



Università degli Studi di Brescia
Presentazione *Progetti bando di Ateneo Health & Wealth*
Area tematiche "Salute" e "Stili di vita"
20 maggio 2021

Area tematica Salute

**Sviluppo di una piattaforma NGS e di pannelli genici
per il miglioramento della diagnosi, della salute e del benessere
di pazienti affetti da connettivopatie ereditarie e
altre malattie mendeliane SPEED-GENE**

MARINA COLOMBI





Diagnosi molecolare di connettivopatie ereditarie

Sindromi di Ehlers-Danlos

Sindrome di Marfan

Sindromi di Loeys-Dietz

Sindrome delle arterie tortuose

Forme non sindromiche di aneurismi aortici

Displasie scheletriche

Osteogenesi imperfetta

Pseudoxantoma elastico

Sanger sequencing



Piattaforma Next Generation Sequencing Ion Torrent



Ion Proton

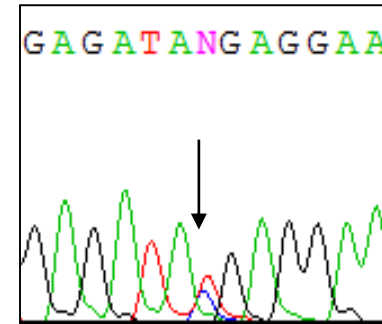


Ion S5

Test genetici: metodologie

PCR + Sanger sequencing:

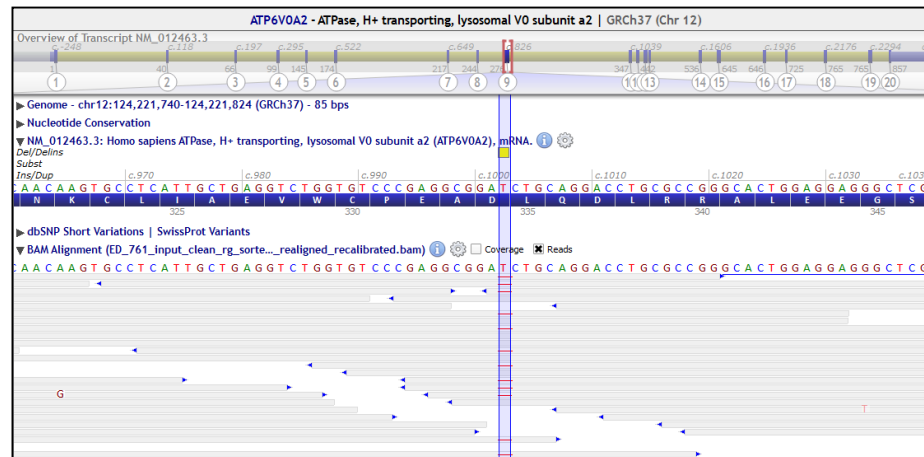
- analisi di diversi ampliconi/gene analizzati uno alla volta
- un campione alla volta



Next generation sequencing, NGS

Analisi simultanea di:

- tutti i geni (cds) in un solo sequenziamento esomico, WES
- dei geni chiaramente associati a malattia in OMIM ~5.000 geni, esoma clinico
- di pannelli di geni mirati per gruppi di malattie su 10-15 individui













Partecipazione al bando di Ateneo Health & Wealth

Sviluppo e l'ottimizzazione di un pannello custom per il sequenziamento di geni coinvolti in diversi disordini ereditari del tessuto connettivo con prevalente coinvolgimento vascolare e cutaneo:

Connective Tissue Panel, CTP

Finanziamento ateneo 25.000 euro, cofinanziamento 27.000 euro

CONNECTIVE TISSUE PANEL, CTP PER 31 GENI

- ***COL5A1, COL5A2, TNXB, COL3A1, COL1A1, COL1A2, ADAMTS2, FKBP14, B4GALT7, SLC39A13, DSE, CHST14***  **Sindromi di Ehlers-Danlos**
- ***FBN1***  **Sindrome di Marfan**
- ***TGFBR1, TGFBR2, SMAD3, TGFB2, TGFB3, SMAD2***  **Sindromi di Loeys-Dietz**
- ***SLC2A10***  **Sindrome delle arterie tortuose**
- ***ACTA2, MFAP5, MYH11, MYLK, PRKG1, SMAD4, FLNA, NOTCH1, SKI***  **Forme sindromiche e non di aneurismi aortici**
- ***COL1A1, COL1A2***  **Osteogenesi imperfetta**
- ***B3GAT3***  **Sindrome Larsen-like**
- ***ABCC6***  **Pseudoxantoma elastico**

CONNECTIVE TISSUE PANEL, CTP: DISEGNO

Tecnologia AmpliSeq

software Ion AmpliSeq Designer v5.4.2: primers per PCR multiplex

31 geni: 739 esoni

5 nt intronici flanking

913 ampliconi

lunghezza media 306 bp

Target totale: 116.053 bp

Copertura regione target:

67.6% 1 amplicone

27,8% 2 ampliconi

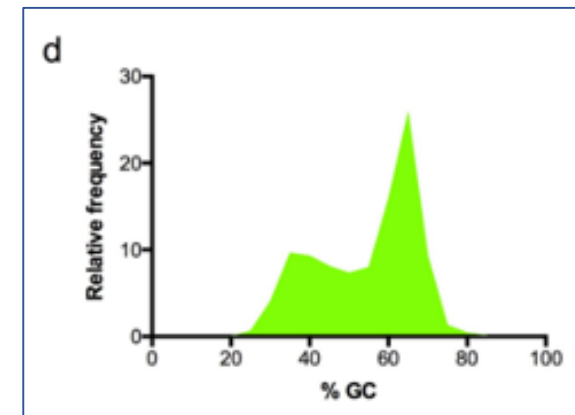
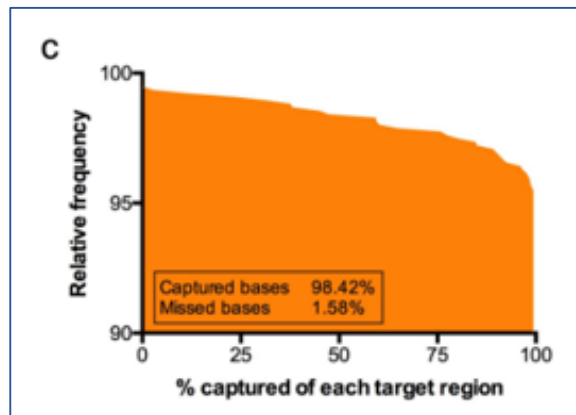
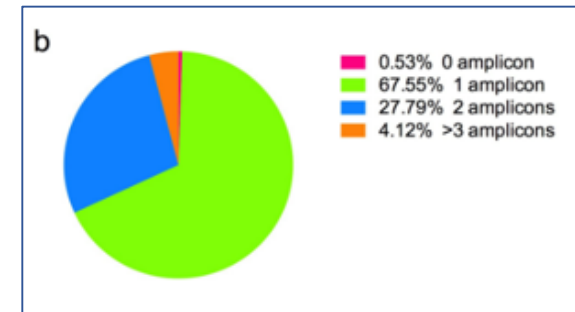
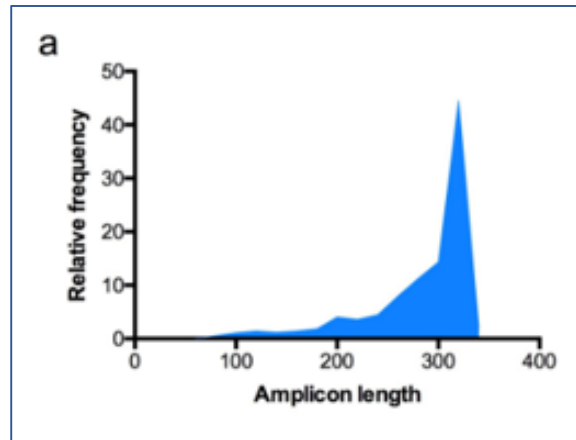
4,1% 3 ampliconi

0,5% nessun amplicone

Copertura totale:

98,4% nt regione target

1,58% in 12 geni non coperto



CONNECTIVE TISSUE PANNEL, CTP: PIPELINE

W
E
T

L
A
B

Creazione di librerie individuali con multiplex PCR
Ligazione di adapter universali e barcode individuo-specifici
Quantificazione librerie con QPCR
Amplificazione di 15 librerie in pool con PCR in emulsione
Sequenziamento delle 15 librerie con Ion S5 su chip Ion 520



D
R
Y

L
A
B

Analisi bioinformatica:
Allineamento delle sequenze con il genoma di riferimento hg19 e
software Ion Torrent Suite v.5.0.2
Identificazione varianti: software Ion Torrent variant caller v.5.0.2.1: file VCF
Annotazione e filtraggio varianti con coverage >10x e MAF <0.01:
software Ion Reporter 5.6
Analisi varianti candidate: Software Alamut Visual 2.15
Verifica varianti: sequenziamento Sanger

243 varianti in media per ogni individuo di cui 16 rare (MAF<0.01)

CONNECTIVE TISSUE PANEL, CTP: CAMPIONI ANALIZZATI

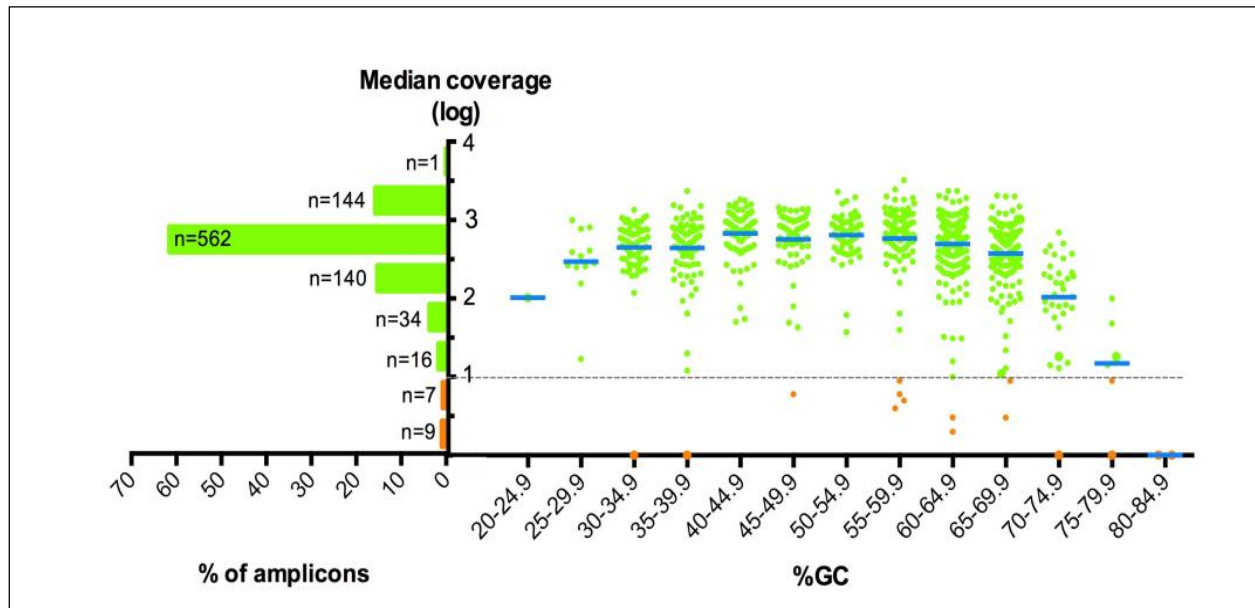
DNA di 90 individui:

Validazione: 38 pazienti con varianti patogenetiche puntiformi già identificate con sequenziamento Sanger e 5 pazienti con CNV patogenetiche note

2 DNA standard con varianti polimorfiche note

32 pazienti con sequenziamento Sanger negativo per alcuni geni candidati

Applicazione: 18 individui con un sospetto clinico di una delle connettivopatie ereditarie associate ai geni presenti nel pannello

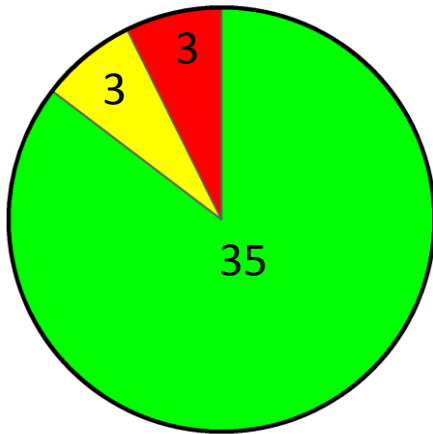


Coverage medio per amplicone: 573x

con più del 98% coperto da un coverage minimo di almeno 10x

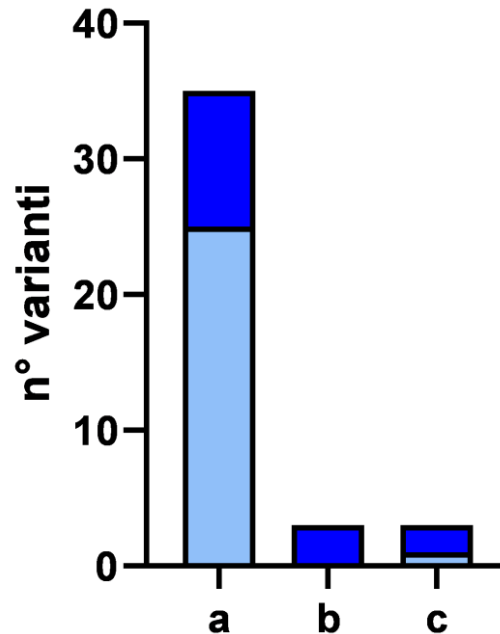
CONNECTIVE TISSUE PANEL, CTP: VALIDAZIONE

SEQUENZIAMENTO DNA DI 38 PAZIENTI CON 41 VARIANTI PATOGENETICHE NOTE



85.37% annotate correttamente
7.32% annotate in modo errato
7.32% non chiamate dal pannello

Totale=41



SNV

INS/DEL

a - annotate correttamente

b - annotate in modo errato

c - non chiamate dal pannello

ANNOTATE IN MODO ERRATO:

1 INS/DEL → Sostituzione puntiforme

2 INS/DELS → due varianti separate

ANALISI DELLE 3 VARIANTI PATOGENETICHE NON CHIAMATE DAL PANNELLO

SMAD3
c.862_871+8del



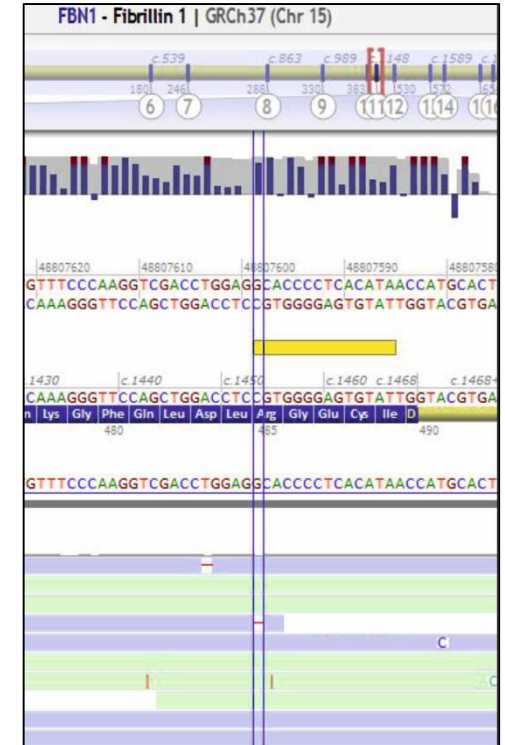
Presente nel file BAM ma non annotata nel File VCF dir/non rev

COL3A1
c.217G>C
p.(Asp73His)



Coverage<10x

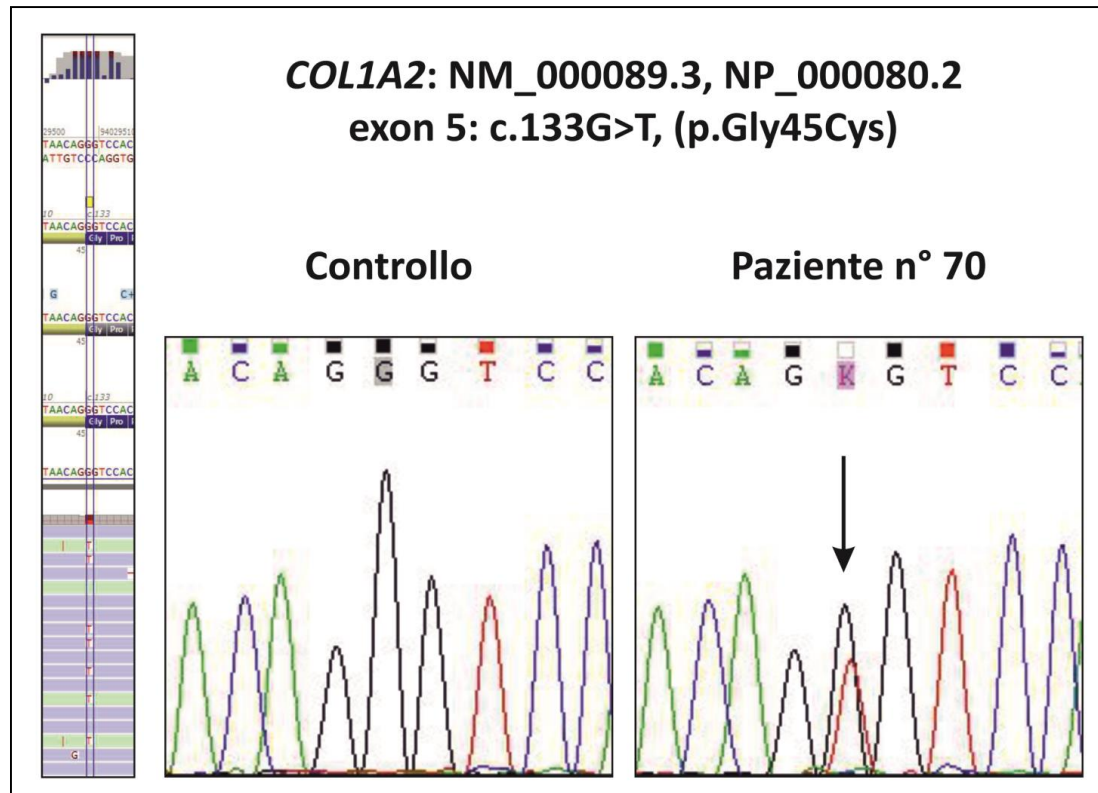
FBN1
c.1453_1466del14ins
GTGGGGGACCTCCGA



Insdel complessa

CONNECTIVE TISSUE PANEL, CTP: VALIDAZIONE

RICERCA DI VARIANTI PATOGENETICHE NEL DNA DI 32 PAZIENTI CON SEQUENZIAMENTO SANGER NEGATIVO PER ALCUNI GENI CANDIDATI



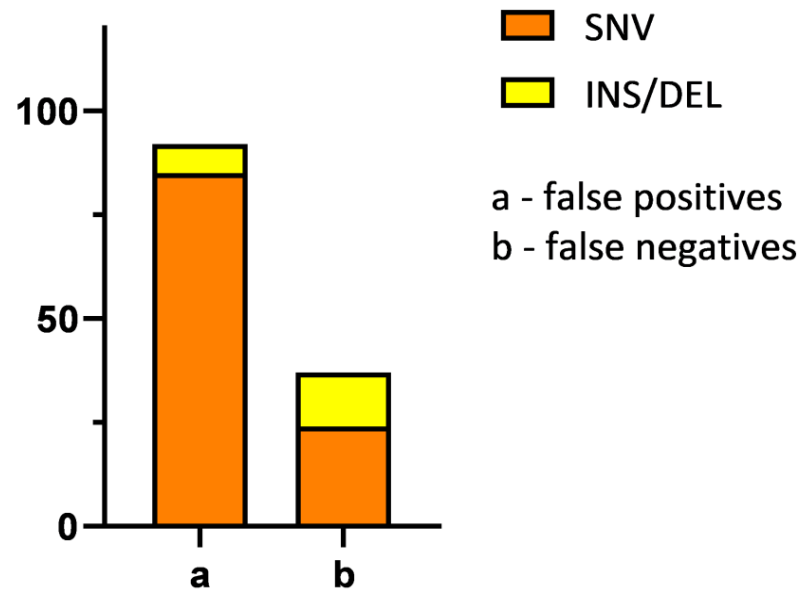
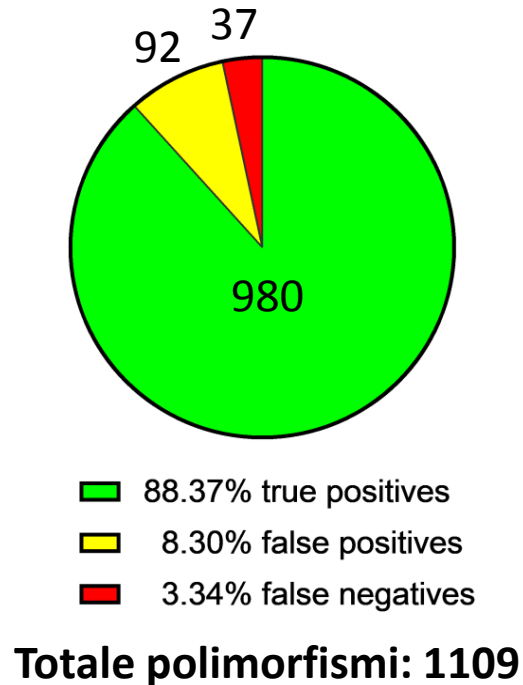
1 di 32 → caratterizzato

31 di 32 → la variante non è presente nei geni del CTP

Analisi esomica, WES

CONNECTIVE TISSUE PANEL, CTP: PERFORMANCE

VARIANTI POLIMORFICHE NEL DNA DEI 70 (38+32) PAZIENTI SEQUENZIATI



ACCURATEZZA = 97%

FDR (false discovery rate) = 4%

Buona performance del pannello confermata dal sequenziamento dei 2 DNA standard in cui erano note 251 varianti polimorfiche nelle regioni coperte dal CTP

con accuratezza > del 98% e FDR del 2%

CONNECTIVE TISSUE PANEL, CTP: APPLICAZIONE SEQUENZIAMENTO DEL DNA DI 18 PAZIENTI MAI INDAGATI

Caratterizzati 12 Pazienti:

- 4: Sindrome di Ehlers-Danlos classica: 3 varianti *COL5A1*, 1 variante *COL1A1*
- 2: Sindrome di Ehlers-Danlos vascolare: 2 varianti *COL3A1*
- 3: Osteogenesi imperfetta: *COL1A1*
- 2: Sindrome di Marfan: *FBN1*
- 1: Sindrome di Loeys-Dietz 1: *TGBR1*

Per 6 pazienti negativi → analisi esomica

Conclusioni

Messa a punto e applicazione di un valido approccio NGS per l'analisi simultanea dei 31 geni per la diagnosi dei disordini di interesse

Acquisizione di know how per lo sviluppo di pannelli NGS

Diagnosi molecolare di 13 pazienti → follow up mirato

Pubblicazioni scientifiche

Multisystemic manifestations in a cohort of 75 classical Ehlers-Danlos syndrome patients: natural history and nosological perspectives.

Ritelli M, Venturini M, Cinquina V, Chiarelli N, Colombi M.

Orphanet J Rare Dis. 2020 Jul 31;15(1):197. doi: 10.1186/s13023-020-01470-0.

Application of the 2017 criteria for vascular Ehlers-Danlos syndrome in 50 patients ascertained according to the Villefranche nosology.

Ritelli M, Rovati C, Venturini M, Chiarelli N, Cinquina V, Castori M, Colombi M.

Clin Genet. 2020 Feb;97(2):287-295. doi: 10.1111/cge.13653. Epub 2019 Nov 3.

COL1-related overlap disorder: A novel connective tissue disorder incorporating the osteogenesis imperfecta/Ehlers-Danlos syndrome overlap.

Morlino S, Micale L, Ritelli M, Rohrbach M, Zoppi N, Vandersteen A, Mackay S, Agolini E, Cocciadiferro D, Sasaki E, Madeo A, Ferraris A, Reardon W, Di Rocco M, Novelli A, Grammatico P, Malfait F, Mazza T, Hakim A, Giunta C, Colombi M, Castori M.

Clin Genet. 2020 Mar;97(3):396-406. doi: 10.1111/cge.13683. Epub 2019 Dec 12.

Truncating variants in the penultimate exon of TGFBR1 escaping nonsense-mediated mRNA decay cause Loey's-Dietz syndrome. Ritelli M, Monetta R, Cinquina V, Camerota L, Zoppi N, Rigon C, Boaretto F, Fortugno P, Angelucci F, di Cesare E, De Paulis R, Salviati L, Colombi M, Brancati F. 2021 Npj Genomic Med, submitted

Atypical variants in COL1A1 and COL3A1 leading to classical/vascular Ehlers-Danlos Syndrome overlap phenotypes: expanding the clinical phenotype based on additional case reports. Colman M, Ritelli M, Ferraris A, Alberto Sulli, Frank C, Grunert J, Zschocke J, Castori M, Micale L, van Dijk F, Ghali N, Demidras S, van de Laar I, Giunta C, Rohrbach M, Frank M, Robert L, Vandersteen A, Byers P, Colombi M, Malfait F. 2021 ERN network, in preparation

**Dipartimento di
Medicina Molecolare
e Traslazionale**

Sezione di Biologia e Genetica:

Prof.ssa Marina Colombi
Dott. Marco Ritelli
Dott. Nicola Chiarelli
Dott.ssa Valeria Cinquina

Panel design

Prof. Giuseppe Borsani
Dott. Edoardo Giacomuzzi
Dott.ssa Viola Ravasio

**Dipartimento di Scienze Cliniche
e Sperimentali**

Clinical evaluation

Prof.ssa Marina Venturini

