



Workshop “Genomics Day@unibs”

ORGANIZZATORI

Giuseppe Borsani, Massimo Gennarelli

Maurizio Memo

Programma scientifico

• **Edoardo Giacomuzzi:** *La Piattaforma di Analisi Genetiche e Genomiche di AgroFood Lab, una risorsa per la genomica a Brescia. Dal sequenziamento NGS all'analisi dei dati.* DMMT, Sezione di Biologia e Genetica

The Genetics and Genomics Analysis Platform (G&GAP) is a research facility providing Next Generation Sequencing data generation and analysis for investigators interested in exploring genomics, transcriptomics, epigenomics and metagenomics. NGS is performed on either Life Technologies (Ion Proton and Ion S5) or Illumina (MiSeq) instruments. Whole Genome Sequencing or large NGS projects are managed through Macrogen service provider and data are analyzed in house. Supported by CINECA and the Big & Open Data Innovation Laboratory of the University of Brescia, the Platform can process and store data for small/medium-scale projects. The Platform offers support in study design and data analysis to achieve effective and interpretable results. Additional services include the use of large genomic datasets available from public repository to support or integrate user's data.

The Genetics and Genomics Analysis Platform is part of the AgroFood Laboratory, coordinated by Dr. Gianni Gilioli and is located building A of the Department of Molecular and Translational Medicine (DMMT) of the University of Brescia. It's funded as part of the Fondazione Cariplo project “La salute della persona: lo sviluppo e la valorizzazione della conoscenza per la prevenzione, la diagnosi precoce e le terapie personalizzate” under the direction of Prof. Maurizio Memo

• **Francesca Todaro:** *Studio delle basi genetiche delle malattie infiammatorie croniche intestinali mediante Next-Generation Sequencing.* DSCS / Spedali Civili di Brescia

Le Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali (MICI) rappresentano un gruppo eterogeneo di patologie la cui incidenza si dimostra essere in continuo aumento. Alcune di queste forme possono essere dovute a difetti immunologici riscontrati anche nelle immunodeficienze primitive. Obiettivo del nostro studio è di identificare le alterazioni patogenetiche in geni noti e non-noti responsabili del fenotipo clinico. Tuttavia, l'approccio diagnostico utilizzato per identificare le cause genetiche di queste malattie deve imprescindibilmente avvalersi delle tecnologie di sequenziamento di nuova generazione (NGS), in quanto le tecniche di sequenziamento tradizionali con metodo Sanger

richiedono troppo tempo e consentono di analizzare solo un gene alla volta. I pazienti verranno analizzati con un pannello NGS che comprende circa 70 geni potenzialmente associati a manifestazioni cliniche Crohn Disease-like. Non sempre tuttavia questo potrebbe dare una risposta al sospetto clinico, quindi i pazienti potranno essere sottoposti a sequenziamento mediante whole exome sequencing, al fine di analizzare tutte le porzioni codificanti e le regioni di splicing che rappresentano circa il 2% del genoma, ma che contengono intorno all'85% delle alterazioni genetiche note come responsabili di malattie.

• **Marco Ritelli:** *NGS nella diagnosi molecolare di sindromi di Ehlers-Danlos e connettivopatie ereditarie relate.* DMMT, Sezione di Biologia e Genetica

Nella nuova classificazione delle sindromi di Ehlers-Danlos (EDS) sono riconosciuti 13 tipi diversi per 12 dei quali, ad eccezione del tipo ipermobile le cui basi genetiche rimangono sconosciute, l'identificazione della(e) variante(i) patogenetica(che) nei geni causali è considerata fondamentale per porre la diagnosi certa. I geni alla base delle EDS sono 19 e codificano per diversi collagene (I, III, V, XII), oltre che per proteine coinvolte in folding e modificazioni post-traduzionali dei collagene, nella sintesi dei glicosaminoglicani, in pathway intracellulari e nella formazione del complemento. Le metodologie per la diagnosi molecolare delle EDS in uso presso il nostro laboratorio, unico centro in Italia ad offrire il test genetico per tutte le EDS e le principali connettivopatie in diagnosi differenziale, sono il sequenziamento Sanger di singoli geni nei casi in cui la diagnosi clinica sia fortemente suggestiva e tecniche di NGS nei casi meno chiari e/o sovrapposti ad altri disordini ereditari dei connettivi. Saranno presentati degli esempi di diagnosi molecolare raggiunta con successo mediante WES usando la piattaforma Ion Proton e saranno illustrati i risultati preliminari della messa a punto di un pannello NGS per la diagnosi delle EDS e di connettivopatie relate a coinvolgimento vascolare nell'ambito del progetto di Ateneo finanziato Health&Wealth SPEED-GENE.

• **Isabella Zanella:** *Applicazioni NGS in diagnostica molecolare.* DMMT / Laboratorio di Biotecnologie, Spedali Civili di Brescia

Il Laboratorio di Biotecnologie dal 1986 si occupa di tecnologie molecolari per lo studio degli acidi nucleici come marcatori di patologia in diverse malattie. In quest'area della diagnostica di laboratorio ha elaborato e messo a punto diverse tecnologie e metodi di studio biologico-molecolari. Dai primi anni '90 la focalizzazione delle attività del laboratorio si è rivolta alle malattie genetiche. In particolar modo riguardanti malattie neurologiche (Frontotemporale, Alzheimer, Parkinson), oncologiche (Sindrome di Lynch, Poliposi Adenomatosa Familiare, Cancro allo stomaco), infiammatorie (Morbo di Crohn), endocrine (Sindromi Adrenogenitali dovute a mutazioni negli enzimi della steroidogenesi) e cardiovascolari (Trombofilie). Le tecnologie molecolari sviluppate in laboratorio per lo studio di queste malattie hanno contribuito negli anni a consolidare l'esperienza del personale laureato e tecnico in quest'ambito. L'incremento continuo delle attività diagnostiche di genetica in questi anni ha reso necessario un up-date continuo delle tecnologie impiegate in un regime di qualità e certificazione. Tale sviluppo è stato possibile anche con il reperimento di risorse esterne nell'ambito di finanziamenti nazionali ed europei. Il laboratorio ospita ininterrottamente borsisti, laureandi, tirocinanti e studenti sviluppando progetti di ricerca e tesi su tematiche diagnostico molecolari.

• **Chiara Magri:** *Sequenziamento dell'esoma di pazienti schizofrenici con elevati livelli di autozigosità: ruolo del sistema glutammatergico e GABAergico.* DMMT, Sezione di Biologia e Genetica

L'inbreeding determina la formazione di regioni di autozigosità, cioè di tratti del genoma in omozigosi e identici per discendenza. L'autozigosità aumenta la probabilità di ereditare alleli deleteri recessivi in omozigosi, per questo motivo è considerata un fattore di rischio per le malattie

autosomiche recessive. Recenti studi suggeriscono che l'autozigosità possa essere un fattore di rischio anche per le patologie multifattoriali quali la schizofrenia. Per chiarire il ruolo delle regioni di autozigosità nella schizofrenia, mediante "Whole Exome Sequencing" e analisi d'arricchimento genico, abbiamo valutato la presenza di varianti di predisposizione alla schizofrenia nelle regioni di omozigosità di pazienti con livelli di autozigosità elevati. Dall'analisi è emerso che fra i geni con mutazioni omozigoti rare funzionali vi era un arricchimento significativo di geni già trovati associati alla schizofrenia. Inoltre, sono state identificate mutazioni deleterie, nuove o estremamente rare, in geni coinvolti nel neurosviluppo e nella trasmissione sinaptica GABAergica e glutammatergica. Questi risultati suggeriscono che l'autozigosità possa essere un fattore di rischio per la schizofrenia poiché aumenta la probabilità di ereditare una combinazione di varianti funzionali rare in omozigosi in geni con un ruolo cardine nell'eziopatogenesi della schizofrenia.

• **Stefano Calza:** *Statistical and computational methods in bioinformatics and genomics*. DMMT, Sezione di Farmacologia

Abstract non disponibile

• **Maurizio Castellano:** *Predisposizione genetica a neoplasie*. DSCS / Laboratorio di Medicina Molecolare, Spedali Civili di Brescia

Abstract non disponibile

• **Simona Bernardi:** *Conoscere il genoma per curare le leucemie*. DSCS, Cattedra di Ematologia / Spedali Civili di Brescia

Le nuove tecniche di studio del genoma sono essenziali in ambito onco-ematologico. Il Next Generation Sequencing (NGS), al quale ci siamo approcciati già da diversi anni, è una tecnologia che applichiamo sia all'ambito diagnostico, sia a quello di ricerca. In particolare, applichiamo l'NGS in routine diagnostica per la caratterizzazione genomica delle Leucemie Acute Mieloidi mediante un approccio di gene-target resequencing. Siamo inoltre focalizzati sullo studio delle Leucemie Acute Mieloidi di tipo famigliare, nel quale affianchiamo NGS al convenzionale Sanger Sequencing. Oltre all'interesse verso le Leucemie Acute Mieloidi, vi è quello per la caratterizzazione delle Mielodisplasie, condizioni pre-leucemiche che necessitano di un approccio genomico dedicato e mirato finalizzato al riconoscimento di signature predittive-prognostiche, per la quale abbiamo ottenuto un finanziamento PRIN. L'NGS, nello specifico il gene-target resequencing, è una tecnologia che stiamo applicando anche allo studio delle patologie mieloproliferative croniche, in particolare della mielofibrosi, sulla quale i dati in letteratura sono ancora discordanti. Da diversi anni siamo inoltre coinvolti nell'applicazione del NGS per lo studio degli antigeni maggiori e minori di istocompatibilità per un'applicazione in ambito trapiantologico.

• **Luisa Lorenzi:** *Genomica del sarcoma a cellule follicolari dendritiche (FDCS)*. DMMT / U.O. Anatomia Patologica, Spedali Civili di Brescia

FDCS è una rara neoplasia mesenchimale derivata da speciali cellule stromali del centro germinativo. Insorge in età adulta, in diverse sedi (nodali ed extranodali), recidiva in un quarto dei casi ed è letale in un quinto. Non sono note né alterazioni cromosomiche né mutazioni geniche specifiche. La mutazione di BRAFV600E è stata identificata in 5/59 casi analizzati in 4 studi, alterazioni della pathway di NFκB e dei geni della regolazione del ciclo cellulare sono stati evidenziati in circa il 30% dei casi in un singolo studio. Nel contesto di uno studio multicentrico abbiamo esaminato una casistica di 31 FDCS valutando l'espressione genica di micro RNA [Hartmann *et al.*] e di RNA messaggero [Laginestra *et al.*] e abbiamo eseguito NGS-RNaseq in due casi [Lorenzi *et al.*]. Questi

studi hanno permesso di identificare un profilo genico che differenzia l'FDCCS da altre neoplasie mesenchimali, riconoscendo inoltre due sottogruppi di FDCCS associati a diversa prognosi; infine, sono stati identificati nuovi marcatori utili alla diagnosi di questa neoplasia. Mediante NGS-DNAseq di un singolo caso abbiamo identificato e validato 10 nuove mutazioni su altrettanti geni che verranno inclusi, con altri, in pannello di ultra-deep sequencing di ampliconi (Illumina) da cimentare su 44 casi di FDCCS.

• **Elisabetta Grillo:** *Ricerca di mutazioni rare in domini conservati con LowMACA: il caso di VEGFR2.* DMMT, Sezione di Biotecnologie

L'espressione del recettore tirosino-chinasico VEGFR2 è alterata in vari tipi di tumori ed è associata a chemio-resistenza e ridotta sopravvivenza. Gli inibitori di VEGFR2 hanno scarsa efficacia terapeutica probabilmente in seguito alla selezione di cellule tumorali esprimenti forme mutate del recettore. Sorge pertanto la necessità di sviluppare nuovi approcci per l'identificazione di mutazioni di VEGFR2 clinicamente rilevanti. Analisi NGS evidenziano 500 diverse alterazioni nel gene di VEGFR2 nei tumori umani, sebbene nessuna appare essere significativamente correlata alla progressione tumorale. Abbiamo quindi sviluppato un nuovo algoritmo per l'analisi di mutazioni geniche non-sinonime a bassa frequenza (LowMACA) basato sull'assunto che tali mutazioni abbiano alta probabilità di essere conservate in diversi geni della stessa famiglia, alterando in modo simile la struttura/funzione delle corrispondenti proteine. Abbiamo così identificato 6 mutazioni conservate nella sequenza consensus del dominio chinasico dei recettori della famiglia PFAM07714. Tali mutazioni colpiscono aminoacidi biologicamente rilevanti di VEGFR2. Dati preliminari confermano che tali mutazioni alterano l'attività chinasica del recettore. Ulteriori studi sono in corso per valutare il loro impatto sulla progressione tumorale.

• **Elisa Rossini:** *Ottimizzazione della terapia farmacologica dei tumori.* DMMT, Sezione di Farmacologia

Le antracicline sono una classe di farmaci utilizzati nel trattamento di molti tumori solidi e liquidi. Sono farmaci efficaci, ma gravati dallo sviluppo di una cardiotossicità (CTX) a lungo termine, che si può manifestare in alcuni pazienti anche dopo la somministrazione di bassi dosaggi, suggerendo un ruolo per il profilo genetico del paziente. Evidenze suggeriscono il coinvolgimento di alcuni geni coinvolti nel metabolismo e trasporto delle antracicline. È quindi in corso nel nostro laboratorio, in collaborazione con l'U.O. di Cardiologia e la S.S.V.D. Breast Unit, uno studio clinico per evidenziare se mutazioni di questi geni possono essere predittivi di un maggior rischio di CTX in pazienti affette da carcinoma mammario (BC). Un altro farmaco utilizzato nella terapia di BC metastatico è l'acido zoledronico (ZA), che inibisce anche direttamente la proliferazione di cellule di BC. Abbiamo recentemente dimostrato che l'azione inibente di ZA riduce i livelli di miRNA-21, suggerendo quindi che miRNA specifici potrebbero essere così caratterizzati come biomarcatori di risposta alla terapia. Alla luce di queste osservazioni, stiamo disegnando uno studio clinico-biologico nel quale vorremmo validare specifici miRNA circolanti come biomarcatori di risposta in alcuni tipi di tumori, quali per esempio, il carcinoma della corticale del surrene ed il tumore del testicolo.

• **Giuseppina De Petro / Edoardo Abeni:** *Il Sorafenib genera variazioni del metiloma del DNA in cellule tumorali derivate da HCC.* DMMT, Sezione di Biologia e Genetica

Alterazioni epigenetiche, inclusi i cambiamenti del profilo globale della metilazione del DNA, giocano un ruolo rilevante nei processi di sviluppo e progressione tumorale, in particolare dell'epatocarcinoma cellulare (HCC). Il Sorafenib (sf: una piccola molecola disegnata come inibitore di chinasi a largo spettro) è un farmaco attualmente utilizzato per trattare i casi di HCC non operabile ed i casi di HCC avanzato. Poco si conosce a livello molecolare sugli effetti downstream generati dal sf nelle cellule di HCC. Utilizzando la procedura di MeDip associata alla tecnologia –promoter array-

(MeDip-chip) è stato possibile identificare le variazioni del metiloma del DNA in cellule di HCC trattate con sf. In particolare sono state identificate 1290 DMR (DMR=differentially methylated regions, 46% DMR ipometilate e 54% DMR ipermetilate) corrispondenti a 1230 geni (89% protein coding genes, 3% long ncRNA, 1% microRNA, 3% pseudogenes, 4% geni non noti). Tra i geni codificanti proteina, numerosi sono quelli coinvolti in processi di apoptosi, angiogenesi ed invasività.

• Lara Faggi: *Epigenetica e ischemia cerebrale: ChIP, ChIP-on-chip e metilazione del DNA per studiare geni e fattori trascrizionali coinvolti nel danno ischemico*. DMMT, Sezione di Farmacologia

Meccanismi epigenetici associati alla metilazione del DNA, come alla acetilazione di istoni e fattori di trascrizione, hanno un ruolo fondamentale nei processi neurodegenerativi. Mediante studi di immunoprecipitazione cromatinica (ChIP) abbiamo dimostrato che in corso di ischemia cerebrale aumenta la acetilazione istonica a livello di promotori per geni pro-apoptotici e pro-infiammatori, mentre diminuisce quella a livello di promotori per geni antiapoptotici. A questo si associa una acetilazione sito-specifica del fattore NF- κ B che guida l'interazione con i promotori e la successiva espressione di geni di apoptosi e infiammazione. Farmaci inibitori di istone deacetilasi di classe I associati ad attivatori di sirtuina sono in grado di ripristinare l'epigenetica originale risultando neuroprotettivi. Nostro interesse è valutare mediante tecnica di ChIP-on-chip ampi pannelli di geni coinvolti nei processi neurodegenerativi e studiare i meccanismi di metilazione del DNA come di espressione di microRNA che possono rispondere ad una modulazione farmacologica.