secondo gene responsabile EP300 ha portato all'identificazione di una nuova mutazione puntiforme (c.669dupT, p.Q223Sfs*19), che si aggiunge alle 7 ad oggi in letteratura e alle 9 del database LOVD. Il paziente, come i 7 casi descritti, presenta un fenotipo lieve.

Concludendo, l'utilizzo combinato di diverse metodiche ha permesso di migliorare la detection rate delle mutazioni per geni RSTS noti: l'analisi mediante MLPA di CREBBP e lo screening del gene EP300 si sono rivelati promettenti per l'implementazione della diagnosi molecolare e la definizione di casi doppi negativi da sottoporre a sequenziamento dell'esoma per identificare nuovi geni causativi.

STUDIO DELLE REGIONI DI OMOZIGOSITA' IN 100 PAZIENTI CON SINDROME DI KLINEFELTER

L. Cleva¹, M. Martinelli¹, V. Pecile¹, A. Ferlin², R. Selice², A. Di Mambro², C. Foresta²

¹*Lab. di Genetica Medica, IRCCS materno-infantile "Burlo Garofolo", Trieste, Italia*

²*Università di Padova, Dip. di Medicina Molecolare, Sez. di Patologia Clinica & Centro per la Patologia della Riproduzione Umana, Padova, Italia*

La sindrome di Klinefelter (KS) è caratterizzata sia dal punto somatico sia da quello comportamentale da una marcata variabilità nella severità del fenotipo. È stato proposto che oltre alle interazioni gene-ambiente, nella variabilità fenotipica possano contribuire specifici fattori genetici, inclusi il pattern di inattivazione preferenziale del cromosoma X e l'origine parentale del cromosoma X sovrannumerario. Questo studio ha esaminato l'ipotesi che le runs of homozygosity (ROHs) giochino un ruolo nella variabilità fenotipica. Una ROH definisce un tratto continuo o ininterrotto di una sequenza di DNA senza eterozigosità nello stato diploide. Pertanto tutti gli SNP all'interno dei segmenti di DNA omologo hanno due alleli identici che creano omozigosità. Il genoma umano è caratterizzato da numerose ROH, quindi è chiaro che una percentuale maggiore del genoma in ROH aumenta il rischio individuale di malattie recessive mendeliane o malattie comuni. È stata eseguita la genotipizzazione per cercare ROH estese in 100 KS e 70 controlli. Il DNA è stato analizzato utilizzando la piattaforma Illumina Infinium SNP genotyping (HumanOmniExpress BeadChip contenente quasi 700,000 marcatori genetici) e lo scanner BeadStation. L'identificazione delle ROH è stata effettuata utilizzando GenomeStudio (Illumina) e il software PLINK. Il primo scopo di questo studio era l'uso dell'analisi delle ROH presenti sul cromosoma X per ipotizzare l'origine parentale del cromosoma X sovrannumerario in assenza dei genitori. Abbiamo diviso i casi in 5 gruppi: nessuna ROH, singola, piccola, grande, intera, presupponendo per i primi 3 gruppi l'origine paterna del cromosoma X sovrannumerario, mentre per i rimanenti 2 l'origine materna. Nel 59% dei casi abbiamo ipotizzato l'origine paterna, percentuale in accordo con i dati in letteratura. In secondo luogo, abbiamo diviso i pazienti sulla base della quantità totale e della media della lunghezza delle ROH sugli autosomi e poi abbiamo confrontato i dati ottenuti con quelli di 70 controlli con cariotipo e fenotipo normale, per verificare una qualunque differenza in quantità, lunghezza e distribuzione delle ROH.

NEW CLINICAL AND GENETIC ASPECTS IN A FAMILY WITH MUTATIONS IN POLYMERASE-GAMMA

E. Borgione¹, M. Lo Giudice¹, F. Castello¹, F. Di Blas³, M. Savio³, G. Barbarino¹, G.A. Vitello², M. Elia⁴, S.A. Musumeci², C. Scuderi¹

¹*U.O. Malattie Neuromuscolari, Dip. per il Ritardo Mentale, IRCCS Oasi Maria SS, Troina*

²*U.O. Neurologia, Dip. per il Ritardo Mentale, IRCCS Oasi Maria SS, Troina*

³*U.O. Psicologia, Dip. per il Ritardo Mentale, IRCCS Oasi Maria SS, Troina*

⁴*U.O. Neurologia e Neurofisiopatologia Clinica e strumentale, Dip. per il Ritardo Mentale, IRCCS Oasi Maria SS, Troina*

Mutations in the POLG1 gene, encoding the catalytic subunit of the mtDNA-specific polymerase- γ , compromise the stability of mitochondrial DNA (mtDNA) and are responsible of numerous clinical presentations as PEO (Progressive External Ophthalmoplegia), SANDO (Sensory Ataxic Neuropathy, Dysarthria, and Ophthalmoparesis), SCAE (Spinocerebellar Ataxia with Epilepsy) and Alpers Syndrome. Besides, POLG mutations can cause disease with both dominant and recessive modes of inheritance.

We report a family, in which the index case, a eight years old girl with mental retardation and muscular hypotonia, carried three missense mutations in POLG1 (P116Q, T251I and P587L). The mother, harbouring mutations T251I and P587L in cis, presented neurosensorial hearing loss and manifested heart block; the father with the mutation P116Q, presented diabetes and myopathy; the brother, 14 years old, with myopathy, ptosis, and headache, harboured the same mutations of the index case; finally, the sister, 10 years old, with borderline intellectual functioning, and myopathy, carried the two mutations in cis. T251I and P587L in cis were previously reported as compound heterozygotes with other putative pathogenic mutations, but also as possible dominant, in association with variable phenotypes.

The mutation P116Q was never previously reported and we hypothesize it may be a pathogenic recessive mutation.

Our results expand phenotype-genotype spectrum associated with mutations in the gene POLG.

CARDIOPATIA COMPLESSA DI TIPO TRONCO-CONALE IN UN FETO CON MICRODUPLICAZIONE, A SEGRAGAZIONE FAMILIARE, DI CIRCA 1,5 MB SUL BRACCIO CORTO DI UN CROMOSOMA 16

D. Bizzoco¹, A. Mesoraca¹, I. Gabrielli¹, C. Tamburrino¹, G. Hernandez¹, L. Carpineto¹, M.P. D'aleo¹, F. Libotte¹, G. Di Giacomo¹, A. Cima¹, V. Alesi³, C. Giorlandino²

¹*Servizio di Genetica Medica, Artemisia Medical Center, Roma*

²*Servizio di Diagnosi Prenatale, Artemisia Medical Center, Roma*

³*Lab. di Genetica Medica, Ospedale San Pietro Fatebenefratelli, Roma*

L'ecografia morfologica eseguita ad un feto alla 21 settimana di gestazione ha evidenziato la presenza di una cardiopatia complessa di tipo tronco-conale. Dopo consulenza genetica la coppia decide di effettuare un prelievo di liquido amniotico al fine di escludere eventuali alterazioni genetiche associabili ai riscontri ecografici. L'analisi mediante QFPCR (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction) ha escluso aneuploidie legate ai cromosomi del sesso ed agli autosomi delle coppie 13,18 e 21. L'esame del cariotipo è risultato femminile normale. Al fine di escludere anomalie cromosomiche non evidenziabili con le tecniche di citogenetica tradizionale la coppia, dopo consulenza genetica, decide di procedere con approfondimenti di citogenetica molecolare con tecniche di Array-CGH (array-based Comparative Genomic Hybridization). Il test eseguito con piattaforma CytoChip Oligo arrays Bluegenome-Cambridge UK su tutto il genoma ad una risoluzione di ~150-250 Kb ha evidenziato una microduplicazione di circa 1,5 Mb sul braccio corto di un cromosoma 16, nella regione 16p13.12 # p13.11. Il test è stato eseguito anche sui genitori permettendo di identificare la segregazione paterna del riarrangiamento. I dati attualmente disponibili in letteratura scientifica, ed in particolare la presenza di geni nella regione duplicata, non consentono di escludere che il riarrangiamento, per quanto ereditato da un genitore sano, si possa associare ad un fenotipo clinico. Alla luce dei risultati ottenuti appare purtroppo evidente che, l'individuazione in diagnosi prenatale con tecniche di Array-CGH di microriarrangiamenti a segregazione familiare ereditati da genitori sani, non consente di escludere, in modo assoluto, possibili conseguenze cliniche e fenotipiche soprattutto se la regione interessata contiene geni con funzionalità nota.

REVEALING THE COMPLEXITY OF A MONOGENIC DISEASE: RETT SYNDROME EXOME SEQUENCING

E. Grillo¹, C. Lo Rizzo⁸, L. Bianciardi¹, V. Bizzarri⁸, M. Baldassarri¹, O. Spiga³, S. Furini⁴, C. De Felice⁵, C. Signorini⁶, S. Leoncini⁹, A. Pecorelli⁶, L. Ciccoli⁶, M.A. Mencarelli⁸, J. Hayek⁷, I. Meloni¹, F. Ariani¹, F. Mari⁸, A. Renieri⁸

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

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

³*Biochemistry and Molecular Biology, University of Siena, Siena, Italy*

⁴*Department of Surgery and Bioengineering University of Siena, Siena, Italy*

⁵*Neonatal Intensive Care Unit University Hospital Azienda Ospedaliera Universitaria Senese (AOUS) of Siena, Siena, Italy*

⁶*Department of Pathophysiology, Experimental Medicine and Public Health, University of Siena, Siena, Italy*

⁷*Child Neuropsychiatry Unit, University Hospital, AOUS, Siena, Italy*

⁸*Medical Genetics, University of Siena, Siena, Italy, Genetica Medica, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena, Italy*

⁹*Department of Pathophysiology, Experimental Medicine and Public Health, University of Siena, Siena, Italy, Child Neuropsychiatry Unit, University Hospital, AOUS, Siena, Italy*

Objective. Rett syndrome is a monogenic disorder that may manifest as a large variety of phenotypes ranging from very severe to mild disease. Since there is a weak correlation between the mutation type in the Xq28 disease-gene MECP2/X-inactivation status and phenotypic variability, we used this disease as a model to unveil the complex nature of a monogenic disorder.

Methods. "Whole exome sequencing" was used to analyze the functional portion of the genome of two pairs of sisters with Rett syndrome. Although each pair of sisters had the same MECP2 mutation and balanced X-inactivation, one individual from each pair could not speak or walk, and had a profound intellectual deficit (classical Rett syndrome), while the other individual could speak and walk, and had a moderate intellectual disability (Zappella variant).

Results. In addition to the MECP2 mutation, each patient has a group of variants predicted to impair protein function. The classical Rett girls, but not their milder affected sisters, have an enrichment of variants in gene related to oxidative stress, muscle impairment and intellectual disability and/or autism. On the other hand, a subgroup of variants related to modulation of immune system, exclusive to the Zappella Rett patients are driving toward a milder phenotype.

Interpretation. We demonstrate that genome analysis has the potential to identify genetic modifiers of Rett syndrome, providing insight into disease pathophysiology. Combinations of mutations that affect speaking, walking and intellectual capabilities may represent targets for new therapeutic approaches. Most importantly, we demonstrated that monogenic diseases may be more complex than previously thought.

DELEZIONE INTERSTIZIALE 17q22q23.1 IN DUE PAZIENTI CON SINDROME PLURIMALFORMATIVA ASSOCIATA A GRAVE RITARDO MENTALE

L. Boccone¹, F. Sarra², D. Gasperini², C. Pani¹

¹*U.O. Genetica Clinica e Malattie Rare- Ospedale Regionale delle Microcitemie, ASL 8, Cagliari*

²*Lab. Citogenetica- Ospedale Regionale delle Microcitemie, ASL 8, Cagliari*

Le sindromi plurimalformative sono un gruppo di patologie caratterizzate da un complesso quadro clinico, costituito da alterazioni dismorfiche maggiori o minori, spesso multi organo (con compromissione funzionale degli stessi) frequentemente associate a ritardo mentale e/o alterazioni del comportamento. La complessità e rarità dei casi porta spesso a una mancata diagnosi molecolare e alla mancata classificazione in sindromi già note.

Descriviamo il caso di due pazienti di sesso femminile seguite dal nostro presidio per tanti anni con un quadro clinico molto simile di sindrome plurimalformativa e ritardo mentale. La recente applicazione dell'aCGH ha permesso di stabilire le basi genetiche che sottendono al fenotipo clinico e la possibile correlazione genotipo-fenotipo.

Le due pazienti presentano dismorfismi cranio-facciali peculiari, alterazioni scheletriche a carico della colonna e delle grandi articolazioni, associate a un quadro caratteristico delle mani (dita lunghe e affusolate, unghie sottili, camptodattilia, clinodattilia del V dito, impianto prossimale del I dito) e dei piedi.

Il fenotipo osteo-articolare si associa a un grave ritardo mentale con mancata espressività verbale, epilessia e RMN encefalo nella norma, e a un quadro endocrinologico e genitale costituito da agenesia ovarica e ipogonadismo ipogonadotropo. L'aCGH ha mostrato in entrambi i casi una delezione interstiziale 17q22q23.1 (chr17:51.080.264-55.404.770 e chr17:53.320.073-58.143.332) con un'ampia regione in comune. La comparazione tra i segni e sintomi dei due casi e degli altri descritti in letteratura associata allo studio dei geni presenti nella regione deleta ci permette di ipotizzare che possano giocare un ruolo rilevante i geni NOG, TRIM 25 e MSI2 nell'espressione fenotipica: le mutazioni descritte a carico del gene NOG sono numerose e responsabili di diversi quadri sindromici osteo-articolari; TRIM25 si è scoperto svolga un'azione sul versante ormonale, upregolato dal livello di estrogeni; il gene MSI2 è stato dimostrato essere implicato nello sviluppo del sistema nervoso centrale in embrioni di topo.

IDENTIFICATION OF NOVEL EXON SPLICE ENHANCERS (ESEs) IN THE GROWTH HORMONE (GH) GENE MUTATED IN ISOLATED GH DEFICIENCY (IGHD) PATIENTS

D. Babu¹, I. Fusco¹, S. Mellone¹, A. Petri¹, F. Prodam¹, S. Bellone¹, G. Bona¹, m. Giordano¹

¹*Dipartimento di Scienze della Salute, Università del Piemonte Orientale, Novara*

Autosomal dominant GH deficiency is mainly caused by mutations influencing the correct mRNA splicing, occurring at the IVS3 donor splice site and within an ESE located in the first 7bp of exon 3 (ESE1). These mutations result in an increased level in the production of the exon 3-skipped isoform encoding the dominant negative 17.5 kDa isoform and variable level of the wild type 22 kDa isoform. Another ESE (ESE2) was identified from nt 19 to nt 32.

We identified three IGHD patients carrying variations in Exon 3. One carried the non-synonymous variation E3+75G>A (Glu82Asp), the second carried two novel variations, E3+90P>P (Pro87Pro) and E3+101E>V (Glu91Val) and the third patient carried two synonymous variations at E3+90P>P (Pro87Pro) and E3+84P>P (Pro85Pro). These mutations were absent in a panel of 400 normal chromosomes. All the mutations were originated by gene conversion from one of the GH cluster homologous genes. None of them was included in the already identified ESEs. The ESE Finder software suggested the presence of two other ESEs in exon 3 from nt 83 to 89 (ESE3) and nt 98 to 104 (ESE4). The mutations at position 84 and 101 were predicted to abolish ESE3 and ESE4, respectively.

We performed in vitro splicing analysis with constructs bearing the entire wild type GH (GHwt) gene, and the GH gene carrying the mutations identified in the three patients (GH82, GH85, GH87, GH91). The mRNAs from transfected GH4C1 rat pituitary cells showed the wild type 22 KDa isoform in all the constructs. GHwt and GH82 showed the full length and the exon3 skipped bands of similar intensity (the 17.5 KDa was visible as a faint band). Conversely, the GH85 and GH91 transcripts produced significantly higher level of the 17.5 KDa isoform as compared to the GHwt. The 17.5kDa isoform was completely absent in the GH87 mRNA.

In conclusion we identified two novel ESEs in the GH exon3 through the detection of mutations in IGHD patients. Two of these mutations E3+84P>P (GH85) and E3+101E>V (GH91) cause an increased level of the 17.5 KDa protein. Further analysis are necessary to better understand the role of these mutations.

FENOTIPO FETALE DELLA SINDROME DI ROBINOW

C. Barone¹, G. Bartoloni², L. Indaco³, E. Pappalardo⁴, A. Cataliotti Del Grano³, G. Conoscenti⁵, C. Ettore³, S. Cosentino², B. Barrano³, G. Ettore⁴, S. Bianca³

¹*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania - Scuola di Specializzazione in Genetica Medica Università degli Studi Messina - Catania*

²*Patologia Diagnostica Fetale Malformativa e Perinatale, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania*

³*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania*

⁴*UOC Ostetricia e Ginecologia Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania*

⁵*UOC Ostetricia e Ginecologia, AO Cannizzaro, Catania*

Introduzione:

La sindrome di Robinow (SR) è caratterizzata da difetto di sviluppo degli arti, del cranio, dismorfie e anomalie genitali. Sono state descritte due forme: una forma autosomica dominante da mutazioni del gene WNT5A e una autosomica recessiva (SRR), meno comune, da mutazioni del gene ROR2. Nella SSR le anomalie scheletriche e gli altri segni clinici sono generalmente molto più gravi rispetto a quelli osservati nella forma dominante, infatti tutti i pazienti affetti dalla SRR presentano difetti della segmentazione vertebrale, che causano scoliosi e deformità toraciche. La fusione delle coste è considerata un segno caratteristico della forma recessiva. La diagnosi si basa sul quadro clinico e sul caratteristico aspetto "fetale" del viso.

Caso clinico:

Riportiamo un caso giunto in consulenza prenatale alla 20a settimana gestazionale per il riscontro ecografico di anomalie congenite multiple. L'albero genealogico mostrava la presenza di una prima figlia della coppia affetta da SR senza evidenza di mutazioni in ROR2 ed in WNT5A. La valutazione della translucenza nucale eseguita alla 12a settimana gestazionale aveva evidenziato valori di 4,4mm per cui era stata eseguita diagnosi prenatale invasiva con cariotipo fetale 46,XY. La valutazione ecografica evidenziava la presenza di bozze frontali prominenti, cheilognatopalatoschisi, ipertelorismo (distanza interoculare esterna di 39mm e interna di 19mm), ventricolomegalia bilaterale borderline (9mm), genitali ambigui, coste corte, lunghezza arti -2 settimane rispetto all'epoca di accrescimento fetale. La coppia decideva di eseguire IVG. Il riscontro autoptico fetale confermava le dismorfie e le anomalie congenite evidenziate ecograficamente con lunghezza del feto 27 cm e span arti superiori 24 cm, labiopalatoschisi bilaterale ed ipospadia severa.

Conclusioni:

La diagnosi prenatale di SR è stata raramente riportata in letteratura; la storia anamnestica della coppia e la valutazione fenotipica del feto ci hanno permesso di confermare la diagnosi di SRR anche se l'assenza di mutazioni dei geni ROR2 e WNT5A nella prima figlia affetta della coppia pone la necessità di proseguire l'iter diagnostico per la valutazione di altri geni coinvolti nella patogenesi di tale condizione.

MESSA A PUNTO E AUTOMATIZZAZIONE DI UN PROTOCOLLO DIAGNOSTICO PER PAZIENTI AFFETTI DA OSTEOGENESI IMPERFETTA MEDIANTE HIGH RESOLUTION MELTING E PCR QUANTITATIVA

M. Maioli¹, V.F. Gentile¹, M. Zuntini¹, A. Parra¹, L. Battistelli¹, M. Pandolfi¹, L. Sangiorgi¹

¹*S.S.D. di Genetica Medica e malattie rare ortopediche, Ist. Ort. Rizzoli, Bologna*

L'Osteogenesi Imperfetta (OI) è una malattia del tessuto connettivo ereditata prevalentemente con modalità autosomica dominante in seguito a mutazioni puntiformi o grandi riarrangiamenti nei geni COL1A1 e COL1A2, che codificano per le catene # del collagene I.

Ad oggi sono state identificate più di 1100 mutazioni patologiche distribuite lungo tutti gli esoni di COL1A1/A2.

Sebbene il sequenziamento diretto abbia fino ad ora rappresentato il metodo standard per l'identificazione di mutazioni patologiche, l'utilizzo di tale metodica risulta essere estremamente dispendioso sia dal punto di vista economico che in termini di tempo. Inoltre, la presenza di grandi riarrangiamenti correlati all'1-2% dei casi di OI, rende necessaria un'ulteriore fase di screening per i pazienti che risultano negativi all'analisi per mutazioni puntiformi.

Scopo dello studio è stato quello di ottimizzare, validare e automatizzare un nuovo protocollo diagnostico che combina la PCR quantitativa con l'analisi ad alta risoluzione della curva di melting (qPCR-HRM), permettendo la riduzione dei tempi diagnostici e la contemporanea identificazione di delezioni/duplicazioni multi-esoniche e mutazioni puntiformi.

Lo screening molecolare è stato effettuato su 50 pazienti clinicamente affetti da OI. I risultati ottenuti dall'analisi qPCR-HRM, seguita da sequenziamento diretto dei profili anomali, sono stati validati mediante DHPLC e MLPA, dimostrando come vi sia completa analogia dei risultati.

La valutazione economica basata sul confronto tra DHPLC-MLPA e qPCR-HRM ha evidenziato, per il nuovo metodo, una riduzione complessiva dei costi del 21%.

L'automatizzazione del protocollo diagnostico mediante lo strumento Biomek® NX Span-8 Laboratory Automation Workstation (Beckman Coulter) e l'utilizzo di specifici adattatori ha permesso un'ulteriore riduzione nella tempistica di preparazione della reazione.

Concludendo, lo studio effettuato ha dimostrato come lo screening molecolare messo a punto, basato su Real Time PCR e HRM, risulti essere un metodo rapido, efficace ed economicamente vantaggioso per la ricerca di mutazioni a carico di COL1A1 e COL1A2.

I risultati presentati in questo studio sono riportati nell'articolo Valentina Gentile et al., 2012, Human Mutation.

SINDROME DA MICRODELEZIONE 3q29: DESCRIZIONE DI UNA PAZIENTE CON DELEZIONE PIÙ AMPIA DI QUELLA RICORRENTE

C. Ceccarini¹, C. Cesarano², N. Bukvic², A. D'Aprile², M. Bruno², M.G. Gallicchio², M.A. Carboni², G. Cotoia², M. Mastrodonato³, R. Antonetti²

¹*Sez. di Citogenetica- II Lab.– Dip. di Patologia Clinica, OO. RR. di Foggia; Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Univ. degli Studi di Foggia*

²*Sez. di Citogenetica- II Lab.– Dip. di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliero-Universitaria OO. RR. di Foggia*

³*Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università degli Studi di Foggia*

Presentiamo il caso di una bambina di anni 5 giunta all'osservazione per immaturità affettiva mostrando difficoltà d'interazione con i pari in ambito scolastico. All'esame psichiatrico risulta possedere un linguaggio adeguato e competenze cognitive apparentemente nella norma. La probanda mostra lievi dismorfismi facciali, cute e mucose pallide, occhi cerchiati, decalcificazione dentale, tardivo inizio di utilizzo della parola, stereotipie, ritardo di crescita (età ossea di 2,6 anni), costipazione ed encopresi intermittente con sangue occulto fecale.

L'analisi cromosomica in bandeggio QFQ (400-550 bande) ha mostrato un cariotipo 46,XX. L'array-CGH eseguita su piattaforma oligo 2x105K (TechnoGenetics) con risoluzione di ~75Kb ha evidenziato una delezione della regione subtelomerica del braccio lungo di un cromosoma 3 di #2Mb confermata con analisi FISH (mix 3, TotalVision Vysis). La stessa analisi eseguita sui genitori ha mostrato che si tratta di una delezione de novo.

Tale delezione è ormai conosciuta come sindrome da microdelezione 3q29 (MIM 609425) caratterizzata da un fenotipo variabile che include ritardo mentale e dello sviluppo da lievi a moderati, microcefalia e lievi dimorfismi facciali; è spesso riportato un ritardo del linguaggio mentre in alcuni pazienti sono descritti tratti autistici. Inoltre, la delezione 3q29 è stata associata ad un aumento del rischio di Schizofrenia. La delezione ricorrente è di circa 1.6 Mb e comprende i geni PAK2 e DLG1, considerati geni candidati per il ritardo mentale e FBXO45, ipotizzato avere un ruolo nell'autismo e nei disordini psichiatrici.

La caratterizzazione fine mediante CGH-array del nostro caso ha evidenziato una delezione più ampia rispetto a quella di tutti i pazienti fino ad ora descritti tranne uno e comprende anche il gene TFRC del recettore della transferrina che svolge un importante ruolo nella biogenesi mitocondriale.

In conclusione, dal confronto con i casi riportati in letteratura, emerge un'ampia variabilità fenotipica della sindrome da microdelezione 3q29 in cui non appare esserci una chiara correlazione genotipo-fenotipo, avvalorata dalle lievi manifestazioni nella nostra paziente portatrice di una delezione più ampia di quella ricorrente.

ANALISI DI DELEZIONI/DUPLICAZIONI A CARICO DELLE REGIONI AZF MEDIANTE MLPA

N. Guercini², A. Calò², P. Celli², B. Mancini², N. Marcato², S. Zanchetti², D. Zarantonello², A. Zilio², A. Montaldi², A. Alghisi¹

¹*U.O.C. di Immunoematologia Trasfusione e Genetica Umana, ULSS N.6 "VICENZA"*

²*U.O.S. di Genetica e Biologia molecolare, ULSS N.6 "VICENZA"*

La presenza di delezioni parziali nelle regioni AZF del cromosoma Y è stata recentemente associata ad alcuni disturbi della spermatogenesi. Tale associazione è tuttavia ancora controversa e richiede la valutazione di un maggior numero di osservazioni.

SCOPO DELLO STUDIO Verifica di appropriatezza della tecnica MLPA nello screening di primo livello per il rilevamento di delezioni parziali di AZF.

MATERIALI E METODI L'analisi MLPA è stata realizzata utilizzando la miscela di sonde "P360 Y-Chromosome Microdeletions" (MRC Holland) in un campione di 49 maschi infertili con cariotipo normale, assenza delle convenzionali microdelezioni del cromosoma Y, assenza di mutazioni CFTR associate a infertilità e in un campione di controllo di 51 maschi con accertata fertilità.

RISULTATI Nel campione di maschi infertili sono stati rilevati: delezione parziale di tipo b1/b3 (1 caso), duplicazioni in AZFc (3 casi), duplicazione in AZFb (1 caso) e duplicazioni adiacenti al locus VCY1b in AZFa (3 casi).

Nel campione di controllo sono stati osservati: delezione parziale di tipo gr/gr (1 caso), duplicazione in AZFc (2 casi), compresenza di duplicazione/delezione contigue in AZFc (1 caso) e duplicazione adiacente al locus VCY1b in AZFa (1 caso).

CONCLUSIONI L'unica delezione riscontrata solo nel campione di maschi infertili è del. parziale b1/b3, osservata in un caso di oligoastenoteratozoospermia il cui significato clinico non è tuttavia certo. La maggior parte dei dosaggi anomali è costituita da duplicazioni con analoga estensione sia nel campione di maschi infertili che in quello di controllo e quindi con verosimile significato di polimorfismo.

Il dosaggio mediante MLPA si è dimostrato un sistema semplice, rapido ed accurato nell'esame delle regioni AZF e può essere proposto come metodo di elezione per la raccolta di un maggior numero di dati, presupposto per la comprensione del ruolo di tali regioni nella biologia e nella clinica della infertilità maschile.

PAROLE CHIAVE: delezioni AZF, infertilità maschile, MLPA

Sindrome del meningocele (multiplo) laterale: una rara patologia ereditaria del tessuto connettivo distinta dalle sindromi di Loews-Dietz

S. Morlino¹, M. Castori¹, M. Ritelli², F.C. Radio¹, M. Valiante¹, N. Chiarelli², M. Colombi², A. Morrone³, P. Grammatico¹

¹*U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, Dip. di Medicina Molecolare, Sapienza Università di Roma, A.O. San Camillo-Forlanini, Roma*

²*Sez. di Biologia e Genetica, Dip. di Scienze Biomediche e Biotecnologie, Università di Brescia*

³*Direzione Generale, A.O. San Camillo-Forlanini, Roma*

La sindrome del meningocele laterale (SML) è una connettivopatia ereditaria rara, caratterizzata da protrusioni multiple dei rivestimenti tecali attraverso i forami intervertebrali (meningoceli "laterali", cisti di Tarlov, ectasie della dura), ipermobilità articolare generalizzata e altre anomalie facciali e scheletriche. Tale condizione è stata descritta per la prima volta nel 1977 in una ragazza di 14 anni. Da allora, sono stati riportati altri 8 pazienti, tra cui 6 sporadici e un caso familiare con madre e figlia affette, di età compresa tra i 2 ed i 33 anni. Lo spettro clinico e la storia naturale della SML sono al momento poco definite, perché non sono conosciute le sue basi biologiche e perché successivamente sono state individuate altre connettivopatie ereditarie a gene noto, che mostrano con essa una significativa sovrapposizione clinica. Descriviamo una donna di 56 anni, giunta alla nostra osservazione mediante il supporto dello Sportello Malattie Rare - servizio di recente istituzione presso la U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica dell'A.O. San Camillo Forlanini (Roma). Il suo quadro clinico risulta caratterizzato da: sindrome dolorosa cronica generalizzata associata ad una significativa disabilità motoria (deambulazione autonoma difficoltosa, necessità di supporto nelle principali attività quotidiane), ripetuti interventi chirurgici per asportazione di numerose ectasie durali e/o cisti di Tarlov a livello spinale, molteplici recidive delle stesse lesioni lungo tutto il rachide, ipermobilità e instabilità articolare generalizzate anamnestiche, apparente ipertelorismo, rime palpebrali rivolte verso il basso e l'esterno, schisi sottomucosa del palato molle e orecchie retrorotote. In considerazione dell'affinità con le sindromi di Loews-Dietz, sono stati richiesti lo studio dell'albero vascolare e lo screening di TGFBR1-2 e SMAD3, che sono risultati negativi. La paziente è, ad oggi, il soggetto affetto da SML in età più avanzata descritto. La sua storia clinica offre numerosi elementi per contribuire ad una migliore definizione della storia naturale della SML, che è, quindi, da considerare in diagnosi differenziale quando si sospetti una connettivopatia ereditaria associata al pathway del TGFbeta.

Mutazioni in GATA5 non sono causa frequente di valvola aortica bicuspidale nell'uomo

E. Sangiorgi¹, F. La Carpia¹, M. Bianco², P. Zeppilli², F. Gurrieri¹, G. Neri¹

¹*Istituto di Genetica Medica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

²*Istituto di Medicina dello Sport, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma*

La valvola aorta bicuspidale (BAV) rappresenta la malformazione cardiaca congenita più comune, presente in circa 1-2% della popolazione mondiale.

Nella maggior parte dei casi il difetto si presenta non associato ad altre malformazioni ed in forma sporadica. Nelle forme familiari la modalità di trasmissione più comune è autosomica dominante con difetto di penetranza, questo suggerisce che sia nelle forme familiari che in quelle sporadiche la causa molecolare è da ricercare in una mutazione eterozigote de novo o ereditata. Le uniche mutazioni riscontrate finora in due famiglie con BAV, coinvolgono il gene NOTCH1, che riveste un ruolo fondamentale durante l'organogenesi. Tuttavia la maggior parte dei casi di BAV, sia sporadici che familiari, non presentano mutazioni di NOTCH1 e non hanno quindi una causa molecolare certa. Attraverso studi di linkage in casi familiari sono stati identificati almeno tre diversi loci sul 18q, 5q e 13q, ma nessun gene è stato trovato mutato in corrispondenza di questi loci. Esistono modelli murini in cui è presente una malformazione che può essere considerata l'equivalente della BAV nell'uomo. I geni e i pathways coinvolti nei difetti murini (eNOs, Alk2, Nkx2-5) sono stati investigati sia in pazienti sporadici che familiari con BAV, ma non sono state identificate mutazioni patogenetiche. Recentemente è stato pubblicato un modello murino in cui è stato inattivato per gene-targeting il gene Gata5, tali topi presentano un'aorta bicuspidale e nessun altro difetto cardiaco associato.

Abbiamo deciso di analizzare, in collaborazione con l'Istituto di Medicina dello Sport dell'Università Cattolica, in una coorte di pazienti con aorta bicuspidale, il gene GATA5 alla ricerca di mutazioni responsabili del difetto.

Abbiamo raccolto in un anno 8 pazienti con BAV isolato, 2 casi familiari e 6 pazienti sporadici, in questi pazienti il gene GATA5 è stato completamente sequenziato in tutte le sequenze codificanti e nelle adiacenti regioni regolatrici. Sono state identificate diversi varianti polimorfiche già presenti nel 1000genome database, ma nessuna chiara mutazione patogenetica.

Questo studio conferma quindi l'eterogeneità genetica di questo difetto e sottolinea la presenza di diverse basi molecolari della BAV nel topo e nell'uomo.

MUTAZIONI IN ADAMTSL2 CAUSANO UN DIFETTO DI SORTING DELLA PROTEINA E DISORGANIZZAZIONE DELLE MICROFIBRILLE

P. Piccolo¹, V. Sabatino¹, P. Campeau², P. Mithbaokar¹, E. Polishchuck¹, R. Polishchuck¹, J. Hicks³, V. Fano⁴, M. Filocamo⁵, G. Andria⁶, C.A. Bacino², N. Brunetti-Pierri⁶

¹*Telethon Institute of Genetics and Medicine, Napoli, Italia*

²*Dept. of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA*

³*Dept. of Pathology, Baylor College of Medicine, Houston, TX*

⁴*Dept. Growth and Development Garrahan Pediatrics Hospital, Buenos Aires, Argentina*

⁵*Centro di Diagnostica Genetica e Biochimica delle Malattie Metaboliche, Ist. G. Gaslini, Genova, Italy*

⁶*Dip. di Pediatria, Università di Napoli "Federico II", Napoli, Italia*

La displasia geleofisica (GD) è una malattia caratterizzata da bassa statura, arti e dita corte e da una caratteristica facies "felice". È inoltre frequentemente associata a rigidità articolare, ispessimento cutaneo e patologia valvolare cardiaca. La presenza di inclusioni intracitoplasmatiche visibili al microscopio elettronico (ME) rappresenta un altro reperto frequente. Recentemente è stato riconosciuto che il disordine è geneticamente eterogeneo ed è causato da alterazione della via del TGF- β : mutazioni nel gene ADAMTSL2 e nella porzione del gene FBN1 (esoni 41-42) codificante il TGF- β -binding protein-like domain 5 (TB5) sono state identificate come causative di una forma recessiva e una dominante della malattia, rispettivamente.

In questo studio abbiamo analizzato una coorte di venti pazienti con diagnosi clinica di GD. All'osservazione al ME i fibroblasti cutanei di otto pazienti su nove analizzati mostravano inclusioni intracitoplasmatiche. Il sequenziamento di ADAMTSL2 ha portato all'identificazione di sei mutazioni missenso, cinque delle quali descritte per la prima volta, in quattro pazienti; quattro pazienti presentavano mutazioni missenso negli esoni 41 e 42 del gene FBN1; nei restanti dodici non sono state identificate mutazioni in ADAMTSL2 e FBN1. Studi funzionali in cellule HEK293 hanno mostrato che tutte le mutazioni di ADAMTSL2 identificate in questo studio riducono la secrezione della proteina e aumentano l'attivazione del TGF- β , dimostrandone il ruolo patogenetico. A differenza della proteina wild-type, ADAMTSL2 mutata non localizza a livello del Golgi e non si accumula nelle inclusioni riscontrate mediante ME. Come già descritto nei pazienti GD mutanti in FBN1, abbiamo osservato un'alterata deposizione di microfibrille di FBN1 anche nei fibroblasti mutanti per ADAMTSL2, i quali mostrano fibre extracellulari ridotte, più corte e disorganizzate rispetto ai wild-type. Questi risultati suggeriscono che ADAMTSL2 sia coinvolta nel corretto assemblaggio delle microfibrille. Una migliore comprensione della patogenesi di questa malattia del tessuto connettivo potrà aumentare la conoscenza sui meccanismi di formazione della matrice extracellulare e aprire nuove possibilità terapeutiche per la GD e per i disordini ad essa associati.

ANALISI MOLECOLARE DI 22 SOGGETTI AFFETTI DA DIABETE INSIPIDO NEFROGENICO

F. Vitiello¹, L. De Falco¹, R. Russo¹, F. Di Noce¹, C. La Scola², G. Montini², A. Iolascon¹

¹Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università "Federico II", Napoli. - CEINGE - Biotecnologie Avanzate, Napoli.

²SS di Nefrologia e dialisi pediatrica, Osp. Sant'orsola Bologna

Il Diabete Insipido Nefrogenico (DIN) è un disordine raro caratterizzato da un'insensibilità delle strutture renali all'azione dell'ADH. La patologia si manifesta precocemente con poliuria e disidratazione, polidipsia e ipostenuria. Nel 90% dei casi si tratta di una patologia a trasmissione X-linked recessiva, determinata da una mutazione del gene AVPR2, localizzato in Xq28. Nel restante 10% circa, la trasmissione è autosomica recessiva o dominante con mutazioni del gene AQP2, localizzato sul cromosoma 12q12-q13.

Dal 2005 ad oggi abbiamo reclutato 22 pazienti (15 maschi e 7 femmine, appartenenti a 18 nuclei familiari). 19 sono stati analizzati per la ricerca di mutazioni nel gene AVPR2, mentre 12 per mutazioni nel gene AQP2. Dei 19 soggetti analizzati per il gene AVPR2, 16 presentano mutazioni (12 emizigoti e 4 eterozigoti) mentre 3 soggetti sono risultati wildtype. Abbiamo trovato in totale 15 mutazioni, di cui 3 sono piccole delezioni (c.168 del C; c.784 del C; c.113delCT), 1 delezione grande (c.25+355_oARHGAP4:2650-577del), 1 nonsense (Q119X) e 10 missense (A84D; R137H; S167L; F178C; A179P; R181C; C192R; R202C; P322H; G352D).

Di queste, 5 sono nuove mutazioni: c.25+355_oARHGAP4: 2650-577 del; c.168 del C; c.784 del C; c.798G>C; F178C; A179P. Le delezioni causano una prematura interruzione della traduzione della proteina, mentre le missense sono state predette essere patologiche mediante analisi in silico.

Da notare che in tutti i casi le mutazioni sono state trasmesse da un familiare, tranne una, F178C, che risulta de novo.

Tra i 4 soggetti eterozigoti 2 pazienti, anche se femmine ed eterozigoti, presentano comunque una sintomatologia tipica. In tali casi si ipotizza un'inattivazione non random del cromosoma X.

Per quanto riguarda lo screening del gene AQP2, sono stati analizzati 12 pazienti e solo uno risulta mutato in omozigosi, R85X, con entrambi i genitori portatori.

In conclusione, 17 soggetti presentano una mutazione mentre 5 soggetti non presentano alcuna mutazione, pertanto è ipotizzabile che ci siano ancora altri geni oltre i due già noti che possano essere causativi di DIN.

TERAPIA GENICA DIRETTA AL FEGATO CON VETTORI AAV PER L'IPEROSSALURIA PRIMARIA DI TIPO I

R. Borzone¹, R. Castello¹, A. Auricchio¹, N. Brunetti-Pierri¹

¹*Telethon Institute of Genetics and Medicine, Naples, Italy*

L'iperossaluria primaria di tipo I (PH1) è una malattia congenita del metabolismo, a trasmissione autosomica recessiva, causata dal deficit di alanina:gliossilato ammino transferasi (AGXT), un enzima perossisomiale, espresso specificamente nel fegato. Il deficit di AGXT comporta un difetto nella detossificazione del gliossilato ed eccessiva produzione di ossalato che forma cristalli insolubili di ossalato di calcio che si accumulano in numerosi tessuti. L'organo più precocemente colpito è il rene, in cui la precipitazione dei calcoli di ossalato di calcio conduce ad insufficienza renale cronica, di solito prima dei 20 anni. Attualmente l'unica terapia curativa disponibile per la PH1 è il trapianto combinato di fegato e reni, che ha un elevato tasso di mortalità e morbidità. La terapia genica basata sui vettori adeno-associati (AAV) potrebbe quindi fornire un'opportunità di trattamento più sicura. I vettori AAV del sierotipo 8 sono particolarmente interessanti per la terapia genica fegato-diretta perché garantiscono un elevato e stabile livello di espressione del transgene e sono stati già usati con successo nell'uomo. L'obiettivo di questo lavoro è quello di generare dati preclinici che supportino l'efficacia di questo approccio di terapia genica. Abbiamo generato vettori AAV del sierotipo 8 contenenti una cassetta di espressione fegato-specifica codificante sia la forma umana che murina del gene AGXT. I vettori AAV sono stati iniettati per via sistemica nei topi PH1 alle dosi di 1×10^{11} , 1×10^{12} e 1×10^{13} copie di genoma (gc)/kg ($n = 5$ per gruppo). Tra le dosi testate, la dose di 1×10^{13} gc/kg ha portato a completa correzione biochimica del fenotipo che si è mantenuta a lungo termine per almeno 6 mesi. Abbiamo inoltre riscontrato una simile efficacia dei vettori AAV codificanti sia la forma umana che murina del gene AGXT. In conclusione, gli studi effettuati finora supportano l'efficacia della terapia genica fegato-diretta con vettori AAV del sierotipo 8 per il trattamento a lungo termine della PH1.

Complementary molecular approaches reveal heterogeneous CDH1 germline defects in Italian patients with Hereditary Diffuse Gastric Cancer (HDGC) syndrome

V. Molinaro¹, V. Pensotti², M. Marabelli¹, I. Feroce³, M. Barile³, S. Pozzi³, L. Fini⁴, L. Laghi⁴, D. Serrano³, L. Bernard², B. Bonanni³, G.N. Ranzani¹

¹*Department of Biology and Biotechnology, University of Pavia*

²*Cogentech, IFOM-IEO Campus, Milan*

³*European Institute of Oncology (IEO), Milan*

⁴*Humanitas Clinical Institute (ICH), Rozzano -MI*

Loss of expression and function or incorrect localization of E-cadherin is a distinctive trait of both Diffuse Gastric Cancer (DGC) and Lobular Breast Cancer (LBC), and contribute to the unique histopathologic features shared by these two tumor types. Germline inactivating mutations of E-cadherin gene (CDH1) are associated with Hereditary Diffuse Gastric Cancer (HDGC) syndrome, a rare autosomal dominant disorder, characterized by a strong predisposition to DGC and LBC.

Aim of this study was to select and genetically characterize Italian families with HDGC. To increase the mutation detection rate, we deeply investigated CDH1 by using different approaches including: DNA sequencing, gene deletion test (by MLPA), gene expression assessment (by SNUPE, RT-PCR, Real-time RT-PCR), and in silico analysis. DNA and RNA were extracted from blood samples of 32 unrelated probands from HDGC families selected according to international guidelines. Genomic DNA sequencing revealed 2 well-known pathogenic mutations (R63X; 1901 C>T splicing mutation) and 8 variants (3 missense and 5 intronic) of uncertain significance (VUS). According to bioinformatics tools, one missense variant (L772Q) was predicted to be damaging; by RT-PCR, we demonstrated that one intronic variant (IVS5-1 G>C) produced abnormal RNA transcripts interfering with the normal splicing process and causing exon skipping. The IVS5-1 G>C intronic variant was present in two first-degree relatives of the carrier proband, with all mutation carriers sharing the same RNA abnormal pattern. In patients who tested negative by DNA sequencing, we found one case of gene deletion encompassing exons 7 and 8 (by MLPA), and one case of allelic imbalance of CDH1 gene expression (by SNUPE). Due to the high interindividual variability we observed both in patients and controls, Real-time RT-PCR does not appear an appropriate method to search for constitutive expression defects. In conclusion, by complementary approaches we identified 12 germline alterations, 5 of which with clear pathogenic significance (5/32: 16%). Therefore, a number of HDGC families still remains genetically unexplained, suggesting that other genes are likely responsible for cancer susceptibility.

DESCRIZIONE DI UN CASO FAMILIARE DI SINDROME 4q- : CARATTERIZZAZIONE DEL FENOTIPO E DELLA ZONA DI DELEZIONE

I. Caliendo¹, M. Ingenito¹, M. Ergoli¹, C. Langella¹, R. Tortora¹, A. Tafuri¹, P. Magini³, M. Seri³, C. Di Stefano², A. Barbarulo², M. Zollino⁴, G. Neri⁴

¹*U.O. Genetica Molecolare e Citogenetica ASL Salerno*

²*U.O. Terapia Intensiva Neonatale Ospedale Umberto 1 Nocera Inferiore*

³*U.O. Genetica Medica Policlinico S.Orsola-Malpighi*

⁴*Istituto di Genetica Medica Università Cattolica del S. Cuore Roma*

La sindrome 4q- è determinata da delezioni, terminali o interstiziali del braccio lungo del cromosoma 4. I casi descritti con del 4q sono molteplici e con differenti caratteristiche fenotipiche. Riportiamo il caso di un ragazzo di 13 anni con del 4q. Nel probando, al momento della consulenza genetica si sono riscontrati una facies peculiare con rime palpebrali lunghe e sopracciglio ad arco, orecchie grandi e discoste dal capo, fossetta preauricolare a sinistra e ritardo nell'acquisizione delle tappe psicomotorie e del linguaggio. L'analisi citogenetica, eseguita su sangue periferico secondo i protocolli standard, ha evidenziato una delezione interstiziale del braccio lungo del cromosoma 4, con cariotipo 46,XY,del(4)(q34.1;q35.2). Lo stesso cariotipo è stato riscontrato nel padre e in un fratello più grande; il padre presenta lo stesso fenotipo del probando, il fratello ha anche problemi visivi e sordità. Nella madre e nelle due sorelle ed in un fratello più piccolo, tutti con fenotipo normale non è stata riscontrata nessuna alterazione citogenetica. Per definire i punti di rottura della delezione interstiziale del probando è stata eseguita l'analisi molecolare Array-CGH su DNA da leucociti di sangue periferico. Per l'indagine molecolare sono state utilizzate 906.600 sonde per i Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) e 945.826 sonde per i Copy Number Variants (CNVs). I risultati hanno evidenziato una delezione interstiziale sul cromosoma 4 di circa 15 Mb. Nella regione deleta non sono stati identificati geni che possano essere coinvolti nel ritardo mentale e di crescita, costantemente osservati nella sindrome 4q-. Abbiamo evidenza di un caso clinico in cui è stata riscontrata una delezione di circa 9Mb localizzata all'interno del nostro intervallo. È interessante notare che questo secondo paziente presenta fenotipo normale (dato non pubblicato). Questi risultati consentono di restringere la delezione 4q responsabile del quadro sindromico descritto ad una regione di circa 6Mb, il cui contenuto genico dovrà essere più approfonditamente indagato.

MIX VINCENTE DI CONSULENZA GENETICA E GIUSTA DOSE DI CURIOSITÀ DURANTE LA SORPRENDENTE CARATTERIZZAZIONE DEL PRIMO CASO DE NOVO DI UN SOGGETTO ADULTO CON DERIVATIVO DEL CROMOSOMA Y

N. Bukvic¹, C. Cesarano¹, C. Cecarini², A. D'Aprile¹, M. Bruno¹, M.R. Lipsi¹, M.G. Galicchio¹, M.A. Carboni¹, L. Valente¹, G. Cotoia¹, M. Mastrodonardo³, R. Antonetti¹

¹OORR Foggia, Azienda Ospedaliero – Universitaria, Dipartimento di Patologia Clinica - Il Laboratorio, Sezione di Citogenetica e Biologia Molecolare, Foggia, Italia

²OORR Foggia, Azienda Ospedaliero – Universitaria, Dipartimento di Patologia Clinica - Il Laboratorio, Sezione di Citogenetica e Biologia Molecolare, Foggia; Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Foggia, Foggia, Italia

³Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Foggia, Foggia, Italia

Le delezioni e/o riarrangiamenti strutturali del cromosoma Y sono una causa genetica frequente di sterilità maschile con una prevalenza stimata di 1/2.500. Qui riportiamo l'esatto ordine cronologico degli eventi che hanno caratterizzato il percorso diagnostico di un soggetto adulto, di sesso maschile con un complesso riarrangiamento relativo ai cromosomi sessuali, caratterizzato mediante FISH e CGHarray, apparentemente senza gravi conseguenze fenotipiche, con aspetti interessanti dal punto di vista sia clinico che genetico. Considerando la morfologia del cromosoma Y non era possibile supporre la presenza di materiale addizionale sul der(Y), comunque è stata ipotizzata la presenza di materiale di provenienza del cromosoma X sulla base dei pochi casi riportati nella letteratura scientifica. Durante la consulenza genetica è stata proposta e discussa l'analisi mediante CGHarray, evidenziando i limiti/preggi della procedura citogenetica standard, la citogenetica molecolare mediante FISH e l'analisi delle microdelezioni del cromosoma Y, che non sarebbero sufficienti nel nostro caso per un percorso diagnostico completo. Riteniamo, infatti, che sia proprio questo il motivo principale per il quale sono descritti in letteratura pochi casi. Il nostro paziente, l'unico in età riproduttiva, è uno dei 6 casi riportati fino ad oggi, che presentano contemporaneamente la duplicazione della regione Xp22.3 (~8.4 Mb) e la delezione della regione Yq11.2 (~42.9 Mb), con il seguente cariotipo finale: 46,X,der(Y),t(X;Y)(Ypter#Yq11.221::Xp22.33#Xpter).ish der(Y) (Yptel+,Ycen+,RP11-529I21+,RP11-506M9-Yqtel-,Xptel+). arrXp22.33p22.31(702-8,395,963, 8,408,289x1), Yq11.221q12 (14,569,317x1, 14,587,321-57,440,839x0) Discutiamo, pertanto, le difficoltà che potrebbero insorgere in corso di consulenza prenatale considerando la variabilità fenotipica, in quanto individuare una duplicazione di Xp e una delezione di Yq in alcuni casi potrebbe rappresentare un dilemma diagnostico e/o clinico, a causa dell'imprevedibilità degli effetti sullo sviluppo. Infine, proponiamo un ipotetico algoritmo diagnostico che potrebbe essere usato in casi clinici analoghi e che prevede un approccio multidisciplinare obbligatoriamente integrato con la consulenza genetica.

PYROSEQUENCING ASSAY FOR ICR1 AND ICR2 (11P15.5) AND DETECTION OF CORRELATIONS BETWEEN METHYLATION LEVEL AND BECKWITH-WIEDEMANN SYNDROME PHENOTYPE

M. Calvello¹, S. Tabano¹, P. Colapietro², A. Selicorni³, S. Maitz³, F. Lalatta⁴, F. Bedeschi⁴, D. Perotti⁵, S. Russo⁶, S. Sirchia², L. Larizza², M. Miozzo¹

¹*Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano; Patologia Molecolare, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano*

²*Genetica Medica, Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano*

³*Dipartimento di Pediatria, Fondazione MBBM, AOS Gerardo, Monza*

⁴*UOD Genetica Medica, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano.*

⁵*Dipartimento di Medicina Predittiva e della Prevenzione, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano*

⁶*Lab di Biologia Molecolare Istituto Auxologico Italiano.*

BACKGROUND Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS, OMIM 130650) is a phenotypically heterogeneous overgrowth disorder. About 70% of cases are caused by epigenetic defects of 11p15.5 and phenotype-(epi)genotype correlations have been described.

AIMS Set up a methylation pyrosequencing assay for ICR1 and ICR2 to evidence possible correlations between methylation levels and clinical features of BWS cases.

MATERIALS AND METHODS Pyrosequencing was performed on DNA from: peripheral blood (PB) of 27 post-natal BWS patients, 3 amniotic fluid (AF) and 5 chorionic villi (CV). Controls were 63 healthy individuals (HI), 17 AF and 60 CV. Methods have been reported by our group (Tabano S et al, 2010).

RESULTS Controls (methyl values in %): HI= ICR1 46 (range:40-52), ICR2 46 (range:41-50). AF= ICR1 44 (range:38-47), ICR2 42 (range:37-47), CV= ICR1 46(range:39-53), ICR2 45 (range:42-48). Cases (%): eight out of 27 post-natal BWS resulted hypermethylated (>52) at ICR1, five hypomethylated (<40) at ICR2 and eight were within the ranges; six cases turned out to be both ICR1 hypermethylated and ICR2 hypomethylated, suggesting paternal 11p15.5 UPD. Only one out of three fetuses suspected for BWS, where AF was analysed, was hypomethylated (< 37) at ICR2. Autopsy after TA confirmed the BWS diagnosis. Three out of five CV of suspected BWS, resulted hypomethylated at ICR2.

Clinical correlations. ICR1 hypermethylation, ICR2 normal: Among the eight cases, in addition to other BWS clinical features, four shared macroglossia, macrosomia and visceromegaly, whereas the other four shared abdominal wall defects (umbilical hernia or diastasis recti), but not omphalocele. Methylation significantly differed between the two groups (81 vs 57, respectively; $p < 0.001$).

ICR1 normal, ICR2 hypomethylation: No specific correlations were found.

Both ICR1/ICR2 defects: all the six cases shared hemihyperplasia.

CONCLUSIONS 1. LA samples showed lower methylation levels compared to blood and CVS, thus suggesting that is important the specific tissue controls evaluation prior to perform molecular testing;

2. Clinical correlations respect to different methylation levels were apparent for ICR1 defects. Additional cases are needed to refine and confirm our observations.

PIEDE TORTO ISOLATO FAMILIARE

M. Vinci¹, C. Barone², A. Cataliotti Del Grano³, A. Spaletta¹, L. Indaco³, S. Amata¹, C. Ettore³, C. Barone³, B. Barrano³, M. Sturnio¹, S. Bianca³

¹*IRCCS Associazione Oasi Maria SS. Troina*

²*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania - Scuola di Specializzazione in Genetica Medica Università degli Studi Messina - Catania*

³*Genetica Medica Dipartimento Materno Infantile, ARNAS Garibaldi Nesima, Catania*

Introduzione:

Il piede torto è uno dei più comuni difetti congeniti alla nascita, con una prevalenza di circa 1 su 1000 nati vivi. Nel 20% dei casi si associa a artrogriposi distale, distrofia miotonica congenita, mielomeningocele, sequenza della banda amniotica o ad altre sindromi genetiche come la trisomia 18 o sindrome da delezione 22q11. Nel resto dei pazienti l'eziologia rimane sconosciuta. Circa il 25% di tutti i pazienti con piede torto isolato riferisce una storia familiare con la stessa malformazione. Alvarado et al, (2010), hanno selezionato 66 casi di piede torto isolato idiopatico con almeno un parente di primo grado affetto per identificare i geni causativi. Gli individui sono stati considerati affetti solo in assenza di altre anomalie congenite (es., difetto cardiaco, ipospadia, ritardo dello sviluppo) o altra eziologia nota (es., artrogriposi, mielomeningocele, miopatia). La microduplicazione ricorrente 17q23.1q23.2 è stata identificata in 3/66 probandi.

Caso clinico:

Riportiamo il caso di un paziente giunto in consulenza all'età di un mese per la presenza di piede torto congenito sinistro. All'anamnesi familiare veniva riferita la presenza di piede torto congenito destro nel padre del probando e piede torto congenito sinistro in una prozia paterna. In tutti e tre i casi non si evidenziavano altre anomalie congenite o altra eziologia nota per la patologia in questione. Si decideva quindi di eseguire esame molecolare mediante array-CGH nel padre del probando che non ha evidenziato alcuno sbilanciamento genomico con probabile ruolo patogenetico.

Conclusioni:

Il risultato riportato da Alvarado et al, (2010) suggerisce che la microduplicazione 17q23.1q23.2 possa essere una causa relativamente comune di piede torto isolato familiare e fornisce una forte evidenza che collega l'eziologia del piede torto alle anomalie di sviluppo precoce degli arti. Il nostro caso tuttavia suggerisce un'eterogeneità genetica con la possibile implicazione di altri loci responsabili. Sono pertanto necessari ulteriori studi per offrire un test genetico per i pazienti con storia familiare di piede torto isolato familiare.

MUTAZIONI IN RAB27A NON SONO SEMPRE ASSOCIATE A FENOMENI DI IPOPIGMENTAZIONE

M.L. Coniglio¹, C. Valentina¹, C. Benedetta¹, M. Da Ros¹, E. Sieni¹, F. Fagioli², P. Pierani³, D. Pende⁴, M. Aricò¹

¹Lab. Oncoematologia, AOU Meyer, Firenze

²Oncoematologia Pediatrica, OIRM Torino

³Oncoematologia Pediatrica, Ospedale Salesi, Ancona

⁴Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova, Italia

INTRODUZIONE E OBIETTIVI La linfoistocitosi emofagocitica familiare (FHL) e' una sindrome clinica caratterizzata da citopenia, febbre, splenomegalia ed elevati livelli di ferritina. I criteri diagnostici aiutano a selezionare questi pazienti, alcuni dei quali hanno un difetto funzionale a carico della citotossicità linfocitaria. Questo difetto e' riconducibile a mutazioni bialleliche in diversi geni: PRF1, UNC13D, STX11, STXBP2. Pazienti con mutazioni di SH2D1A o BIRC4 possono sviluppare una XLP con manifestazioni indistinguibili; infine, soggetti con mutazioni di RAB27A o LYST possono anch'essi sviluppare sindrome emofagocitica ma generalmente sono riconoscibili per il deficit di pigmento che causa un albinismo almeno parziale (Sindrome di Griscelli di tipo 2 e Sindrome di Chediak Higashi). RAB27A e' una proteina chiave nel traffico dei melanociti ma svolge anche un ruolo importante dell'esocitosi dei granuli citotossici, il cui difetto causa ridotta citotossicità e ridotta degranulazione.

METODI L'analisi di RAB27A e' stata effettuata sul DNA di 30 pazienti affetti da sindrome emofagocitica mediante sequenziamento diretto delle regioni esoniche ed introniche fiancheggianti.

RISULTATI Sei pazienti sono risultati mutati in questo gene: tre omozigoti rispettivamente per le seguenti mutazioni:

c.[510delAAGCC];[510delAAGCC] p.[I170Fs];[I170Fs],

c.[422_424delGAG];[422_424delGAG] p.[R141del];[R141del],

c.[148_149delAGinsC];[148_149delAGinsC] p.[R50Fs];[R50Fs]

due eterozigoti composti: il primo con c.[422_424delGAG];[487 A>C] p.[R141del];[S163R] , il secondo con c.[227 C>T];[476 A>G] p.[A76V];[Y159C]; infine uno e' risultato eterozigote semplice: c.[550C>T];[=] p.[R184X];[=].

CONCLUSIONI Il risultato piu' rilevante e meno atteso e' stato che due pazienti eterozigoti composti ed uno omozigote non mostravano ipopigmentazione della pelle o colorazione grigio argentea dei capelli, caratteristiche tipicamente associate alla sindrome di Griscelli tipo 2. Questo ci ha indotto a modificare la strategia di analisi dei pazienti con HLH includendo la analisi di RAB27A anche nei casi in cui un deficit di pigmento degli annessi cutanei non e' stato segnalato.

GERMLINE ALLELE-SPECIFIC EXPRESSION OF APC AND MUTYH IN MUTATION-NEGATIVE PATIENTS WITH MULTIPLE COLORECTAL ADENOMAS AND/OR COLORECTAL CANCER

M.C. Curia², S. De Iure¹, F. Fantini¹, P. Di Filippo³, P. Battista¹, G. Palka², R. Valanzano⁴, P. Di Gregorio⁵, A. Cama³, G. Aceto¹

¹*Dep. of Clinical and Experimental Sciences, "G.d'Annunzio" University, Chieti*

²*Dep. of Medical, Oral and Biotechnological Sciences, "G.d' Annunzio" University, Chieti*

³*Dep. of Drug Sciences, "G.d'Annunzio" University, Chieti*

⁴*Dep. of Clinical Pathophysiology, Medical Genetics U.O., University of Florence*

⁵*Division of Immunotransfusion, "SS. Annunziata" Hosp., Chieti*

Introduction. Recent data showed that altered germline allele-specific expression (ASE) may be a useful marker of genetic predisposition to cancer or other diseases. Germline mutations and ASE of APC are associated with familial adenomatous polyposis (FAP). Also MUTYH mutations, involved in base excision repair (BER), is associated to polyposis (MAP) and carriers of MUTYH biallelic and monoallelic mutations have an increased risk of developing gastrointestinal tumors. The role of ASE in this gene is unknown. In this study we analyzed whether the germline variations in ASE of APC and MUTYH may be associated with low penetrant familial cancers in APC mutation-negative patients with multiple colorectal adenomas and/or carcinomas and whether the pathogenic APC and MUTYH mutations had impact on ASE.

Methods. The study was carried out on gDNA and cDNA obtained from blood samples of 44 unrelated APC mutation-negative patients with multiple colorectal adenomas and/or carcinomas, 13 APC mutation-positive FAP patients and 160 healthy donors recruited from "SS. Annunziata" Hospital of Chieti. Non-fluorescent DHPLC-based primer extension method was used to analyze ASE of APC and MUTYH.

Results. In 25 out of 44 APC-negative patients with available mRNA, we identified 6 patients heterozygous for the frequent APC coding SNP rs2229992 (c.1478C>T). Two patients showed ASE values deviating more than 1SD from the mean ASE values measured in 121 individuals. Moreover, to assess the effect of germline APC mutations on ASE we analyzed 13 carriers of pathogenic variants. Six of these individuals were heterozygous for the rs2229992 marker and 1 of them, bearing the pathogenic APC p.Ser895X, showed a germline allelic loss by ASE analysis. Moreover, we are analyzing ASE of MUTYH among APC-negative patients. Six of these patients were heterozygous for the frequent MUTYH coding SNP rs3219489 (c.1005G>C; p.Gln335His). One patient, APC- and MUTYH-negative, showed ASE values deviating more than 1SD from the mean ASE values measured so far in 31 individuals.

Conclusions. Our preliminary results underline the importance of RNA-level studies in the molecular diagnosis of patients with multiple colorectal adenomas and/or carcinomas without detectable mutations in APC and/or MUTYH.

MESSA A PUNTO DI UN PROTOCOLLO DIAGNOSTICO PER L'ANALISI DEI GENI COINVOLTI CON LA FORMA RECESSIVA DI OSTEOGENESI IMPERFETTA

M. Maioli¹, A. Parra¹, M. Gnoli¹, M. Tremosini¹, L. Sangiorgi¹

¹*S.S.D. di Genetica Medica e malattie rare ortopediche, Ist. Ort. Rizzoli, Bologna*

L'osteogenesi imperfetta (OI) è una malattia genetica rara del tessuto connettivo caratterizzata da fragilità ossea e fratture ricorrenti, eterogenea sia in termini di ereditarietà che di espressività fenotipica. Nel 90% dei casi la patologia è causata da mutazioni dominanti nei geni COL1A1 e COL1A2 che codificano per le catene # del collagene di tipo I e, nel 5-6% dei casi, da mutazioni recessive in geni coinvolti nella biosintesi del collagene (CRTAP, LEPRE1, PPIB, FKBP10 e SERPINH1) o implicati nella formazione e differenziamento osseo, come SP7.

L'OI viene classificata in undici tipi sulla base delle caratteristiche cliniche, radiologiche, istologiche, ereditarie e ai geni coinvolti. La scoperta, negli ultimi cinque anni, dei geni recessivi ha comportato un'estensione della classificazione iniziale redatta da Silience nel 1979, in quanto pazienti che clinicamente rientravano in forme già descritte presentavano mutazioni in geni diversi e, in alcuni casi, mostravano caratteristiche istologiche distintive.

Scopo dello studio è stata la messa a punto e la standardizzazione di un protocollo diagnostico basato sul sequenziamento diretto dei geni recessivi PPIB, FKBP10, SERPINH1 e SP7, che si aggiunge a quello già in uso, presso il nostro laboratorio, per i geni CRTAP e LEPRE1.

Durante la prima fase del lavoro sono state disegnate 25 coppie di primers e ne sono state ottimizzate le condizioni di amplificazione; Nella seconda fase è stato effettuato lo screening molecolare di 19 pazienti clinicamente affetti da OI, selezionati da un data set iniziale di 50 pazienti sulla base dell'anamnesi familiare, quando presente, e delle caratteristiche cliniche e radiologiche compatibili con le forme recessive descritte in letteratura.

La messa a punto di questi protocolli diagnostici ha permesso di estendere l'attività diagnostica fornita dal nostro laboratorio per la definizione delle basi molecolari responsabili delle diverse forme cliniche della patologia in esame.

NOVEL INSIGHTS INTO THE IMPACT OF GERMLINE AND SOMATIC CBL MUTATIONS IN DEVELOPMENT AND LEUKEMOGENESIS

S. Martinelli¹, S. Checquolo², F. Consoli³, E. Stellacci¹, C. Rossi⁴, M. Silvano¹, E. Flex¹, C. Cossu⁵, A. De Luca³, G. Cazzaniga⁶, I. Screpanti⁷, M. Tartaglia¹

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

²*Dep. of Medico-Surgical Sciences and Biotechnologies, Sapienza University, Latin, Italy*

³*Mendel Institute, Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy*

⁴*UO Genetica Medica, Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna, Italy*

⁵*Dep. of Public Health, Clinical and Molecular Medicine, University of Cagliari, Cagliari, Italy*

⁶*Centro Ricerca M. Tettamanti, Milano-Bicocca University, San Gerardo Hospital, Monza, Italy*

⁷*Dep. of Molecular Medicine, Sapienza University, Rome, Italy*

CBL is an E3 ubiquitin ligase that negatively regulates intracellular signalling elicited by activated cell-surface receptors, but also contributes positively to signal transduction through its adaptor function. Somatic acquired CBL mutations occur in human myeloid malignancies as homozygous defects due to acquired uniparental disomy (aUPD). More recently, our group and others provided evidence that germline CBL lesions underlie a phenotype with clinical features partially overlapping Noonan syndrome (NS), a developmental disorder caused by up-regulation of RAS signalling, and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). Here, we report that homozygosity for a CBL mutation due to aUPD occurs in a small proportion of patients with childhood B-lineage acute lymphoblastic leukaemia (ALL), documenting a wider impact of CBL mutations in leukemogenesis. The ALL-associated p.Cys419Phe amino acid change was found to affect CBL E3-ligase activity, and promote constitutive activation of signal flow through MAPK and PI3K-AKT pathways. Mutations occurred in blasts of two children with disease relapse, suggesting possible clinical relevance of CBL defects in ALL. Scanning of the entire CBL coding sequence in a large and clinically well-characterized cohort of subjects with NS or a phenotype suggestive of this disorder and without mutations in previously identified disease genes allowed to identify novel mutations in four unrelated individuals. The mutational spectrum associated with germline and somatic CBL defects, as well as their genotype-phenotype correlations are discussed.

ASSOCIAZIONE TRA LA PRESENZA DEI GENI DEI RECETTORI KIR INIBITORI E DEL LIGANDO Bw4 E SCLEROSI MULTIPLA NELLA POPOLAZIONE SARDA

R. Littera¹, F. Alba¹, S. Lai¹, L. Cappai¹, M. Mulargia², D. Valentini¹, V. Loi¹, M. Serra¹, R. Maddi¹, G. Costa³, M.G. Marrosu³, C. Carcassi²

¹*Genetica Medica, Ospedale R. Binaghi, ASL 8, Cagliari e Università degli Studi di Cagliari, Italy*

²*Cattedra di Genetica Medica, Ospedale R. Binaghi, Dipartimento di Scienze Mediche Internistiche, Università di Cagliari, Italy*

³*Centro Sclerosi Multipla, Ospedale R. Binaghi, Università di Cagliari, Italy*

La Sclerosi Multipla è una malattia cronica infiammatoria del SNC la cui incidenza (5/105) e prevalenza (1/103) nella popolazione Sarda sono significativamente superiori al resto dell'Italia.

In letteratura è stata ampiamente descritta l'associazione della malattia con gli alleli codificanti per le molecole HLA di Classe II. In particolare gli aplotipi contenenti gli alleli DRB1*04:05-DQA1*05:01-DQB1*03:01 avrebbero un effetto predisponente alla malattia nella Popolazione Sarda.

In questo studio casi-controlli abbiamo invece valutato il ruolo dei recettori KIR e dei rispettivi ligandi rappresentati dalle molecole HLA di Classe I, con la suscettibilità alla SM.

I geni KIR di un gruppo omogeneo di 132 pazienti affetti da SM (relapsing-remitting) e di 186 controlli sani appartenenti alla popolazione Sarda, sono stati tipizzati con metodica PCR-SSP.

In entrambi i gruppi è stata valutata la presenza/assenza dei singoli geni KIR e dei loro ligandi e dei geni KIR attivatori e/o inibitori nei rispettivi genotipi.

L'analisi statistica, condotta utilizzando il Fisher Exact Test (livello di significatività: $P < 0,05$), evidenziava alcuni notevoli risultati:

entrambi i gruppi mostravano frequenze simili dei singoli geni KIR; la presenza di tutti e sette i geni KIR inibitori aveva una frequenza statisticamente significativa nei pazienti rispetto ai controlli e sembrava associata alla suscettibilità alla malattia ($OR = 2.16$, $95\% CI = 1.36 - 3.44$, $P = .001$); si osservava un'associazione significativa tra l'assenza del ligando Bw4 e SM: l'assenza del ligando Bw4 di KIR3DL1 risultava maggiore nei pazienti rispetto ai controlli ($OR = 4.9$, $95\% CI = 3.02 - 8.15$, $P < .0001$), in accordo con quanto riportato da Lorentzen sull'effetto protettivo di HLA-Bw4 nella predisposizione alla malattia. Infine, l'associazione tra la presenza di tutti e sette i geni KIR inibitori e l'assenza di qualsiasi ligando Bw4 presentava una frequenza ancora più significativa a favore della suscettibilità alla SM ($OR = 8.0$, $95\% CI = 3.44 - 18.59$, $P < .00001$).

Questi dati evidenziano che KIR e molecole HLA di I Classe sono coinvolti nell'insorgenza della SM sebbene i meccanismi mediante i quali le cellule NK esplicano la loro azione specifica non siano ancora stati chiariti.

Long-standing balancing selection in the THBS4 gene: influence on sex-specific brain expression and grey matter volumes in Alzheimer's disease

R. CAGLIANI¹, F.R. GUERINI², F. BAGLIO², D. FORNI¹, C. AGLIARDI², U. POZZOLI¹, S. RIVA¹, G.P. COMI³, N. BRESOLIN¹, M. CACERES⁴, M. CLERICI⁵, M. SIRONI¹

¹*Scientific Institute IRCCS E. Medea, Bosisio Parini (LC), Italy.*

²*Don C. Gnocchi Foundation ONLUS, IRCCS, Milan*

³*Dino Ferrari Centre, Department of Physiopathology and Transplantation, University of Milan, Fondazione Ca' Granda IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy*

⁴*Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Barcelona), Spain*

⁵*Chair of Immunology, Department of Physiopathology and Transplantation, University of Milan, 20090 Milano, Italy*

The THBS4 gene encodes a glycoprotein involved in different processes including inflammation and synaptogenesis. THBS4 is expressed at higher levels in the brain of humans compared to non-human primates, and the protein accumulates in β -amyloid plaques. We analysed THBS4 genetic variability in 4 human populations and show that two major haplotypes (hap1 and hap2) in a region centered around exon 3 are maintained by balancing selection. The two haplotypes have extremely deep coalescence time and modulate THBS4 expression in lymphocytes. Analysis of human brain samples from healthy donors indicated that THBS4 expression increases with age. Analysis of brain expression data in aged healthy individuals showed that variants in the balancing selection region interact with sex in influencing THBS4 expression ($p=0.038$), with hap1 homozygous females showing the lowest expression level. MRI analysis in 66 Alzheimer's disease (AD) patients indicated a significant interaction between sex and THBS4 genotype status for peripheral grey matter ($p=0.016$) and total grey matter ($p=0.031$) volumes. Again, the interaction was mainly mediated by hap1 homozygous AD females, in whom the lowest volumes were detected. Because THBS4 is synaptogenic, its brain expression may be up-regulated to counteract the synaptic damage associated with the aging process, and lower expression may result in a more severe degree of pathology in hap1-homozygous AD female patients. Notably, the selection signature associated with THBS4 might not be related to AD, but rather to inflammatory responses, as proposed for other genes involved in AD pathogenesis.

DAL CARIOTIPO CONVENZIONALE A QUELLO MOLECOLARE (SNP-ARRAY): APPROFONDIMENTO CITOGENETICO-MOLECOLARE IN UN CASO DI LEUCEMIA PLASMACELLULARE

G. Iaquinta¹, A. Mariottini¹, S. Bonifacio¹, M. Giuseppina¹, P. Chiara¹, M. Staderini², G. Gelli³, B. Peruzzi³, R. Ciampi¹, R. Caporale³, A. Bosi², F. Torricelli¹

¹Lab. SOD Diagnostica Genetica, A.O.U. Careggi, Firenze

²Lab. U.F. Ematologia, A.O.U. Careggi, Firenze

³Lab. DAI Diagnostica di Laboratorio, A.O.U. Careggi, Firenze

La leucemia plasmacellulare costituisce una forma più aggressiva di presentazione delle gammopatie monoclonali ed è caratterizzata dalla presenza nel sangue periferico di oltre 2000 plasmacellule per microlitro e di plasmocitosi nel sangue periferico > 20%. Rappresenta la forma più rara di discrasia plasmacellulare (2-4%). Per lo scarso numero di casi studiati e per la consapevolezza che la malattia è sempre associata con prognosi infausta (OS tra 1,3-12 mesi), non esistono fattori prognostici di sopravvivenza accurati. Dal punto di vista genetico solitamente si riscontrano cariotipi complessi ipodiploidi o pseudodiploidi; rari i cariotipi iperdiploidi nella leucemia plasmacellulare. La presenza di alcune anomalie cromosomiche quali, la del 1p21, la t(4;14), riarrangiamenti dell'oncogene MYC; si associano in alcuni casi con una ridotta sopravvivenza. L'indagine citogenetico-molecolare diventa quindi uno strumento di analisi importante per la diagnosi e per la prognosi di questa neoplasia. In questo lavoro verrà affrontato un caso di leucemia plasmacellulare primaria presente in un uomo di 66 anni, la cui analisi genetica ha previsto un'indagine citogenetico-molecolare (cariotipo convenzionale e FISH) associata a esperimento SNP-array. Sono stati evidenziati numerosi riarrangiamenti di tipo numerico e strutturale. L'esame citogenetico ha messo in evidenza tre linee cellulari: una presenta un cariotipo maschile a 44 cromosomi con la monosomia del cromosoma 13, perdita di un cromosoma 16, 18, e del cromosoma Y, sostituiti da 2 marker caratterizzati mediante FISH; e la traslocazione t(4;14) che determina la fusione del gene IGH/FGFR3. La seconda linea presenta, oltre a tutte le alterazioni sopra descritte, un isocromosoma per le braccia lunghe di un cromosoma 8. La terza linea presenta un cariotipo maschile normale. Le stesse alterazioni, fatta eccezione per la traslocazione cromosomica bilanciata, sono state confermate mediante SNP-array (tecnologia di sequenziamento di nuova generazione).

IDENTIFICAZIONE DI 2 NUOVE MUTAZIONI DEL DNA MITOCONDRIALE IN PAZIENTI AFFETTI DALLA SINDROME DEL VOMITO CICLICO

L. Rigoli¹, S. Cara¹, F. Pugliatti¹, C. Di Bella¹, V. Procopio¹, C. Romano¹, C. Salpietro¹, M. Fuoti², S. Martinazzi², A. Ravelli²

¹*Dipartimento Materno-Infantile, Policlinico Universitario, Messina*

²*Dipartimento di Pediatria, Spedali Civili, Brescia*

Scopo. La Sindrome del Vomito Ciclico (CVS) è una condizione disabilitante frequente nell'età pediatrica. Essa è caratterizzata da attacchi ricorrenti di nausea incessante e vomito incoercibile, spesso associati a letargia e cefalea. La patogenesi è sconosciuta, ma studi recenti suggeriscono un ruolo importante esercitato dal DNA mitocondriale (mtDNA) che viene ereditato per via materna. Si ritiene che mutazioni nella regione regolatrice, definita "mtDNA D-loop", siano responsabili della CVS poiché potrebbero alterare il tasso di replicazione del mtDNA e, quindi, modificare l'affinità di legame di importanti fattori di trans-attivazione.

Pazienti e Metodi. Sono stati reclutati 9 soggetti in età pediatrica di origine Italiana affetti da CVS (7 maschi e 2 femmine, età media 10.7 anni) ed i loro familiari di primo grado. Tramite nested PCR e usando 4 specifiche coppie di primers, sono state amplificate oltre 1200 bp di mtDNA, che includono la regione del D-loop. I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante sequenziamento automatico.

Risultati. Sono state riscontrate 2 nuove mutazioni in 2 pazienti affetti da CVS. Entrambi presentavano una familiarità materna positiva per emicrania. In un soggetto di 3 anni affetto da CVS e acidemia lattica, nella regione del D-loop, è stata rilevata una mutazione in omoplasmia C>T al np 571. Essa era presente anche nel fratello e nella madre affetti entrambi da cinetosi. Nell'altro paziente di 14 anni e nella madre, sempre nella stessa regione del mtDNA, è stata identificata una nuova mutazione in omoplasmia G>A al np 396.

Conclusioni. In accordo con i pochi studi precedenti, i nostri risultati suggeriscono un ruolo importante di mutazioni del mtDNA nella patogenesi della CVS.

NIMBL project: Italian contribution to the genetic analysis of Aicardi-Goutières Syndrome

M. Bianchi¹, I. Olivieri², S. Gagliardi¹, G.S. Grieco¹, Y. Crow³, G. Rice³, U. Balottin⁴, S. Orcesi², C. Cereda¹

¹Laboratory of Experimental Neurobiology, C. Mondino National Institute of Neurology Foundation, IRCCS, Pavia, Italy

²Child Neurology and Psychiatry Unit, C. Mondino National Institute of Neurology Foundation, IRCCS, Pavia, Italy

³Genetic Medicine University of Manchester, Manchester Academic Health Science Centre, Central Manchester Foundation Trust University Hospitals, Manchester, UK

⁴University of Pavia, Pavia, Italy

Aicardi-Goutières Syndrome (AGS) is a rare genetically determined encephalopathy that may overlap with the phenotype of congenital infection. Mutations in five genes (TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C and SAMHD1) have been found to be responsible for the majority of AGS cases. AGS1/TREX1 gene codes for 3'5' DNA exonuclease with specificity for ssDNA. AGS2, AGS3, AGS4 patients have mutations in genes that code for the three subunits of the Human Ribonuclease H2 enzyme complex implicated in ribonucleotides removal from RNA:DNA duplexes. The AGS5 gene, SAMHD1, encodes for a triphosphohydrolase that converts deoxynucleoside triphosphates to deoxynucleoside and inorganic triphosphate.

In the last two years, IRCCS "C. Mondino" Foundation and International Aicardi-Goutières Syndrome Association (IAGSA) were involved in a European project called NIMBL: Nuclease Immune Mediated Brain and Lupus-like conditions. The objectives of this project are to better understand the pathogenesis, to describe more accurately the clinical picture and to delineate a genotype-phenotype correlation. The new knowledge acquired aim to develop diagnostic and therapeutic modalities applicable to AGS and also to more common autoimmune diseases, including systemic lupus erythematosus.

An AGS biobank to collect serum, plasma, lymphoblastoid cell lines and PBMCs was established at Mondino Institute, according to the guidelines of the NIMBL project. We recruited samples of 20 patients with suspected clinical diagnosis of AGS with the samples and data of their corresponding families. We collect one AGS1/TREX1 case, 13 AGS2 / RNASEH2B cases, one AGS3/RNASEH2B case, one AGS4/RNASEH2C case and one AGS5/ SAMHD1 case. Mutations found are as follows: AGS1 (p.R114H), AGS2 (p.A177T, p.A177T+pT163I, p.A177T+p.W73L, c.IVS436+1G>T +p.A177T), AGS3 (p.D39Y), AGS4 (p.R108W +p.F231L) and AGS5 (p.M385V).

Although three of the screened patients did not show mutations in the mentioned genes above, we may still consider the possibility of the presence of new mutations yet to be identified in other genes.

The research leading to these results has received funding from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement number 24177

FALSO POSITIVO IN DP SU CVS MEDIANTE ARRAY-CGH DOVUTO AD ANOMALIA STRUTTURALE CONFINATA AL TROFOBLASTO

L. Cardarelli¹, E. Nalesso¹, I. Mammi², S. Gomirato¹, K. Marchioro¹, L. Michelotto¹, M. Duca¹, S. Caroti³, G. Abatangelo¹

¹Laboratorio Analisi Citotest - Consorzio GENiMED - Sarmeda di Rubano (PD)

²Ambulatorio di Genetica Medica - ULSS 13 - Ospedale di Dolo (VE)

³UO Ostetricia e Ginecologia- Ospedale di Dolo (VE)

Si presenta un caso di discrepanza tra villi coriali e liquido amniotico.

La gestante (34aa) ha eseguito villocentesi a 12sg. L'analisi ha evidenziato add(8)(p23) omogeneo in diretta e a mosaico (%) con linea apparentemente normale in coltura.

Per la caratterizzazione del der(8) si è eseguito aCGH su alcuni frustoli di villo (piattaforme 180K Agilent e software Agilent Workbench), che ha evidenziato trisomia parziale a mosaico 14q e monosomia omogenea del telomero 8p. La FISH con sonde telomeriche 8p(Kreatek) e 14q (Cytocell) ha confermato in coltura una t(8;14) sbilanciata a mosaico e la delezione telomerica 8p omogenea, rilevata anche nelle metafasi con morfologia del cr.8 apparentemente normale.

Dopo la consulenza la pz ha deciso di approfondire l'analisi su liquido amniotico. A differenza di quanto atteso, la FISH interfascia su amniociti non coltivati ha evidenziato normale apporto delle regioni telomeriche 8p e 14q nel 100% dei nuclei, non confermando quanto riscontrato su CVS. L'analisi colturale ha riconfermato il riscontro di cariotipo normale su amniociti, suggerendo che l'anomalia non coinvolgeva i tessuti fetali.

Confortata dai nuovi risultati e da ecografie nella norma, la coppia ha proseguito la gravidanza. A termine è nata una bambina sana (cariotipo su linfociti 46,XX).

Anche in questo caso l'applicazione di tecniche molecolari è stata fondamentale per comprendere la natura dello sbilanciamento cromosomico e identificare la delezione criptica nel tessuto analizzato confermando l'abilità degli array nel chiarire/identificare anomalie che non possono essere rilevate o comprese correttamente mediante le analisi di routine.

L'applicazione di questa tecnica, che va comunque utilizzata con cautela dato il limite nell'interpretazione di eventuali CNV di dubbio significato, può essere complicata dalla presenza di mosaicismi confinati o di bassa entità, in particolare su CVS. Il presente caso sottolinea infatti che nella dp su CVS, con o senza eventuale aCGH, bisogna sempre considerare la natura extraembrionale del trofoblasto, che può presentare mosaicismi confinati alla base di alcuni casi di discrepanza diagnostica che, seppur rari, non sono nulli e potrebbero portare ad errori prognostici.

FREQUENZA DELLE MUTAZIONI DEL GENE GJB2 NELLA SICILIA ORIENTALE

M. Amorini¹, P. Romeo¹, C. Di Bella¹, S.G. Romeo¹, V. Procopio¹, F. Pugliatti¹, S. Cara¹, A.P. Capra¹, C. Liuzzo¹, C. Salpietro¹, L. Rigoli¹

¹*Dipartimento di Scienze Pediatriche Mediche e Chirurgiche, Università di Messina, Messina;*

La sordità infantile colpisce 1 su 650-1000 nati. Le cause ereditarie sono le più frequenti seguite da quelle infettive, tossiche e traumatiche. Circa l'80% dei pazienti di origine Europea presenta una trasmissione autosomica recessiva dovuta principalmente ad alterazioni del gene "GJB2". Il gene si localizza sul cromosoma 13q12 e codifica per la connessina 26, indispensabile per la normale funzione dell'orecchio interno poiché partecipa alla formazione delle "gap junctions". Le mutazioni del gene GJB2 possono indurre modifiche strutturali importanti o la mancata sintesi della proteina CX26, rendendo le cellule dell'orecchio interno impermeabili all'ingresso dei mediatori chimici e degli ioni. Nella popolazione Caucasica, in età pediatrica, il 50% dei casi di ipoacusia genetica non sindromica è causata dalla mutazione 35delG .

Abbiamo selezionato 50 probandi con difetti di ipoacusia neurosensoriale bilaterale sia sporadica che familiare ad ereditarietà autosomica recessiva. E' stata effettuata l'analisi molecolare del gene GJB2 allo scopo di studiare mutazioni che alterano l'espressione della proteina, la sua localizzazione e la sua funzione di canale. Le mutazioni riscontrate sono la delezione 35delG (16%), la R184W (6%), la 167delT (4%) e, infine, le mutazioni V153I, W24X, E47X, M163V riscontrate con una frequenza del 2%.

La mutazione più frequente nel nostro gruppo di studio è la delezione 35delG. Invece, la mutazione M163V rappresenta una variante molto rara di cui noi descriviamo il terzo caso nella letteratura mondiale.

Nella popolazione caucasica, la delezione 35delG caratterizza oltre il 70% dei casi di sordità ereditaria e la maggior parte dei casi sporadici. Studi epidemiologici hanno confermato un'elevata incidenza dei portatori sani sia in Italia (1/35) che in tutte le altre zone del bacino Mediterraneo (da 1/25 a 1/50). Il nostro studio sottolinea la necessità di effettuare uno screening molecolare del gene GJB2 quando in un gruppo familiare viene identificato un soggetto affetto da sordità neurosensoriale bilaterale allo scopo di una precoce identificazione dei portatori sani.

Patologie ereditarie del tessuto connettivo: l'esperienza dell'A.O. San Camillo-Forlanini nell'ambito di un percorso diagnostico-assistenziale e di studio integrato

M. Castori¹, S. Morlino¹, M. Valiante¹, F. Camerota², M. Bruschini³, M. Celli⁴, C. Celletti², S. Antonelli⁵, C. Blundo⁶, G. Minisola⁵, A. Morrone⁷, P. Grammatico¹

¹U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica, Dip. di Medicina Molecolare, Sapienza Università di Roma, A.O. San Camillo-Forlanini, Roma

²U.O.C. Medicina Fisica e Riabilitazione, Dip. di Scienze Ortopediche, Sapienza Università di Roma, Policlinico Universitario Umberto I, Roma

³U.O.C. Neuroriabilitazione e Neuropsicologia, Dip. di Geriatria, Neuroscienze ed Ortopedia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Roma

⁴Dip. di Pediatria, Sapienza Università di Roma, Policlinico Universitario Umberto I, Roma

⁵U.O.C. Reumatologia, Dip. di Medicina Specialistica, A.O. San Camillo-Forlanini, Roma

⁶U.O.C. Neurologia e Neurofisiopatologia, Dip. di Neuroscienze, A.O. San Camillo-Forlanini, Roma

⁷Direzione Generale, AO San Camillo-Forlanini, Roma

Le connettivopatie ereditarie (CE) sono un gruppo clinicamente e geneticamente eterogeneo di sindromi dovute a mutazioni in geni codificanti diverse componenti del tessuto connettivo. La nosologia delle CE è in continuo aggiornamento ed include un numero sempre maggiore di condizioni, così come sempre crescente è il numero di pazienti diagnosticati. Dal 2009 l'ambulatorio della U.O.C. Laboratorio di Genetica Medica dell'A.O. San Camillo-Forlanini ha implementato il suo ruolo assistenziale e di ricerca delle CE e ciò risulta evidente dalla casistica che comprende: 179 sindromi di Ehlers-Danlos (tra varianti ipermobile, classica, vascolare e non classificate), 38 displasie scheletriche, 19 disostosi degli arti, 18 disostosi maxillofacciali, 17 craniosinostosi, 8 artrogriposi, 7 fibrillinopatie e sindromi vascolari, 7 difetti multipli della segmentazione costovertebrale ed 1 cutis laxa ereditaria. Recentemente è stata costituita una rete multidisciplinare che vede coinvolti specialisti afferenti all'A.O. San Camillo-Forlanini, al Policlinico Universitario Umberto I e all'Istituto Dermopatico dell'Immacolata di Roma. L'accertamento molecolare, quando necessario, viene eseguito prevalentemente in collaborazione con il Laboratorio di Citogenetica e Genetica Molecolare dell'Università degli Studi di Brescia (prof.ssa Marina Colombi). Da queste collaborazioni è emerso l'interesse per diverse problematiche correlate alla disabilità cronica, associata alle CE e di difficile gestione a causa della assenza di protocolli condivisi e terapie efficaci. A tale riguardo, si è ritenuto opportuno utilizzare la sindrome di Ehlers-Danlos come modello per tracciare percorsi diagnostico-assistenziali integrati e nuovi protocolli di studio della fisiopatologia delle CE. Da questa esperienza risulta evidente il ruolo che può avere il genetista clinico nel coordinamento delle diverse figure professionali coinvolte non solo nella fase diagnostica, ma anche e soprattutto, in quella gestionale delle CE.

Citogenetica del Dermatofibrosarcoma protuberans: descrizione di un caso

F. Cambosu¹, G. Fogu¹, G. Soro¹, L. Ulgheri¹, L. Corona¹, A. Bulla², E. Pancrazi², A. Montella¹

¹Università di Sassari, Dip. di Scienze Biomediche, U.O. Genetica Clinica, AOU Sassari

²Università di Sassari, Dip. di Scienze Chirurgiche, Microchirurgiche e Mediche, U.O. Chirurgia Plastica-Ricostruttiva, AOU Sassari

Il dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP) è una neoplasia fibroistiocitaria del derma profondo, a basso grado di malignità e di origine clonale, descritto per la prima volta da Darrier e Ferrand nel 1924. Il nome attuale si deve a Hoffman (1925) che lo descrisse ulteriormente e gli diede il nome di dermatofibrosarcoma protuberans.

Clinicamente il DFSP è un tumore caratterizzato da crescita localmente aggressiva con un elevato rischio di ricorrenza a livello locale ma con scarsa tendenza a dare metastasi a distanza e bassa mortalità (1-4%), a meno che non si verifichi una trasformazione in fibrosarcoma. Colpisce maggiormente giovani/adulti di età media (30-50 anni), interessa più frequentemente il tronco e le estremità prossimali; si manifesta con placche o piccole lesioni di tipo nodulare fino alla formazione di grandi masse multinodulari.

Dal punto di vista citogenetico il DFSP è caratterizzato da una traslocazione reciproca, t(17;22)(q22;q13) e più spesso da un cromosoma soprannumerario ad anello derivato da t(17;22), indicato come r(17;22). Tali anomalie possono essere considerate i marcatori citogenetici della patologia, essendo estremamente rari i casi in cui questi riarrangiamenti sono assenti.

Studi di ibridazione in situ fluorescente (FISH) hanno dimostrato la composizione 17/22 dei ring, che generalmente contengono il centromero del cromosoma 22 e sequenze 22cen-q13.1 e sequenze 17q22-qter.

Sia nei ring che nella t(17;22) è presente lo stesso riarrangiamento molecolare e cioè la fusione dei geni COL1A1 (17q21-q22), codificante per la catena $\alpha(1)$ del collagene di tipo 1 e il proto-oncogene c-sis PDGFB (22q13).

La fusione deregola PDGFB ponendolo sotto il diretto controllo del gene COL1A1 e attivandolo, ciò porta ad una produzione anomala di PDGFB, che sembra svolgere un ruolo importante nello sviluppo del DFSP.

Viene qui descritto un caso di DFSP in un paziente di sesso maschile di 42 anni, la cui lesione era presente da circa 15 anni, in cui all'analisi citogenetica convenzionale e molecolare è stata riscontrata la presenza di cromosoma soprannumerario ad anello singolo o multiplo con numero variabile di segnali di fusione COL1A1/PDGFB.

Crohn's disease loci are common targets of protozoa-driven selection

R. CAGLIANI¹, U. POZZOLI¹, D. FORNI¹, A. CASSINOTTI², S. ARDIZZONE², R. ASSELTÀ³, S. RIVA¹, M. BIASIN⁴, G.P. COMI⁵, N. BRESOLIN¹, M. CLERICI⁶, M. SIRONI¹

¹*Bioinformatics Laboratory, Scientific Institute IRCCS E. Medea, Bosisio Parini (LC)*

²*IBD Unit, Chair of Gastroenterology, Luigi Sacco University Hospital, Milan*

³*Dipartimento di Biologia e Genetica per le Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano, Milano*

⁴*Chair of Immunology, DISC LITA Vialba, University of Milano, Milano*

⁵*Dino Ferrari Centre, Department of Neurological Sciences, University of Milan, Fondazione Ca' Granda IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Milano*

⁶*Chair of Immunology, Department of Biomedical Sciences and Technologies LITA Segrate, University of Milan, Milano*

Previous studies indicated that a few risk variants for autoimmune diseases have been subject to pathogen-driven selection. Nonetheless, the proportion of risk loci that has been targeted by pathogens, and the type of infectious agent(s) which exerted the strongest pressure remain to be evaluated. We assessed whether different pathogens exerted a pressure on known Crohn's disease (CD) risk variants, and demonstrate that these SNPs are preferential targets of protozoa-driven selection ($p=0.008$). In particular, 19% of SNPs associated with CD have been subject to protozoa-driven selective pressure. Analysis of p values from GWASs and meta-analyses indicated that protozoan-selected SNPs display significantly stronger association with CD compared to non-selected variants. This same behavior was not observed for GWASs of other autoimmune diseases. Thus, we integrated selection signatures and meta-analysis results to prioritize 5 genic SNPs for replication in an Italian cohort. Three SNPs were significantly associated with CD risk and combination with meta-analysis results yielded p values $< 4 \times 10^{-6}$. The bona fide risk alleles are located in ARHGEF2, an interactor of NOD2, NSF, a gene involved in autophagy, and HEBP1, encoding a possible mediator of inflammation. Pathway analysis indicated that ARHGEF2 and NSF participate in a molecular network which also contains VAMP3 (previously associated to CD), and is centered around miR-31 (known to be dysregulated in CD). Thus, we show that protozoa-driven selective pressure had a major role in shaping predisposition to CD. We next used this information for the identification of three bona-fide novel susceptibility loci.

ANALISI CGH ARRAY IN QUATTRO CAMPIONI DI TUMORI RARI DELLE GHIANDOLE SALIVARI

G. Floridia¹, F. Censi¹, F. Novara², M.P. Foschini³, D. Taruscio¹

¹*Reparto Test Genetici, Centro Nazionale Malattie Rare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

²*Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Pavia*

³*Sez. di Anatomia Patologica, Dipartimento di Ematologia e Oncologia, Università di Bologna, Ospedale Bellaria, Bologna*

I tumori delle ghiandole salivari (TSG) sono rare neoplasie della testa e del collo con tassi grezzi di incidenza per 100.000 abitanti abitualmente al di sotto dell'unità, in modo costante tra le varie popolazioni e per entrambi i sessi.

I TSG rappresentano una categoria particolarmente eterogenea di neoplasie con una notevole varietà di aspetti istologici e comportamenti clinici.

L'eziologia dei TSG è poco conosciuta; ad oggi le radiazioni ionizzanti costituiscono l'unico fattore di rischio ufficialmente riconosciuto.

Lo studio di alterazioni genetiche/cromosomiche può portare ad una migliore comprensione dell'eziopatogenesi di questi rari tumori e all'identificazione di potenziali markers diagnostici e prognostici.

A tale scopo abbiamo analizzato mediante CGH array-piattaforma Agilent ad una risoluzione di circa 100 kb (slide 4x44k) quattro campioni paraffinati di TSG, in particolare: a) un caso di carcinoma adenoido cistico (ACC) cribriforme e la sua metastasi linfonodale; b) due tumori ibridi, istotipo rarissimo, di cui uno con componente epimioepiteliale (60%) e adenoido cistico (40%) e l'altro con componente mioepiteliale (90%) e adenoido cistico (10%).

Sono state ritrovate pochissime copy number alterations. L'ACC e la sua metastasi mostrano come unica alterazione la perdita in mosaico della regione 12q12-q14.2 di circa 30 Mb; l'alterazione è più rappresentata nel tessuto metastatico-circa 60% che nel tessuto del tumore primario-circa 40%.

Dei due tumori ibridi soltanto il caso con componenti mioepiteliale e ACC mostra una gain dei cromosomi 8 e 14 in mosaico cellulare-in circa il 60% e 80% delle cellule rispettivamente. In letteratura sono riportate negli ACC sia la perdita frequente delle regioni 12q13 e 12q24 che la presenza di un numero basso di alterazioni genomiche. Per quanto riguarda il numero bassissimo di sbilanciamenti genomici sia negli ACC che nei tumori ibridi può essere ipotizzato che probabilmente altri meccanismi di oncogenesi, quali mutazioni geniche o alterazioni epigenetiche, siano responsabili della tumorigenesi e della progressione tumorale di questi istotipi.

E' necessario comunque estendere l'analisi ad altri casi per una migliore comprensione dei meccanismi patogenetici molecolari di queste rare neoplasie.

DELEZIONE RICORRENTE 16p13.11

R. Pitta¹, M. Carella², G. Cassisi¹, M. Fichera¹, F. Guarnaccia¹, O. Palumbo², P. Palumbo², T. Mattina¹

¹*Genetica Medica –Università di Catania Centro di Riferimento Regionale per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico- Vittorio Emanuele di Catania*

²*Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

Introduzione

La microdelezione ricorrente 16p13.11 è un disordine genomico identificato in studi condotti su coorti di pazienti con disabilità intellettiva. L'aploinsufficienza dei geni coinvolti sembra essere il principale meccanismo alla base del quadro clinico: ritardo dello sviluppo, microcefalia, epilessia, bassa statura, dismorfismi facciali e disturbi del comportamento con penetranza incompleta ed espressività variabile.

Caso clinico

Descriviamo un paziente di sesso maschile, secondogenito di genitori non consanguinei, giunto alla nostra osservazione per ritardo dello sviluppo psicomotorio e tratti autistici. Il paziente presenta dimorfismi facciali, microcefalia e disturbo pervasivo dello sviluppo. Un fratello del propositus e lo zio materno presentano disturbo del linguaggio. Cariotipo e FRAXA negativi. L'analisi con SNP-array sulla famiglia dimostrava una delezione di circa 1.4 Mb nella regione 16p13.11 nel propositus e nel padre, non presenti nella madre e nel fratello. Sono attualmente in corso ulteriori accertamenti clinici sui genitori e sul fratello del propositus.

Conclusioni

Nel nostro paziente il riarrangiamento in 16p13.11 è stato ereditato dal padre in apparente buona salute. All'interno della regione deleta sono stati individuati due geni, NDE1 e NTAN1, che sembrerebbero correlare con il fenotipo neuro cognitivo. Il risultato confermerebbe la penetranza incompleta della microdelezione che si assocerebbe al fenotipo solo in presenza di altri fattori. In questa famiglia è presente anche un quadro clinico sfumato costituito da un disturbo del linguaggio, osservato nel fratello e nello zio materno del propositus, non segregante con la microdelezione 16p13.11. Le nostre ipotesi riguardo la correlazione genotipo fenotipo sono: 1) il quadro clinico del propositus è indipendente dalla microdelezione, ed è dovuto invece ad un fattore (da noi non identificato) responsabile anche delle manifestazioni osservate nel fratello e nello zio materno 2) il propositus presenta il quadro clinico per la contemporanea presenza della microdelezione trasmessa del padre e di un fattore aggiuntivo (da noi non identificato) trasmesso dalla madre e responsabile delle manifestazioni cliniche osservate nello zio materno e nel fratello.

Produzione e congelamento di linee iPSc come servizio alla ricerca

M. Castagnetta¹, M. Mogni¹, V. Viotti¹, C. Baldo¹, F. Fruscione², S. Viaggi³, F. Zara², D. Coviello¹

¹*S.C. Lab. di Genetica Umana, E.O. Ospedali Galliera*

²*UOC Neurologia pediatrica e Malattie muscolari, IRCCS G.Gaslini*

³*Dipartimento per lo studio del territorio, dell'ambiente e della vita (DISTAV)*

Le linee cellulari iPSc (induced Pluripotent Stem Cells) sono derivate da cellule somatiche e ottenute tramite la riprogrammazione con quattro o più fattori trascrizionali, tipicamente OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC.

La tecnologia delle iPSc rappresenta un potente modello sperimentale per studiare in vitro la patogenesi di malattie genetiche umane, laddove i modelli murini forniscono una rappresentazione limitata della patofisiologia umana. Sebbene la produzione di iPSc sia abbastanza standardizzata, il congelamento delle stesse presenta maggiori difficoltà rispetto alle linee non riprogrammate: diviene quindi di fondamentale importanza, per poter fornire ai ricercatori linee iPSc di buona qualità, mettere a punto un protocollo di congelamento affidabile ed efficiente.

A questo scopo, abbiamo confrontato il numero di colonie presenti in 5 diverse linee iPSc da noi prodotte prima e dopo il loro congelamento in N₂ liquido, impiegando diversi agenti crioprotettivi (CPA) (DMSO, glicerolo e DMSO con KOSR).

Delle linee iPSc impiegate, una è di tipo fetale, 3 hanno origine da soggetti adulti ed una è ottenuta da cellule staminali mesenchimali adulte.

Per tutte le linee iPSc è stato impiegato il terreno di coltura hESC (DMEM/F12; KOSR 20%; NEAA 1%; betamercaptoetanolo 1%) con l'aggiunta di FGF-2 alla concentrazione di 10 ng/ml. Le condizioni di congelamento hanno previsto l'impiego di supporti MrFrosty NALGENE, stoccaggio a -80°C per un tempo minimo di 1 giorno e successiva conservazione in N₂ per un tempo non inferiore a 10 giorni.

I 3 diversi terreni di congelamento utilizzati sono stati: hESC medium 90% + DMSO 10%, hESC medium 90% + Glicerolo 10%, ed infine KOSR (Invitrogen) 90% + DMSO 10%.

Allo scongelamento si è osservata globalmente una migliore resa del terreno di congelamento DMSO + KOSR con una resa in vitalità cellulare complessiva del 66% impiegando il metodo meccanico e del 64 % con l'uso di Accutase.

La resa del terreno con DMSO è sensibilmente più bassa, 26% prelevando le colonie meccanicamente e 31% e con l'uso di Accutase. Infine, la resa più bassa si è osservata impiegando glicerolo come CPA, 31% e 13 %, rispettivamente. Sono attualmente in corso ulteriori test di validazione tramite immunofluorescenza e RT-PCR.

Mutations in PRRT2 result in familial infantile convulsions with marked variability in clinical expression and SUDEP

P. Tarantino¹, G. Palamara², A. Labate², M. Gagliardi³, L. Mumoli², E. Ferlazzo², F. Cavalcanti¹, U. Aguglia², G. Incorpora⁴, A. Gambardella¹, G. Annesi¹

¹*Institute of Neurological Sciences, National Research Council, Mangone (CS), Italy*

²*Institute of Neurology University Magna Græcia, Catanzaro, Italy*

³*University Magna Græcia, Catanzaro, Italy*

⁴*Unit of Paediatrics, University Hospital "Arezzo-Trifiletti", Ragusa, Italy*

Benign familial infantile seizures (BFIS) is an autosomal dominant disorder characterized by afebrile seizures that begin at age 3-12 months with a favorable outcome. A recent discovery has identified heterozygous mutations in PRRT2 on chromosome 16p, which encodes proline-rich transmembrane protein 2, in most families affected by BFIS. PRRT2 is also the major causative gene for familial paroxysmal kinesigenic dystonia (PKD), a rare disorder characterized by episodic attacks of choreoathetosis or dystonia. These results have corroborated the existence of familial infantile convulsions with paroxysmal choreoathetosis (ICCA, OMIM 602066) that shares overlapping clinical features with BFIS and PKD. In this study, we performed mutation screening of PRRT2 in our collected families with BFIS, ICCA or PKD phenotypes. The whole genomic region of PRRT2 was sequenced in seven Italian families, of which six with BFIS or ICCA phenotype, and one family with PKD phenotype. The previously reported mutation, c.649dupC (p.R217Pfs*7), was found in two families with BFIS phenotype, and in one family with ICCA. In an additional BFIS family, a missense mutation, c.718C/T (R240X), was identified. All these mutations co-segregated with the disease in these families and were not observed in 300 control subjects of matched ancestry. In the ICCA family, two affected members displayed a more complex phenotype with episodic ataxia, mental retardation and migraine attacks. In one family that also carried the c.649dupC mutation, one affected member died at age of 13 years of SUDEP. This study confirms the major role of PRRT2 mutations in families with BFIS phenotypes. Our findings also enlarge the clinical spectrum related to PRRT2 mutations and underscore the complexity of the phenotypic consequences of mutations in this gene.

MALATTIA DI HUNTER (MPS II) IN PAZIENTE DI SESSO FEMMINILE CON TRASLOCAZIONE CROMOSOMICA X;9

C. Lombardi¹, P. Di Natale², M. Filocamo³, M. Maioli¹, G. Pontarelli², S. Lualdi³, M. Ciavarella¹, F. Lonardo¹, G. Scarano¹

¹U.O. Genetica Medica, A.O.R.N. "Gaetano Rummo" Benevento

²Dip. Ass. Medicina di Laboratorio, Area Funz. Indagini Diagnosi Mucopolisaccaridosi, Università Federico II, Napoli

³Dip. Di Ricerca e Diagnostica, UOSD Centro di Diagnostica Genetica e Biochimica delle Malattie Metaboliche, Istituto G. Gaslini, Genova

Bambina di 9 anni viene in consulenza per ritardo di crescita staturale. La valutazione clinica aggiunge malocclusione di III ° classe, lieve ipertrofia gengivale, brachidattilia, dita delle mani in flessione, difficoltà dei movimenti in pronazione e ridotta mobilità in flessione dei gomiti, iperlordosi lombare, bassa statura (-4DS), peso (25-50°pc), normale sviluppo intellettuale con rendimento scolastico buono. L'esame radiologico dello scheletro mostra lieve disostosi multipla: anispondilia, inclinazione delle estremità distali di radio ed ulna una verso l'altra, ossa carpali piccole ed irregolari, colpo d'unghia delle estremità prossimali II-V metacarpo.

Sebbene il quadro clinico fosse fortemente suggestivo di MPS di tipo I (Hurler, AR) o II (Hunter, X-linked), le nostre prime indagini, in presenza di paziente di sesso femminile, sono indirizzate verso il dosaggio dell'enzima alfa-L-iduronidasi, la cui presenza, nel range della norma, esclude la MPS I. Il dosaggio dell'iduronato2-solfatasi, eseguito subito dopo dimostra totale assenza di attività enzimatica e consente di diagnosticare, in soggetto di sesso femminile, la malattia di Hunter. Poiché l'analisi di sequenza del gene IDS non evidenzia mutazioni nelle regioni genomiche codificanti e nelle regioni introniche limitrofe, deputate allo splicing, si procede con l'analisi del cariotipo. L'esame cromosomico evidenzia una traslocazione reciproca de novo apparentemente bilanciata tra il braccio lungo di un cromosoma X ed il braccio lungo di un cromosoma 9, con punti di rottura in Xq28 e 9q12 (bandeggio GTG, risoluzione 550-600 bande). L'esame citogenetico per la replicazione differenziale del cromosoma X mediante incorporazione di BrdU e successiva colorazione con arancio di acridina mostra in tutte le 50 metafasi esaminate l'inattivazione del cromosoma X normale. Il test HUMARA conferma l'inattivazione preferenziale di uno dei due cromosomi X, che risulta essere quello materno. La traslocazione, quindi, coinvolge il cromosoma X di provenienza paterna. L'aCGH non evidenzia sbilanciamenti criptici (CytoChip ISCA 4x180K, risoluzione 60 Kb per le delezioni, 80 Kb per le duplicazioni). Attualmente sono in corso ulteriori indagini per chiarire le basi molecolari della malattia.

Ampliamento del pannello FISH per una migliore caratterizzazione citogenetica dei pazienti con Leucemia Linfatica Cronica

L. Falai¹, A. Valencia ¹, D. Gargano¹, A. Lari¹, F. Cutinelli¹, F. Donati¹, G. Nannetti¹, F. Torricelli¹

¹*SOD Diagnostico Genetico. AOU Careggi. Firenze*

La leucemia linfatica cronica (LLC) è una neoplasia del sistema linfatico caratterizzata da un accumulo di linfociti nel sangue periferico, nel midollo osseo e negli organi linfatici. Presenta alterazioni citogenetiche significative per la diagnosi e prognosi di malattia però nessuna è specifica della malattia. Risulta difficile ottenere metafasi nelle cellule leucemiche della LLC perciò la FISH è la tecnica che viene comunemente utilizzata nella routine, identificando anomalie cromosomiche nell'80% dei casi di LLC. Le alterazioni citogenetiche che più frequentemente vengono studiate mediante FISH sono la del(17p), del(11q), +12 e del(13q14) (in ordine di importanza decrescente riguardo la prognosi). Tuttavia, l'identificazione di altri difetti citogenetici come la del(6q) e le alterazioni del gene IgH (14q32) e molecolari come le mutazioni del gene TP53 sono importanti per una caratterizzazione più completa di questi pazienti.

Lo scopo di questo studio è stato quello di identificare ulteriori alterazioni citogenetiche presenti nei casi di LLC alla diagnosi. In aggiunta alle sonde FISH usate nel pannello LLC classico che ibridano regioni nel: 17p, 11q, 12q, 13q sono state incluse sonde per le regioni 6q21 e 14q32. I casi presi in esame sono 9 con diagnosi di LLC confermata.

Dall'anno 2011 ad oggi sono arrivati ai laboratori della SOD Diagnostica Genetica (AOU Careggi) 60 casi di LLC. A 54 di questi pazienti (90%) è stato effettuato il pannello LLC classico, e 26 casi (48%) hanno mostrato una o più alterazioni citogenetiche. In 9 di questi casi, usando le sonde che ibridano nelle bande 6q21 e 14q32, abbiamo notato che: nessuno presenta alterazioni nella banda 6q21 e 5 (56%) presentano alterazioni nella regione IgH (14q32). Di questi 5, un caso (11%) presenta un segnale di fusione compatibile con la perdita della regione 14q32, due (22%) presentano un pattern di ibridazione compatibile con una traslocazione della regione IgH su un altro cromosoma, due (22%) presentano una delezione parziale del 14q32.

A conclusione di questo studio possiamo affermare che per una migliore caratterizzazione di pazienti con LLC risulta utile l'utilizzo di sonde che ibridano la regione 14q32 vista l'elevata frequenza di alterazioni rilevate in questa regione.

Riscontro in diagnosi prenatale di isocromosoma 18p in mosaico

L. Ulgheri¹, F. Cambosu¹, P.M. Campus¹, M. Farina², G. Pirisi², L. Iervolino², A. Oggiano¹, R. Orizi¹, S. Riccio¹, R. Sanna¹, G. Soro¹, A. Montella¹

¹*Università di Sassari, Dip. di Scienze Biomediche, U.O. Genetica Clinica, AOU Sassari*

²*Università di Sassari, Dip. di Scienze Chirurgiche Microchirurgiche e Mediche, U.O. Ostetricia e Ginecologia, AOU Sassari*

La tetrasomia 18p è una rara anomalia dovuta alla presenza di un piccolo cromosoma metacentrico soprannumerario isocromosoma 18p i(18p). L'anomalia è correlata con ritardo psicomotorio da moderato a severo, microcefalia e anomalie cranio-facciali e scheletriche.

La sindrome da tetrasomia 18p è ben documentata in letteratura, mentre sono rari i casi descritti di diagnosi prenatale con tetrasomia da i(18p) a mosaico la cui gravidanza è stata portata a termine. Nonostante i pochi casi descritti non forniscano elementi chiarificatori sulla sintomatologia clinica, la gravità del fenotipo sembra essere apparentemente legata all'entità del mosaico. E' stata ipotizzata una selezione negativa delle cellule come accade nell'iso 12p.

Descriviamo un caso di iso(18p) riscontrato in diagnosi prenatale in una donna di 41 anni, sottoposta ad amniocentesi alla 16ma settimana di gestazione per età materna avanzata. I test biochimici risultavano nella norma con rischio combinato < a 1/10000. All'anamnesi è emersa l'assunzione di Escitalopram durante le prime 4 settimane di gestazione e malformazione dell'ultima vertebra lombare nel padre. All'anamnesi familiare sono stati riferiti due casi di lieve RM in un cugino della madre ed in un fratello della nonna paterna ed un caso di morte perinatale in uno zio del padre. L'analisi citogenetica convenzionale riscontrava la presenza di isocromosoma 18p soprannumerario in mosaico (24%). La natura dell'isocromosoma è stata confermata dai successivi studi di FISH, atti anche a meglio quantificare e caratterizzare il mosaico, con sonde specifiche per il centromero, il telomero del braccio p e painting del cromosoma 18. Le analisi di FISH sono state effettuate su colture in situ e in fiasca, riscontrando percentuali di mosaico diverse nelle due colture (in situ 25,4%; in fiasca 15,9%); lo studio è stato esteso ai successivi passaggi colturali al fine di valutare l'eventuale correzione del mosaico.

Il cariotipo su sangue periferico dei genitori risultava normale. L'analisi ecografica di primo e secondo livello e l'ecografia cardiaca fetale non hanno evidenziato anomalie morfologiche nel feto

Dopo consulenza genetica la coppia decideva di portare a compimento la gravidanza, che è tuttora in corso.

GENETICS OF ALS IN PIEDMONT-ITALY: RESULTS OF A POPULATION BASED STUDY

M. Brunetti¹, I. Ossola¹, A. Calvo², M. Barberis¹, F. Lombardo¹, C. Moglia², S. D'Alfonso³, L. Corrado³, L. Mazzini⁴, G. Restagno¹, A. Chiò²

¹*Medical Genetics Unit, AO Città e della Salute e della Scienza, Presidio OIRM-S. Anna, Torino, Italy*

²*ALS Center, Department of Neuroscience, University of Torino, Italy*

³*Department of Medical Sciences, Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Disease, A. Avogadro University, Novara, Italy*

⁴*Department of Neurology, A. Avogadro University and Maggiore della Carità Hospital, Novara, Italy*

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a degenerative disorder of adult age involving motor system, with a progressive and invariably fatal course. In 5% of cases it is considered to be genetically transmitted (familial ALS, fALS) (Byrne et al, 2010) while in the remaining cases it occurs sporadically in the population (sporadic ALS, sALS). Several genes have been found to cause ALS: SOD, TARDBP, FUS, OPTN, and the recently described C9ORF72. However no population-based studies have systematically studied the frequency of mutations of these genes in a well defined population.

The aim of this study is to assess the frequency of mutations of SOD1, TARDBP, FUS, OPTN and C9ORF72 in an epidemiological series of cases diagnosed in Piemonte and Valle d'Aosta, Italy, during the period January 1, 2007, to June 30, 2011, and to compare the clinical characteristics of patients with and without genetic mutations.

A total of 475 patients were included in the study: overall, 51 patients (10.7% of the whole series) carried a mutation of an ALS-related gene (67.4% of the 46 fALS and 4.7% of the 429 apparently sALS). 32 ALS cases carried a hexanucleotide repeat expansion of C9ORF72 gene, representing 6.7% of all ALS cases and 62.7% of all mutated cases. Among these cases, 24 (75%) had a family history for ALS, FTD or both. Frequency of SOD1 mutations was 2.1% of all ALS cases and 19.6% of all mutations; 1.5% of all ALS cases carried mutation of TARDBP gene (13.7% of all mutations). One patient had the p.R514S missense mutation of the FUS gene. We detected one fALS carrying the never previously described p.L500P missense mutation in OPTN gene.

In conclusion, at least 10% of ALS patients carry a genetic mutation of one of the major ALS genes, with C9ORF72 being the commonest genetic alteration in this Italian mainland population. In the clinical setting, the presence of co-morbid FTD or a young age at onset are strong indicators of a possible genetic origin of the disease, and should induce to propose to the patient a genetic counseling. Our notion of hereditary ALS, as well the nosological classification of ALS as a pure motor system disorder, are rapidly evolving to encompass a broader clinical continuum from pure ALS to pure FTD.

ETEROZIGOSI COMPOSTA PER MUTAZIONI DEL GENE SHOX IN UNA PAZIENTE PAUCISINTOMATICA

R. Gauci¹, A. Costa¹, A.M. Baffico², G. Giliberto¹, E. Mazzola¹, I. Mura², V. Nicotra¹, T. Mattina¹

¹*Genetica Medica –Università di Catania Centro di Riferimento Regionale per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico- Vittorio Emanuele di Catania*

²*Laboratorio di Genetica Umana - E.O. Ospedali Galliera Genova*

Introduzione

Il gene SHOX, Short stature HOmeoboX-containing gene, è un gene localizzato nell'estremità del braccio corto dei cromosomi sessuali X ed Y, all'interno della porzione telomerica.

Tale gene sarebbe espresso soprattutto in corrispondenza del terzo medio degli arti specialmente a livello del gomito e delle ginocchia, della porzione distale del radio, dell'ulna e del polso. Questo specifico pattern d'espressione spiegherebbe le manifestazioni dell'aploinsufficienza di SHOX caratterizzate da bassa statura, deformità di Madelung e brevità del IV metacarpo. Omozigosi o eterozigosi composta per mutazioni del gene si associa clinicamente alla più severa displasia mesomelica di Langer

Caso Clinico

B.L., 13 anni, giunge in consulenza per iposomia. All'esame molecolare del gene SHOX viene evidenziata una delezione eterozigote che include il gene SHOX e una regione regolatrice del gene, localizzata all'esterno del gene SHOX.

L'esame molecolare viene esteso anche alla madre di B. L., la quale presenta iposomia e deformità di Madelung; la signora, nonostante il fenotipo mild, risulta eterozigote composto: presenta, infatti, su un allele la mutazione già diagnosticata nel figlio e sull'altro una delezione parziale della regione regolatrice del gene stesso. L'esame molecolare è stato esteso ai nonni materni ed una zia materna del propositus.

Conclusioni

Riportiamo i risultati dell'esame molecolare del gene SHOX in una famiglia in cui diversi soggetti presentano bassa statura, ed il quadro clinico dei soggetti positivi inclusa una donna con eterozigosi composta per mutazioni del gene.

UN CASO DI DUPLICAZIONE DI 400 KB IN XP22.12 CONTENENTE IL GENE RPS6KA

A. Valetto¹, V. Bertini¹, B. Toschi¹, C. Cosini¹, P. Simi¹

¹*U.O. Citogenetica e Genetica Molecolare, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, Pisa*

Riportiamo il caso di un bambino di 12 anni, giunto alla nostra osservazione per lieve ritardo neuropsichico e peculiari note morfologiche della facies, quali profilo piatto, fronte ampia, naso piccolo con narici anteverse, orecchie piccole e a basso impianto, filtro corto, palato stretto e denti affollati. La deambulazione è stata acquisita all'età di 14 mesi ed ha presentato ritardo di acquisizione del linguaggio che ha richiesto logopedia dall'età di 4 anni. All'età di 9 anni è stata diagnosticata la presenza di ipoacusia neurosensoriale moderata che ha richiesto protesizzazione.

L'analisi CGH-array ha mostrato una duplicazione di circa 400 kb della regione Xp22.12. Tale duplicazione è presente nella madre. La regione contiene un solo gene, RPS6KA, che codifica un membro della famiglia serin/treonina chinasi RSK, coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare, nella differenziazione e nella sopravvivenza cellulare.

Dall'analisi della letteratura emerge che il paziente riportato presenta la più piccola duplicazione Xp22.12 che contenga solo il gene RPS6KA. Il quadro fenotipico del paziente è discusso in relazione all'attività funzionale del gene e a casi simili riportati in letteratura.

The role of the rs1333040 SNP (9p21.3) on clinical and angiographic outcomes in early-onset myocardial infarction.

N. Marziliano¹, V. Motta³, F. Orsini³, S. Veronese³, D. Ardissino⁴, P.A. Merlini¹

¹*Unità Ricerche Clinica-Cardiologia IV, AO Ospedale Niguarda Cà Granda Milano*

²*Dipartimento di Scienze del Benessere, Università del Molise*

³*Laboratorio di Patologia Molecolare, AO Ospedale Niguarda Cà Granda Milano*

⁴*AO-Universitario di Parma*

OBJECTIVES: The purpose of this study was to test whether the 9p21.3 variant rs1333040 influences the occurrence of new cardiovascular events and coronary atherosclerosis progression after early-onset myocardial infarction.

BACKGROUND: 9p21.3 genetic variants are associated with ischemic heart disease and coronary artery disease, but it is not known whether they influence prognosis after an acute coronary event.

METHODS: Within the Italian Genetic Study of Early-onset Myocardial Infarction, we genotyped by means of TaqMan Assays, the locus rs1333040 in 2,008 patients hospitalized for a first myocardial infarction before the age of 45 years who underwent coronary angiography without index event coronary revascularization. They were followed up for major cardiovascular events and angiographic coronary atherosclerosis progression.

RESULTS: Over 16,599 person-years, there were 883 cardiovascular events and 692 primary endpoints: 77 cardiovascular deaths, 223 recurrences of myocardial infarction, and 383 coronary artery revascularizations. The rs1333040 genotype had a significant influence ($p = 0.01$) on the primary endpoint, with an adjusted hazard ratio of 1.19 (95% confidence interval [CI]: 1.08 to 1.37) for heterozygous carriers and 1.41 (95% CI: 1.06 to 1.87) for homozygous carriers. Analysis of the individual components of the primary endpoints provided no significant evidence that the rs1333040 genotype influenced the hazard of cardiovascular death ($p = 0.24$) or the recurrence of myocardial infarction ($p = 0.57$), but did provide significant evidence that it influenced on the hazard of coronary revascularization, with adjusted heterozygous and homozygous ratios of 1.38 (95% CI: 1.17 to 1.63) and 1.90 (95% CI: 1.36 to 2.65) ($p = 0.00015$), respectively. It also significantly influenced the angiographic endpoint of coronary atherosclerosis progression ($p = 0.002$).

CONCLUSIONS: In early-onset myocardial infarction, the 9p21.3 variant rs1333040 affects the progression of coronary atherosclerosis and the probability of coronary artery revascularization during long-term follow-up.

Structural chromosomal abnormalities detected during CVS analysis and their role in the prenatal ascertainment of cryptic subtelomeric rearrangements

M.C. Pittalis¹, A. Mattarozzi¹, C. Menozzi², M. Malacarne³, E. Pompili⁴, A. Percesepe²

¹*Lab. Citogenetica, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna*

²*Genetica Medica, Policlinico di Modena*

³*Lab. Genetica, Ospedale Galliera, Genova*

⁴*Genetica Medica, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna*

Mosaic structural chromosomal abnormalities observed along the trophoblast-mesenchime-fetal axis, although rare, pose a difficult problem for their prognostic interpretation during prenatal diagnosis. Additional issues are raised by the presence of derivatives of the same chromosome showing different sizes in the different tissues, i.e. deletions and duplications in the cytotrophoblast and mesenchime of chorionic villi. These cytogenetic arrangements are thought to originate from the postzygotic break of a dicentric chromosome or of the product of the first anaphasic break. Selection versus the most viable cell line(s) may result in a confined placental mosaicism of the most severe unbalancement(s), favouring the presence of the cell lines with the mildest duplications or deletions in the fetal tissues.

We document three cases of ambiguous results in CV analysis due to the presence of structural chromosomal abnormalities which were differently represented in the trophoblast and the mesenchyme. The grossly rearranged chromosome in one of the CV preparations (direct or culture) was crucial to raise the attention towards the involved chromosomal region in other tissues (villi or amniotic fluid), allowing the prenatal diagnosis through molecular cytogenetic methods of subtelomeric rearrangements [del(7)(q36qter); del(11)(q25qter); del(20)(p13pter)]. Due to the size of the deletion, the mentioned rearrangements would have surely escaped from detection with the routine banding techniques.

In conclusion, the possibility to diagnose complex abnormalities predisposing to cryptic subtelomeric rearrangements, together with a better knowledge of the initial/intermediate products leading to the final abnormal cryptic deletion should be included into the advantages of the CVS technique.

Analisi citogenetica e valutazione clinica dei casi di Sindrome Mielodisplastica osservati nel periodo 2010-2012 presso l'U.O. di Genetica Clinica-AOU Sassari

F. Cambosu¹, P.M. Campus¹, S. Bonfigli², A. Oggiano¹, R. Sanna¹, G. Soro¹, A. Montella¹

¹Università di Sassari, Dip. di Scienze Biomediche, U.O. Genetica Clinica, AOU Sassari

²Università di Sassari, Dip. di Scienze Biomediche, U.O. Ematologia, AOU Sassari

Le sindromi mielodisplastiche (MDS) sono un gruppo di disordini emopoietici eterogeneo da un punto di vista clinico, biologico e morfologico, a patogenesi non ben definita caratterizzate da ematopoiesi inefficace e displastica. Nei pazienti si riscontra citopenia periferica accompagnata a ipercellularità midollare e aumentato rischio di evoluzione in leucemia mieloide acuta (AML). Sono colpiti per lo più soggetti adulti (65-70 anni), con prognosi e range di sopravvivenza altamente variabili.

L'eterogeneità si riscontra anche a livello genetico con un' enorme variabilità di anomalie citogenetiche, spesso rare, che rendono difficile la comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nelle anomalie stesse e conseguentemente il loro valore prognostico. Le anomalie sbilanciate sono caratteristiche delle MDS: le trisomie parziali o totali sono rare, mentre sono più frequenti le delezioni parziali e/o monosomie. Si può quindi assumere che il meccanismo molecolare fondamentale nelle MDS è rappresentato dalla perdita o inattivazione di geni oncosoppressori. Circa il 50% dei pazienti mostrano anomalie cromosomiche clonali fra le quali le più frequenti sono: -5/5q-, -7/7q-, +8 e 20q-.

Il WPSS, sistema prognostico basato sulla classificazione WHO comprende le caratteristiche morfologiche secondo WHO, la citogenetica secondo IPSS e il fabbisogno trasfusionale. Quest'ultima scala di valutazione ha portato a identificare cinque classi di rischio, da molto basso a molto alto, in funzione delle anomalie riscontrate.

La delezione interstiziale del cromosoma 5, caratterizzata da anemia refrattaria e aspetti clinici caratteristici si associa a una sindrome ben definita (Sdr. 5q-) che risponde al lenalidomide, farmaco immunomodulatore e anti-angiogenetico capace di indurre completa remissione citogenetica.

Nel presente studio sono riportati i dati citogenetici e clinici relativi ai pazienti con MDS giunti alla nostra osservazione nel periodo 2010- 2012.

ARX-dependent KDM5C defects are associated to X-Linked Intellectual Disability and Epilepsy

L. Poeta⁸, F. Fusco¹, D. Drongitis¹, A. Padula¹, C. Shoubridge⁹, G. Manganeli¹⁰, S. Filosa¹⁰, M. Paciolla⁸, P. Collombat¹¹, M.B. Lioi², J. Gecz⁹, M.V. Ursini¹, M.G. Miano¹

¹*Institute of Genetics and Biophysics 'ABT', CNR, Naples, Italy*

²*University of Basilicata, Potenza, Italy*

³*Dep. of Paediatrics, University of Adelaide, SA Adelaide, Australia*

⁴*Dep. of Genetics and Molecular Pathology, SA Adelaide, Australia*

⁵*IRCCS, Neuromed, Pozzilli, Italy*

⁶*Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France*

⁷*Inserm U1091, IBV, Diabetes Genetics Team, Nice, France*

⁸*Institute of Genetics and Biophysics 'ABT', CNR, Naples, Italy, University of Basilicata, Potenza, Italy*

⁹*Dep. of Paediatrics, University of Adelaide, SA Adelaide, Australia, Dep. of Genetics and Molecular Pathology, SA Adelaide, Australia*

¹⁰*Institute of Genetics and Biophysics 'ABT', CNR, Naples, Italy, IRCCS, Neuromed, Pozzilli, Italy*

¹¹*Université de Nice-Sophia Antipolis, Nice, France, Inserm U1091, IBV, Diabetes Genetics Team, Nice, France*

Intellectual Disability (ID) and Epilepsy often occur together with a dramatic impact on the development and quality of life of the affected children. PolyAlanine expansion mutations of Aristaless-related homeobox gene (ARX) cause a spectrum of X-chromosome phenotypes with ID (XLID) and various forms of malignant paediatric epilepsy. We here present that lysine (K)-specific demethylase 5C (KDM5C/JARID1C/SMCX), a known XLID gene involved in chromatin remodeling, is an ARX-dependent target, demonstrating a functional link between these two XLID/Epilepsy genes. Combining luciferase reporter and DNA binding assays, we reveal that ARX directly binds a CNE in the 5' region of KDM5C. Our investigation into the functional properties of ARX with PolyAlanine expansions have demonstrated that changes in the repeat units cause a decreased trans-activating activity and a reduced, but not abolished, binding to the KDM5C regulatory region. In the Arx KO ES disease model, a decreased level of Kdm5C mRNA and protein has been shown to be associated with an increased level of H3K4me3, a defect that could compromise cyclical rounds of methylation-demethylation and consequently the genes in DNA "off" and "on". These data suggest that ARX and KDM5C may be functionally connected in specific neuronal paths, which once identified, could facilitate the dissection of the peculiar neurophenotypes observed in XLID and Epilepsy patients. Overall, a role for chromatin packaging in ARX diseases is an attractive hypothesis as it expands our horizons of the modes of PolyAlanine pathogenesis; however further study is required.

SOMATIC MOSAICISM IN TPM2-RELATED MYOPATHY WITH NEMALINE RODS AND CAP STRUCTURES

F. Fattori¹, G. Tasca², E. Ricci³, M. Monforte³, V. Rizzo³, E. Mercuri⁴, G. Silvestri³, E. Bertini¹

¹*Lab. di Medicina Molecolare, Dip. di Neuroscienze, Osp. Pediatrico Bambino Gesù, Roma*

²*Fondazione Onlus Don Carlo Gnocchi*

³*Istituto di Neurologia, Università Cattolica, Roma*

⁴*U.O. Neurologia Pediatrica, Università Cattolica, Roma*

Cap myopathy is a congenital myopathy in which peripheral “caps” of disorganized thin filaments are seen in muscle fibres. Dominant mutations in the TPM2 gene encoding for β -tropomyosin, an isoform mainly expressed in type 1 striated muscle fibers, are associated with different congenital myopathies, including nemaline and cap myopathy, and distal arthrogryposis syndromes.

In this work we describe the clinical, pathologic, genetic and muscle imaging findings in a Macedonian family with two siblings affected by congenital myopathy showing both rods and cap-like structures caused by a TPM2 mutation

The proband, a 15-year-old girl, presented with slowly progressing muscle weakness in the first decade, after normal achievement of motor milestones. At age 13, she developed rapidly progressing scoliosis and respiratory failure, leading to hypercapnic coma, with subsequent tracheostomy. She had long narrow face, scoliosis and rigid spine without other contractures. CK level was normal, EMG was myopathic with normal nerve conduction studies, and cardiological examinations were normal.

Her 14-year-old brother displayed a similar, although milder, phenotype. He had elongated face, high arched palate, rigid spine and mild scoliosis. Ankle extensors, neck flexors, supra and infraspinatus muscles were weak. Nerve conduction studies, CK level and cardiological examinations were normal.

Their parents were reported to be healthy, as well as another sister.

The clinical and radiological phenotype of the siblings resembled that of SEPN1-related myopathy, while biopsy showed both nemaline rods and cap structures. Genetic testing revealed a c.412_414delGAG dominant TPM2 mutation. Their father, who had only subtle skeletal deformities and no muscle symptoms, was a somatic mosaic for the mutation. Muscle MRI features were homogeneous in all affected members.

Besides confirming the association between a congenital myopathy characterized by coexistence of nemaline rods and cap-like structures and TPM2 mutations, we show the detection of a mosaicism in a clinically asymptomatic individual expanding the phenotypic spectrum of mutations in TPM2.

MC1R VARIATION AND MELANOMA RISK IN RELATION TO HOST/CLINICAL AND ENVIRONMENTAL FACTORS IN CDKN2A POSITIVE AND NEGATIVE MELANOMA PATIENTS

L. Pastorino¹, L. Bonelli², W. Bruno¹, M. Barile³, V. Andreotti¹, S. Nasti¹, L. Battistuzzi⁴, M. Grosso⁵, P. Queirolo¹, G. Bianchi Scarrà¹, P. Ghorzo¹

¹*Dip di Medicina Interna e Specialità Mediche, Università degli Studi di Genova, Lab di Genetica dei Tumori Ereditari rari, IRCSS AOU San Martino-IST, Genova*

²*Div Prevenzione Secondaria e Screening, IRCCS AOU San Martino-IST Genova*

³*Div Prevenzione e Genetica Oncologica, IEO, Milano*

⁴*Dip di Scienze della Salute, Università degli Studi di Genova*

⁵*Oncologia Medica, IRCCS AOU San Martino-IST, Genova*

BACKGROUND: Host, environmental, and genetic factors modulate cutaneous melanoma risk. Currently, major genetic risk determinants are germline mutations in the major known high-risk susceptibility genes, CDKN2A and CDK4, and variants of the low-risk gene MC1R, which plays a key role in the pigmentation process, and has been proposed as a genetic modifier of CDKN2A mutations. **AIM:** The distribution and relative weight of the genetic factors involved in CM susceptibility appear to vary across populations and few epidemiological case-control studies have been conducted in Italy to investigate their role. We have therefore investigated the influence of the main host and environmental risk factors as well as of MC1R variation on CM risk in CDKN2A- negative and CDKN2A- positive Italian CM patients.

METHODOLOGY: This is a case control study: 439 histologically confirmed CM cases and 490 controls were interviewed on their family history, host and environmental risk factors, and genotyped for CDKN2A and MC1R.

RESULTS : Multivariate analysis showed that MC1R variation, number of nevi and childhood sunburns doubled melanoma risk in 390 CDKN2A-negative individuals. In 49 CDKN2A-positive individuals, family history of melanoma and presence of atypical nevi, rather than MC1R status, modified disease risk(20.75- and 2.83-fold, respectively). Finally, occupational sun exposure increased melanoma risk (3 to 6-fold) in both CDKN2A- and CDKN2A+ individuals, reflecting the occupational habits of the Ligurian population and geographical position of the region.

CONCLUSIONS: In conclusion, the results of this study confirm previous findings in our population showing that CDKN2A-positive CM cases have substantially fewer MC1R variants than cases from other geographic areas and that our cases do not show an association between MC1R and CM risk . The present study suggests that other genes, besides MC1R, may modify CM risk in CDKN2A + cases, and that MC1R plays a role in CM development in CDKN2A- cases both via pigmentary and non-pigmentary pathways.

Overall, as different host/clinical, environmental, and genetic characteristics emerged as independent risk factors in CDKN2A+ and CDKN2A- CM cases, our results have potential implications for genetic counseling.

CARATTERIZZAZIONE DEI GENI FUS, TARDBP E C9ORF72 NEI PAZIENTI SARDI CON SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

N. Orru¹, P. Ragatzu², A. Floris², I. Bellini², C. Culigioni², R. Murru¹, C. Carcassi², S. Orru²

¹*SC Genetica Medica, P.O. Binaghi, ASL Cagliari,*

²*Genetica Medica -Dip di Scienze Mediche- Università di Cagliari*

Recentemente alcune varianti dei geni FUS, TARDBP e C9ORF72 sono state descritte come patogenetiche nella sclerosi laterale amiotrofica (ALS). Lo scopo di questo studio era quello di caratterizzare la variabilità genetica di questi geni in un campione di 150 pazienti sardi affetti da ALS. Le regioni codificanti dei geni FUS e TARDBP sono state analizzate mediante sequenza diretta dei prodotti di PCR, mentre per determinare la presenza di espansioni patogenetiche della ripetizione GGGGCC il gene C9ORF72 è stato analizzato mediante repeat-primed PCR assay. Relativamente al gene TARDBP la variante p.A382T (c1144G>A) era presente in 41 pazienti (27%) di cui la maggior parte mostrava una storia familiare. Una seconda variante p.G295S era presente in un solo paziente comunque di origine sarda. Diciassette pazienti (11%) presentavano più di 30 ripetizioni GGGGCC al gene C9ORF72, mentre nessun paziente presentava varianti considerate patogenetiche al gene FUS. Noi abbiamo stimato la penetranza della variante p.A382T del gene TARDBP relativamente all'età in un campione di 47 portatori. La penetranza media a 70 anni era 60% (95% CI 41-79%) con una tendenza a un rischio maggiore a parità di età per gli individui di sesso maschile. Lo studio con marcatori genetici fiancheggiati i geni TARDBP e C9ORF72 ha messo in luce un effetto fondatore per le varianti patogenetiche dei due geni. La variabilità fenotipica tra i pazienti portatori di varianti geniche patogenetiche non era significativamente differente rispetto a quella dei pazienti con un genotipo selvatico indicando in questo modo che essa deve riferirsi a un contesto multifattoriale anche in presenza di un fattore causale altamente penetrante come quelli determinati dai geni TARDBP e C9ORF72.

Microdelezione 6q25.1: descrizione di un caso clinico

S. Briuglia¹, I. Loddo¹, E. Moschella¹, V. Salpietro Damiano¹, M.R. Pizzino¹, F.L. De Luca¹, M.P. Calabrò¹, C. Salpietro Damiano¹

¹*Dipartimento Materno-Infantile, UOC di Genetica ed Immunologia Pediatrica, Messina*

Descriviamo il caso clinico di una bambina, giunta alla nostra osservazione all'età di 1 anno e 2/12. Secondogenita, nata da genitori non consanguinei alla 37° settimana di gestazione da TC per sofferenza perinatale e arresto di crescita intrauterina. Alla nascita peso 2,240 Kg; diagnosi di DIV perimembranoso sottoaortico per cui inizia terapia con Furosemide e ACE-Inh; riscontro di pielectasia renale sx; asimmetria ventricolare all'ETF. Cariotipo nella norma. All'esame fenotipico presenza di: angioma frontale, radice del naso piatto, epicanto, elice di destra ripiegato, collo corto, mani e piedi piccoli, ptosi palpebrale, iperlassità articolare, cute sovrabbondante e lassa, ipotonia generalizzata, fossetta sacro coccigea, peso e altezza al di sotto del 3° centile. All'età di 1 anno e 6/12, ricovero per scarsa crescita, vomito ricorrente con rifiuto dell'alimentazione ed episodi di aritmia. Eseguiti ecocardiogrammacolor Doppler con evidenza di: "DIV perimembranoso parzialmente chiuso da tessuto accessorio tricuspidalico, shunt sx-dx moderato, emodinamicamente ben tollerato. Pervietà del forame ovale" e Holter-ECG: "tachicardia parossistica sopraventricolare da rientro". Per tale motivo avviata terapia con beta-bloccante (Nadololo). All'età di 2 anni e 8/12 eseguita RMN encefalo con evidenza di: "Ampliamento della cisterna magna con ampia comunicazione con il IV ventricolo, ipotrofia sia del verme che degli emisferi cerebellari (Dandy Walker variant)". Eseguito infine a-CGH con riscontro di microdelezione regione 6q25.1 estesa circa 630 kb de novo.

Nella regione critica 6q25.1 è stato identificato il gene TAB2 (TAK1-binding protein 2), responsabile di numerose anomalie cardiache congenite non sindromiche, quali DIA, DIV, stenosi aortica congenita ed ipoplasia dell'arco aortico. In una famiglia sono state inoltre riscontrate anomalie del ritmo (tachicardia parossistica sopraventricolare). Ampi studi effettuati su pazienti con anomalie cardiache congenite, hanno dimostrato il coinvolgimento di tale gene nello sviluppo delle strutture cardiache.

MICROPHTALMIA_ASSOCIATED TRANSCRIPTION FACTOR (MITF) E318K: AN INTERMEDIATE RISK VARIANT FOR MELANOMA , A NEW LINK BETWEEN DEREGULATED SUMOYLATION AND CANCER

L. Pastorino¹, P. Queirolo², W. Bruno¹, V. Andreotti¹, S. Nasti¹, G. Bianchi Scarrà¹, P. Ghiorzo¹

¹*Dip di Medicina Interna e Specialità Mediche, Università degli Studi di Genova, Lab di Genetica dei Tumori Ereditari rari, IRCSS AOU San Martino-IST, Genova*

²*Oncologia Medica, IRCSS AOU San Martino-IST, Genova*

BACKGROUND: A French and an Australian study have recently identified a rare germline functional variant in MITF (E318K) that predisposes to familial and sporadic melanoma (1,2) and to renal cell carcinoma (RCC) (2), showing a new link between two tumor types with different risk factors, and between deregulated sumoylation and cancer. MITF encodes a member of the Myc supergene family of transcription factors which is thought to function as a melanoma oncogene. E318K was shown to impair sumoylation of MITF, and functional studies were consistent with a gain-of-function role in tumorigenesis.

AIM and METHODOLOGY: The aim of our study was to test the prevalence of the MITF E318K mutation in 667 melanoma cases from our population, including patients with family history, multiple melanoma and patients diagnosed with melanoma and other cancers.

RESULTS: The overall E318K allele frequency in cases (0.009) was significantly higher than in controls ($p=0.011$), and carriers exhibited nearly three-fold increased risk of developing melanoma compared with controls. Carriers were also more likely to have developed multiple primary melanomas ($OR=6.40$, $CI=1.43-28.58$), regardless of family history.

Five of the 12 positive patients developed nodular melanoma (41.6%), a percentage that is significantly higher than observed in MITF-negative melanoma patients (13.7%, $P=0.018$, $OR=4.48$, 95% CI 1.39-14.43).

Carriers with a personal and/or family history of PC and RCC nearly a 31- and 8-fold higher risk compared to wt patients (respectively $OR= 30.85$, 95% CI 6.85-138.9, $P=0.0005$ and $OR=7.98$, 95% $CI=1.61-39.46$, $P=0.038$).

CONCLUSIONS: Our findings provide the first indication that MITF may be involved in the development of PC in melanoma families. If confirmed these results open up the question on how information about MITF should be managed in E318K-positive patients and families. The finding of an association between nodular melanoma in E318K-positive compared with E318K-negative patients, if supported by other reports, paves the way to studies on the potential prognostic role of this rare functional variant.

References 1) Yokoyama et al, Nature 2011 480:99-103. 2) Bertolotto et al, Nature 2011 480:94-98.

CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO DI ESPRESSIONE DEL WNT SIGNALING NELLA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA: INDUZIONE DELLA FUNZIONE RIGENERATIVA IN CELLULE AC133^{BRIGHT}

F. Lazzaroni¹, M. Mignardi², F. Ferrazzi³, V. Bronte⁴, R. Cairoli⁵, A. Beghini¹

¹*Dip. di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milano*

²*Dep. of Immunology, Genetics and Pathology, Rudbeck Laboratory, Uppsala, Sweden*

³*Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), Gene Center, Munich, Germany*

⁴*Istituto Oncologico Veneto, Padova*

⁵*Dip. di Oncologia, Osp. Niguarda, Milano*

Evidenze sperimentali hanno suggerito il coinvolgimento nella Leucemia Mieloide Acuta (LAM) del Wnt signaling ed in particolare nel mantenimento della frazione definita come Leukemia Initiating Cells (LICs). Poiché l'antigene AC133 rappresenta uno dei marcatori più significativi ai fini dell'arricchimento della rara componente "staminale tumorale" in diversi contesti neoplastici, abbiamo valutato la capacità della frazione leucemica AC133+, di effettuare engraftment in seguito a xenotrapianto nel modello murino immunodeficiente Rag2-/- γ c-/- . I risultati hanno evidenziato come il marcatore di superficie AC133 sia in grado di arricchire per la popolazione cellulare che contiene le LICs. Recentemente, abbiamo individuato come unico programma trascrizionale indotto in frazioni cellulari AC133+ e differenzialmente espresso tra pazienti e soggetti sani, il Wnt receptor signaling pathway associato alla funzione rigenerativa mediata dall'up-regolazione dei loci WNT10B, WNT10A, WNT2B e WNT6. Attraverso la valutazione di singole molecole di mRNA in situ su biopsia osteomidollare di pazienti affetti da LMA e l'analisi di espressione genica condotta su una casistica di 120 pazienti leucemici, abbiamo identificato il WNT10B come prevalente locus associato alla funzione rigenerativa e over-espresso dalla totalità dei pazienti analizzati. La valutazione molecolare del trascritto ci ha permesso di caratterizzare una variante di splicing al 5'UTR il cui potenziale ruolo è discusso. Immunofluorescenze condotte su biopsie osteomidollari di pazienti leucemici, hanno evidenziato l'attivazione del segnale WNT, attraverso la concomitante presenza del ligando WNT10B e delle β -catenine nella forma attiva defosforilata, suggerendo un meccanismo di attivazione autocrino/paracrino di tipo ligando-dipendente. Analisi di imaging, hanno determinato come la popolazione cellulare responsiva all'induzione del Wnt pathway, sia strettamente associata alla positività al marcatore AC133bright. I risultati del presente studio, hanno evidenziato che la funzione di "staminalità tumorale", presente nella popolazione cellulare AC133bright, è correlata all'attivazione del Wnt signaling associato alla funzione rigenerativa attribuendo un ruolo chiave a specifici ligandi WNT.

UPD14 DI ORIGINE MATERNA IN UN CASO CON FENOTIPO PRADER WILLI-LIKE

C. Barone¹, M. Carella², R. Gauci¹, G. Giliberto¹, M. Miroballo², O. Palumbo², R. Pitta¹, A. Ragusa³, T. Mattina¹

¹*Genetica Medica –Università di Catania Centro di Riferimento Regionale per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico- Vittorio Emanuele di Catania*

²*UOC Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

³*UOC Diagnosi Prenatale Genetica Medica AOU Policlinico-Vittorio Emanuele Catania*

Introduzione

Obesità, ritardo mentale ed ipotonia sono segni caratteristici della sindrome di Prader-Willi. Un quadro clinico simile, caratterizzato da ritardo di crescita prenatale e postnatale, ipotonia neonatale, mani e piedi piccoli, difficoltà all'alimentazione e pubertà precoce, può manifestarsi anche in presenza di disomia uniparentale materna del cromosoma 14 (UPD14). La regione 14q32.2 contiene, infatti, diversi geni sottoposti ad imprinting e, pertanto, la perdita dell' allele paterno contribuisce nella determinazione del fenotipo.

Caso clinico

Riportiamo il caso di una paziente giunta in consulenza per la presenza di ipotonia neonatale ed un quadro clinico di disabilità intellettiva, scarso accrescimento, obesità e pubertà precoce. L'analisi molecolare per sindrome di Prader-Willi, FRAXA e lo studio del cariotipo risultavano nella norma. L'indagine citogenetica ad elevata risoluzione per mezzo di SNPs-Array, pur non rilevando alcuna alterazione cromosomica, ha evidenziato la presenza sul cromosoma 14 di un lungo tratto (17,28 Mb) di perdita di eterozigosità, non associata a delezione, e quindi compatibile con uno stato di disomia uniparentale. L'analisi del genotipo di tutti gli SNPs localizzati sul cromosoma 14, sul probando e su entrambi i genitori, ha mostrato una mancanza di segregazione allelica per l'intero cromosoma, anche nella regione non interessata da perdita di eterozigosità. Tale condizione, in assenza dell'allele paterno, era compatibile con uno stato di isodisomia uniparentale materna, nella regione di omozigosità, ed etrodisomia uniparentale materna, nella regione di eterozigosità. Le condizioni di isodisomia ed eterodisomia materna parziale del cromosoma 14 sono state confermate mediante analisi di microsatelliti.

Conclusioni

L'UPD14 materna dimostra un fenotipo Prader-Willi like soprattutto durante l'infanzia e, pertanto, dovrebbe essere sospettata in pazienti con ipotonia e fenotipo suggestivo. L'analisi SNPs-Array, inoltre, si è dimostrata essere una metodica valida nell'identificazione di disomie uniparentali (sia iso- che etero-disomie).

EPIDEMIOLOGIA DELLA SINDROME DI WOLFRAM: UNA ZONA “HOT SPOT” NELLA SICILIA NORD-ORIENTALE

L. Rigoli¹, C. Di Bella¹, S. Cara¹, F. Pugliatti¹, M. Amorini¹, V. Procopio¹, P. Romeo¹, F. Lombardo¹, G. Salzano¹, F. De Luca¹, C. Salpietro¹

¹*Dipartimento Materno-Infantile, Policlinico Universitario, Messina*

Scopo. La Sindrome di Wolfram (WS) è una patologia neurodegenerativa ad evoluzione progressiva a carattere autosomico recessivo. Essa è caratterizzata da diabete insipido (DI), diabete mellito ad insorgenza giovanile (DM), atrofia ottica (OA), e sordità (D) (DIDMOAD ed è causata da mutazioni nel gene WFS1 situato sul cromosoma 4p16.1. Il gene WFS1 codifica per una proteina transmembrana chiamata wolframina, normalmente espressa in numerosi tessuti. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare l'epidemiologia della WS in un'area della Sicilia nord-orientale in cui sono frequenti le unioni tra consanguinei. Pazienti e Metodi. Sono stati studiati 12 pazienti affetti da WS, diagnosticati negli ultimi 15 anni nell'U.O. di Endocrinologia Pediatrica del Policlinico Universitario di Messina (Sicilia nord-orientale). Essi hanno un'età compresa tra i 9 e i 29 anni e sono nati nell'area geografica di Messina e dintorni. Tra questi, 7 pazienti fanno parte di un'estesa famiglia il cui albero genealogico è stato ricostruito attraverso un probando proveniente da un piccolo ed isolato paese dei Monti Nebrodi. Nei 12 pazienti, la diagnosi di WS è stata confermata dall'analisi genetica eseguita mediante il sequenziamento automatico di tutto il gene WFS1. Risultati. L'analisi molecolare del gene WFS1 ha consentito di identificare 2 alleli mutati in tutti i pazienti. In 10 soggetti, le mutazioni erano in omozigosi per lo stesso allele, mentre negli altri 2 pazienti le mutazioni erano in eterozigosi composta. La maggior parte di esse (10/12) erano localizzate nel dominio transmembrana (S443I; R558H; Y454_L459del_fsX454;) e solo 1 mutazione invece è stata trovata nel dominio N-terminale (K178_A179del). La mutazione più frequente era la delezione Y454 L459del fsX454. Inoltre, dai nostri dati è emerso che la frequenza di WS nella popolazione della Sicilia nord-orientale potrebbe essere di 1 su circa 55.000 abitanti. Conclusioni. Il nostro è il primo studio effettuato in un'ampia casistica di pazienti affetti da WS provenienti dalla Sicilia Nord-Orientale. Esso ha consentito di valutare la frequenza delle specifiche mutazioni del gene WFS1, indicando quali sono le varianti genetiche che devono essere ricercate per prime nei soggetti affetti.

Delezione 14q32 distale in diagnosi prenatale: descrizione di un caso

F. Cambosu¹, G. Fogu¹, L. Ulgheri¹, P.M. Campus¹, A. Oggiano¹, R. Orizi¹, R. Sanna¹, G. Soro¹, A. Montella¹

¹Università di Sassari, Dip. di Scienze Biomediche, U.O. Genetica Clinica, AOU Sassari

Le delezioni del cromosoma 14 sono rare e generalmente associate a ring 14. Ad oggi sono descritti circa 20 casi.

Un significativo numero di pazienti con delezione 14qter presenta i seguenti segni clinici, che contribuiscono a delineare una vera e propria sindrome: microcefalia, fronte larga, fessure palpebrali strette, epicanto, ponte nasale piatto e naso bulboso, labbra sottili, micro-retrognatia, orecchie con lobi dismorfici in associazione a segni neurologici quali ipotonia, ritardo dello sviluppo psicomotorio, ipoplasia del corpo calloso e ritardo mentale da lieve a moderato.

Generalmente la sindrome da delezione terminale 14q, in assenza di ring, sembra non essere associata ad anomalie congenite multiple o condizioni limitanti.

Si riporta un caso di cromosoma 14 anomalo riscontrato in diagnosi prenatale. Il cromosoma anomalo, che all'analisi citogenetica convenzionale in bande Q presentava una piccola banda fluorescente terminale, simile a piccoli satelliti, è stato successivamente caratterizzato mediante analisi di FISH con opportune sonde, risultando positivo alla sonda per painting del cromosoma 14 (wcp 14) e negativo alla sonda subtelomerica 14qter. Il break point della delezione veniva individuato all'interno della sonda per il locus IgH (14q32), parzialmente deleta.

Studi familiari dimostravano la presenza della stessa anomalia nel padre del nascituro, di intelligenza normale, che all'esame obiettivo presentava lievissimi dismorfismi facciali assimilabili al fenotipo ring 14 like, e nella nonna paterna, anch'essa di intelligenza normale, senza le note dismorfiche presenti nel figlio.

Siamo in attesa di verificare il fenotipo fetale poiché la gravidanza è ancora in corso.

Il caso qui descritto viene confrontato con i casi di delezione 14q già riportati in letteratura.

TALIDOMIDE: UN NUOVO QUESITO

G. Trimarchi¹, C. Barone¹, A. Costa¹, V. Nicotra¹, R. Pitta¹, T. Mattina¹

¹*Genetica Medica – Università di Catania Centro di Riferimento Regionale per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico- Vittorio Emanuele di Catania*

Un Decreto del 2009 del Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali ha stabilito l'adozione di "un regolamento per disciplinare il procedimento per il riconoscimento e la corresponsione dell'indennizzo previsto [...] ai soggetti affetti da sindrome da Talidomide, [...] nelle forme dell'amelia, dell'emimelia, focomelia e micromelia e nati negli anni dal 1959 al 1965". Con 50 anni di ritardo alcuni Paesi, tra i quali l'Italia, cercano di lenire il dolore di una tragedia che tanto clamore suscitò negli anni 60 e che vide come primo responsabile la comunità scientifica.

Visto il recente decreto tre persone sono recentemente pervenute al nostro centro per consulenza genetica ai fini di valutare se le malformazioni presenti fossero imputabili all'assunzione di Talidomide da parte della madre, durante la gravidanza.

- P.S., nato nel 1962: il quadro clinico comprende agenesia bilaterale del II, III e IV dito delle mani, ipoplasia bilaterale dei pollici, agenesia di mesopiede ed avampiede sinistro con abbozzo digitale, sindattilia membranosa tra II e III dito del piede destro, scoliosi, lingua malformata. Cariotipo, Array-CGH ed analisi gene TP73L negativi.
- B.A., nato nel 1963: alla nascita riscontro di ipogenesia di II, III e IV dito della mano destra, a sinistra ipogenesia di tutte le 5 dita "riunite alle loro estremità da benderelle fibrose saldate insieme". Successivamente interventi chirurgici a scopo funzionale in entrambe le mani.
- B.V., nato nel 1965: agenesia della mano e dell'avambraccio sinistro, abbozzo digitale all'estremità del moncone, piede piatto bilaterale.

Nel primo caso, sulla base della valutazione morfologica, della negatività dei test genetici, e del dato anamnestico, è verosimile che le lesioni siano secondarie all'esposizione al Talidomide.

Negli altri due casi, sulla base della valutazione morfologica si pone diagnosi di esiti da briglie amniotiche.

La cosiddetta sindrome da briglie amniotiche è una patologia la cui eziopatogenesi è complessa, probabilmente eterogenea ed ancora in discussione: può il Talidomide, farmaco antiangiogenetico, essere concausa della sindrome da briglie amniotiche?

A novel molecular and functional mechanism predisposing to ototoxicity

E. Pohl¹, N. Offenhäuser², F. Kersten³, A. Üzümcü⁴, Y. Li¹, O. Uyguner⁴, G. Yigit¹, H. Kayserili⁴, K. Steel⁵, P.P. Di Fiore², H. Kremer³, B. Wollnik¹

¹*Institute of Human Genetics, University Hospital Cologne, Germany*

²*IFOM, Fondazione Istituto FIRC di Oncologia Molecolare, Milan, Italy*

³*Department of Human Genetics, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen, The Netherlands*

⁴*Department of Medical Genetics, Istanbul Medical Faculty, Istanbul University, Istanbul, Turkey*

⁵*Welcome Trust Sanger Institute, Cambridge, Hinxton, UK*

While our knowledge about molecular mechanisms underlying Mendelian forms of hearing loss tremendously increased over the last years, the genetic basis and pathogenesis for drug induced hearing impairment remains unclear. Aminoglycosides are the most commonly used antibiotics worldwide. Although highly effective, their use is restricted by side effects such as ototoxicity in a significant subset of patients. However, underlying pathogenesis and pharmacogenetic risk variants are largely unknown. Here we show that dysfunction of an actin remodeling protein (named here ARP) can result in a drug-inducible disturbance of actin dynamics and an irreversible hearing impairment in humans. By positional cloning, we identified a homozygous missense variant, p.L329P, in ARP as a cause of aminoglycoside-induced hearing impairment in a large consanguineous family from Turkey with 4 affected individuals. Complete ARP loss in knock out mice leads to hearing loss associated with shortened stereocilia shown by whole mount stainings and electron microscopy of mouse cochleae. We demonstrate that the protein is a component of the tip complex that regulates stereocilia length and that it interacts with whirlin. The mutation severely impairs this interaction in vitro shown by GST pull-down, yeast two-hybrid assay and immunostainings. Further GST pull-down assays showed that myosinXVa can stabilize the ARP-whirlin interaction complex, and we show for the first time that kanamycin has a negative effect on this complex formation, which is even more pronounced in mutant complexes, thereby explaining the development of hearing loss in affected individuals after aminoglycoside treatment. Taken together, we link ototoxicity after aminoglycoside treatment to actin dynamics and this finding will help in devising strategies to counteract this severe side-effect of aminoglycosides.

Trial multicentrico di fase II, clinic e molecolare, in doppio cieco controllato con placebo, di tollerabilità ed efficacia del salbutamolo in pazienti adulti con SMA III

F.D. Tiziano¹, R. Lomastro¹, L. Di Pietro¹, M.B. Pasanisi², S. Fiori¹, C. Angelozzi¹, E. Abiusi¹, C. Angelini³, G. Sorarù³, A. Gaiani³, T. Mongini⁴, L. Vercelli⁴, E. Mercuri⁵, G. Vasco⁵, G. Vita⁶, G.L. Vita⁶, S. Messina⁶, L. Politano⁷, L. Passamano⁷, G. Di Gregorio⁷, C. Montomoli⁸, C. Orsi⁸, A. Campanella², R. Mantegazza², G. Neri¹, L. Morandi²

¹Ist. Gen. Med., Univ. Cattolica, Roma

²Unità di Pat. Musc. e Neuroimmun., Istituto Besta, Milano

³Ist. Neuroscienze, Univ. Padova

⁴Sez. Malattie Neuromusc., Osp. Molinette, Torino

⁵Dip. Neuropsich. Inf., Univ. Cattolica, Roma

⁶Dip. Neuroscienze, Univ. Messina

⁷Sez. Genetica Cardiomiol., II Univ. Napoli

⁸Dip. Salute Pubbl., Univ. Pavia

L'atrofia muscolare spinale (SMA) è una condizione autosomica recessiva, caratterizzata dalla degenerazione dei motoneuroni delle corna anteriori del midollo spinale, causata dalla perdita in omozigosi del gene SMN1. Sia SMN1 che un gene quasi identico (SMN2) codificano per la proteina SMN ma, a causa dello splicing alternativo dell'esone 7, i geni SMN2 producono bassi livelli di proteina SMN full length. I livelli di SMN sono marcatamente ridotti nei pazienti SMA e correlano inversamente con la gravità fenotipica. Sebbene non vi sia ad oggi una terapia per la SMA, diverse evidenze sperimentali hanno messo in evidenza come l'espressione dei geni SMN2 possa essere incrementata mediante trattamento farmacologico con diversi composti, tra cui il salbutamolo, un agonista del recettore beta2-adrenergico (B2AR).

L'obiettivo di questo studio era di valutare tollerabilità ed efficacia del salbutamolo in 45 pazienti adulti affetti da SMA III. I pazienti arruolati sono stati randomizzati in due gruppi e trattati, in doppio cieco, con salbutamolo o con placebo, con la stessa posologia. I pazienti sono stati valutati alla baseline, e dopo 3, 6, e 12 mesi di trattamento, mediante le seguenti misure di outcome: Manual muscle testing, miometria, North Star Ambulatory Assessment scale, 6-Minute Walk Test e capacità vitale forzata. I test molecolari erano: determinazione del numero di copie di SMN2, e livelli di trascritti e proteina SMN.

I risultati del nostro studio hanno dimostrato che il salbutamolo è ben tollerato, che induce un incremento statisticamente significativo dei trascritti dei geni SMN2, ed un miglioramento significativo della performance motoria nella maggioranza dei pazienti. Tuttavia, mentre l'analisi dei trascritti di SMN2 può essere considerato un valido marker farmacodinamico, la mancanza di miglioramento clinico in alcuni pazienti trattati non conferma il ruolo potenziale di tale analisi come misura di outcome surrogata. I limiti del nostro studio sono essenzialmente il numero limitato di pazienti e la breve durata del follow-up, dal momento che la lunga storia di malattia nei nostri pazienti e la presenza di complicanze frequenti quali scoliosi e retrazioni tendinee, possono alterare la risposta clinica al trattamento.

Associazione tra la subunità 2B del recettore NMDA (gene GRIN2B) e la malattia di AlzheimerF. Trecroci¹, R. Cittadella¹, E.V. De Marco¹, M. Liguori¹, P. Spadafora¹, G. Di Palma¹, V. Andreoli¹¹*Istituto di Scienze Neurologiche-Consiglio Nazionale delle Ricerche, Mangone, Cosenza.*

Pur nella diversità delle manifestazioni cliniche presenti nella malattia di Alzheimer (MA), il comune denominatore è senza dubbio rappresentato dalla demenza. Secondo le conoscenze più recenti, alla base di tale processo neurodegenerativo tipico della MA si riscontrerebbe una complessa azione neurotossica a livello sinaptico, che culminerebbe nella demenza corticale, associata a disfunzione neuronale. Uno dei principali meccanismi di eccitotossicità sarebbe indotta dal glutammato e in parte mediata dai recettori N-metil-D-aspartato (NMDA), complessi tetramerici tra i quali la subunità 2B occupa un posto di rilievo. Il gene che codifica per questa subunità, denominato GRIN2B (chr12p12-13 esoni), è espresso nell'ippocampo, nei gangli della base e nella corteccia cerebrale. Alla luce di quanto esposto, abbiamo effettuato l'analisi mutazionale di GRIN2B in una coorte indipendente di 270 pazienti con MA proveniente dal sud Italia, nell'ipotesi di un coinvolgimento molecolare di tale gene nella MA. Tutte le porzioni codificanti e le giunzioni esone-introne del gene sono state amplificate utilizzando primers specifici e successivamente analizzate mediante DHPLC e sequenziamento diretto del DNA. Nella prima fase del nostro studio, sono stati identificati cinque polimorfismi silenti a singolo nucleotide (SNP), tutti localizzati nella sequenza codificante: c.15G>T-Ala5; c.366C>G-Pro122; c.1665C>T-Ser555; c.2514C>T-Cys838; c.3534C>T-His1178. In seconda istanza, è stato condotto uno studio caso-controllo supportato da 250 controlli sani, caucasici, sovrapponibili per età e sesso, senza tuttavia riscontrare associazione statisticamente significativa tra pazienti e controlli ($P=0,337$ Pro122; $P=0,142$ Ser555; $P=0,868$ His1178 e $P=0,096$ Cys838). Il risultato della variante Ala5 è stato omissso per la bassa frequenza degli alleli identificati. Abbiamo quindi analizzato i diversi genotipi in funzione delle più rilevanti variabili cliniche (sesso, genotipo APO-E ed età d'insorgenza della MA), ottenendo anche in tal caso risultati negativi. I nostri dati preliminari suggeriscono, in conclusione, un non coinvolgimento di questo gene nella MA; tuttavia, è in corso il completamento dell'analisi mutazionale di GRIN2B per elucidare in toto il suo ruolo nella MA.

DIECI ANNI DI SCREENING NEONATALE DELLA FIBROSI CISTICA IN PIEMONTE: DAL PROGETTO PILOTA ALLA EVOLUZIONE DELLE METODICHE E REVISIONE DEI PROTOCOLLI

M. Barberis¹, L. Sbaiz¹, C. Mari¹, S. Pagliardini², C. Luciano¹, A.M. Sedita¹, M. Duvant¹, C. Michielotto¹, I. Impoco¹, F. Lombardo¹, E. Bignamini³, G. Restagno¹

¹S.S. *Diagnosi e Consulenza Genetica, A.O. Città della Salute e della Scienza, Presidio OIRM-S.Anna, Torino*

²*Centro di Screening Neonatale, Dip. di Diagnostica, A.O. Città della Salute e della Scienza, Torino*

³*Centro Regionale Fibrosi Cistica, S.C. Pneumologia, A.O. Città della Salute e della Scienza, Torino*

Lo screening neonatale della fibrosi cistica è stato attivato in Regione Piemonte nel 2001, dopo un progetto pilota di un anno (b-IRT+ test molecolare). Lo studio pilota su 36.626 neonati aveva evidenziato 634 neonati positivi al test biochimico eseguito con cut-off di 50 ng/ml al 97.5° centile (1.7%), con recall rate di 0.4%. L'analisi di mutazioni con OLA-PCR-SCS (pannello di 31 mutazioni) aveva individuato 11 soggetti con due mutazioni, in cui il test del sudore era risultato positivo. Su 60 spot era stata evidenziata una sola mutazione, e in 4 casi il test del sudore era risultato positivo (frequenza degli eterozigoti individuati: 1/11, incidenza di FC 1/2000). Questi risultati hanno portato ad una revisione dei valori di cut-off per limitare il richiamo di soggetti eterozigoti sani. Il protocollo attualmente utilizzato è il seguente: se IRT > 98.6° centile e inferiore a 99.6° centile si procede con analisi di mutazioni su spot (pannello 35 mutazioni e 7 delezioni Nuclear Laser, test di I livello). Se nessuna mutazione: stop, se presenti una o più mutazioni: test del sudore. Se IRT > 99.6° centile: ricerca mutazioni come sopra; se assenti mutazioni viene richiesto un controllo su un secondo cartoncino alla quarta settimana di vita circa. Se IRT al secondo controllo è > cut off: test del sudore. In totale dal 2001 a fine 2011 sono stati analizzati 3372 spot (su 352.000 neonati) con una percentuale di IRT positivi dello 0.95% e una recall rate dello 0.25%. Quando il test del sudore è positivo ed è identificata una sola mutazione o nessuna mutazione con il test di I livello, si procede con la sequenza dell'intero gene. Gli affetti sono risultati 126 su 352.000 nati, con un'incidenza di 1:2.715. Uno dei limiti è la sensibilità dell'analisi molecolare, poiché il pannello di I livello non comprende le mutazioni rare o presenti nelle popolazioni di migranti, e l'analisi di II livello non supera la sensibilità del 96%. Nel protocollo è previsto che al test molecolare segua sempre una consulenza genetica, anche nei casi in cui il neonato risulti un eterozigote. In questi casi, per una futura pianificazione familiare, viene offerta una consulenza genetica e l'analisi del DNA di entrambi i genitori.

ANOMALIE CROMOSOMICHE STRUTTURALI A MOSAICO E DIFFICOLTÀ DIAGNOSTICHE: UN CASO DI SINDROME 18q-

V. Uliana¹, R. Bianchieri², L. Doria Lamba², A. Rossi³, M. Severino³, M. Malacarne⁴, C. Marciano¹, G. Mandrile¹, F. Forzano¹, E. Di Maria⁵, F. Faravelli¹

¹SSD Genetica Medica, EO Ospedali Galliera, Genova

²UOC Neuropsichiatria Infantile, Istituto Giannina Gaslini, Genova

³UOC Neuroradiologia, Istituto Giannina Gaslini, Genova

⁴SC Laboratorio di Genetica, EO Ospedali Galliera, Genova

⁵SSD Genetica Medica, EO Ospedali Galliera, Genova e Dip. di Scienze della Salute, Università di Genova

Riportiamo il caso di un soggetto di sesso maschile, unicogenito di genitori sani non consanguinei. Il probando presenta disabilità intellettiva, piedi torti congeniti e deficit di GH. Alla RM cerebrale, a 3 e 5 anni di età, è stato documentato un quadro di ipomielinizzazione della sostanza bianca rispetto ai normali parametri per l'età. L'esame obiettivo a 4 anni di età ha evidenziato altezza 91 cm (3-10° cnt), peso 14 kg (3-10° cnt), microcefalia (circonferenza cranica 47.5 cm, <3°cnt), brachicefalia con accenno a plagicefalia, bozze frontali prominenti, sclere bluastre, sopracciglia rade, occhi infossati, accenno a strabismo, labbro superiore ad arco, piega palmare unica bilateralmente. Sono state inoltre rilevati stereotipie e bruxismo. Sulla base del quadro clinico, ed in particolare del dato neuroradiologico, era stato posto il sospetto di una delezione del braccio lungo del cromosoma 18, ma le successive indagini (cariotipo costituzionale e ricerca di riarrangiamenti subtelomerici) erano risultate nella norma.

Alla visita di controllo all'età di 10 anni i tratti somatici erano sostanzialmente invariati, era presente disabilità intellettiva nel contesto di quadro clinico ad andamento migliorativo. È stata posta indicazione ad analisi di array-CGH, che ha evidenziato un doppio riarrangiamento: una delezione di circa 26 Mb della regione 18q21.2q23 (52258392-77982126; UCSC hg 19) ed una duplicazione di circa 37 Mb della regione 9p24.3p13.2 (271257-37246576; UCSC hg 19). Il dato è stato confermato tramite FISH, che ha evidenziato la presenza di mosaicismo a due linee cellulari, una con corredo cromosomico normale, la seconda, presente nel 20% delle cellule esaminate, con una traslocazione sbilanciata coinvolgente il braccio corto di un cromosoma 9 ed il braccio lungo di un cromosoma 18. L'analisi di array-CGH ha, quindi, confermato il sospetto clinico di sindrome da delezione 18q formulato in precedenza.

L'analisi di cariotipo e di riarrangiamenti subtelomerici successivamente effettuate nei genitori sono risultate nella norma, confermando l'origine de novo del riarrangiamento.

PANCREATITE CRONICA FAMILIARE (PCF): NUOVA MUTAZIONE FAMILIARE GENE PRSS1

F. Guarnaccia¹, C. Barone¹, A. Costa¹, A. Gentile², A. Piepoli², G. Trimarchi¹, T. Mattina¹

¹*Genetica Medica –Università di Catania Centro di Riferimento Regionale per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico - Vittorio Emanuele di Catania*

²*Laboratorio e Divisione di Gastroenterologia, IRCCS“Casa Sollievo della Sofferenza”, San Giovanni Rotondo (FG)*

Introduzione

La pancreatite cronica familiare (PCF) è una forma molto rara di pancreatite infantile cronica, con meccanismo di trasmissione autosomico recessivo. Non esistono dati certi sull'incidenza e sulla prevalenza della PCF. Il quadro clinico è altamente variabile e comprende dolori addominali cronici, difetti della funzione del pancreas endocrino e esocrino, nausea, vomito, difficoltà digestive, diabete, pseudocisti, occlusione del dotto biliare e del duodeno e tumore del pancreas. Molti pazienti presentano un quadro clinico sfumato. Le mutazioni del gene PRSS1, che codifica per il tripsinogeno cationico, svolgono un ruolo patogenetico nella pancreatite cronica. È stato dimostrato che le mutazioni di PRSS1 aumentano la conversione autocatalitica del tripsinogeno in tripsina attiva e questo causa probabilmente l'attivazione intrapancreatica prematura del tripsinogeno, che disturba l'equilibrio intrapancreatico delle proteasi e degli inibitori.

Caso clinico

Riportiamo i casi di due sorelle con quadro clinico di pancreatite cronica caratterizzato da dolore in ipocondrio destro, meteorismo, epigastralgia con iperamilasemia ed iperlipasemia. La diagnosi molecolare del gene PRSS1 mediante DHPLC ha evidenziato in entrambe le pazienti, la presenza di una variante genica (V213I) non ancora descritta in letteratura e con significato patogenetico ignoto e delle varianti polimorfiche N246 (738C), D199D (GAT/GAC), L210L (CTC/CTT). Mediante l'uso di un tool bioinformatico PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2), il quale permette di predire l'impatto di una sostituzione aminoacidica sulla struttura e funzione della proteina, sembrerebbe che la variante V213I risulti essere benigna. Tuttavia, la presenza contemporanea di tali mutazioni missense e non-sense possono essere verosimilmente considerate causative del quadro clinico delle pazienti.

Conclusioni

I pazienti con PCF presentano un incrementato rischio di sviluppare tumore pancreatico; pertanto la diagnosi precoce della malattia, anche mediante analisi molecolare, consente di gestire adeguatamente il counselling genetico ed il follow up per tale patologia.

BASI GENETICHE DEL MELANOMA PRIMARIO MULTIPO

F. Gensini¹, F. Crucianelli¹, R. Sestini¹, M. Vignoli², P. Brandani³, A. Chiarugi⁴, L. Borgognoni³, N. Pimpinelli⁵, M. Genuardi¹

¹Sez. Genetica Medica, Dip. di Fisiopatologia Clinica, Univ. di Firenze

²Dip. di Scienze per la Salute della Donna e del Bambino, Univ. di Firenze

³Centro di Rif. Reg. per il melanoma Osp. S. Maria Annunziata, A.S. Firenze

⁴Ist. per lo studio e la prevenzione oncologica, Firenze

⁵Sez. Dermatologia Clinica, Preventiva e Oncologica, Dip. di Area Critica Medico Chirurgica, Univ. di Firenze

Circa il 5% dei pazienti con melanoma sviluppa un altro melanoma primario, con probabilità maggiore di quella di sviluppare un melanoma primario nella popolazione generale (1,4%). Questa osservazione, insieme al frequente riscontro di storia familiare positiva, suggerisce una predisposizione genetica al melanoma primario multiplo (MPM). Mutazioni germinali dell'oncosoppressore CDKN2A, il principale gene implicato nella predisposizione ereditaria al melanoma, sono state riscontrate nel 15-40% dei casi familiari, e nel 3-33% dei casi con MPM indipendentemente dalla storia familiare. La frequenza di mutazioni aumenta in base al numero di melanomi nel singolo soggetto. Ad oggi, mutazioni germinali del gene CDK4, sono state identificate in pochi casi di MPM familiare. Epimutazioni germinali di vari geni possono essere responsabili della predisposizione all'insorgenza di tumori (cancro coloretale e tumore di Wilms), ma i dati relativi al melanoma sono scarsi. Scopo dello studio è stato valutare il ruolo di mutazioni germinali di CDKN2A e CDK4, e di epimutazioni germinali di CDKN2A e CDKN2B in una casistica di pazienti con MPM. Su un totale di 50 pazienti analizzati mediante sequenziamento diretto ed MLPA, 7 casi (14%), tutti con storia familiare positiva, hanno mostrato 4 diverse mutazioni di CDKN2A. Il sequenziamento diretto dell'esone 2 di CDK4 non ha evidenziato mutazioni in nessuno dei restanti 43 pazienti. Pertanto questi ultimi sono stati analizzati mediante metodica MS-MLPA, che non ha mostrato alterazioni costituzionali della metilazione. I risultati ottenuti confermano il ruolo centrale di CDKN2A nella predisposizione al melanoma familiare. L'assenza di mutazioni in casi sporadici di MPM, apparentemente discordante con i dati di alcuni studi precedenti, può essere attribuita alle caratteristiche cliniche dei pazienti (la maggior parte dei quali aveva 2 melanomi), alla natura della mutazione di CDKN2A, e/o ad altri fattori di rischio genetici e non genetici. I risultati ottenuti suggeriscono inoltre che l'ipermetilazione costituzionale di CDKN2A e CDKN2B non abbia un ruolo importante nella predisposizione al MPM.

UN CASO DI MICRODUPLICAZIONE 17p11.2 o SINDROME DI POTOCKI-LUPSKI

R. Gauci¹, M. Carella², O. Palumbo², P. Palumbo², C.S. Perrotta³, G. Trimarchi¹, G. Cassisi¹, T. Mattina¹

¹*Genetica Medica – Università di Catania Centro di Riferimento Regionale per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico- Vittorio Emanuele di Catania*

²*Laboratorio di Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

³*Dh Talassemia- Amb. Di Genetica Medica – Pres. Osp. Vittorio Emanuele III Gela*

Introduzione

La microduplicazione 17p11.2 (Sindrome di Potocki-Lupski), che coinvolge il gene RAI1, è caratterizzata da ritardo dello sviluppo psicomotorio, ritardo del linguaggio, disturbo pervasivo dello sviluppo, bassa statura, anomalie scheletriche, anomalie cardiache e facies peculiare. Le microduplicazioni riscontrate sono per lo più ad insorgenza de novo e la diagnosi viene eseguita mediante analisi array-CGH.

Casi clinici

Riportiamo il caso di un paziente, portatore di una microduplicazione di circa 200 kb (contenente il gene RAI1) nella regione 17p11.2, giunto alla nostra attenzione all'età di 10 anni per ritardo mentale, ritardo del linguaggio, note dismorfiche. Il piccolo presentava, inoltre, EEG diffusamente irregolare e scarsamente organizzato con anomalie diffuse interessanti il ritmo e la morfologia. All'esame obiettivo il paziente presentava le seguenti caratteristiche: altezza intorno al 10°pc, circonferenza cranica intorno al 25°pc, cranio ovoidale, ponte nasale alto, ciglia lunghe, columella piatta, narici anteverse, orecchie piccole con lobo ipoplastico, palato stretto e ogivale, disodontosi, labbro inferiore carnoso, solco palmare unico della mano destra, pollici a basso impianto, valgismo del gomito, sindattilia cutanea II-III dito ad entrambi i piedi; brachidattilia delle dita dei piedi, scoliosi, scapole alate.

Le indagini genetiche effettuate (cariotipo, FRAXA ed ATRX) hanno dato esito negativo. Pertanto, nel 2010, è stata posta la diagnosi con SNP-Arrays.

Conclusioni

La microduplicazione in 17p11.2 identificata con gli SNP-Arrays è compatibile col quadro clinico del paziente.

NUOVE MUTAZIONI DEL GENE PTCH1 IN UNA COORTE DI PAZIENTI AFFETTI DA TUMORI CHERATOCISTICI ODONTOGENICI E/O AMELOBLASTOMI SCREENATI PER LA DIAGNOSI DELLA SINDROME DEL CARCINOMA NEVOIDE BASOCELLULARE

L. Pastorino¹, A. Pollio², G. Pellacani³, C. Guarnieri³, P. Ghiorzo¹, C. Longo⁴, W. Bruno¹, G. Bianchi-Scarrà¹, C. Ruini³, S. Seidenari³, A. Tomasi⁵, G. Ponti⁵

¹Università di Genova, Dip. Di Medicina Interna e Specialità Mediche; Laboratorio di Genetica dei tumori ereditari rari, IRCCS AOU San Martino-IST, Genova.

²Università di Napoli, Dip. di Odontoiatria, Unità di Medicina Orale.

³Università di Modena e Reggio Emilia; Divisione di Dermatologia.

⁴IRCCS Reggio Emilia

⁵Università di Modena e Reggio Emilia; Dip. di Medicina Diagnostica, Clinica e di Sanità Pubblica

I tumori cheratocistici odontogeni (TCO) e gli ameloblastomi (AML) sono neoplasie relativamente rare diagnosticate in setting sporadici o ereditari. Tali neoplasie odontogene costituiscono una stigmata clinica peculiare per la diagnosi di Sindrome di Gorlin (SG), genodermatosi caratterizzata dalla presenza di carcinomi basocellulari multipli (BCC), TCO, medulloblastoma, fibromi ovarici e cardiaci, pits palmo-plantari ed anomalie scheletriche. L'obiettivo perseguito dal nostro studio è stato la codifica di un approccio clinico e biomolecolare per la diagnosi di GS in una coorte di pazienti con diagnosi di tumori cheratocistici odontogenici e/o ameloblastomi. Dagli archivi dell' Anatomia Patologica dell'Università di Modena sono stati reclutati tutti i pazienti con diagnosi istologica di TCO tra il 1991 ed il 2011. La storia anamnestica personale e familiare di ciascun probando è stata ricostruita.

Diciotto dei 70 pazienti con TCO e 2 dei 41 con AML presentavano BCC multipli e/o altri criteri clinici per la diagnosi di SG. Un'ampia variabilità fenotipica sia intra- che inter-familiare è stata evidenziata negli alberi genealogici individuati. I 2 AMLs sono stati descritti in pazienti risultati gene-carrier di mutazioni del gene PTCH1. Nove mutazioni germinali del gene PTCH1, delle quali cinque non ancora descritte in letteratura, sono risultate dall'esame di sequenza dei 14 probandi disponibili allo studio genetico.

I TCO sono da considerarsi un valido marker clinico per la diagnosi precoce di GS. Un criterio persino più sensibile e specifico dei BCC multipli che possono non presentarsi e/o presentarsi in condizioni non eredo-familiari. Tali neoplasie odontogene rare quando insorgono nell'ambito di setting ereditari solitamente sono multiple, interessano entrambi i massellari, hanno un esordio precoce ed in base alla esperienza di questo studio autorizzano l'indagine clinico-anamnestica e strumentale individuale e familiare per la individuazione di membri affetti da simili lesioni odontogene e/o da altri segni e sintomi riconducibili alla GS. La diagnosi precoce della SG permette strategie di sorveglianza per l'intercettazione del medulloblastoma ed di altri rari tumori pediatrici frequenti nell'ambito di tale disordine genetico.

MOTOR HALOPLEX, AN INNOVATIVE STRATEGY FOR THE MOLECULAR DIAGNOSIS OF MUSCULAR DISEASES

M. Savarese¹, G. Di Fruscio¹, T. Giugliano¹, M. Iacomino¹, A. Torella¹, M. Guarracino³, M. Dionisi², M. Mutarelli², F. Del Vecchio Blanco¹, G. Piluso¹, V. Nigro¹

¹*Dipartimento di Patologia Generale, Seconda Università di Napoli, Naples, Italy*

²*Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Naples, Italy*

³*ICAR-CNR, Naples, Italy*

Muscular dystrophies are a group of myopathies characterized by an extremely high clinical and genetic heterogeneity. Patients show a wide clinical spectrum ranging from mild to severe phenotype with progressive weakness, myalgias, rhabdomyolysis but also with just increased serum creatine kinase levels without other symptoms. The non specific histological and histochemical features of the muscle biopsy, revealing a size variation of fibers, necrosis, fiber regeneration and fibrosis, do not help the identification of the correct form of dystrophy.

The molecular identification of causative mutations could be important for patients' inclusion in the future therapeutic trials and necessary for the reproductive risk estimation (RRE). Moreover, it could improve the knowledge of disease pathogenesis and could help to find a proper treatment. Non specific symptoms and histological features suggest a time-consuming and expensive gene-by-gene approach to the molecular diagnosis. As a consequence, since each laboratory only performs an incomplete number of tests, DNA samples circulate among laboratories all over the world for years, resulting in a delayed molecular diagnosis.

Next generation sequencing, allowing the analysis of several genes all together, is particularly useful for the genetic diagnosis of heterogeneous conditions. To specifically develop a customized target enrichment of regions related to muscular diseases, we utilized HaloPlex™ Target Enrichment System, a new easy and fast method to capture regions of interest in a large number of samples. In particular, we targeted all the exons and the ten flanking bases of 98 genes implicated in 9 different disease classes of muscular dystrophies. The captured DNA fragments have been sequenced using barcodes, so that different DNA samples have been pooled together and sequenced on the same channel.

This strategy is easier, less time-consuming and labor intensive than the traditional gene by gene approach, allowing a fast molecular diagnosis without increasing the costs. Moreover, custom enrichment system we performed is easy to scale up and appropriate for routine diagnoses.

RACCOLTA DATI DI PATOLOGIE CROMOSOMICHE OMOGENEE E A MOSAICO SU PRELIEVI DI VILLI CORIALI: FOLLOW-UP CITOGENETICO E DELLA GRAVIDANZA

G. Nocera¹, P. Battaglia², R. Bonora³, L. Cardarelli⁴, P. Celli⁵, S. Lauricella⁶, M. Mogni⁷, A.M. Nardone⁸, A. Pettinari⁹, M.C. Pittalis¹⁰, O. Privitera¹¹, B. Raso¹², E. Sala¹³, S. Stioui¹⁴

¹S.S. di Citogenetica, S.C. di Ostetricia e Ginecologia, AZ. Osp. Fatebenefratelli e Oftalmico, P. O. M. Melloni, Univ., Milano

²SSU Lab. di Genetica, UOC Genetica Medica, AUSL, Imola

³Consorzio Genimed Research & Innovation S.p.A., Padova

⁴Lab. Analisi Citotest, Consorzio Genimed, Sarmeola di Rubano, Padova

⁵U.O.S. di Genetica e Biologia Molecolare, Serv. di Immunoematologia, Trasfusionale e Genetica Umana, U.L.SS., Vicenza

⁶Lab. Citogenetica Medica, A.O.R. Villa Sofia Cervello, Palermo

⁷S.C. Lab. Genetica Umana, E.O. Osp. Galliera, Genova

⁸U.O.C. Lab. di Genetica Medica, Fondazione PTV Policlinico, Tor Vergata, Roma

⁹Lab. di Genetica Medica, SOS Malattie Rare, SOD Clinica Pediatrica, Az. Osp. Riuniti, Ancona

¹⁰Lab. di Citogenetica, S.C. di Ostetricia e Medicina dell'Età Prenatale, Az. Osp. Univ., Bologna

¹¹Sezione di Genetica, AO USL4 Osp. Misericordia e Dolce, Prato

¹²ASL RMA, UOSA Genetica Medica, Osp. Sant'Anna, Roma

¹³US Genetica Medica, Osp. S. Gerardo, Monza

¹⁴S.S. di Citogenetica, Lab. Analisi, AO, Legnano

Il mosaicismo cromosomico rappresenta da sempre un problema diagnostico per la citogenetica. In particolare l'osservazione di un mosaico cromosomico in colture di cellule fetali non solo rappresenta un problema interpretativo tecnico, ma anche e soprattutto un problema di correlazione cariotipo-fenotipo. Nell'1-2% dei prelievi di villi coriali eseguiti nel primo trimestre di gravidanza, la diagnosi porta all'identificazione di un mosaico cromosomico e nella maggior parte dei casi la linea anomala non viene poi confermata sui prelievi di controllo. Questo ha portato ad affermare il concetto di "mosaicismo confinato alla placenta", in quanto la linea anomala è presente esclusivamente nel tessuto extraembrionale e non nelle cellule del soma fetale. Inoltre diverse segnalazioni riportano anche di patologie cromosomiche omogenee non confermate dai controlli citogenetici successivi al prelievo di villi coriali "falsi positivi".

Sono stati raccolti i dati riguardanti analisi cromosomiche su campioni di villi coriali prelevati nel periodo dal 2008 al 2011 in 14 Laboratori Italiani. Complessivamente sono state raccolte circa 21.500 analisi. La principale indicazione all'analisi è risultata l'età materna superiore a 35 anni mentre per la settimana di gestazione quella più frequente è l'undicesima. Le trisomie degli autosomi sono risultate le più ricorrenti tra le patologie cromosomiche omogenee (47% sul totale an. cr.); seguono le anomalie strutturali bilanciate e sbilanciate (11.3%) e le aneuploidie dei cromosomi del sesso (7.6%). Le patologie a mosaico rappresentano circa il 33% sul totale delle an. cr. e il 2.25% sul tot. delle analisi. Anche in questo gruppo l'anomalia cromosomica più ricorrente è risultata un'aneuploidia degli autosomi (54%) dove i cromosomi più coinvolti sono risultati: 13, 2, 7, 21, 8 e 18. Le aneuploidie dei cromosomi del sesso rappresentano il 20% con la monosomia del cromosoma X come linea anomala più frequente. Vengono presentati i dati riguardanti i follow-up citogenetici e della gravidanza al fine di definire non solo la frequenza delle patologie cromosomiche omogenee e a mosaico ma soprattutto l'incidenza del "falso positivo".

UN CASO RARO DI INVERSIONE PERICENTRICA DEL CROMOSOMA 9

F. Guarnaccia¹, V. Nicotra¹, L. Di Dio¹, R. Gauci¹, G. Giliberto¹, O. Guzzardi², T. Mattina¹

¹*Genetica Medica –Università di Catania Centro di Riferimento Regionale per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico- Vittorio Emanuele di Catania*

²*Poliambulatorio Lapira Siracusa*

Introduzione

L'inversione pericentrica del cromosoma 9 (p11;q13) è una variante cromosomica comune che si riscontra nella popolazione normale con una frequenza di circa 1%. Consiste nell'inversione pericentrica totale o parziale della regione eterocromatica del cromosoma 9, tale inversione non determina la formazione di cromosomi ricombinanti, e rimane, pertanto virtualmente priva di rischio per la prole. Per questa ragione in accordo con le linee guida per la diagnosi citogenetica della SIGU, consensus 2007 è fra le varianti cromosomiche che si suggerisce di non segnalare nel referto. Un caso diverso è quello in cui si osserva una inversione pericentrica del cromosoma 9 di tipo non classico.

Caso clinico

Paziente maschio di anni 39 inviato insieme alla partner dal Ginecologo presso la nostra struttura per consulenza genetica a causa di infertilità di coppia, dopo ripetuti infruttuosi tentativi di fecondazione assistita. All'esame del liquido seminale si documenta ipospermia, ipomobilità, e forme teratologiche. Il paziente è stato sottoposto agli screening genetici per lo studio dell'infertilità secondo le linee guida. Il cariotipo risulta essere: 46,XY, inv(9) (p24;q31). L'inversione pericentrica del cromosoma 9 riscontrata differisce dalla variante comune. Si tratta di un'ampia inversione riguardante non solo la regione eterocromatica del braccio lungo del cromosoma 9, ma anche buona parte del braccio corto (costituito da eucromatina) e un' ampia porzione eucromatica del braccio lungo. La probabilità di crossing over all'interno dell'ansa da inversione durante la meiosi, ed il rischio di gameti ricombinanti sono elevati. Le anomalie morfologiche e funzionali osservate allo spermio-gramma sono imputabili all'anomalia cromosomica riscontrata, così come l'interruzione spontanea precoce di eventuali gravidanze. In caso di progressione della gravidanza la coppia è, inoltre, a rischio di anomalia cromosomica nella prole, l'entità del rischio è elevata ma non quantificabile.

Conclusioni

Il riscontro della rara inv(9)(p24;q31) in un paziente con storia di infertilità mette in evidenza la necessità di attenzione e cautela nell'interpretazione dei risultati dei test genetici e l'importanza della consulenza genetica post-test.

DIAGNOSI DI MCCD IN UNA DONNA ADULTA TRAMITE LO SCREENING NEONATALE DEL SUO BAMBINO

T. Giovanniello¹, V. Leuzzi², C. Carducci³, F. Amoroso¹, M. Tolve³, C. Artiola¹, S. Santagata¹, C. Carducci¹

¹*Dip. Medicina Sperimentale. Università Sapienza Roma*

²*Dip. di Scienze Neurologiche e Psichiatriche dell'Età Evolutiva. Università Sapienza Roma*

³*Dip. Medicina Sperimentale e Dip. Medicina Molecolare. Università Sapienza Roma*

Il deficit di 3-metilcrotonil-CoAcarbossilasi (MCC, EC6.4.1.4) è trasmesso come carattere autosomico recessivo.

Fino ad oggi sono state descritte 100 mutazioni in entrambe le subunità dell'enzima: codificate dai geni MCCC1 e MCCC2. Il quadro clinico di MCCD è estremamente variabile anche all'interno della stessa famiglia. Le possibilità terapeutiche consistono nella supplementazione orale con L-carnitina e in una dieta povera di leucina. La patologia può essere diagnosticata in epoca neonatale attraverso lo screening per le malattie metaboliche.

Riportiamo il caso di una donna affetta da MCCD. La diagnosi è stata effettuata in seguito al controllo del figlio che presentava un aumento di C5OH allo screening neonatale. La paziente è una donna di 29 anni. Dai dati anamnestici raccolti si è evidenziato un adeguato sviluppo neurocognitivo e nessuna patologia degna di nota durante l'infanzia. A seguito del sospetto diagnostico, il profilo metabolico della donna ha mostrato un'elevata escrezione urinaria di 3-MCG, 3-HIVA e livelli elevati di C5OH nel sangue e nelle urine. All'osservazione la paziente presenta ipotiroidismo, obesità, lieve ipertransaminasemia associata ad una lieve steatosi epatica. All'indagine molecolare la paziente presenta un genotipo eterozigote composto per le seguenti mutazioni nel gene MCCC1: p.A268D e la p.R456C. Quest'ultima, mai descritta finora, non è presente nei database degli SNPs e in 112 alleli di controllo.

L'uso di tools bioinformatici per la valutazione teorica dell'impatto che la mutazione ha sulla proteina ha evidenziato che entrambe le mutazioni riducono la stabilità della proteina aumentandone l'energia libera. Entrambi gli aminoacidi interessati si trovano nel dominio di carbossilazione del cofattore, è possibile che la sostituzione aminoacidica a questo livello possa inficiare la funzione dell'enzima.

La diagnosi occasionale di MCCD in madri asintomatiche mostra quanto sia complessa la definizione di questa condizione. Una maggiore conoscenza dei meccanismi genetici e ambientali che concorrono all'espressione del fenotipo, diventa sempre più importante, non solo per la comprensione dei meccanismi fisiopatologici, ma anche per una più funzionale organizzazione dei pannelli di screening neonatale.

PRENATAL TESTING USING PYROSEQUENCING ASSAY TO CONFIRM BECKWITH WIEDEMANN SYNDROME IN A 13 WG FETUS WITH OMPHALOCELE

M. Calvello¹, E. Bonaparte¹, C. Augello¹, S. Tabano¹, B. Gentilin², T. Rizzuti¹, M. Miozzo¹, S.M. Sirchia³, F. Lalatta²

¹ *Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano; UOC Anatomia Patologica, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano.*

² *UOD Genetica Medica, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano.*

³ *Genetica Medica, Dipartimento di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano.*

Omphalocele is the most common congenital abdominal wall defect and can be isolated or associated with other structural anomalies. During pregnancy omphalocele can be detected by ultrasound from the 12th wg, however imaging does not allow to reveal other congenital anomalies until much later. Non-isolated omphalocele can be associated with chromosomal abnormalities or genetic syndromes, such as Beckwith Wiedemann syndrome (BWS). Several studies showed that in BWS patients, omphalocele is associated with hypomethylation of ICR2 or point mutations at CDKN1C gene.

We report a prenatal case of omphalocele detected at 13th wg by US imaging which did not evidence any other structural abnormalities. Fetal karyotype was 46,XX. Methylation status of 11p15.5 (ICR1, ICR2) was analyzed by pyrosequencing on AF DNA and hypomethylation at ICR2 was detected compared to AF controls (29% vs 37-47%). The analysis was concluded in 48 hrs after the AF sampling. Pregnancy was terminated at 20th wg. Autopsy confirmed the presence of omphalocele and revealed the following additional features: ear anomalies, macroglossia, visceromegaly, adrenal citomegaly and hypertrophic Langerhans cells. The presence of these signs, not detected by US, confirmed the molecular diagnosis of BWS. Methylation defect was also present in paraffin embedded placental samples.

This report suggests that pyrosequencing analysis is a very sensitive, specific and fast method for prenatal diagnosis of BWS.

NUOVA MUTAZIONE DEL GENE KIT IN UNA PAZIENTE CON PIEBALDISMO

C. Barone¹, L. Brandimarte², C. Matteucci², C. Mecucci², S. Melchionda⁴, M. Ruggieri³, P. Stanziale⁴, L. Zelante⁴, T. Mattina¹

¹*Genetica Medica –Università di Catania Centro di Riferimento Regionale per la Prevenzione Diagnosi e Cura delle Malattie Genetiche Rare, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico- Vittorio Emanuele di Catania*

²*Struttura di Genomica dei Tumori A.O. Università degli Studi di Perugia*

³*Dipartimento Scienze della Formazione, Università degli Studi di Catania*

⁴*Istituto di Ricovero e Cura a carattere scientifico, Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo*

Introduzione

Il piebaldismo (OMIM 17200) è una rara patologia autosomica dominante caratterizzata dalla presenza di macchie ipopigmentate a livello della parte mediana della fronte e diffuse a livello di torace, addome ed arti. È causato da mutazioni inattivanti o delezioni del gene KIT o del gene SLUG.

Caso clinico

Riportiamo il caso di una paziente, secondogenita di genitori sani non consanguinei, giunta in consulenza all'età di 11 anni per la presenza di grandi macchie ipocromiche ed acromiche a livello di torace, addome ed arti associate a numerose macchie caffelatte. La probanda presentava inoltre ciuffo bianco di capelli nella regione mediale della fronte. L'analisi molecolare degli esoni 2, 8, 10, 11, 17 del gene c-kit mediante DHPLC e sequenziamento diretto evidenziava una mutazione missenso c.2429 A>G p.D810G (NM_000222.2; CCDS3496.1) nell'esone 17. Tale mutazione non risulta descritta in letteratura, ma altre mutazioni missenso localizzate nella stessa regione sono responsabili di piebaldismo. Inoltre, l'analisi della mutazione tramite i softwares PolyPhen 2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) e SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) ci hanno indicato che la sostituzione dell'acido aspartico in posizione 810 della proteina è probabilmente dannosa in quanto tale aminoacido è altamente conservato nella scala evolutiva. La presenza di numerose macchie caffelatte ha reso altresì opportuna l'analisi molecolare del gene NF1 che non ha evidenziato, mediante MLPA, delezioni /duplicazioni del gene. È in corso analisi di sequenziamento.

Conclusioni

Il quadro clinico della nostra paziente presenta manifestazioni tipiche del piebaldismo e macchie caffelatte caratteristiche della NF1. La concomitante presenza di manifestazioni di questo tipo può creare difficoltà per una corretta diagnosi di piebaldismo o NF1. Diversi casi della letteratura (Stevens et al, 2012), suggeriscono che le macchie caffelatte ed il freckling possano costituire segni clinici occasionali osservabili nel piebaldismo, e la contemporanea presenza di mutazioni responsabili del piebaldismo e mosaicismi per mutazioni del gene NF1 non è mai stata riportata. Riteniamo comunque corretto completare le indagini molecolari del gene NF1.

PROPOSAL FOR A CLINICAL GENETIC DIAGNOSTIC FLOW-CHART FOR CLEFT LIP AND PALATE

A. Wischmeijer¹, M. Gnoli², E. Albertini³, L. Garavelli⁴, M. Seri⁵, D. Turchetti⁵

¹*Dept. of Medical Genetics, Policlinico S.Orsola-Malpighi, University of Bologna, Bologna and Clinical Genetics Unit, Arcispedale S. Maria Nuova, IRCCS, Reggio Emilia*

²*Dept. of Medical Genetics and Skeletal Rare Diseases, Rizzoli Orthopaedic Institute, Bologna*

³*Dept. of Orthodontics, University of Ferrara, Ferrara*

⁴*Clinical Genetics Unit, Arcispedale S. Maria Nuova, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Reggio Emilia*

⁵*Dept. of Medical Genetics, Policlinico S.Orsola-Malpighi, University of Bologna, Bologna*

Cleft lip with or without cleft palate (CL/P), and cleft palate alone (CP), epidemiologically and etiologically distinct entities, are among the most common birth defects in humans, with an overall incidence of 1 in 700 live births.

CL/P and CP most often appear as isolated defects and are considered as multifactorial disorders, related to environmental as well as genetic factors, which are currently poorly understood. Empiric recurrence risks in sibs of individuals with isolated CL/P range from about 3-7%, whereas recurrence risks in sibs of isolated CP patients are estimated to be about 2-4%.

Approximately 14-30% of CL/P cases, however, are associated with multiple anomalies, compared with 42-54% of CP cases. Several hundred syndromic conditions with CL/P or CP have been described. Syndromic forms of CL/P or CP with a predominantly genetic basis are mainly due to chromosomal aberrations or monogenic disorders. Chromosomal anomalies, such as trisomy 13 or 18, usually have a low recurrence risk in sibs of a proband, whereas in monogenic disorders, like IRF6- or p63-associated syndromes, the recurrence risk for sibs can be as high as 50%.

Thus, reaching an accurate diagnosis is important to counsel patients and their families properly about their condition (particularly in syndromic cases), recurrence risks, and possibilities of genetic testing. Moreover, a careful classification of different types of CL/P and CP leads to the formation of homogeneous patient groups, which can provide new epidemiological data and be helpful in the search for genetic factors implicated in isolated CL/P and CP, especially now that modern potent genetic research methods such as whole genome association (WGA) studies, array-comparative genomic hybridization (Array-CGH) and next generation sequencing (NGS) have become available.

Therefore, we propose a flow-chart of the clinical genetic diagnostic approach to the child with CL/P and CP.

IDENTIFICAZIONE DI SNP IN RNA-SEQ

L. Xumerle¹, I. Iacobucci², A. Mori¹, V. Mijatovic¹, G. Martinelli², P.F. Pignatti¹, G. Malerba¹

¹*Dip. di Scienze della Vita e della Riproduzione, Sez. di Biologia e genetica, Università degli Studi di Verona*

²*Dip. di Ematologia e di Scienze Oncologiche "L. e A. Seràgnoli", Università di Bologna*

Con la crescente diffusione dei nuovi sequenziatori massivi paralleli è possibile sequenziare milioni di sequenze (reads) che andranno poi allineate su un genoma di riferimento. In un secondo momento è possibile utilizzare le basi in mismatch con la sequenza di riferimento per identificare gli alleli di un possibile SNP. Scopo del lavoro è comparare alcuni dei programmi di allineamento più diffusi (bowtie2, tophat2, bwa, gsnap) per verificarne la precisione nello SNP detection e per valutare come possano essere settati i diversi parametri di funzionamento. Sono stati utilizzati i dati di 7 soggetti (2 di leucemia e 5 di Sindrome mieloproliferativa cronica) che sono stati precedentemente genotipizzati con i Chip GenomeWideSNP 6 di Affymetrix e per i quali è stato condotto uno studio di espressione globale tramite sequenziamento massivo parallelo (RNA-seq). Per determinare la bontà dell'allineamento nella SNP detection è stato creato uno script che va a determinare il genotipo di una data posizione direttamente nel file pileup prodotto dal programma samtools, senza utilizzare strumenti più avanzati come, ad esempio, GATK, dato che questi programmi richiedono un ulteriore passaggio computazionalmente molto oneroso.

Dai dati di RNA-seq sono stati identificati circa 3000 polimorfismi. Le prestazioni dei programmi vanno valutate considerando sia il numero di loci polimorfici identificati che la correttezza nella chiamata del genotipo (CCG). I nostri studi preliminari, ottenuti su due individui utilizzando i software con i parametri standard, mostrano come gsnap sia il programma che individua più loci. Nei due esperimenti condotti con gsnap abbiamo osservato la corretta genotipizzazione di 2156 su 2388 genotipi con CCG 90% in un esperimento e 2567 su 2763 genotipi con CCG 92% sul secondo. Per bwa, bowtie2 e tophat2 i risultati mostrano rispettivamente 1272 su 1454 genotipi con CCG 87%, 1236 su 1414 genotipi con CCG 87% e 369 su 466 genotipi con CCG 79% per il primo esperimento e 2160 su 2394 genotipi con CCG 90%, 2284 su 2538 genotipi con CCG 89% e 1070 su 1227 genotipi con CCG 87% per il secondo esperimento. Lo studio proseguirà stimando la sensibilità e specificità dei diversi programmi al variare dei parametri utilizzati.

VARIANTI ALLELICHE DEL GENE NOTCH3 IN UN PAZIENTE CON SOSPETTO CADASIL

C. Savio¹, P. Lulli¹, C. Bozzao¹, F. Libi¹, C. Rossi¹, G. Alfedi¹, F. Lemseged², L. Chessa¹

¹*U.O. Genetica Medica, Dip. Medicina Clinica e Molecolare, Università Sapienza, Roma*

²*U.O.C. Neurologia, Policlinico Tor Vergata, Roma*

L'arteriopatia cerebrale autosomica dominante con infarti subcorticali e leucoencefalopatia (CADASIL, MIM#125310) è la forma ereditaria più comune di arteriopatia sistemica non-amiloide. Può manifestarsi a partire dalla seconda decade di vita con attacchi ischemici subcorticali ricorrenti, decadimento cognitivo, alterazioni dell'umore, emicrania, estese lesioni della sostanza bianca evidenziabili alla risonanza magnetica per immagini (MRI) ed accumulo di granuli elettrondensi (GOM) nella tunica media delle arteriole. CADASIL è causata da mutazioni nel gene Notch3, che determinano l'acquisto o la perdita di residui di cisteina, con conseguente alterazione strutturale della proteina prodotta. Poche informazioni si hanno invece sulle altre varianti missenso e sul loro ruolo nello sviluppo della malattia.

In questo studio vengono riferiti i risultati dell'indagine molecolare del gene Notch3 condotta sul DNA di una paziente di 38 anni, proveniente dal Congo, giunta alla nostra osservazione con storia di emicrania sin dall'adolescenza, episodi di offuscamento del visus e brevi parestesie in emisoma dx. Alla MRI risultavano lesioni sottocorticali bilaterali interpretate come esiti gliotici. Veniva formulato il sospetto diagnostico di CADASIL e richiesta l'analisi di mutazione del gene Notch3. L'analisi molecolare mediante sequenziamento diretto di tutti gli esoni del gene ha permesso di identificare due variazioni di sequenza, A1020P (c.3058G>C) e V1183M (c.35474G>A), rispettivamente negli esoni 19 e 22, domini 26 e 30 di EGFR (epidermal growth factor-like repeat).

Tali varianti non coinvolgono residui di cisteina e sono state classificate come polimorfismi, tuttavia dall'analisi mediante software predittivi (SIFT e POLYPHEN), V1183M risulta a probabile significato patogenetico e A1020P risulta tollerata. Attualmente ci sono dati controversi sul significato patogenetico delle varianti e ci sono pochi dati circa la correlazione genotipo-fenotipo. Non possiamo ritenere con certezza che queste due varianti siano causative della patologia, è possibile però che insieme possano avere un effetto additivo e dare origine a forme moderate di CADASIL. Ulteriori indagini sono necessarie per capire se alterazioni in altri geni possano contribuire al fenotipo clinico.

CYTOGENETIC AND MOLECULAR ANALYSIS IN THREE TURNER PATIENTS SHOWING A MOSAIC KARYOTYPE WITH RING X

G. De Luca¹, L. Perone², A. Grandone³, M. Savarese¹, F. Del Vecchio Blanco¹, G. Piluso¹, E. Miraglia del Giudice³, L. Perrone³, V. Nigro¹

¹*Dipartimento di Patologia Generale, Seconda Università di Napoli, Naples, Italy*

²*Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Naples, Italy*

³*Dipartimento di Pediatria "F. Fede", Seconda Università di Napoli, Naples, Italy*

Turner syndrome (TS) affects about 1/2000-1/2500 female infants born alive and it is mostly associated with a 45,X karyotype.

In some patients with TS, the karyotype shows both a normal X and a structurally rearranged X chromosome. Most of the girls carrying a ring X chromosome present with somatic signs of TS, including short stature, peripheral edema, characteristic facial features, low posterior hairline, ovarian dysgenesis, endocrine disorders, and autoimmune conditions.

However, in cases of ring X chromosomes, the incidence of other risks, including mental retardation, learning difficulties, autistic spectrum disorders, and structural brain abnormalities can be significantly higher than in TS.

The atypical and more severe phenotype has been attributed to the grade of mosaicism, to incomplete or complete status of inactivation, and to the size of ring X.

Here we report three Turner patients showing a mosaic karyotype 45,X/46,r(X), detected using conventional cytogenetic and Fish analysis.

The first patient, M.R., shows clinical features represented by congenital nystagmus, high arched palate, horseshoe kidney, congenital patent foramen ovale, recurrent otitis media, obesity, hypertelorism, large nasal bridge, some cognitive dysfunction and a karyotype: mos 45, X, [40]/46X, r(X)[35].

The second one, R.C., is characterized by facial dysmorphism, high arched palate, ptosis, short neck, no mental retardation, recurrent otitis media, and a karyotype: mos 45,X[75]/46,X,r(X)[25].

The third patient, R.V., presents with ovarian failure, genu valgum, fourth short metacarpal and metatarsal, autoimmune disease, non-specific facial dysmorphic features, severe cognitive defects and a karyotype mos: 46,X,r(X)[24]/45,X[21].

Rings molecular characterization by aCGH and inactivation studies have been performed in order to compare our patients to other cases reported in the literature and to better analyze the karyotype-phenotype correlations.

SINDROME DI PRADER-WILLI DA TRASLOCAZIONE 5;15

P. Olivieri¹, M. Calabrese¹, A. Tafuri¹, C. Mastellone¹, C. Langella¹, R. Tortora¹, G. Pellegrino¹, P. Friso², G. Fioretti², M. Ingenito¹

¹Laboratorio di Genetica Molecolare e Citogenetica, U.O., P.O. Tortora, Pagani

²Genetica Medica, U.O.C., A.O. Cardarelli, Napoli

Riportiamo il caso di una neonata di 4 giorni ricoverata in terapia intensiva neonatale dell'Ospedale Umberto I di Nocera Inferiore. La paziente nata da genitori non consanguinei, presentava note dismorfiche ed ipotonia assiale. Veniva richiesto un cariotipo per escludere anomalie cromosomiche. L'esame dei cromosomi ottenuti da linfociti di sangue periferico secondo metodiche standard, evidenziava un cariotipo femminile con un cromosoma derivativo risultante da una traslocazione sbilanciata tra il braccio q di un cromosoma 15 a livello della regione 1 banda 3 e l'estremità terminale del braccio p di un cromosoma 5. Il tratto 15q11-q13 era deletato. Il cariotipo dei genitori risultava normale. Veniva effettuata FISH con le sonde Vysis D15S11 e SNRPN che evidenziava un solo segnale, conseguenza della traslocazione sbilanciata. L'utilizzo delle sonde D5S23 e D5S721 escludeva la delezione terminale submicroscopica di 5p. Le Sindromi di Prader Willi e di Angelman sono dovute alla perdita della regione critica 15q11-q13 su cromosomi di origine parentale diversa. Il test di metilazione evidenziava l'origine paterna del cromosoma traslocato. La Sindrome di Prader Willi da traslocazione sbilanciata si ritrova in circa l'1 % dei pazienti. Il fenotipo è sovrapponibile a quello da delezione classica.

La conoscenza precoce della causa genetica permette di prevedere l'evoluzione del quadro clinico dei pazienti. Soggetti con UPD materna hanno dismorfismi più sfumati rispetto a quelli con delezione, non presentano il fenomeno dello skin picking, né ipopigmentazione, ma disturbi psichici, depressione e psicosi più frequenti in età adulta.

La diagnosi precoce della Sindrome permette inoltre di anticipare la terapia multidisciplinare. La somministrazione dell'ormone GH migliora la qualità di vita dei soggetti, aumentando la velocità di crescita, migliorando la composizione della massa corporea e la funzionalità muscolare. È stata dimostrata anche una sua azione positiva sulle alterazioni della facies.

“BIOBANCHE E ASSOCIAZIONI DI PAZIENTI: L’ESPERIENZA DELLA GALLIERA GENETIC BANK”

C. Baldo¹, V. Viotti¹, M. Castagnetta¹, M. Mogni¹, D. Coviello¹

¹*Laboratorio di Genetica Umana, E.O. Ospedali Galliera*

La Galliera Genetic Bank (GGB), è stata istituita nel 1983 presso il Laboratorio di Genetica Umana dell'E.O. Ospedali Galliera di Genova, con l'obiettivo di conservare e distribuire per scopo di ricerca e diagnosi campioni biologici di persone e famiglie affette da patologie genetiche rare. La maggior parte dei campioni derivano da pazienti in cui è già stata effettuata una diagnosi citogenetica e/o molecolare. I restanti campioni, senza una precisa diagnosi, sono stati raccolti e archiviati per finalità diagnostiche future. La biobanca ha un sito web dedicato: <http://ggb.galliera.it> da cui è possibile consultare sia l'elenco dei campioni sia i servizi forniti ai ricercatori. Dal 2008 la GGB partecipa al "Network Telethon di Biobanche Genetiche" (TNGB) (www.biobanknetwork.org).

Una delle finalità del Network è quella di promuovere il ruolo delle Biobanche genetiche all'interno delle Associazioni familiari; infatti, nell'ambito delle malattie rare, è fondamentale accentrare la raccolta di campioni biologici e dati clinici collegati al fine di realizzare progetti di ricerca su queste specifiche condizioni. Nell'ambito di questa attività la GGB, in qualità di partner del TNGB, ha stipulato nel 2009 un accordo con L'Associazione Internazionale Ring 14 per la conservazione e distribuzione dei campioni di famiglie affette da anomalie del cromosoma 14. Grazie a questo accordo è stato possibile collezionare e conservare 152 campioni (DNA e linee cellulari) da 54 famiglie provenienti da diversi paesi: Italia, Francia, Spagna, America e Australia. In seguito a questa positiva esperienza il 20 febbraio 2012 è stato firmato un accordo quadro tra Telethon e Uniamo (Federazione italiana malattie rare) con lo scopo di facilitare il contatto tra le associazioni di malattia e la rete di biobanche Telethon. Sulla base di questo documento la biobanca GGB ha stipulato a luglio del 2012 due nuovi accordi con: l'Associazione Italiana Mowat Wilson e l'Associazione idic(15). Tutte le informazioni relative a queste collezioni sono messe a disposizione della comunità scientifica internazionale con l'obiettivo di intensificare la ricerca genomica e quindi aumentare le speranze dei pazienti in termini di miglior diagnosi e nuove terapie.

DELEZIONE 11q12.1 ASSOCIATA A DIFETTO DEL TUBO NEURALE SINDROMICO

U. Cavallari¹, S. Tedoldi¹, A. Impeduglia¹, P. Cavalli¹

¹*Servizio di Genetica, A.O. Istituti Ospitalieri di Cremona, Cremona*

Si ritiene che il 70% circa dei casi di difetti di chiusura del tubo neurale (DTN) abbia origine multifattoriale. Più raramente i DTN sono parte di un quadro sindromico, talvolta associato a disordini monogenici o ad anomalie citogenetiche. Lo studio del genoma mediante microarray cromosomici (CMA) ha già permesso di evidenziare riarrangiamenti submicroscopici non precedentemente descritti in individui con fenotipi neurocomportamentali patologici associati o meno a malformazioni congenite.

Utilizzando una piattaforma Array-CGH (ISCA 44K, Bluegenome) abbiamo identificato una delezione de novo di 2.75 Mb nella regione 11q12.1 in una paziente di 35 anni affetta da mielomeningocele, labioschisi, lievi dismorfismi facciali, ritardo mentale lieve ed epilessia. La regione non si sovrappone a varianti polimorfiche benigne presenti nei database di riferimento e comprende 19 geni descritti in OMIM dei quali nessuno sembra essere direttamente relazionabile a DTN o labiopalatoschisi. Almeno 6 geni (APLNR, P2RX3, RTN4RL2, YPEL4, SELH, CNTF) sono espressi a livello del sistema nervoso centrale ed uno di essi (SELH, selenoproteina H), codificante per una ossidoreduttasi nucleolare, è altamente espresso nelle fasi iniziali dello sviluppo embrionario. La delezione del gene C1NH giustifica l'occorrenza nella paziente di attacchi di angioedema.

Questo riscontro sottolinea l'importanza di eseguire l'analisi mediante CMA in tutti i casi di DTN associato a probabile o sospetto quadro sindromico e offre ulteriori spunti per l'identificazione di geni potenzialmente coinvolti nella patogenesi di labiopalatoschisi e DTN.

Inoltre, dal punto di vista clinico, l'analisi CMA potrebbe essere estesa a tutti i casi di feti affetti da DTN (anche materiale conservato in paraffina) per una migliore valutazione del rischio di ricorrenza della patologia.

Microdelezione 6p22.3: descrizione di un paziente con autismo, disabilità intellettiva grave ed anomalie EEG.

D. Di Benedetto¹, G. Di Vita¹, M. Lo Giudice¹, A. Vitello¹, O. Galesi¹, D. Luciano¹, L. Grillo¹, S.A. Musumeci¹, M. Fichera²

¹*IRCCS Associazione Oasi M. SS. Troina (En), Italia*

²*Genetica Medica, Università degli Studi di Catania, Italia ; IRCCS Associazione Oasi M. SS. Troina (En), Italia*

La sindrome da delezione 6p22-p24 descritta da Davies e collaboratori è caratterizzata da disabilità intellettiva di grado da moderato a grave, ritardo di crescita, ipotonia, dismorfismi cranio-facciali, alterazioni cerebrali, anomalie cardiache ed epatiche ed altre alterazioni minori. Recentemente, queste delezioni interstiziali sono state anche associate ad un fenotipo neurologico che comprende ASD, ritardo del linguaggio, ADHD o iperattività, ed altre anomalie comportamentali. Tuttavia, la presentazione clinica è variabile in relazione alle dimensioni e posizioni delle regioni delete e la correlazione genotipo-fenotipo è ancora oggetto di studio. Riportiamo la dettagliata caratterizzazione clinica e molecolare di un paziente con un quadro clinico caratterizzato da disabilità intellettiva grave, autismo ed anomalie EEG al fine di dare un contributo all'identificazione dei geni candidati per il fenotipo da delezione 6p.

Il paziente presenta una delezione de novo di 1 Mb nella regione cromosomica 6p22.3. I geni interessati dalla delezione sono 5 (JARID2, DTNBP1, MYLIP, GMP and ATXN1), sono tutti espressi nel cervello e svolgono un importante ruolo nella formazione e funzione neuronale.

La delezione è stata identificata mediante array-CGH con piattaforma 180K (Agilent Technologies), ed è stata confermata eseguendo un secondo esperimento array-CGH del paziente verso i genitori. L'analisi con microsatelliti, altamente informativi, nella regione di interesse ha evidenziato una origine paterna della delezione.

Con il presente caso restringiamo la minima regione di delezione e confermiamo la forte associazione tra ASD e disabilità intellettiva con la delezione della regione 6p22.3.

IMPACT OF GENETIC POLYMORPHISMS ON THE PATHOGENESIS OF IDIOPATHIC ACHALASIA: ASSOCIATION WITH IL33 GENE VARIANT

A. Latiano¹, O. Palmieri¹, F. Bossa¹, T. Latiano¹, G. Corritore¹, E. De Santo¹, G. Martino¹, A. Merla¹, M.R. Valvano¹, A. Cuttitta², V. Annese³, A. Andriulli¹

¹*IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, Div. of Gastroenterology, San Giovanni Rotondo, Italy*

²*IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, Unit of General Surgery 2nd and Thoracic Surgery, San Giovanni Rotondo, Italy*

³*Gastroenterology Unit, AOU Careggi Hospital, Florence, Italy*

Idiopathic achalasia is a rare primary motility disorder of the esophagus. The classical features are incomplete relaxation of a frequently hypertensive lower esophageal sphincter and a lack of peristalsis in the tubular esophagus. These motor abnormalities lead to dysphagia, stasis, regurgitation, weight loss, or secondary respiratory complications. Although the etiology of idiopathic achalasia remains unknown, there is an increase body of evidence to implicate an immune-inflammatory basis on the pathogenesis. Aim: We investigated the association of polymorphisms of genes involved in the regulation of immune responses, IL33, IL1RL1, IL23R, and IL10, in an Italian population of patients with achalasia. Methods: A panel of ten polymorphisms were genotyped in 116 non-related idiopathic achalasia patients and 371 healthy subjects, by using TaqMan genotyping assays. Results: Significant differences of allele ($P = 0.0065$, OR = 1.59, CI = 1.14-2.22) and genotype ($P = 0.0097$, OR = 1.74, CI = 1.14-2.65) frequencies of the IL33 rs3939286 variant was found between achalasia patients and controls. No association of the other investigated SNPs with achalasia was detected. No differences in genotype and allele distribution were found with respect to clinical characteristics of patients with achalasia. Conclusion: We provide for the first time an association between the risk of developing idiopathic achalasia and IL-33 variant, underling the role of the cytokines and other inflammatory mediators on the pathogenesis of achalasia.

ALPORT SYNDROME: SIMULTANEOUS MUTATION ANALYSIS OF COL4A3, COL4A4 AND COL4A5 GENES IN 81 UNRELATED PATIENTS BY A BENCHTOP NEXT GENERATION SEQUENCER

C. Fallerini¹, L. Dosa¹, A. Seri¹, D. Del Prete², S. Feriozzi³, G. Gai⁴, M. Clementi⁵, A. La Manna⁶, N. Miglietti⁷, R. Mancini¹, G. Mandrile⁸, M. Ghiggeri⁹, F. Brancati¹⁰, E. Frate¹¹, A. Pinciaroli¹², M. Gianì¹³, D. Giachino⁸, M. De Marchi⁸, F. Mari¹, M. Bruttini¹, F. Ariani¹, A. Renieri¹

¹Genetica Medica, Università degli Studi di Siena

²Dipartimento di Medicina, Clinica Nefrologica, Università di Padova

³U.O.C. Nefrologia e Dialisi, Ospedale Belcolle, Viterbo

⁴S.C.D.U. Genetica Medica, A.O. Città della Salute e della Scienza, Torino

⁵Genetica Clinica, Università di Padova

⁶Dipartimento di Pediatria, Seconda Università di Napoli

⁷Clinica Pediatrica di Brescia

⁸Genetica Medica San Luigi, Università di Torino

⁹U.O. Nefrologia Dialisi e Trapianto, istituto "G. Gaslini", Genova

¹⁰Genetica Medica, Policlinico Universitario "Tor Vergata", Roma

¹¹Genetica Medica, Azienda Unita Locale Socio-Sanitaria n°9, Treviso

¹²S.O.C. di Nefrologia e Dialisi, Dipartimento Medicina Generale e Specialità Mediche "Giuseppe Spada", A.O. Pugliese-Ciaccio, Catanzaro

¹³U.O.C. Nefrologia e Emodialisi Pediatrica, Ospedale Maggiore Policlinico, Milano

Alport syndrome (ATS) is a clinically and genetically heterogeneous progressive nephropathy often associated with sensorineural hearing loss and/or ocular abnormalities. ATS shows a prevalence of 1:5000 and accounts for 1-2% of chronic renal failure cases in Europe. It is caused by mutations in three large genes encoding type IV collagen chains: the X-linked gene COL4A5 (51 exons), responsible for 85% of cases, and the autosomal COL4A3 (52 exons) and COL4A4 (48 exons) genes on chromosome 2 accounting for the rest of cases. We previously developed a protocol for the simultaneous analysis of mutations in the three genes using a benchtop Next Generation Sequencer (454 GS Junior, Roche). Using this technology, we screened a cohort of 81 ATS patients and we found 42 pathogenic mutations, of which 27 were never reported before. Unexpectedly, among the 37 mutated cases, 19 were X-linked (51%), 15 autosomal dominant (41%) and 3 autosomal recessive (8%), indicating that autosomal ATS forms may be underestimated. The introduction of NGS was extremely useful for the rapid diagnosis in cases with less informative pedigrees. The cohort included 9 families in which the clinical diagnosis was compatible with both an X-linked and an autosomal dominant inheritance and 8 sporadic cases. In a traditional diagnostic workflow, prioritization based on reported mutation frequency would have led to the analysis of COL4A5 and, as second step, of COL4A3 and COL4A4. The simultaneous mutation analysis of the three genes by NGS allowed to directly identify 3 mutations in COL4A3 and 4 in COL4A4, allowing a significant reduction of turnaround time in the lab. Moreover, in 5 families clinical data and family history suggested a dominant inheritance while NGS detected COL4A5 mutations. Finally, NGS allowed to identify 4 mutations that had been missed by previous DHPLC analysis, showing a higher sensitivity respect to traditional methods. In conclusion, this study illustrates how benchtop high-throughput sequencing platforms are poised to make a decisive impact on the diagnosis of genetic diseases, especially of clinically and genetically heterogeneous conditions.

ANALISI DI ABORTI SPONTANEI NEL PRIMO TRIMESTRE DI GRAVIDANZA MEDIANTE ARRAY CGH

C.D. Viaggi¹, S. Cavani¹, M. Malacarne¹, F. Floriddia¹, M. Mogni¹, M. Castagnetta¹, G. Piombo¹, D.A. Coviello¹, F. Camandona², D. Lijoi², W. Insegno³, M. Pierluigi¹

¹Laboratorio di Genetica Umana, E.O. Ospedali Galliera, Genova

²Reparto di Ginecologia, E.O. Ospedali Galliera, Genova

³Reparto di Ginecologia, Ospedale Evangelico Internazionale, Genova

Il 10-15% delle gravidanze esita in aborto spontaneo, la maggior parte delle interruzioni spontanee avviene nel primo trimestre, di queste circa il 50% sono dovute ad alterazioni cromosomiche. Lo studio Array-CGH su DNA estratto da tessuti fetali non coltivati, si è rivelato un utile strumento nell'identificazione di microriarrangiamenti, non visibili al cariotipo standard, che possano essere causativi dell'aborto spontaneo.

In questo studio abbiamo analizzato 40 campioni di tessuto fetale derivati da interruzioni spontanee avvenute tra la 7° e la 11° settimana di gestazione con cariotipo normale, utilizzando una piattaforma Array-CGH con risoluzione di circa 100Kb. Il nostro scopo è stato quello di verificare la presenza e la prevalenza di CNV e la possibilità di identificare geni candidati all'interno di tali riarrangiamenti con un possibile coinvolgimento nello sviluppo embrionale precoce e nell'aborto spontaneo. Abbiamo identificato 45 CNV, comprese tra 120Kb and 4.3 Mb, in 31 campioni. 24 CNV erano presenti in duplicazione e 21 in delezione. 10 campioni (10/31, 32%) hanno evidenziato più di una CNV. 31 CNV (68%) sono state identificate come polimorfiche, 14 (31%) non erano presenti nel DGV. Analizzando il contenuto genico delle varianti statisticamente significative (test di Fisher) abbiamo identificato alcune CNV contenenti possibili geni candidati coinvolti in pathway di adesione cellulare, trascrizione, trafficking vescicolare ed apoptosi (LYN, MAPK11, MAPK12, HDAC10, PSPC1).

MOLECULAR ANALYSIS OF THREE PATIENTS WITH ELEVATED LONG-CHAIN 3-OH-ACYLCARNITINES

G. Frisso¹, C. Cozzolino¹, R. Romanelli¹, E. Scolamiero¹, G. Parenti², G. Andria², M. Ruoppolo¹, F. Salvatore¹

¹*Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II" & CEINGE-Biotecnologie Avanzate scrl, Napoli*

²*Dip. di Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli*

The mitochondrial trifunctional protein (MTP) is a multienzyme complex of the fatty acid beta-oxidation cycle. It is composed of 4 α -subunits (encoded by HADHA) harboring long-chain 2,3 enoyl-CoA hydratase (LCEH) and long-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD), and 4 β -subunits (encoded by HADHB) harboring long-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase (LCKT). MTP deficiency is an autosomal recessive disorder distinguished in two diseases: isolated LCHAD deficiency (LCHADD), characterized by reduced LCHAD activity, and general MTP deficiency (MTPD), characterized by reduced activity of all three MTP enzymes. Here, we report three patients, for which plasma acylcarnitine profile analysis by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) showed an increase of long-chain 3-hydroxy species: 3-OH-palmitoylcarnitine (C16OH) and 3-OH-oleylcarnitine, (C18:1OH). These findings suggested either long-chain 3-hydroxyacyl-coA dehydrogenase deficiency (LCHADD) or complete MTP deficiency. By molecular analysis of the HADHA and HADHB genes, the patients 1 and 2 revealed homozygosity for the common β -subunit mutation c. G1528C (p.E510Q), that is located directly within the catalytic region of the LCHAD domain and is present in homozygous form in about 70% of affected individuals. These results are consistent with LCHADD diagnosis. Patient 3 was found to be a compound heterozygote for 2 novel mutations in HADHB gene: c.A284G (p. T62A), absent in 600 normal chromosomes, and c. 358+1 G>A, resulting in the skipping of exon 5 with an in-frame 44-bp deletion, suggesting MTP deficiency.

In conclusion, we emphasize the importance of genetic analysis for a correct differential diagnosis of diseases that show overlapping biochemical findings, such as LCHADD and MTPD.

ESPERIENZA MONOCENTRICA DI UTILIZZAZIONE ROUTINARIA DELLE SONDE LSI EGR1/D5S23, D5S721, LSI CSF1/D5S721, PER LA VALUTAZIONE DELL'ANOMALIA CROMOSOMICA DEL(5Q) NELLE SINDROMI MIELODISPLASTICHE

I. Caliendo¹, P. Danise², C. Fabbricatore¹, M. Ergoli¹, G. Pellegrino¹, M. Ingenito¹, A.M. D'Arco²

¹*U.O.C Patologia Clinica, P.O. Umberto I, Nocera Inferiore (SA)*

²*Dip. di Onco-Ematologia, P.O. Umberto I, Nocera Inferiore (SA)*

Premessa

La Sindrome Mielodisplastica (MDS) con delezione isolata del braccio lungo del cromosoma 5 rappresenta un'entità definita come Sindrome 5q-. La Sindrome 5q- può risultare da delezioni interstiziali di vario tipo a livello delle braccia lunghe del cromosoma 5, con molteplici punti di rottura tali da determinare segmenti deleti di diversa lunghezza che a volte non sono identificabili con la Citogenetica Convenzionale (CC). Pertanto, quando si sospetta una del(5q) risulta indispensabile eseguire la Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) con specifiche sonde; contemporaneamente va sempre eseguita la CC che permette di analizzare il cariotipo del paziente ed evidenziare alterazioni cromosomiche e/o evoluzioni clonali diverse dalla del(5q).

Scopo del lavoro

Lo scopo del lavoro è quello di valutare il contributo della FISH, nell'identificazione dell'alterazione citogenetica del(5q) al momento della diagnosi e nel follow-up dei pazienti in terapia.

Materiali e metodi

L'analisi citogenetica e FISH è stata eseguita nel corso dell'anno 2011 sul campione di sangue midollare di 31 pazienti con diagnosi di MDS. I 31 campioni sono stati valutati contemporaneamente con la CC e con la metodica FISH utilizzando le specifiche sonde per la del(5q): LSI CSF1/D5S23,D5S721; LSI EGR1/D5S23,D5S721 (Abbott).

Con la CC è stato possibile valutare 29 campioni dei 31 analizzati.

Risultati

Dei 31 campioni analizzati 20 (64,5%) hanno mostrato cariotipo normale; 7 campioni su 31 (22,5%) hanno presentato alterazioni citogenetiche diverse dalla del(5q); in due campioni (6,45%) è stata fatta diagnosi di del(5q), mentre altri 2 campioni su 31 (6,45%) rappresentavano il follow-up di pazienti in terapia con Lenalidomida. I risultati della CC e della FISH sono stati concordi sia nei campioni positivi che negativi per la del(5q).

In uno dei due pazienti in cui è stata eseguita diagnosi di del(5q) è stata di fondamentale importanza l'apporto della FISH, poiché i risultati ottenuti con la CC non sono stati soddisfacenti a definire tale alterazione cromosomica.

Conclusioni

Dai risultati ottenuti si evince che la CC e la FISH sono entrambi indispensabili per la diagnosi e il follow-up dei pazienti che presentano l'alterazione citogenetica del(5q).

SET UP OF A NEXT GENERATION SEQUENCING PROTOCOL FOR THE DIAGNOSIS OF COHEN SYNDROME

R. Tita¹, V. Bizzarri¹, L. Dosa¹, M. Baldassarri¹, M. Bordignon², L. Salviati³, G. Ciana⁴, M. Mencarelli¹, M. Bruttini¹, R. Tenconi⁵, I. Longo¹, F. Ariani¹, F. Mari¹, A. Renieri¹

¹*Genetica Medica, Università degli studi di Siena*

²*UO di Pediatria, Osp. di Montebelluna, Montebelluna (TV)*

³*Genetica Clinica, Dipartimento Salute Donna e Bambino, Università di Padova*

⁴*Centro Regionale per le Malattie Rare, AOU "S. Maria della Misericordia", Udine*

⁵*Via Agnus Dei 26, Padova*

Cohen syndrome is a rare autosomal recessive disorder whose clinical diagnosis is based on the following phenotypic characteristics: non-progressive intellectual deficit (ID), microcephaly, typical facial gestalt, hypotonia, isolated neutropenia, retinopathy and myopia. The phenotype was found to be associated with mutations in the COH1 gene (VPS13B) that includes up to 62 exons with the longest transcript of 14,093 nt. The conventional mutational screening, performed by DHPLC and/or Sanger sequencing, is time-consuming and has relatively high costs because of size of the gene and the absence of mutational hot spots. For these reasons, we designed a Next Generation Sequencing (NGS) protocol which allows to analyze all exons of the COH1 gene in a single experiment. In particular, we used the Roche 454 platform (GS Junior), a smaller version of the 454 GS FLX machine, exploiting similar emulsion PCR and pyrosequencing approaches, but with lower set-up and running costs. In a first pilot experiment, this method allowed to perform molecular diagnosis of Cohen syndrome in three patients. In the first case, the analysis of large rearrangements by MLPA previously identified a duplication including exons 34-35 in heterozygous state but DHPLC analysis failed to detect the second mutation. The employment of NGS revealed the presence of a silent variant c.6309A>T (p.G2103G) that introduces an aberrant acceptor splice site (prediction software: NetGene2 Server). In the second patient, resulted negative by conventional analysis, NGS detected the presence of the mutation c.4708G> T (p.A1570S) in homozygous state. In the third case, involving a pair of affected dizygotic twins, NGS detected an homozygous frameshift mutation: c.11125delC (p.T3708fsX61). In conclusion, here we report the first successful application of the 454 GS Junior Sequencing platform to the molecular diagnosis of Cohen syndrome. Although improvements will be necessary in software data analysis, our study demonstrates that the system can be used to perform a rapid, sensitive and relatively low-cost screening of variations in COH1 gene.

DELEZIONE INTERSTIZIALE DE NOVO DELLA REGIONE 13q12.11: SEGNALAZIONE DI UN NUOVO CASO E REVISIONE DELLA LETTERATURA

U. Cavallari¹, S. Tedoldi¹, B. Riboli¹, A. Impeduglia¹, P. Cavalli¹

¹*Servizio di Genetica, A.O. Istituti Ospitalieri di Cremona, Cremona*

Nella recente letteratura sono stati riportati in modo indipendente due casi di delezioni interstiziali della regione 13q12.11 in individui di sesso maschile con dismorfismi facciali, lievi anomalie toraco-vertebrali e disturbi neuropsichiatrici [1][2]. La regione deleta comune si estende per 2.1 Mb e contiene 16 geni incluso il locus DFNB1 (GJB2, GJB6).

Riportiamo il caso di una donna di 32 anni con una delezione più piccola nella stessa regione cromosomica e caratteristiche cliniche comuni ai casi già segnalati, suggerendo l'esistenza di una sindrome da microdelezione con fenotipo specifico.

La paziente presenta lieve disabilità intellettiva e disturbi nel comportamento (shopping compulsivo), anomalie scheletriche (displasia dell'anca, piede piatto, scoliosi importante, spalle spioventi, clinodattilia del 5° dito bilaterale), caratteristiche cranio-facciali peculiari (capelli sottili, volto allungato, ponte nasale alto con ipoplasia delle ali del naso, filtro lungo e poco pronunciato, labbra sottili, palato molto alto e stretto con ugola bifida). L'analisi mediante array-CGH (ISCA 180K, Bluegenome) ha evidenziato una delezione di 1.79 Mb nella regione 13q12.11 tra la base 20,153,718 e la base 21,945,885 di origine de novo.

La regione comune di sovrapposizione con i casi precedentemente descritti si estende per 1.5 Mb e contiene 14 geni (ZMYM2, GJA3, GJB2, GJB6, CRYL1, IFT88, IL17D, N6AMT2, XPO4, LATS2, SAP18, SKA3, MRP63, ZDHHC20). Caratteristiche cliniche comuni comprendono un importante ritardo nel linguaggio, un livello cognitivo che va dal normale al lieve ritardo mentale, lievi anomalie toraco-vertebrali (es. fusioni vertebrali, scoliosi, spalle spioventi), caratteristiche facciali (viso allungato, ipoplasia delle ali del naso, filtro lungo, labbra sottili, palato molto alto e stretto).

Il presente caso permette di restringere la regione minima di delezione associata al quadro clinico riportato. Ulteriori segnalazioni di individui affetti saranno necessari per restringere ulteriormente la regione causale e definire il ruolo dei geni coinvolti.

[1] Der Kaloustian et al., *Am J Med Genet* 2011,155A(10):2538-42.

[2] Tanteles GA, et al. *Clin Dysmorphol* 2011, 20(2):61-65.

IDENTIFICATION OF NOVEL DEAFNESS-CAUSING VARIANTS IN THE TMPRSS3 GENE BY WHOLE-EXOME SEQUENCING

M. Robusto¹, R. Asselta¹, A. Ghilardi², P. Castorina³, E. Benzoni³, P. Primignani⁴, U. Ambrosetti³, L. Del Giacco², S. Caccia¹, S. Duga¹, G. Soldà¹

¹*Dip. di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia*

²*Dip. di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Milano, Italia*

³*Medical Genetics Lab. and U.O. Audiology, Fondazione IRCCS, Osp. Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Milan, Italy*

⁴*Medical Genetics Lab., Osp. Niguarda Cà Granda, Milan, Italy*

Whole-exome next-generation sequencing (WES) currently represents one of the most efficient strategies to identify causative mutations underlying highly heterogeneous inherited diseases, such as nonsyndromic sensorineural hearing loss (NSHL). In this study, three NSHL families (NSHL6-8), with a recessive inheritance pattern and at least two affected individuals, were subjected to WES using the 50M SureSelect exome capture enrichment kit (Agilent) and an HiSeq 2000 sequencer (Illumina). All the analyzed probands were negative for variations in the GJB2, GJB6, and MTRNR1 genes. For two families (NSHL7 and 8), no putative pathogenic mutations in known NSHL genes were found. Candidate variants in novel genes are currently being tested to evaluate their segregation with the disease in the probands' families and their recurrence in a cohort of 1124 Italian NSHL patients.

In the third analyzed family (NSHL6), instead, two novel variants (Trp268Arg and Arg435His) in the TMPRSS3 gene (transmembrane serine protease 3, DFNB8/10 locus) were found in the heterozygous state and shown to segregate with post-lingual, bilateral, high-frequency hearing loss. Both missense mutations are located within the serine-protease domain of TMPRSS3 and affect evolutionarily conserved amino acids.

Although several NSHL-causing mutations in TMPRSS3 have been described over the years, the actual function of this protein in the auditory system is currently elusive. The existence of at least one orthologue in zebrafish (*Danio rerio*) with a sequence identity of about 56% with the human protein, suggests the use of this model to better understand the role of TMPRSS3 in hair-cell development, as well as the impact of the identified mutations on the protein function.

In conclusion, we provide evidence of the usefulness of WES for the genetic diagnosis of NSHL and we contribute to amplify the mutational spectrum of the TMPRSS3 gene.

Protocollo diagnostico per la caratterizzazione molecolare della Distrofia muscolare di Duchenne (DMD) e di Becker (BMD) attraverso multiplex PCR ed elettroforesi capillare

S. Gambardella², R. Marini², R. Cascella¹, G. Barrano³, M. Di Gregorio³, A. Sabino⁴, A.M. Nardone⁵, A. Mesoraca⁶, E. Giardina¹, G. Galluzzi⁴, L. Seminara⁷, G. Sabbadini⁷

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

²Orga Bio Human srl, Roma, Italia

³UOSD di Genetica Medica, Ospedale San Pietro Fatebenefratelli, Roma, Italia

⁴Lab. di genetica molecolare UILDM Sezione Laziale - IRCSS Fondazione Santa Lucia, Roma, Italia

⁵Dip. di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Universitaria Policlinico di Tor Vergata, Roma, Italia

⁶Artemisia Medical Group, Roma, Italia

⁷Istituto di diagnostica clinica PRODA, Roma, Italia

Le distrofie muscolari di Duchenne (DMD) e di Becker (BMD) sono malattie degenerative della muscolatura scheletrica ad eredità recessiva legata al sesso. Il gene responsabile della patologia mappa sul braccio corto del cromosoma X, ed è organizzato in 79 esoni codificanti per una proteina strutturale del muscolo, la distrofina.

La mutazione più frequente (65-70%) è la delezione intragenica di tratti più o meno estesi di DNA, mentre il rimanente 30-35% dei casi è dovuto a mutazioni diverse da delezioni.

La diagnosi molecolare DMD/BMD viene oggi effettuata utilizzando metodiche complesse, di difficile interpretazione e poco automatizzate. Per far fronte a tale necessità abbiamo sviluppato DMD/BMD Detection kit (CE), che utilizza un protocollo diagnostico rapido ed efficace per l'identificazione di più del 95% delle delezioni nel gene della distrofina (65% circa dei casi di DMD/BMD).

Il test consiste nella amplificazione simultanea di 18 esoni più il promotore del gene della distrofina con primers fluorescinati in 6' FAM o in 5' HEX (Chamberlain et al., 1988 e Beggs et al., 1990), con successiva separazione in elettroforesi capillare. Per la validazione del kit è stato condotto uno studio multicentrico. Sono stati reclutati 30 pazienti con diagnosi clinica e molecolare di DMD/BMD e 100 soggetti di controllo.

Il kit ha permesso di identificare tutti i pazienti con delezioni nei 19 esoni considerati (23 dei 30 pazienti). I restanti 7 pazienti non caratterizzati erano portatori di mutazioni non identificabili con il kit (duplicazioni, delezioni in esoni non considerati nel kit). Oltretutto, il kit non ha consentito di evidenziare delezioni in femmine portatrici, mostrando la sua accuratezza diagnostica solamente in soggetti di sesso maschile.

Lo studio multicentrico ha permesso di stabilire come la sensibilità e la specificità del test sia $\geq 99,9\%$, ed ha dimostrato che il kit, considerate attentamente le sue prestazioni ed i suoi limiti, è in grado di evidenziare il 95% delle delezioni osservate in pazienti DMD/BMD.

Pertanto, il kit può essere utilizzato, in sinergia con altre metodiche, per la diagnosi molecolare di DMD e BMD.

TREATING KABUKI SYNDROME BY MLL2 NONSENSE MUTATIONS READ-THROUGH STRATEGY

C. Maffeo¹, L. Micale¹, B. Augello¹, C. Fusco¹, M.T. Pellico¹, A. Selicorni², F. Zucchetti², L. Zelante¹, G. Merla¹

¹*Medical Genetics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, 71013 San Giovanni Rotondo, Italy*

²*Ambulatorio Genetica Clinica Pediatrica, Clinica Pediatrica Università Milano, Bicocca, Fondazione MBBM AOS Gerardo Monza, Italy*

Kabuki syndrome (KS) is a rare, multiple congenital anomalies/mental retardation syndrome. Exome sequencing identified MLL2 mutations as a major cause of KS. MLL2 protein is a member of the Mixed Lineage Leukemia family of histone methyl transferases that act as epigenetic transcription factors by mainly regulating the expression of genes involved in embryogenesis and development, including the HOX genes. More recently, three KS patients with deletions in the KDM6A gene were reported. To date we have enrolled nearly 300 individuals clinically diagnosed as KS. Mutational screening detected MLL2 nucleotide variants in approximately 70% of patients. The majority of them carry nonsense mutations (40%) predicted to truncate the polypeptide chain of the protein suggesting loss of function, and therefore haploinsufficiency as the likely mechanism for the KS phenotype. Splice site and frameshift mutations were also identified. Molecular assays showed that MLL2 mRNAs bearing premature stop codon are degraded by the nonsense mediated mRNA decay, the major mechanism of mRNA surveillance that detect nonsense mutations and prevent the expression of truncated proteins, contributing to MLL2 protein haploinsufficiency. RT-qPCR and direct sequencing on RNA from Kabuki patients carrying MLL2 splice site mutations demonstrated that these variants cause aberrant splicing of the corresponding transcript resulting in a truncating and not functional protein.

We hypothesized that a number of KS patients may benefit from a readthrough therapy that mediates translational suppression of nonsense mutations, restoring the physiologically levels of endogenous MLL2 protein. Fifteen MLL2 nonsense mutations were tested for their response to readthrough treatment through an in vitro dual reporter luciferase vector system. Our experimental data selected 11 MLL2 nonsense mutations (70%) whose displayed the highest levels of readthrough in response to several compounds. We are confirming the therapeutic potential of readthrough treatment in KS cell lines of those patients carrying MLL2 non-sense mutations. We are confident that the proposed therapeutic approach may move us closer to personalized medicine for KS.

Una delezione di 660 Kb a monte del gene lamina B1 (LMNB1) ha un effetto analogo alla sua duplicazione genica e causa leucodistrofia autosomica dominante dell'adulto (ADLD)

E. Giorgio¹, D. Robyr², E. Di Gregorio¹, D. Lacerenza³, G. Vaula⁴, A. Brusco¹, S. Antonarakis², A. Brussino¹

¹*Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino*

²*Department of Genetic Medicine and Development, University of Geneva Medical School and University Hospitals of Geneva, Geneva, Switzerland*

³*SCDU Genetica Medica, Città della Salute e della Scienza, Torino*

⁴*Department of Neuroscience, AOU S. Giovanni Battista, Torino, Italy*

La leucodistrofia autosomica dominante dell'adulto (ADLD) è una rara patologia demielinizzante al momento associata solo a duplicazioni del gene lamina B1 (LMNB1). Abbiamo studiato una grande famiglia Italiana in cui segrega una forma di ADLD e mappato il locus malattia sul cromosoma 5q23.2 nella regione del gene LMNB1, senza identificare duplicazioni/delezioni o mutazioni puntiformi nel gene. L'analisi di espressione nei fibroblasti dei pazienti ha mostrato sovra espressione di LMNB1, sia a livello di mRNA che di proteina.

Utilizzando l'array-CGH abbiamo identificato una delezione di circa 660 Kb, fiancheggiata da due elementi Alu, 66 Kb a monte del 5'UTR del gene LMNB1. All'interno della delezione sono presenti tre geni, GRAMD3, ALDH7A1 and PHAX: il loro silenziamento in cellule HeLa utilizzando shRNA ha dimostrato che l'assenza di uno dei tre geni non influenza i livelli di espressione di LMNB1.

Ipotizzando che un elemento regolatorio mappasse all'interno della delezione abbiamo eseguito una circular chromosome conformation capture (4C) su fibroblasti di un paziente e di un controllo, utilizzando il promotore della lamina come esca. Abbiamo identificato quattro potenziali elementi regolatori: l'elemento A, localizzato nella regione deleta (0,12 Mb centromericamente rispetto a LMNB1) che interagisce con il promotore in pazienti e controlli, e gli elementi B, C e D (0,77, 1,9 e 2,0 Mb a monte di LMNB1) la cui interazione è specifica per i pazienti.

Ognuna delle quattro regioni è stata clonata in un vettore pGL4.10 (Promega) a monte del gene della luciferasi sotto il promotore della lamina B1, per valutarne l'effetto con un saggio dual-luciferase. Abbiamo dimostrato che due regioni si comportano come enhancer, l'elemento A e B. Entrambi non sono riportati come enhancer di LMNB1 e non sono evolutivamente conservati.

Nei pazienti, quindi, la delezione rimuove l'enhancer A ed avvicina alla lamina B1 l'enhancer B. Poiché gli esperimenti di dual-luciferase dimostrano che l'elemento B è un enhancer più forte di A (luciferasi/controllo= 3,4 contro 2,8), è verosimile che questo causi un aumento nell'espressione di LMNB1.

Questo risultato è un ulteriore esempio di mutazioni in regioni regolatorie che causano patologie mendeliane.

VALUTAZIONE DELLE STRATEGIE DIAGNOSTICHE PIU' COMUNI NELLO SCREENING PRENATALE DEL GENE CFTR. LA NOSTRA CASISTICA .

A. Mesoraca¹, A. Cima¹, G. Di Giacomo¹, G. Sarti¹, A. Viola¹, M.A. Barone¹, S. Monti¹, P. Cignini², C. Giorlandino²

¹Lab. di Genetica Medica, Artemisia Roma

²Servizio di Diagnosi Prenatale, Artemisia Roma

Durante il colloquio informativo pre-amniocentesi, in un periodo che va dal 1997 al mese di settembre 2012, il 75% delle pazienti ha richiesto lo screening per il gene CFTR (MIM: 219700). Il 3-5% di queste lo ha richiesto per familiarità, il 2-3% per l'evidenza di segni ecografici fetali: ileo da meconio, dilatazione dell'intestino distale, la maggior parte per motivi personali e di tranquillità psicologica. Nel corso degli anni è aumentata la detection rate dello screening del gene CFTR per utilizzo di sistemi diagnostici più sensibili: Reverse Dot Blot, PCR-OLA, DHPLC, sequenziamento automatico del gene. In circa 15 anni 33.075 gestanti hanno richiesto lo screening, 1281 feti sono risultati eterozigoti, 13 omozigoti affetti con frequenza relativa, rispettivamente, di 1:26 eterozigoti e 1:2545 omozigoti affetti. L'uso dei kit commerciali ha permesso una detection rate crescente nel corso degli anni, tra il 71% e l'85%. Per evitare ad inappropriate caratterizzazioni di genotipi FC, eterozigoti ed omozigoti sono stati confermati con i sistemi alternativi (OLA, RDB, DHPLC, Seq). Tutti gli eterozigoti sono stati sottoposti anche a sequenziamento degli esoni 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 14b, 17b, 18, 20, 21, 23. In 33 feti di 1281 eterozigoti si è rilevata la presenza di polimorfismi noti non determinanti fenotipicamente, con un incremento della detection rate non significativo rispetto alle due metodiche OLA e RDB. Per 2 dei 13 omozigoti affetti la caratterizzazione è stata definita attraverso il sequenziamento, riscontrando due mutazioni rare non comprese nei kit commerciali. La sensibilità combinata dei due metodi RDB ed OLA non è inferiore al 99%, mentre la specificità è comunque abbastanza alta, sebbene siano possibili falsi positivi e falsi negativi, potenzialmente smascherabili utilizzando più metodi diagnostici. In conclusione, uno screening eseguito su larga scala, come in questo studio, va valutato naturalmente nella capacità diagnostica attraverso i due parametri fondamentali della sensibilità e della specificità. In relazione a questo è consigliabile, dunque, per la caratterizzazione molecolare del gene CFTR, integrare più sistemi diagnostici per escludere la presenza di alleli FC rari, e confermare quelli ritrovati con i sistemi diagnostici più frequentemente utilizzati.

Novel mutation in TREX1 gene associated with Systemic Lupus Erythematosus (SLE)

M. Bianchi¹, A. Tincani², E. Fazzi³, G.S. Grieco¹, S. Orcesi⁴, I. Olivieri⁴, M. Fredi², L. Andreoli², C. Cereda¹

¹Laboratory of Experimental Neurobiology, C. Mondino National Institute of Neurology Foundation, IRCCS, Pavia, Italy

²Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Spedali Civili and University of Brescia, Brescia, Italy

³Child Neurology and Psychiatry Unit, Mother-Child Department, Civil Hospital, University of Brescia, Italy

⁴Child Neurology and Psychiatry Unit C. Mondino National Institute of Neurology Foundation, IRCCS, Pavia, Italy

Introduction. Increased expression of interferon regulated genes and disturbance of interferon alpha (IFN- α) homeostasis has a major role in the pathogenesis of the prototypic autoimmune disorder, systemic lupus erythematosus (SLE). A perturbation of IFN- α metabolism is also a major pathogenic feature of the Aicardi-Goutières syndrome (AGS). After the discovery of AGS-causing mutations in the TREX1 gene, distinct heterozygous mutations were described in autosomal dominant diseases such as retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy and familial chilblain lupus. Subsequent studies demonstrate that up to 2% of patients with SLE harbor pathogenic mutations in TREX1. 3' Repair exonuclease (Trex1) is the most abundant mammalian 3' # 5' DNA exonuclease with specificity for ssDNA. The loss of TREX1 activity may result in the accumulation of double-stranded DNA (dsDNA) degradation intermediates that trigger autoimmune activation. Here, we report a novel heterozygous TREX1 mutation in a SLE patient. **Methods.** 51 SLE patients were screened for TREX1 gene. The genomic DNA was extracted by automatic extraction and stored at -20°C. TREX1 gene was amplified and automatically sequenced. PolyPhen2 pathogenicity prediction software was used to determine possible pathogenic significance of the not previously described mutation. NM_033629.2 (isoform b-short isoform) was used to report novel variation. **Results.** A novel heterozygous variant (p.Asp130Lys) was identified in one patient affected by SLE. TREX1 missense variation was classified as probably damaging by PolyPhen2 (score 1/1). This change was absent in 150 control samples sequenced. Also TREX1 SNP rs11797 was found in 22 SLE patients. Only one SLE patient carried rs3135944 variation. **Discussion.** The novel variation is not annotated in database. We will perform the genetic analysis of parents to determinate if the novel variation in TREX1 exon is de novo mutation. Moreover, the pathogenicity of TREX1 variation must be confirmed by functional protein study.

The research leading to these results has received funding from IAGSA (International Aicardi Goutières Syndrome Association) and from the European Union's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013; grant agreement 24177).

MUTAZIONI NEL GENE DEL FATTORE STEROIDOGENICO SF1 (NR5A1) IN PAZIENTI CON 46,XY DSD.

F. Baldinotti¹, E. Dati², C. Ungaro³, A. Michelucci¹, B. Toschi¹, C. Congregati¹, R. Maltomini¹, A. Fogli¹, M.C. Salerno³, S. Bertelloni², P. Simi¹

¹*U.O. Laboratorio Genetica Medica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa*

²*U.O. Pediatria I, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Pisa*

³*Dipartimento di Pediatria, AOU Federico II Napoli*

Il fattore steroidogenico 1 (SF1, gene NR5A1) è un recettore nucleare che regola la trascrizione di più geni coinvolti nello sviluppo surrenale e gonadico, nella steroidogenesi e nell'asse riproduttivo. La delezione completa del gene NR5A1 nei topi XY determina agenesia surrenale e gonadica, comparsa di genitali esterni femminili e presenza di strutture mülleriane. Inizialmente mutazioni sono state rilevate in pazienti con disgenesia gonadica grave e insufficienza surrenalica primaria. Più recentemente mutazioni in eterozigosi sono state identificate in pazienti 46,XY con Disordini del Differenziamento Sessuale (46,XY DSD) senza insufficienza surrenale, in criptorchidi, in soggetti con micropene e/o infertilità maschile. In questo studio abbiamo analizzato il gene NR5A1 in un gruppo di 10 pazienti italiani con diagnosi clinica di 46,XY DSD in cui era stata esclusa la presenza di mutazioni nei geni del recettore per gli androgeni, della 5 α -reduttasi II e in SRY. In tre pazienti è stata rilevata una mutazione in eterozigosi nel gene NR5A1: una paziente presentava la missenso p.R84C localizzata nella DNA-binding region di SF1, le altre due avevano mutazioni nella Ligand-binding region (p.R313C e c.1074dupG con formazione di uno stop p.L359AfsX28). Le tre pazienti presentavano alla nascita un fenotipo simile con ipertrofia clitoridea, orifizio unico e seno urogenitale ed erano state assegnate al sesso femminile con diagnosi clinica di insensibilità agli androgeni; nessuna di loro aveva mostrato segni di insufficienza surrenale. La paziente con la mutazione p.L359AfsX28 presentava anche il polimorfismo p.G146A trasmesso in linea paterna. La paziente con la mutazione p.R84C era stata operata ad un anno per gonadectomia e ricostruzione della vagina con separazione dell'uretra e al momento della diagnosi molecolare era in età prepubere. L'analisi genetica sui genitori delle probande ha dimostrato che le mutazioni sono de novo. I nostri risultati indicano che le mutazioni nel gene NR5A1 sono una causa frequente di 46,XY DSD, mostrando come l'SF-1 sia un fattore chiave per lo sviluppo testicolare negli esseri umani e come lo sviluppo surrenale umano sembra essere più resistente agli effetti della aploinsufficienza rispetto quello gonadico.

TWO NOVEL MUTATIONS IN FRUCTOSE 1,6-BISPHOSPHATASE DEFICIENCY

G. Frisso¹, C. Cozzolino¹, A. Cerrato¹, G. Parenti², G. Andria², M. Ruoppolo¹, F. Salvatore¹

¹*Dip. di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II" & CEINGE-Biotecnologie Avanzate scrl, Napoli*

²*Dip. di Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli*

Fructose 1,6-bisphosphatase (FBPase) deficiency is a rare autosomal recessive inborn error of metabolism in the gluconeogenic pathway. FBPase converted fructose-1,6-bisphosphate into fructose 6-phosphate and inorganic phosphate. FBPase deficiency is caused by mutations in fructose 1,6-bisphosphatase 1 (FBP1) gene, which result in impaired gluconeogenesis, characterized by episodes of hypoglycemia, ketonuria, lactic and metabolic acidosis.

In this study, mutation screening of seven exons in FBP1 gene was carried out in two patients with FBPase deficiency by using direct sequence analysis. Each patient was homozygous for a novel mutation: c. 1-50_169+5192del and c. G355A (p.D119N), respectively. The mutation c. 1-50_169+5192del is a large deletion, including ATG and most of 5'UTR of FBP1 gene, probably resulting in a lack of gene expression. Missense mutation c. G355A (p.D119N), located in exon 3, affects a highly conserved amino acid. Transient transfection studies using COS-7 cells demonstrated that FBPase protein with D119N mutation is enzymatically less active than the wild-type (about 30% of activity compared to wild type).

Molecular analysis and functional studies allowed as to better understand the pathogenetic role of new mutations in rare metabolic disease.

Heterotopic bone formation not related to POH/FOP disease: a new entity?

E.F. Belligni¹, E. Biamino¹, E. Di Gregorio¹, A. Calcia², C. De Filippi¹, G.B. Ferrero¹, A. Brusco¹, M. Tartaglia³, M. Silengo¹

¹*S.C.d.U. Genetica Medica, Città della Salute e della Scienza, Torino, Italy*

²*Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, University of Torino*

³*Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy*

We present a unique case of congenital multiple and massive periarticular calcifications in a 3 years old female, with normal cognitive function. She is the first child of Italian non consanguineous parents, born at term after an uneventful pregnancy and delivery. Progressive diffuse joints limitation was noticed since first month of life. Skeletal survey and CT scan at 8 months showed severe shoulder's, elbow's, wrist's, hip's, knee's and ankle's joints limitation due to impressive periarticular calcifications. The posterior longitudinal ligament was completely ossified. At 10 months, total body MRI highlighted intercostal and masticatory muscles calcification. Her posture was forced in flexion of elbows, knees and ankles, and movements of the head were completely abolished. She had brachydactyly and camptodactyly of hands and feet. Her eyes were deep-set, the philtrum short and smooth, but no other striking dysmorphisms were present.

Neurocognitive milestones were properly achieved.

Extensive metabolic workup gave normal results: serum and urine calcium levels were normal, as well as serum and urine phosphorus, sodium, potassium, magnesium, creatinine, PTH, 1-25-OH-Vit D, 25-OH-VitD levels.

Molecular analysis of ACVR1 and GNAS genes ruled out both Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) and Progressive Osseous Heteroplasia (POH), two distinct severely disabling heritable disorders of connective tissue characterized by progressive heterotopic ossification.

CGH array analysis (Agilent platform, 70 K) identified a de novo 2p14 duplication (820 Kb), neither described before in the literature, nor reported as a benign CNV in the Database of Genomic Variants. Exome sequencing is pending.

Microduplicazione 11q13.3 de novo, comprendente i geni FGF3 e FGF4, in un paziente con disabilità intellettiva, plagiocefalia e microcefalia.

L. Grillo¹, D. Di Benedetto¹, A. Spalletta¹, M. Sturnio¹, S. Amata¹, M. Vinci¹, R. Pettinato¹, C. Romano¹

¹*IRCCS Associazione Oasi M. SS. Troina (EN), Italia*

Le duplicazioni nel braccio lungo del cromosoma 11 sono rare, in particolar modo quelle che interessano la regione cromosomica 11q13.3-q23. Abbiamo identificato mediante una piattaforma array-CGH 180K (Agilent Technologies) una microduplicazione de novo nella regione cromosomica 11q13.3 di circa 235 Kb.

Il paziente presenta disabilità intellettiva di grado medio, plagiocefalia, microcefalia, anomalie morfologiche facciali, exoftalmia-tropia, lieve ipotonia muscolare, lieve deficit dell'equilibrio dinamico, piede piatto e valgo. La RMN evidenzia ritardo della maturazione mielinica a livello dei poli temporali e frontali, corpo calloso di spessore ridotto, ipoplasia cerebello-vermiana. La regione duplicata comprende i geni CCND1(OMIM 168461), ORAOV1, FGF19, FGF3 (OMIM 164950), FGF4.

Studi su modelli animali di craniosinostosi hanno evidenziato un incremento di espressione dei fattori di crescita dei fibroblasti FGF3 e FGF4 ed è stato ipotizzato che un aumento del dosaggio genico di tali geni possa avere un ruolo chiave causando un anomalo sviluppo delle suture craniche mimando il meccanismo di gain of function derivato dalle mutazioni nei geni FGFR nelle sindromi di craniosinostosi.

Il riarrangiamento da noi identificato rappresenta la più piccola duplicazione finora descritta in letteratura e corrisponde alla regione di overlap delle duplicazioni, di maggiore dimensione, descritte da Jehee et al. (Am.J.Med. Genet. 2007).

Con il presente caso possiamo dare un ulteriore contributo allo studio del ruolo dei geni FGF3 e FGF4 nello sviluppo delle suture craniche e alla comprensione dell'effetto dose di tali geni.

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI UNA NUOVA MUTAZIONE NEL GENE TP53

C. Bozzao¹, M. Colombo², C. Meazza², M. Piane¹, M. Rapazzotti Onelli¹, B. Peissel², P. Radice², D. Delia², L. Chessa¹, S. Manoukian²

¹*U.O. Genetica Medica, Dip. Medicina Clinica e Molecolare, Università Sapienza, Roma*

²*Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano*

Mutazioni germinali del gene TP53 sono responsabili della sindrome di Li-Fraumeni (MIM#151623), sindrome da predisposizione ereditaria allo sviluppo di neoplasie multiple frequentemente ad esordio giovanile.

È giunto in consulenza genetica oncologica un paziente di 17 anni con diagnosi di osteosarcoma ad alto grado dell'omero destro, con anamnesi familiare negativa ad eccezione del padre deceduto all'età di 49 anni per neoplasia polmonare. Per una definizione dell'iter terapeutico sono stati effettuati test di radiosensibilità su sangue periferico e su linea linfoblastoide, risultati entrambi negativi. Contemporaneamente, l'analisi mutazionale del gene TP53, effettuata mediante sequenziamento diretto, ha permesso di identificare una nuova mutazione non descritta in letteratura, c.666_IVS6+3del10. Al fine di validare il significato patogenetico di tale mutazione sono state condotte ulteriori analisi. Dopo trattamento con cicloesamide e successiva RT-PCR è stato possibile individuare due trascritti instabili soggetti a degradazione per Non-sense Mediated Decay. Il sequenziamento dei due prodotti anomali di splicing ha permesso di identificare in un trascritto lo skipping dell'esone 6 e nell'altro la delezione degli ultimi 7 nucleotidi e l'inserimento di ulteriori due nucleotidi per la creazione di un nuovo sito di splicing, sempre nell'esone 6. La degradazione dei prodotti anomali è stata ulteriormente confermata mediante Real Time-PCR che ha evidenziato una diminuzione del 40% dei livelli di espressione del gene TP53. Inoltre, l'analisi immunohistochimica condotta sul tessuto tumorale ha dimostrato assenza della proteina p53. I risultati ottenuti permettono di concludere che la mutazione c.666_IVS6+3del10 identificata nel probando è patogenetica ed agisce verosimilmente per aploinsufficienza.

IDENTIFICAZIONE DI FATTORI DI RISCHIO GENETICI NELLO SVILUPPO DEL MESOTELIOMA PLEURICO (MPM): UNO STUDIO DI ASSOCIAZIONE CASO-CONTROLLO GENOME-WIDE

G. Matullo¹, S. Guarrera², M. Betti³, G. Fiorito², D. Ferrante⁴, F. Voglino², G. Cadby⁵, C. Di Gaetano¹, F. Rosa², E. Casalone³, M. Padoan⁴, M. Giordano⁶, A. Aspesi³, C. Casadio⁷, F. Ardissoni⁸, E. Ruffini⁹, P.G. Betta¹⁰, R. Libener¹⁰, R. Guaschino¹¹, E. Piccolini¹², L.J. Palmer⁵, M. Neri¹³, D. Mirabelli¹⁴, D. Ugolini¹⁵, S. Bonassi¹³, C. Magnani¹⁶, I. Dianzani¹⁷

¹Human Genetics Foundation, HuGeF, Turin, Italy and Dept. Genetics, Biology and Biochemistry, Univ. Turin, Italy

²Human Genetics Foundation, HuGeF, Turin, Italy

³Laboratory of Genetic Pathology, Dept. Health Sciences, Univ. Piemonte Orientale, Italy

⁴CPO-Piemonte and Unit of Medical Statistics and Epidemiology, Dept. Translational Medicine, Univ. Piemonte Orientale, Italy

⁵Genetic Epidemiology and Biostatistics Platform, Ontario Institute for Canc. Res., Toronto, Canada; on behalf of the Australian study: A.W. Musk, N.H. de Klerk, J. Hui, J. Beilby, A. L. James, J. Creane, B. Robinson, S. Mukherjee

⁶Laboratory of Genetics, Dept. Health Sciences, Univ. Piemonte Orientale, Italy

⁷Thoracic Surgery Unit, Univ. Piemonte Orientale, Italy

⁸Chest Surgery, Dept. Clinical and Biological Sciences, Univ. Turin, Italy

⁹Thoracic Surgery Unit, Univ. Turin, Italy

¹⁰Pathology Unit, Az. Osp SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria, Italy

¹¹Transfusion Centre, Az. Osp SS Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria, Italy

¹²Pneumology Unit, S. Spirito Hospital, Casale Monferrato, Italy

¹³Unit of Clinical and Molecular Epidemiology IRCCS San Raffaele Pisana, Roma, Italy

¹⁴CPO-Piemonte and Unit of Medical Statistics and Epidemiology, Dept. Translational Medicine, Univ. Piemonte Orientale, Italy and Interdepartmental Center for Studies on Asbestos and other Toxic Particulates "G. Scansetti", Univ. Turin, Italy

¹⁵Dept Oncology, Biology and Genetics, Univ. Genoa, Italy

¹⁶CPO-Piemonte and Unit of Medical Statistics and Epidemiology, Dept. Translational Medicine, Univ. Piemonte Orientale, Italy and Interdepartmental Center for Studies on Asbestos and other Toxic Particulates "G. Scansetti", Univ. Turin, Italy

¹⁷Laboratory of Genetic Pathology, Dept. Health Sciences, Univ. Piemonte Orientale, Italy, and Interdepartmental Center for Studies on Asbestos and other Toxic Particulates "G. Scansetti", Univ. Turin, Italy

Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è un raro tumore aggressivo che ha come fattore di rischio principale l'esposizione all'asbesto. Poiché solo il 10% degli esposti all'asbesto sviluppa MPM, è stato ipotizzato il coinvolgimento di fattori genetici, supportato da studi recenti che suggeriscono un ruolo di polimorfismi genetici in enzimi del metabolismo ossidativo e di riparazione del DNA.

Per identificare il ruolo di fattori genetici nello sviluppo del MPM, abbiamo effettuato uno studio di associazione genome-wide (GWAs) su 407 casi di MPM italiani e 389 controlli sani appaiati per età, sesso e luogo di residenza, reclutati in 3 località italiane: Casale Monferrato (manifattura di cemento-amianto ed esposizione ambientale), Genova (esposizione ad amianto nello scalo portuale) e Torino. Per tutti i soggetti era disponibile la valutazione completa dell'esposizione all'asbesto. I soggetti sono stati genotipizzati per più di 370.000 SNPs (Illumina-HumanCNV370), e altri 5 milioni di SNPs sono stati inclusi nell'analisi dopo imputazione.

Venti marcatori sono risultati associati al MPM con significatività statistica tra $P=1.48 \times 10^{-6}$ e $P=3.95 \times 10^{-5}$ all'analisi della popolazione totale e dei soli esposti. Molti di questi marcatori si trovano in regioni genomiche già descritte come associate al mesotelioma, e determinano un rischio di sviluppo di MPM aumentato di circa 2 volte. La maggior parte delle associazioni è stata confermata con l'analisi aploipica, regione- o gene-specifica. Un'analisi di arricchimento basata sul Gene Ontology database ha mostrato un probabile coinvolgimento del pathway delle metalloproteinasi nello sviluppo del MPM.

E' stata effettuata una replica indipendente su 428 casi di MPM e 1269 controlli sani appartenenti ad uno studio australiano (GUARD study). Tale studio ha evidenziato segnali significativi in 6 delle regioni significative nello studio italiano (3q26.2, 4q32.1, 7p21.2, 7p22.2, 14q11.2, 15q14), riscontrando associazioni significative con geni già descritti come coinvolti nel MPM o altri tipi di cancro.

Nel complesso i nostri risultati mostrano un possibile ruolo di varianti genetiche nella suscettibilità al MPM, anche se con un effetto molto minore rispetto a quello conferito dall'esposizione all'asbesto.

Espressione di Isoforme di splicing in pazienti affetti da Distonia Dopa Responsiva

T. Giovannello¹, V. Leuzzi², C. Carducci³, C. Artiola¹, M. Tolve³, F. Amoruso¹, C. Carducci¹

¹*Dip. medicina Sperimentale. Università Sapienza, Roma*

²*Dip. di Scienze Neurologiche e Psichiatriche dell'Età Evolutiva. Università Sapienza, Roma*

³*Dip. Medicina Sperimentale e Dip. Medicina Molecolare. Università Sapienza, Roma*

La distonia Dopa Responsiva, causata da un difetto dell'enzima GTPCicloidrolasi1(GTPCH1), è trasmessa per via autosomica dominante.

Il GTPCH fa parte della via di sintesi del BH4, cofattore delle idrossilasi degli aminoacidi aromatici, il cui deficit determina riduzione delle amine biogene.

L'enzima umano è un omodecamero codificato dal gene GCH1, uno splicing alternativo dà luogo a quattro Isoforme (1-4) che si differenziano al 3'.

Soltanto l'isoforma 1 partecipa alla formazione dell'enzima funzionale. Le altre isoforme risultano prive di attività catalica. La co-espressione in vitro delle varianti 2-4 con il monomero wild-type (isoforma1) ha rivelato una riduzione dell'attività enzimatica del GTPCH. Ciò fa ipotizzare che le varianti di splicing, incorporate nell'eterodecamero in vivo, possano diminuire la stabilità e l'attività dell'enzima.

A tale scopo ci proponiamo di valutare l'espressione dei trascritti delle isoforme del gene GCH1.

Sono state allestite colture primarie di fibroblasti e di PBMC di pazienti e controlli, stimolate con citochine, essendo la sintesi di GCH soltanto inducibile in cellule periferiche. Poiché i neuroni sintetizzano costitutivamente l'enzima, sono state utilizzate colture di neuroblastoma umano come controllo.

La valutazione dell'espressione differenziale dei trascritti di GCH1 è stata effettuata in Real-Time PCR.

Lo studio dei trascritti 1-4 nei citotipi analizzati ha evidenziato un'espressione delle isoforme non funzionali 10 volte più bassa rispetto alla isoforma funzionale. Eccetto che per una paziente e suo padre, eterozigoti per la delezione p.M211fs, in cui la isoforma 4 è iperespressa rispetto alla 1.

Si può ipotizzare che, eterodecameri costituiti anche dalla isoforma non funzionale, possano dar luogo ad una marcata riduzione dell'attività enzimatica e contribuire alla gravità del fenotipo. Coerente con questa ipotesi, il padre della paziente, debolmente sintomatico, mostra un'espressione più bassa, rispetto alla figlia, della ISO4.

Secondo i nostri dati è possibile ipotizzare una interferenza nella formazione dell'omodecamero che infici la formazione e la funzionalità dell'enzima.

TRISOMIA 22 OMOGENEA ED A MOSAICO

D. Bianchi¹, F.P. Amico¹, A.M. Oneda¹, S. Di Maggio¹, E. Ciulla¹, E. Caselli², R. Colombi², G. Nocera¹

¹S.S. di Citogenetica, S.C. Ostetricia e Ginecologia, Az. Osp. Fatebenefratelli e Oftalmico, P.O. M. Melloni, Univ. , Milano

²S.S. di Anatomia Patologica, Az. Osp. Fatebenefratelli e Oftalmico, P.O. M. Melloni , Milano

La trisomia 22 è la seconda aneuploidia più comune identificata negli aborti spontanei. I nati vivi sono rari e la loro sopravvivenza è estremamente limitata. Per la trisomia 22 a mosaico sono invece noti in letteratura casi con prolungata sopravvivenza postnatale.

Riportiamo due casi: uno di trisomia 22 omogenea ricorrente e uno di trisomia 22 a mosaico. Il primo caso di trisomia 22 è legato a una coppia poliabortiva giunta alla nostra osservazione dopo una pregressa mola vescicolare. L'analisi citogenetica condotta su cellule placentari di due gravidanze successive, interrotte spontaneamente nel primo trimestre, ha evidenziato in entrambe la presenza di un cariotipo omogeneo trisomico (47,XY,+22). L'analisi citogenetica eseguita su sangue periferico della coppia, ha mostrato, su 100 cellule analizzate, un cariotipo normale. Il secondo caso di trisomia 22 a mosaico, giunto alla nostra osservazione per anomalie evidenziate in ecografia, è stato identificato alla 20a settimana sia attraverso l'analisi su prelievo di villi coriali (CVS) che su liquido amniotico. L'esame cromosomico su CVS evidenziava, per l'analisi diretta, 24 cellule trisomiche (47,XY,+22) e 2 a cariotipo maschile normale (46,XY) mentre per l'analisi dopo coltura, la trisomia era presente su tutte le 8 aree di crescita osservate (47,XY,+22). L'analisi su prelievo di liquido amniotico mostrava invece su 21 colonie esaminate (provenienti da 6 colture indipendenti) 19 colonie a cariotipo maschile normale (46,XY) e 2 soltanto con la trisomia del cromosoma 22 (47,XY+22). La coppia dopo consulenza genetica decideva di interrompere la gravidanza alla 22a settimana. L'esame autoptico presentava anomalie cardiache, anectasia polmonare bilaterale, stasi ematica polmonare e poliviscerale e ritardo di crescita. I controlli citogenetici successivi, sui tessuti abortivi, confermavano la presenza della trisomia 22 a mosaico.

La diagnosi prenatale di trisomia 22 a mosaico effettuata su CVS o su liquido amniotico può creare enormi difficoltà in particolare per la consulenza genetica in quanto il ritardo mentale non sembra essere legato alla percentuale di cellule trisomiche osservate ed il fenotipo alla nascita risulta estremamente variabile.

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI MUTAZIONI INTRONICHE SULLO SPLICING DEI GENI BRCA1 E BRCA2

M. Tancredi¹, G. Gambino¹, E. Falaschi², C. Guglielmi¹, P. Aretini², G. Arrighi³, G. Allegrini³, M.A. Caligo²

¹*Dipartimento di Oncologia, dei Trapianti e delle Nuove Tecnologie in Medicina, Pisa*

²*Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, Pisa*

³*Azienda ASL.5, Ospedale Lotti, Pontedera (Pi)*

Circa il 94 % dei geni ha prodotti di splicing alternativo fisiologico e circa il 50 % di mutazioni a questo livello causano malattia. Ogni introne ha 3 elementi per la regolazione dello splicing: i siti al 5'e 3' di ogni introne (GT e AG) ed il branch point, di solito collocato vicino alla estremità 3'. Ci sono, inoltre sequenze supplementari introniche ed esoniche che possono essere potenziatori (ISI/ESE) o silenziatori (ISS/ESS) dello splicing. Sebbene alcuni di questi elementi siano identificabili con l'uso di diversi algoritmi, non è ancora possibile prevedere costantemente gli effetti di mutazioni in queste regioni sullo splicing. Molte mutazioni missenso identificate nei geni BRCA1 e BRCA2 rimangono non classificate (UV) e molte UVs includono varianti introniche. Diversi studi hanno riportato l'analisi di varianti che coinvolgono gli elementi consenso al 5'e al 3'. Tuttavia, poco è stato fatto per prendere in considerazione le conseguenze delle varianti situate al di fuori di tali siti. Scopo di questo studio è stato di valutare come alcune varianti introniche di BRCA1 e BRCA2, identificate in pazienti affetti da carcinoma mammario e/o ovarico, possano interessare lo splicing. In particolare, sono stati identificati 2 trascritti alterati nell'RNA estratto da linfociti di una paziente con carcinoma dell'ovaio in cui era stata riscontrata a livello genomico la variante di BRCA2 IVS15-11 delATTTT. Tali trascritti, isolati e sequenziati, hanno rivelato la presenza di una forma alterata (F1) priva degli ultimi 151 nt dell'esone 17, di tutto l'esone 18 e dei primi 97 nt dell'esone 19 ($\Delta 603$). Il secondo trascritto identificato (F2) manca degli ultimi 100 nt dell'esone 16, di entrambi gli esoni 17 e 18 e dei primi 97 nt dell'esone 19 ($\Delta 723$). I trascritti F1 e F2 mantengono l'ORF ma producono una proteina BRCA2 priva rispettivamente di 201 e 241 aa nel dominio di legame al DNA. Inoltre, l'analisi del DNA estratto dal campione tumorale della paziente indica la delezione dell'allele wt. Quindi, questo studio potrebbe iniziare a far luce sulla classificazione delle varianti introniche, che non inficiano i siti di splicing canonici, come possibili mutazioni deleterie in grado di influenzare la predisposizione al tumore alla mammella e/o ovaio.

THE ROLE OF TRIM8 IN GLIOBLASTOMAS

L. Micale¹, C. Fusco¹, M.T. Pellico¹, B. Augello¹, C. Maffeo¹, M. Copetti², F. Pellegrini², P. Parrella³, R. Barbano¹, G. Merla¹

¹*Medical Genetics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, 71013 San Giovanni Rotondo FG, Italy*

²*Biostatistic and Bioinformatic Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, 71013 San Giovanni Rotondo FG, Italy*

³*Laboratory of Oncology, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, 71013 San Giovanni Rotondo FG, Italy*

Elucidation of the critical molecular events and genes that underlie the malignant phenotype of glioma helps the search for new glioma biomarkers and candidate targets for therapeutic approaches. To date we have collected biological specimens (DNA, RNA, and tumor primary cell lines) from nearly 100 individuals with ascertained glioma.

Here, we describe TRIM8 gene as a new potential tumor suppressor involved in glioma pathogenesis. TRIM8 expression inhibits tumor cell colony formation in vitro and enhances p53 tumor suppressor activity.

By analyzing our cohort of 100 human primary glioma cell lines and 40 human glioma tissues, we found that TRIM8 mRNA expression was reduced and correlated with tumor grade. We found that the reduced TRIM8 expression level was not due to the methylation of TRIM8 CpG islands neither mutations in the TRIM8 coding region. Interestingly we detected a somatic heterozygous deletion encompassing TRIM8 in approximately 70% of analyzed glioblastoma.

qPCR analysis revealed that TRIM8 mRNA level inversely correlated with miR-17 5p expression, a microRNA known to be upregulated and involved in glioma progression. By luciferase assays we showed that miR-17 5p targets the 3'-UTR of TRIM8. These data suggest that TRIM8 downregulation occurs primarily through the loss of a TRIM8 copy and/or mir-17 regulation.

We further analyzed the correlation of TRIM8 with survival rates of patients. We found that low expression of TRIM8 significantly correlated with a worse patients outcome. Finally, we found that the restoring of TRIM8 expression level in U87 glioma cell line induces the suppression of cell proliferation, as revealed by MTT assays.

In conclusion, our data provides evidences that TRIM8 acts as a tumor suppressor gene, plays an inhibitive role during the development of glioma and might be a useful predictor of glioma patients survival.

ANALISI E MODELLIZZAZIONE DEI PERCORSI DI GENETICA CLINICA NELLE GRAVIDANZE A RISCHIO

O. Calabrese¹, E. Tanfani², A. Baroncini¹, P. Landa², M. Lucci³, E. Calzolari⁴, A. Testi²

¹*UOC Genetica Medica, AUSL di Imola.*

²*Dipartimento di Economia (DIEC), Università di Genova*

³*Sezione e UO di Genetica Medica, Dip. di Medicina Sperimentale e Diagnostica, Università di Ferrara*

⁴*Unità di Genetica Epidemiologica, Dipartimento di Riproduzione e Accrescimento, AOU di Ferrara*

Il lavoro nasce dalla collaborazione scientifica nell'ambito del progetto strategico di ricerca finalizzata dal titolo "Sviluppo di linee guida per offrire test genetici nelle gravidanze a rischio: implementazione di processi di valutazione dei test genetici" di cui è destinatario istituzionale la Regione Emilia Romagna. L'obiettivo del lavoro qui presentato è quello di impostare una modellizzazione dei percorsi di cura seguiti dalle donne con gravidanze a rischio che consenta in linea prospettica una determinazione dei costi e una proposta di tariffazione del percorso corrispondente al costo standard.

In una prima fase, il lavoro si è incentrato sulle modalità e i contenuti degli strumenti di rilevazione dei dati (schede di raccolta dati ad hoc) utili alla modellizzazione dei percorsi clinici e della loro valutazione economica.

Sperimentalmente, la grande mole di dati raccolti presso uno dei tre Centri partecipanti (pari a 2119 pazienti seguite da gennaio a dicembre 2010) è stata rielaborata per ottenere dei record di dati che fornissero, per ogni paziente, tutte le informazioni di interesse relative al percorso seguito (anamnesi, motivazioni di ingresso, date di accesso, date delle visite, esami effettuati, esiti, rischio, indicazione diagnosi prenatale etc.).

Partendo dalle motivazioni di ingresso (singole o multiple) delle pazienti, sono stati individuati 14 gruppi di pazienti da cui partire per lo studio dei percorsi clinici da esse seguiti (in particolare durata e complessità assistenziale).

La prima modellizzazione, basata su flow chart, ha permesso di sintetizzare l'attività della struttura e studiare la dinamica e la variabilità dei diversi percorsi seguiti dalle donne con gravidanze a rischio. Tale modellizzazione è inoltre la fase preliminare per impostare altri modelli di analisi (in particolare modelli di regressione e analisi di correlazione, modelli di code e modelli di simulazione discreta) che siano di aiuto agli operatori sanitari (dirigenti, coordinatori, manager) per analizzare e confrontare le strategie correnti e fornire un sistema di supporto alle decisioni per la gestione e la pianificazione delle attività e dei percorsi.

ELEVATA INCIDENZA DI DELEZIONI MULTIESONICHE DEL GENE CDKL5 RESPONSABILE DELLA VARIANTE AD EPILESSIA PRECOCE DELLA SINDROME DI RETT

M. Marchi¹, F. Cogliati¹, S. Guzzetti¹, P. Finelli¹, M. Crippa¹, M.T. Bonati¹, T. Granata², B. Ben Zeev³, M. Cassani⁵, L. Larizza¹, S. Russo¹

¹*Istituto Auxologico Italiano, Lab. di Citogenetica e Genetica Molecolare, Milano*

²*Istituto Neurologico C. Besta -NPI- Milano*

³*Sheba Med. Ctr, Ramat-Gan, Israel*

⁴*Genetica Medica - Dip. Medicina Chirurgia e Odontoiatria - Università degli Studi di Milano*

⁵*Ospedali Riuniti di Bergamo - NPI- Bergamo*

Mutazioni nel gene Cyclin-Dependent kinase-like 5 (CDKL5, OMIM 300203) sono responsabili della Encefalopatia Epilettica Infantile (EIEE2, OMIM 300672) o variante Rett ad insorgenza precoce di epilessia (Hanefeld variant). Caratteristica patognomica di tale variante della Sindrome di Rett è la insorgenza di epilessia nei primi mesi di vita, spesso farmaco resistente. La maggior parte delle mutazioni, più di 80 ad oggi descritte, prevalentemente puntiformi, è stata identificata in pazienti femmine. Sono inoltre relativamente frequenti delezioni estese a uno o più esoni del gene, a nostra conoscenza 27, di cui 5 in pazienti maschi, un dato che suggerisce di testarne la presenza nell'iter diagnostico in entrambi i sessi. Recentemente sono state descritte anche 3 pazienti con delezione a mosaico, categoria che potrebbe essere sottostimata. Nel nostro laboratorio sono state identificate, su un totale di 273 pazienti caratterizzati da insorgenza precoce di epilessia (213 femmine e 60 maschi), 16 pazienti mutate, di cui 5 con delezione estesa, attestando una frequenza di delezioni nelle femmine di 7,5%, in accordo ai dati della letteratura. Di particolare interesse una paziente con un'ampia delezione di circa 1,63 Mb che include 9 geni posti all'estremità 5' di CDKL5 ma solo l'esone 1 dell'isoforma I del gene, che comprende la regione del promotore e del sito di inizio della trascrizione. Al fine di valutare l'effetto della delezione nella patogenesi della malattia abbiamo analizzato i livelli di trascritto di CDKL5 nei linfociti della paziente mediante PCR quantitativa su RealTime AB7900HT utilizzando sonde TaqMan. L'espressione di CDKL5 nella paziente è stata confrontata con l'espressione in un pool di controlli sani utilizzando come normalizzatore un gene X-linked con range di espressione paragonabile a quello di CDKL5, confermando la ridotta espressione del gene. La paziente presenta un fenotipo sovrapponibile a quello di altre pazienti mutate in CDKL5, confermando il ruolo primario di tale gene nella manifestazione fenotipica e manifesta inoltre caratteristiche aggiuntive imputabili all'emizigotità degli altri geni inclusi nella regione deleta, quali la cataratta corticale monolaterale, spesso presente nella sindrome di Nance-Horan.

NEOPLASIE MALIGNI E BENIGNE ASSOCIATE AL MELANOMA MULTIPLO: COINVOLGIMENTO DI MITF, PTEN AND CDKN2A NELLA CANCEROGENESI MELANOCITARIA MULTIPLA

A. Pollio¹, S. Seidenari², G. Pellacani², M. Rodolfo³, S. Frigerio⁴, A. Maurichi⁵, D. Turchetti⁶, L. Pastorino⁷, P. Ghiorzo⁷, M.D. Mignogna¹, A. Tomasi⁸, G. Ponti⁸

¹Università di Napoli, Dip. di Scienze Odontostomatologiche e Maxillo Facciali, Unità di Medicina Orale

²Università di Modena e Reggio Emilia; Divisione di Dermatologia

³Fondazione IRCCS Ist. Nazionale Tumori, Unità di Immunoterapie, Milano

⁴Fondazione IRCCS Ist. Nazionale Tumori, Dip. di Oncologia, Milano

⁵Fondazione IRCCS Ist. Nazionale Tumori, Dip. di Chirurgia e BiometriaMilano

⁶Università di Bologna, Dip. di Genetica

⁷Università di Genova, Dip. Di Medicina Interna e Specialità Mediche, Laboratorio di Genetica dei tumori ereditari rari, IRCCS AOU San Martino-IST, Genova;

⁸Università di Modena e Reggio Emilia, Dip. di Medicina Diagnostica, Clinica e di Sanità Pubblica

Il fenotipo melanomi multipli (MM) è un interessante modello di ricerca per lo studio e l'identificazione di mutazioni germinali che sottendono alla maggiore suscettibilità neoplastica cutanea e viscerale, individuale e familiare. L'analisi della storia clinica di gruppo di paziente affetti da MM ha evidenziato un'alta incidenza di neoplasie polidistrettuali.

Lo studio ha analizzato in modo retrospettivo la presenza di neoplasie in un gruppo di 49 pazienti con diagnosi di MM rapportate ad un gruppo controllo di 49 pazienti con diagnosi di melanoma singolo selezionato per medesima età, sesso e durata del follow-up.

Una prevalenza statisticamente significativa ($P < 0.0001$) di neoplasie è stata evidenziata nel gruppo di pazienti affetti da MM rispetto al gruppo controllo. Le neoplasie maligne riscontrate sono state 27 di cui la più frequente è stata il carcinoma basocellulare cutaneo ($n=10$, 37.1%), seguito dall'adenocarcinoma del colon-retto ($n=4$, 14.8%), dall'adenocarcinoma della prostata ($n=3$, 11.1%), dal carcinoma mammario ($n=2$, 7.4%), dal carcinoma papillifero della tiroide ($n=2$, 7.4%), dall'adenocarcinoma pancreatico ($n=2$, 7.4%), dal carcinoma renale ($n=2$, 7.4%), dal carcinoma orale ($n=1$, 3.7%), dall'adenocarcinoma del fegato ($n=1$, 3.7%), dal linfoma a cellule B ($n=1$, 3.7%), dal mieloma multiplo ($n=1$, 3.7%) e dal carcinoma vescicale ($n=1$, 3.7%). Nel gruppo controllo non è stata riportata alcuna neoplasia maligna associata. Dieci neoplasie benigne sono state riportate a carico di più organi tra i pazienti con MM. I test genetici hanno svelato mutazioni germinali a carico di geni quali PTEN, MITF (E318K), CDKN2A e polimorfismi di MC1R. In tre pazienti con MM e storia personale e/o individuale di neoplasie renali a cellule chiare è stata rilevata coesistenza di mutazioni germinali di CDKN2A, MITF.

Una sorveglianza oncologica accurata è raccomandabile nei pazienti affetti da MM. È compito del clinico selezionare in base alla storia clinica riportata i pazienti da candidare ai test genetici per un ulteriore approfondimento diagnostico. Il management clinico del paziente può essere direttamente influenzato dal tipo di mutazione diagnosticata sia per quanto concerne la terapia che la pianificazione del follow-up.

DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE/BECKER E REGOLA DEL READING FRAME

S. Bernabini¹, I. Giotti¹, U. Ricci¹, C. Romolini¹, V. Formica¹, B. Boschi¹, M. Armenio¹, E. Pelo¹, F. Torricelli¹

¹*SOD Diagnostica Genetica, AOU Careggi, Firenze*

Le distrofie muscolari di Duchenne e Becker (DMD e BMD) sono malattie neuromuscolari causate da degenerazione dei muscoli scheletrici, lisci e cardiaci.

Nella DMD i primi sintomi si manifestano generalmente tra i 2 e i 6 anni; si ha perdita della deambulazione entro i 12 anni e successivamente perdita della funzione degli arti superiori. Le complicanze cardiache e respiratorie riducono l'aspettativa di vita di questi pazienti. Le manifestazioni della BMD ricalcano quelle della DMD ma in forma più lieve e con esordio più tardivo.

Entrambe sono patologie X linked causate da mutazioni nel gene DMD che codifica per la proteina distrofina: nella DMD la distrofina è del tutto assente, mentre nella BMD è ridotta o alterata. Le mutazioni che interessano il gene DMD possono essere delezioni/duplicazioni di 1 o più esoni e mutazioni puntiformi. Secondo la regola del Reading Frame, la diversa gravità delle forme DMD e BMD è riconducibile al fatto che la mutazione causi o meno lo sfasamento della lettura dell'mRNA durante la traduzione.

Presso la SOD Diagnostica Genetica il test attualmente impiegato per la ricerca di del/dup del gene DMD è l'MLPA; tale metodica permette di fare diagnosi nei maschi affetti e di individuare le portatrici sane.

La paziente di interesse è giunta in consulenza per familiarità per DMD (fratello deceduto all'età di 23 anni per DMD, genotipo non noto, unico caso in famiglia); in passato era stata eseguita un'analisi di linkage che aveva permesso di identificare l'origine materna e paterna dei 2 alleli. Il test MLPA ha evidenziato la presenza della duplicazione dell'esone 12 in eterozigosi poi confermata mediante tecnica Real Time. La mutazione è risultata ereditata dalla madre e, secondo la previsione realizzata sul sito www.dmd.nl, altera il frame di lettura. Questo però non permette di definire con certezza il fenotipo DMD o BMD di un figlio maschio: la duplicazione infatti è riportata in letteratura associata sia a DMD che a BMD. Diversi lavori descrivono eccezioni alla regola del Reading Frame, soprattutto per le duplicazioni. In particolare per la dup dell'esone 12 sembra che eventi di "exon skipping" relativi alla regione duplicata possano determinare il ripristino del frame, quindi il fenotipo "milder".

MICRODULICAZIONE DELLA REGIONE 16p13.3:NUOVO CASO CLINICO

M.C. Di Giacomo¹, F.N. Riviello¹, L. Cloroformio¹, E. Ferri¹, M.A. Antonucci¹, T. Maffei³, O. Palumbo², P. Palumbo², M. Carella²

¹*Lab. Citogenetica, U.O. Anatomia Patologica, AOR "San Carlo", Potenza (PZ)*

²*Servizio Genetica Medica, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG)*

³*Amb. Neuropsichiatria Infantile, ASP Basilicata, Sede di Potenza*

L'introduzione di tecniche di citogenetica molecolare ha facilitato l'identificazione di specifiche sindromi genetiche associate a sbilanciamenti di alcune regioni genomiche. Tuttavia spesso esistono difficoltà nel delineare lo spettro fenotipico di specifici sbilanciamenti a causa dell'esiguo numero di pazienti descritti. La duplicazione della regione critica deleta nella Sindrome di Rubinstein-Taybi sul cromosoma 16p13.3 causa una nuova condizione sindromica clinicamente riconoscibile. L'eccessiva espressione del gene CREBBP, in 16p13.3, sembra giocare un ruolo chiave nello sviluppo psicofisico pre e post natale pertanto il suo dosaggio sembra essere decisivo per la comparsa di segni clinici peculiari. Noi riportiamo il caso di una paziente con una microduplicazione della regione 16p13.3 de novo diagnosticata con SNPs array. La duplicazione ha una dimensione di circa 0,4 Mb e include i seguenti geni OMIM: SLX4, DNASE1 e CREBBP. Il caso presentato fornisce un ulteriore contributo alla caratterizzazione clinica di pazienti con una nuova sindrome da duplicazione clinicamente riconoscibile.

RARA MUTAZIONE NELLA SEQUENZA SEGNALE N-TERMINALE DEL GENE COL1A1: CASO CLINICO E STUDIO FUNZIONALE SU FIBROBLASTI FETALI

M. Gnoli¹, M. Maioli¹, M.F. Bedeschi², F.V. Gentile¹, C. Giunta³, U. Lindert³, F. Lalatta², L. Sangiorgi¹

¹SSD Genetica Medica e Malattie Rare Ortopediche, Istituto Ortopedico Rizzoli, Bologna

²UOD Genetica Medica, IRCCS Cà Granda, Osp Maggiore Policlinico, Clinica Mangiagalli, Milano

³Division of Metabolism, Connective Tissue Unit, Children's Research Center and University Children's Hospital, Zurich

L'Osteogenesi Imperfetta (OI) è una malattia rara caratterizzata da fragilità ossea associata ad altri segni clinici, con fenotipo variabile da forme gravi/letali a lievi. Nel 90% dei casi l'OI è dovuta a mutazioni in eterozigosi nei geni COL1A1 e COL1A2, che codificano per le catene $\alpha 1$ e $\alpha 2$ del collagene I, proteina costituita da due peptidi globulari N- e C-terminali e da un dominio centrale a tripla elica caratterizzato dalla tripletta ripetuta Gly-X-Y. Mutazioni che alterano la struttura della proteina sono generalmente correlate ad un fenotipo più severo rispetto a quelle che determinano un'aploinsufficienza. Mutazioni strutturali a livello dell'N-propeptide sono rare e non hanno di solito esito letale; il significato patologico delle sostituzioni amminoacidiche riportate a livello dell'esone 1 del gene COL1A1 non è spesso chiaro. Ad oggi la funzione dell'N-propeptide non è ben conosciuta; tuttavia è stato ipotizzato un suo ruolo nella regolazione della biosintesi del collagene, e in processi chiave dello sviluppo. Riportiamo il caso di un feto affetto da una forma grave di OI causata dalla mutazione de novo c.64G>C (p.G22R) in COL1A1, localizzata nella regione di riconoscimento di clivaggio del peptide segnale nell'estremità N-terminale. Tale mutazione è stata riportata in letteratura una sola volta da Pollitt e colleghi nel 2006, i quali segnalavano un paziente affetto da una forma severa della patologia ed ipotizzavano che la mutazione causasse alterazioni nella localizzazione/processamento della molecola, non disponendo tuttavia di dati biochimici. Lo scopo dello studio è stato confermare e chiarire questo meccanismo. Da un'analisi effettuata su fibroblasti, mediante microscopia elettronica ed esperimenti pulse-chase di secrezione del collagene, è stato possibile evidenziare un rallentamento nella secrezione e ritenzione della proteina a livello del RER. Si tratta della prima dimostrazione dell'effetto biochimico della mutazione G22R che, localizzandosi nella sequenza segnale dell'N-propeptide, ipotizziamo ne alteri il clivaggio/funzione determinando così la gravità del fenotipo. Ulteriori studi saranno necessari per gettar luce sulla funzione dell'N-propeptide e sull'effetto delle mutazioni in tale regione di COL1A1.

CARATTERIZZAZIONE CLINICO-MOLECOLARE DI UN PAZIENTE CON r(1) SOPRANNUMERARIO A MOSAICO

A. Scatigno¹, N. Villa², S. Redaelli³, F. Crosti², E. Gautiero², F. Saccheri², E. Cattaneo¹, F. Zucchetti¹, S.B. Maitz¹, L. Dalprà²

¹*UOS Genetica Clinica Pediatrica, Fondazione MBBM S. Gerardo, Monza*

²*U.S. di Genetica Medica, A.O. San Gerardo, Monza*

³*Dip. di Chirurgia e Medicina Interdisciplinare, Univ. Milano-Bicocca*

Ragazzo di 17 anni con sospetto clinico di microdelezione 22q11.2 per il riscontro di DIA multipli e palatoschisi. L'accrescimento staturale-ponderale è nella norma e lo sviluppo psico-motorio borderline. Problemi medici segnalati: scoliosi sinistro-convessa, bronchiti ricorrenti, frequenti episodi di emicrania, vizi refrattivi. All'EEG riscontro di anomalie epilettiformi; alla RMN encefalo assottigliamento del corpo calloso. All'esame obiettivo conformazione dolicocefalica del capo, ipertelorismo, lieve sinofria, epicanto e labbra carnose. Analisi del cariotipo su 16 metafasi eseguita in precedenza è risultata nella norma. Durante l'esecuzione della FISH della regione 22q11.2, riscontro di un cromosoma soprannumerario in alcune metafasi; l'estensione dell'analisi del cariotipo su 100 metafasi conferma la presenza di un piccolo cromosoma marcatore soprannumerario Da-DAPI negativo nel 7% delle cellule. La positività al wcp1 in FISH con il Multiprobe Octochrome ha consentito di definirlo r(1)(p13q10). Il cariotipo dei genitori è risultato normale. Il cariotipo su fibroblasti evidenziava una situazione più complessa con tre linee cellulari: 52% delle cellule presentavano il cromosoma r(1), il 17% presentava il r(1) in duplice copia, le rimanenti 31 metafasi erano a cariotipo maschile normale. Su DNA estratto da fibroblasti coltivati è stata effettuata aCGH 180K con SNPs che ha evidenziato un tratto di 7,79 Mb (dal nt 112823040 al nt 120613221, 1p11.2p13.2) in trisomia a mosaico al 57% con 43 sonde SNP trialleliche. Conclusioni: sul piano clinico il paziente non mostra alcune caratteristiche peculiari della condizione quali microcefalia, ritardo mentale grave/autismo. A livello citogenetico si conferma che la FISH, rispetto all'aCGH permette la caratterizzazione di un cromosoma marcatore anche quando scarsamente rappresentato (< 10%). La distribuzione tissutale delle linee cellulari può essere molto diversa (nel nostro caso dal 7% su sangue al 69% su cute). L'aCGH consente di definire a livello molecolare la regione di trisomia, ma l'interpretazione dei dati, in presenza di più linee cellulari, necessita l'integrazione con tecniche di citogenetica convenzionale.

ANALISI SEMIQUANTITATIVA DELL'ESPRESSIONE DELLE ISOFORME DEL GENE C16ORF57 IN UN PANNELLO DI LINEE CELLULARI E TESSUTI ED IN PAZIENTI CON POICHILODERMA CON NEUTROPENIA

L. Fontana¹, G. Negri¹, E.A. Colombo¹, L. Larizza¹

¹*Genetica Medica, Dip. di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano, Milano*

La sindrome Poichiloderma con Neutropenia (PN; OMIM#604173) è una rara genodermatosi autosomica recessiva caratterizzata da poichiloderma, neutropenia grave non ciclica che causa infezioni ricorrenti e predispone a sindrome mielodisplastica con possibile evoluzione leucemica, alterazioni degli annessi cutanei, ipercheratosi palmoplantare, difetti ossei e dismorfismi craniofacciali. Del gene causativo C16orf57, che codifica per una esonucleasi coinvolta nello splicing, sono note due isoforme prodotte da splicing alternativo: C16orf57-001, che comprende sette esoni, e C16orf57-004 che condivide con l'isoforma 001 i primi tre esoni ma ritiene una porzione dell'IVS3 riconosciuta come quarto ed ultimo esone. Abbiamo valutato con RT-PCR semiquantitativa il profilo di espressione delle isoforme 001 e 004 in un pannello di linee cellulari e tessuti normali e tumorali. Entrambe le isoforme sono espresse ubiquitariamente a conferma della natura housekeeping del gene; i livelli più elevati nei tessuti connettivo, osseo ed ematopoietico, prevalentemente colpiti nella sindrome, suggeriscono la loro sensibilità a difetti di C16orf57. L'espressione delle due isoforme è stata quindi analizzata in linee linfoblastoidi e sangue di pazienti PN con mutazioni precoci e tardive di vario tipo: splicing (c.265+2T>G, c.502A>G, c.504-2A>C, c.683_693+1del12), nonsense (c.232C>T) e delezioni (c.179delC, c.531delA) per valutare la presenza e i livelli dei trascritti. Sono stati rilevati trascritti mutati di entrambe le isoforme in tutti i pazienti. L'isoforma 001 risulta diminuita, dal 98% al 37% circa, nei pazienti rispetto ai controlli, in modo più rilevante nei casi con mutazioni precoci. L'isoforma 004 è invece ridotta solo nei casi con mutazioni negli esoni condivisi con l'isoforma 001, del 49% per c.179delC e dell'80% per c.232C>T, mentre negli altri pazienti l'espressione è comparabile ai controlli. Al fine di convalidare ed espandere questi dati, i livelli di espressione di C16orf57 in pazienti PN verranno analizzati a livello quantitativo per stabilire il ratio tra le due isoforme e la riduzione di una o entrambe a seconda della posizione della mutazione, fattore che, combinato all'analisi delle proteine, fornirà indicazioni sulla correlazione genotipo-fenotipo.

ARRAY-CGH: sindromi note, varianti private e nuove sindromi

E. Belligni², E. Di Gregorio¹, E. Biamino², A. Calcia¹, C. Molinatto², A. Mussa², E. Grosso², A. Zonta², M.T. Ricci³, L. Sorasio², G. Mandrile³, V. Naretto²

¹*S.C.d.U. Genetica Medica, Città della Salute e della Scienza, Torino, Italy*

²*Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, University of Torino*

³*Istituto di Fisiopatologia Clinica, Clinica Oculistica, University of Turin, Italy*

Abbiamo analizzato un gruppo di 513 pazienti affetti da ritardo delle acquisizioni neuromotorie/deficit cognitivo, associato a malformazioni congenite e/o dimorfismi mediante array-CGH (60 K, Agilent). Le varianti individuate, non riportate nel Database of Genomic Variants (DGV) come anomalie comuni nella popolazione sana, sono state suddivise in quattro gruppi:

1) 46 pazienti (8,9%) hanno una sindrome da microdelezione/microduplicazione nota, o un riarrangiamento che coinvolge un gene malattia noto. Tra le più frequenti del 22q11.21 (n.6), del/dup 15q13.3 (n.2+2), del/dup 16p11.2 (n.3+4), del 17p21.31 (n.2), del 1p36 (n. 2), del 1q21.1 (n. 1), del 3q29 (n.1), del 7q11.23 (S. di Williams-Beuren, n.2). Tra le delezioni/duplicazioni, che interessano geni malattia noti, sono stati identificati: una dup. NSD1 (controparte S. di Sotos), una del. CREBBP (S. di Rubinstein-Taybi), una del. NF2, una del. PITX2 (S. di Rieger), e una del. ANKRD11 (S. KBG).

2) In 23 casi (4,5%) è stata identificata una delezione e/o duplicazione di estensione superiore a 7 Mb (intervallo 7.5-29 Mb). In due casi il riarrangiamento era a mosaico (>30%), nei restanti, le regioni cromosomiche coinvolte sono risultate di difficile studio mediante cariotipo standard. Cinque dei 23 casi, sono soggetti portatori di un cromosoma derivativo, secondario ad una traslocazione bilanciata e confermata successivamente mediante FISH in uno dei genitori.

3) In 15 casi (3%) è stata identificata un delezione o duplicazione (150 Kb-1,4 Mb) considerata potenzialmente patogenetica perché di dimensioni maggiori di 400 Kb e contenente almeno un gene candidato. Dieci soggetti mostravano un riarrangiamento de novo, mentre in cinque segregava in più membri affetti. Tra quest' ultime segnaliamo: (i) una delezione atipica di 1,3 Mb in 3q29 (13 geni coinvolti); (ii) una delezione di 500 Kb in 5q12.3 (5 geni coinvolti); (iii) delezione di 1,4 Mb in 16p13.12p12.3 (14 geni coinvolti).

4) Infine, sono state individuate 52 CNV a significato incerto (da 110 a 900 Kb).

I risultati da noi ottenuti sottolineano l'importanza dell'array-CGH come analisi di primo livello nei pazienti con fenotipo complesso e come strumento di identificazione di nuovi geni candidati per disturbi neuro-comportamentali.

A new case of pulmonary hypoplasia and Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome

B. Gentilin¹, F. Motta², E. Restelli², V. Bianchi¹, G. Scuvera¹, F. Mari³, A. Renieri³, F. Lalatta¹, L. Fedele²

¹*Medical Genetics Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano*

²*Obstetric and Gynecology Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano*

³*Medical Genetics Unit, University of Siena, Policlinico Le Scotte, Siena*

The Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) syndrome is a malformation of the female genitals (occurring in one in 4000 female live births) as a result of interrupted embryonic development of the Müllerian ducts. Traditionally a typical form defined Type I (isolated) or Rokitansky sequence, which shows Müllerian abnormalities range from minor anatomical variations up to total aplasia, and an atypical form (Type II and MURCS association), which it is often associated with other malformations are described. More than 30% of these women have associated defects: these include vertebral, cardiac, nephro, urologic (upper tract), and hearing anomalies.

Acien and al. in 2010 reported the case of a patient with MRKH syndrome presenting right hip dysplasia, congenital right pulmonary hypoplasia, and hereditary renal adysplasia.

Pulmonary hypoplasia (PH) consists of variable amounts of pulmonary primordium, bronchial tree, and supporting vasculature. Unilateral PH is a defect compatible with an almost normal existence though, and is frequently associated with other singular or complex anomalies (e.g. renal and vascular).

So far no other cases with müllerian defect and associated PH were described in the literature.

Here we describe another MRKH girl with pulmonary hypoplasia.

A 18-year-old woman with aplasia of the uterus and the upper part (2/3) of the vagina, confirmed by MRI and CT scan, was referred to our Unit for a medical genetics evaluation. Imaging of the pelvis showed also the presence of an ectopic left kidney in pelvic region. Thoracic imaging revealed dextrocardia, right pulmonary hypoplasia with compensatory hyperexpansion of the left lung. She had several hospital admissions for respiratory disorders. Dorsal-lumbar scoliosis and thorax asymmetry were present. Hormonal values were normal, she entered normally puberty with development of secondary sexual characteristics. Intellectual and development features were normal, there were no obvious facial dysmorphisms. Chromosomal analysis showed a normal 46, XX karyotype. Anomalies in 22q11.2 region, described in other MRKH patients, were not present in this case.

Does this association expand the phenotype of MRKH or should it still be considered occasional?

TEMPARI E CARICHI DI LAVORO IN GENETICA CLINICA: ELEMENTI PRIMARI PER LA VALUTAZIONE DEI COSTI E DELLA QUALITÀ ASSISTENZIALE

O. Calabrese¹, E. Calzolari², B. Canesi³, L. Corradi³, A. Pernice⁴, E. Tanfani⁵, A. Testi⁵, A. Baroncini¹

¹*UOC Genetica Medica, AUSL di Imola*

²*Unità di Genetica Epidemiologica, Dipartimento di Riproduzione e Accrescimento, AOU di Ferrara*

³*Nextage S.r.l., Genova*

⁴*c/o Azienda Ospedaliera "Bolognini" Seriate (Bg)*

⁵*Dipartimento di Economia (DIEC), Università di Genova*

La valutazione della qualità e dell'efficienza, obiettivi prioritari del governo clinico, non possono prescindere da una corretta analisi della necessità di personale, la quale a sua volta gioca un ruolo centrale nell'economia sanitaria. Un organico inadeguato può compromettere qualità e produttività, mentre l'eccesso causa un ingiustificabile aumento dei costi. La valutazione dei carichi di lavoro è premessa indispensabile alla quantificazione delle necessità e dovrebbe a sua volta discendere dall'analisi dei tempi necessari allo svolgimento delle attività.

Gli studi inerenti i tempi e i carichi di lavoro della genetica clinica sono molto limitati e quasi tutti riferiti alla realtà sanitaria USA, ove il sistema fee-for-service ne rende indispensabile la "contabilizzazione". Nonostante il sistema analitico, vi è evidenza di una sottovalutazione delle attività. Alcuni lavori, sin dal 1987, pur eterogenei nella metodologia, hanno stimato il tempo medio del genetista clinico pari a circa 7 h per nuovo paziente/famiglia e 4 h per visita di controllo. Il primo studio real-time sui tempi dei genetisti clinici e dei genetic counsellors (McPherson, 2008) presso una Genetica Clinica "generalista" confermando queste stime, evidenzia che circa il 60% delle attività erano svolte in assenza del paziente.

Il protocollo sperimentale da noi messo a punto si basa su un metodo "time sampling" che prevede che gli operatori medici, infermieri e amministrativi, volontariamente disponibili, registrino mediante smartphones, ad intervalli predeterminati e utilizzando opzioni standardizzate, le attività svolte (preventivamente categorizzate e mutualmente esclusive) nell'istante di registrazione. In un GANNT sono stati concordati tempi e fasi del protocollo: analisi dei processi con dettaglio attività, durata e frequenza del campionamento, validazione preliminare dei parametri del modello, training, correzioni al modello, monitoraggio esterno, invio dati e analisi statistica.

La riproduzione del protocollo presso altri Servizi italiani, e il confronto con altri Paesi, potrebbero condurre a una stima affidabile dei tempi e carichi di lavoro della genetica clinica, al fine di un possibile miglioramento dell'efficienza e qualità dei Servizi.

DELEZIONE DEL GENE ASTN2 (ASTROTACTIN-2), COINVOLTO NELLA MIGRAZIONE NEURONALE, IN DUE SORELLE CON RITARDO PSICOMOTORIO

E. Di Gregorio¹, S. Ungari³, E. Grosso¹, P. Pappi¹, A. Calcia², M. Amione¹, F. Fiocchi¹, M.C. Paradiso¹, N. Migone², A. Brusco²

¹SCDU Genetica Medica, Az. Osp. Città della Salute e della Scienza di Torino

²Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino

³SS Genetica e Biologia molecolare, Az. Osp. S. Croce e Carle, Cuneo

L'analisi array-CGH (60K, Agilent), eseguita in due sorelle affette da ritardo dello sviluppo psicomotorio, ha identificato una delezione di 220-320 Kb in 9q33.1 (119.059.513x2, 119.090.300-119.312.402x1, 119.380.611x2). La delezione è stata ereditata dalla madre, che clinicamente, presenta un ritardo mentale di grado lieve (insegnante di sostegno a scuola), non associato a specifici dismorfismi.

La prima sorella (19 anni) presenta microcrania lieve, iposomatismo, dismetria agli arti inferiori, scoliosi toraco lombare; il ritardo mentale è di grado lieve (QI 69). Risonanza magnetica encefalica nella norma; esame cromosomico normale. Nella seconda (17 anni) ipertricosi, lieve scoliosi toracica, strabismo e nistagmo destri; il ritardo mentale è di grado medio (QI 48). Alla risonanza magnetica encefalica è stata evidenziata una dilatazione del sistema ventricolare (possibile stenosi dell'acquedotto) e corpo calloso nettamente assottigliato.

La delezione identificata comprende parzialmente due geni: PAPP A, che codifica per la proteina plasmatica A associata alla gravidanza, e ASTN2 uno dei due membri della famiglia delle astroactine. ASTN1 e ASTN2 sono geni altamente espressi a livello encefalico, e le loro proteine sono coinvolte nella migrazione neuronale guidata dalla glia, durante lo sviluppo del cervello. Dati di letteratura mostrano che ASTN2 potrebbe essere un gene di suscettibilità ai disordini dello spettro autistico, e la delezione del gene è stata associata a patologie psichiatriche.

Riteniamo probabile che la perdita di funzione di ASTN2 possa spiegare, almeno in parte, il fenotipo neurologico delle nostre pazienti.

REFINEMENT OF GENETIC DIAGNOSIS OF PEDIATRIC T-CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

R. La Starza¹, A. Lettieri², V. Pierini¹, C. Matteucci¹, V. Nofrini¹, B. Crescenzi¹, G. te Kronnie³, M. Giordan³, A. Leszl³, G. Basso³, G. Cazzaniga², C. Mecucci¹

¹*Struttura Semplice di Genomica dei Tumori, Ematologia, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Perugia*

²*Centro di Ricerca Tettamanti, Clinica Universitaria Pediatrica Milano Bicocca, Monza*

³*Dip di Pediatria, Ematologia e Oncologia, Università di Padova, Padova*

Introduction. A great contribution to the genomic characterization of T-ALL derives from Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) and Gene Expression Profiling (GEP). Genome-wide imbalances, neutral loss of heterozygosity as well as specific genetic signatures were identified. We set up a combined interphase fluorescence in situ hybridization (CI-FISH) as an additional tool to personalized diagnosis in T-ALL.

Aims. Integration of CI-FISH with SNPs and GEP analysis to improve the genetic diagnosis of T-ALL.

Methods. We investigated 51 children with T-ALL who had been enrolled in the AIEOP-BFM ALL2000 protocol. CI-FISH was performed with probes for 42 genes involved in T-ALL. SNPs was done with the Whole-Genome Cytogenetic 2.7M array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Data were analyzed by Chromosome Analysis Suite (ChAS) Software (Affymetrix) with hg19 genome built (<http://genome.ucsc.edu/>) as reference. GEP data were normalized with Robust Multi-array average algorithm (RMA). Prediction was performed using the method Prediction Analysis of Microarrays (PAM).

Results. CI-FISH was abnormal in 97.5% patients and detected 2 genetic changes in 67.5%. It identified primary lesions in 85% cases: TAL/LMO (37.5%), HOXA (22.5%), TLX3 (20%), and TLX1 (5%). SNPs were abnormal in all cases and revealed 121 copy number variations with a mean of 5.6 abnormalities per case. The most common CNV was mono-or bi-allelic CDKN2A/B/9p21 deletion (96%). GEP PAM analysis identified 15 probe sets, on the training set, and predicted correctly the test set. 11/15 probe sets were part of the signature used by Homminga I, et al. (2011) to distinguish LMOTAL, TLX3 and HOX subgroups.

Conclusions. CI-FISH identified multiple molecular lesions and classified the majority of cases into six genomic categories. SNPs provided an in-depth picture of secondary lesions in each genomic category. Based on CI-FISH results a predictive test was elaborated to assign a specific expression profile to each genomic category.

Aknowledgments: FCRP Cod. 2012.0108.021 Ricerca scientifica e tecnologica

AN EMERGING PHENOTYPE OF INTERSTITIAL 15q25.2 MICRODELETIONS: CASE REPORT AND REVIEW

O. PALUMBO¹, P. PALUMBO¹, T. PALLADINO¹, R. STALLONE¹, M. MIROBALLO¹, M.R. PIEMONTESE¹, L. ZELANTE¹, M. CARELLA¹

¹*Medical Genetics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG), Italy*

²*Department of Biology, University of Bari, Bari, Italy*

Interstitial deletions of chromosome 15q25.2 are rare. To date, only 9 cases with micro-deletions within this chromosomal region have been described. Here, we report on a girl with severe speech delay, psychomotor retardation, behavioral problems and slight dysmorphic features with a 1.6 Mb deletion in 15q25.2 region. In order to study the parental origin of the rearrangement, we analyzed selected SNPs in the deleted area in the proband and her parents, showing Mendelian incompatibilities suggesting a de novo deletion on the chromosome of maternal origin. By comparing the clinical and molecular features of our patient with 5 previously reported cases of an overlapping deletion, we suggest that 15q25.2 deletion is an emerging syndrome characterized by a distinct although variable spectrum of clinical manifestations, including slight dysmorphic features, neurodevelopmental delay and a recognizable pattern of congenital malformation. Furthermore, our case is the second one in which a behavioral phenotype characterized by hyperactivity, anxiety and autistic features was reported, indicating that these features might be part of this new syndromic condition. Breakpoints of the deletion in the patient reported here are useful to better define the smallest region of overlap (SRO) between all the patients. Selected genes that are present in the hemizygous state and which might be important for the phenotype of these patients, are discussed in context of the clinical features. In conclusion, our patient increases the knowledge about the molecular and phenotypic consequences of interstitial 15q25.2 deletions, highlighting that deletions of this region may be responsible for a new microdeletion syndrome.

CUTANEOUS VENOUS MALFORMATION DUE TO KRIT1 MUTATION: A CASE REPORT

P. Lulli¹, F. Grippaudo², M. Piane¹, L. Alesi¹, I. De Santis¹, M. Amoroso², S. Penco³, F. Santanelli², L. Chessa¹

¹*U.O. Genetica Medica, Dip. Medicina Clinica e Molecolare, Università Sapienza, Roma*

²*U.O. Chirurgia Plastica, Dip. NESMOS, Università Sapienza, Roma*

³*U.O. Genetica Medica, Dip. Medicina di Laboratorio, Osp. Niguarda Ca' Granda, Milano*

Cavernous malformations (CMs) are vascular anomalies of the nervous system mostly located in the brain. Cerebral cavernous malformations (CCM) can occur sporadically or as an autosomal dominant condition, with incomplete penetrance and variable clinical expression. Occasionally, extraneural manifestations of CMs involving the skin have been described. We report the case of two sibs with cutaneous vascular lesions associated with cerebral CMs. After surgical excision, histopathological analysis demonstrated those lesions to be cavernous hemangiomas. Cerebral MRI revealed multiple images suggestive of cavernous hemangiomas in both patients, although no signs of neurological impairment were reported. The genetic study revealed in both patients a nonsense mutation (c.535C>T) in the KRIT1 gene, leading to a premature stop codon (p.R179X) and giving rise to protein truncation.

DIAGNOSTICA DELL'INFERTILITÀ MASCHILE E TEST DI FRAMMENTAZIONE DEL DNA SPERMATICO: STUDIO DI COORTE RETROSPETTIVO MEDIANTE APPLICAZIONE DEL TUNEL TEST

A.L. Gambardella¹, M. Salierno¹, M. Calafati¹, A. Rosolia¹

¹*Analisi Cliniche Mater Dei, Pagani, Salerno*

Premessa

La frammentazione del DNA spermatico determina una condizione di rottura dell'integrità del DNA dello spermatozoo. Tale indagine viene condotta in particolari condizioni anamnestiche quali aborti ripetuti, insuccesso di tecniche di procreazione assistita ed infertilità idiopatica.

Cause di frammentazione del DNA includono: il fumo di sigaretta, ipertermia, varicocele, stress causato dai radicali liberi (ROS), o azione di agenti esterni come chemioterapici, radioterapici o agenti tossici.

Un'elevata frammentazione del DNA è legata ad una diminuzione dei tassi d'impianto e un aumento di aborti spontanei, mentre una percentuale di cellule con DNA frammentato superiore al 20% è collegata ad un ridotta fertilità naturale e a un ridotto tasso di gravidanze ottenute in seguito a tecniche di IUI o FIVET.

Scopo dello studio

Valutazione della percentuale di frammentazione del DNA spermatico mediante l'applicazione del TUNEL TEST (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-digoxigenin nick-end labeling) in pazienti con diagnosi di sterilità idiopatica.

Materiali e metodi

Sono stati analizzati 86 campioni di liquido seminale mediante l'applicazione del Tunel test (Roche), basato sull'impiego di una terminal-desossinucleotidil-transferasi (TdT), che identifica le rotture del DNA coniugando gli estremi -OH terminali con nucleotidi modificati visualizzati mediante analisi microscopica. Il risultato è espresso come percentuale di DFI (DNA Fragmentation Index).

Risultati

L'applicazione del Tunel test ha mostrato in 29 campioni su 86 un risultato fisiologico con DFI inferiore al 15% (33.7% dei casi); in 21 campioni (24.5%) valori compresi tra il 15 e 20%; in 35 (40.6%) risultati maggiori del 20%; e 1 risultato con DFI maggiore del 40% (1.2%).

Conclusioni

E' noto che l'ovocita è in grado di ripristinare alcuni danni del DNA dello spermatozoo, che se non corretto, manifesta maggiormente la sua azione negativa durante o dopo l'impianto, fenomeno detto effetto paterno tardivo.

I nostri risultati dimostrano che la frammentazione del DNA spermatico è presente in una importante percentuale di pazienti, e questo fenomeno influenza la fertilità in misura variabile, ricoprendo un ruolo importante nell'ambito della sterilità idiopatica.

VALUTAZIONE DEL RUOLO DEL GENE MSH2 NEL TUMORE FAMILIARE DELLA MAMMELLA

L. Maresca¹, C. Cozzani³, M. Tancredi², L. Spugnesi², A. Collavoli¹, P. Aretini¹, E. Falaschi¹, C. Guglielmi², A. Galli³, M.A. Caligo¹

¹*Sezione di Genetica Oncologica, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana, Pisa*

²*Dipartimento di Oncologia, dei Trapianti e delle Nuove Tecnologie in Medicina, Pisa*

³*Istituto di Fisiologia Clinica, CNR, Pisa*

Mutazioni germinali nel gene BRCA1 conferiscono un rischio del 56-80% di sviluppare un tumore della mammella. BRCA1 interagisce con numerose proteine coinvolte nel riparo del DNA tra cui MSH2. Non è mai stato identificato un omologo umano di BRCA1 in lievito ma questo costituisce un ottimo sistema modello per valutare gli effetti del gene BRCA1 umano, wt o mutato, sulla HR (Homologous Recombination) e sulla frequenza di mutazione genica. In esperimenti precedenti sono state valutate le frequenze degli eventi di HR e mutazione genica nel ceppo aploide RSY6 di *S.Cerevisiae*, contenente un substrato artificiale di ricombinazione. RSY6wt o difettivo nel riparo, è stato trasformato con un vettore che esprimeva la proteina BRCA1 umana wt o mutata (VUS). Dieci differenti VUS sono state valutate. L'espressione di BRCA1wt nel ceppo RSY6 wt non aveva effetto né sulla HR né sulla frequenza di mutazione genica. Invece nel ceppo RSY6msh2Δ, che aveva un livello basale di ricombinazione pari al 50% rispetto al wt, l'espressione di BRCA1wt aumentava la ricombinazione di circa 3 volte e la frequenza di mutazione genica di circa 2 volte. Questi dati suggeriscono che il gene MSH2 potrebbe avere un ruolo nell'instabilità genomica indotta da BRCA1. Per verificare questa ipotesi è stata condotta un'analisi mutazionale del gene MSH2 nei tumori delle pazienti carrier delle VUS di BRCA1 precedentemente valutate nei saggi funzionali in lievito. È stata individuata una VUS nell'esone 3 (c.484 G>A; p.G162R) già nota come patogenetica e due varianti sinonime localizzate nell'esone 11 (c.1666 T>C; p.L556L e c.1746 C>T; p.V582V) di MSH2. Tutte le pazienti nelle quali sono state ritrovate queste varianti erano affette da carcinoma mammario duttale infiltrante. La variante p.G162R è stata identificata nella paziente carrier della VUS p.A1789T, nota come patogenetica, la p.L556L è stata individuata in due pazienti una carrier della VUS p.S1040N, nota come neutra e l'altra della p.M1652I, nota come patogenetica, anche la p.V582V è stata riscontrata in una paziente carrier della VUS p.M1652I di BRCA1. Questi risultati indicano che tra i due geni esiste una possibile interazione patogenetica ma che probabilmente andrebbero analizzati pazienti selezionati diversamente.

STUDIO DEL RUOLO DI MARK4 NEL CICLO CELLULARE ATTRAVERSO SILENZIAMENTO, OVERESPRESSIONE E VALUTAZIONE DELLO STATO DI ATTIVAZIONE

D. Rovina¹, L. Monti¹, C. Novielli¹, L. Fontana¹, N. Panini², S. Sirchia¹, E. Erba², I. Magnani¹, L. Larizza¹

¹*Genetica Medica, Dip. di Scienze della Salute, Università Degli Studi di Milano, Milano*

²*Dip. di Oncologia, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano*

MARK4, espresso nelle due isoforme MARK4S ed L, appartiene ad una famiglia di chinasi che fosforilano le MAP aumentando la dinamicità dei microtubuli. Un ruolo di MARK4L nella gliomagenesi è indicato dalla sua predominante espressione in cellule staminali neurali, nei glioblastomi (GBM) e in cellule staminali derivanti da GBM. Inoltre, la localizzazione di MARK4L ed S nei centrosomi e midbody, suggerisce un loro coinvolgimento nei processi di divisione e regolazione del ciclo cellulare.

A supporto di tale ipotesi, mediante esperimenti di immunofluorescenza (IF) con anticorpo specifico per le MARK fosforilate, abbiamo verificato che MARK4, a livello centrosomico, risulta fosforilato, e quindi attivo, in tutte le fasi della mitosi e nel midbody in citochinesi. Al contrario, in interfase solo una frazione di centrosomi risulta positiva per l'anticorpo.

Ulteriori evidenze circa il coinvolgimento di MARK4 nella divisione cellulare emergono da esperimenti di silenziamento ed overespressione effettuati su fibroblasti normali e linee di glioma (GBM G32, e oligoastrocitoma G157).

Il silenziamento di MARK4 in entrambi i sistemi cellulari, causa alterazioni della morfologia cellulare, diminuzione della frazione mitotica e rallentamento della proliferazione, come dimostrato dagli esperimenti di IF e citofluorimetria. Inoltre la maggior parte delle cellule silenziate mostrano centrosomi duplicati, posizionati apicalmente al nucleo, caratteristica tipica della transizione G1-S, apparentemente bloccata dal deficit funzionale di MARK4.

L'overespressione di MARK4L e S in fibroblasti e G157, determina vistose alterazioni della morfologia cellulare, parallelamente ad una diminuzione della densità dei microtubuli. In aggiunta circa il 30% e il 5% dei fibroblasti overesprimenti L ed S rispettivamente, mostrano la formazione di fasci, negativi per tubulina, ma positivi per MARK4 fosforilato, ad indicare la presenza della chinasi in forma attiva in complessi disfunzionali per la corretta progressione del ciclo cellulare.

I risultati ottenuti da questi esperimenti, convalidano il coinvolgimento di MARK4 in strutture cruciali dell'apparato mitotico, quali centrosomi e microtubuli e suggeriscono l'importanza del suo dosaggio per la progressione della divisione cellulare.

DEVELOPMENT OF AN ACCURATE PIPELINE FOR EXOME SEQUENCING DATA ANALYSIS

M.R. De Filippo¹, G. Giurato², F. Rizzo², D. Greco³, R. Katainen⁴, L. Aaltonen⁴, G. Coppola⁵, A. Weisz²

¹*Fondazione IRCCS SDN, Napoli, Italy*

²*Laboratory of Molecular Medicine and Genomics and UOC Molecular Pathology and Medical Genomics, University of Salerno, Faculty of Medicine, Salerno, Italy*

³*Research Unit of Molecular Medicine, University of Helsinki, Helsinki, Finland and Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden*

⁴*Department of Medical Genetics, Genome-Scale Biology Research Program, University of Helsinki, Helsinki, Finland*

⁵*Department of Medicine and Surgery, University of Salerno, Salerno, Italy*

Exome sequencing - targeted sequencing of coding regions of the genome - is a powerful and cost-effective new tool for dissecting the genetic basis of diseases and traits that have proved to be intractable with conventional gene-discovery strategies. Until now many algorithms have been produced, each of them addressing a different task in the downstream analysis of next-generation sequencing (NGS) data. The aim of this work is to combine these algorithms into an accurate analysis pipeline to identify high quality variations in the data produced in our laboratory by exome capture using the Agilent SureSelect 50Mb exome capture kit and massively parallel sequencing with an Illumina GAllx sequencer. After sequencing, paired-end reads were aligned to the hg19 reference genome using BWA [1] allowing more than one mismatch, and processed using SAMtools [2]. Base quality score recalibration and local realignment around indels were performed using the Genome Analysis Toolkit GATK [3] and PCR duplicates were removed using Picard tool [4]. SNPs calling was done using GATK UnifiedGenotyper, that applies a Bayesian model to estimate the most likely genotypes and allele frequency in a population of N samples, giving an annotated VCF file as output. Only variations supported by a number of reads greater than 8, calls greater than 25 and quality score greater than 40, were considered for the next steps. Subsequently, variants have been marked as missense or synonymous and then dbSNP was used to discard SNPs that were already known. Finally, the tendency of each missense mutation to be deleterious for the function of a protein as opposed to neutral was calculated using CONDEL [5], a software that computes a weighted average of the scores of the SIFT and POLYPHEN methods. The pipeline was tested on a sample derived from a human cell line sequenced in our laboratory. Starting from 165.791 raw variants, we applied all filters described above reducing the list to 3.154 variations, ~1.000 of which were marked as deleterious by CONDEL and manually annotated according to the literature to identify variations of potential interest for the disease.

VALIDAZIONE MEDIANTE FISH DI RIARRANGIAMENTI RILEVATI CON CGH: DUE CASI DI TRASLOCAZIONE INSERZIONALE FAMILIARE

S. Fini¹, B. Buldrini¹, R. Gruppioni¹, A. Bonfatti¹, V. Aiello¹, I. Donati¹, E. Italyankina¹, M. Santucci², G. Garani³, S. Bigoni¹, A. Ferlini¹

¹*U.O. Genetica Medica, Az. Ospedaliera Universitaria-Ferrara*

²*Dip. Scienze Neurologiche, Università di Bologna*

³*U.O. T.I.N. e Neonatologia, Az. Ospedaliera Universitaria-Ferrara*

L'implementazione dell'analisi CGH array come primo approccio diagnostico nei pazienti con disabilità intellettiva e/o malformazioni congenite ha portato ad un notevole incremento quantitativo nella individuazione di variazioni del numero di copie (CNVs) di segmenti cromosomici, sia quelli di natura patologica che quelli privi di significato patogenetico.

Per la validazione e follow-up delle CNVs evidenziate dalle analisi aCGH sono utilizzati strumenti di citogenetica molecolare (FISH) e analisi molecolari quantitative (RT-PCR, MLPA, QF-PCR); la FISH presenta il vantaggio di fornire, con i limiti attuali imposti dalla dimensione delle sonde, anche informazioni sulla localizzazione cromosomica del riarrangiamento.

Nel contesto dei dati ottenuti dalle analisi aCGH è emerso un notevole aumento della frequenza delle traslocazioni inserzionali (IT) rispetto a quella stimata con le metodiche di citogenetica classica, in base alle casistiche recentemente pubblicate la frequenza delle IT risulta essere il 2-3% degli sbilanciamenti interstiziali apparentemente "de novo".

Presentiamo due casi recenti di CNV patologiche rilevati con aCGH in soggetti con deficit cognitivo e dismorfismi e risultati essere conseguenza di IT nel corso di follow-up effettuato con analisi FISH:

- probando con delezione di 4,9 Mb (del 6q14.3) risultato di una trasmissione sbilanciata di IT bilanciata paterna (ish ins(6;7)(q14.3;p?)(RP1130P6-;RP1130P6+)

- due sorelle, una con delezione e l'altra con duplicazione di un segmento di circa 5 Mb che è presente come traslocazione inserzionale bilanciata nella madre (ish ins(3;6)(p14.1;q?)(RP119A1-;RP119A+)

L'osservazione di un significativo aumento nella frequenza delle traslocazioni inserzionali e l'alto rischio di trasmissione sbilanciata di IT parentali bilanciate (50%), enfatizza l'importanza di effettuare il follow-up con FISH per le CNVs potenzialmente patologiche considerata la rilevanza nel counselling genetico.

La recente disponibilità di sonde sintetiche, in grado di caratterizzare anche sbilanciamenti di piccole dimensioni (100-200 Kb), predispone ad un utilizzo generalizzato della FISH come metodica di validazione in aCGH.

EFFETTO INTERCROMOSOMICO IN UN PORTATORE DI TRASLOCAZIONE ROBERTSONIANA (13;14)

G. Gai¹, S. Bosso², P. Bibbò¹, G. Voglino², E. Savin¹, A. Zonta¹, C. Arduino¹, N. Migone³, E. Grosso¹

¹*SCDU Genetica Medica, Az. Osp. Città della Salute e della Scienza di Torino*

²*Laboratorio Promea, Torino*

³*Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino*

Presentiamo il caso di una coppia giunta in consulenza per valutare il rischio di ricorrenza di anomalie cromosomiche nella prole.

La coppia ha avuto quattro gravidanze esitate in aborto spontaneo entro la dodicesima settimana di gestazione; l'esame cromosomico su materiale abortivo è stato eseguito solo negli ultimi due eventi avversi, e in entrambi i casi ha identificato un cariotipo con una traslocazione tra il cromosoma 13 e il 14 e la monosomia del cromosoma 21: 44,XY,der(13;14)(q10;q10),-21.

I consultandi si sono sottoposti ad analisi cromosomica: il partner maschile è risultato portatore di una traslocazione Robertsoniana tra il cromosoma 13 e il cromosoma 14: 45,XY,der(13;14)(q10;q10). La partner femminile ha presentato un cariotipo nella norma.

La presenza di una monosomia del cromosoma 21 in due gravidanze consecutive è da ritenersi un evento non casuale ma favorito dalla presenza della traslocazione robertsoniana parentale mediante il cosiddetto "interchromosomal effect".

Studi sul processo di segregazione meiotica in maschi portatori di traslocazione Robertsoniana hanno dimostrato un'aumentata incidenza di non-disgiunzioni dei cromosomi non coinvolti nella traslocazione; tale fenomeno è definito "interchromosomal effect" ed è stato postulato per la prima volta da Lejeune et al (1965); tuttavia, la possibilità che un riarrangiamento cromosomico possa influenzare la corretta segregazione meiotica degli altri cromosomi è una questione ancora controversa.

Il counselling genetico e la valutazione del rischio di anomalie cromosomiche in coppie con un partner portatore di traslocazione Robertsoniana devono tenere in considerazione il fenomeno dell' "interchromosomal effect".

Trisomia 8 a mosaico in diagnosi prenatale: correlazione genotipo-fenotipo

L. Godino¹, G. Tortora¹, A. Elmakky¹, S. Miccoli¹, M.C. Pittalis², G. Simonazzi³, M. Segata⁴, E. Pompili¹

¹*U.O. Genetica Medica, Policl. Sant'Orsola Malpighi, Bologna*

²*Lab. Citogenetica, U.O. Ginecologia Ostetricia, Policl. Sant'Orsola Malpighi, Bologna*

³*U.O. Ginecologia Ostetricia, Policl. Sant'Orsola Malpighi, Bologna*

⁴*U.O. Ostetricia e Ginecologia, Osp. Maggiore, Bologna*

La trisomia 8 (T8) a mosaico è una condizione sporadica, il cui fenotipo è caratterizzato da ritardo psicomotorio, dismorfismi facciali, anomalie scheletriche, renali e cardiovascolari. Dal 2005 ad oggi presso l'U.O. Genetica Medica del Policlinico S.Orsola-Malpighi di Bologna si sono effettuate 3493 consulenze genetiche prenatali: in 10 di esse (0,29%) è emerso un mosaicismo per T8. In sette casi il dato era stato riscontrato su villi coriali (CVS), in quattro riscontrato/confermato su liquido amniotico (LA) e in tre riscontrato/confermato su sangue fetale (SF). Delle 10 donne a cui era stata riscontrata una T8 a mosaico su CVS e/o LA, sette si sono sottoposte a SF; tre casi con conferma alla citogenetica classica e in un caso solo su FISH. Quattro donne su 10 si sono sottoposte a travaglio abortivo: due per la rappresentanza del dato su più tessuti e due per il riscontro di malformazioni ecografiche complesse. In cinque casi le gravidanze sono state portate a termine con un buon follow-up dei bimbi; il caso più rappresentativo tra questi mostrava una percentuale di T8 a mosaico alla nascita del 5,61%. In due casi il riscontro su LA può essere ricondotto ad un quadro di pseudomosaicismo, data la presenza di cellule anomale all'interno della stessa coltura in presenza di SF normale. È stato possibile ipotizzare una correlazione genotipo-fenotipo in tre casi: in uno l'ecografia mostrava labioschisi bilaterale con schisi del palato anteriore, dimorfismi facciali e marcata deviazione dell'asse cardiaco (autopsia: anomalie dell'apparato gastro-enterico e renale); in uno era stata evidenziata una ipoplasia del corpo calloso e una pielectasia renale monolaterale (autopsia: malformazioni cerebrali multiple e anomalie viscerali); nell'ultimo l'ecografia morfologica non aveva mostrato un quadro anomalo, tuttavia all'esame autoptico emergevano dismorfismi facciali ed anomalie viscerali. Dai nostri dati non emerge una chiara correlazione tra l'entità del mosaico e il quadro clinico. Pertanto, nel tentativo di delineare al meglio il fenotipo, risulta fondamentale l'esecuzione del cariotipo sui diversi tessuti disponibili in epoca prenatale, in associazione alla FISH e al dato ecografico.

TECNICHE INNOVATIVE NELLA DIAGNOSTICA X FRAGILE E PATOLOGIE ASSOCIATE A PREMUTAZIONE

M. Grasso¹, E. Gennaro¹, L. Pennese¹, M. Barbaresi¹, D. Coviello¹

¹*Laboratorio di Genetica Umana, E.O. Ospedali Galliera, Genova*

La sindrome dell'X Fragile (SXF) è associata all'espansione superiore a 200 copie della tripletta CGG e alla metilazione del promotore del gene FMR1. Il numero di ripetizioni è variabile e le categorie alleliche sono: normale 6-44, intermedio 45-54, premutazione 55-200 (associata a FXTAS-POI); la mutazione completa (associata a sindrome dell'X Fragile) è la risultante di 2 eventi: espansione superiore a 200 CGG che si associa a ipermetilazione del promotore.

Il Southern blot (SB) è ritenuto il metodo più sensibile (gold standard) per valutare lo stato di metilazione degli alleli mutati ma ha scarso potere risolutivo e non consente di definire accuratamente le diverse categorie alleliche. I comuni metodi basati su PCR consentono la determinazione dell'espansione CGG, ma falliscono, o sono scarsamente riproducibili, nell'amplificare alleli superiori a 100-150 CGG. Nel 2010 è stata descritta la Repeat-Primed PCR (RP-PCR) che mediante l'aggiunta di un terzo primer chimérico, complementare alla sequenza ripetuta, consente l'amplificazione e il sizing di tutti gli alleli: dai normali fino a mutazioni superiori a 1000 CGG. Recentemente è stato introdotto un nuovo test di metilazione PCR-based (mPCR) nel quale l'amplificazione è preceduta da una digestione con un enzima sensibile alla metilazione del DNA. Presentiamo la casistica di 64 soggetti (49 F +15 M) esaminati con il nuovo approccio combinato RP-PCR + mPCR con esempi di analisi di genotipi complessi o atipici.

Il nuovo approccio diagnostico ha dimostrato un'elevata capacità nell'amplificare tutte le categorie alleliche e di definire lo stato di metilazione con una sensibilità analitica talvolta superiore al SB, anche nei casi di mosaicismo con alleli poco rappresentati; verrà descritta una nuova flow chart, alternativa al SB, per la diagnosi di routine della SXF e delle patologie associate a premutazione con evidenti vantaggi quali la diminuzione dei tempi di esecuzione e l'abbandono dell'uso di composti radioattivi.

Si ringraziano Dr. Gary J. Latham, Mrs. Stela Filipovic-Sadic and Dr. Andrew G. Hadd, della Diagnostics Research and Technology Development Asuragen, Inc., Austin TX, USA, per il supporto tecnico sull'utilizzo del software e per l'interpretazione dei risultati.

CARATTERIZZAZIONE DI UN NUOVO BREAKPOINT DELLA DELEZIONE CFTRdele2,3(21kb) IN SOGGETTI DI ORIGINE ITALIANA

P. Thavaraja¹, C. Ruberto¹, A. Gulisano¹, T. Mattina², C. Barone², M.A. Buccheri¹, A. Ragusa¹

¹*UOC Diagnosi Prenatale e Genetica Medica, AOU Policlinico-Vittorio Emanuele, Catania*

²*Scuola di Specializzazione in Genetica Medica, Università Catania*

La Fibrosi Cistica, uno dei più comuni disordini genetici autosomici recessivi nei caucasici, è causata da mutazioni del gene CFTR.

In questo gene riarrangiamenti genomici di grossa taglia rappresentano oltre il 20 % degli alleli negativi per mutazioni puntiformi.

Fra le più frequenti grosse delezioni del gene CFTR, la delezione CFTRdele2,3(21Kb) ha una distribuzione diversa tra le regioni dell'Europa centrale e dell'est e quelle mediterranee.

Questa delezione, comunemente evidenziata con Reverse Dot Blot (RDB) (Innolipa), è visibile con la Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), metodologia di punta per l'analisi di delezioni/duplicazioni, ormai routinariamente utilizzata nella diagnostica molecolare di III livello della Fibrosi Cistica.

Mediante l'applicazione di entrambe le metodiche è stato osservato che, in alcuni soggetti siciliani la delezione CFTRdele2,3, caratterizzata con RDB risultava normale con il metodo MLPA.

La costruzione di primers specifici nella regioni genomiche coinvolte nella delezione ha permesso di evidenziare la presenza di due distinti breakpoints della delezione CFTRdele2,3.

Communication of Genetic Information by Other Health Professionals: The role of the Genetic Counsellor in Specialist Clinics

R. O'Shea¹, A.M. Murphy¹, E. Treacy¹, S.A. Lynch¹, D. Lambert¹

¹*U.O. di Genetica, Osp Temple Street, Dublino, Irlanda*

Many children with chronic genetic diseases are followed by specialty clinics that provide genetic information as part of the care. Health services restrictions in the Republic of Ireland (ROI) can make the wait for an appointment with a genetic counsellor long. We examined whether genetic information was being adequately understood when presented by medical, but non-genetics staff to long term patients, using our national metabolic service as an example. The aim was to inform health professionals about the need or role of a genetic counsellor in a specialist setting. A questionnaire was used to assess knowledge among parents and patients affected by galactosaemia and Maple Syrup Urine Disease (MSUD). Twenty seven families with galactosemia and 10 with MSUD were interviewed in clinic. Comparative analysis showed significant differences in knowledge between parents of children with galactosemia and adult patients ($p=0.001$) and between ethnicities ($p>0.05$). While parents are well informed, the majority expressed a wish for more information about the condition and its transmission. Adult patients with galactosemia and parents from certain ethnic backgrounds could especially benefit from genetic counselling. This study highlights the need for a genetic counsellor in specialist clinics.

DELEZIONE NELLA REGIONE 12q13.13 COINVOLGENTE IL GENE ACVRL1 IN PAZIENTE CON RITARDO MENTALE, HABITUS MARFANOIDE E TELEANGECTASIA EMORRAGICA EREDITARIA.

U. Cavallari¹, F. Comes², E. D'Adamo², P. Cavalli¹

¹*Servizio di Genetica, Istituti Ospitalieri di Cremona, Cremona*

²*U.O. Pediatria, Istituti Ospitalieri di Cremona, Cremona*

Riportiamo il caso di un ragazzo di 14 anni con ritardo mentale e habitus marfanoide nel quale è stata identificata una delezione de novo a carico delle regione 12q13.13.

Il paziente presenta ritardo mentale di grado medio, microcefalia, dismorfismi craniofacciali (ipotelorismo con occhi infossati, rime palpebrali brevi ed epicanto; padiglioni auricolari anteversti; ponte nasale ampio; labbra sottili, grave malposizione dentaria), habitus marfanoide con aracnodattilia, lieve pectus carinatum, piede cavo con camptodattilia; pregressi interventi per criptorchidismo, strabismo convergente e timpanoplastica per otite media cronica.

L'analisi array-CGH ha evidenziato una delezione de novo di 2.9 Mb nella regione 12q13.13 che coinvolge 59 geni descritti in OMIM (74 HGNC). Tra questi, 27 geni codificano per cheratine (responsabili di epidermolisi bullose, displasie ectodermiche e ittiosi a trasmissione recessiva) e 4 geni sono associati ad altre patologie a trasmissione recessiva (anemia ipocromica microcitica con sovraccarico di ferro, sindrome AAA, osteogenesi imperfetta tipo XI, sindrome da persistenza dei dotti mulleriani). Il riscontro di delezione del gene ACVRL1 ha consentito la diagnosi preclinica-presintomatica di teleangectasia emorragica ereditaria (HHT), per la quale il paziente è attualmente in corso di valutazione clinica.

Il ruolo degli altri geni coinvolti nella delezione è di difficile definizione. Tra i geni degni di approfondimento segnaliamo SCN8A, canale del sodio già associato a ritardo mentale, e RARG, recettore gamma per l'acido retinoico con funzioni di controllo della condrogenesi.

Dal confronto con la letteratura emerge un unico caso con delezione parzialmente sovrapposta e analogie nel fenotipo (disturbo cognitivo, dismorfismi facciali, camptodattilia, strabismo)[1]. Ulteriori segnalazioni di individui con simili delezioni saranno necessarie per definire più precisamente il ruolo dei geni coinvolti.

[1] Okamoto N, et al. Am J Med Genet Part A 2011, 155:2997-3001.

ANALISI DI METILAZIONE EPIGENOME-WIDE (EWAS) NELL'INFARTO DEL MIOCARDIO

S. Guarrera¹, G. Fiorito¹, A. Russo⁹, C. Di Gaetano⁹, F. Ricceri⁹, F. Rosa¹, A. Allione¹, F. Voglino¹, L. Iacoviello³, M.C. Giurdanella⁴, R. Tumino⁴, S. Gioni⁵, V. Krogh⁵, A. Mattiello⁶, S. Panico⁶, P. Vineis¹⁰, C. Sacerdote¹¹, G. Matullo⁹

¹Human Genetics Foundation – Torino, Torino, Italy

²Genetics, Biology and Biochemistry Department, University of Torino, Torino, Italy

³Fondazione di Ricerca e Cura “Giovanni Paolo II”, Catholic University, Campobasso, Italy

⁴Cancer Registry and Histopathology Unit, “Civile-M.P. Arezzo” Hospital, ASP7, Ragusa, Italy

⁵Department of Preventive and Predictive Medicine, Epidemiology and Prevention Unit, Fondazione IRCSS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italy

⁶Department of Clinical and Experimental Medicine, Federico II University, Napoli, Italy

⁷Epidemiology and Public Health, Imperial College London, UK

⁸Cancer Epidemiology, CPO-Piemonte, Torino, Italy

⁹Human Genetics Foundation – Torino, Torino, Italy, Genetics, Biology and Biochemistry Department, University of Torino, Torino, Italy

¹⁰Human Genetics Foundation – Torino, Torino, Italy, Epidemiology and Public Health, Imperial College London, UK

¹¹Human Genetics Foundation – Torino, Torino, Italy, Cancer Epidemiology, CPO-Piemonte, Torino, Italy

La metilazione del DNA, soprattutto a livello delle isole CpG, è un importante meccanismo di regolazione coinvolto nello sviluppo e differenziamento, nell'invecchiamento, ed in varie patologie, dai disordini neurologici ed autoimmuni al cancro. Per identificare un eventuale ruolo della metilazione del DNA nell'infarto del miocardio (MI), abbiamo esaminato i livelli di metilazione di più di 450.000 siti CpG (Illumina HumanMethylation450 BeadChip) in una coorte prospettica di 206 casi e 206 controlli appaiati per genere, età, centro e stagione di reclutamento appartenenti alla sezione italiana dello studio EPIC (European Perspective Investigation into Cancer and Nutrition). I volontari EPIC, sani al reclutamento (1994-98), sono stati monitorati periodicamente per l'insorgenza di tumori o di patologie legate allo stile di vita.

I livelli di metilazione misurati su DNA da sangue intero prelevato al reclutamento sono stati analizzati secondo procedure standard (MethyLumi, Bioconductor). Le analisi sono state corrette per le variabili di appaiamento e per altri fattori di rischio cardiovascolare (fumo, BMI, waist/hip ratio) stratificando per genere quando necessario per tener conto della metilazione sesso-specifica e dei differenti fattori di rischio tra maschi e femmine.

Non sono state riscontrate associazioni statisticamente significative (EWAs threshold $P=10^{-7}$) tra i livelli di metilazione di alcun singolo sito CpG ed il rischio di MI, sia per i maschi che per le femmine. All'analisi “regionale”, considerando una finestra di 50 kb, sono stati riscontrati segnali multipli di metilazione differenziale tra casi e controlli statisticamente significativi ($P<10^{-7}$) in 2 regioni genomiche per le femmine (Chr5 e Chr1), e in 4 regioni con significatività borderline per i maschi (Chr6, Chr7, Chr11 e Chr17). In tutte queste regioni sono stati descritti QTLs associati alla suscettibilità al MI, alla regolazione della pressione sanguigna, e a disordini metabolici come diabete, obesità e dislipidemia, che sono noti fattori di rischio per patologie cardiovascolari (CVDs). Questo risultato suggerisce che il differente profilo di metilazione tra casi e controlli possa essere coinvolto nella regolazione di queste regioni, e conseguentemente nell'insorgenza di CVDs.

Colorectal cancer risk: influence of one-carbon metabolism on promoter gene methylation.

F. Migheli², A. Stocco¹, F. Coppedè², W.A. Wan Omar³, A. Failli⁴, A. Legitimo⁴, M. Seccia⁵, R. Spisni⁵, P. Miccoli⁵, J. Mathers³, L. Migliore¹

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

²*Dep. of Laboratory Medicine, Pisa University Hospital (AOUP), Pisa, Italy*

³*Human Nutrition Research Centre; Institute for Aging & Health; Newcastle University; Newcastle upon Tyne, UK.*

⁴*Dep. of Reproductive Medicine and Child Development, Division of Pediatrics, Lab. of Immunology, University of Pisa, Pisa, Italy.*

⁵*Dep. of Surgery, University of Pisa, Italy.*

Folate-dependent one carbon metabolism is a highly polymorphic pathway that regulates the distribution of one-carbon derivatives between DNA methylation and synthesis. Methylation of the promoter-associated CpG islands is an epigenetic modification, acting as a mechanism to regulate gene expression associated with the development of many different types of cancers such as colorectal cancer (CRC). Since epigenetic modifications are reversible, methylation studies are extremely promising in cancer research for diagnosis, prognosis and therapy approaches. We performed promoter methylation analysis, using methylation sensitive-high resolution melting (MS-HRM) technique, of three tumor suppressor genes such as adenomatous polyposis coli gene (APC), cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gene (CDKN2A/p16) and O6-Methylguanine-Methyltransferase (MGMT) gene in 80 CRC and healthy adjacent tissue specimens. We also developed a method for deriving single estimates, rather than a range, of methylation using MS-HRM and compared the values obtained with those obtained using pyrosequencing. The comparison of the two techniques (MS-HRM and pyrosequencing), using APC and P16 results, allowed us to observe a high correlation coefficient between them. Finally we investigated the possible correlation among the methylation status of the reported genes and the clinical-pathological features of the patients; we also tested a possible association among MTHFR C677T, DNMT3B C-149T, MTRR A66G, MTR A2756G polymorphisms on folate metabolism genes and the methylation levels of APC, CDKN2A and MGMT genes. A higher gene promoter methylation in CRC tissue with respect to the healthy adjacent tissue was found; moreover no statistically significant association between stage (TNM), gender, sex, tumor size, location with regard to the methylation profile of each of the analyzed genes was obtained. However we noticed a positive association between age and MGMT methylation levels. Finally some significant interactions between folate metabolism polymorphisms and gene promoter methylation were observed.

B-CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA WITH t(4;11)(q21;q23) IN A YOUNG WHOMAN. APPEARANCE OF AN ADDITIONAL LEUKEMIC CLONE WITH MONOCYTTIC PHENOTYPE DURING THERAPY

M.I. Ferreri¹, G. Carulli², I. Sardelli¹, R. Bruno¹, C. Cosini¹, P. Simi¹

¹Laboratory of Cytogenetics, AOUP, Pisa, Italy

²Division of Hematology, Department of Oncology, Transplants and New Technologies in Medicine, University of Pisa;

About 5% of B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) in adults is characterized by t(4;11)(q21;q23), which produces the AF4/MLL gene. This genetic anomaly confers peculiar features to this B-ALL subtype, including a very immature immunophenotype and poor prognosis.

We describe the case of a 21-year-old female who presented B-ALL carrying the t(4;11)(q21;q23) and blast cells positive for CD19, TdT, CD79a, CD38, HLA-DR.

Before completing the entire Hyper-CVAD therapy regimen, the B-cell leukemic clone still was detected, but an additional leukemic clone appeared, with distinct morphologic features and immunophenotype (CD13, CD33, CD64, CD38, CD56, CD15, CD4dim) compatible with derivation from the myeloid/monocytic lineage. Karyotyping showed the co-existence of t(4;11)(q21;q23) with a trisomy of chromosomes 8, 12, 13 and a double chromosome 4 derivative of t(4;11)(q21;q23). The patient developed a rapid progression of disease and died with a clinical picture of disseminated intravascular coagulation.

So far, very few cases of B-ALL carrying the t(4;11)(q21;q23) have been reported to display a lineage switch (from lymphoid to myeloid). Our report describes an additional possible evolution of such a subtype of B-ALL, with appearance of an additional non-lymphoid clone. This finding suggests a blast cell derivation from a common lymphoid/monocytic precursor leading to a bilineal acute leukemia. Early detection of such uncommon evolution of this B-ALL subtype may have practical implications in terms of therapy or follow-up strategies.

OTTIMIZZAZIONE DELLA DIAGNOSI GENETICA DELLE FEBBRI PERIODICHE MEDIANTE TECNOLOGIE AD ALTO PROCESSAMENTO

G.M. Severini¹, E. De Martino¹, E. Athanasakis¹, B. Bortot¹, A.M. Bianco¹, J. Vuch¹, S. Crovella¹, A. Tommasini¹

¹*Dipartimento di Diagnostica Avanzata, IRCCS materno infantile Burlo Garofolo, Trieste.*

Le sindromi auto-infiammatorie e le febbri periodiche costituiscono un gruppo di malattie rare, a causa genetica, caratterizzate dalla comparsa di episodi infiammatori ricorrenti o continui accompagnati da febbre elevata e da una varietà di altri sintomi. Le malattie meglio definite in questo gruppo sono: la febbre familiare mediterranea (gene MEVF), la sindrome periodica associata al recettore del TNF-alfa (gene TNFRS1A), il difetto di mevalonato kinasi o sindrome da iper IgD (gene MVK), le criopirinopatie (gene CIAS1) e le sindromi infiammatorie legate a difetto di NLRP12.

Le procedure cliniche e di laboratorio per l'identificazione precoce di queste malattie non sono sempre di semplice attuazione e molti bambini rimangono senza una diagnosi certa ed un trattamento adeguati.

La possibilità di effettuare rapidamente la diagnosi genetica rappresenta quindi uno strumento fondamentale per la gestione clinica dei pazienti. Tuttavia, esiste una certa sovrapposizione clinica tra i diversi fenotipi e la scelta dei geni da analizzare può essere difficile e talora può essere indicato eseguire in sequenza l'analisi di più geni.

Abbiamo quindi sviluppato un sistema diagnostico ad alto processamento che, con l'ausilio della tecnologia robotica, ci consente di analizzare, tramite sequenziamento diretto, 5 geni contemporaneamente (MEVF, TNFRS1A, MVK, CIAS1 e NLRP12), con un notevole risparmio sia in termini di costi che di tempo. Con questa tecnica siamo riusciti a completare la diagnosi su 7 dei 17 pazienti di una casistica selezionata per l'esclusione della sindrome PFAPA e per la persistenza del problema febbrile al momento della diagnosi. In oltre il 40% dei casi è stato possibile identificare variazioni geniche certamente associate al fenotipo clinico (2 casi con MKD, 1 FMF, 1 TRAPS, 1 FCU) o possibilmente correlate al fenotipo (2 FMF con una sola mutazione) nei quali la diagnosi di FMF è stata confermata in seguito all'evidenza di risposta al trattamento con colchicina.

In conclusione, una procedura di analisi ad alto processamento può facilitare la diagnosi genetica in un'ampia quota di soggetti in casistiche selezionate. Per alcuni casi resta la necessità di integrare i risultati genetici con i dati clinici per giungere ad una diagnosi finale.

IDENTIFICAZIONE DI MUTAZIONI SOMATICHE A MOSAICO DEI GENI IDH1 ED IDH2 IN ENCONDROMI E EMANGIOMI A CELLULE FUSATE NELLA MALATTIA DI OLLIER E SINDROME DI MAFFUCCI

L. Sangiorgi¹, T.C. Pansuriya², P. D'Adamo³, M. Gnoli¹, E. Pedrini¹, J.V. Bovée²

¹*Department of Medical Genetics and Skeletal Rare Diseases, Rizzoli Orthopaedic Institute, Bologna, Italy*

²*Department of Pathology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands*

³*Institute for Maternal and Child Health, Instit. Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Burlo Garofolo, University of Trieste, Italy*

La malattia di Ollier e la Sindrome di Maffucci sono patologie scheletriche non ereditarie caratterizzate da encondromi multipli, in associazione con emangiomi a cellule fusate (Sindrome di Maffucci). Riportiamo mutazioni somatiche in eterozigosi a carico del gene IDH1 oppure IDH2 nell'87% degli encondromi (tumori cartilaginei benigni) e nel 70% degli emangiomi a cellule fusate (lesioni vascolari benigne). In particolare le mutazioni identificate nel gene IDH1 sono c.394C>T (che determina a livello proteico la sostituzione amminoacidica R132C) e c.395G>A (che causa la sostituzione R132H) e nel gene IDH2 la mutazione c.516G>C (p.R172S). In totale è stata identificata una mutazione nel gene IDH1 (98%) ed IDH2 (2%) in 35 su 43 (81%) individui affetti da malattia di Ollier e 10 su 13 (77%) pazienti affetti da Sindrome di Maffucci. Indagini immunostochimiche hanno dimostrato mosaicismo intraneoplastico e somatico per una mutazione (c.395G>A, che determina la sostituzione amminoacidica R132H) del gene IDH1. Mutazioni nel gene IDH1 nei tumori cartilaginei sono risultati associati a ipermetilazione e down-regolazione di diversi geni. L'analisi condotta su tumori cartilaginei solitari centrali ha mostrato la presenza di una mutazione nel 40% (40 su 101) dei casi e in 4 linee cellulari di condrosarcoma: saranno necessari studi funzionali per chiarire il ruolo delle mutazioni di IDH1 ed IDH2 nello sviluppo delle neoplasie.

A NOVEL DELETION IN 2q24.1q24.2 IN A GIRL WITH MENTAL RETARDATION AND GENERALIZED HYPOTONIA: A CASE REPORT

O. PALUMBO¹, P. PALUMBO¹, T. PALLADINO¹, R. STALLONE¹, L. ZELANTE¹, M. CARELLA¹

¹*Medical Genetics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG), Italy*

²*Department of Biology, University of Bari, Bari, Italy*

Chromosomal imbalances, recognized as the major cause of mental retardation, are often due to submicroscopic deletions or duplications not evidenced by conventional cytogenetic methods. To date, interstitial deletion of long arm of chromosome 2 have been reported for more than 100 cases, although studies reporting small interstitial deletions involving the 2q24.1q24.2 region are rare. With the widespread clinical use of comparative genomic hybridization chromosomal microarray technology, several cryptic chromosome imbalances have outlined new genotype-phenotype correlations and isolated a number of distinctive clinical conditions. Here we report on a girl with mental retardation and generalized hypotonia. A genome-wide screen for copy number variations (CNVs) using single nucleotide polymorphisms (SNPs) array revealed a 7.5 Mb interstitial deletion of chromosome region 2q24.1q24.2 encompassing 59 genes, which was absent in parents. The gene content analysis of the deleted region and review of the literature revealed the presence of some genes that may be indicated as good candidate in generating the main clinical features of the patient. The present case represents a further patient described in the literature with an interstitial deletion of chromosome 2q24.1q24.2. Our patient shares some clinical features with the previously reported patients carriers of overlapping 2q24 deletion. Although more cases are needed to delineate the full-blown phenotype of 2q24.1q24.2 deletion syndrome, published data and present observation suggest that hemizygoty of this region results in a clinically recognizable phenotype. Considering these clinical and cytogenetic similarities, we suggest the existence of an emerging syndrome associated to 2q24.1q24.2 region.

Identification, characterization and molecular analysis of a novel PPARG transcript

M. Aprile¹, M.R. Ambrosio¹, R. Aversa¹, R. Esposito¹, M. Scarpato¹, A. Ciccodicola¹, V. Costa¹

¹CNR, Inst. of Genetics and Biophysics 'A. Buzzati-Traverso' (IGB), Naples, Italy

Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ (PPAR γ) is a ligand-activated transcription factor, with established roles in a plethora of biological processes, such as inflammation, cellular differentiation and proliferation, lipid and glucose metabolism. The human PPARG gene encodes different transcripts, and our group has previously identified in tumor tissues a new transcript encoding an isoform lacking the ligand binding domain, γ ORF4. It arises by a readthrough in intron 4 and was mostly detected in sporadic colorectal cancers, showing a dominant negative effect toward PPAR γ .

More recently, another transcript, named γ Delta5, a new not characterized PPARG isoform has been identified by in silico analysis of EST databases and gene predictions.

Here we describe the identification - and further characterization - of such novel transcript, originated by the skipping of exon 5. We investigated the expression of this novel PPARG isoform by quantitative Real-Time PCR and semi-quantitative RT-PCR in different tissues and cell lines, and evaluated - through functional assays - its molecular properties, also investigating the effects of a commonly used PPAR γ ligand, the troglitazone, on γ Delta5 transcription.

In brief, we have demonstrated the new isoform is expressed in several cell lines as well as tissues, and have shown that, similarly to the previously characterized γ ORF4, γ Delta5 transcript does not transactivate a reporter gene, also exerting a dominant negative effect toward PPAR γ . Colony efficiency formation and BrdU incorporation assays showed this novel isoform is no longer able to inhibit cell proliferation (as PPAR γ), whereas conversely it increases in vitro cell growth.

Since PPARG is a master gene of adipogenesis, crucial for the activation of several key genes, we analyzed γ Delta5 expression during in vitro differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to address its putative involvement in such process. We are currently planning to in vivo investigate the expression, and the possible function, of this novel PPARG isoform in human adipose tissue of normal weight control individuals and in obese patients.

AMPIA VARIABILITÀ FENOTIPICA ASSOCIATA A MUTAZIONI COMPOSTE DEL GENE RBM8A: TAR-OPATHIES.

P. Prontera¹, A. Mencarelli¹, D. Rogaia¹, I. Isidori¹, V. Ottaviani¹, T. Cosentino¹, I. Manes¹, M. Schippa¹, C. Gradassi¹, C. Ardisia¹, E. Donti¹

¹*Centro di Riferimento Regionale di Genetica Medica, Azienda Ospedaliera e Università di Perugia, Perugia, Italia.*

La sindrome TAR, patologia autosomica recessiva inizialmente descritta come l'associazione di assenza bilaterale dei radii con trombocitopenia, rappresenta oggi la definizione utilizzata per descrivere un gruppo più ampio di anomalie scheletriche che condividono la stessa eziologia.

Albers et al. (2012) hanno difatti dimostrato, in un'ampia casistica di 55 pazienti, che queste patologie sono causate da eterozigosi composta di alleli nulli e ipomorfi a carico del gene RBM8A, dove l'allele nullo è, nella maggior parte dei casi, rappresentato dalla microdelezione in 1q21.1, mentre quello ipomorfo da varianti nucleotidiche rare.

Riportiamo qui il caso di una famiglia in cui due fratelli hanno avuto, l'uno due gravidanze in cui i feti presentavano aplasia bilaterale dei radii e focomelia, rispettivamente, l'altro una figlia con sindrome TAR.

L'analisi citogenetico-molecolare (FISH) eseguita su metafasi di amniociti coltivati della gravidanza del feto affetto da focomelia, ha evidenziato la microdelezione 1q21.1 in eterozigosi, mentre l'analisi molecolare mediante sequenziamento diretto del gene RBM8A, effettuata su DNA estratto dalle stesse colture di amniociti, ha evidenziato la presenza dello SNP G/A al 5'-UTR chr1: 145, 507, 646). Le analisi parentali hanno documentato la presenza della microdelezione nel padre, mentre la madre è risultata omozigote per la variante G/A al 5'-UTR.

Questi risultati evidenziano l'ampia variabilità fenotipica, anche intrafamiliare, associata alle mutazioni di RBM8A, condizione che apre nuove sfide per la ricerca dei fattori modificatori e che va tenuta in considerazione in ambito assistenziale per il counseling genetico ai genitori ed ai pazienti.

Riteniamo infine utile riflettere sull'opportunità di generare un lumping che riconduca i diversi difetti agli arti, non solo quindi i difetti radiali, a mutazioni di RBM8A: noi suggeriamo il nome "TARopathies".

SLC45A2 SCREENING IN OCULOCUTANEUS ALBINISM ITALIAN PATIENTS IDENTIFIED NOVEL MUTATIONS

L. Mauri¹, L. Barone¹, M. Al Oum³, A. Del Longo², E. Piozzi², S. Marzo¹, F. Stanzial⁴, P. Primignani¹, E. Manfredini¹, S. Penco¹, M.C. Patrosso¹

¹*Medical Genetics Laboratory, Niguarda Ca' Granda Hospital, Milan, Italy*

²*Pediatric Ophthalmology, Niguarda Ca' Granda Hospital, Milan, Italy*

³*Departement of Ophthalmology, University of Insubria – Circolo Hospital, Varese, Italy*

⁴*Genetics, AS Alto Adige, Bolzano, Italy*

Background: Albinism is a heterogeneous group of inherited congenital disease. This disorder can affect all ethnic backgrounds with an overall prevalence of approximately 1/17.000 people. Prevalence of the different forms of Albinism varies considerably worldwide.

Oculocutaneous Albinism is an autosomal recessive inherited condition that involves hair, skin and eyes. Four OCA forms are recognized based on the expression of four different genes.

OCA4 is the most recent form identified and it is caused by mutations in SLC45A2. The gene, located on chromosome 5p13.3, encodes MATP, a transporter protein that mediates melanin synthesis.

Our purpose is to define SLC45A2 genetic variation frequencies in Italian population affected by OCA and negative for TYR, P-protein and TYRP1 gene defects.

Materials and Methods: After clinical examination and instrumental evaluation, all affected patients received a genetic counselling and signed an informed consent for the genetic study. After DNA extraction, different PCR amplifications and automatic sequences of TYR, P-protein, TYRP1 and SLC45A2 genes were performed.

Results: Twenty-two OCA subjects from a cohort of 117 albino patients referring to our Medical Genetic Unit, have been selected for being negative at TYR, TYRP1 and P molecular screening. Five patients out of 22 displayed mutations in SLC45A2 gene. Molecular analysis identified 4 known mutations and 2 novel variations; the known mutations are three missense: c.298G>A (p.G100S), c.606G>C (p.W202C) and c.1532C>A (p.A511E) and one nucleotide deletion the c.986delC (p.T329fs*69); the two new variations are the missense c.793A>T (p.M265L) and the splice-site change c1156+1G>A. The genotypes were: homozygote (1), compound heterozygote (3) and heterozygote (1).

Discussion: We identified two new genomic variations. The splicing mutation is in compound heterozygosis with p.W202C and could be pathological in a patient initially classified as OA1. The new missense variant p.M265L is conserved only in the evolutionary scale of mammals. The chemical properties of Metionine and Leucine are very similar suggesting that this variation could be only a polymorphism. Our analysis indicates that molecular defects in SLC45A2 gene represents only 4% in Italian albino patients.

CHROMOSOME 19p13.3 MICRODELETION: AN ATYPICAL CASE

O. PALUMBO¹, P. PALUMBO¹, T. PALLADINO¹, R. STALLONE¹, M. MIROBALLO¹, L. ZELANTE¹, M. CARELLA¹

¹*Medical Genetics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG), Italy*

²*Department of Biology, University of Bari, Bari, Italy*

The Peutz-Jeghers syndrome (PJS, MIM175200) is an autosomal-dominant inherited disorder characterized by gastrointestinal polyposis, melanin spots of the oral mucosa and digits, and an increased risk for various neoplasms. Germline mutations of the gene STK11, located on 19p13.3, account for the large majority of PJS cases (70%), whereas large deletions account for about 30% of the cases. We describe a patient bearing a de novo 0.7 Mb microdeletion at 19p13.3, detected by SNP-Arrays analysis, encompassing 19 RefSeq genes including STK11. Despite the deletion encompass the entire coding region of the gene STK11, our patient didn't show the typical clinical features of PJS. The patient, a girl, was the first of three children of non-consanguineous parents. She was delivered at term after an uncomplicated pregnancy. Birth weight was 3540 g, body length 50.7 cm and Apgar scores 9/9. At the age of 4 years she showed psychomotor retardations and dysmorphic features. Several genetics and instrumental examinations have been performed and all were negative. To the best of our knowledge, only another case carrier of a larger (1.23 Mb) deletion at 19p13.3, but without PJS features, has been reported. For this reason our patient is important to further delineate the clinical spectrum associated with the 19p13.3 microdeletion.

ADAMTS18 is a novel autosomal recessive syndromic retinal dystrophy gene

I. Peluso¹, I. Conte¹, F. Testa², M. Pizzo¹, N. Meola¹, M. Mutarelli¹, C. Ziviello¹, A.M. Barbarulo³, V. Nigro⁴, M. Melone³, F. Simonelli², S. Banfi⁴

¹*Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Naples*

²*Department of Ophthalmology, Second University of Naples, Naples*

³*First Neurological Clinic, Department of Clinical and Experimental Medicine and Surgery, Second University of Naples, Naples*

⁴*Medical Genetics, Department of General Pathology, Second University of Naples*

Background: Inherited retinal dystrophies, including retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis among others, are a group of genetically heterogeneous disorders that lead to severe visual deficits. They can be caused by mutations in over 100 genes and there is evidence for the presence of as yet unidentified genes in a significant proportion of patients.

Aim: To identify a novel gene for an autosomal recessive form of retinal dystrophy (ARRD) in a patient carrying no previously described mutations in known ARRD genes.

Methods: An integrated strategy including homozygosity mapping and whole exome sequencing was used. To assess mutation pathogenicity, functional tests were performed in the medaka fish (*Oryzias latipes*) model organism.

Results: This study identified, in the analyzed patient, a homozygous missense mutation in the ADAMTS18 gene, which was recently linked to Knobloch syndrome, a rare developmental disorder that affects the eye and the occipital skull. In vivo gene knockdown and rescue assays performed in medaka confirmed the pathogenic role of the mutation identified in the ARRD patient.

Conclusion: This study reveals that mutations in the ADAMTS18 gene can cause a broad phenotypic spectrum of eye disorders and contribute to shed further light on the complexity of ARRD.

TRISOMIA 15 A MOSAICO CONFINATA ALLA PLACENTA IN GRAVIDANZA CON MARCATORE INVdup15 FAMILIARE NON EREDITATO

F.P. Amico¹, D. Bianchi¹, A.M. Oneda¹, E. Ciulla¹, S. Di Maggio¹, G. Nocera¹

¹*S.S. di Citogenetica, S.C. di Ostetricia e Ginecologia, Az. Osp. Fatebenefratelli e Oftalmico, P. O. M. M. Melloni, Univ. Milano*

Uno dei problemi diagnostici nell'analisi cromosomica su prelievo di villi coriali nel primo trimestre di gravidanza è il ritrovamento di una trisomia autosomica a mosaico. Quando l'anomalia non coinvolge i cromosomi 13, 18 e 21, la probabilità che si tratti di un mosaicismo confinato alla placenta (CPM) risulta essere vicina al 100%. Quando l'anomalia coinvolge un cromosoma soggetto ad imprinting genomico è sempre consigliabile escludere la disomia uniparentale. Tale esclusione è consigliabile anche quando uno dei due genitori risulta portatore sano di un marcatore sovranumerario derivativo da un cromosoma soggetto ad imprinting sia che esso venga o non venga ereditato. In entrambi i casi il rischio di disomia uniparentale (UPD) rispetto a quello della popolazione generale risulta aumentato.

Riportiamo un caso di trisomia 15 a mosaico riscontrato in diagnosi prenatale del primo trimestre in una paziente di 40 anni il cui partner risulta portatore sano di un invdup(15)(pterq11). L'analisi diretta su prelievo di villi coriali mostrava un cariotipo maschile normale (46,XY), mentre l'analisi dopo coltura ha messo in evidenza 2 aree di crescita con la trisomia libera del cromosoma 15 (47,XY,+15) e 5 a cariotipo maschile normale (46,XY). Dopo consulenza genetica la coppia decideva di effettuare un controllo su cellule di liquido amniotico. L'analisi cromosomica eseguita su 60 colonie provenienti da 6 colture indipendenti, mostrava un cariotipo maschile normale dimostrando la presenza di un mosaicismo confinato alla placenta ed escludendo un coinvolgimento fetale, mentre l'analisi molecolare dei loci polimorfici permetteva di escludere la disomia uniparentale del cromosoma 15 sia paterna che materna. Anche nelle due precedenti gravidanze il cariotipo fetale risultava anomalo. nella prima per la presenza dell'invdup 15 paterno con esclusione dell'UPD e nella seconda per una trisomia del cromosoma 18.

IDENTIFICAZIONE DI UNA MUTAZIONE IN CHD7 IN UN PAZIENTE ADULTO CON DIAGNOSI CLINICA DI SINDROME DI CHARGE IN ASSENZA DI MALFORMAZIONI CARDIACHE ASSOCIATE

A. Michelucci¹, B. Toschi¹, C. Congregati¹, A. Fogli¹, F. Baldinotti¹, R. Maltomini¹, P. Simi¹

¹*U.O. Laboratorio di Genetica Medica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana*

Riportiamo il caso di un paziente di 50 anni giunto alla nostra osservazione per lieve deficit intellettivo e anomalie malformative. In particolare, nella prima infanzia è stata diagnosticata la presenza di ipoacusia di tipo misto con malformazioni dell'orecchio interno, coloboma corio-retinico e del nervo ottico, ipo-aplasia dei dotti lacrimali. La deambulazione è stata acquisita all'età di 24 mesi. La RM encefalica ha rilevato la presenza di agenesia dei bulbi olfattori e microcrania. La valutazione psichiatrica effettuata in età adulta ha rilevato la presenza di sindrome di Asperger. Il paziente ha effettuato gli studi universitari con laurea in medicina e specializzazione.

Il paziente presenta peculiari note morfologiche faciali inquadrabili nella sindrome di CHARGE.

La Sindrome di CHARGE è una malattia rara con incidenza di circa 1/10.000 nati vivi. Le caratteristiche peculiari sono riassunte nell'acronimo CHARGE: Coloboma, Heart defect (difetti cardiaci), Atresia choanae (atresia delle coane), Retarded growth and development delay (ritardo della crescita e dello sviluppo), Genital anomalies (malformazioni dei genitali), Ear anomalies (malformazioni dell'orecchio).

La trasmissione è autosomica dominante con ampia eterogeneità genotipica. La maggioranza dei casi sono sporadici e circa il 70% dei pazienti presenta mutazioni nel gene CHD7 (8q12.1). Il gene CHD7 codifica per una proteina appartenente alla famiglia dei modificatori dell'organizzazione della cromatina quindi regola l'espressione genica.

Lo studio del gene CHD7 nel paziente giunto alla nostra osservazione è stato condotto mediante DHPLC. E' stata rilevata un'inserzione in eterozigosi di due adenine nell'esone 28 (c.5655_5656insAA, Ensembl Gene ID: ENSG00000171316) che determina la formazione di un precoce codone di stop (p.H1886NfsX). La mutazione non è riportata in letteratura, ma è da considerarsi patogena dato che la proteina prodotta risulterà più corta e funzionalmente meno attiva. Pur in assenza di malformazioni cardiache, questo dato conferma pertanto la diagnosi clinica di CHARGE nel paziente descritto. La diagnosi fatta in età adulta conferma l'ampia eterogeneità genotipica e l'importanza della consulenza genetica per il corretto inquadramento della malattia.

EPIGENETIC ANALYSES IN PATIENTS WITH ALZHEIMER'S DISEASE

F. Coppede¹, P. Tannorella², A. Stoccoro², F. Migheli¹, G. Meli², B. Nacmias³, S. Sorbi³, G. Siciliano⁴, L. Migliore²

¹*Department of Laboratory Medicine, Pisa University Hospital (AOUP), Pisa, Italy*

²*Department of Translational Research and New Technologies in Medicine and Surgery, Division of Medical Genetics, University of Pisa, Pisa, Italy*

³*Department of Neurological and Psychiatric Sciences, University of Florence, Florence, Italy*

⁴*Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Pisa, Pisa, Italy*

The possible contribution of folate metabolism in modulating the methylation profile and the expression of disease-related genes has attracted substantial research in the field of complex diseases, such as Alzheimer's disease (AD), likely resulting from still not well understood gene-environment interactions. Previous data from our group confirmed the literature observations of an impairment in folate metabolism, also referred to as one-carbon metabolism, in AD. Particularly, AD subjects are characterized by hyperhomocysteinemia and by decreased serum folate levels with respect to controls. We also observed that common polymorphisms in genes coding for folate-metabolizing enzymes, including methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR), are associated with circulating levels of folates and might contribute to increased AD risk. Several hypotheses have been formulated linking impaired folate metabolism to AD risk, among them one of the most arguing suggests that it could result in altered DNA methylation and expression of genes involved in disease pathogenesis. We are therefore currently focusing our research interest on epigenetic biomarkers of AD. The analysis of the methylation profiles of several genes, including that coding for the beta-secretase (BACE1) responsible for the production of the beta-amyloid peptide, and genes such as MTHFR and DNA methyltransferases (DNMTs) involved in DNA methylation processes, is ongoing in DNA extracted from peripheral lymphocytes of AD patients and matched controls by means of methylation-sensitive high resolution melting technique. The first gene analysed, BACE1, resulted hypermethylated in all but one subjects. In parallel, we are evaluating the contribution of functional polymorphisms in de novo DNMTs to disease risk as well as their interaction with circulating levels of folates and their contribution to the methylation levels of the selected genes. DNMT3B promoter polymorphisms have been genotyped in almost 700 subjects and allele and genotype frequencies were not different between patients and controls. The analysis of DNMT3A functional polymorphisms is still ongoing. The study will help to better clarify the role of the DNA methylation pathway in AD pathogenesis.

Ricerca di mutazioni in una famiglia ADNFLE

V. Sansoni¹, L. Ferini Strambi², R. Combi¹

¹Dip. di Biotecnologie e Bioscienze, Università di Milano-Bicocca, Milano

²Centro Malattie del Sonno, Università Vita e Salute San Raffaele, Milano

L'epilessia notturna del lobo frontale (NFLE) è un'epilessia focale, con insorgenza nella tarda infanzia, caratterizzata da cluster di crisi originatesi a livello del lobo frontale che provocano manifestazioni motorie prevalentemente notturne. Per tale patologia sono stati riportati sia casi sporadici che casi familiari (in questo caso si parla di ADNFLE, ovvero di NFLE a trasmissione autosomica dominante). In una minoranza (circa 10%) dei pazienti, sono state identificate mutazioni a carico dei geni codificanti per le subunità α -2, α -4 e β -2 (CHRNA2, CHRNA4 e CHRNB2) del recettore nicotinico neuronale per l'acetilcolina. Nell'ambito di un ampio progetto di ricerca delle basi genetiche dell'ADNFLE, è stato raccolto presso il Centro del Sonno dell'ospedale S. Raffaele di Milano, il DNA dei membri di una famiglia composta da quattro fratelli, che da uno studio genetico precedentemente svolto in un altro laboratorio erano risultati tutti portatori di una variante del gene MTHFR, dei quali due (un maschio e una femmina) affetti da ADNFLE. Un ampliamento dell'anamnesi familiare alla generazione precedente e successiva ha mostrato come il padre (attualmente deceduto) fosse affetto da morbo Parkinson e RBD (REM sleep Behavior Disorders), la madre sana, e una delle figlie della donna affetta da ADNFLE presentasse spina bifida in quanto portatrice di due varianti nel gene MTHFR (una ereditata e una de novo). Al fine di identificare le basi molecolari dell'ADNFLE in questa famiglia è stato effettuato il sequenziamento diretto delle porzioni codificanti e delle giunzioni introne-esone dei geni noti (CHRNA2, CHRNA4, CHRNB2, CRH). Tale analisi ha portato all'identificazione di una nuova mutazione missenso nel gene CRH presente in eterozigosi negli individui affetti da ADNFLE e localizzata nella porzione codificante la regione pro della pre-pro proteina. Il gene codifica, infatti, per un pre-pro ormone di 196 aminoacidi, che in seguito a processamento origina un ormone attivo di 41. Attualmente è in corso uno studio funzionale per valutare la presenza di eventuali effetti della mutazione identificata sul corretto processo di maturazione della proteina, considerando il fatto che in letteratura i meccanismi di processamento del CRH non sono ben noti.

FENOTIPI ATIPICI NELLA CENTRAL CORE DISEASE

P. D'Ambrosio¹, O. Paciello², A. Tammaro³, L. Passamano¹, A. Palladino¹, A. Taglia¹, E. Picillo¹, A. Di Martino³, S. Papparella², V. Nigro⁴, L. Politano¹

¹Cardiomiologia e Genetica Medica - Dip. di Medicina Sperimentale - Seconda Università di Napoli, Napoli

²Dip. Medicina Veterinaria - Università di Napoli Federico II, Napoli

³Centro di Biotecnologie per lo Studio dell'Ipertermia Maligna - Az. Osped. Cardarelli, Napoli

⁴Dip. Patologia Generale - Lab. di Genetica Medica - Seconda Università di Napoli, Napoli

La Central core disease (CCD) è una miopatia a trasmissione autosomica dominante, descritta per la prima volta da Shy and Magee, nel 1956. La diagnosi è di solito basata sui reperti della biopsia muscolare che evidenziano aree ben definite prive di mitocondri e di staining per gli enzimi ossidativi, associati ad aspetti caratteristici.

E' noto che la CCD è allelica all'Ipertermia Maligna (MH) e che entrambe le patologie sono causate da mutazioni nel gene della rianodina (RYR1), che codifica per i canali del calcio, facilitandone il rilascio nello spazio filamentoso durante la fase di eccitazione-contrazione.

La CCD può mostrare un ampio spettro di espressione fenotipica, da individui apparentemente normali ad individui con inabilità a deambulare senza appoggio.

In questa sede, riportiamo due esempi di pazienti che presentavano alla biopsia muscolare i caratteristici cores e mutazioni nel gene RYR1, ma un fenotipo atipico. In particolare un paziente con mutazione nota R2508H, presenta un fenotipo sovrapponibile a quello che di solito si osserva nei pazienti con la forma dei cingoli LGMD2B (disferlinopatia) ed un secondo, in cui è stata riscontrata una mutazione mai descritta, A3022D, il cui quadro clinico aveva in prima istanza fatto porre diagnosi di Sindrome Miotonica.

I quadri clinici riportati ampliano lo spettro del fenotipo clinico osservabile nei pazienti con Central Core Disease.

VARIABILITA' DI ESPRESSIONE E PENETRANZA INCOMPLETA NELLE MICRODUPLICAZIONI DELLA REGIONE 16p13

M. Cerutti¹, G. Chiarelli¹, M. Calvello², L. Rovida¹, F. Menni¹, M.F. Bedeschi²

¹*Pediatric Clinic 1, Department of Pathophysiology and Trasplantation, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico*

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

Circa il 5% del genoma umano è costituito da "blocchi" di poche sequenze ripetute con omologia reciproca molto alta (segmental duplication o low copy repeats: LCRs) implicate nel meccanismo di ricombinazione omologa non allelica causato da un appaiamento scorretto. Tali regioni sono più soggette a microdelezioni e/o microduplicazioni correlate in modo non sempre univoco alla genesi di condizioni genetiche note; il braccio corto del cromosoma 16 ne fornisce un esempio essendo ricco di sequenze intracromosomiche LCRs. Mentre in letteratura è ben descritta la microdelezione della regione 16p13.11 associata a disabilità intellettiva, epilessia e/o malformazioni, la duplicazione della stessa regione è meno nota: considerata inizialmente rara variante benigna, è stata in seguito associata a disordini dello spettro autistico, epilessia, deficit dell'attenzione, anomalie strutturali cerebrali, micro/macrocefalia.

All'interno del braccio corto del cromosoma 16 mappano geni implicati nel sistema nervoso centrale (NDE e GRIN2A).

In 2 dei nostri pazienti affetti da anomalie minori del volto, ritardo psicomotorio, iperattività ed epilessia (in uno dei due casi) mediante l'analisi di array CGH è stata evidenziata un'acquisizione di copie di sequenze di DNA rispettivamente a livello della banda p13.11-13.12 e p13.2-13.3 del cromosoma 16. Le medesime alterazioni sono state riscontrate anche nel patrimonio genetico dei genitori. Alla luce delle conoscenze attuali è ragionevolmente possibile in entrambi i casi attribuire una correlazione tra l'alterazione riscontrata al cariotipo molecolare e il quadro clinico basandosi su parametri utili nell'analisi dell'array (contenuto genico della regione coinvolta, soggetti con quadro clinico simile e portatori di alterazione della medesima regione, soggetti portatori della medesima alterazione con differente penetranza nel nucleo familiare). Anche i nostri casi rispondono a tali parametri: è interessante notare come la medesima duplicazione sia infatti riportata in letteratura in soggetti sani, e nello specifico, in genitori di bambini che presentano manifestazioni cliniche.

LABIOPALATOSCHISI ED ESADATTILIA BILATERALE DELLA MANO ASSOCIATE AD UNA DOPPIA DELEZIONE DE NOVO SUL CROMOSOMA 4q32 E 4q34 CHE COINVOLGONO I GENI PDGFC E FBXO8

A. Calcia¹, G. Gai², E. Di Gregorio², F. Talarico², V.G. Naretto², A. Brusco¹, N. Migone¹, E. Grosso²

¹*Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino*

²*SCDU Genetica Medica, Az. Osp. Città della Salute e della Scienza di Torino*

E' giunto alla nostra osservazione un bambino di 4 anni, nato a termine dopo una gravidanza condotta fisiologicamente. Alla nascita presentava labiopalatoschisi bilaterale completa e duplicazione del I dito delle mani, bilaterale, con pollice trifalangeo. L'ecocardiogramma ha evidenziato una minima pervietà del dotto di Botallo; l'esame cromosomico ha mostrato un cariotipo 46,XY. E' riferito ritardo dello sviluppo psicomotorio. La RM encefalica è risultata nella norma. L'esame obiettivo non ha permesso un inquadramento sindromico specifico; i parametri auxologici sono nella norma.

L'array-CGH (60K) ha evidenziato due delezioni distinte (~1 Mb e ~300Kb), entrambe localizzate sul braccio lungo di un cromosoma 4 [arr4q32.1(157.152.567x2, 157.343.163-158.271.008x1, 158.373.371x2), 4q34.1(174.817.531x2, 174.941.276-175.160.361x1, 175.196.885x2)] ed entrambe de novo.

La prima delezione (4q32.1) comprende tre geni, fra i quali PDGFC, codificante per un fattore di crescita per cellule mesenchimali: i topi *Pdgfc* -/- presentano, fra le altre, anomalie scheletriche e schisi facciale, che hanno suggerito il coinvolgimento di questo gene nella palatogenesi. Nel Database of Genomic Variants pazienti con delezioni che comprendono PDGFC non sono riportati avere labiopalatoschisi o esadattilia. Per questo motivo abbiamo cercato, senza trovarle, mutazioni puntiformi nell'allele non deletato.

La seconda delezione (4q34.1) comprende un unico gene, FBXO8 (F-box protein 8) a funzione ignota. Le proteine contenenti F-box entrano a far parte del complesso ubiquitina ligase SCF che regola importanti funzioni cellulari come la sintesi del DNA, la divisione mitotica e i checkpoint di transizione del ciclo cellulare. Dati di letteratura mostrano che le proteine F-box possono essere coinvolte in un'ampia varietà di funzioni organo specifiche; alcune di esse causano anomalie della formazione degli arti in modelli murini (*dactylin*) e malattie umane (*split-hand foot malformation*, gene *SHFM3*).

In assenza di dati funzionali, non è possibile al momento capire se i riarrangiamenti osservati siano causa della patologia: la loro assenza nei genitori del paziente e la natura dei geni coinvolti suggeriscono, tuttavia, cautela nel definire questa associazione come casuale.

Exome sequencing identifies NXF5 gene as a cause of X-linked Familial Focal Segmental Glomerulosclerosis with First-Degree Heart Block

S. Magliocca¹, V. D'Alessio¹, R. Lea³, B. Maher³, D. Moses³, H. Cox³, A. Angius², T. Titus⁴, F. Gianfrancesco¹, L. Griffiths³, T. Esposito¹

¹*Institute of Genetics and Biophysics "Adriano Buzzati-Traverso", National Research Council of Italy, Naples*

²*Institute of Genetic and Biomedical Research, National Research Council of Italy, Cagliari, Italy.*

³*Genomics Research Centre, Griffith Health Institute, Griffith University*

⁴*Gold Hospital Gold Coast, Queensland, 4222, Australia.*

Focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) is characterized by a damage to podocytes, specialized cells of kidney's filtering system (glomeruli). FSGS causes proteinuria and, in the severe cases, it can result in kidney failure. We recruited a large, multigenerational Australian pedigree of 89 individuals in which FSGS co-segregates with first-degree heart block. Since only males exhibit the full form of both disorders, we hypothesized an X-linked recessive inheritance. Of further interest is the occurrence of renal tumours in this family, which has added another element of complexity to understanding the genetic basis of the disease. There have been no reports of any family co-inheriting these disorders, nor has there been a previous report of FSGS transmitted in an X-linked fashion.

Through a combined approach of linkage and haplotype analysis, we found that the disease gene(s) reside in a 21.19 cM interval between the markers DXS8077 and DXS8064. Subsequently, using a whole exome sequencing approach, we identified a mutated gene, Nuclear RNA Export Factor 5 (NXF5), located in the linkage interval and segregating with the disease phenotype in the pedigree. Moreover, the mutation in NXF5 gene (R113W), was absent in the healthy population and predicted to be deleterious by bioinformatics tools. The NXF5 gene belongs to the NXF gene family which shows high similarity for the encoded proteins. Interestingly, the arginine at position 113 is highly conserved along the evolutive scale, implying a causative role. As demonstrated in mice, Nxf7 which is analogous to the human NXF5 gene, has cytoplasmic RNA transport factor properties. It has further been shown that Nxf7 interacts with cytoplasmic microtubules and actin filaments and is involved in cellular motility. So we hypothesized that NXF5 could play a key role in podocyte mobility and molecular cellular transport. Functional studies are ongoing to determine the functional consequence of this novel mutation to development of FSGS and heart block phenotypes.

PRESENZA VARIANTE DEL GENE FGFR1 IN UNA PAZIENTE CON SINDROME DI KALLMANN NON CLASSICA

B. Toschi¹, C. Congregati¹, A. Fogli¹, A. Michelucci¹, F. Baldinotti¹, R. Maltomini¹, P. Simi¹

¹*U.O. Laboratorio di Genetica Medica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana.*

La Sindrome di Kallmann (SK) è data dall'associazione di ipogonadismo ipogonadotropo e anosmia o iposmia. La prevalenza è stimata in 1:8000 maschi e 1:40000 femmine.

Nelle forme familiari sono descritti casi con trasmissione X-linked, autosomica recessiva e autosomica dominante.

Circa il 10% dei pazienti con diagnosi clinica di SK presenta mutazioni nel gene FGFR1. In questo caso la SK è detta di tipo 2 e possono essere associate anomalie e malformazioni, quali labiopalatoschisi, agenesia di uno o più denti, malformazioni delle dita e agenesia del corpo calloso. E' riportata una notevole variabilità clinica e una penetranza incompleta.

Riportiamo il caso di una paziente giunta alla nostra osservazione per pubertà ritardata associata a malformazioni multiple. In particolare sono presenti anomalie a carico della mani e dei piedi, labiopalatoschisi e agenesia dei denti. La RM encefalica ha mostrato l'assenza parziale del corpo calloso e anomalie della girazione della corteccia fronto-basale con difficile visualizzazione dei bulbi olfattori. Il test di stimolazione al GnRH ha rilevato bassi valori di LH e FSH, ma non chiaramente inquadrabili in un ipogonadismo ipogonadotropo. Il cariotipo è risultato normale.

La storia familiare è risultata negativa per malformazioni e condizioni su base genetica nota. L'analisi mediante sequenziamento del gene FGFR1 ha fatto rilevare la presenza nell'esone 14 della variante c.1883A>G in eterozigosi (NCBI Ref. Seq. NM_023110.2), che determina la sostituzione di un residuo di asparagina con una serina (p.N628S; NCBI Ref. Seq. NP_075598.2).

Tale sostituzione non è presente nei genitori della paziente, non è riportata in letteratura ed è localizzata a livello di un residuo aminoacidico altamente conservato negli eucarioti. Inoltre, l'analisi mediante il programma PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) classifica la sostituzione aminoacidica come altamente patogenetica per la struttura e la funzione della proteina.

Allo scopo di escludere la possibilità di una ereditarietà digenica della patologia è in corso la ricerca di mutazioni nei geni PROK2, PROKR2 e CHD7, anch'essi coinvolti nella SK. Il fenotipo della paziente sarà discusso in base ai risultati ottenuti.

C16orf57: DAL RUOLO CAUSATIVO NELLA SINDROME RARA POICHILODERMA CON NEUTROPENIA AL POSSIBILE COINVOLGIMENTO NELL'EZILOGIA DELLE SINDROMI MIELODISPLASTICHE ACQUISITE

G. Negri¹, B. Crescenzi², E.A. Colombo¹, C. Mecucci², L. Larizza¹

¹*Genetica Medica, Dip. di Scienze della Salute, Università degli Studi di Milano, Milano*

²*Ematologia, Osp. S. Maria della Misericordia, Università degli Studi di Perugia, Perugia*

La sindrome Poichiloderma con Neutropenia (PN; OMIM#604173) è una rara genodermatosi autosomica recessiva caratterizzata da poichiloderma, neutropenia grave non ciclica ed alterazioni midollari che predispongono a sindrome mielodisplastica (MDS) che può evolvere in leucemia mieloide acuta (AML). Data la vulnerabilità del comparto ematopoietico in individui con mutazioni germinali del gene C16orf57, quest'ultimo si presenta come potenziale candidato a contribuire all'eziologia delle mielodisplasie acquisite attraverso difetti della sua funzione di regolazione dello splicing.

In questo lavoro è stato analizzato il gene C16orf57 in una casistica consecutiva, finemente caratterizzata a livello clinico e citogenetico, di 111 campioni midollari di pazienti con diversi sottotipi di MDS, neoplasmi mielodisplastici/mieloproliferativi (MDS/MPN), AML, neutropenia acquisita e MDS che si è evoluta da neutropenia.

In tutto, sono state identificate tre variazioni puntiformi non riportate: i) c.-56A>G nella 5' UTR presente in eterozigosi in una paziente con RCMD e trisomia del cromosoma 8, ii) c.450-67dupT nell'IVS3 in eterozigosi in due pazienti con REAB2 e del5q e iii) c.587+21A>G nell'IVS4 in eterozigosi in una paziente con MDS/MPN ed in uno con RAEB1, entrambi con cariotipo normale. L'analisi del DNA estratto da un tessuto non tumorale di questi pazienti ha rivelato che tutte le varianti sono germline.

Per valutare se le variazioni c.-56A>G e c.587+21A>G siano mutazioni o varianti di suscettibilità, è stato analizzato un numero pari di controlli mediante RFLP. Tutti sono risultati omozigoti per l'allele A della c.-56A>G mentre la c.587+21A>G è stata identificata in eterozigosi anche in un controllo, suggerendo che sia un raro polimorfismo.

Questo studio, seppur preliminare, rappresenta la prima esplorazione circa il coinvolgimento di C16orf57 nell'eziologia delle MDS. La casistica andrà ulteriormente ampliata in quanto, nonostante ad oggi non si siano identificate varianti dal chiaro significato causativo, non si può escludere il ruolo di C16orf57 in un ristretto numero di casi, oppure in un particolare sottotipo di MDS. Verranno anche saggiati campioni di MDS/AML di tipo pediatrico più simili per età di insorgenza ai pazienti PN.

THE CHROMOSOME 17Q21.31 DELETION SYNDROME IS A MONOGENIC DISORDER CAUSED BY HAPLOINSUFFICIENCY OF KANSL1: GENOTYPE-PHENOTYPE CORRELATIONS IN PATIENTS WITH CHROMOSOME DELETION AND KANSL1 MUTATION

G. Marangi¹, M. Zollino¹, D. Orteschi¹, M. Murdolo¹, E. Mercuri², D. Battaglia², G. Zampino³, G. Scarano⁴, M. Priolo⁵, H. Feret⁶, G. Neri¹, E. Zackai⁶

¹*Istituto di Genetica Medica, Università Cattolica Sacro Cuore, Pol. "A. Gemelli", Roma*

²*Istituto di Neuropsichiatria Infantile, Università Cattolica Sacro Cuore, Pol. "A. Gemelli", Roma*

³*Istituto di Pediatria, Università Cattolica Sacro Cuore, Pol. "A. Gemelli", Roma*

⁴*Genetica Medica, A. O. "G. Rummo", Benevento*

⁵*A.O. Bianchi-Melacrino-Morelli, Reggio Calabria*

⁶*Division of Human Genetics, Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia PA, USA*

The chromosome 17q21.31 deletion syndrome is one of the most frequent genomic disorders, with estimated prevalence of 1 in 16000 individuals of European ancestry. First described in 2006, about sixty cases have been reported so far. Clinically, it is characterized by highly distinctive facial features, moderate to severe intellectual disability, hypotonia and friendly behavior. Other important clinical manifestations include epilepsy, heart defects and kidney anomalies. Cytogenetically, it is usually associated to a recurrent 500-650 kb deletion on chromosome 17q21.31, with breakpoints mapping to large clusters of flanking low copy repeats. Following the observation by independent clinicians of some non-deleted patients presenting with a comparable phenotype, loss-of-function mutations in KANSL1 (KIAA1267) residing within the critically deleted interval were recently reported to cause a full del(17q21.31) phenotype, proving that chromosome 17q21.31 deletion syndrome is a monogenic disorder caused by haploinsufficiency of KANSL1. Questions to be still addressed are 1) relative frequency of gene mutations with respect to chromosome deletions, 2) whether gene mutations are associated to a milder phenotype and 3) whether knowledge of the major causal gene will broaden the diagnostic spectrum of the 17q21.31 deletion syndrome. Through a collaborative study with the Division of Human Genetics at the Children's Hospital of Philadelphia, we analyzed a total of 20 individuals with 17q21.31 deletion syndrome phenotype. Of them, 15 had the recurrent 500-650 kb chromosome deletion and one a 1.4 Mb deletion on 17q21.31, and 4 had KANSL1 mutations. Some additional non-deleted patients were enrolled in the genetic test on clinical suggestions. All but two of the present subjects were never reported before. This report represents the first attempt to achieve consistent genotype-phenotype correlations in the distinct groups of subjects with chromosome 17q21.31 deletion or KANSL1 mutation.

MINIGENE GATEWAY: UNO STRUMENTO PER CARATTERIZZARE VELOCEMENTE LE MUTAZIONI DI SPLICING

G. Giorgi¹, L. Salviati¹, M. Clementi¹

¹*Laboratorio Genetica Clinica ed Epidemiologica, Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino*

Negli ultimi anni hanno sempre ottenuto maggiore attenzione mutazioni a ridosso della fine/inizio degli esoni/ introni. Queste mutazioni possono disturbare il corretto

splicing e quindi produrre una proteina alterata con funzione limitata o assente. Investigare se una mutazione possa essere o meno causa di uno splicing alterato non è spesso agevole. Infatti l'RNA del paziente spesso non è disponibile per motivi "logistici" o perchè il gene ha un pattern di espressione tessuto specifico. Sebbene esistano molti software per la predizione delle conseguenze di queste mutazioni, questi programmi ipotizzano, attraverso algoritmi più o meno complessi, la percentuale di patogenicità della mutazione ma non danno la certezza assoluta del risultato. Disporre di un sistema semplice per lo studio delle alterazioni dello splicing è sempre più importante per potere fornire un'adeguata consulenza ai pazienti.

Un metodo affidabile per caratterizzare le mutazioni di splicing è l'utilizzo di minigeni ibridi. Il minigene è un sistema formato da un plasmide per l'espressione in cellule umane con clonato all'interno un piccolo gene (nel nostro caso la β -globina) o un suo frammento. In esso viene clonato il frammento di DNA genomico con la mutazione in esame formando così un gene ibrido. Dopo trasfezione su linee cellulari umane si osservano le eventuali differenze nello splicing tra plasmide mutato e Wild Type. Questo metodo presenta però delle difficoltà tecniche che allungano di molto l'analisi. Spesso il clonaggio non è agevole per la mancanza di siti di restrizione adeguati, soprattutto nel caso di frammenti di grandi dimensioni. Per ovviare a questo si è adattato il nostro minigene β -globina al sistema Gateway (Invitrogen) che

permette un veloce clonaggio dell'inserto. Si è inserito all'interno dell'introne 2 del gene β -globina la cassetta che permette, attraverso una reazione di ricombinazione, il trasferimento del DNA al minigene senza l'utilizzo di enzimi di restrizione o DNA ligasi.

Con questo sistema sono state analizzate mutazioni sul gene NF1, ASL, STK11 e CFTR.

Si è potuto analizzare e confermare presunte mutazioni di splicing diminuendo notevolmente i tempi di analisi.

STUDIO DI ASSOCIAZIONE CASO-CONTROLLO DI GENI CANDIDATI IN ASMA, RINITE E BPCO

A.R. Lo Presti¹, F. Belpinati¹, S. Accordini², A. Baldan¹, M. Ferrari³, G. Malerba¹, E. Zanolin², P.F. Pignatti¹, R. De Marco², C. Bombieri¹

¹*Dipartimento di Scienze della Vita e della Riproduzione, Sezione di Biologia Genetica, Università di Verona*

²*Dipartimento di Sanità Pubblica e Medicina di Comunità, Sezione di Epidemiologia e Statistica Medica, Università di Verona*

³*Dipartimento di Medicina, Sezione di Medicina Interna, Università di Verona*

L'Asma, la Rinite e la Bronco-Pneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) sono malattie complesse ed eterogenee derivate dall'interazione di fattori genetici ed ambientali. Diversi geni, ciascuno con un piccolo effetto, sono verosimilmente coinvolti nello sviluppo di queste malattie e possono contribuire alla variabilità del fenotipo in relazione all'esposizione ambientale. Scopo del lavoro è l'identificazione di geni di suscettibilità ad Asma, Rinite e BPCO e geni che possono essere comuni alle tre patologie.

Un pannello di 384 "Tag-SNP", rappresentative di 69 geni candidati coinvolti in processi biologici potenzialmente correlati con le patologie oggetto dello studio, è stato analizzato con il sistema di genotipizzazione multipla GoldenGate (Illumina). L'analisi è stata condotta su un totale di 1000 soggetti, comprendenti soggetti affetti da Asma, Rinite e BPCO (casi) e soggetti non affetti da malattie infiammatorie delle vie aeree (controlli) di età compresa tra i 20 e i 64 anni, reclutati dalla popolazione generale Veneta nel corso del progetto GEIRD (Gene Environment Interaction Respiratory Diseases).

È stato effettuato uno studio di associazione a singolo locus e a loci multipli per valutare l'associazione con i seguenti fenotipi: asma corrente, asma passato, asma totale, asma atopico corrente, rinite allergica e non allergica, rinite totale, e presenza di bronchite cronica.

Una associazione statisticamente significativa (p non corretto $<0,01$) è stata osservata fra i geni IL-13 e TIM1 e l'asma passato, i geni SPINK-5 e PDE4D e la rinite non atopica, i geni TNS1, LTA e GPR154 e la presenza di bronchite cronica, SERPINE2 e l'asma atopico corrente. Dopo correzione di Bonferroni per test multipli, solo la SNP rs1862439 del gene SPINK5 rimane statisticamente significativa ($p=0,02415$). Dallo studio è emersa anche la presenza di associazione di polimorfismi nel gene IL1RL-2 con più fenotipi (asma totale, asma corrente, asma atopico corrente, presenza di bronchite cronica, rinite allergica, rinite non allergica, e rinite totale).

La raccolta dei campioni sta proseguendo a livello nazionale allo scopo di ampliare la coorte di soggetti. L'analisi su un campione più ampio è, infatti, necessaria per poter confermare i risultati ottenuti.

IDENTIFICATION OF A 22 miRNA SIGNATURE DISTINGUISHING HIGH GRADE FROM LOW GRADE GLIOMAS

O. PALUMBO¹, B. RAFFAELA², B. PASCULLI², R. STALLONE¹, M. COCO², T. BALSAMO², V. D'ANGELO³, M. COPETTI⁴, M. CARELLA¹, V.M. FAZIO², P. PARRELLA²

¹Laboratory of Medical Genetics, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG), Italy

²Laboratory of Oncology, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG), Italy

³Department of Neurosurgery, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG), Italy

⁴Unit of Biostatistic, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG), Italy

Gliomas account for approximately 70% of malignant primary brain tumors diagnosed in adults and are classified, by a system developed by the World Health Organization (WHO), in High Grade Gliomas (HGGs, WHO grade III and IV) and Low Grade Gliomas (LGGs, WHO I and II), according to their morphological resemblance to the respective glial cell types, cytoarchitecture and immunohistological marker profile. While LGGs are characterized by an overall good prognosis, HGGs, mainly glioblastoma multiforme (GBM), are characterized by a median survival of 14 months. In the last years, microRNAs (miRNAs) have emerged as new molecular players involved in cancer pathogenesis, acting as oncogenes or tumor suppressors, and abnormalities in miRNAs expression could also involve resistance to radio-chemotherapy. In order to identify miRNAs differentially expressed in gliomas, we performed a miRNAs expression profiling by using the GeneChip miRNA Array 1.0 (Affymetrix) on a training set of 8 LGGs, 24 HGGs and 4 normal brain tissues commercially available. Data analysis was performed by using Partek Genomic Suite software setting a significative p-value ≤ 0.01 and a fold change cutoff of 2. Following this approach, we identified differential expression of: 60 miRNAs in LG and HG versus normal brain tissues; 80 miRNAs in LG versus normal; 71 miRNAs in HG versus normal. A panel of 22 miRNAs was able to distinguish high grade gliomas from low grade tumors. We are currently validating this signature by qRT-PCR on an independent cohort of 40 low grade and 133 high grade gliomas.

DEFICIT DI PAPP-A IN GRAVIDANZA, FENOTIPO CORNELIA DE LANGE E RIARRANGIAMENTO GENOMICO DA TRASLOCAZIONE RECIPROCA

V.G. Naretto¹, A. Sciarrone², V. Guaraldo³, E. Di Gregorio¹, G. Botta⁴, S. Russo⁵, A. Carbone¹, E. Colombo¹, A. Brusco⁶, E. Viora², N. Migone⁶, E. Grosso¹

¹SCDU Genetica Medica, Az. Osp. Città della Salute e della Scienza di Torino

²Dip. di Ostetricia e Neonatologia, Centro di Ecografia e Diagnosi Prenatale, Az. Osp. Città della Salute e della Scienza di Torino

³SS Screening Anomalie cromosomiche, Az. Osp. Città della Salute e della Scienza di Torino

⁴SC Anatomia Patologica, Az. Osp. Città della Salute e della Scienza di Torino

⁵Lab. Genetica molecolare, Istituto Auxologico Italiano, Milano

⁶Dipartimento di Scienze Mediche, Università di Torino

Presentiamo il caso di una coppia che ha presentato alla terza gravidanza bassi livelli di PAPP-A nel siero materno (0.06 MoM), con un test di screening negativo per Sindrome di Down (1/1.400).

La gravidanza è stata interrotta per il riscontro ecografico di grave iposviluppo (valori biometrici <5° centile a 17 settimane), profilo fetale con sporgenza del labbro superiore, micrognazia, edema prefrontale e dei tessuti molli retronucali, cardiomegalia con DIV perimembranoso in malallineamento, dismorfismo della fossa cranica ed iperecogenicità intestinale.

L'esame autoptico ha confermato la presenza di iposviluppo, ipognazia, arcata sopraccigliare marcata e fusa sulla linea mediana, edema in sede retronucleare, piedi a dondolo, arti raccorciati, ipoplasia timica, difetto interventricolare, polmoni ipoplasici, circonvoluzioni encefaliche appiattite ed emorragia a livello della fossa cranica posteriore con cervelletto ipoplasico e dilatazione del IV ventricolo, confermando l'ipotesi diagnostica di sindrome di Cornelia de Lange.

La prime due gravidanze della coppia erano terminate rispettivamente con la nascita di un maschio sano e con un'interruzione spontanea a 12 settimane (idrope posteriore ed area iperecogena a carico della parete addominale anteriore riferibile ad onfalocele).

Il cariotipo standard è risultato 46,XX. La ricerca di alterazioni di sequenza e duplicazioni/delezioni di NIPBL e SMC1, dell'ipometilazione di H19 e della disomia uniparentale del cromosoma 7 sono risultate negative. L'array-CGH (60K) ha evidenziato la duplicazione terminale del cromosoma 3q e delezione terminale del cromosoma 15q [arr3q27.1q29 (184.369.685x2, 184.428.168-197-840.339x3), 15q26.1q26.3 (90.814.328x2, 90.857.664-102.383.473x1)]. Casi di fenotipo Cornelia de Lange associati a duplicazione parziale 3q sono già stati descritti in Letteratura.

L'analisi FISH dei genitori ha mostrato nel padre una traslocazione reciproca, non visibile al bandeggio G, tra la regione subtelomerica 3q e la regione subtelomerica 15q.

Questo caso sottolinea l'importanza di una valutazione accurata della crescita e dell'anatomia fetale in tutti i casi di ridotti valori di PAPP-A e fornisce un ulteriore esempio di associazione fra deficit di PAPP-A e fenotipo Cornelia de Lange.

SEVERELY IMPAIRED RESPIRATORY CHAIN CAUSES MULTISYSTEM APOPTOSIS-DRIVEN DEVELOPMENTAL DEFECTS, A NEW MITOCHONDRIAL PHENOTYPE IN VERTEBRATES

A. Indrieri¹, V. van Rahden², V. Tiranti³, I. Conte¹, J. Quartararo⁴, M. Morleo¹, D. Iaconis¹, R. Tammaro¹, G. Chesi¹, M. Cermola⁵, R. Tatè⁵, I. Maystadt⁶, S. Demuth⁷, A. Zvulunov⁸, I. D'Amato³, P. Goffrini⁴, I. Ferrero⁴, P. Bovolenta⁹, K. Kutsche², M. Zeviani³, B. Franco¹⁰

¹*Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Napoli*

²*Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany*

³*UO Neurogenetica Molecolare, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico "C. Besta", Milano*

⁴*Dip di Genetica, Biologia dei Microrganismi, Antropologia, Evoluzione, Università degli Studi di Parma, Parma*

⁵*Microscopia Integrata, Istituto di Genetica e Biofisica "Adriano Buzzati Traverso", CNR, Napoli*

⁶*Centre de Genetique Humaine, Institut de Pathologie et de Genetique, Gosselies (Charleroi), Belgium*

⁷*Gemeinschaftspraxis für Humangenetik, Erfurt, Germany;*

⁸*Schneider Children's Medical Center of Israel, Ben-Gurion University of the Negev, Beer-Sheva, Israel*

⁹*Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC-UAM and CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain*

¹⁰*Telethon Institute of Genetics and Medicine (TIGEM), Napoli, Dip di Pediatria, Università degli Studi di Napoli "Federico II", Napoli.*

Mitochondrial-dependent programmed cell death (PCD), plays an essential homeostatic role, by selecting bioenergetically proficient cells suitable for normal tissue and organ development. Despite intensive investigation, the impact of this crucial process in human diseases remains mechanistically undefined. In particular, the link between apoptosis and mitochondrial disorders, i.e. primary defects of oxidative phosphorylation, has not been persuasively demonstrated. Nevertheless, a clearly developmental phenotype, Microphthalmia with Linear Skin lesions syndrome (MLS), is associated with mutations in HCCS, the X-linked gene encoding Holo-Cytochrome c-type synthase, which incorporates the heme-c moieties in the mitochondrial respiratory chain (MRC). To gain insight on MLS syndrome, we first showed that, similar to MLS patients, hccs knockdown results in central nervous system (CNS) abnormalities in medakafish. Next, we demonstrated that these defects are caused by increased PCD via apoptosome-independent caspase-9 activation, triggered by MRC impairment and overproduction of reactive oxygen species. Based on these results, we then screened other X-linked MRC-related genes in HCCS-negative MLS patients, and found deleterious mutations in COX7B, encoding a structural subunit of cytochrome c oxidase (COX). Finally, we demonstrated that COX7B is indispensable for COX assembly, COX activity, mitochondrial respiration and CNS development. These data indicate an essential role for MRC in organogenesis and define a new group of mitochondrial diseases hallmarked by apoptosis-driven abnormal development.

STUDIO DI ASSOCIAZIONE DI UN SNP DEL GENE IL33 CON L'ASMA OCCUPAZIONALE NEI PANIFICATORI

F. Belpinati¹, G. Malerba¹, A.R. Lo Presti¹, L. Xumerle¹, C.A. Biscardo², C. Bombieri¹, M. Olivieri², P.F. Pignatti¹

¹Sezione di Biologia e Genetica, DSVR, Università di Verona

²Medicina del Lavoro, Ospedale Policlinico "G. Rossi", Università di Verona

In un recente studio su famiglie con bambini asmatici abbiamo confermato l'associazione di marcatori nella regione del cromosoma 9 fiancheggiante il gene IL33 con l'asma allergico infantile. Precedentemente due studi GWAS indipendenti hanno descritto l'associazione di SNP sulla stessa regione del cromosoma 9 con asma.

In questo lavoro abbiamo studiato un gruppo di 70 panificatori non imparentati caratterizzati per patologie correlate alla esposizione sul luogo di lavoro. Tutti i soggetti hanno risposto ad un questionario standardizzato e sono stati sottoposti ad una serie di esami clinici.

Abbiamo quindi verificato la presenza di associazione di SNP che si trovano nella regione del gene IL33 con fenotipi legati all'asma occupazionale nei 70 panificatori. I fenotipi studiati sono: asma occupazionale (28/70 affetti), costrizione al torace al lavoro (16/70 positivi), respiro corto al lavoro (26/70 positivi), sibili al lavoro (26/70 positivi), tosse al lavoro (21/70 positivi), e attacchi d'asma in passato (14/70 positivi).

La selezione degli SNP è stata effettuata con il supporto del software GEVALT. Dieci tag-SNP (rs1342326, rs3939286, rs928413, rs10975498, rs2006682, rs10815388, rs7019575, rs10975516, rs1330383, rs1200049), che catturano il 96,12% della variabilità genetica di questa regione cromosomica nei Caucasoidi del database HAPMAP, sono stati genotipizzati con la tecnica di genotipizzazione multipla ad alto rendimento GoldenGate (Illumina).

Le associazioni tra genotipi e fenotipo sono state valutate con tabelle di contingenza e test del X².

I risultati preliminari indicano l'associazione dei marcatori rs10815388 ($p=0.0015$; OR=4,103), rs7019575 ($p=0.0099$, OR=2,98) ed rs10975516 ($p=0.010$, OR=0,293) con un solo fenotipo, "attacchi d'asma in passato". L'asma occupazionale non ha mostrato alcuna associazione con i marcatori utilizzati.

Il campione sarà presto esteso a circa 80 individui. Verrà inoltre eseguita una analisi sugli aplotipi per valutare se le associazioni osservate possano appartenere ad un determinato sottogruppo di individui.

In conclusione, i risultati preliminari indicano che la regione del gene IL33, già descritta come associata all'asma infantile, non presenta alcuna associazione con l'asma occupazionale nei panificatori.

NO FUNCTIONAL CYP27B1 VARIANTS IN ITALIAN MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS

N. Barizzone¹, B. Luciano¹, A. Bagarotti¹, F.R.G. Guerini², A. Salviati³, A. Di Sapio⁴, P. Cavalla⁵, M. Leone⁸, S. D'Alfonso¹

¹Department of Health Sciences, University of Eastern Piedmont, Novara, Italy

²Fondazione Don C. Gnocchi ONLUS I.R.C.C.S. S. Maria Nascente, Milan, Italy

³Department of Neurological, Neuropsychological, Morphological and Motor Sciences University of Verona

⁴Neurologia 2 -CRESM, AOU San Luigi, Orbassano (Torino), Italy

⁵MS Center, Department of Neuroscience, AOU S. Giovanni Battista & University of Turin, Torino, Italy

⁶Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD)

⁷SCDU Neurology, AOU "Maggiore della Carità", Novara, Italy

⁸Interdisciplinary Research Center of Autoimmune Diseases (IRCAD),SCDU Neurology, AOU "Maggiore della Carità", Novara, Italy

This study originated from a recent paper published by Ramagopalan (Ann Neurol 2011) reporting the association of rare, functional variants in CYP27B1 gene with the susceptibility to Multiple Sclerosis (MS) in a Canadian sample set. CYP27B1 encodes for the 1-alpha-hydroxylase enzyme, which converts a vitamin D precursor into vitamin D active form. Vitamin D acts as a regulator on many MS susceptibility genes, and vitamin D serum levels are thought to influence MS susceptibility because a) MS incidence increases with latitude and the latitude gradient correlates inversely with UV radiation exposure, the major determinant of vitamin D levels; b) CYP27B1 region has been previously associated with MS in a large GWAS; c) comorbidity between MS and VDDR1, a rare monogenic disease due to CYP27B1 mutations, has been reported in three cases. For all these reasons we decided to search for MS related CYP27B1 mutations in the Italian population.

We sequenced the complete coding sequence (exons 1-9), all intron/exon junctions, the 5' UTR and 370bp of the 3'UTR of CYP27B1 gene in 134 unrelated MS patients belonging to Italian MS multiplex families. We observed only five novel variants in CYP27B1 non coding regions, so far unreported on public databases, with no functional evidence according to in silico prediction: one in the 5'UTR (c.1-117G>A) one in the 3'UTR (c.*100A>G), one in intron 2 (c.386+128G>A), and two variations in intron 7 (c.1216-37G>A and c.1216-93C>T). All the variants were observed in heterozygosity and in one-two patient each. Moreover, R389H(rs118204009), the most common CYP27B1 missense variant reported by Ramagopalan, showing the strongest MS association in the Canadian population, has been genotyped in a large Italian set of 1692 additional MS patients and of 989 geographically-matched controls with a Taqman assay. We did not observe the mutant allele in any of the tested individuals.

Based on the odds ratio (OR) reported by Ramagopalan. (OR = 4.7) for CYP27B1 rare variants, our sample size (1826 MS patients and 989 controls) had 99.7% power to demonstrate association at the 5% significance level. In summary, our data do not confirm the pathogenetic role of CYP27B1 functional mutations in MS susceptibility in the Italian population.

Exome sequencing approach identifies MYH7B and ITGA7 genes as genetic causes of a rare form of congenital myopathy (CFTD) associated with left ventricular noncompaction (LVNC) cardiomyopathy

D. Formicola¹, F. Napolitano¹, M. Simonetti², O. Farina², F. Cipullo², S. Sampaolo², F. Gianfrancesco¹, G. Di Iorio², T. Esposito¹

¹*Istituto di Genetica e Biofisica, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Napoli*

²*Dipartimento di Scienze Neurologiche, Seconda Università di Napoli, Napoli*

In an Italian family we report a clinical condition, never described before, characterized by Congenital Fiber Type Disproportion (CFTD) associated with left ventricular noncompaction (LVNC) cardiomyopathy. The LVNC phenotype shows autosomal dominant mode of transmission with high phenotype variability; while CFTD, showing a recessive mode of transmission, is reported only by the propositus. Consanguinity is reported in the family.

We performed whole exome sequencing approach, of three samples of the family, combined with a dominant model of analysis to identify the LVNC mutated gene and a recessive model of analysis to identify the CFTD gene.

The dominant model for LVNC identified a homozygous mutation c.2668 C>T in exon 27 of the myosin heavy chain 7B (MYH7B) gene, causing an arginine to cysteine amino acid change (R890C). This mutation, segregating with disease phenotype, was predicted to be deleterious by bioinformatics tools and was not found in 600 samples from healthy population, implying a causative role. Evolutionary conservation analysis shows that the arginine at position 890 is highly conserved in all species. To confirm the genetic implication of this mutation in LVNC phenotype, we analysed a cohort of 24 unrelated LVNC patients. One of them showed the R890C mutation. The MYH7B gene, expressed in the adult human heart, belongs to the MYH gene family which, in humans, also includes MYH7 gene, already reported as NCC causing gene. This is the first evidence that mutation in MYH7B gene cause cardiomyopathy.

The recessive model of analysis for CFTD identified a novel homozygous missense mutation c.2656 G>A in the Integrin alpha 7 (ITGA7) gene causing an E886K amino acid change. This mutation was not found in control population, segregating with CFTD phenotype, was predicted to be deleterious by bioinformatics tools and is highly conserved in all species. Alpha7B integrin binds laminin within the plasma membrane forming an important support of structural and functional stability within the skeletal muscle. Functional studies of these two genes are ongoing to support their role as CFTD/LVNC causing genes.

NOTCH1 MUTATION ANALYSIS IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA (CLL)

G. Pira¹, M. Monne¹, A. Uras¹, M. Murineddu¹, A.D. Palmas¹, G. Piras¹, G. Latte¹

¹*Laboratorio Specialistico Ematologia, UOC Ematologia, Osp. San Francesco ASL Nuoro*

Introduction

Chronic lymphocytic leukaemia (CLL) is a heterogeneous disease with a highly variable clinical course from indolent to aggressive. Clinical and biologic features predict the clinical course and guide treatment decisions.

Recently it has been demonstrated that activating mutations of the NOTCH1 proto-oncogene occur in about 10% CLL and emerge as an independent predictor of poor prognosis.

Here we report a retrospective analysis of one single recurrent NOTCH1 mutation (c.7544_7545delCT), that accounts for 80% of all NOTCH1 mutations, with a simple and rapid PCR approach in a cohort of CLL patients.

Methods

Eighty-seven DNA samples from CLL patients (M=53, F=34, age range 32-85yo) were tested for the NOTCH1 mutation using ARMS-PCR approach as described by Del Giudice et al. (Haematologica, 97:437, 2012).

CLL patients were stratified according to genetic risk subgroups: 11% (9/87) had TP53 deletion, ATM/11q23 deletion was present in the 5% (4/87) of patients, 17% (14/87) had trisomy 12, deletion 13q was present in the 34% of cases. Five "FISH negative" patients had abnormal karyotypes when blood samples were cultured in presence of CpG-oligonucleotide/DSP30/IL2. IGVH mutational status was analyzed in 59 CLL samples and unmutated status was present in the 56% of cases.

Results

NOTCH1 c.7544_7545delCT mutation was detected in 7 CLL patients (8%). Three patients presented with trisomy 12 and unmutated IGVH status. Four NOTCH1 mutated CLLs exhibited a normal four-probe FISH pattern and normal karyotype. NOTCH1 mutation was present in the 21% of the CLL with trisomy 12.

Conclusions

Results of NOTCH1 mutation analysis allowed to:

- define the distribution of the NOTCH1 c.7544_7545delCT among CLL genetic subgroups showing association with trisomy 12 as reported in literature;
- identify a CLL subgroup with no other genetic prognostic factors that might have adverse prognosis.

DETECTION OF A SINGLE GENE DELETION IN 9q34.3 USING HIGH-RESOLUTION SNP ARRAY TECHNOLOGY

O. PALUMBO¹, P. PALUMBO¹, M. Delvecchio³, T. Palladino¹, R. Stallone¹, M. Miroballo¹, L. ZELANTE¹, M. CARELLA¹

¹*Medical Genetics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG), Italy*

²*Department of Biology, University of Bari, Bari, Italy*

³*Pediatrics Unit, IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza, San Giovanni Rotondo (FG), Italy*

Molecular karyotyping by microarray has provided significant improvement in the diagnosis of conditions resulting from chromosome abnormalities through detection of submicroscopic pathogenic copy number changes (CNCs). It is therefore now widely recommended that array-based technology should be used as a "first tier" test in the evaluation of individuals with intellectual disability, developmental delay, multiple congenital anomalies, and autism spectrum disorders. With few exceptions, the chromosome abnormalities detected by conventional microscopic analysis contain many genes among which one or more cause phenotypic abnormality through dominant mechanisms, including haploinsufficiency and over expression. The diagnostic use of high-resolution microarrays for molecular karyotyping has extended the limit of resolution for detection of CNCs down to 1–2 kb. Microarrays with high genic/exonic probe coverage can detect CNCs at the single gene or even exon level. Here, we describe a girl with psychomotor retardations, speech delay, hyporeflexia, conductive hearing loss, strabismus and hypermetropia. Using high resolution SNP-Array technology (Affymetrix CytoScan HD Array), we identified in this patient a small interstitial microdeletion, approximately 125 kb, involving part of EHMT1, a gene whose protein product is a histone H3 Lys 9 (H3-K9) methyltransferase. Haploinsufficiency of the EHMT1 gene has been demonstrated to be responsible for the 9q subtelomeric deletion syndrome (9qSTDS), clinically characterized by mental retardation, childhood hypotonia and a characteristic facial features. In addition, congenital heart and renal defects, microcephaly, epilepsy, obesity and behavioral problems are frequently present. The example of pathogenic copy number change described here, emphasize the value of using high-resolution microarray analysis in the clinical diagnosis. This diagnose has been made without an indicative family history through detection of a cryptic deletion in 9q34.3 chromosomal region. The recognition of the high-recurrence risk associated with diagnosis of a monogenic disorder is of obvious importance for genetic counseling.