

**ID: 178**

**Area di Laboratorio**

*Tipo di presentazione: Poster*

**Utilità della conferma dei risultati di 1° livello in previsione della caratterizzazione molecolare per i difetti dell'emoglobina.**

**Adriana Guastini<sup>1</sup>, Giovanni Ivaldi<sup>2</sup>, Leonardo Rizzi<sup>3</sup>, Fabiano Santoni<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Ospedale San Jacopo - USL Centro Toscana, SOS Patologia Clinica, Italia; <sup>2</sup>Ospedali Galiera Laboratorio Genetica Umana Genova, Italia; <sup>3</sup>Ospedale San Jacopo - USL Centro Toscana, SOS Patologia Clinica, Italia; <sup>4</sup>Ospedale San Jacopo - USL Centro Toscana, SOS Patologia Clinica, Italia; [adriana.guastini@uslcentro.toscana.it](mailto:adriana.guastini@uslcentro.toscana.it)

Utilità della conferma dei risultati di 1° livello in previsione della caratterizzazione molecolare per i difetti dell'emoglobina.

Background: l'HPLC è una tecnica utilizzata da alcuni decenni per la determinazione quali-quantitativa di 1° livello degli assetti emoglobinici, così come l'elettroforesi e la sua evoluzione capillare (CE). Non tutte le varianti possono essere discriminate o lo possono essere in modo diverso dai due metodi. Riportiamo due varianti (HbSudbury e HbI) che coeluiscono con HbF in HPLC e vengono chiaramente risolte in elettroforesi capillare.

Metodi: due campioni di sangue sono stati analizzati in HPLC con Bio-Rad Variant II ( HbA2/HbA1c dual program) ed in elettroforesi capillare utilizzando Capillarys 3 Tera (Capi3 Hemoglobine). L'analisi molecolare è stata eseguita in un laboratorio di riferimento.

Risultati: il caso 1 in HPLC evidenziava HbF al 19,3% e HbA2 0,7% ed assenza di varianti mentre in CE era visibile una frazione, distinta da HbF, del 22,1% (Hb Sudbury) ed un HbA2 di 1,7% con HbF 0,6%. Il caso 2 mostrava in HPLC HbF del 16,8% e HbA2 del 2,2% mentre in CE era presente una variante del 27,5% (HbI) ed un HbA2 del 1,7%.

Conclusioni: La disponibilità di metodi diversi per la valutazione degli assetti ha dimostrato di poter indirizzare in maniera puntuale le indagini di 2° livello a vantaggio del tempo e dei costi diagnostici.

**ID: 179**

**Area di Laboratorio**

*Tipo di presentazione:* Orale

*Parole chiave:* C15orf41, CDA type I, functional characterization

### **Characterization of two cases of congenital dyserythropoietic anemia type I shed light on the uncharacterized C15orf41 protein**

**Roberta Marra<sup>1,2</sup>, Roberta Russo<sup>1,2</sup>, Immacolata Andolfo<sup>1,2</sup>, Gianluca De Rosa<sup>1,2</sup>, Barbara Eleni Rosato<sup>1,2</sup>, Francesco Manna<sup>2</sup>, Antonella Gambale<sup>1,2</sup>, Maddalena Raia<sup>2</sup>, Sule Unal<sup>3</sup>, Susanna Barella<sup>4</sup>, Achille Iolascon<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italy; <sup>2</sup>CEINGE Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italy; <sup>3</sup>SSD Talassemie, Anemie Rare e Dismetabolismi del Ferro, Ospedale Pediatrico Microcitamico Antonio Cao, Azienda Ospedaliera Brotzu, Cagliari, Italy; <sup>4</sup>Division of Pediatric Hematology, Hacettepe University, Ankara, Turkey; [robertamarra.r@gmail.com](mailto:robertamarra.r@gmail.com)

CDA type I is a rare hereditary anemia, characterized by relative reticulocytopenia, and congenital anomalies. It is caused by biallelic mutations in one of the two genes: (i) CDAN1, encoding Codanin-1, which is implicated in nucleosome assembly and disassembly; (ii) C15orf41, which is predicted to encode a divalent metal ion-dependent restriction endonuclease with a yet unknown function.

We described two cases of CDA type I, identifying the novel variant, Y94S, in the DNA binding domain of C15orf41, and the H230P mutation in the nuclease domain of the protein. We first analyzed the gene expression and the localization of C15orf41. We demonstrated that C15orf41 and CDAN1 gene expression is tightly correlated, suggesting a shared mechanism of regulation between the two genes. Moreover, we functionally characterized the two variants, establishing that the H230P leads to reduced gene expression and protein level, while Y94S induces a slight decrease of expression. We demonstrated that C15orf41 endogenous protein exhibits nuclear and cytosolic localization, being mostly in the nucleus. However, no altered nuclear-cytosolic compartmentalization of mutated C15orf41 was observed. Both mutants accounted for impaired erythroid differentiation in K562 cells, and H230P mutant also exhibits an increased S-phase of the cell cycle in these cells.

Our functional characterization demonstrated that the two variants have different effects on the stability of the mutated mRNA, but both resulted in impaired erythroid maturation, suggesting the block of cell cycle dynamics as a putative pathogenic mechanism for C15orf41-related CDA I.

**ID: 180**

**Area di Laboratorio**

*Tipo di presentazione: Orale*

*Parole chiave: Iron metabolism, PIEZO1, SEC23B, digenic inheritance, pathogenic mechanism*

### **Co-inheritance of PIEZO1 and SEC23B causative genotypes accounts for marked hepatic iron overload in hemolytic anemia patients**

**Barbara Eleni Rosato<sup>\*1,2</sup>, Immacolata Andolfo<sup>\*1,2</sup>, Roberta Marra<sup>1,2</sup>, Francesco Manna<sup>2</sup>, Roberta Russo<sup>1,2</sup>, Achille Iolascon<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, "Federico II" University of Naples, Naples, Italy; <sup>2</sup>University of Naples, Ceinge biotecnologie avanzate, Italia; [rosato.barbara@gmail.com](mailto:rosato.barbara@gmail.com)

Congenital dyserythropoietic anemia type II (CDaII) and dehydrated hereditary stomatocytosis (DHS) are two hereditary hemolytic anemias associated with iron overload. CDaII is an autosomal recessive disease characterized by ineffective erythropoiesis, hemolysis, erythroblast morphological abnormalities, and hypoglycosylation of some red blood cell membrane proteins. The causative gene encodes the cytoplasmic COPII component SEC23B. This protein mediates accumulation of secretory cargo, deformation of the membrane, and anterograde transport toward the Golgi apparatus. The increased levels of erythroblast-derived hormone erythroferrone (ERFE) only partially explain the hepcidin suppression in CDaII. DHS is an autosomal dominant hemolytic anaemia characterized by cation leak and cell volume alterations. Two causative genes have been identified: PIEZO1 (DHS1), a mechanoreceptor, and KCNN4 (DHS2), a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel. Recently, we demonstrated that severe hepatic iron overload is directly linked to PIEZO1 gain-of-function mutations in the liver (unpublished data).

The aim of this project is to dissect the pathogenic mechanism of hepatic iron overload in digenic SEC23B/PIEZO1 anemia.

We analyzed a patient with clinical signs of hemolytic anemia (increased bilirubin and LDH) and severe hepatic iron overload (ferritin levels at 1938 ng/mL and 88% of transferrin saturation). Clinical investigations revealed typical aspects of both DHS (stomatocytes at blood smear) and CDaII (decreased DiMaxat ektacytometric curve). Finally, NGS custom gene panel (86 genes related to hereditary anemias) highlighted the co-inheritance of the most frequent causative homozygous variant in SEC23B(E109K) and a causative heterozygous variant in PIEZO1 (K2502R).

We silenced SEC23B in the hepatic systems HepG2 and HuH7 to functionally characterized the iron metabolism regulation. We found a downregulation of the main membrane proteins involved in hepatic iron homeostasis (TFRs, TMPRSS6, HJV) and reduced activation of the BMP/SMAD pathway that, in turn, results in HAMP mRNA reduction. Moreover, the protein expression of ferritin resulted increased in silenced cells compared to controls.

We here demonstrated that the pathogenic mechanism of the hepatic iron overload in the digenic co-inheritance of SEC23B/PIEZO1 is due, beyond to the increased levels of ERFE, to the direct role of both PIEZO1 and SEC23B genes on the hepcidin regulation.

**ID: 181**

**Area di Laboratorio**

*Tipo di presentazione:* Nessuna Preferenza

*Parole chiave:* Talassemia, NGS

### **Caratterizzazione genotipica di una famiglia con beta-talassemia mediante NGS**

**Ylenia Barbanera<sup>2</sup>, Francesco Arcioni<sup>1</sup>, Paola Grammatico<sup>4</sup>, Mousa Qatawneh<sup>3</sup>, Roberta La Starza<sup>2</sup>, Maurizio Caniglia<sup>1</sup>, Cristina Mecucci<sup>2</sup>, Paolo Gorello<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Azienda Ospedaliera di Perugia, Italia; <sup>2</sup>Università degli Studi di Perugia, Italia; <sup>3</sup>Queen Rania Al-Abdallah Children Hospital-Jordan;

<sup>4</sup>Università degli studi di Roma "La Sapienza"; [ylenia.barbanera@gmail.com](mailto:ylenia.barbanera@gmail.com)

#### Introduzione

Sempre più frequentemente si osserva una eterogeneità clinica, in termini di carico trasfusionale, insorgenza di complicanze e risposta alla terapia, in pazienti beta-talassemici con genotipo identico. E' noto che variazioni geniche concomitanti alla mutazione beta, come quelle a carico dei geni alfa globinici e dei geni regolatori BCL11A, HBG2 e HBS1L-MYB, modulano il fenotipo in alcuni casi. L'analisi NGS offre la possibilità di identificare nuovi geni e nuove variazioni coinvolte nella modulazione del fenotipo.

#### Materiali e Metodi

Lo studio è stato condotto su 2 fratelli affetti da Beta Talassemia Major, con identico genotipo beta -29 A>G /cod8 (-AA) e geni alfa normali con diversa espressività fenotipica. Abbiamo sviluppato un pannello NGS (SOPHiA GENETICS; tecnologia Illumina Miseq) per lo studio dei geni HBB, HBA1, HBA2, HBD, BMP6, BMP2, ERFE, FTL, HAMP, HFE, HJV, SLC11A2, SLC40A1, TFR2, TMPRSS6, PKLR, KFL1, BCL11A. L'analisi dei dati è stata effettuata con tre criteri di ammissione: 1) SNP >20% e INDEL >15%, 2) coverage >50X, 3) esclusione delle varianti off target (SOPHiA DDM®).

#### Risultati

Sono state identificate 44 varianti nel pt.1 e 45 del pt.2. Di queste quattro varianti sono presenti solo nel pt.1 (ERFE:c.\*889G>C in eterozigosi, SLC40A1:c.\*1130A>G in eterozigosi, TMPRSS6:c.-235T>C e TMPRSS6:c.15C>T in omozigosi) e due solo nel pt.2 (SLC40A1:c.663T>C in eterozigosi e TMPRSS6:c.72G>A in eterozigosi). Inoltre 9 varianti comuni (1 in ERFE, 2 in BCL11A, e 6 in TMPRSS6) presentavano differenze nell'assetto genotipico (omozigote/eterozigote).

#### Conclusioni

La caratterizzazione genomica individuale rappresenta sempre più una necessità in funzione della comprensione della correlazione tra genotipo/fenotipo in ogni singolo paziente e nella sua potenziale stratificazione prognostica e terapeutica. Un approccio NGS consente lo studio di variazioni a carico di numerosi geni potenzialmente coinvolti nella modulazione del fenotipo talassemico. I nostri dati, seppur preliminari, mostrano che 6 varianti segregano diversamente nei due fratelli. I geni più ricorrentemente coinvolti sono SLC40A1 (=2) e TMPRSS6 (=3). Quest'ultimo presenta anche il maggior numero di differenze nell'assetto genotipico.

**ID: 182**

**Area di Laboratorio**

*Tipo di presentazione:* Orale

*Parole chiave:* Hemoglobinopathies, screening, Thermogravimetry, Chemometrics

### **New screening test for Hemoglobinopathies: TGA/Chemometric analysis**

**Roberta Risoluti<sup>1</sup>, Patrizia Caprari<sup>2</sup>, Francesco Sorrentino<sup>3</sup>, Stefano Materazzi<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Sapienza - University of Rome, Rome, Italy; <sup>2</sup>National Centre for the Control and Evaluation of Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy; <sup>3</sup>UOC DH Talassemia, Ospedale S. Eugenio, Rome, Ital; <sup>4</sup>Department of Chemistry, Sapienza - University of Rome, Rome, Italy; [roberta.risoluti@uniroma1.it](mailto:roberta.risoluti@uniroma1.it)

Thermogravimetry coupled with chemometrics proved to be a rapid and cost effective diagnostic tool for  $\beta$ -thalassemia screening [1]. This model, consisting of chemometric PLS-DA, permitted the discrimination of thalassemic patients and healthy individuals, using the TG curves of blood samples. In addition, the TGA screening test permitted to differentiate thalassemia according to clinical severity and was not influenced by drug therapies (aspirin) commonly used by thalassemia patients who undergo splenectomy [2-3]. The TGA/Chemometric analysis is able to provide the screening of thalassemia in blood samples stored at 4°C until 15 days. Healthy donors were considered as reference subjects and a typical thermal behaviour as a function of aging was estimated and compared to thermal behavior of thalassemia subjects. Despite blood changes with aging, the healthy and thalassemic subjects may be significantly differentiated by TGA/Chemometrics after 15 days from blood collection with a 100 % of correct classification rate. This new method applied to aged samples was able to discriminate thalassemia in transfused patients that is generally not possible by the common first level protocol, and in  $\delta\beta$ -thalassemias, and  $\beta$ -thalassemia combined with Hb Lepore, usually requiring the molecular analysis for diagnosis. This study, for the first time, describe a screening method for thalassemia able to detect thalassemia on whole blood samples stored for 15 days [4].

In conclusion the application of TGA/chemometric analysis has proved to be a particularly useful diagnostic tool for the screening of the hemoglobin defects, in a short time and at low cost, of this case of congenital hemolytic anemia of difficult diagnosis. This method results particularly suitable in pediatric patients as it requires small sample volumes and is able to characterize patients subjected to transfusion.

1. Risoluti, R., Materazzi, S., Sorrentino, F., Bozzi, C., Caprari, P. *Talanta* 183 (2018) 216-222 doi 10.1016/j.talanta.2018.02.071
2. Risoluti, R., Materazzi, S., Sorrentino, F., Maffei, L., Caprari, P. *Talanta* 159 (2016) 425-432 doi 10.1016/j.talanta.2016.06.037
3. Risoluti, R., Gullifa, G., Fabiano, M.A., Sorrentino, F., Caprari, P., Materazzi, S. *J of Ther. Anal and Cal.* 134(2) (2018) 1299-1306 doi 10.1007/s10973-018-7262-3.
4. Risoluti, R., Caprari, P., Gullifa, G., Massimi, S., Sorrentino, F., Buiarelli, F., Materazzi, S. *Microchemical J* 146 (2019) 374-380 doi 10.1016/j.microc.2019.01.008

**ID: 183**

**Area di Laboratorio**

*Tipo di presentazione:* Poster

*Parole chiave:* Glucose-6-phosphate deficiency, favism, hemolytic anemia, chronic non-spherocytic hemolytic anemia, variants

### **Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in northern Italy: appearance of uncommon mutations during the last 15 years**

**Lorena Duca<sup>2</sup>, Maria Domenica Cappellini<sup>1,2,3</sup>, Isabella Nava<sup>2</sup>, Elena Cassinero<sup>1</sup>, Alessia Marcon<sup>3</sup>, Irene Motta<sup>3</sup>, Marta Salvatori<sup>3</sup>, Marta Mancarella<sup>3</sup>, Federico Landi<sup>3</sup>, Marta Bortolotti<sup>3</sup>, Andrea Cosentino<sup>3</sup>, Giovanna Graziadei<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Rare Diseases Center, General Medicine Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico; <sup>2</sup>Department of Medicine and Medical Specialties, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Italia; <sup>3</sup>Department of Clinical Sciences and Community Health, University of Milan, Milan, Italy; [giovanna.graziadei@policlinico.mi.it](mailto:giovanna.graziadei@policlinico.mi.it)

**Background.** G6PD deficiency is an X-linked hemolytic anemia caused by G6PD gene mutations which affect 400 million people worldwide. The distribution and frequency of genetic variants differ depending on ethnicity and geographical areas. Because of new migrations different variants are now present in Europe.

**Aims.** This retrospective study aims to identify variants among the G6PD deficient subjects referred since 2004 to Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico in Milan. The subjects were divided into 3 groups, considering the distribution every five years: group 1 (2004-2008), group 2 (2009-2013) and group 3 (2014-2018).

These subjects were studied because of known or suspected G6PD deficiency or for genetic counselling.

**Methods.** Three hundred and thirty nine G6PD mutated subjects were identified, classified and divided on the basis of their mutations. The molecular analysis has been carried out by restriction fragments length polymorphisms (RLFP) and direct DNA sequencing.

**Results.** During 12 years a significant decrease of the Mediterranean and an important increase of the African, Asian and uncommon variants (classified as Others) have been observed. In the first eight years Cassano and Chatham variants have had an increase unchanged in the last four years. During each period new mutations were found: in group 1 the Gly485Asp (c.[1454G> A]) in homozygosity (female) , in group 2 the Glu195Arg (c.[584A> G]) in heterozygosity and in group 3 the Ile224Phe (c.[670A>T]) in hemizyosity. Referring to the entire period of the study 2004-2018, in 3 subjects (1.1%) were found Portici variant, responsible for chronic non-spherocytic haemolytic anaemia, as well as Puerto Limon and Georgia (0,4%). Other variants identified in less than 1% of subjects studied were: Cairo, Mahidol, Ludhiana, Rignano, Santamaria, Sant'Antioco, Canton, Sibari, Cosenza, Abruzzo, Viangchan, Orissa, and Union. Two cases showed 1365-13T>C polymorphism coupled with 1311C>T variation, generally associated with Mediterranean variant.

**Conclusions.** These data reflect the appearance of uncommon G6PD mutations in Northern Italy, probably due to new migrations, as consequence G6PD characterization becomes a diagnostic issue. The evidence of polymorphisms in G6PD deficient subjects suggests that not only single variations in the exonic/intronic boundaries, but also specific haplotypes could be causative for G6PD deficiency.

**ID: 184**

**Area di Laboratorio**

*Tipo di presentazione: Poster*

### **Pilot study on inflammatory involvement of the phototoxic reaction in Erythropoietic Protoporphyrria (EPP) patients**

**Francesca Granata<sup>1</sup>, Lorena Duca<sup>1</sup>, Giovanna Graziadei<sup>1</sup>, Valentina Brancaleoni<sup>1</sup>, Pasquale Missineo<sup>3</sup>, Giacomo De Luca<sup>1</sup>, Silvia Fustinoni<sup>2</sup>, Elena Di Pierro<sup>1</sup>, Maria Domenica Cappellini<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Fondazione IRCCS Ca Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano., Italia; <sup>2</sup>EPIGET - Epidemiology, Epigenetics, and Toxicology Lab, Department of Clinical Sciences and Community Health, Università degli Studi di Milano, Italy. Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, U.O.S Tossicologia, Milan, Italy; <sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy; [francesca.granata@policlinico.mi.it](mailto:francesca.granata@policlinico.mi.it)

#### **Objectives**

The phototoxic reaction is a well-known aspect of the EPP: oxidative status, complement system activation and mast cells response are some of the hypothesized mechanisms responsible for this reaction. Our aim was to verify some aspects involved in each mechanism in order to extend the knowledge about PR.

#### **Methods**

The oxidative status was tested with malondialdehyde (MDA), the complement system (CS) by C3 assay, the classical pathway by C1q, the alternative pathway (AP) by factor B and mast cell by IL-10 assay. Two serum samples were collected in winter and summer on 19 EPP patients (9M/10F aged a=37y b=38y) and 13 controls matched by age and sex, in order to verify the reaction of the sun exposure within each group, without invasive treatments.

#### **Results**

During summer, a significant difference in the oxidative stress was observed in patients compared to the control group ( $p^*=0.04$ ). Also, C3 and Factor B in summer were statistically significant than other control values ( $p^{**}=0,002$ ;  $p^{****}<0,0001$ ). The correlation between the values of CS could indicate the involvement of an alternative pathway in EPP phototoxicity.

#### **Conclusions**

This study shows that the phototoxic reaction is not only located in the dermis but can also be the result of a systemic response, which could affect the patients' general health. In order to verify this theory, we need to further study this field. The knowledge of pathophysiology is essential for new markers to discover for EPP, useful for improving clinical studies of known and future drugs.

**ID: 189**

**Area di Laboratorio**

*Tipo di presentazione:* Nessuna Preferenza

*Parole chiave:* iperferritinemia, cataratta, ferro, famiglia

### **Sindrome da iperferritinemia-cataratta congenita: diagnosi in una famiglia.**

**Anna Paola Capra<sup>1</sup>, Petronilla Daniela Romeo<sup>1</sup>, Alessandro Meduri<sup>1</sup>, Giuseppina Zirilli<sup>2</sup>, Saverio Alberti<sup>1</sup>, Maria Angela La Rosa<sup>1</sup>, Silvana Briuglia<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze biomediche, odontoiatriche e delle immagini morfologiche e funzionali, Università degli Studi, Messina;

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Pediatriche Ginecologiche Microbiologiche e Biomediche, Policlinico Universitario "G. Martino" di Messina, Italia; [annapaolacapra@gmail.com](mailto:annapaolacapra@gmail.com)

La sindrome da iperferritinemia-cataratta ereditaria (HHCS, OMIM#600886, ORPHA163) è una malattia genetica rara, a prevalenza inferiore a 1 su 1 000 000 a trasmissione autosomica dominante. E' caratterizzata dalla comparsa di cataratta bilaterale prima dei 50 anni e da elevati livelli plasmatici di ferritina, in assenza di sovraccarico marziale, è dovuta a mutazioni nella regione 5' non codificante del gene della L-ferritina (FTL), di cui sono note più di 47 varianti patogenetiche, ad oggi. Descriviamo il caso di C.A., 6 anni, giunta alla nostra osservazione, inviata dal pediatra, per il riscontro occasionale di iperferritinemia senza causa apparente. L'anamnesi perinatale e familiare non evidenziava patologie degne di nota, ad eccezione della presenza di riduzione del visus. Gli esami ematochimici di routine presentavano un valore elevato di ferritina 1400 ng/mL, che in controlli successivi era di 1169 e 1800 ng/mL, con normali livelli sierici di ferro e saturazione della transferrina <45%, segno di assenza di sovraccarico marziale. I parametri auxologici, i test di funzionalità epatica e l'ecografia addome risultavano nella norma. Il controllo oculistico evidenziava la presenza di cataratta bilaterale. Il quadro complessivo suggeriva l'ipotesi diagnostica di HHCS, per cui la paziente è stata inviata in Genetica Medica. A supporto, dall'anamnesi familiare è emerso che sia la madre che la sorellina più piccola, di 1 anno di età, erano affette da cataratta.

Abbiamo amplificato e sequenziato la regione 5' del gene FTL. Abbiamo riscontrato in questa regione la mutazione g.5032G>C; c.-168G>C (rs398124635) in eterozigosi. In questa regione è presente il sito IRE (iron-responsive element). La mutazione riscontrata modifica la struttura secondaria della regione regolatoria responsiva al ferro, impedendo il legame con le IRPs (Iron Regulatory Proteins). Ciò determina l'espressione costitutiva della L-ferritina con considerevole aumento della concentrazione plasmatica. L'L-ferritina quindi precipita a livello del cristallino, causando lo sviluppo, anche molto precoce, di cataratta bilaterale. L'analisi genetica effettuata negli altri membri della famiglia, ha confermato la diagnosi in 7 soggetti, di 3 diverse generazioni, che avevano manifestato la cataratta e in cui abbiamo riscontrato iperferritinemia con normali livelli ematici di ferro.

Dai dati di letteratura, in Italia sono stati diagnosticati ad oggi 29 soggetti. Sono 160 i casi di HHCS descritti nel mondo. Il caso descritto sottolinea l'importanza di una attenta valutazione dei casi che presentano iperferritinemia isolata. E' auspicabile un'attenta visita clinica che in presenza di cataratta bilaterale non-post-trauma, in età precoce e familiarità compatibile con modalità di trasmissione dominante, sospetti la sindrome da HHCS. Essendo condizione molto rara, la consulenza genetica diventa fondamentale.



**ID: 190**

**Area di Laboratorio**

*Tipo di presentazione:* Poster

*Parole chiave:* ferro, sclerosi multipla, progressione malattia, polimorfismi

### **Valutazione dell'omeostasi del ferro in soggetti con sclerosi multipla**

**Elisa Ferro, Anna Paola Capra, Petronilla Daniela Romeo, Giuseppa Visalli, Angela Di Pietro, Silvana Briuglia, Saverio Alberti, Maria Angela La Rosa**

Dipartimento di Scienze biomediche, odontoiatriche e delle immagini morfologiche e funzionali, Università degli Studi, Messina;  
[ferro\\_elisa@alice.it](mailto:ferro_elisa@alice.it)

Nel sistema nervoso centrale, il ferro svolge un ruolo essenziale per la maturazione e funzionalità degli oligodendrociti. Gran parte degli enzimi coinvolti nella sintesi di ATP, colesterolo e acidi grassi, sono ferro-dipendenti. L'importanza del ferro nella mielinizzazione del sistema nervoso centrale (SNC) è stata provata in modelli murini, in cui la carenza marziale è stata associata ad ipomielinizzazione, mentre il sovraccarico di ferro al processo di demielinizzazione. Lesioni causate da depositi di ferro sono state rilevate sia nella materia grigia che bianca del SNC di soggetti con sclerosi multipla (SM). Recenti evidenze attribuiscono un ruolo al danno ossidativo ferro-indotto nella patogenesi della SM e la presenza di overload marziale, a livello cerebrale correla con marcatori di progressione della patologia. Obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare i meccanismi che stanno alla base della disregolazione dell'omeostasi del ferro in 145 soggetti con SM afferenti all'U.O.C. di Neurologia del Policlinico Universitario di Messina. Sono stati raccolti i dati anamnestici e clinici: età, sesso, forma di malattia (remittente recidivante=RR, secondariamente progressiva=SP e primariamente progressiva=PP), familiarità, anno di esordio, EDSS (Kurtzke's Expanded Disability Status Scale), indice progressione (PI, EDSS/durata malattia), attività di malattia (neuroradiologica e clinica); numero di riacutizzazioni (ultimi 2 anni), esordio mono o polisintomatico. Abbiamo determinato i livelli di epcidina e dei fattori che ne influenzano l'espressione: ferritina, recettore solubile della transferrina (sTfR) e interleuchina 6 (IL6). Sono stati analizzati single nucleotide variations (SNPs) nel gene HFE, C282Y (rs1800562) e H63D (rs1799945), comunemente associati all'emocromatosi ereditaria; nel gene HAMP, il polimorfismo -582A>G fortemente rappresentato in soggetti con SM e nel gene PCSK7 il polimorfismo (rs236918). Le variabili studiate sono state valutate sia nell'intera popolazione di pazienti SM che in un gruppo controllo, stratificando per la forma RR e per quelle progressive (SP+PP). Abbiamo osservato che l'epcidina è diminuita nelle forme RR e aumentata nelle forme progressive rispetto al gruppo controllo (Grafico 1). Stesso andamento ha la ferritina con valori più alti nelle forme progressive (SP+PP) ed in particolare nel gruppo PP (Grafico 2A). Applicando il Mann-Whitney U Test si osservano differenze significative tra soggetti con SM e controlli per il sTfR (Grafico 2B) e IL6 (Grafico 2C). Applicando il rapporto tra i valori del sTfR e il log della concentrazione serica della ferritina si ottiene il TfR-F-index, considerato un marker più sensibile dello stato ferro-carenziale. Questo indice è risultato aumentato nelle forme RR rispetto ai controlli, ma non nelle forme progressive di SM. L'epcidina/ferritina ratio mostra differenze significative tra le forme RR e quelle SP+PP. I risultati dello studio dei polimorfismi (Tabella 1), eccetto per la variante C282Y riscontrata solo in eterozigosi nel 2% dei pazienti (3 soggetti, 2 RR e 1 SP). In conclusione, la progressione della sclerosi multipla, malattia estremamente eterogenea ad eziologia ancora sconosciuta, risulta essere associata in una frazione di casi ad alterazioni nei meccanismi di regolazione dell'omeostasi del ferro. Sono pianificati ulteriori approfondimenti nelle indagini genetiche e biochimiche ed estensione della casistica.

**ID: 192**

**Area di Laboratorio**

*Tipo di presentazione:* Nessuna Preferenza

*Parole chiave:* Erythropoietic protoporphyria, deep intronic pathogenic variants

### **Unraveling deep intronic pathogenic variants in erythropoietic protoporphyria (EPP) patients through a re-sequencing of FECH locus.**

**Elena Di Pierro<sup>1</sup>, Matteo Chiara<sup>2</sup>, Manuel Méndez<sup>3</sup>, Valentina Brancaleoni<sup>1</sup>, Francesca Granata<sup>1</sup>, Elena Arranz Canales<sup>3</sup>, Monserrat Morales<sup>3</sup>, Giovanna Graziadei<sup>1</sup>, Maria Domenica Cappellini<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milan, Italy; <sup>2</sup>Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy; <sup>3</sup>Instituto de Investigación, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain; [elena.dipierro@unimi.it](mailto:elena.dipierro@unimi.it)

#### Objectives

It is universally accepted that clinical manifestations of erythropoietic protoporphyria (EPP) require a rare null FECH allele in trans to a common hypomorphic FECH allele associated with the c.315–48T>C variant (C variant, rs2272783). However, routine genetic analysis fails to detect FECH pathogenic variants in 1-5% of individuals carrying one or two hypomorphic alleles. This study, by applying high throughput re-sequencing of the FECH gene, aimed to identify non-coding pathogenic variants responsible for the EPP phenotype.

#### Methods

A custom enrichment panel was designed in order to include also introns and flanking regions of the FECH gene. Standard Haloplex system procedure was applied for library preparation and 150 bp paired-end reads were generated using an Illumina Miseq sequencer. Variant calling was performed by the CoVaCS pipeline. Qualitative RNA analysis and quantitative DNA methylation examination were also performed.

#### Results

Three new deep intronic variants, at an average distance of 1000bp from constitutive exons, were found in eight unrelated patients developing a clinically overt disease. We demonstrate that these genetic variants lead to the insertion of pseudoexons, containing stop codon, in the mature FECH transcript by the activation of new alternative donor/acceptor splice sites or by the abolition of exonic splicing silencer site and the concurrent institution of new methylated CpG di-nucleotide.

#### Conclusions

These results suggest that the presence of non-coding variants in the pathogenic process of EPP should consistently be evaluated. Moreover, these finding supports the hypothesis that the pre-mRNA splicing pattern can be modulated through a methylation-dependent mechanism.

**ID: 194**

**Area di Laboratorio**

*Tipo di presentazione:* Nessuna Preferenza

*Parole chiave:* case report, sideroblastic anemia, ALAS2, erythropoiesis

### **Toxic substances abuse worsening sideroblastic anemia phenotype**

**Paola Delbini<sup>3</sup>, Elena Cassinero<sup>1,2</sup>, Valentina Brancaleoni<sup>1</sup>, Elena Di Pierro<sup>1</sup>, Alessia Marcon<sup>3</sup>, Marta Bortolotti<sup>3</sup>, Paola Bianchi<sup>4</sup>, Giovanna Graziadei<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>Department of Medicine and Medical Specialties, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Italia; <sup>2</sup>Rare Diseases Center, General Medicine Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico; <sup>3</sup>Department of Clinical Sciences and Community Health, University of Milan, Milan, Italy; <sup>4</sup>Hematology Unit, Pathophysiology of Anemias Unit; [giovanna.graziadei@policlinico.mi.it](mailto:giovanna.graziadei@policlinico.mi.it)

A 32 years-old man with a medical history of persistent severe anemia was admitted as outpatient in our centre. Since the age of 15 he reported alcohol and drugs abuse. At age 23, he was hospitalized with severe anemia. The familiar history presented a mother affected by anemia that needs transfusional support in the past. The initial complete blood count was as follows: Hb, 7.8 g/dL; mean corpuscular volume (MCV), 75.7 fL; mean corpuscular hemoglobin (MCH), 13.2 pg; red cell distribution width (RDW), 20.3%; reticulocytes, 0.38%; and platelets, 623×10<sup>6</sup>/L. A peripheral blood smear showed a hypochromic microcytic anemia with marked anisocytosis, poikilocytosis, and polychromasia; a normal leukocyte differential; and no pathologic cells. The protein electrophoresis, complement measurements and hemoglobin electrophoresis were normal, the Coombs tests were negative. Bone marrow examination showed a hypercellular marrow with a large number of ringed sideroblasts (35%). The patient was regularly transfused every 2 weeks with 2 unit of packed red cells with pretransfusional Hb level of 7 g/dl. DNA sequencing of the ALAS2 gene confirmed the diagnosis of X-linked sideroblastic anemia, detecting the hemizigous mutation c.611G>A (Arg204Gln). X-linked sideroblastic anemia (XLSA), the most common type of congenital sideroblastic anemia, is caused by defects in the X-linked gene encoding 5-aminolevulinic acid synthase 2 (ALAS2). The characteristic hypochromic, microcytic anemia typically becomes manifest in the first three decades of life. In our patient the anemia related to the genetic defect was worsen by alcohol and drug abuse with increased bone marrow toxicity.

Using an in vitro model of erythropoiesis, we studied cell proliferation and differentiation rate of erythroid cells derived from XLSA patient. CD34+-enriched cells isolated from peripheral blood of patient by immunoselection were evaluated for the capacity to proliferate by in vitro clonogenic capacity assays (burst-forming unit-erythroid (BFU-E)). The erythroid maturation stage was quantified by flow cytometry (CD34, CD45, Glycophorine A, CD71) and morphological analysis by microscopy observation. Moreover, apoptotic effects of plasma from XLSA patient were assessed on cultured primary human erythroid cells to assess its toxic properties.

The phenotype of ALAS2-deficient cells was characterized by low viability (13.1%), a strong reduction in proliferation (10±3 BFU-E/105 cells; controls 50±8 BFU-E/105 cells) and an arrest of differentiation (CD71high/GlyA low early erythroblasts >80%; CD71high/GlyA high late erythroblasts <0.5%), as expected for the disease. Morphology analysis confirmed an impaired ability to differentiate, with high rate of cellular death (80%), high percentage of proerythroblasts (27%) and basophilic erythroblasts (40%) and low percentage of mature erythroblasts (14%).

The apoptotic effect of plasma of XLSA patient was analyzed using CD34+ cells derived from patients and controls. Plasma, compared to normal FBS, caused increased apoptosis of primary human CD34+ cells derived from patient (>95%) and from healthy subjects (>80%), arrested erythroid differentiation in all samples (CD71low/GlyA low precursors >98%) and induced an alteration in morphology of erythroid cells, that became adhesive on the plate, probably due to an high grade of cellular death. This suggest a plasma toxicity that could represent an additional effect on already compromised erythropoiesis.