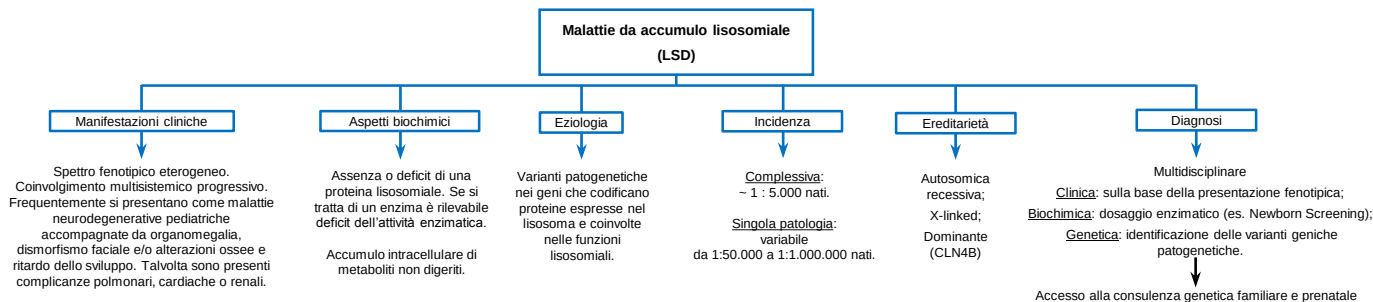


Federica Feo¹, Lorenzo Ferri¹, Elena Procopio², Maria Alice Donati², Anna Caciotti¹, Michelina Sibilio³, Miriam Rigoldi⁴, Vincenzo Leuzzi⁵, Roberta Battini^{6,7}, Agata Fiumara⁸, Daniela Concolino⁹, Filippo Manti⁵, Federica Deodato¹⁰, Paolo Prontera¹¹, Grazia Molinaro¹², Salvatore Savasta¹³, Maria Cristina Maggio¹⁴, Renzo Guerrini¹⁵, Amelia Morrone¹⁵
1 Lab Bio Mol Mal Neuromet, AOU Meyer, Firenze; 2 Mal Metab Musc Eredit, AOU Meyer, Firenze; 3 Uni Metab, AOU Federico II, Napoli; 4 Ist Mario Negri Ric Farmacol, IRCCS, Bergamo; 5 Dip Neurosc Umane, Uni Sapienza Roma; 6 Neuro Svilup, Fond Stella Maris IRCCS Pisa; 7 Dip Med Sperim Clin, UNIPR Pisa; 8 Clin Pediatr, Uni Catania; 9 Unit Pediatr, Uni Magna Graecia Catanzaro; 10 Mal Metab, Osp Bambino Gesù IRCCS, Roma; 11 Neonat Diagn Prenat, A.O. Perugia; 12 Neuro Riabilit, Comprensorio Sant'Elia 13 Clin Pediatr, Osp Magg Crema 14 Endocrin Clin UNIPR, Palermo 15 Dip Neurofibr, UNIFI Firenze

email to: amelia.morrone@meyer.it; lorenzo.ferri@meyer.it; federica.feo@meyer.it

INTRODUZIONE



SCOPO

Valutare la rilevanza dell'approccio NGS con pannello di geni nella conferma diagnostica di LSD.

MATERIALI E METODI

Targeted resequencing NGS degli esoni e dei siti di splicing di **64 geni** associati a LSD mediante Nextera DNA Flex Library Preparation e sequenziamento Paired-End 150 bp su piattaforma MiSeq (Illumina).

RISULTATI

Abbiamo identificato:

23 nuove diagnosi di LSD in 22 famiglie non correlate:

1 MPS-I, 1 MPS-II, 1 MPS-IIIA, 3 MPS-IIIB, 2 MPS-IIIC, 1 MPS VI, 1 Niemann-Pick A, 1 Niemann-Pick B, 1 Niemann-Pick C, 1 Sandoff, 1 fucosidosi, 1 alfa-mannosidosi, 1 gangliosidosi GM1, 1 Tay-Sachs, 3 mucopolipidosi II, 1 mucopolipidosi III, 1 mucopolipidosi IV, 1 deficit multiplo di solfatasi.

12 nuove varianti geniche causative di LSD, confermate biochimicamente.

Potenzialità dell'approccio NGS:

Diagnosi differenziale

- una paziente con opacità corneale e sospetto di malattia di Fabry è invece risultata affetta da mucopolipidosi IV;
- un paziente con sospetta mucopolipidosi III (pseudo Hurler) era invece affetto da MPS-I.

Rivalutazione «vecchi» casi irrisolti

- In un caso con sospetto clinico di Niemann-Pick A/B, in cui tale malattia era stata esclusa biochimicamente per dosaggio sfingomielinasi risultato nella norma. Al sequenziamento NGS è risultata una omozigosi per l'allele patogenetico di *SMPD1* associato a pseudonormalità (Niemann-Pick B);
- un paziente con diagnosi biochimica di MPS-II eseguita presso altro laboratorio, ma senza mutazioni in IDS, era invece affetto da MPS-VI, con mutazione biallelica di *ARSB*.

Individuazione di riarrangiamenti genici estesi

- un paziente risultato precedentemente omozigote per una variante di *SUMF1* in Sanger era invece eterozigote per una delezione estesa dell'intero gene *SUMF1*, ereditata dalla madre e presente anche in una sorella.

CONCLUSIONI

- Il pannello NGS per le LSD presentato in questo studio, ha consentito di espandere il "potenziale diagnostico" del nostro laboratorio da 9 geni (10 malattie) analizzati in Sanger a tutte le malattie lisosomiali, raggruppandole in un unico test.

- L'applicazione del pannello di geni LSD in NGS ha consentito:

- Risoluzione casi precedentemente «irrisolti».
- Possibilità di eseguire una diagnosi differenziale, specialmente nei casi di fenotipi comuni a più malattie lisosomiali.
- Individuazione di riarrangiamenti genici estesi senza dover eseguire test di dosaggio allelico gene-specifici.

Tabella 1. Varianti patogenetiche identificate mediante analisi NGS di 64 geni associate a LSD. In rosso le varianti nuove

Paziente	Dosaggio enzimatico	Variante identificata con pannello NGS-LSD	Alterazione proteica	Letteratura	Diagnosi
P01	Alfa-iduronidasi: 0 nmol/mg/h (25-60 nmol/mg/h)	IDUA: c.1469T>C omo	p.(Leu490Pro)	Zahoor et al., 2019, J Pediatr Endocrinol Metab	Mucopolisaccaridosi, tipo IHS (Sindrome di Hurler-Scheie)
P02	-	IDS: c.879+1G>A etero SMPD1: c.1630delA etero	p.(Thr544Profs*69)	Semyachkina et al., 2021, BMC Med Genomics 14: 71 Novel	Mucopolisaccaridosi II
P03	-	SGSH: c.364G>A omo	p.(Gly122Arg)	Ugurov et al., 2015, PLoS One 10: e0121511	Mucopolisaccaridosi IIIA (Sindrome Sanfilippo tipo A)
P04	-	NAGLU: c.422C>T omo	p.(Ser141Phe)	Pollard et al., 2013, J Inher Metab Dis 36: 179	Mucopolisaccaridosi, tipo IIIB (Sindrome di Sanfilippo, tipo B)
P05	N-acetilalfa-glucosaminidasi iduronica: 0.05 nmol/min/mg (0.24-0.68 nmol/min/mg)	NAGLU: c.343C>T etero NAGLU: c.1694G>A etero	p.(Pro115Ser) p.(Arg565Gln)	Capalbio et al., 2019, PLoS Genet 15: e1008409	Mucopolisaccaridosi, tipo IIIB (Sindrome di Sanfilippo, tipo B)
P06	-	NAGLU: c.611T>G omo	p.(Met204Arg)	Novel	Mucopolisaccaridosi, tipo IIIB (Sindrome di Sanfilippo, tipo B)
P07	-	HGSNAT: c.338T>C omo	p.(Leu113Pro)	Canals et al., 2011, Clin Genet 80: 367	Mucopolisaccaridosi, tipo IIIC
Sorella di P07	-	HGSNAT: c.338T>C omo	p.(Leu113Pro)	Canals et al., 2011, Clin Genet 80: 367	Mucopolisaccaridosi, tipo IIIC
P08	Arilsofataasi B leucocitaria: 17 nmol/mg/h (100-280 nmol/mg/h)	ARSB: c.224T>G etero ARSB: c.629A>G etero	p.(Leu75Arg) p.(Tyr210Cys)	Novel Capalbio et al., 2019, PLoS Genet 15: e1008409	Mucopolisaccaridosi VI (Sindrome di Maroteaux-Lamy)
P09	-	SMPD1: c.739G>A omo	p.(Gly247Ser)	Hou et al., 2020, Proc Natl Acad Sci U S A 117: 3053	Malattia di Niemann-Pick, tipo A/B
P10	-	SMPD1: c.880C>A omo	p.(Gln294Lys)	Parfuta et al., 1997, J Inher Metab Dis 20: 915; Ferreira et al., 2005, J Inher Metab Dis 28: 201; Wang et al., 2017, Hum Mutat 38: 1491; Wang et al., 2017, Hum Mutat 38: 1491; Capalbio et al., 2019, PLoS Genet 15: e1008409	Malattia di Niemann-Pick, tipo A/B
P11	-	NPC1: c.2800C>T etero NPC1: c.2974G>A etero	p.(Arg934*) p.(Gly992Arg)	Dardis et al., 2020, J Clin Med 9	Niemann-Pick tipo C
P12	-	HEXB: c.850C>T etero HEXB: c.623A>G etero	p.(Arg284*) p.(Asp208Gly)	Zhang et al., 1994, Hum Mut Genet 3: 139; Cheema et al., 2020, NPJ Genom Med 5: 44 Novel	Gangliosidosi GM2, Malattia di Sandhoff
P13	Alfa-Fucosidasi leucocitaria: 0 nmol/mg/h (30-120 nmol/mg/h)	FUCA1: c.564G>A omo	p.(Trp188*)	Xiong et al., 2015, Science 347: 1254806	Fucosidosi
P14	Alfa-mannosidase leucocitaria: 0.8 nmol/mg/h (50-300 nmol/mg/h)	MAN2B1: c.2248C>T omo ARSB: c.245T>G etero HPSS: c.1067C>A etero	p.(Arg750Trp) p.(Leu82Arg) p.(Ser356Tyr)	Hou et al., 2020, Proc Natl Acad Sci U S A 117: 3053 Novel	Alfa-mannosidosi
P15	-	GLB1: c.602G>A etero GLB1: c.1143+1G>T etero	p.(Arg201His)	King et al., 2020, Mol Genet Metab Rep 25: 100676 Novel	Gangliosidosi GM1, giovanile
P16	B-essosaminidasi A leucocitaria: 70-240 nmol/mg/h	HEXA: c.1121A>G etero HEXA: c.1150delC etero	p.(Gln374Arg) p.(Gln384Serfs*15)	Ohno et al., 2008, Mol Genet Metab 94: 462 Novel	Gangliosidosi GM2 (malattia di Tay-Sachs)
P17	-	GNPTAB: c.2693delA etero GNPTAB: c.2956C>T etero	p.(Lys898Serfs*13) p.(Arg986Cys)	Pasumartini et al., 2020, J Hum Genet 65: 973	Mucopolipidosi II o/B
P18	Elevate attività enzimiche lisosomiali nel plasma (es. Beta-essosaminidasi totale, Alfa-fucosidasi)	GNPTAB: c.3613C>T etero GNPTAB: c.1049C>T etero	p.(Arg1205*) p.(Thr350Leu)	Xiong et al., 2015, Science 347: 1254806 Novel	Mucopolipidosi II o/B
P19	-	GNPTAB: c.3503_3504delTC etero GNPTAB: c.3443_3446delTTTG etero	p.(Leu1168GlnfsTer5) p.(Val1148AlafsTer2)	Aker et al., 2021, NPJ Genom Med 6: 14; Tappino et al., 2009, Hum Mutat 30: E956	Mucopolipidosi II o/B
P20	-	GNPTG: c.110+1G>A etero GNPTG: c.654_657delCTTA etero	p.(Tyr218*)	Novel Tuyssat et al., 2018, Gene 642: 398	Mucopolipidosi tipo III gamma
P21	-	MCOLN1: c.959T>C etero MCOLN1: c.959T>C etero	p.(Ser319Pro) p.(Leu320Pro)	Novel	Mucopolipidosi IV
P22	-	SUMF1: c.670C>T etero SUMF1: delezione intero gene etero	p.(Arg224Trp)	Meschach Paul et al., 2017, J Biol Mol Struct Dyn Novel	Deficit multiplo di solfatasi