

# Studio multicentrico sui fattori genetici predisponenti per la BPD dati preliminari

Marco Somaschini

*Unità di Neonatologia, Clinica S. Anna, Genolier Swiss Medical Network, Lugano  
Unità di Genomica per la Diagnostica delle Patologie Umane,  
Centro di Genomica Traslazionale e Bioinformatica.  
Istituto Scientifico San Raffaele, Milano*

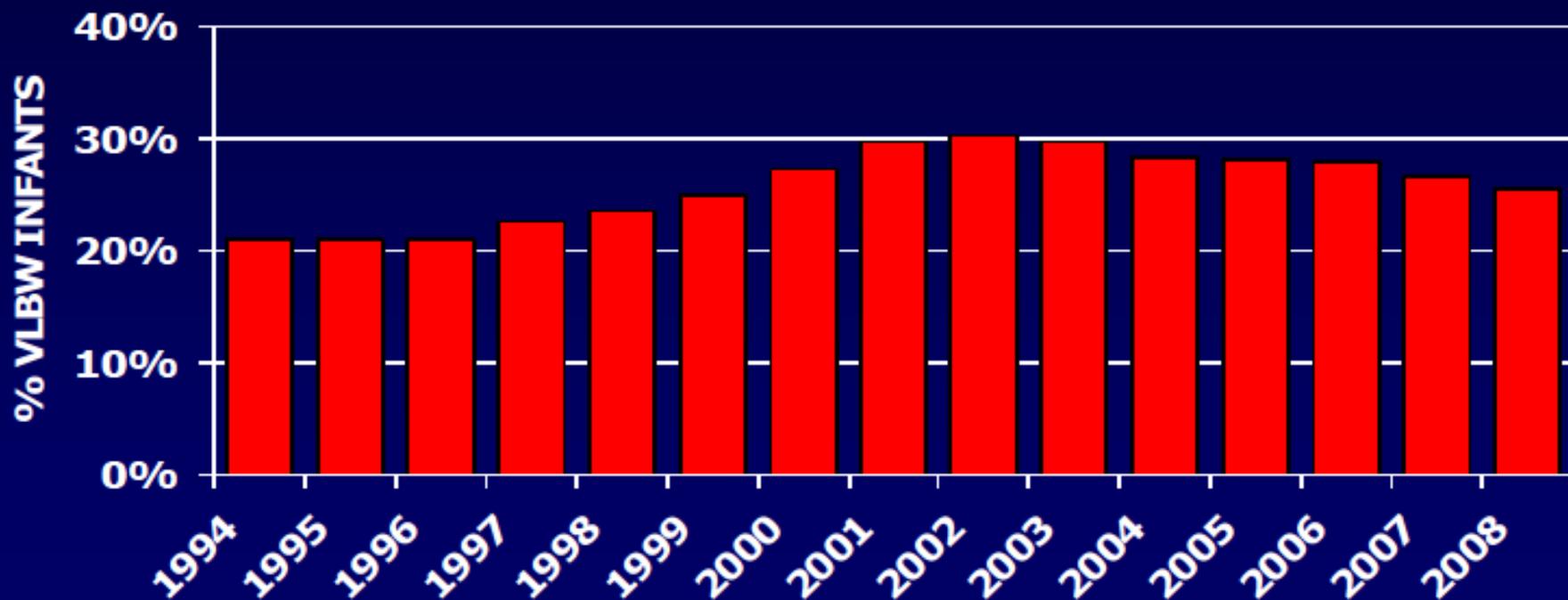
# BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA

- Bronchopulmonary dysplasia remains a major problem in premature ventilated infants
- BPD is associated with neurodevelopmental disability and increased cost making this one of the more important focuses of clinical research in neonatal medicine

Roger F. Soll, MD  
H. Wallace Professor of Neonatology  
University of Vermont  
President Vermont Oxford Network  
October 2011

# CHRONIC LUNG DISEASE IN VLBW INFANTS

VERMONT OXFORD NETWORK ANNUAL REPORTS 1994-2008



# Definition of BPD

Oxygen requirement at 36 weeks' postmenstrual age (PMA)

- 501-1500 g: 4-58.3% (29%) VON 2003
- 24-31 w : 10.5-21.5% MOSAIC, Pediatrics 2008

# Current treatment for bronchopulmonary dysplasia

- Ventilation
- Oxygen
- Surfactant
- Inhaled nitric oxide
- Caffeine
- Steroids (antenatal, postnatal, systemic, inhaled)
- Antibiotics
- Diuretics
- Nutrition / fluid restriction
- Vitamin A
- Inositol
- Antioxidant and anti-inflammatory agents

COMMENTARY

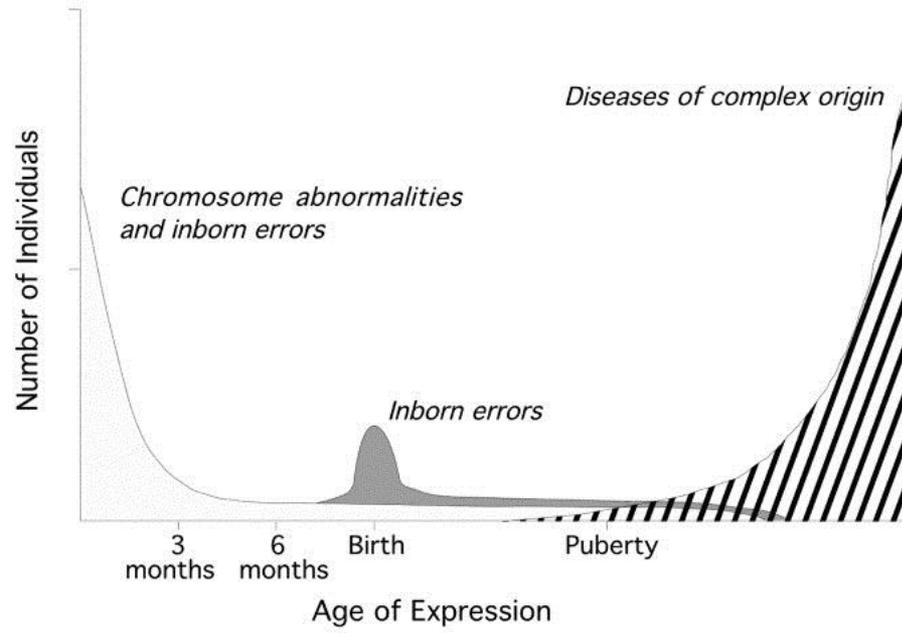
# Bronchopulmonary Dysplasia: A Genetic Disease

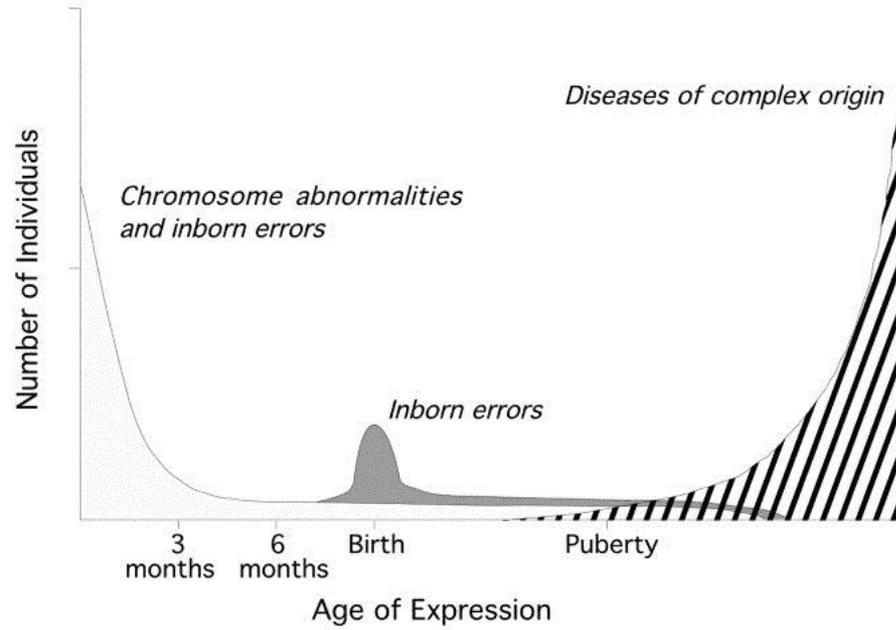
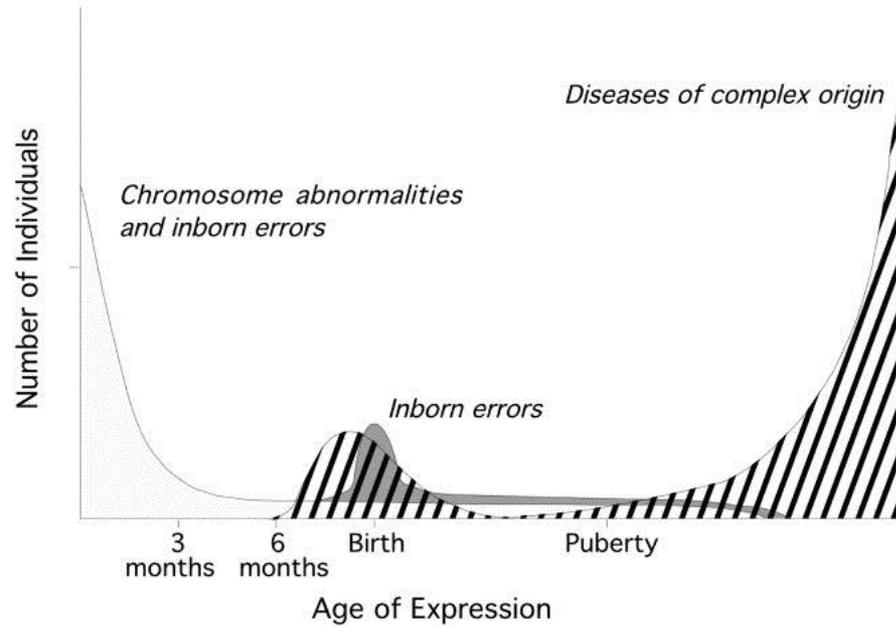
**Steven H. Abman, MD, Peter M. Mourani, MD, Marci Sontag, PhD**

Sections of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Pediatrics, Pediatric Heart Lung Center, University of Colorado School of Medicine and Children's Hospital, Aurora, Colorado

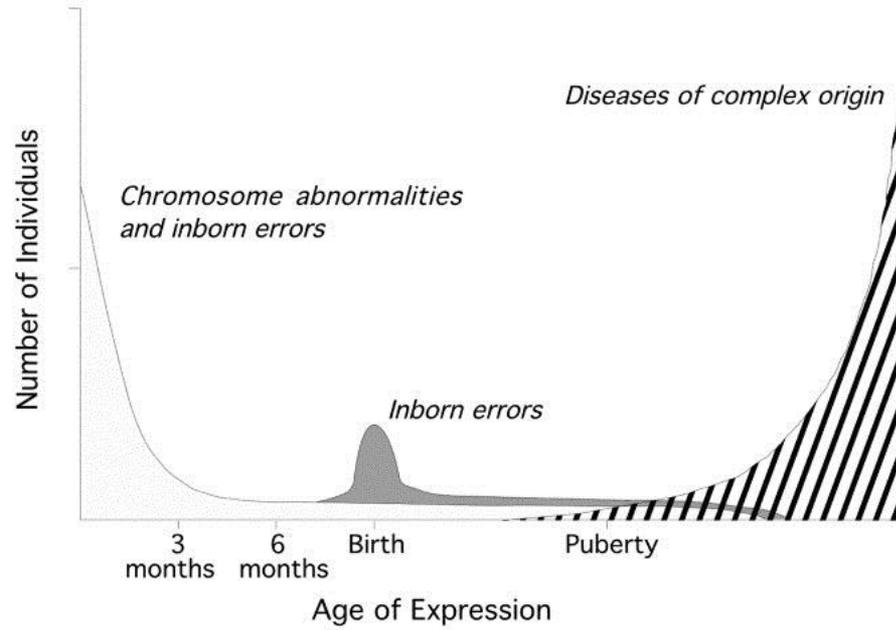
The authors have indicated they have no financial relationships relevant to this article to disclose.

A

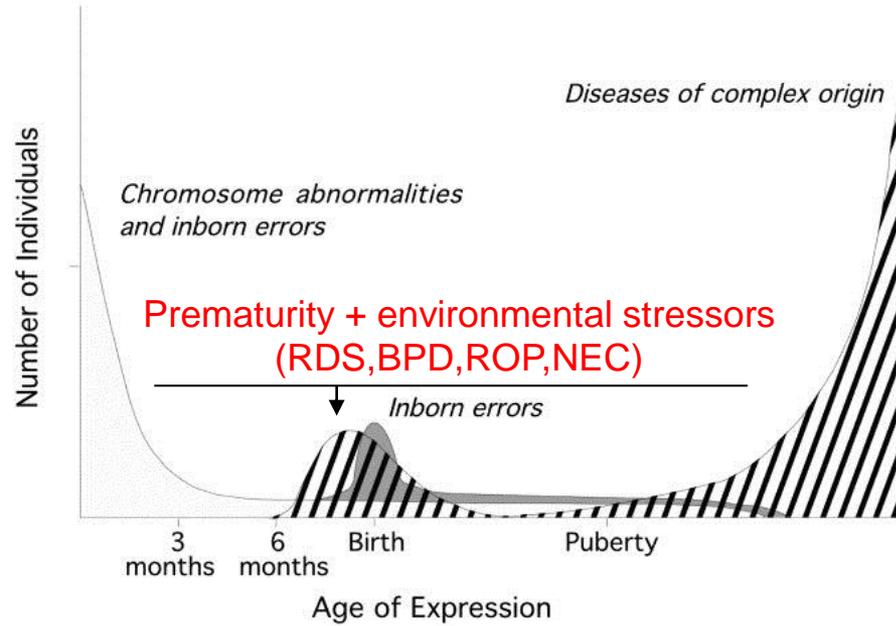


**A****B**

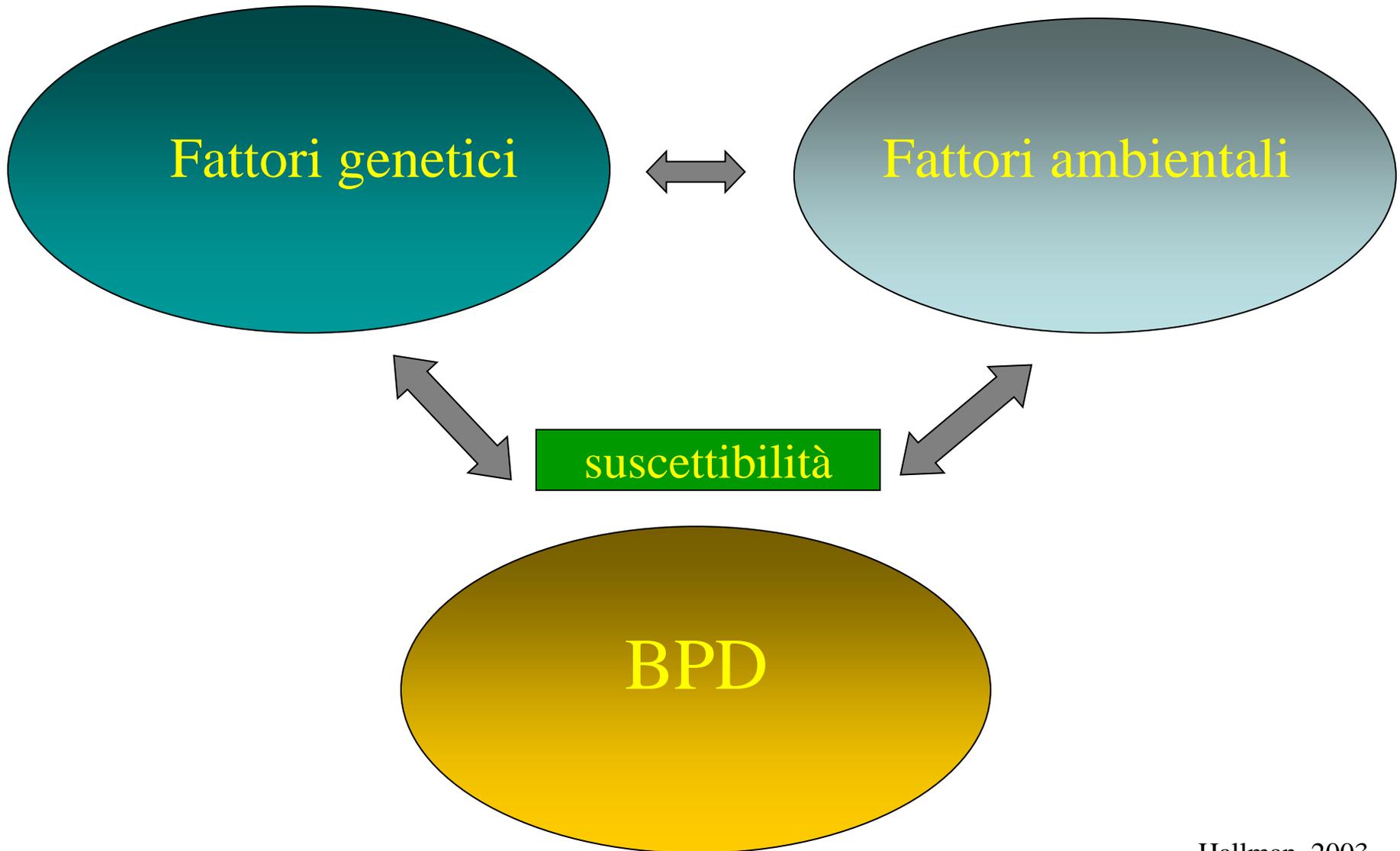
A



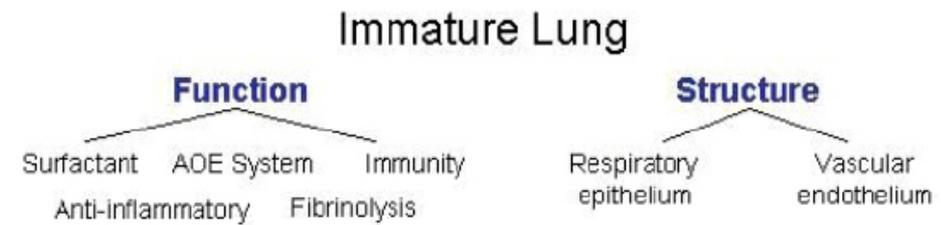
B



## BPD: una malattia multifattoriale



La BPD è una malattia multifattoriale



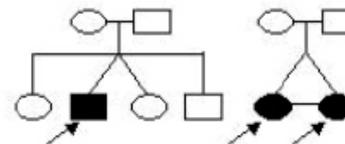
+

Environmental 'Stressors'



+

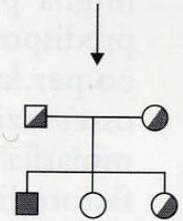
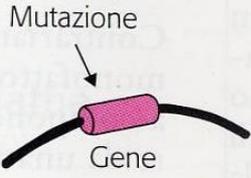
Genetic 'Foundation'



=

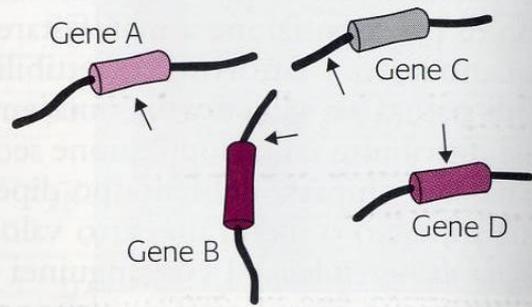
**Bronchopulmonary Dysplasia**

### Carattere monofattoriale



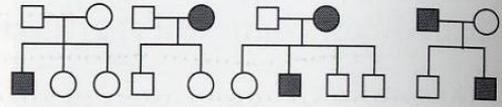
Modalità di trasmissione (dominante o recessiva)

### Malattia complessa

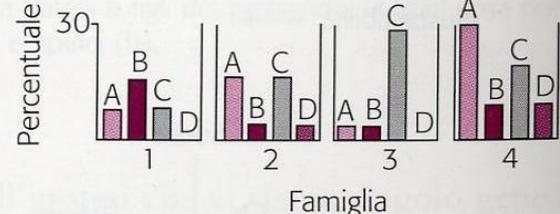
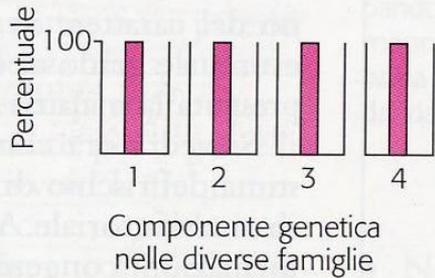
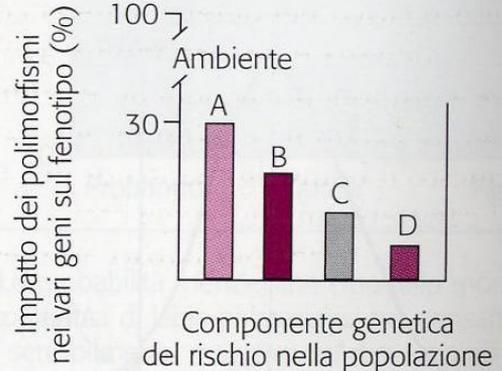
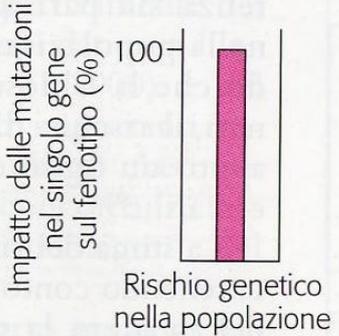


Polimorfismi

Per lo più casi sporadici



Modalità di trasmissione (complessa)



Coinvolgimento di più geni nella comparsa del carattere

varianti/polimorfismi con bassa penetranza

interazione con fattori ambientali



suscettibilità alla malattia

variabilità familiare

# Status and outcome of infants with RDS

« Good »  
Infants



Success  
On CPAP

Marginal  
Infants



Early CPAP failure  
Surfactant/MV

Bad  
Infants

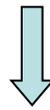


Intubation  
surfactant  
MV / HFOV  
BPD / death

genetic variability

# Medicina predittiva e preventiva per l'ottimizzazione della terapia

Definizione del rischio genetico di malattia

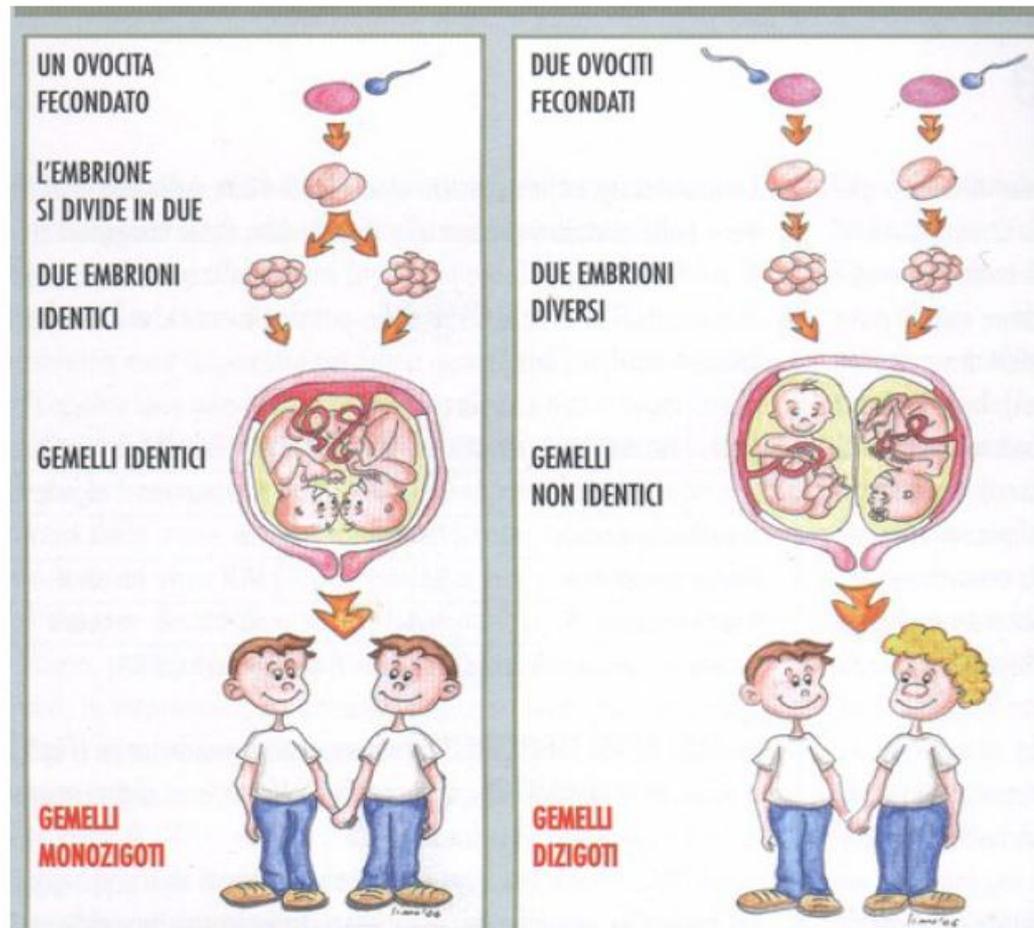


Sviluppo e validazione di terapie personalizzate

# Impatto della genetica nella BPD

## Metodi di studio

# Impatto genetico nelle malattie multifattoriali: Metodo dei gemelli



si considera uno specifico carattere: se il rapporto tra concordanza osservata e quella attesa è maggiore nei monozigoti è da attribuire a fattori genetici

# Impact of genetics in BPD

## Twin studies

Author	% of variability in the incidence of BPD due to genetic factors
Bandhari (Pediatrics, 2006)	53
Lavoie (Pediatrics, 2008)	79



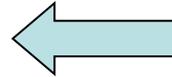
Studio di associazione caso-controllo



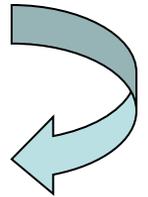
Determinare il fenotipo da studiare



Analisi di associazione



Selezione degli SNPs



confronto della frequenza di un polimorfismo in 2 gruppi di soggetti

quando un polimorfismo ha una frequenza significativamente maggiore nei casi rispetto ai controlli si conclude che è associato al fenotipo in esame

***Prenatal events***

Chorioamnionitis  
- Cytokine  
exposure of the  
fetus-

***Postnatal events***

- + Resuscitation
- + Oxygen toxicity
- + Mechanical ventilation
- + Pulmonary and / or systemic infection



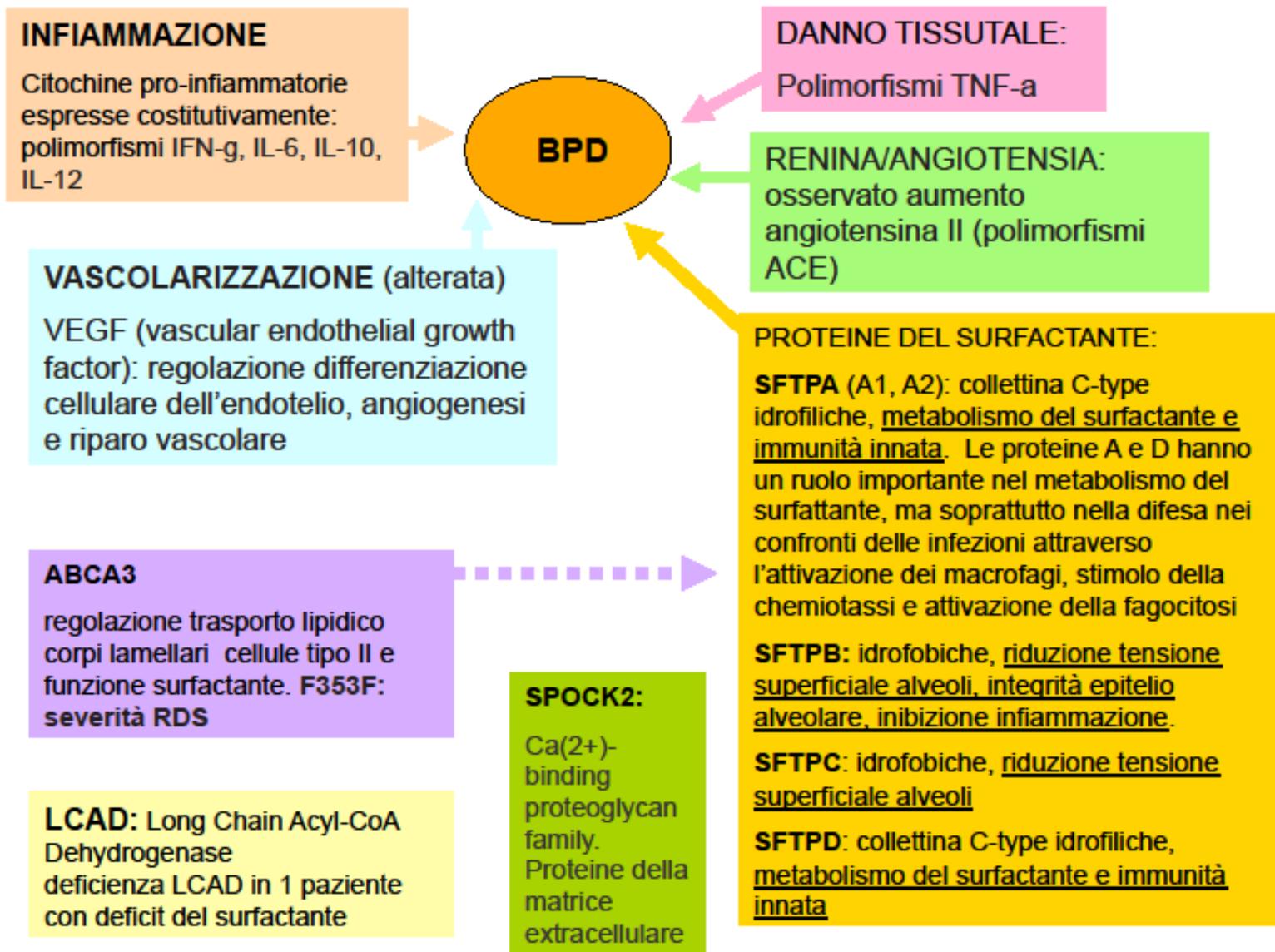
Pulmonary inflammatory response

Aberrant wound healing

Inhibition of alveolarization and vascular development

**“New” BPD**

# Geni candidati per studi di associazione



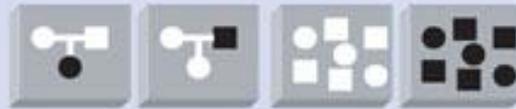
# Problemi connessi agli studi di associazione genetica

- Omogeneità etnica
- Casistica omogenea
- Omogeneità delle condizioni in cui avviene lo studio e delle misure dell' outcome
- Numero adeguato di pazienti (a causa del debole impatto del polimorfismo)

# Candidate genes for BPD

Genes	DNA variation	Population	p value	Risk	References
<b>Glutathione-S-Transferase-P1 (GST-P1)</b>	p.Val105Ile	133 newborns (35 MOD and SEV BPD vs 98 controls)	p=0.05	↑ <b>BPD</b>	Manar MH, Brown MR, Gauthier TW and Brown LAS. J Perinatol 2004. 24:30-35
<b>Surfactant Protein-B (SP-B)</b>	Intron 4 deletion	245 newborns ≤32 wk (67 MOD and SEV BPD vs 178 controls)	P=0.008	↑ <b>BPD</b>	Rova M, Haataja R, Marttila R, Ollikainen V, Tammela O, Hallman M. Hum Mol Genet 2004; 13:1095-104
<b>Tumor Necrosis Factor alpha (TNFα)</b>	c.-238 G/A	120 newborns <1250 g (51 MOD and SEV BPD vs 69 controls)	p=0.026	↓ <b>BPD</b>	Kazzi SNJ, Kim UO, Quasney MW, and Buhimschi I. Pediatrics 2004. 114(2):243-248
<b>Angiotensin Converting Enzyme (ACE)</b>	intron 16 deletion	120 newborns <1250 g (51 MOD and SEV BPD vs 69 controls)	p=0.025	↑ <b>BPD</b>	Kazzi SN and Quaesny MW. L Pediatr 2005. 147:818-22
<b>Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)</b>	c.-460 T>C	181 newborns 24-32 wk (118 MILD, MOD and SEV BPD vs 63 controls)	p=0.013	↓ <b>BPD</b>	Kwinta O, Bik-Multanowski, Mitkowska Z, et al. Pediatr Res 2008; 64:682-688
<b>Matrix Metalloproteinase16 (MMP16)</b>	rs2664352	263 newborns <28 wk (45 MOD and SEV BPD vs 218 controls)	p=0.013 (T/T)	↓ <b>BPD</b>	Hadchouel a, Decobert F, Franco-Montoya ML, et al. PLoS ONE 2008; 3(9):1-10
	rs2664349		p=0.047 (G/G)	↓ <b>BPD</b>	
<b>Testican-2 (SPOCK2)</b>	rs1245560	390 newborns <28 wk (87 MOD and SEV BPD vs 303 controls)	p=1.66x10 <sup>-7</sup>	↑ <b>BPD</b>	Hadchouel A, Durrmeyer X, Bouzigon E, et al. Am j Respir Crit Care Med. 2011. 15;184(10):1164-70.
<b>Toll-Like Receptor 5 (TLR-5)</b>	p. Arg392X	280 newborns ≤1500g (66 MOD and SEV BPD vs 223 controls)	p=0.03	↑ <b>BPD</b>	Sampath V, Garland J, Le Min, et al. Pediatr Pneumol 2012. 47 :460-468

# Genome-wide association study



Population resources –  
trios or case-control samples



Whole-genome genotyping



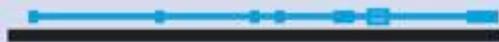
Genome-wide association



Fine mapping



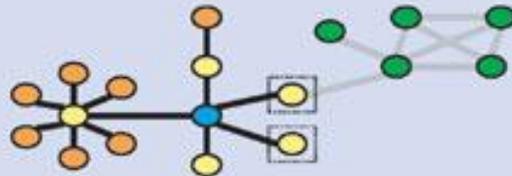
Gene mining



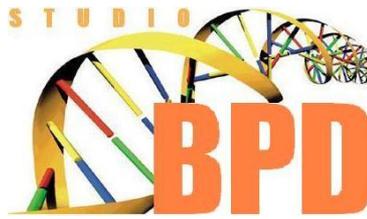
Gene sequencing &  
polymorphism identification



Identification of causative SNPs



Pathway analysis &  
target identification



## Identificazione di fattori genetici predisponenti per displasia broncopolmonare in neonati di origine europea *Studio multicentrico*

**Coordinamento Clinico: Marco Somaschini**

**Coordinamento Genomica: Paola Carrera,**

**Data basing: Marco Corsi**

Emanuela Castiglioni

Chiara Volonteri

Maurizio Ferrari

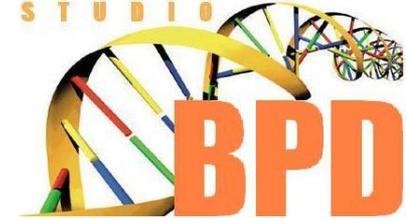
*IRCCS San Raffaele (Milano)*



### Centri partecipanti:

Rosario Magaldi, Matteo Rinaldi, Gianfranco Maffei (Foggia)  
Mauro Stronati, Chryssoula Tzialla, Alessandro Borghesi (Pavia)  
Paolo Tagliabue, Tiziana Fedeli, Marco Citterio (Monza)  
Fabio Mosca, Mariarosa Colnaghi, Anna Lavizzari (Milano)  
Massimo Agosti, Gaia Francescato (Varese)  
Antonella Auriemma, Cristina Bellan, Giorgio Priori (Seriata)  
Virgilio Carnielli, Stefano Nobile (Ancona)  
Paolo Gancia, Giulia Pomero, Cristina Dalmazzo (Cuneo)  
Enrico Bertino, Claudio Martano (Torino)  
Giuseppe Carrera, Chiara Zambetti (Lodi)  
Antonio Boldrini, Armando Cuttano, Rosa Scaramuzzo (Pisa)  
Rocco Agostino, Riccardo Pucello, Sara Palatta (Roma)





## Scopo dello studio

Identificare le varianti genetiche predisponenti per BPD  
(identificare i neonati a maggior rischio → trattamento personalizzato)

## Criteri di arruolamento e metodi

- Neonati pretermine con EG < 32 settimane di etnia europea (escludere africani, asiatici, sudamericani...)
- (casistica 450 neonati)
- Criterio di esclusione: malformazioni polmonari maggiori
- Consenso informato
- Prelievo di 1 cc sangue intero in EDTA (conservare a – 20°C) almeno 20 giorni dopo eventuali trasfusioni

**TABLE 1. DEFINITION OF BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA:  
DIAGNOSTIC CRITERIA**

Gestational Age	< 32 wk	≥ 32 wk
Time point of assessment	36 wk PMA or discharge to home, whichever comes first	> 28 d but < 56 d postnatal age or discharge to home, whichever comes first
	Treatment with oxygen > 21% for at least 28 d <b>plus</b>	
Mild BPD	Breathing room air at 36 wk PMA or discharge, whichever comes first	Breathing room air by 56 d postnatal age or discharge, whichever comes first
Moderate BPD	Need* for < 30% oxygen at 36 wk PMA or discharge, whichever comes first	Need* for < 30% oxygen at 56 d postnatal age or discharge, whichever comes first
Severe BPD	Need* for ≥ 30% oxygen and/or positive pressure, (PPV or NCPAP) at 36 wk PMA or discharge, whichever comes first	Need* for ≥ 30% oxygen and/or positive pressure (PPV or NCPAP) at 56 d postnatal age or discharge, whichever comes first

# **NEWER DEFINITIONS: BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA**

---

**Severity – Based Diagnostic Criteria for BPD  
For infants at 36 weeks PMA or discharge**

**Received oxygen for at least 28 days**

**Mild BPD:                   in room air**

**Moderate BPD:         $FiO_2 < 0.3$**

**Severe BPD:            $FiO_2 \geq 0.3$  and/or PPV or CPAP**

*Ehrenkranz 2005*

# Raccolta dei dati

Ogni centro partecipante è stato dotato di un database informatico per la compilazione dei dati.

Il database è strutturato in 3 sezioni: ANAMNESI, RICOVERO, GENETICA

**Scheda raccolta dati Studio multicentrico BPD**

Anamnesi   Ricovero   Genetica

Medico referente  Telefono  Email

Cognome   Nome   Data di nascita   Sesso   E.G.   Peso   APGAR 1'   APGAR 5'

Origine materna   Origine paterna

italiana    estera   Italia

stato   regione   stato   regione

Fattori di rischio materno

Infezioni    IUGR    Altro

PROM >18 h    Gestosi

Profilassi con steroidi antenatali

Modalità del parto    Gemellarità

Presenza di patologie polmonari in famiglia

**CENTRO-cognome-nome**  **Istituto**  

Record:  1 di 1

## Scheda raccolta dati Studio multicentrico BPD

Anamnesi

Ricovero

Genetica

RDS     Surfattante    n° dosi

### Assistenza ventilatoria

N-CPAP    per ore     per giorni   
 VM    per ore     per giorni   
 HFO    per ore     per giorni   
 O2 terapia    per ore     per giorni

a 28 giorni

O2 dipendenza % O2   
 CPAP    % O2   
 VM    % O2

a 36 settimane

O2 dipendenza % O2   
 CPAP    % O2   
 VM    % O2

### Terapia farmacologica

Cortisone     Diuretici     INO     Altro

### Emotrasfusione

Emotrasfusione    Plasma (n°)     GRC (n°)     PLT (n°)     Altro   
Giorni tra l'ultima emotrasfusione e il prelievo

### Esami strumentali significativi

RX Torace     Biopsia Polm  
 TC Polmonare     Altro

PDA    Chiusura con    
 Emocultura +     Emorragia     NEC  
Diagnosi alla dimissione   
Durata della degenza

CENTRO-cognome-nome

Istituto



DB by Marco Corsi



### Scheda raccolta dati Studio multicentrico BPD

Anamnesi

Ricovero

Genetica

Gene/Pannello

Commento

Record: 1 di 1

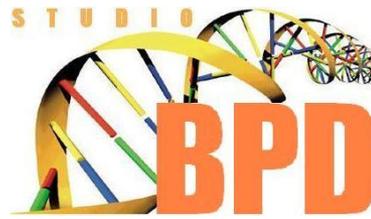
CENTRO-cognome-nome

Istituto



DB by Marco Corsi

Record: 1 di 1

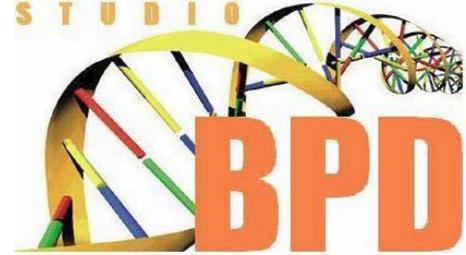


**Identificazione di fattori genetici predisponenti per displasia  
broncopolmonare in neonati di origine europea**  
*Studio multicentrico*

Settembre 2012

413 campioni

## Multicenter study

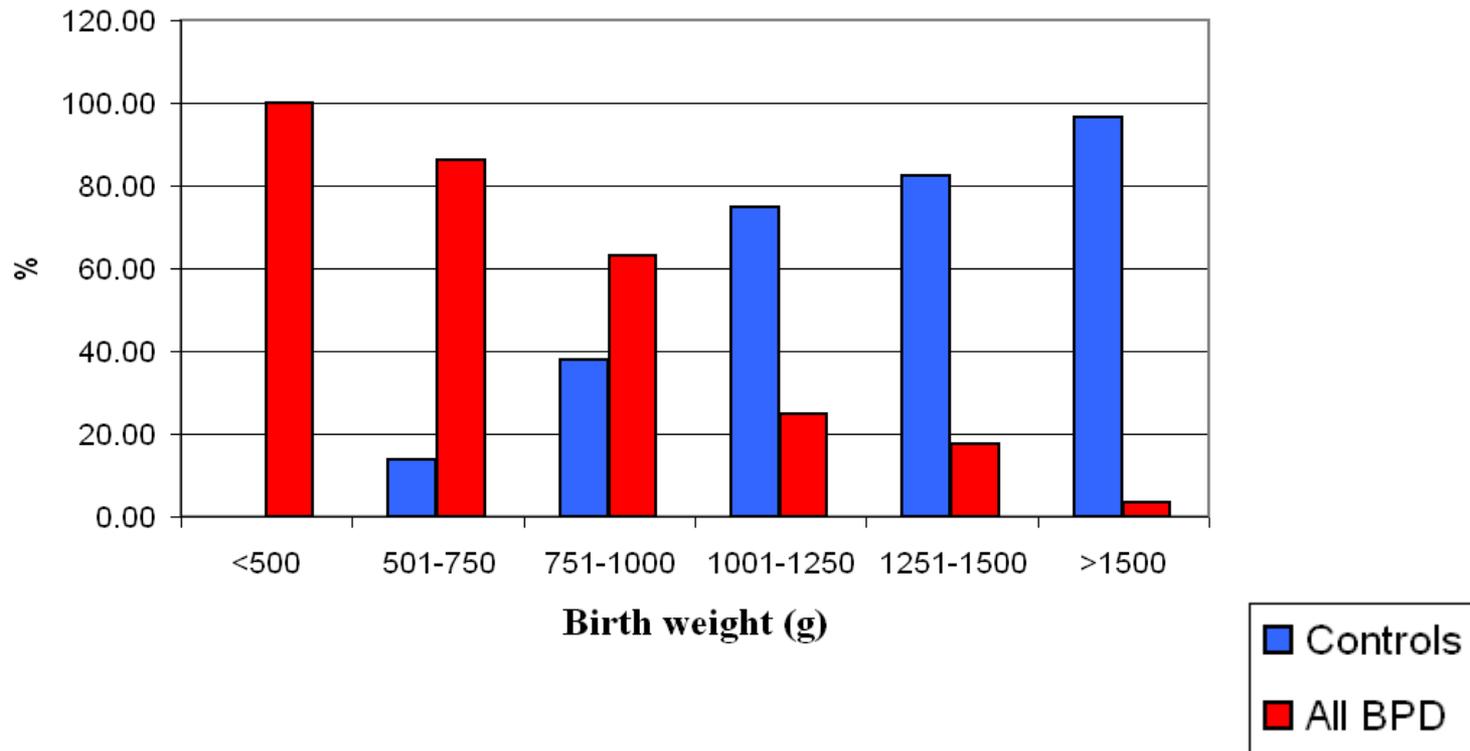


# Identification of genetic factors predisposing to broncopulmonary dysplasia in neonates of european origin

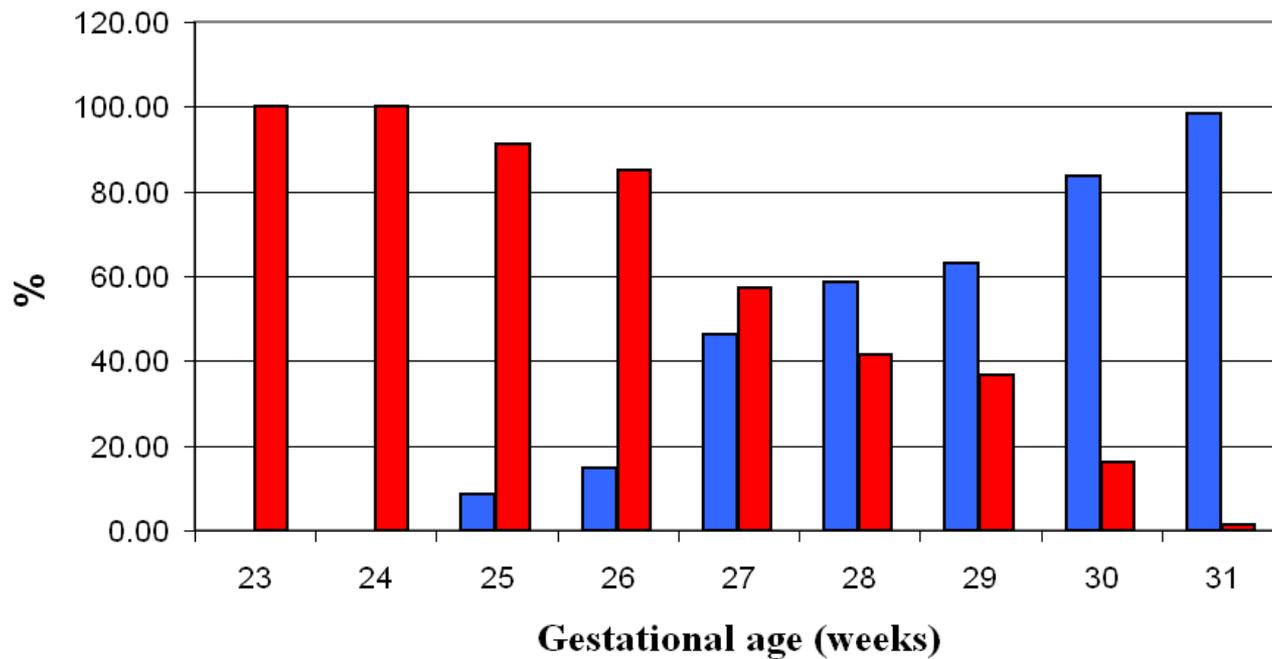
June 2012

n infants	n BPD	n controls
366	141	225
	Mild 65 (46%)	
	Moderate 40 (28%)	
	Severe 36 (25%)	

## Birth Weight

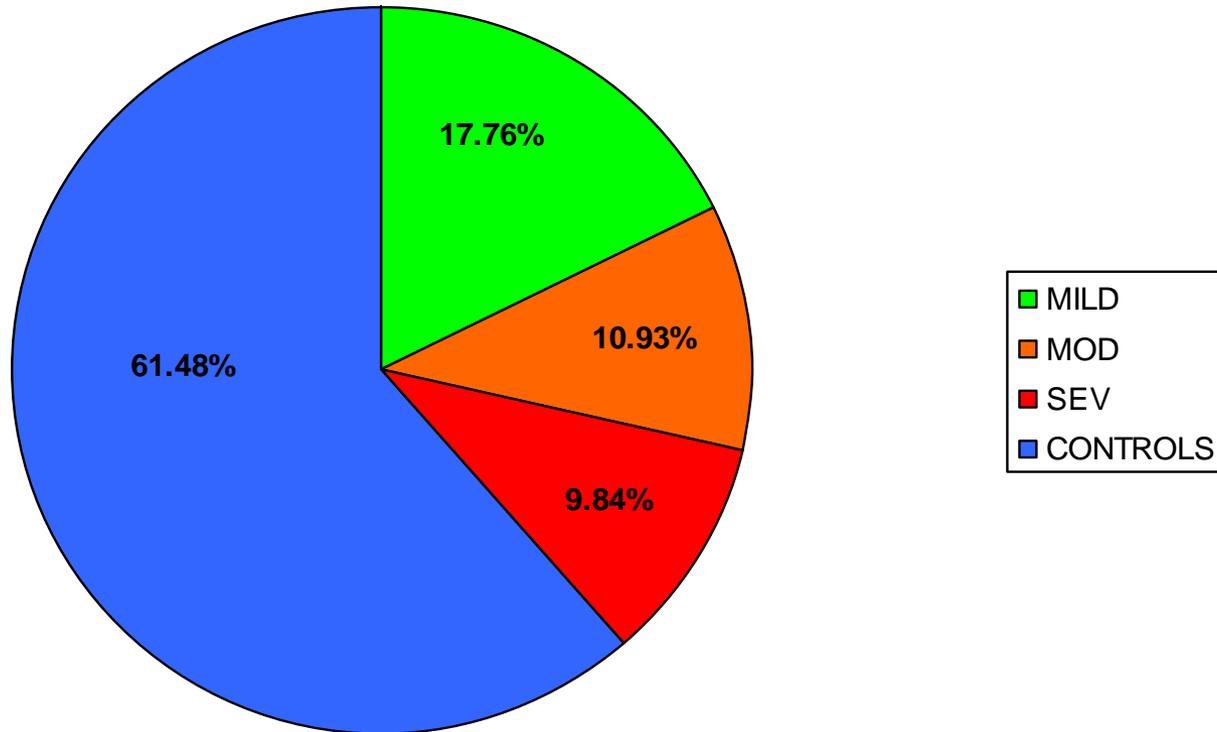


# Gestational Age



# characteristics of 366 neonates

	Controls	MILD	MOD	SEV	All BPD	MOD+SEV
N° of patients	225	65	40	36	141	76



## anamnesis

	Controls	MILD	MOD	SEV	All BPD	MOD+SEV	
N° of patients	225	65	40	36	141	76	p°
Birth weight (average, g)	1296.45	931.00	944.78	740.61	886.30	848.07	
Gestational age (average, weeks)	29.56	27.17	27.03	25.86	26.79	26.47	
Male (%)	52.00	44.62	65.00	66.67	56.03 <sup>ns</sup>	65.79*	0.0475
Familiarity to lung diseases (%)	4.00	1.54	10.00	5.56	4.96 <sup>ns</sup>	7.89	

° Pearson's Chi square vs Controls; ns: not significant, \*: significant

## Environmental factors: pregnancy (1)

	Controls	MILD	MOD	SEV	All BPD	MOD+ SEV	
N° of patients	225	65	40	36	141	76	p°

Antenatal maternal infections (%)	13.39	15.38	35.00	17.65	21.58 <sup>ns</sup>	27.03*	0.0163
IUGR (%)	14.67	7.69	10.00	11.11	9.22 <sup>ns</sup>	10.53	
PROM (%)	15.11	16.92	20.00	25.00	19.86 <sup>ns</sup>	22.37	
Gestosis (%)	16.00	26.15	12.50	11.11	18.44 <sup>ns</sup>	11.84	

° Pearson's Chi square vs Controls; ns: not significant, \*: significant

## Environmental factors: pregnancy (2)

	Controls	MILD	MOD	SEV	All BPD	MOD+ SEV	
N° of patients	225	65	40	36	141	76	p°

Caesarian section (%)	82.43	69.84	72.97	76.47	72.39 <sup>ns</sup>	74.65	
Twin birth (%)	29.78	21.54	22.50	33.33	24.82 <sup>ns</sup>	27.63	
Antenatal steroids (%)	89.73	84.62	92.50	83.33	86.52 <sup>ns</sup>	88.16	
Complete cycle of antenatal steroids (%)	78.64	66.15	72.50	58.33	65.96*	65.79	0.045

° Pearson's Chi square vs Controls; ns: not significant, \*: significant

## Environmental factors: postnatal age

	Controls	MILD	MOD	SEV	All BPD	MOD+ SEV	
N° of patients	225	65	40	36	141	76	p°

Postnatal infection (%)	9.33	24.62	27.50	44.44	30.50*	35.53	0.00018
Surfactant therapy (%)	38.67	83.08	95.00	86.11	87.23*	90.79	<0.0000 001
>1 surfactant dose (%)	8.00	26.15	45.00	69.44	42.55*	56.58	<0.0000 001
Postnatal steroids (%)	3.11	21.54	42.50	50.00	34.75*	46.05	<0.0000 001
Diuretics (%)	3.11	29.23	57.50	63.89	46.10*	60.53	<0.0000 001

° Pearson's Chi square vs Controls; ns: not significant, \*: significant

## Environmental factors: postnatal age

	Controls	MILD	MOD	SEV	All BPD	MOD+ SEV	
N° of patients	225	65	40	36	141	76	p°
NO (%)	0.89	3.08	5.00	27.78	9.93*	15.79	0.004
Respiratory support (%)	92.89	100.00	100.00	100.00	100.00*	100.00	0.001
NCPAP (%)	90.67	98.46	95.00	100.00	97.87*	97.37	0.028
VM (%)	34.67	80.00	90.00	94.44	86.52*	92.11	<0.0000 001
HFOV (%)	4.00	13.85	37.50	58.33	31.91*	47.37	<0.0000 001
O2 (%)	58.67	100.00	100.00	100.00	100.00*	100.00	<0.0000 001
Blood transfusion (%)	31.11	67.69	75.00	88.89	75.18*	81.58	<0.0000 001

° Pearson's Chi square vs Controls; ns: not significant, \*: significant

## Prematurity complications

	Controls	MILD	MOD	SEV	All BPD	MOD+ SEV	
N° of patients	225	65	40	36	141	76	p°

RDS (%)	79.56	95.38	97.50	100.00	97.16*	98.68	0.00014
PDA (%)	23.56	53.85	55.00	77.78	60.28*	65.79	<0.0000 001
Cerebral Haemorrhage (%)	7.11	16.92	22.50	47.22	26.24*	34.21	0.00028
NEC (%)	4.00	10.77	7.50	19.44	12.06*	13.16	0.035

° Pearson's Chi square vs Controls; ns: not significant, \*: significant

# GENETICS



# Methods



## 1) Association study of a panel of 128 SNP

- 4 SFTPA (aplotypes 6A2, 1A0 of genes SFTPA1 and SFTPA2)
- 13 SFTP B
- 13 SFTP C
- 19 SFTP D
- 31 ABCA3
- 3 LCAD
- 7 SPOCK2
- Other candidate genes**

TaqMan® OpenArray®  
Genotyping Instrument Platform



## 2) Analysis ins/del int 4 SPB (associated with BPD) with DHPLC



# Next generation sequencing

Processività di 1 giorno=10 anni del metodo classico (Sanger) per Progetto Genoma

Permette l'analisi di sequenza di tutto il genoma, o parte di esso (esoma o batterie di geni) in modo accurato

Raccoglie informazioni su tutte le varianti presenti

L'analisi dell'esoma è in grado di identificare piccole variazioni e inserzioni/delezioni di piccola/media grandezza

Permette di eseguire studi di associazione per varianti comuni

Permette di identificare varianti rare

Oggi ha raggiunto un costo competitivo



Metodo:

Sequenziamento dell'esoma tramite Next generation Sequencing (NGS)

Protocollo Illumina

La maggior parte delle mutazioni identificate nelle malattie ereditabili sono localizzate a livello delle regioni codificanti del genoma (esoma)

Esoma = 1% di tutto il genoma

Aprile 2012: approvazione del Comitato Etico

# Protocollo di lavoro

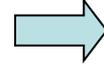
Sangue (1ml)



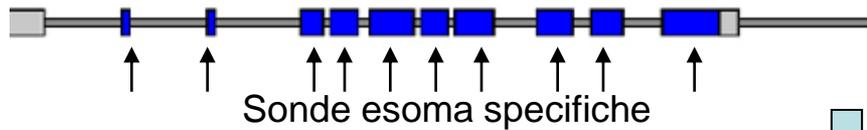
Estrazione DNA



Frammentazione DNA  
(sonicazione)



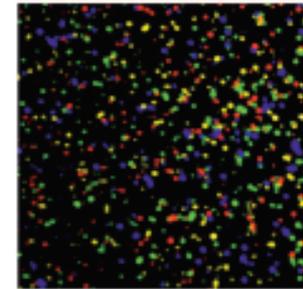
Preparazione librerie genomiche



Arricchimento con sonde  
specifiche per esoma



Generazione di clusters sulla flow cell



Sequenziamento su piattaforma HiSeq 2000



Output di dati di sequenza



10 days/run



## Output dei dati di sequenza

Totale sequenze per campione : 57.353.406  
↓  
(6 miliardi di basi)

Milioni di variazioni per campione

Filtro qualità → ↓ ← Filtro varianti comuni

Migliaia di variazioni per individuo

## Analisi dei dati (linee guida Broad Institute)

↓  
Allineamento con genoma di riferimento hg19

Classificazione variazioni:

Nuove

Note

} Predizione effetto delle singole variazioni  
sul gene (softwares di predizione snEFF,  
Polyphen, Sift, GATK)

Basso impatto

Alto impatto

Medio impatto

# Analisi dei dati (Annotazioni per ogni variante identificata)

Numero del cromosoma su cui è stata identificata la variazione

Posizione genomica

Codice rs (per le varianti note)

Allele di riferimento ed allele alternativo

Parametri di qualità per ogni singola variante

Frequenza allelica dell'insieme dei campioni sequenziati

GMAF (frequenza dell'allele minoritario in banca dati)

Tipo di mutazione: SNP/DEL/INS/MISSENCE

Genotipo di ogni singolo campione relativo ad ogni singola mutazione identificata

Nome del gene in cui è stata trovata la variazione

Effetto della variante: snEFF. Polyphen, Sift, GATK



#CHROM	POS	ID	REF	ALT	FILTER	VQSLOD	DP	MQ	QUAL	AF	GMAF	BPD-11	BPD-2	BPD
1	2.1E+08	rs113345	C	T	PASS	7.0244	238	59.43	186.76	0.042	0.00183	0/1	0/0	0/0
2	8.6E+07	rs626234	C	T	TruthSens	6.1127	343	59.6	331.69	0.042	0.00868	0/0	0/0	0/0
2	8.6E+07	rs112653	G	C	PASS	7.4675	184	59.81	212.98	0.042	0.00046	0/0	0/0	0/0
2	1.1E+08	rs776626	C	T	PASS	7.1306	273	59.58	353.15	0.042	0.00686	0/0	0/0	0/1
2	1.7E+08	rs342918	G	C	PASS	6.7018	246	59.58	73.28	0.042	0.00868	0/0	0/0	0/0
3	5E+07	rs91980	T	A	PASS	7.3011	251	59.21	347.07	0.042	0.0032	0/0	0/0	0/0
3	7.3E+07	rs223192	T	G	PASS	6.7466	543	59.34	788.76	0.042	0.00503	0/0	0/0	0/0
4	8.4E+07	rs112033	T	A	TruthSens	6.009	218	59.3	484.82	0.083	0.0064	0/0	0/0	0/1
5	4.1E+07	rs762029	A	G	PASS	6.6374	316	59.8	657.45	0.042	0.00091	0/0	0/1	0/0
5	1.8E+08	rs112867	G	A	PASS	6.8173	262	59.42	67.91	0.042	0.00411	0/0	0/0	0/0
7	1.5E+08	rs118956	G	A	TruthSens	5.0917	180	58.52	112.04	0.042	0.00274	0/0	0/0	0/0
X	6.9E+07	rs413106	C	T	TruthSens	6.2067	258	58.47	348.93	0.042	0.00914	0/0	0/0	0/0
X	7.4E+07	rs13237	C	T	PASS	7.1869	206	59.48	584.77	0.042	0.00736	0/0	0/0	0/1
X	1.1E+08	rs413044	G	A	TruthSens	6.1097	390	59.47	513.75	0.091	0.00366	0/0	0/0	0/0
8	1.8E+07	rs503083	C	T	PASS	6.4214	427	59.7	110.17	0.042	0.00274	0/0	0/0	0/0
8	4E+07	rs752684	T	A	PASS	7.0717	243	59.53	965.06	0.083	0.00548	0/0	0/0	0/0
8	1.1E+08	rs726870	G	A	PASS	7.1782	129	59.5	171.49	0.042	0.00503	0/0	0/0	0/1
9	9.6E+07	rs117360	C	T	PASS	7.7017	145	58.68	238.57	0.042	0.0096	0/0	0/0	0/0
9	1.1E+08	rs744980	C	A	TruthSens	6.0917	233	59	676.86	0.042	0.00823	0/0	0/0	0/1
10	3.7E+07	rs116939	G	T	TruthSens	6.2312	283	59.76	345.86	0.042	0.00914	0/0	0/0	0/0
11	5.6E+07	rs117360	C	T	PASS	6.9575	331	59.44	442.28	0.042	0.0096	0/0	0/0	0/0
12	2.6E+07	rs118038	C	T	PASS	6.5208	262	58.95	65.63	0.042	0.00457	0/0	0/0	0/0
12	5.1E+07	rs802010	G	A	TruthSens	6.3318	199	59.65	179.93	0.042	0.00914	0/0	0/0	0/0
13	3.3E+07	rs115718	A	T	TruthSens	5.5565	290	60	91.71	0.042	0.00457	0/0	0/0	0/0
14	2.1E+07	rs115945	T	A	TruthSens	5.2725	418	59.25	642.96	0.083	0.00457	0/0	0/0	0/0

# Studio “pilota”

5 SEVERE BPD

5 RDS (0/1  
mutazione)

2 CONTROLS  
(precedentemente  
sequenziati con  
Sanger per alcuni  
geni malattia)

Campione	Coverage medio	Sequenziamento Sanger
BPD-1	37	
BPD-2	20	
BPD-3	7	
BPD-4	28	
BPD-5	25	
RDS-1	20	
RDS-2	33	
RDS-3	27	
RDS4	36	
RDS-5	7	
CONTROLLO1	23	Concordanza 100%
CONTROLLO2	48	Concordanza 100%

E' stata necessaria una ottimizzazione del metodo per aumentare la Coverage del sequenziamento (**coverage ottimale ~ 30X**)

## Work in progress (12 campioni):

4.657 varianti con **forte effetto**

### Ricerca varianti rare

1) Selezione **varianti note** con  $MAF < 0.01$  **tot.66**

(31 only BPD + 32 only RDS + 3 comuni)

2) Selezione **varianti nuove** **tot.548**

(128 only BPD + 310 only RDS + 110 comuni)

### In corso:

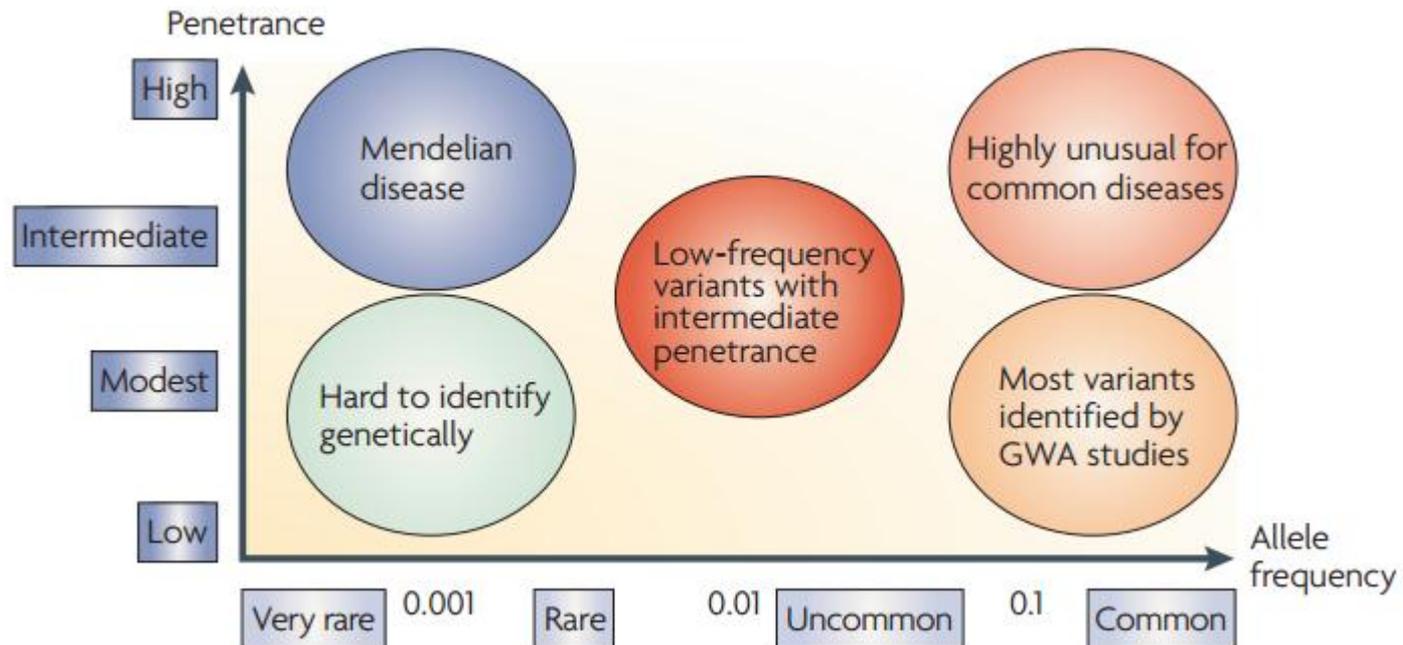
- . Verifica varianti con metodo Sanger
- . selezione geni candidati

25.881 varianti con **effetto moderato**

- Obiettivi futuri:
- . Analisi delle varianti con effetto moderato
  - . Conferma varianti con metodo Sanger
  - . Selezione geni candidati

## Obiettivo finale

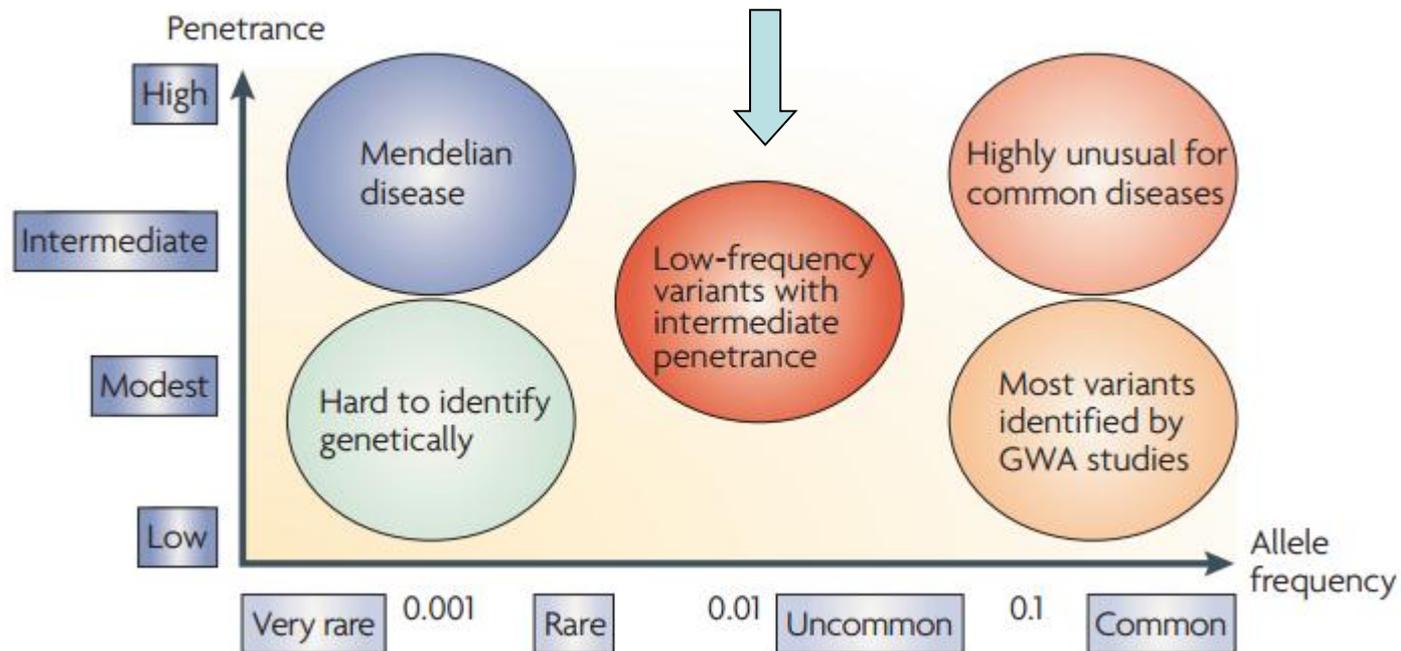
Applicazione del protocollo NGS a tutta la casistica BPD per l'identificazione di varianti rare a impatto medio/alto e di varianti comuni predisponenti alla malattia



McCarthy. Nature Rev Genet 9; 356-369 (May 2008)

## Obiettivo finale

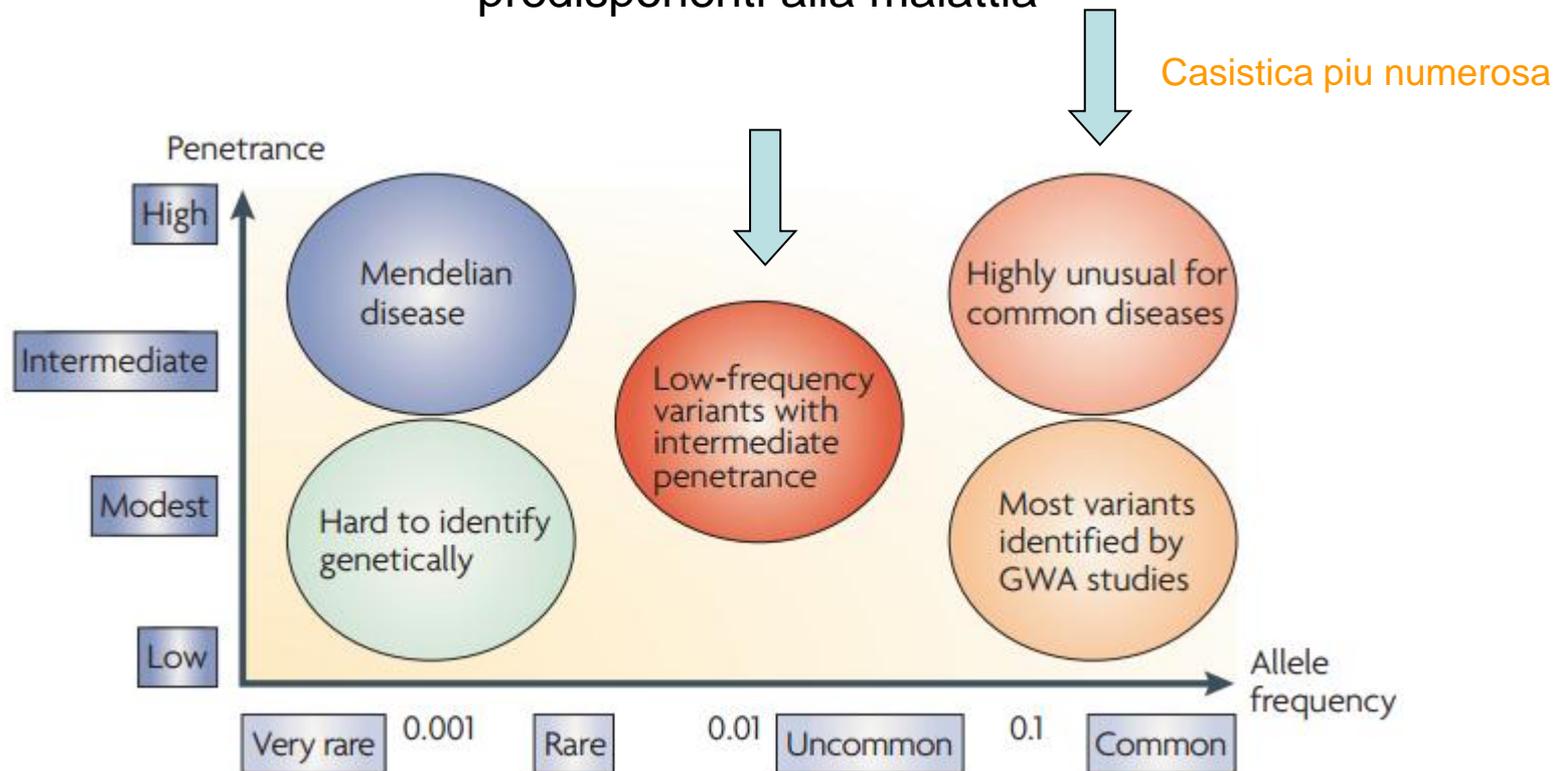
Applicazione del protocollo NGS a tutta la casistica BPD per l'identificazione di varianti rare a impatto medio/alto e di varianti comuni predisponenti alla malattia



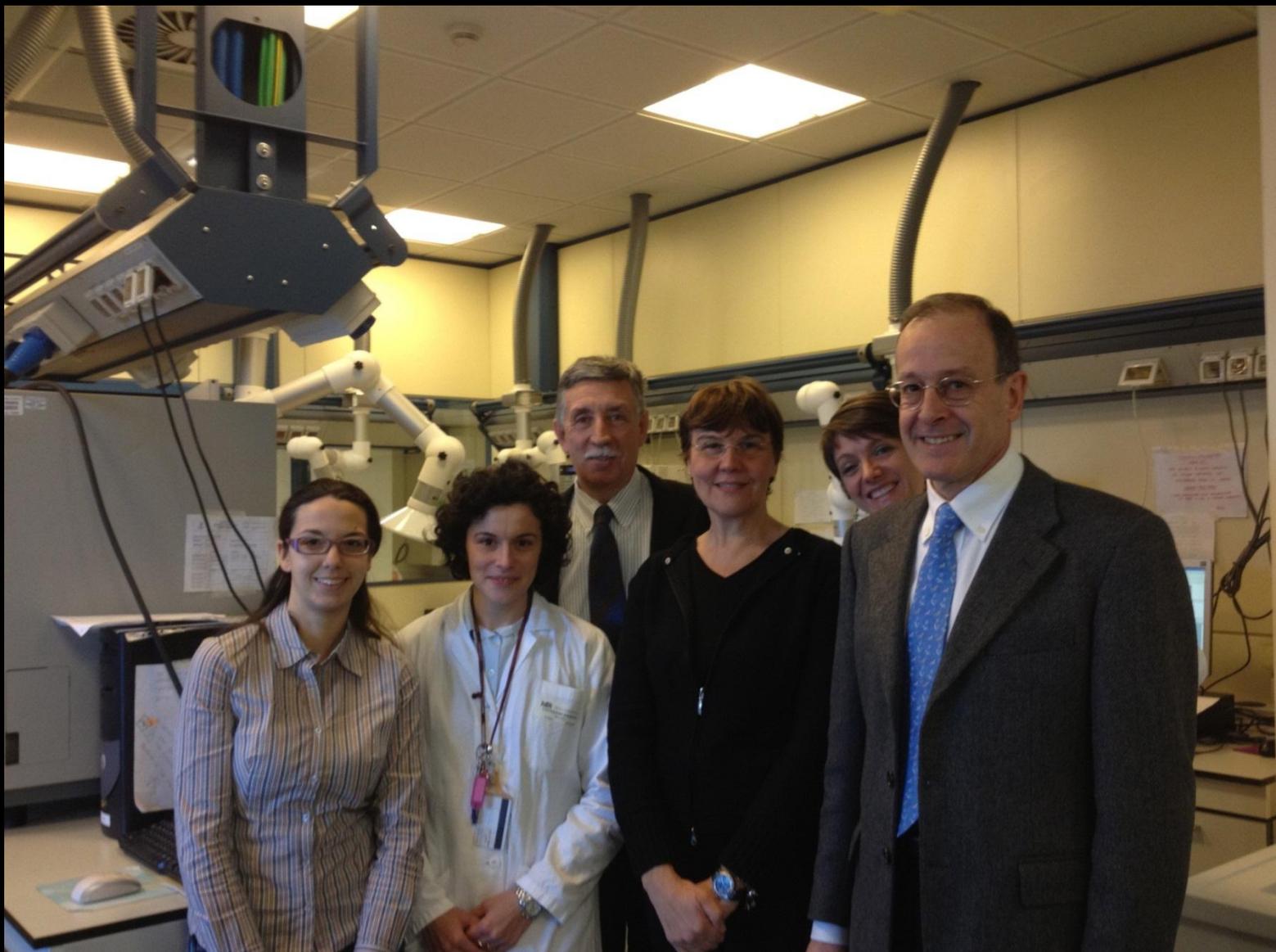
McCarthy. Nature Rev Genet 9; 356-369 (May 2008)

## Obiettivo finale

Applicazione del protocollo NGS a tutta la casistica BPD per l'identificazione di varianti rare a impatto medio/alto e di varianti comuni predisponenti alla malattia

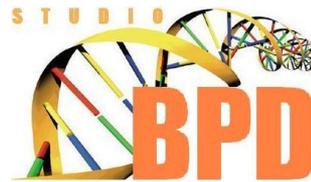


McCarthy. Nature Rev Genet 9; 356-369 (May 2008)



Unità di Genomica per la Diagnostica delle Patologie Umane  
Istituto Scientifico San Raffaele, Milano

chiara volonteri, emanuela castiglioni, maurizio ferrari, paola carrera, silvia presi, marco somaschini



**Identificazione di fattori genetici predisponenti per displasia  
broncopolmonare in neonati di origine europea**  
*Studio multicentrico*

**Ringraziamento ai Centri partecipanti:**

Rosario Magaldi, Matteo Rinaldi, Gianfranco Maffei (Foggia)  
Mauro Stronati, Chryssoula Tzialla, Alessandro Borghesi (Pavia)  
Paolo Tagliabue, Tiziana Fedeli, Marco Citterio (Monza)  
Fabio Mosca, Mariarosa Colnaghi, Anna Lavizzari (Milano)  
Massimo Agosti, Gaia Francescato (Varese)  
Antonella Auriemma, Cristina Bellan, Giorgio Priori (Seriata)  
Virgilio Carnielli, Stefano Nobile (Ancona)  
Paolo Gancia, Giulia Pomero, Cristina Dalmazzo (Cuneo)  
Enrico Bertino, Claudio Martano (Torino)  
Giuseppe Carrera, Chiara Zambetti (Lodi)  
Antonio Boldrini, Armando Cuttano, Rosa Scaramuzzo (Pisa)  
Rocco Agostino, Riccardo Pucello, Sara Palatta (Roma)