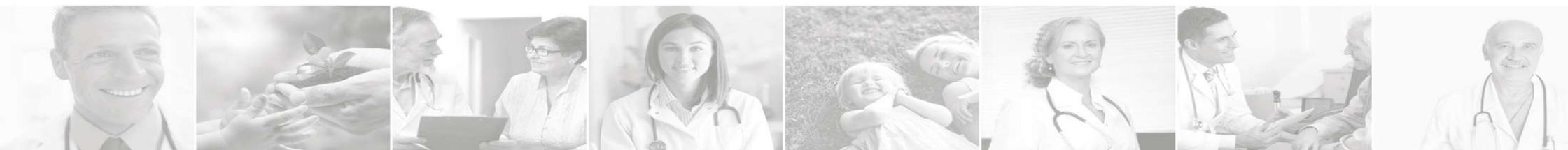


Reunión Área de Genética
IIS-Fundación Fundación Jiménez Díaz

29 de Septiembre de 2022



Secuenciación genómica de lecturas largas para identificar reordenamientos estructurales en enfermedades raras oculares

MARTA CORTON

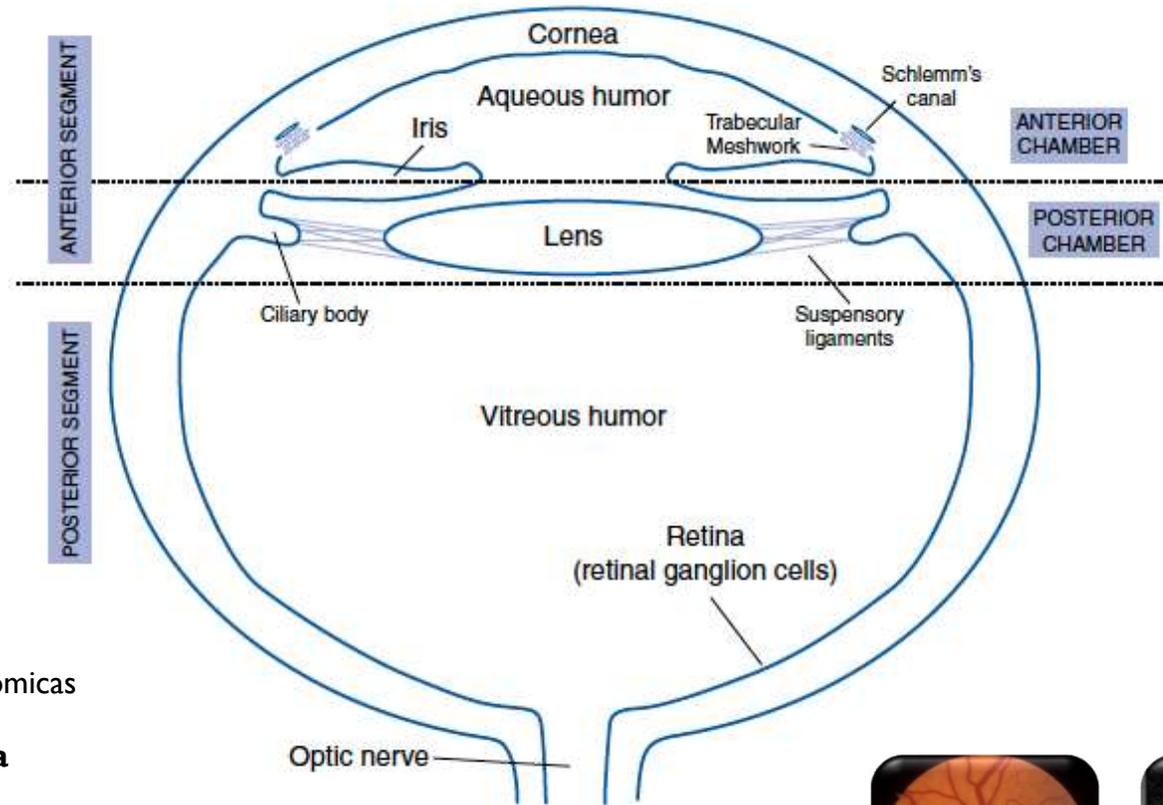
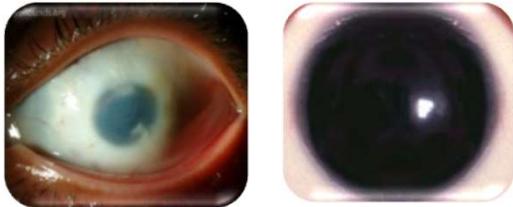
Grupo Genética & Genómica (Enfermedades Raras y Complejas)
Lab. Genética - 4ª planta (IIS-FJD)
mcorton@fjd.es (ext. 3437)



ENFERMEDADES OFTALMOGENETICAS

DISGENESIAS SEGEMENTO ANTERIOR

> 50 genes



CATARATAS CONGENITAS

> 150 genes



- ✓ **Elevada heterogeneidad clínica**
formas aisladas, panoftálmicas y sindrómicas

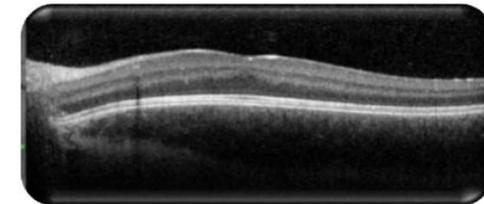
- ✓ **Elevada heterogeneidad genética**
>800 genes asociados

Herencia mendeliana (AD, AR, XL)
50-60% *mutación de novo*

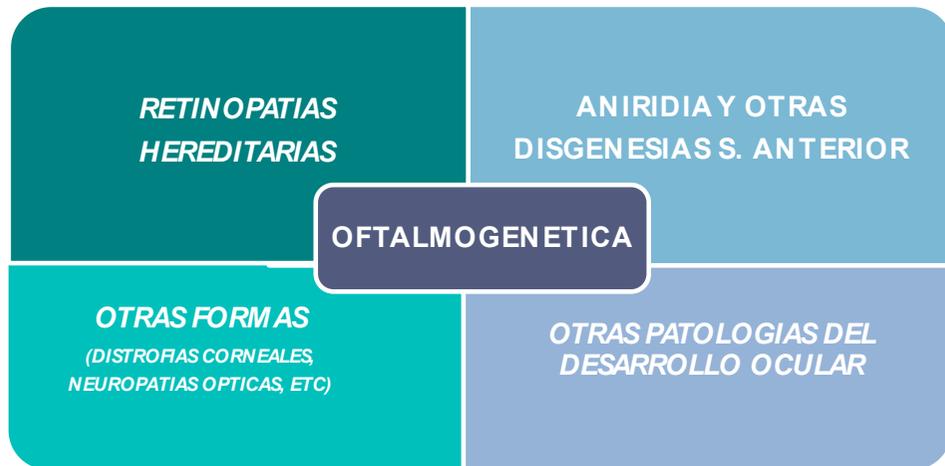
- ✓ **Complejidad alélica:** SNVs, CNVs y SVs

RETINOPATIAS

> 280 genes



LINEAS DE INVESTIGACIÓN EN OFTALMOGENETICA



Identificación de nuevas causas genéticas

- Paneles personalizados de NGS / aCGH
- Estudio de regiones no codificantes (paneles / WGS)
- **Estudio de variantes estructurales (short and long WGS)**
- Identificación de nuevos genes (WES / WGS)
- Implicación de mosaicismo (ddPCR / NGS)
- Implicación de procesos epigenéticos

Caracterización funcional de mecanismos moleculares

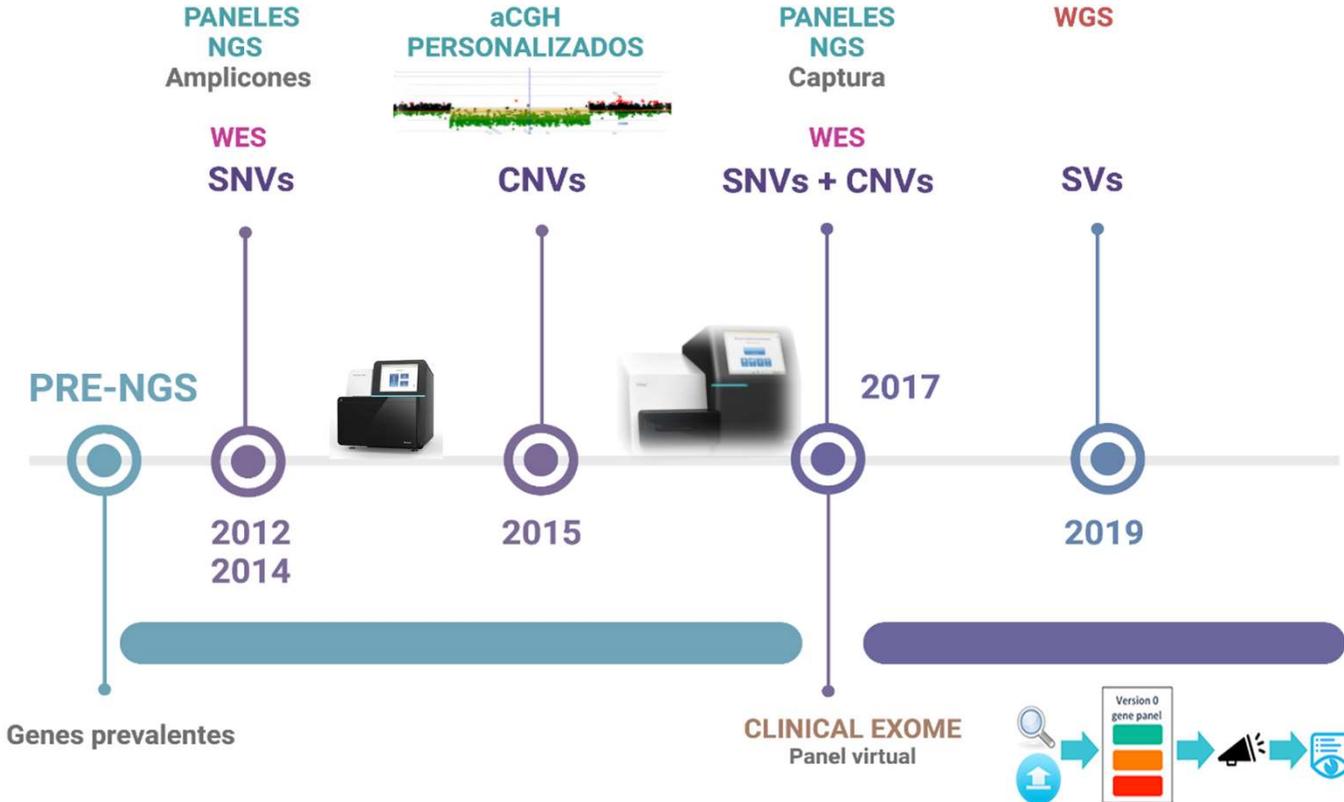
- Caracterización funcional de VUS y variantes no codificantes
- Implicación de splicing alternativo (long-reads RNAseq)
- Desarrollo de modelos experimentales para aniridia (minigenes, LCLs, hiPSCs + organoides oculares, pez cebra)

Estrategias terapéuticas

- Terapias antisentido para modulación mutaciones splicing
- Terapias readthrough para modulación mutaciones nonsense

DESARROLLO APROXIMACIONES ÓMICAS

AMBITO INVESTIGACION



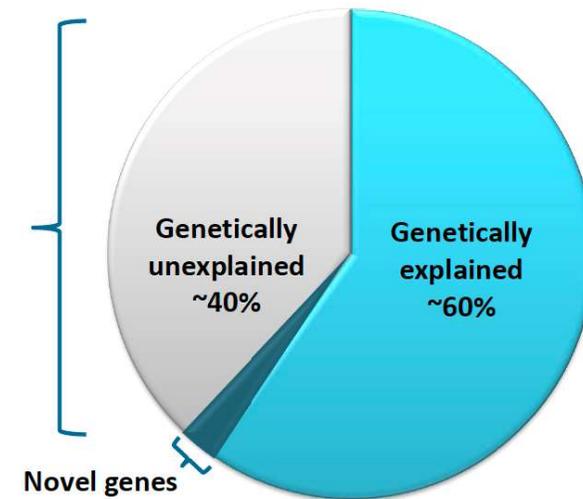
AMBITO DIAGNOSTICO



- ANIRIDIA
- ALBINISMO
- ANOMALÍAS NERVIÓ ÓPTICO
- CATARATAS PEDIÁTRICAS
- DISGENESIAS POLO ANTERIOR
- DISTROFIAS CORNEALES
- GLAUCOMA CONGÉNITO
- HIPOPLASIA FOVEAL
- MICROFTALMIA COLOBOMATOSA
- RETINOPATÍAS NO SINDRÓMICAS
- RETINOPATÍAS SINDRÓMICAS

LIMITACIONES EN EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO

*40-50 % pacientes
tienen resultados
No informativos*



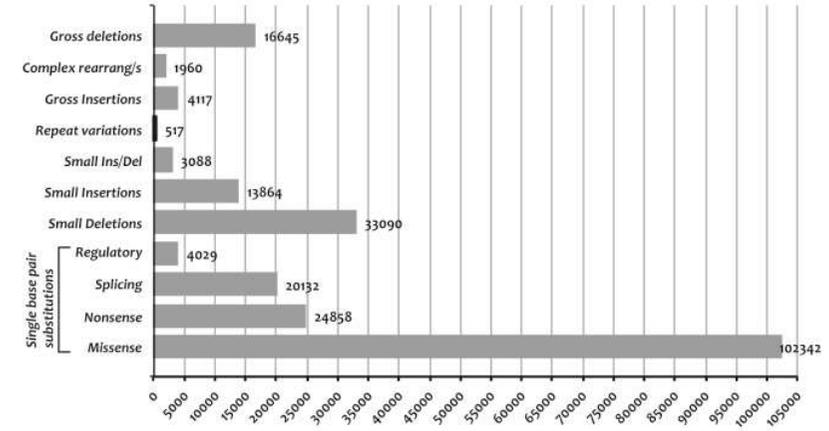
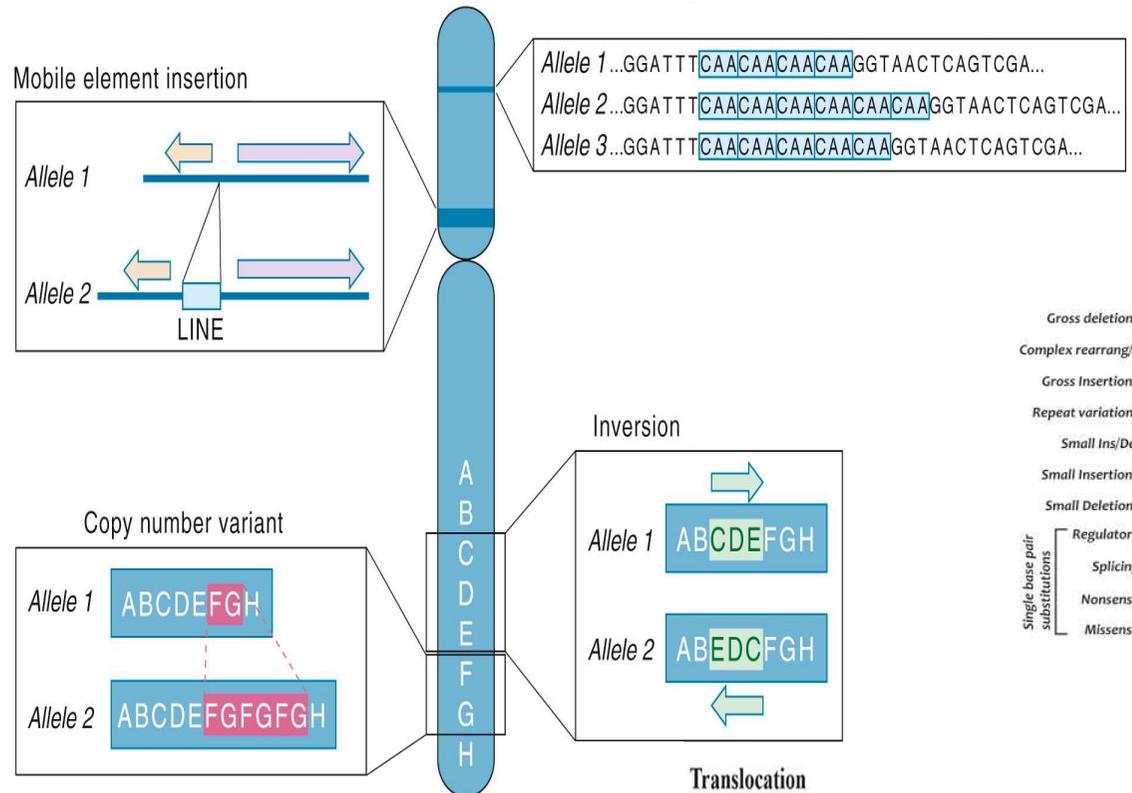
1. Gen responsable aún no identificado

2. Identificación de una variante de significado incierto (VUS) >>>> ¿patogenicidad?

3. Falsos negativos por uso de técnica inadecuada / problemas cobertura

- *Mutación en región no capturada (non-coding, enhancers, intrones)*
- *Mutación en regiones repetitivas o en GC-rich*
- *Limitaciones en la identificación de SVs mediante análisis de WES/paneles*

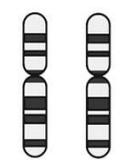
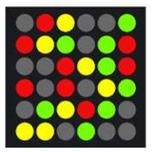
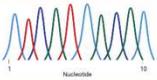
VARIANTES ESTRUCTURALES COMO FUENTE DE PATOGENICIDAD



224642 pathogenic mutations in 8784 genes (13jul18)

SVs se encuentran infradetectadas

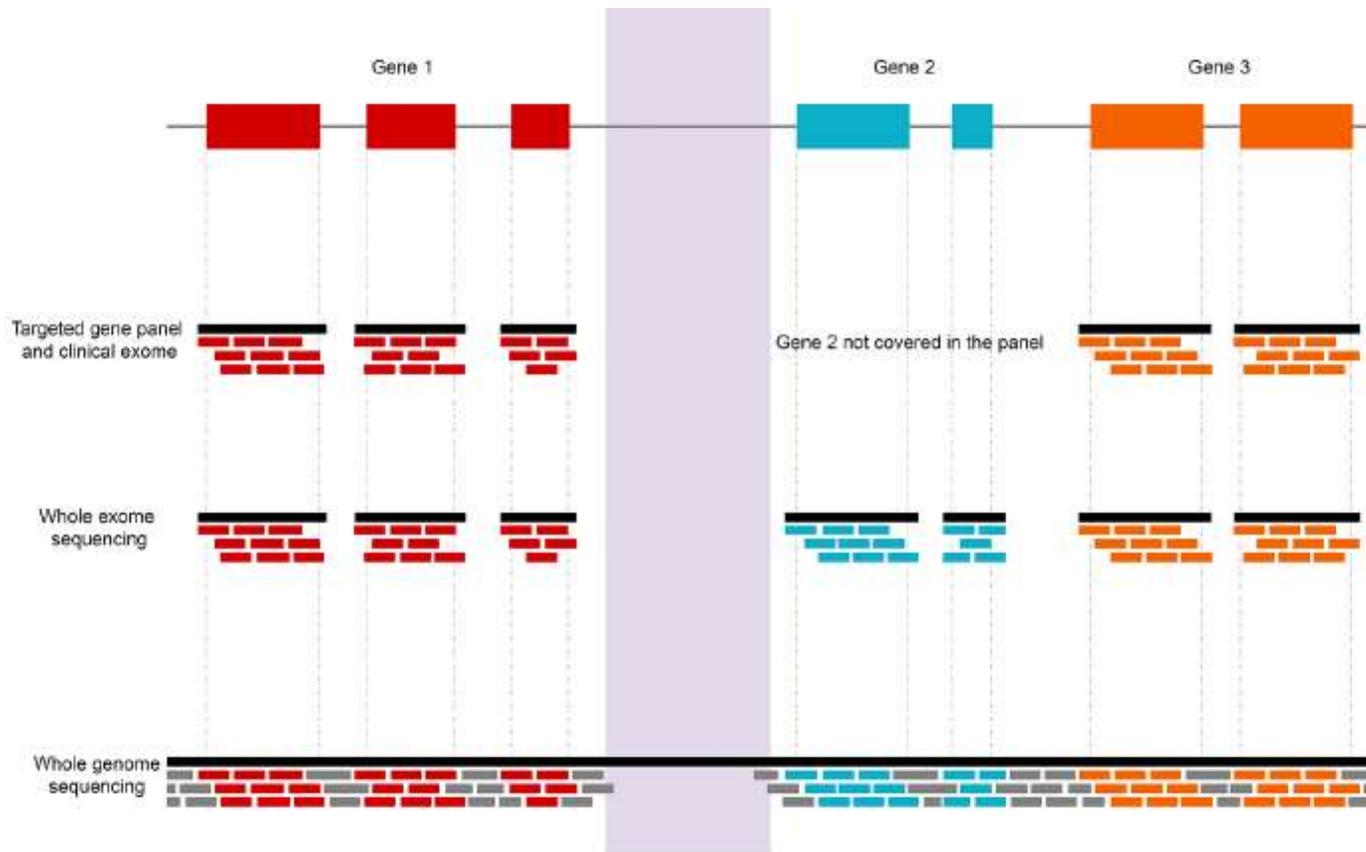
APROXIMACIONES DE ANALISIS SVs

	Technique	Targeted	11p13 del	Other SV	Coding SNVs	Non-coding / enhancer
	Karyotyping		Large microdeletions			
	FISH					
	MLPA					
	aCGH					
	Sanger					
	Panel		Depends on design / bioinfo analysis			Depends on design / bioinfo analysis
	Whole exome		Depends on design / bioinfo analysis			
	Whole genome					

WGS permite el cribado simultáneo de SNVs y SVs

SECUENCIACION GENOMICA COMO ALTERNATIVA

WGS permite detectar mutaciones en regiones no capturadas por WES



LIMITACIONES WGS PARA DETECTAR SVs

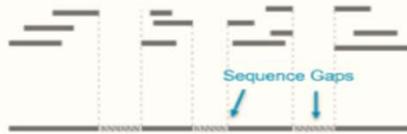


Short read sequencing

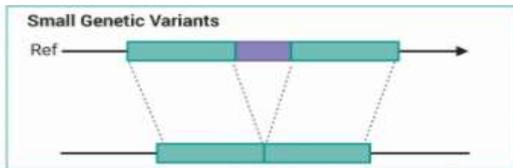


Genome

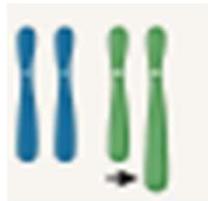
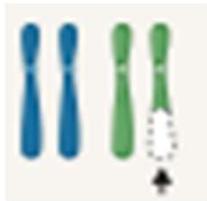
Short reads
150 bp



Draft Genome



Copy number variations
Deletions Amplifications

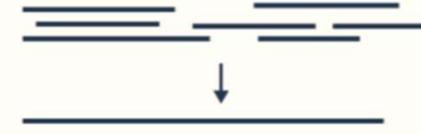


Long read sequencing

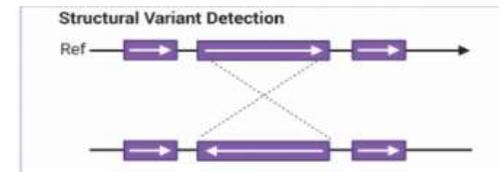


Genome

Long reads
>10Kb

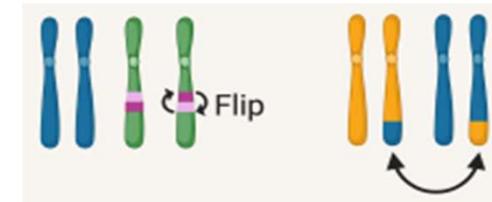


Complete Genome



Inversions

Translocations



Las aproximaciones de
secuenciación de
lecturas largas (LRS)
aumentan el
rendimiento de la
detección de SVs

PROYECTO: LONG-READ WGS PARA IDENTIFICAR SVs EN OFTALMOGENETICA

Project



EASI Genomics Project 756



CNRGH Bioinformatics /
Bioanalysis collaboration

Samples



30 cases



INSTITUTO DE
INVESTIGACIÓN
SANITARIA
FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ



Retinal dystrophies
Eye malformations



Clinical exome
WES



Suspected SV



WGS



PromethION

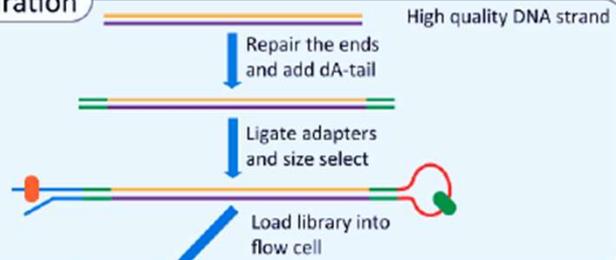
“Deciphering the molecular basis of opthalmogenetic diseases: sequencing the whole genome using a long reads approach”

IP: C. Ayuso & JM. Millán

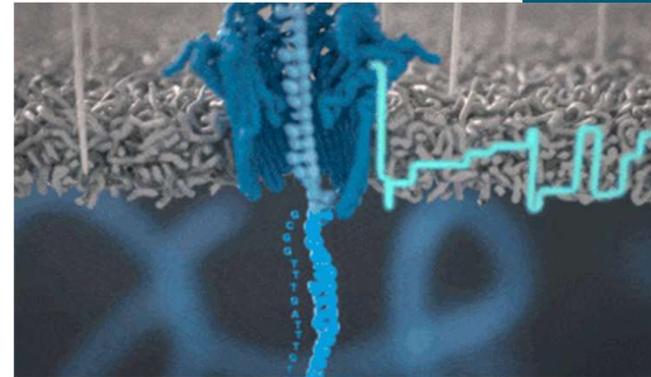
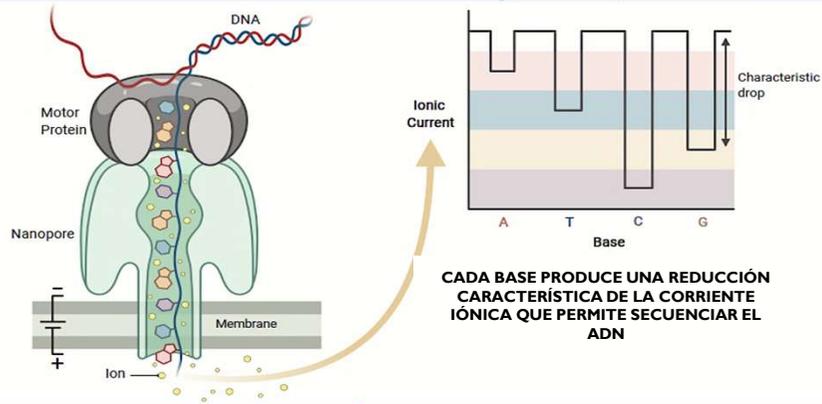
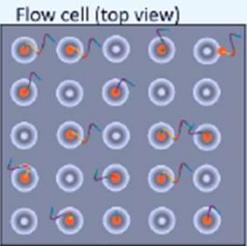
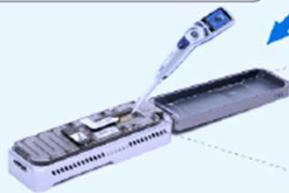
SECUENCIACION DE LECTURAS LARGAS POR NANOPOROS



A Library preparation

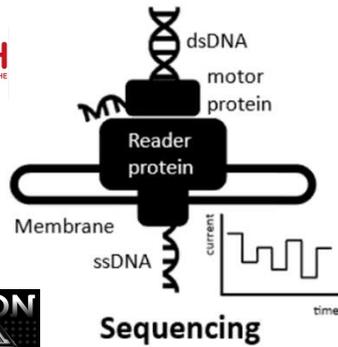


B Sequencing process



Workflow

High Molecular Weight-DNA



Sequencing

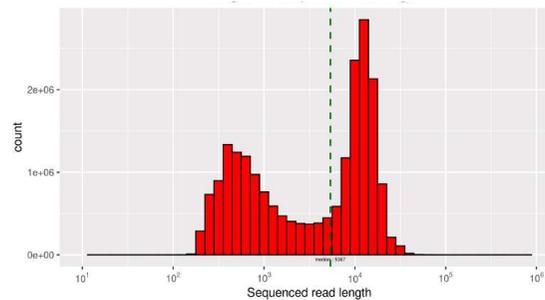
Summary Mapping

Sample	Reads	Mapped	Mapped%	Dup	Dup%	MQ0	MQ0%
C001VXE_PAG93571	19 126 065	18 940 995	99.03%	411 540	2.15%	242 285	1.27%

Summary Aligned Reads

Sample	Median length	Mean	N50	Max	%Supplementary	Accuracy
C001VXE_PAG93571	3 597	6 102	12 302	59 746	8.91%	92.40%

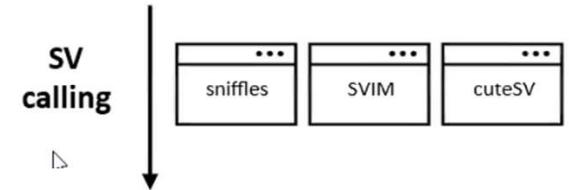
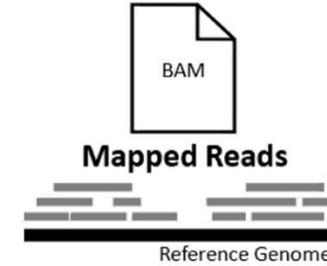
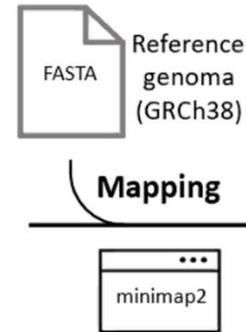
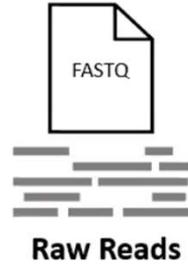
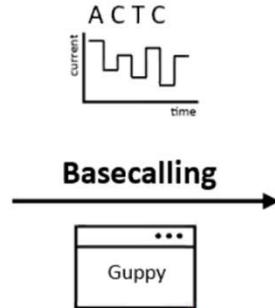
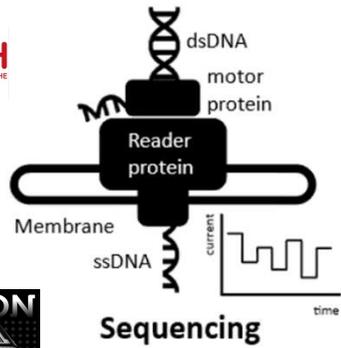
reads: 1- 60 Kb
(median length 9574 kb)
Depth: 30X



Chromosome	Covered (kb)	Not covered (kb)	%Not covered	Largest covered region (kb)
chr1	230 239	242	0.11%	54 930
chr2	239 928	620	0.26%	108 364
chr3	197 926	174	0.09%	104 513
chr4	189 495	258	0.14%	74 290
chr5	178 793	190	0.11%	54 794
chr6	169 996	82	0.05%	52 373
chr7	158 854	116	0.07%	68 430
chr8	144 639	129	0.09%	59 325
chr9	120 916	874	0.72%	63 463
chr10	132 657	606	0.45%	51 726
chr11	134 472	61	0.05%	47 503
chr12	133 118	20	0.01%	85 983
chr13	97 890	93	0.10%	65 937
chr14	88 449	70	0.08%	36 232
chr15	84 465	176	0.21%	42 640
chr16	81 764	42	0.05%	43 848
chr17	81 766	1 155	1.39%	35 080
chr18	79 922	168	0.21%	26 059
chr19	55 766	0	0.00%	31 367
chr20	63 787	157	0.25%	28 019
chr21	37 826	212	0.56%	18 023
chr22	36 919	153	0.41%	28 451
chrX	154 670	223	0.14%	41 435
chrY	1 531	22 106	93.52%	92
chrM	17	0	0.00%	13
genome	2 895 800	27 928	0.96%	108 364

Workflow

High Molecular Weight-DNA



Raw variant reports



CARACTERIZACION DE DELECCION EN EYS

Caso I

FENOTIPO

- Retinosis pigmentaria

ESTUDIOS GENETICOS PREVIOS

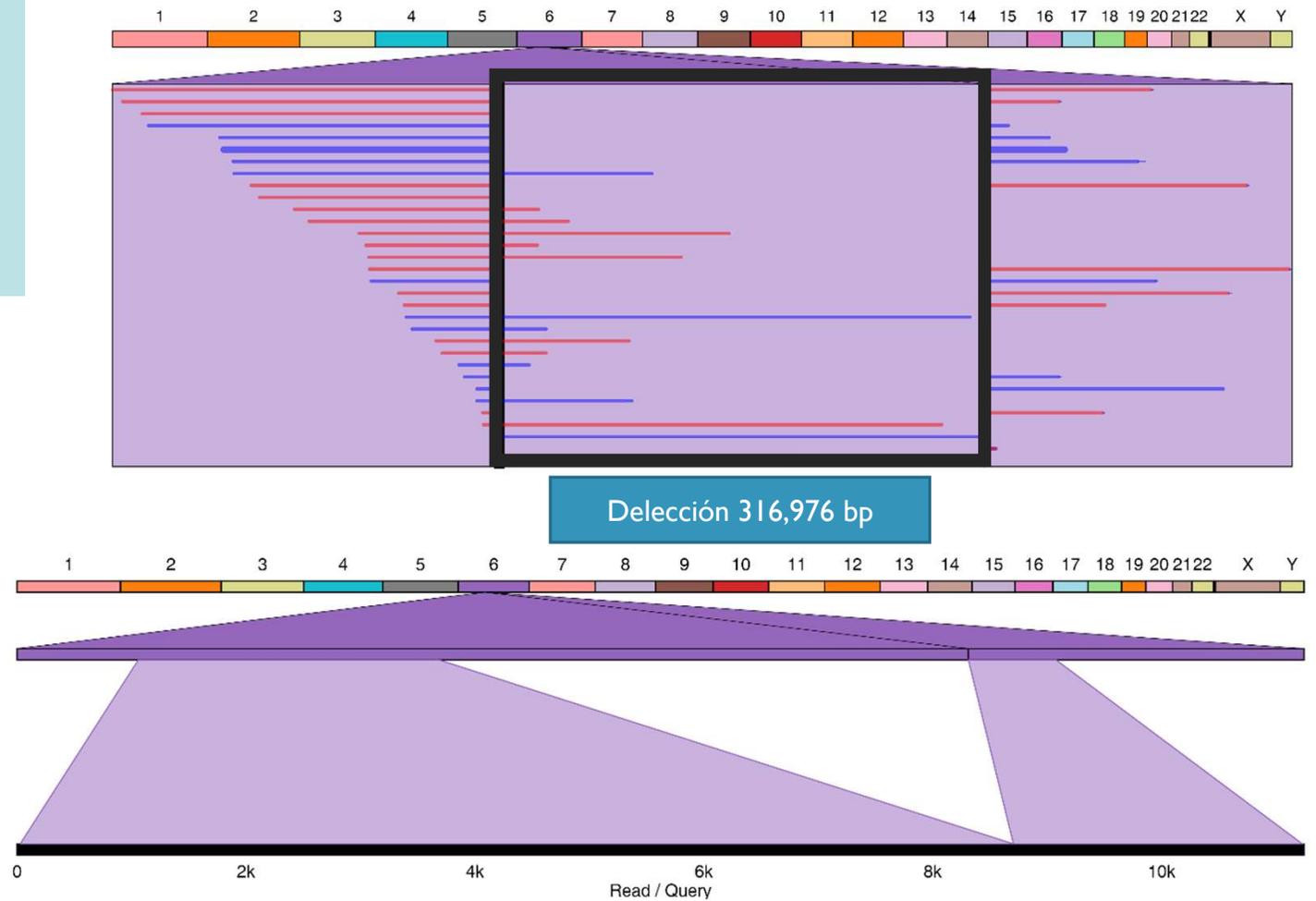
- Bialélico para *EYS*:

Alelo 1: . c.4103dup; p.Ser1369Ilefs*18

Alelo 2: . Delección exón 14-22 (MPLA)

Delimitar los breakpoints exactos

chr6:64,738,649-65,055,624



CARACTERIZACION DE DELECIÓN EN KCNV2

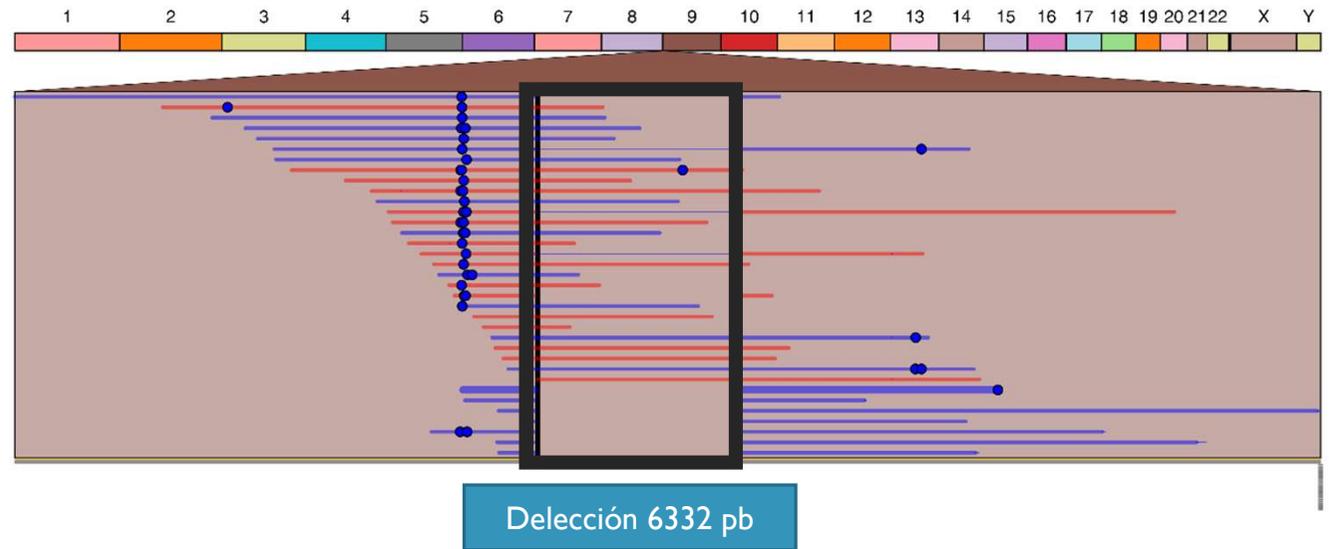
Caso 2

FENOTIPO

- Distrofia conos-bastones

ESTUDIOS GENETICOS PREVIOS

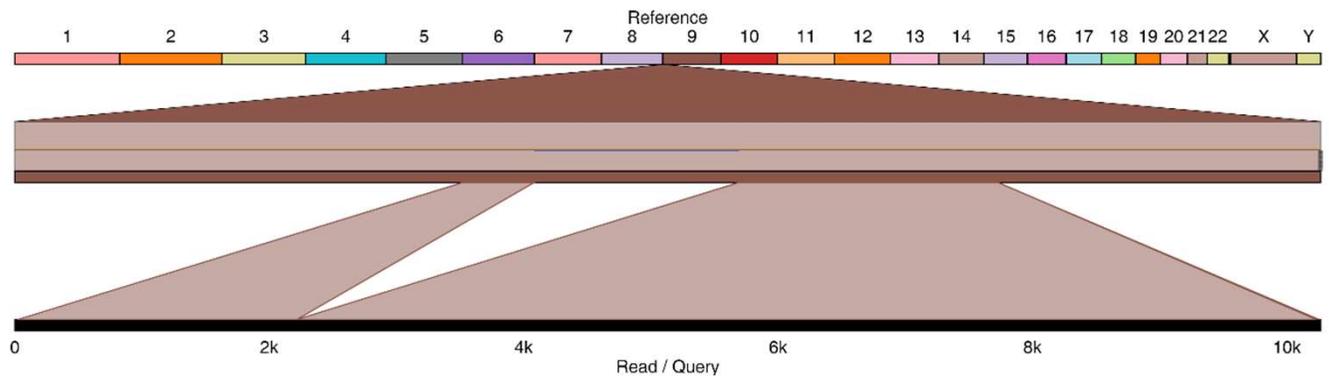
- Portador de un alelo missense en *KCNV2* (c.550G>A; p.Glu184Lys)
- Posible *delección exón 2* de *KCNV2*



Confirmación de la CNV

Delimitar los breakpoints exactos

chr9:2724293-2730625



CARACTERIZACION DE INVERSION CHR. X POR LRS-WGS

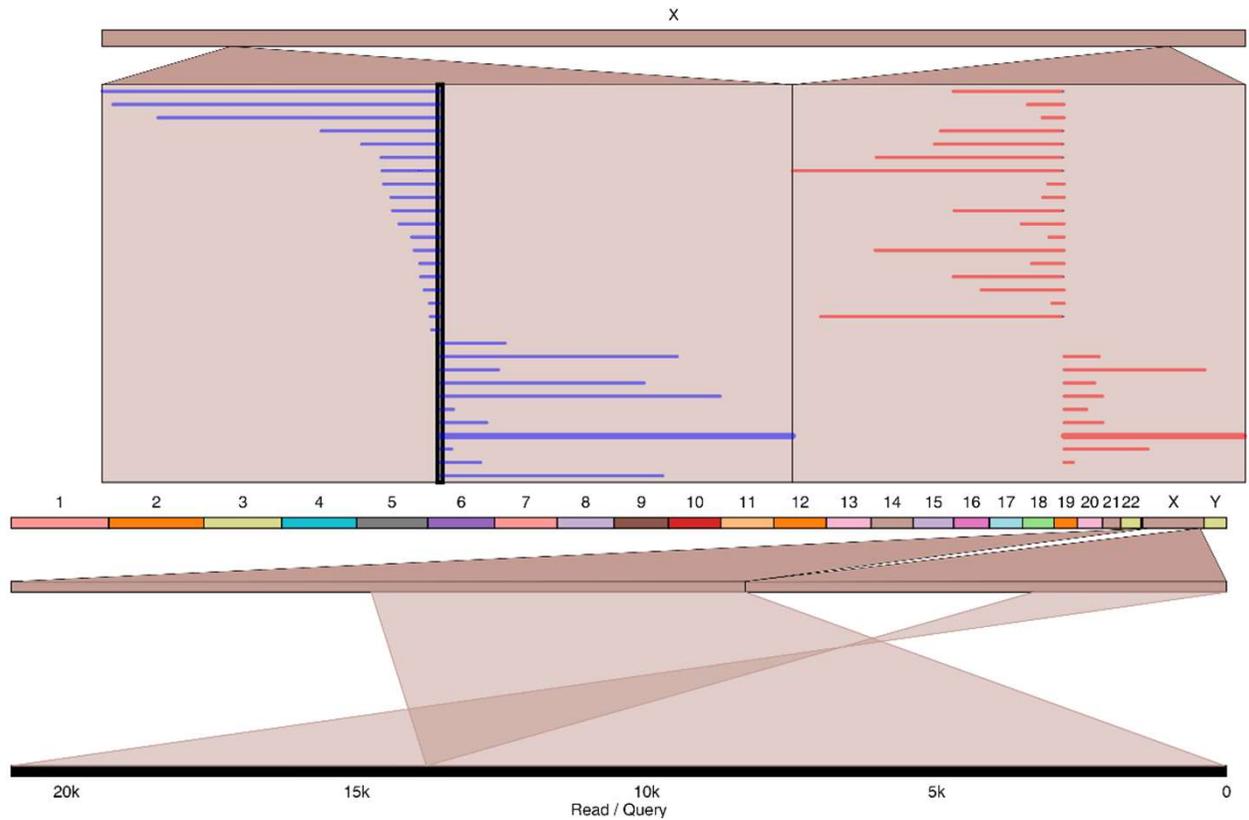
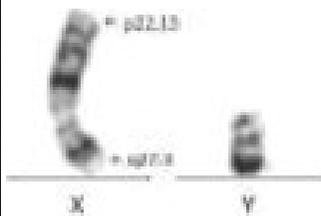
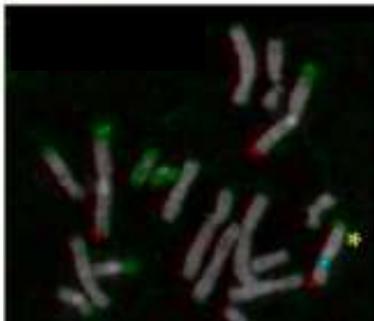
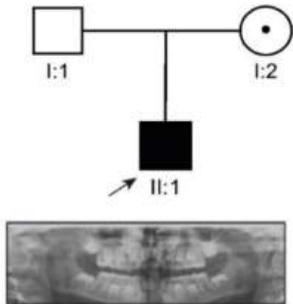
Caso 3: varón

FENOTIPO

- Cataratas congénitas
- Discapacidad intelectual
- Anomalías dentales

ESTUDIOS GENETICOS PREVIOS

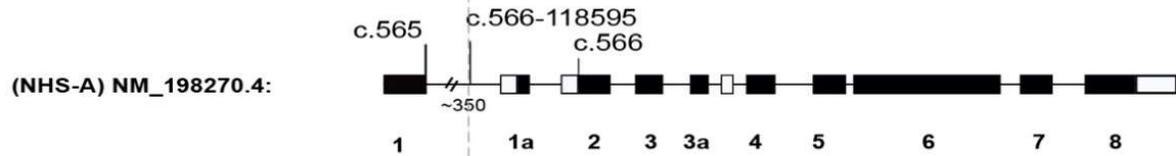
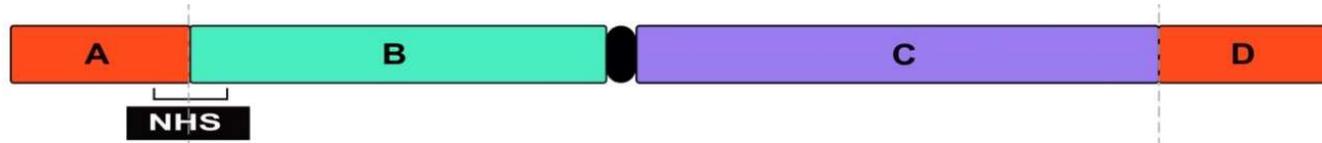
- Cariotipo: Inv ChrX de origen materno
- *Negativo en exoma clínico & aCGH*



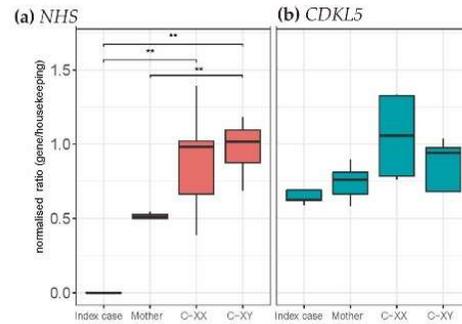
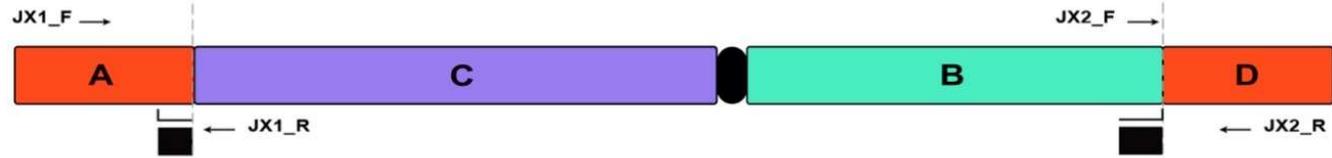
Punto de corte distal: **chrX:17569147+ Del 16 pb**

CARACTERIZACION DE INVERSION CHR. X POR LRS-WGS

X wild type



Inverted X



IDENTIFICACION DE SVs CRÍPTICAS POR LRS-WGS

Caso 4: esporádico

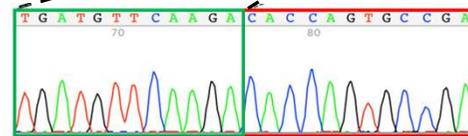
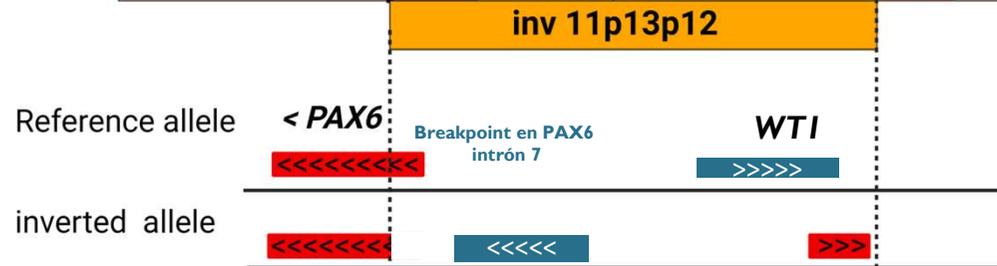
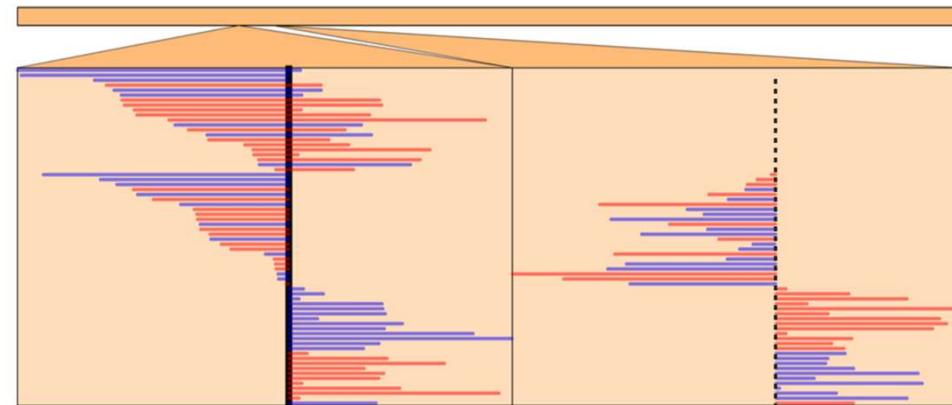
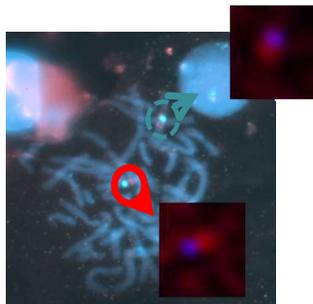
FENOTIPO

- Aniridia congénita
- Cataratas congénitas
- Nistagmo
- Vítreo primario hiperplásico persistente

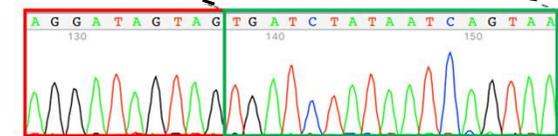
ESTUDIOS GENETICOS PREVIOS

- Cariotipo normal
- *Negativo en cribado PAX6 por panel NGS & aCGH*

Identificación de una inversión paracéntrica equilibrada de 4.9 Mb en 11.p13 que disrumpe el locus *PAX6*



Chr 11 (+) TGATGTTCAAGATTTCAGTTGATCTATAATCAGTAA
 Inverted JX2 TGATGTTCAAGA...CACCAGTGCCGACA
 Chr 11 (-) AGTAATAGGATAGTAGTGTATAGCACCAGTGCCGACA



Chr 11 (+) TGATGTTCAAGATTTCAGTTGATCTATAATCAGTAA
 Inverted JX1 AGTAATAGGATAGTAGTGTATAGCACCAGTGCCGACA
 Chr 11 (-) AGTAATAGGATAGTAGTGTATAGCACCAGTGCCGACA

IDENTIFICACION DE SVs CRIPTICAS POR LRS-WGS

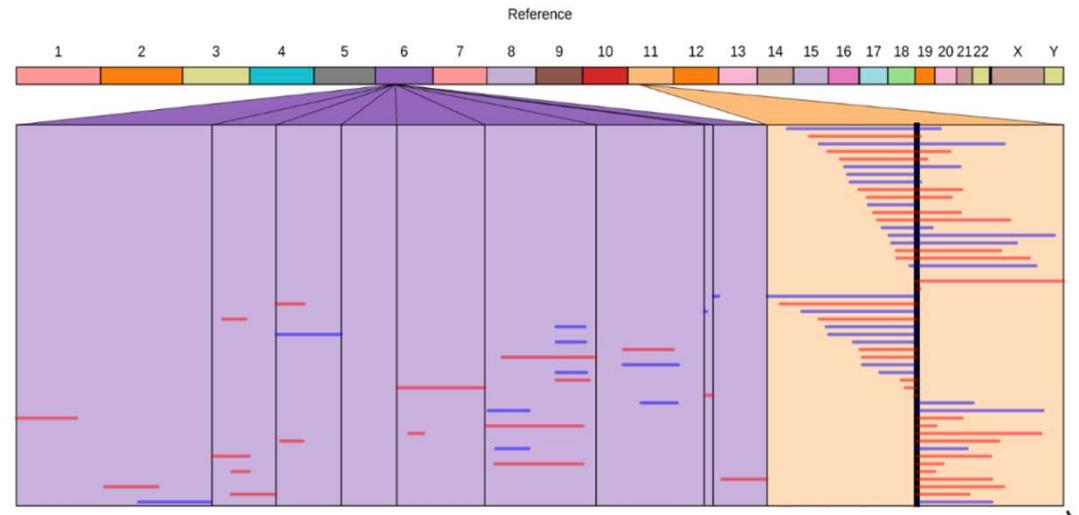
Caso 5: esporádico

FENOTIPO

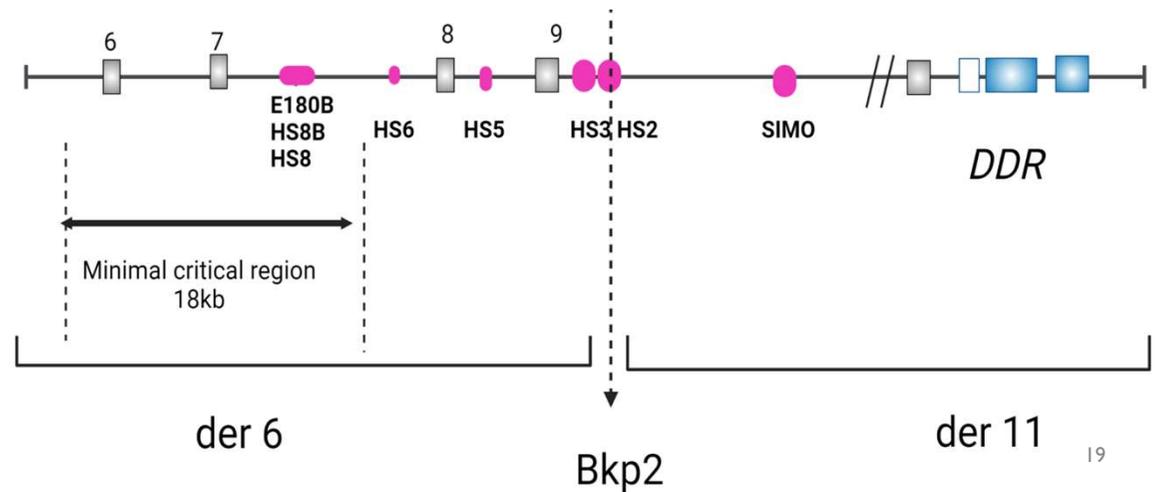
- Hipoplasia de iris congénita
- Cataratas congénitas

ESTUDIOS GENETICOS PREVIOS

- Portador de $tr.(6,11)$, detectada por cariotipo /FISH, considerada no patogénica en 2007
- *Negativo en cribado PAX6* por panel NGS & aCGH
- Traslocación no detectada por short-read WGS

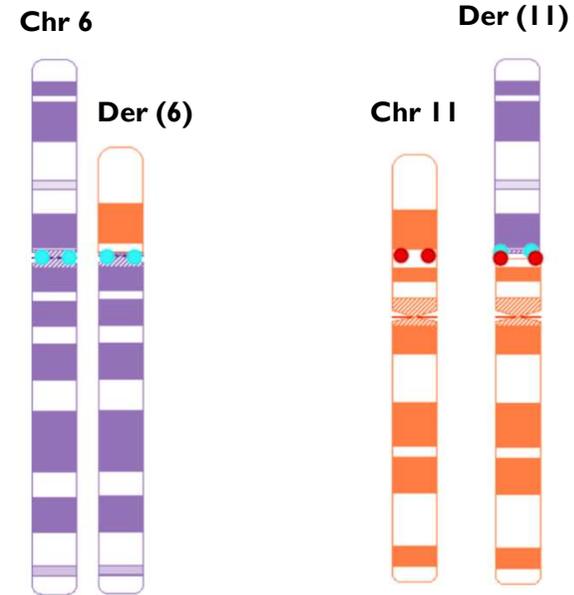
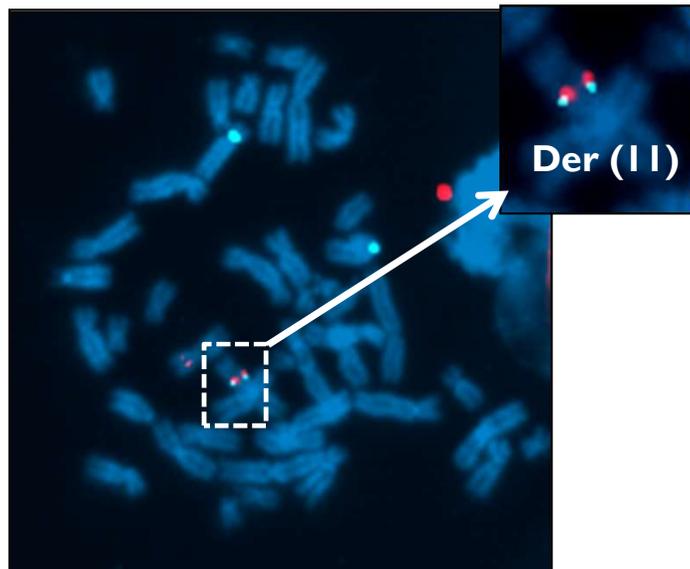


Caracterización de una traslocación equilibrada $t(6;11)(p11.1,p13)$ que disrumpe un enhancer de *PAX6*



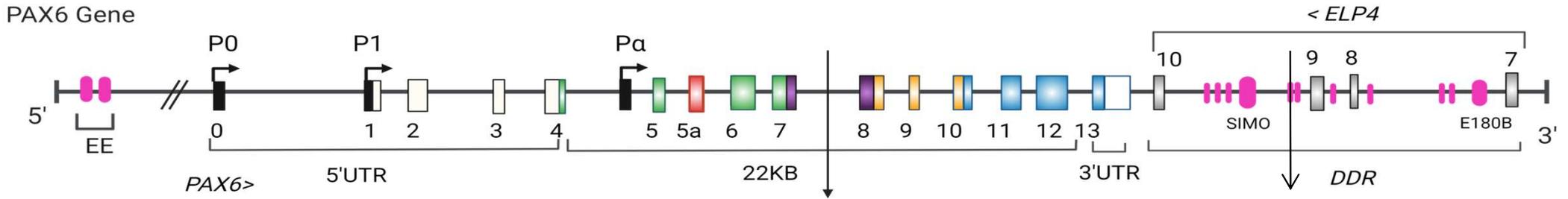
IDENTIFICACION DE SVs CRIPTICAS POR LRS-WGS

CASO 5: Caracterización de una traslocación equilibrada $t(6;11)(p11.1, p13)$ que disrumpe el locus *PAX6*



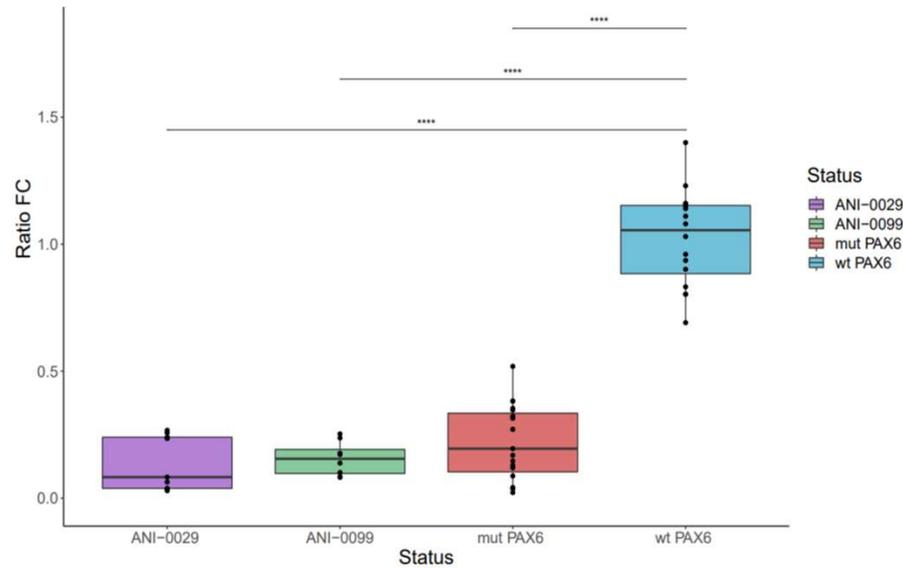
- Traslocación implica secuencias alpha-satélite centroméricas del cromosoma 6, altamente repetitivas
- Fue incorrectamente descrita en un cariotipo y FISH
- Traslocación no detectada por short-read WGS debido a la baja complejidad de las regiones en los puntos de corte

ANIRIDIA PUEDE ESTAR CAUSADA POR SVs CRIPTICAS



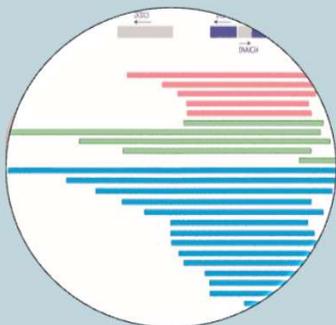
Caso 5
inv (11)(p13p12)

Caso 4
t(6;11)(p11.1,p13)

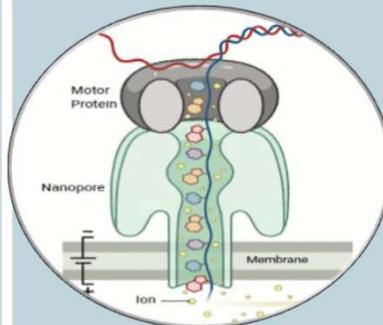


- SVs implican la disrupción directa del gen o su región reguladora a 150 Kb a 3' de PAX6
- No identificadas previamente por las técnicas utilizadas, incluyendo short-read WGS.

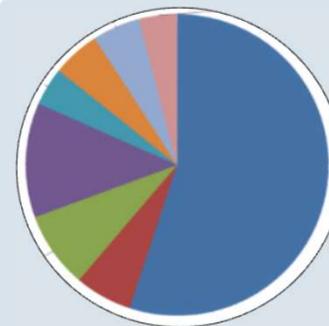
CONCLUSIONES



Variantes SVs afectando a *PAX6* como causa de aniridia



LRS permiten detectar distintos tipos de SVs

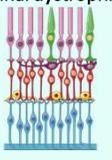


LRS mejoran el rendimiento en el diagnóstico genético

Eye Developmental lab **Marta Cortón**
Alejandra Damian
 Alejandra Tamayo
 Carolina Ruiz



Retinal dystrophies lab **Carmen Ayuso**
Irene Perea
 Marta del Pozo
 Cristina Rodilla
 Olga Zurita
 Cristina Villaverde



Bioinformatic Unit **Pablo Minguez**
Gonzalo Núñez
 Raquel Romero
 Ionut Iancu
 Lorena de la Fuente




Dpt. Clinical Genetics
FJD



Carmen Ayuso
Marta Rodriguez de Alba
 Fiona Blanco-Kelly
 Saoud T. Swafiri
 M^a José Trujillo
 Almudena Avila
 Isabel Lorda
 Inmaculada Martín
 Berta Almoguera

Dpt. Ophthalmology
FJD

Blanca G. Sandoval
 Esther Carreño
 Belén Jiménez



CNRGH

Claire Jubin
 Jean-François
 Deleuze




Hospital La Fe

Jose María Millan
 Gema Garcia















FUNDING / SUPPORT

ISCIII
 MINECO
 CIBERER
 European Regional
 Development Fund
 Comunidad de Madrid
 H2020
 CNAG
 F. Mutua Madrileña
 F. Ramon Areces
 F. Conchita Rábago
 FEDER
 ONCE



mcorton@fjd.es