



UNIONE EUROPEA
Fondo europeo di sviluppo regionale



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA DE SARDIGNA
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA



Nuove tecnologie diagnostiche non invasive basate sul sequenziamento di nuova generazione

Malattie Rare – La ricerca per la vita
3 Marzo 2018

Paolo Uva
CRS4 Biosciences
NGS Core facility
Pula CA, Italy

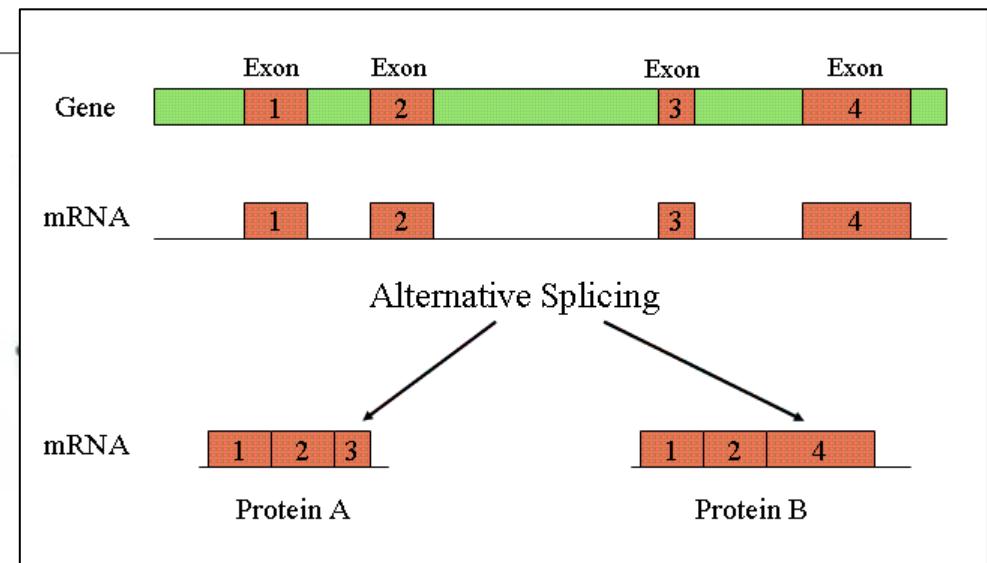
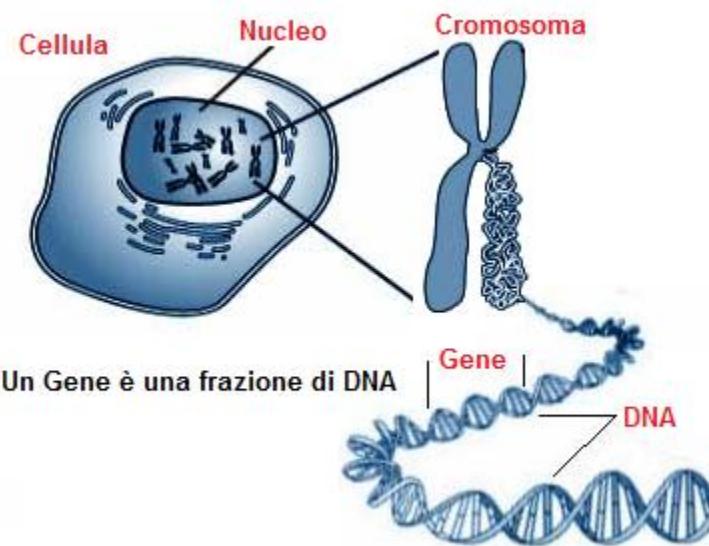


Agenda

- Sequenziamento Nuova Generazione (NGS)
- Metodi non invasivi:
 - NIPT e recenti progressi per lo studio di malattie monogeniche
 - Altre applicazioni (biopsia liquida)

Cosa è il DNA

STRUTTURA DEL DNA

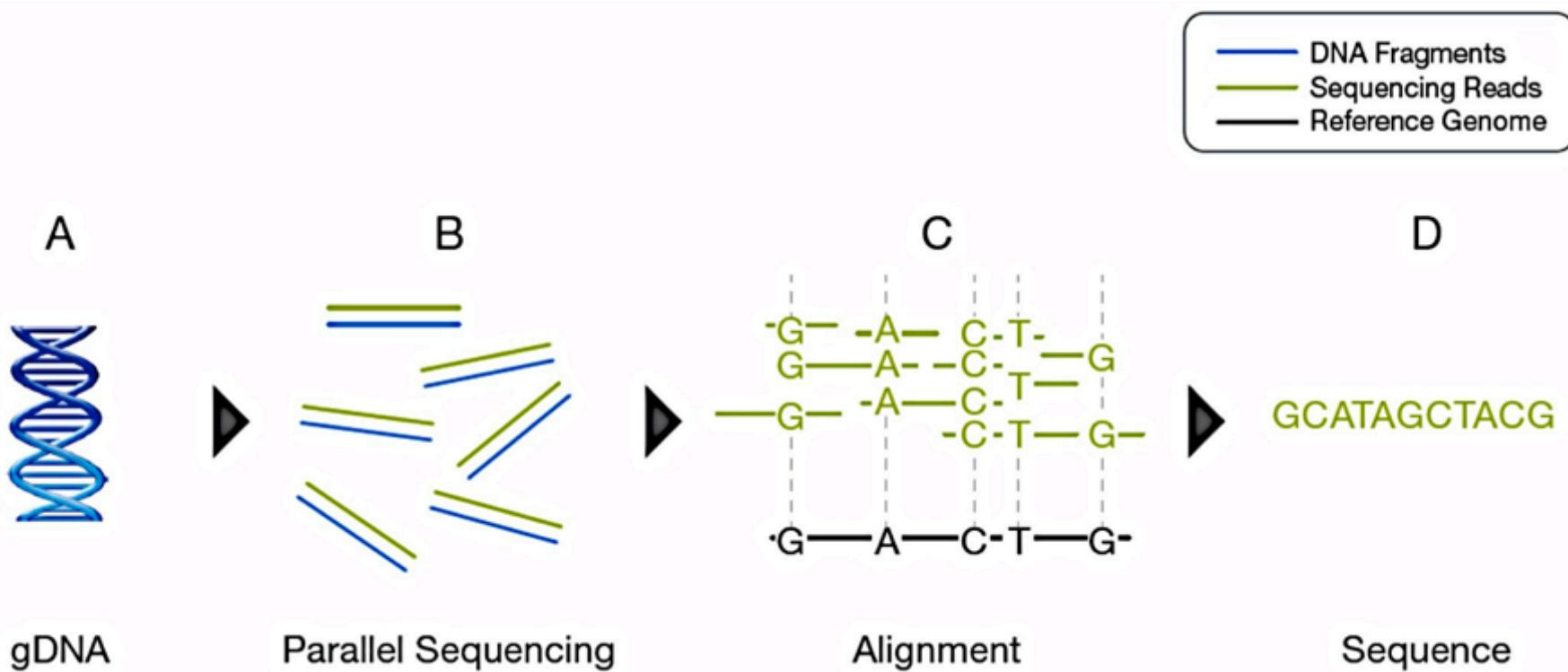


Il DNA umano contiene circa 3 miliardi di paia di basi (A,C,G,T), suddivise in cromosomi.

Il **sequenziamento** è la lettura delle basi del DNA

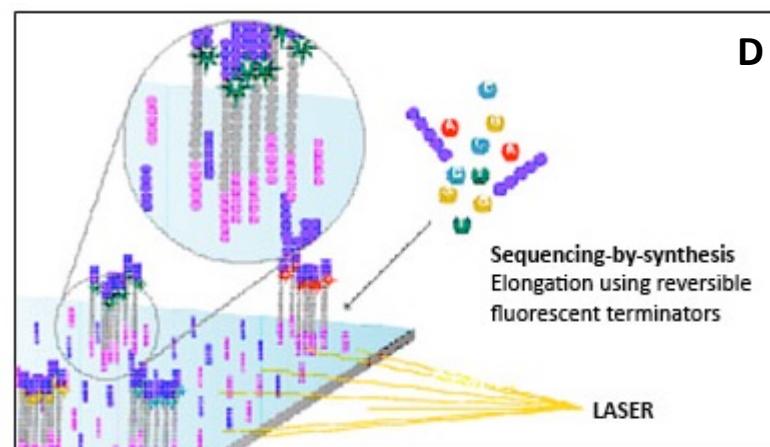
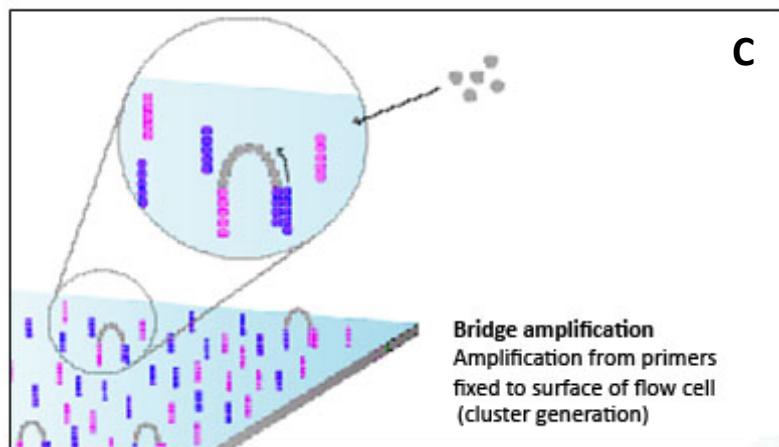
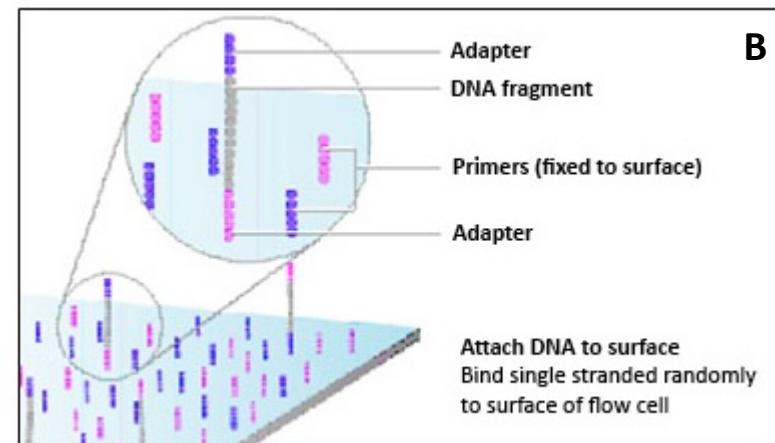
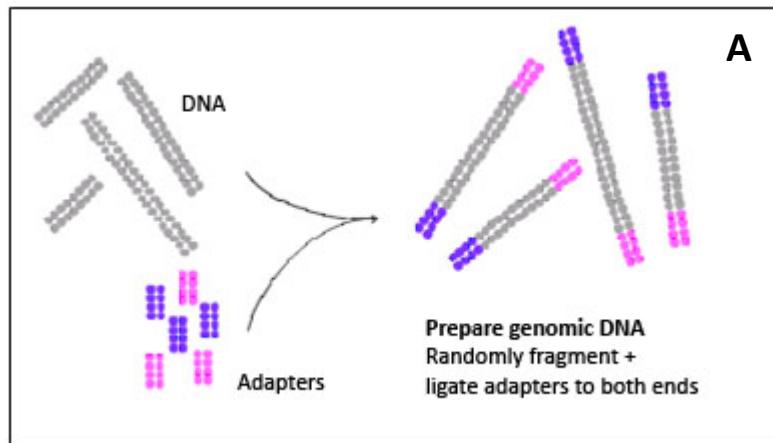
Next-Generation Sequencing (NGS)

Conceptual overview of Whole-Genome Sequencing (WGS)



- A. Extracted gDNA.
- B. gDNA is fragmented into a library of small segments that are each sequenced in parallel.
- C. Individual sequence reads are reassembled by aligning to a reference genome.
- D. The whole-genome sequence is derived from the consensus of aligned reads.

Next Generation Sequencing

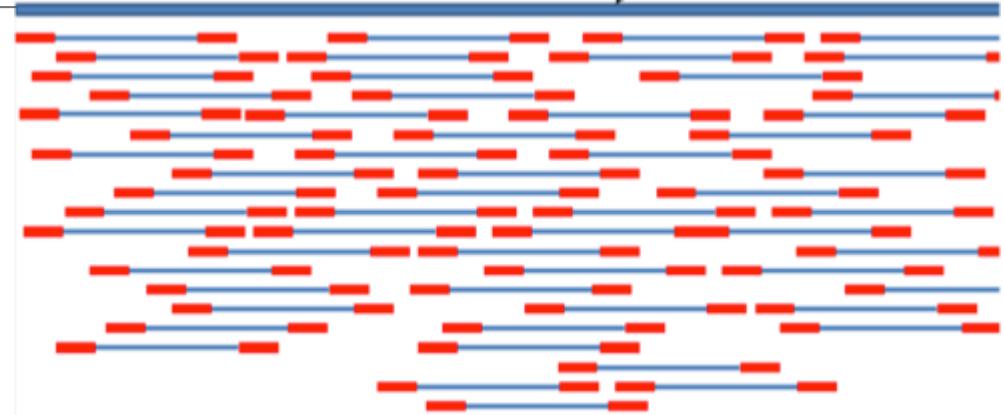


*Sequencing by synthesis, Illumina Inc.

Sequenziamento classico (Sanger)



Sequenziamento Nuova Generazione



Sequenziamento Sanger

- Sequenze lunghe
- Poche sequenze
- **Costo più alto**
- Basso tasso di errore

Sequenziamento NGS

- Sequenze corte
- Milioni di sequenze
- **Minor costo**
- Ridondanza per compensare errori di lettura

Dal DNA al sequenziamento NGS

Analisi

Allineamento delle sequenze generate sul genoma umano di riferimento

Dalle sequenze all'identificazione di mutazioni

A ID3131: *MYH7* (p.Y162H)

B ID3236: *ILK* (p.P70L)



Analisi

Identificazione delle varianti

Malattie Rare - perché sequenziare?

Per Identificare mutazioni RARE (a bassa frequenza nella popolazione) che causano la malattia

Due individui qualunque condividono il **99.9%** delle sequenze di DNA

DNA sequence variants

We are all different from each other

Il rimanente 0.1% determina l'unicità dell'individuo



Ogni persona ha una sequenza di DNA che la rende diversa da ogni altra

0.1% delle differenze tra due individui



Variazioni a livello delle singole basi (conversione di una base in un'altra, delezione, inserzione)

- **SNP** (Single Nucleotide Polymorphisms) -



VARIAZIONI
SENZA EFFETTI

VARIAZIONI INNOCUE

(es. legate all'aspetto esteriore, alla
capacità di arrotolare la lingua, ecc...)

**TENDENZA A SVILUPPARE
MALATTIE**



Individuo SANO ma con
una proteina con
funzionamento alterato

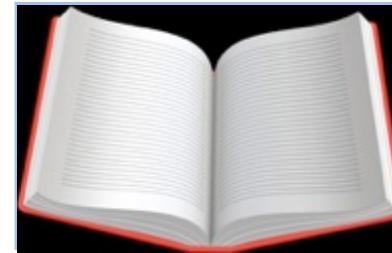
Individuo SANO

Senza effetti

Patogenetica

Innocua

Anomalie genetiche



Genoma

Capitolo:
Cromosoma

Paragrafo:
Microdelezioni
Microduplicazioni

Lettera:
Mutazioni
puntiformi

Cariotipo



Microarray



Sequenziamento



CRS4 – NGS Core Facility

Pula – Polaris

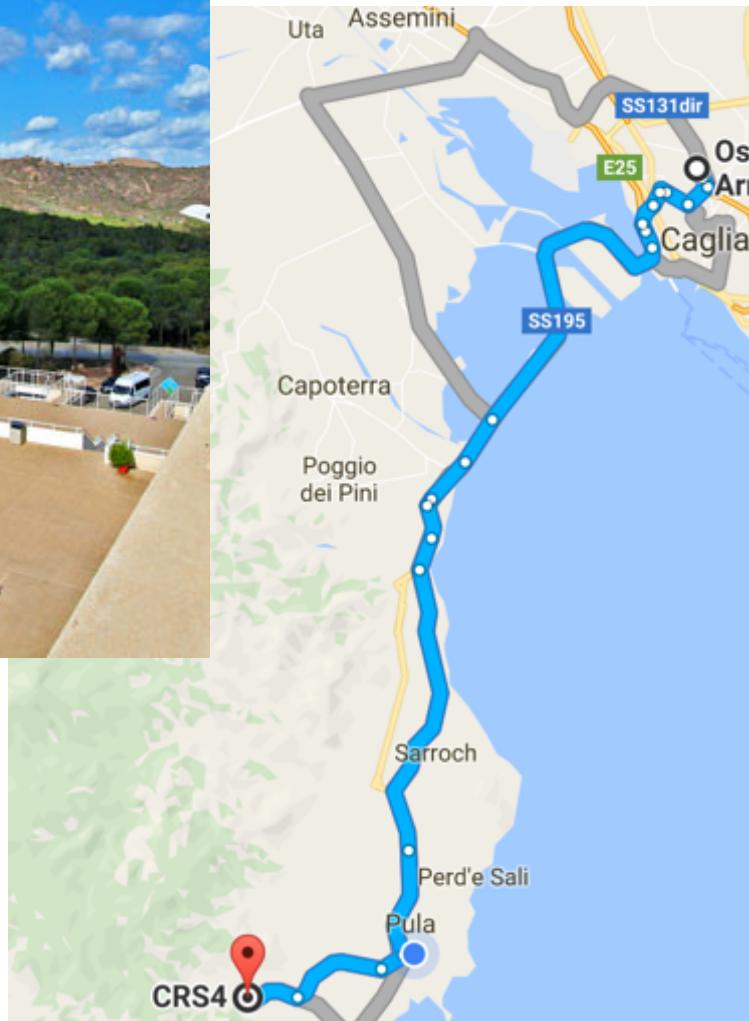
- High-throughput NGS facility
 - La più **grande** piattaforma di sequenziamento NGS in Italia
 - x000 genomi, x000 RNA-Seq, x00 esomi
- Centro di calcolo
 - Tra i top 5 in Italia, **3200+ processori, Pb spazio disco**
- Piattaforma di analisi
 - Metodi per la gestione e l'analisi dei dati di sequenziamento



Dove siamo



CRS4 NGS Core Facility
Parco Scientifico e Tecnologico Polaris
09010 – Pula, Cagliari



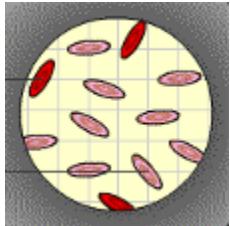
Test pre-natale non invasivi per malattie genetiche

	Falsi positivi
Età materna	5-25%
Screening biochimico	5%
Translucenza nucleare	5%
<i>Test integrato</i>	2-5%
DNA fetale circolante	<1%

Dov'è presente il DNA fetale?

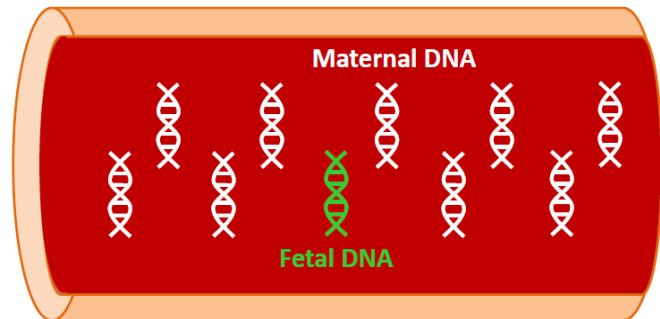


■ Le cellule di origine fetale sono presenti nel sangue materno



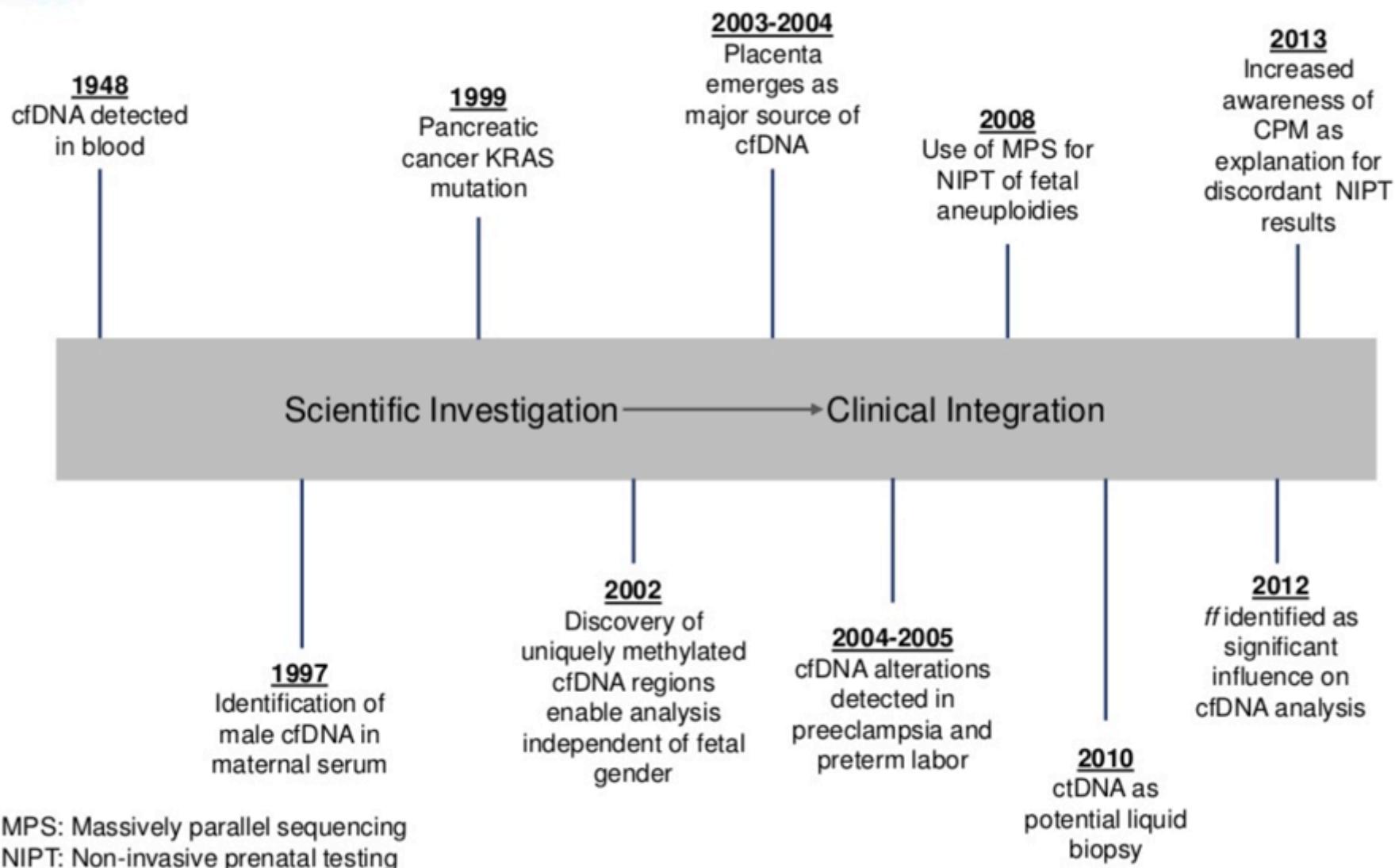
- Separazione delle cellule materne e fetal
- Poche cellule fetal disponibili: necessario arricchimento

■ DNA fetale cell-free (cffDNA) nel sangue materno



- Il cffDNA è presente in quantità maggiore rispetto al DNA nelle cellule fetal circolanti (20-100x)
- Rappresenta ~10% del DNA circolante totale
- Rimosso dal sangue materno in < 24h

Discovery of cfDNA: historical developments



MPS: Massively parallel sequencing
 NIPT: Non-invasive prenatal testing
 CPM: Confined placental mosaicism
 ff: fetal fraction

Discovery of cfDNA: historical developments

1948
cfDNA detected
in blood

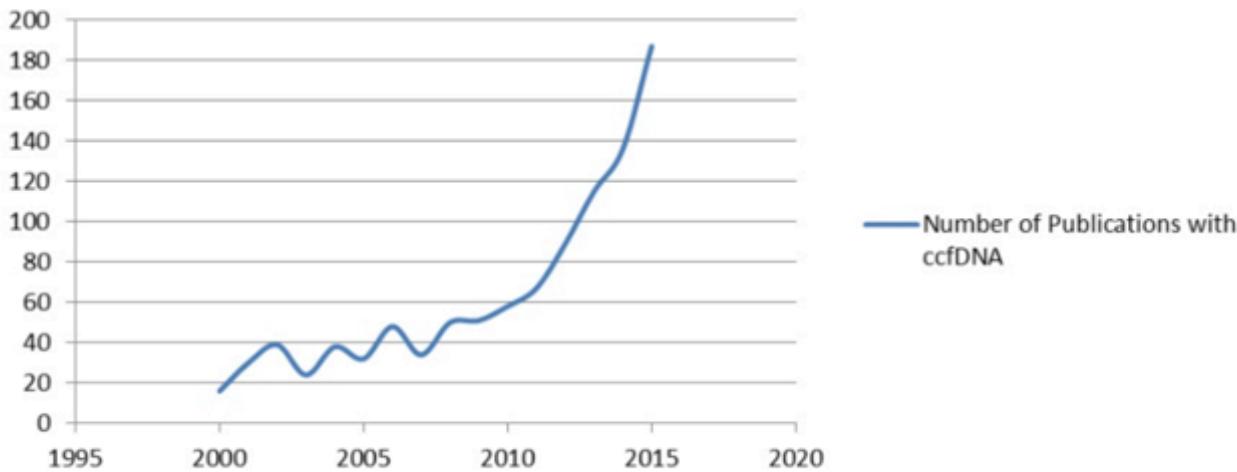
1999
Pancreatic
cancer KRAS
mutation

2003-2004
Placenta
emerges as
major source of
cfDNA

2008
Use of MPS for
NIPT of fetal
aneuploidies

2013
Increased
awareness of
CPM as
explanation for
discordant NIPT
results

Number of PubMed Publications



Number of Publications with
ccfDNA

2012
ff identified as
significant
influence on
cfDNA analysis

2010
ctDNA as
potential liquid
biopsy

MPS: Massively parallel sequencing
NIPT: Non-invasive prenatal testing
CPM: Confined placental mosaicism
ff: fetal fraction

Modified from: Taglauer, E.S., Wilkins-Haug, L. and Bianchi, L.W. 2014. Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. Placenta 35, S64-68

Fattori chiave per NIPT

Not Invasive Prenatal Testing

- Frazione fetale: la percentuale di DNA fetale presente all'interno del plasma materno è un fattore determinante per l'accuratezza del NIPT. Percentuali inferiori al 5-10% rendono il test poco affidabile
 - ➔ determinazione del DNA fetale
 - Coverage/profondità di sequenziamento: numero medio di letture per base. Maggiore il coverage, più accurato (e più costoso) il test

A ID3131: *MYH7* (p.Y162H)

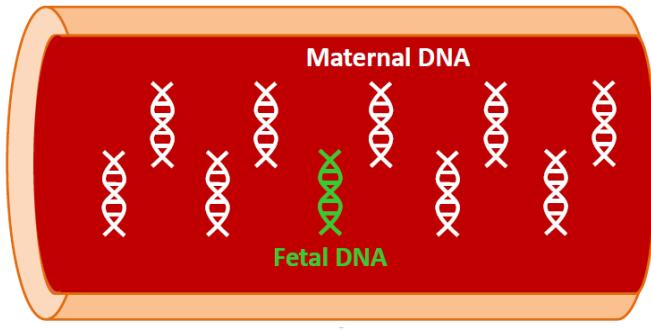
B ID3236: *ILK* (p.P70L)

Fattori chiave per NIPT

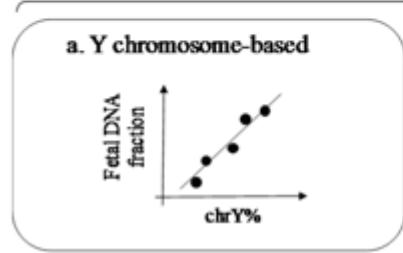
Not Invasive Prenatal Testing

- Frazione fetale: la percentuale di DNA fetale presente all'interno del plasma materno è un fattore determinante per l'accuratezza del NIPT. Percentuali inferiori al 5-10% rendono il test poco affidabile
 - ➔ determinazione del DNA fetale
- Coverage/profondità di sequenziamento: numero medio di letture per base. Maggiore il coverage, più accurato (e più costoso) il test
- Analisi bioinformatica: lo sviluppo di nuove soluzioni per l'analisi dei dati consente di aumentare l'accuratezza del test
 - ➔ NIPT di seconda generazione

Determinazione della frazione fetale

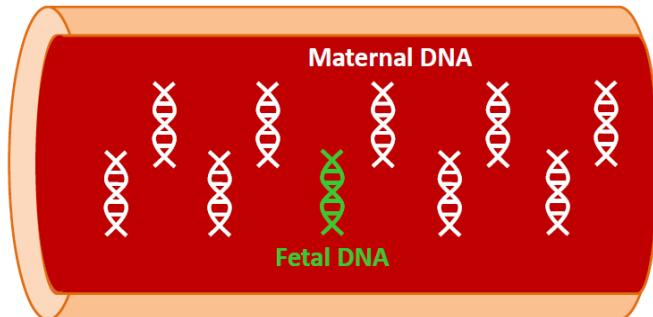


Approaches for fetal DNA
fraction determination

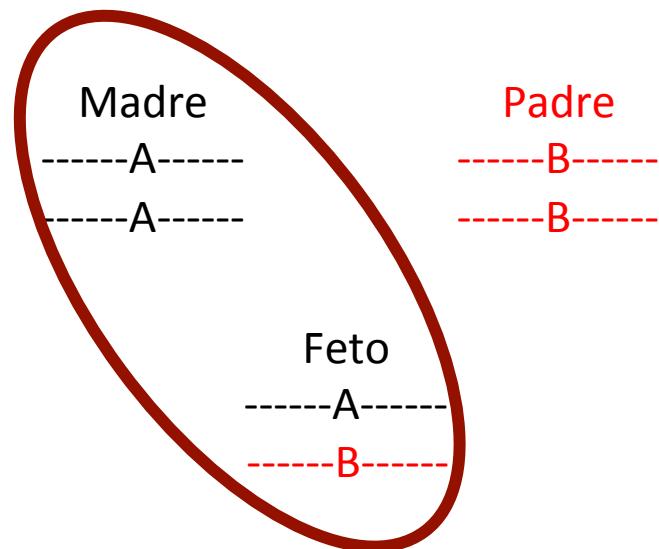
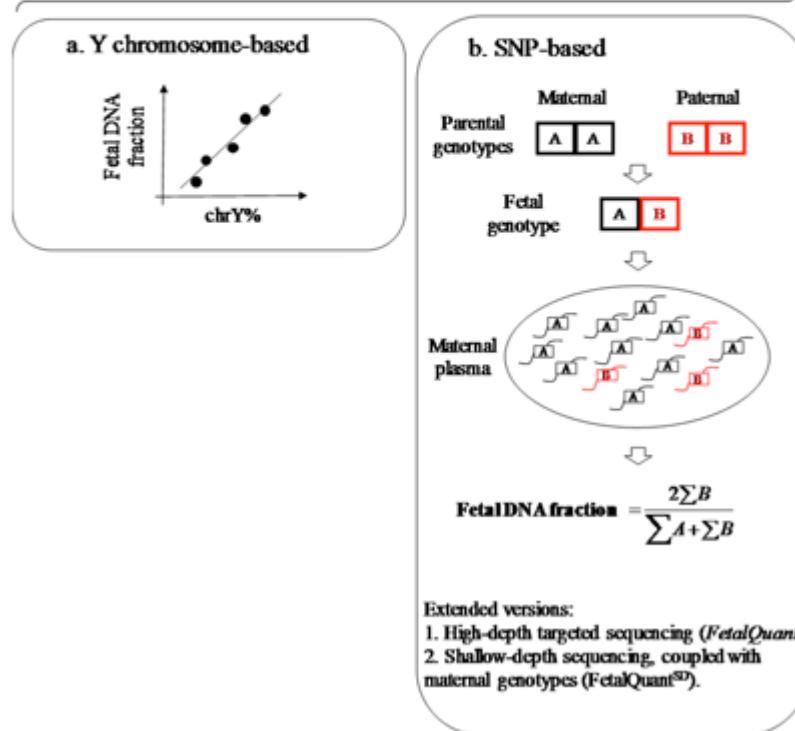


Proporzione di sequenze che allineano sul
chr Y (solo per feti di sesso maschile)

Determinazione della frazione fetale

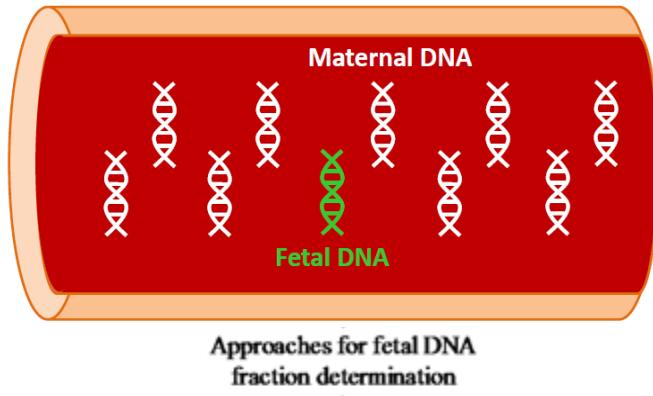


Approaches for fetal DNA fraction determination



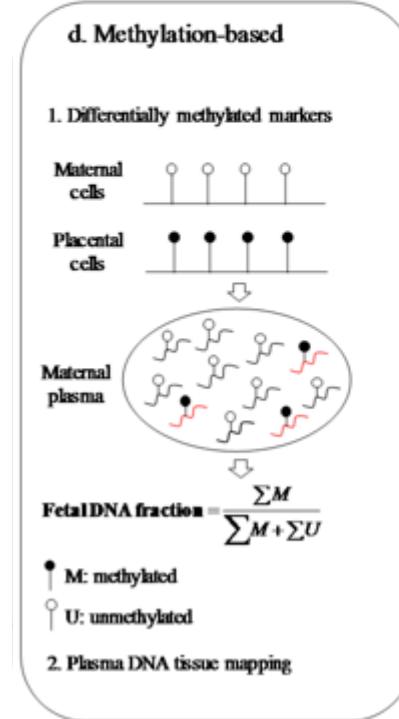
La frazione di alleli paterni
fornisce una stima della
frazione fetale

Determinazione della frazione fetale



Metilazione del DNA: modifica delle Citosine con impatto sulla trascrizione DNA→RNA.

La metilazione di una regione genomica varia da tessuto a tessuto, e può essere usata per la stima della frazione fetale.



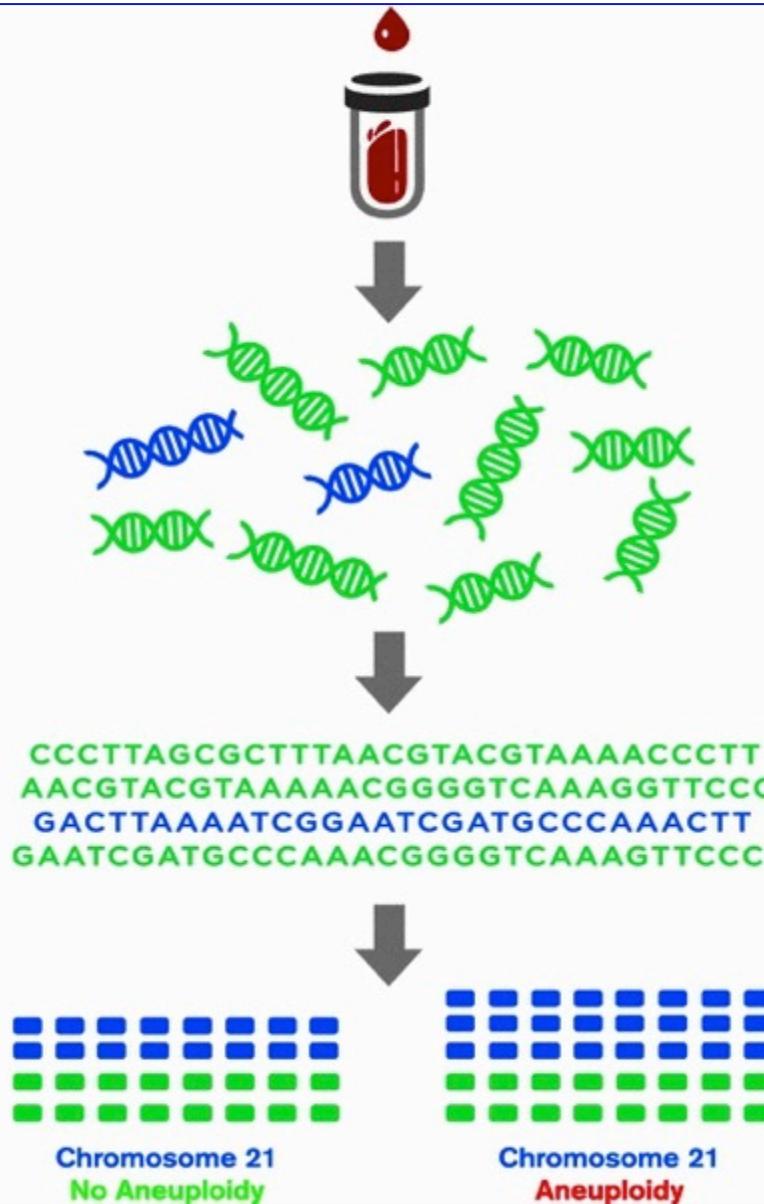
NIPT per le aneuploidie

MATERNAL BLOOD
SAMPLE

MATERNAL AND
FETAL CELL-FREE DNA

CELL-FREE DNA
SEQUENCED VIA
MASSIVELY PARALLEL
SEQUENCING (MPS)

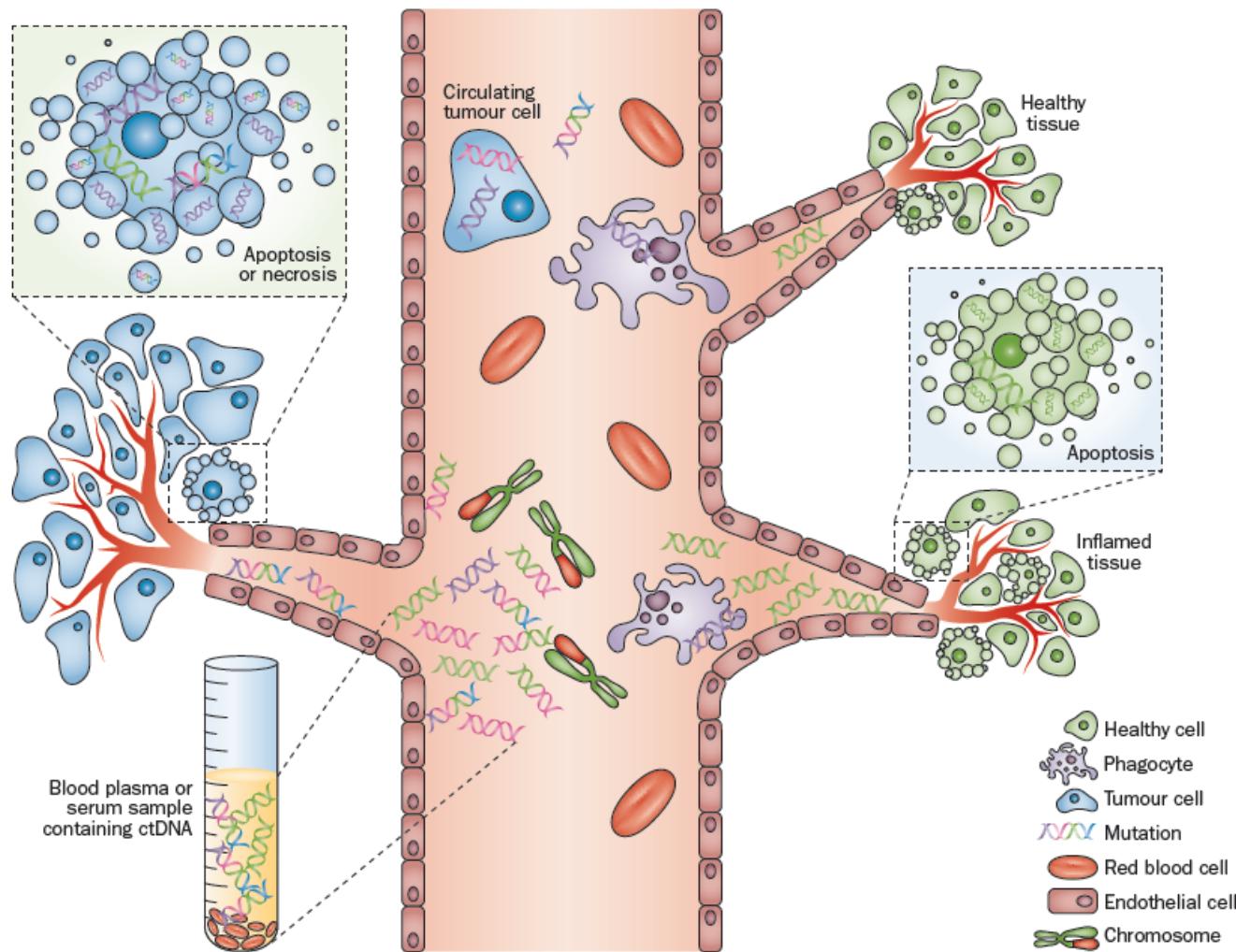
ALIGNMENT AND
COUNTING



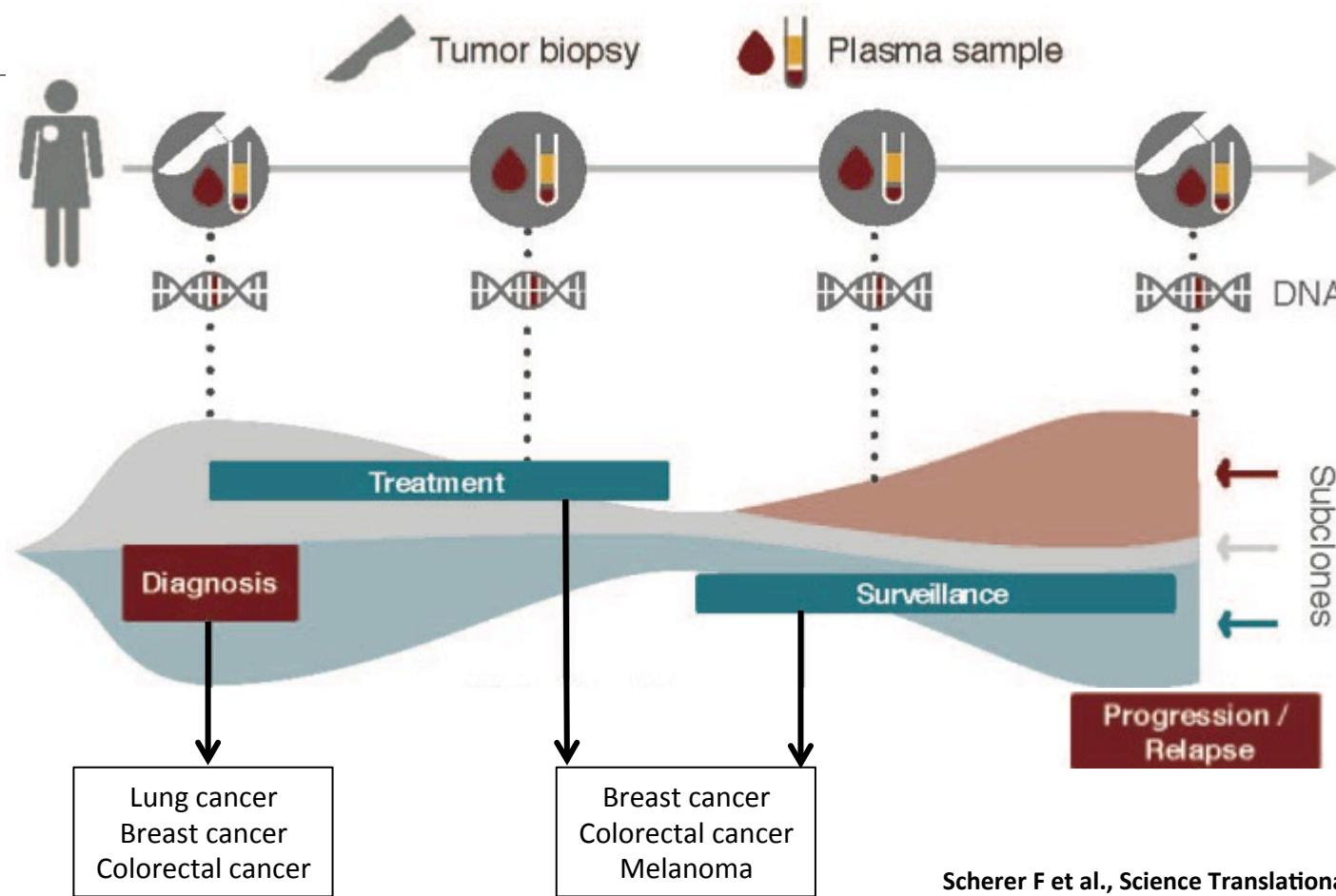
Conta delle sequenze

- Feto con trisomia contribuisce con un 50% in più di cfDNA dal cromosoma trisomico
- Milioni di reads necessarie per identificare lievi variazioni di cfDNA
- Non distingue il DNA materno dal fetale

DNA tumorale circolante (ctDNA)



Applicazioni cliniche della biopsia liquida



Adapted from

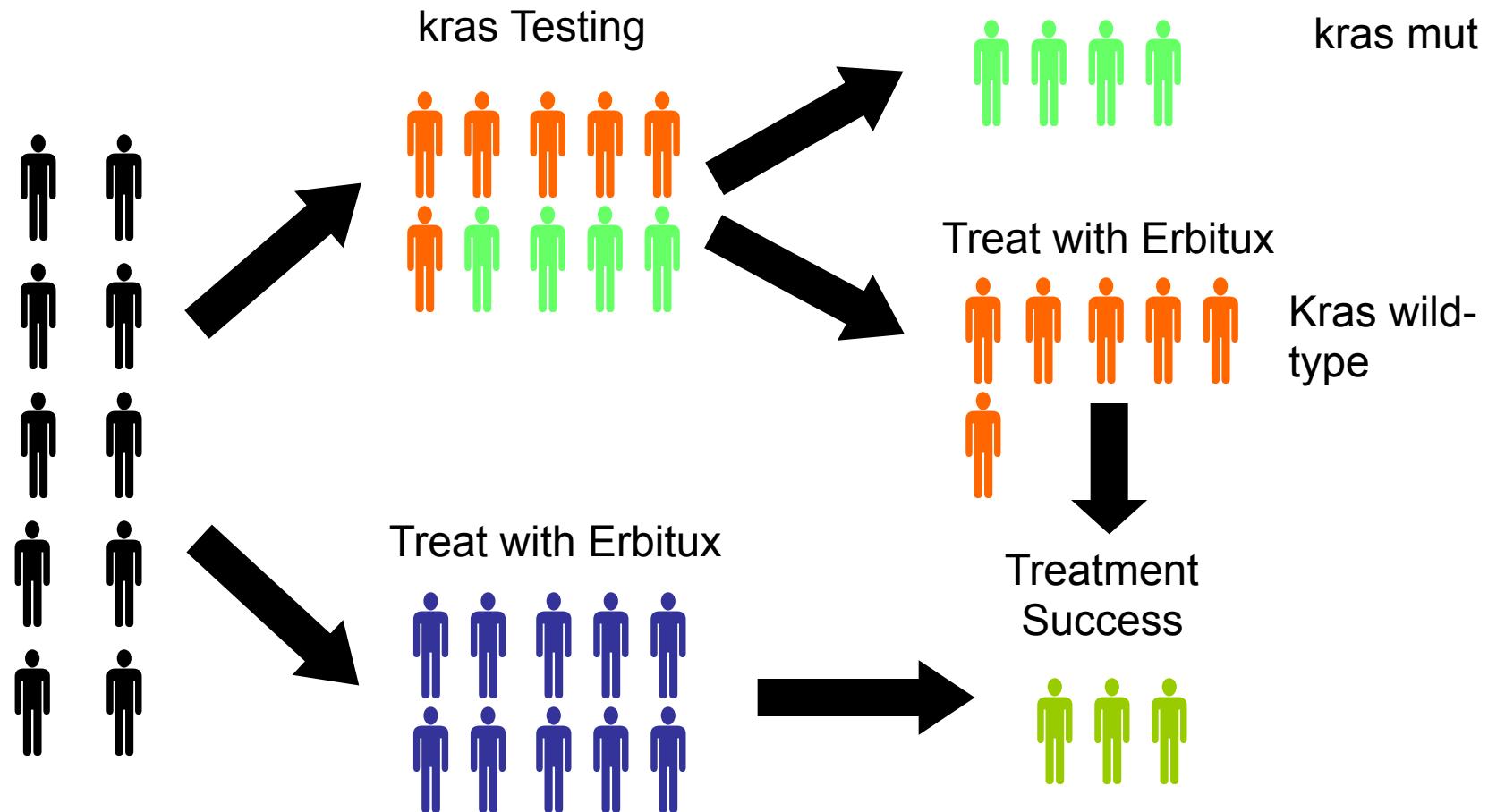
Scherer F et al., *Science Translational Medicine*, 2016

Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer, Heitzer et al., *Clin Chem*, 2015

Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer, Bardelli et al., *Cancer Discov.*, 2013

Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies, Bettegowda et al., *Sci Transl Med.*, 2014

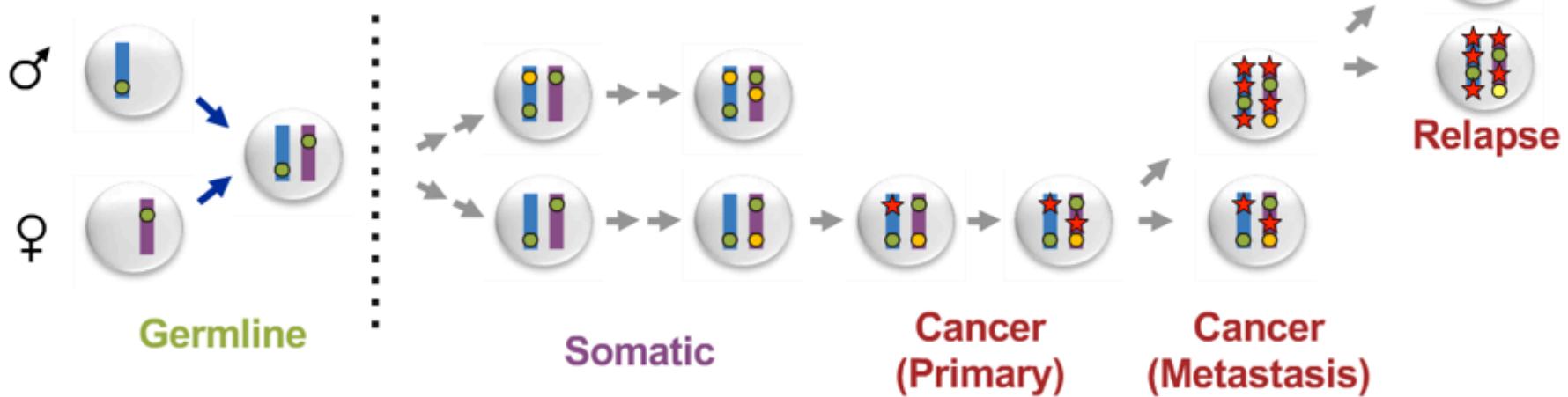
La conoscenza del profilo genomico consente di ottimizzare le strategie terapeutiche: Medicina di Precisione



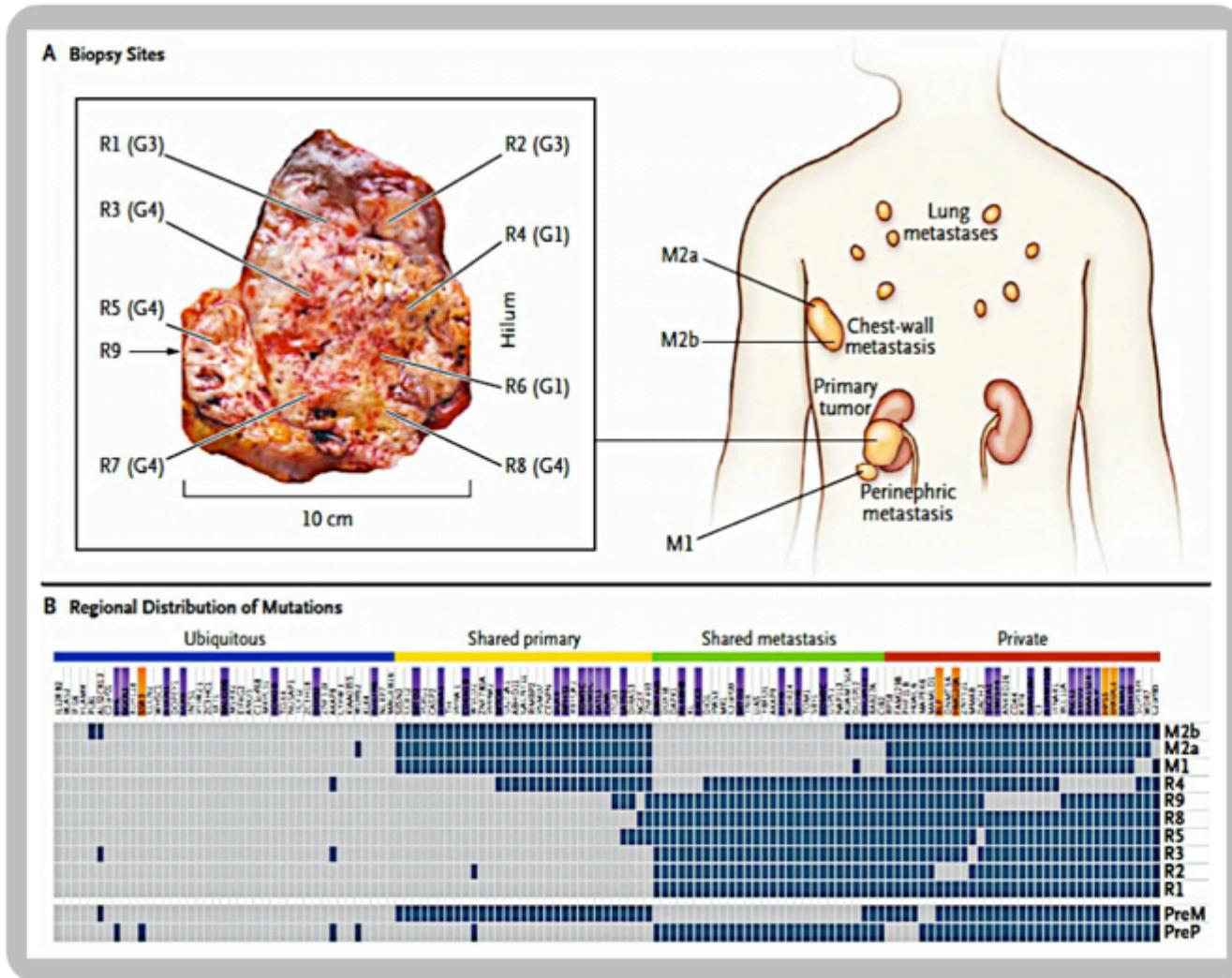
NGS per lo studio dell'evoluzione *temporale* del tumore

- WGS is a **snapshot**
- Certain mutations reflect paternal and/or maternal **germline** variation
- Additional **somatic** mutations accumulate through life
- “Driver” mutations cause **cancer**, “passenger” mutations are carried along
- Additional drivers **evolve** and diversify the cancer
- Some alter aggressiveness...
- ...which may be **treatable**
- Others may alter treatment response, leading to **relapse**

Cancer genomes are not static.
In cancer, one snapshot is not enough.



NGS per lo studio dell'evoluzione *spaziale* del tumore: eterogeneità tumorale e metastatica



Progetto NIASMIC

POR FESR 2014/2020 – “RICERCA SCIENTIFICA, SVILUPPO TECNOLOGICO E INNOVAZIONE” Azioni Cluster Top-Down

Sviluppo di un protocollo non invasivo di analisi del profilo genetico del DNA tumorale circolante (ctDNA), estratto da biopsia liquida, per un ampio spettro di tumori.

Durata: 2018-2020

PARTNERS

- BGT-Inversol
- Kitos
- Nurex
- Yenetics
- Ardea
- Microtec
- Osp. Oncologico, Cagliari
- Policlinico Gemelli, Roma



UNIONE EUROPEA
Fondo europeo di sviluppo regionale



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA DE SARDEGNA
REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA



Futuro del sequenziamento NGS

- **Sviluppo tecnologico:** rapida evoluzione della tecnologia; investimenti per tecnologie più efficienti: riduzione dei tempi e dei costi, aumento qualità dei risultati

The GRAIL approach



BILLGATES



BEZOS

GRAIL is poised to detect cancer early in asymptomatic individuals by combining high-intensity sequencing of unprecedented breadth and depth with the techniques of modern data science. Through one of the largest clinical trial programs ever pursued in genomic medicine, GRAIL will create vast datasets to develop our products and demonstrate their clinical utility.



Mckesson Ventures

SUTTER HILL VENTURES

Tencent 腾讯

VARIAN medical systems

Costo per il sequenziamento di 1 genoma

2000
\$ 100 Milioni



2018
\$ 1000



2030
????



CENTRO DI RICERCA, SVILUPPO E STUDI SUPERIORI IN SARDEGNA
CENTER FOR ADVANCED STUDIES, RESEARCH AND DEVELOPMENT IN SARDINIA



Grazie per l'attenzione