

ID: 122 - Sviluppo e validazione di una metodica di sequenziamento long-reads su piattaforma Nanopore per la diagnosi della malattia di Gaucher e la ricerca di varianti genetiche complesse suGBA1

Natascha Bergamin³, Paolo Peruzzo², Silvia Cattarossi³, Stefania Marzinotto¹, Andrea Dardis² Piattaforma di Biologia Molecolare, ASUFC Udine, ²Centro di Riferimento Regionale per le Malattie Rare, ASUFC Udine, ³Piattaforma di Biologia Molecolare-Centro di Riferimento Regionale per le Malattie Rare, ASUFC Udine

Introduzione: Il gene *GBA1* codifica l'enzima glucocerebrosidasi, un'idrolasi lisosomiale coinvolta nel catabolismo degli sfingolipidi. Varianti patogenetiche bialleliche del gene *GBA1* sono associate alla malattia di Gaucher. Ad oggi, sono state identificate oltre 700 varianti del gene con un'ampia variabilità nella loro patogenicità e correlazione con il fenotipo clinico. Di recente, inoltre, lo stato di portatore per una variante su*GBA1* è stato associato ad un aumento del rischio dello sviluppo della malattia di Parkinson (PD) e della Demenza a corpi di Lewy. La diagnosi molecolare della malattia di Gaucher rappresenta una sfida complessa a causa della presenza dello pseudogene GBAP1: l'elevata omologia e la stretta vicinanza fra gene e pseudogene aumentano la frequenza di eventi di ricombinazione, generando alleli complessi o delezioni non facilmente rilevabili con metodiche *short-reads* (NGS).

Scopo: Sviluppare e validare una metodica di sequenziamento *long-reads* utilizzando la piattaforma Nanopore per l'analisi del gene *GBA1*, in grado di identificare anche varianti complesse e delezioni critiche per le metodiche NGS di seconda generazione.

Metodi: DNA di pazienti Gaucher, genotipizzati con *long-PCR* e sequenziamento Sanger, sono stati sottoposti a sequenziamento *long-reads* con strategia "*adaptive sampling*" su piattaforma Nanopore per arricchire nel locus di interesse.

Risultati: La metodica ha permesso di ricostruire efficacemente l'assetto genotipico dei pazienti, inclusi quelli con alleli complessi solo in parte risolvibili con tecniche NGS, abbattendo i tempi rispetto ai protocolli diagnostici attualmente in uso. Inoltre, ha permesso di definire aplotipi e "*phasing*" senza ricorrere a studi di segregazione familiare. Infine, basandosi sul sequenziamento diretto del DNA nativo, ha fornito informazioni sull'assetto di metilazione della regione *GBA1* senza dover ricorrere ad ulteriori analisi.

Discussione: Il protocollo sviluppato si è dimostrato semplice ed efficace per l'analisi del gene *GBA1* ed ha il potenziale di migliorare l'accuratezza e la tempestività diagnostica sia della malattia di Gaucher sia dello stato di portatore di varianti *GBA1* in pazienti PD fornendo contestualmente informazioni aggiuntive quali aplotipo e stato di metilazione.