CFTR WORKFLOW

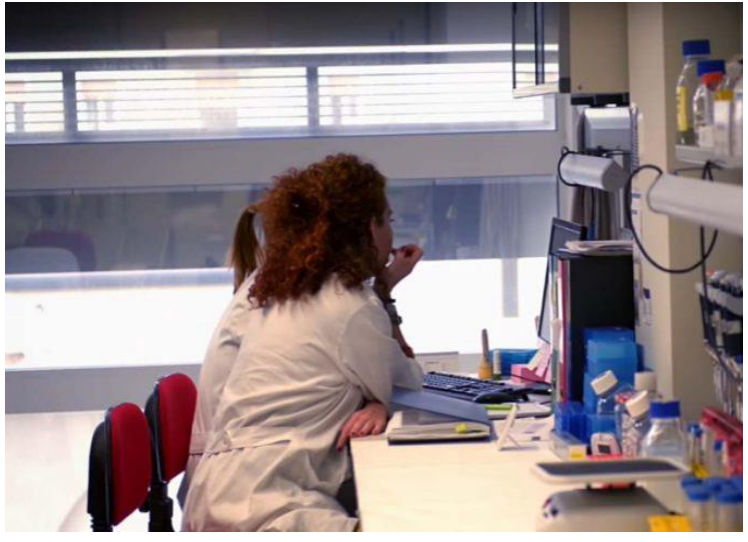
dall'arrivo del campione al referto

Corso di Laurea Magistrale in Biologia.
"Malattie genetiche: Dalla diagnosi alla terapia"

Gruppo 1: Lisa Mercadante, Nadia Chiappa, Grazia Di Monda, Federica Amato, Thi Van Martina Bertelle, Irene Gargiulo.
Gruppo 2: Lucrezia Marta, Marta Pelateo, Alessia Valtorta, Letizia Giudici, Alberto Villa, Francesco Bonacina

Policlinico di Milano

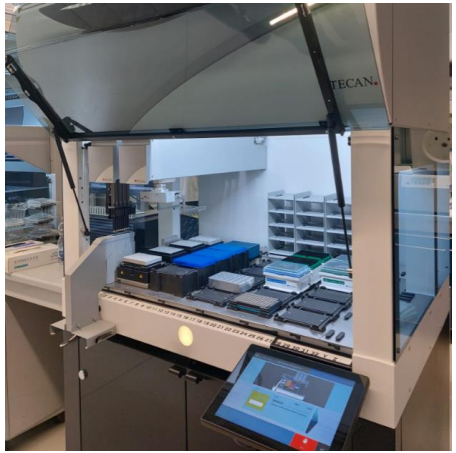
- Consulenza genetica
- Diagnosi prenatale
- Screening neonatale
- Diagnosi successiva al periodo neonatale



STRUTTURA LABORATORIO DI GENETICA

1. Stanza **Estrazione** -> accettazione del campione
2. Stanza **Pre-PCR** -> allestimento reazione PCR
3. Stanza **Post-PCR** -> reazione PCR in termociclatore

1



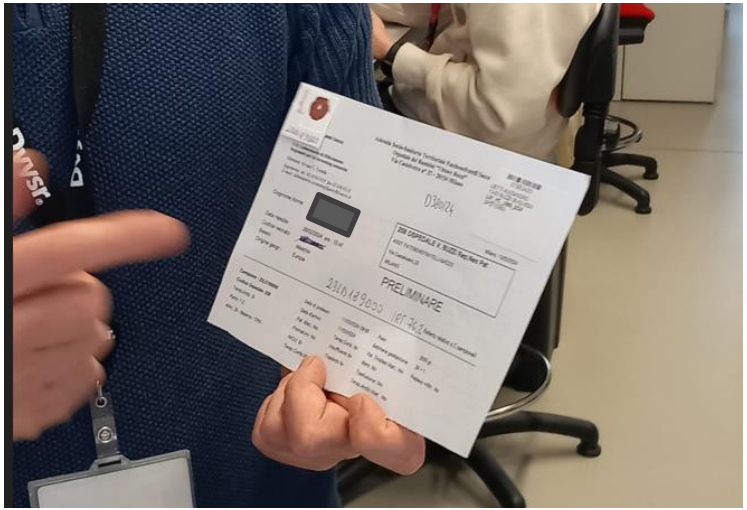
2

3

TIPI DI CAMPIONE

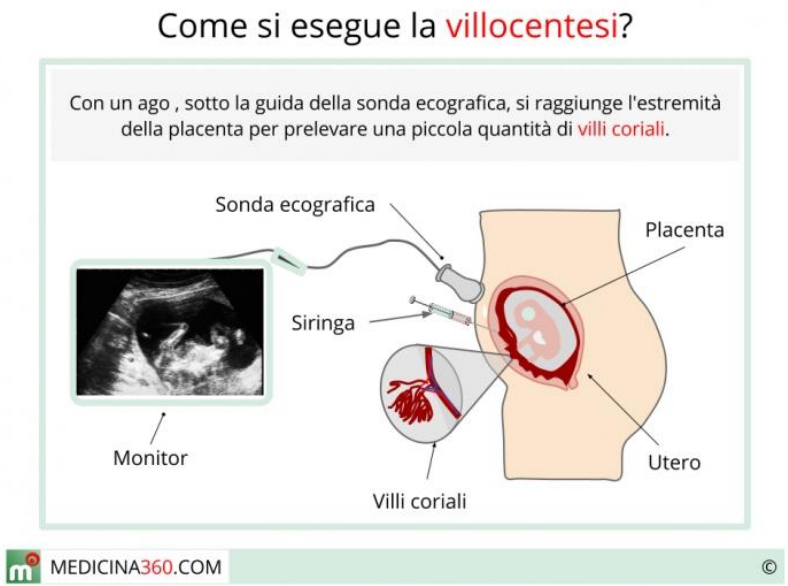
Provetta in EDTA di sangue periferico

Prelievo di sangue dal tallone di neonato

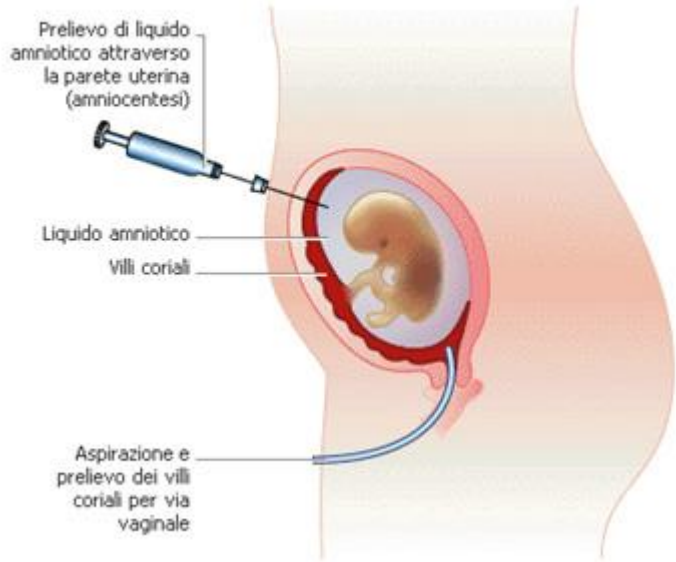


TIPI DI CAMPIONE

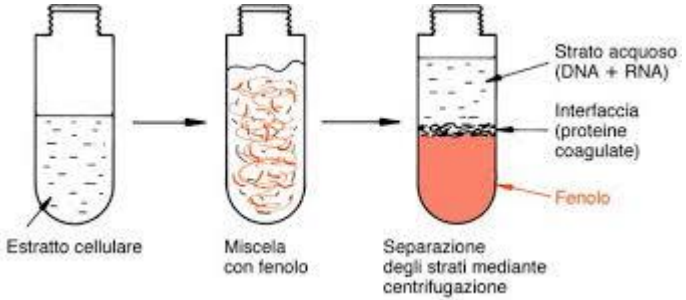
Villi coriali

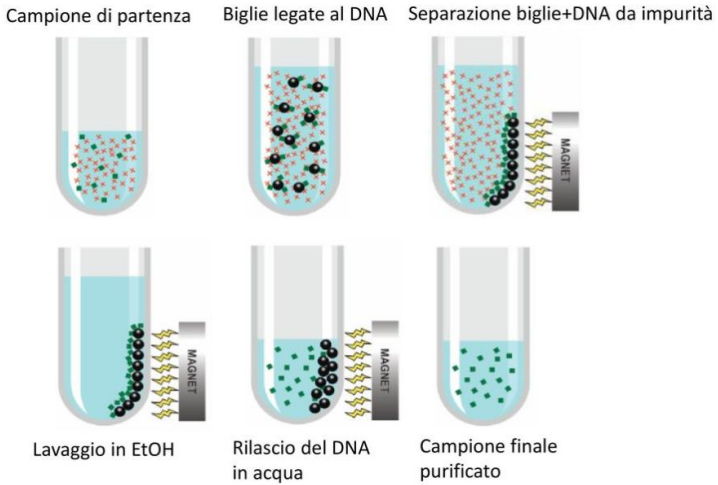


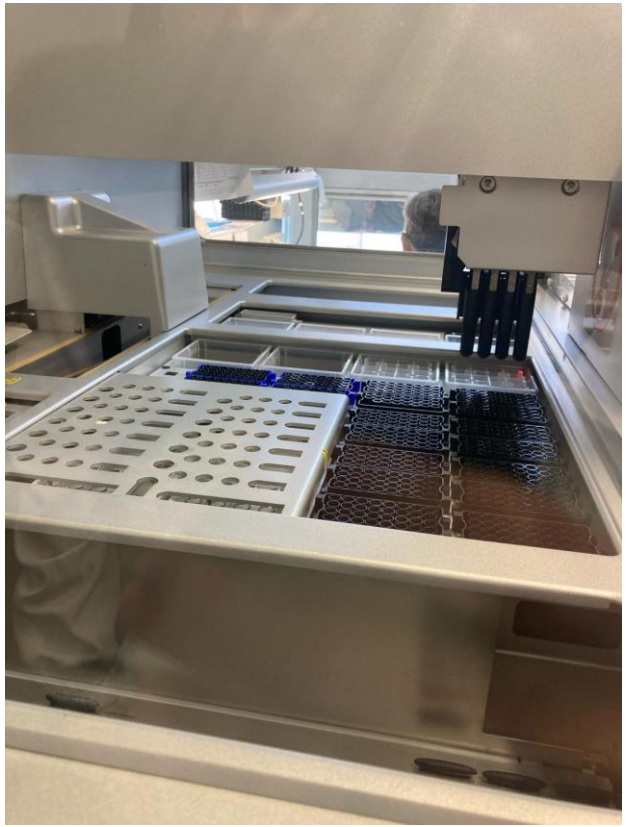
Liquido amniotico



ESTRAZIONE

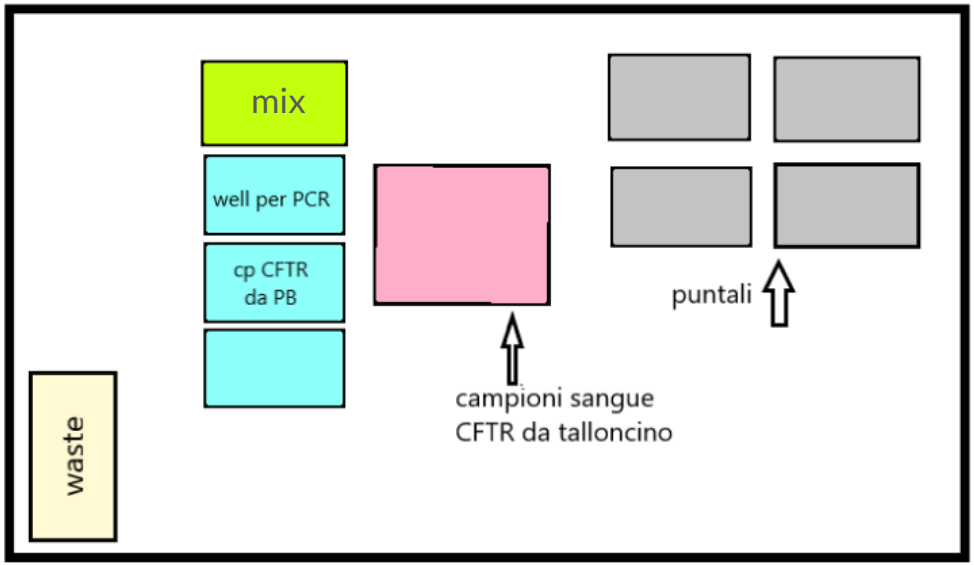

Strato acquoso
(DNA + RNA)
Interfaccia
(proteine
coagulate)
Fenolo
Estratto cellulare
Miscela
con fenolo
Separazione
degli strati mediante
centrifugazione


Campione di partenza
Biglie legate al DNA
Separazione biglie+DNA da impurità
MAGNET
MAGNET
Lavaggio in EtOH
Rilascio del DNA
in acqua
Campione finale
purificato

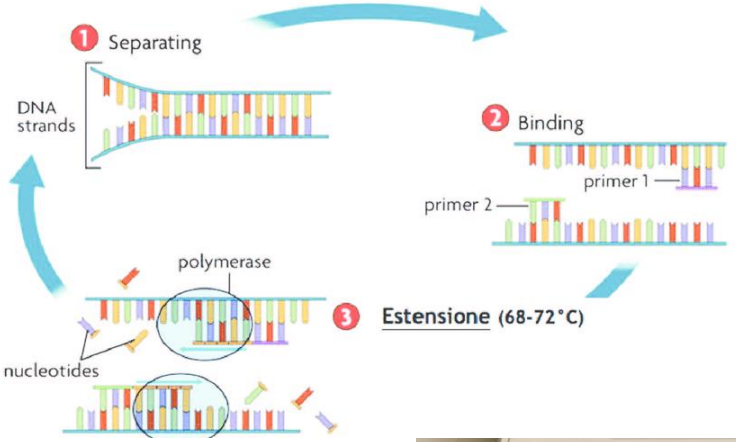


LIQUID HANDLING

Strumento automatico per unire la mix di reazione e i campioni precedentemente diluiti.



PCR1 - amplificazione



• 22 cicli.

• 3 fasi principali:
- Denaturazione: T = 95°C, 15 minuti.
- Annealing: T = 62°C.
- Estensione: T = 72°C.
+ Fase di stabilizzazione: T = 4°C.

→ Si ottengono le regioni del gene CFTR amplificate.

PCR 2 - indicizzazione

• Preparazione della mix con liquid handling.
• Utilizzo di primer che presentano all'estremità degli index specifici.
• Appaiamento dei primers alle estremità degli esoni di CFTR.

→ Si ottengono ampliconi di pazienti taggati in modo univoco.

Purificazione e diluizione

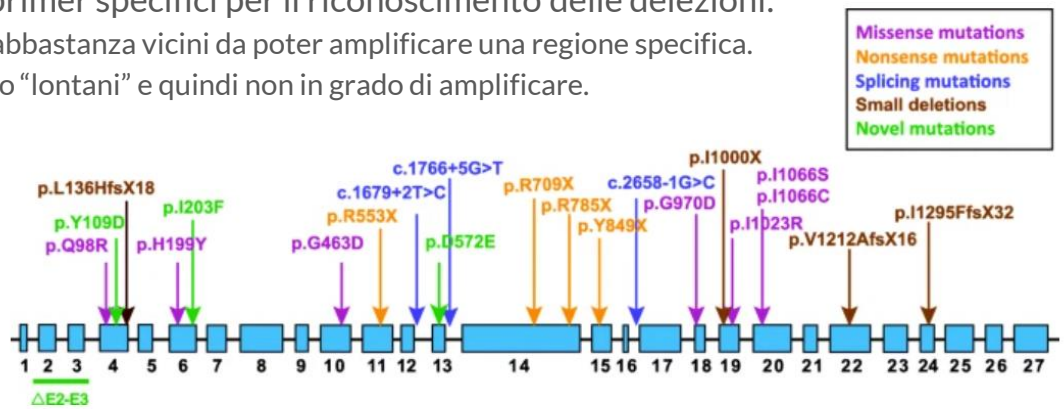
• Utilizzo di biglie magnetiche per la purificazione del campione:
  - inserimento delle biglie all'interno del pool dell'amplificato
  - applicazione di un magnete
  - rimozione del surnatante
  - aggiunta di un buffer di lavaggio
  - aggiunta di un buffer di eluizione
  - applicazione del magnete

• Misurazione della concentrazione del DNA mediante fluorimetro.

• Diluizione del purificato (nM → pM).

I primers

- i primers utilizzati per il sequenziamento di CFTR coprono tutte le regioni esoniche più circa 40 bp prima e dopo l'esone, per identificare anche mutazioni nelle regioni introniche.
  - sono circa 40
- nella reazione vengono anche inseriti dei primer specifici per il riconoscimento delle delezioni:
  - se c'è la delezione i due primer si trovano abbastanza vicini da poter amplificare una regione specifica.
  - se non c'è la delezione i due primer saranno "lontani" e quindi non in grado di amplificare.

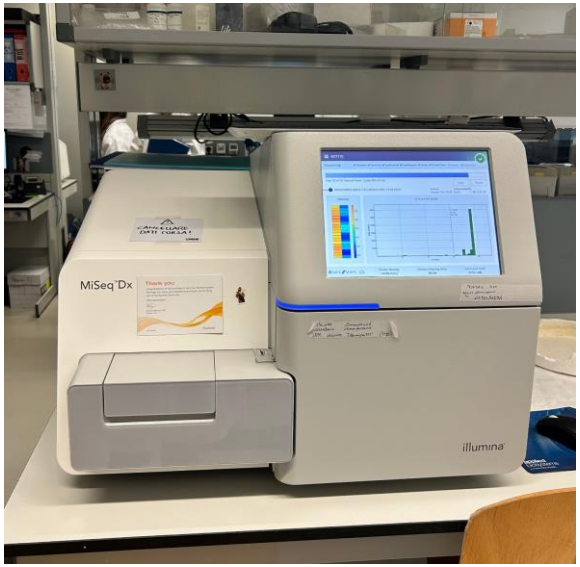


CFTR mutations detected in this CF cohort. Different mutation types are shown in the colors indicated in the upper panel; the gross deletion of exons 2–3 is indicated with a green solid line in the lower panel. The novel mutations identified in the current study are highlighted in green

NGS

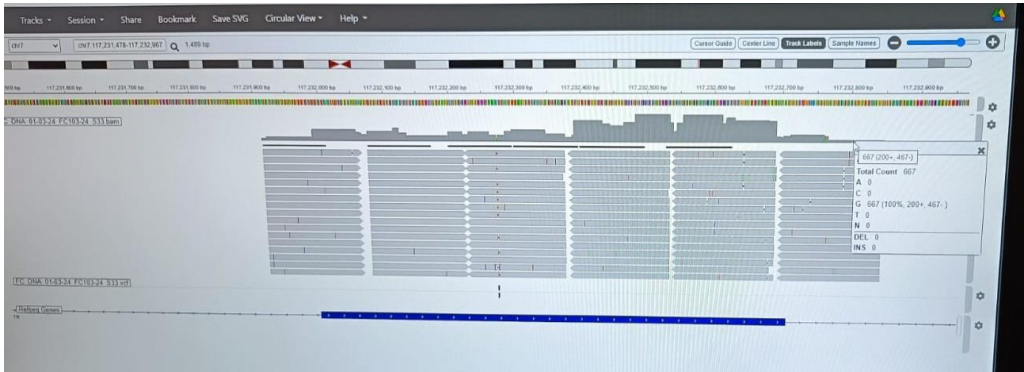
Q score= -10log(e)

- Alto Q score-> minore probabilità di errore
- Basso Q score-> aumenta la probabilità di errore

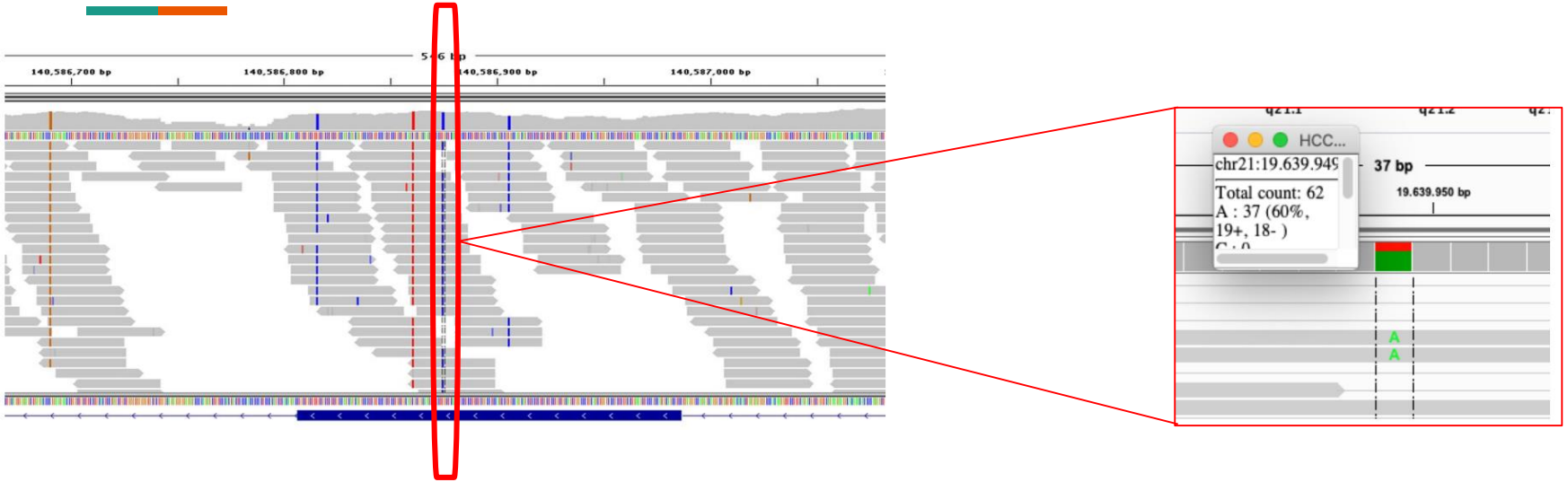


Le reads rappresentano le sequenze di ampliconi ottenute in PCR1 e PCR2.

- In grigio=sequenza della reads uguale al wild type
- Banda colorata= cambio di base



OMOZIGOSI VS ETEROZIGOSI



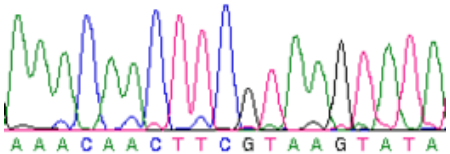
Su IGV si possono analizzare le sostituzioni e capire se a mutazione è in omo o in eterozigosi.

bisogna cliccare sulla sostituzione e il pop-up indicherà le percentuali che sono state riscontrate per ogni base: se una base è al 99% allora l'allele è in omozigosi, se invece abbiamo due basi circa attorno al 50% allora è in eterozigosi.

Sequenziamento Sanger

- PCR con terminazione di catena (tutti i ddNTP nella stessa miscela di reazione, ognuno legato a un marcatore fluorescente diverso)
- Corsa elettroforetica su un unico gel capillare
- Lettura da parte del computer delle bande del gel usando fluorescenza per identificare il ddNTP. Ognuno dei 4 ddNTP è dotato di un tag di fluorescenza diverso.

output: elettroferogramma.

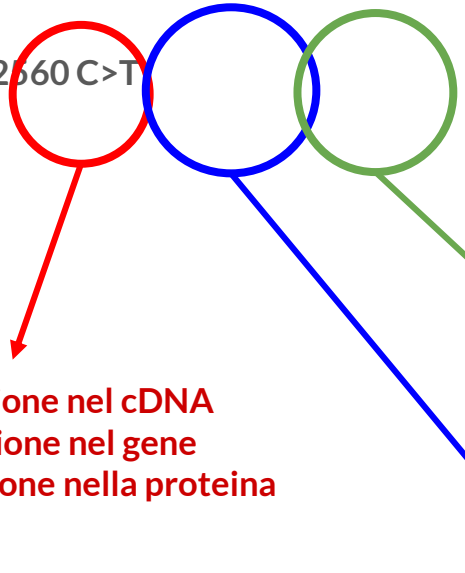


se si ha un doppio picco c'è stato un cambio di base, se invece ho una delezione avrò un frameshift.

COME "DARE IL NOME" AD UNA MUTAZIONE: CFTR, NM_000492.4

HGVS C. 2560 C>T

LEGACY 2428 C>T



C. = cerco la mutazione nel cDNA
G. = cerco la mutazione nel gene
p. = cerco la mutazione nella proteina

C>T= sostituzione
Ala > Cis = sostituzione AA
C del = delezione
A ins = inserzione

La prima base di trova a -132 bp dal codone d'inizio

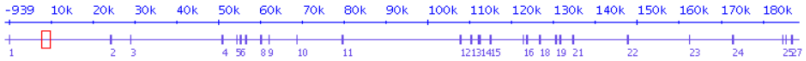
Posizione nucleotidica / AA all'interno del gene / proteina dalla prima base A / dal cordone d'inizio ATG

Cystic Fibrosis Mutation Database

Home Search CFTR Gene History Team Statistics Links Submit Help

CFTR1

Select your region of interest by clicking on the graph below to obtain the corresponding CFTR genomic sequence spanning 2000 nucleotides



Enter the positions of the first and last nucleotides of the required CFTR sequence

From: To: 0 Get Sequence

Move: 100nt Move Left Move right Don't Move

Zoom: 200nt Zoom In Zoom Out Don't Zoom Refresh

DNA sequence from 0 to 0 (Sequences corresponding to exons are shown in uppercase)

Get a sequence only copy. DNA sequence

CFTR2

https://cftr2.org/mutation/general/P5L/F508del

Results for P5L and F508del

Variant P5L can be referred to as P5L, p.Pro5Leu, c.14C>T, or 146C>T

- The drug combination of tezacaftor and ivacaftor (Symdeko or Symkevi) and the drug combination of elexacaftor, tezacaftor, and ivacaftor (Trikafta or Kaftrio) have been approved in some countries for individuals with this variant. Please contact your physician to discuss whether these drugs are appropriate for you.

Variant F508del can be referred to as F508del, p.Phe508del, c.1521_1523delCTT, or c.1521_1523del or 1653delCTT,

- The drug combination of lumacaftor and ivacaftor (Orkambi), the drug combination of tezacaftor and ivacaftor (Symdeko or Symkevi), and the drug combination of elexacaftor, tezacaftor, and ivacaftor (Trikafta or Kaftrio) have been approved in some countries for individuals with this variant. Please contact your physician to discuss whether these drugs are appropriate for you.

Summary Information | Sweat Chloride | Lung Function | % with Pancreatic Insufficiency | Pseudomonas Infection Rate

- This variant combination has varying consequences.
- Some patients with this variant combination have CF.
- Other patients with this variant combination do not have CF.
- Because of this variability, it is very important that CLINICAL CRITERIA ALONE be used to determine whether a person with this variant has CF.
- Because the clinical manifestations of CF can vary over the course of a person's lifetime, people who have this variant plus a variant that is known to cause CF should have periodic check-ups with their doctor even if they have no clinical signs or symptoms of CF at the present time.
- Clinical information shown below is taken only from patients in the CFTR2 database who have been diagnosed with CF.
  - There are other people with this variant who do NOT have CF. Information from these people is NOT included in the clinical information below, because these individuals are not followed at a CF center and are not part of the CFTR2 database. Therefore, the data below is not representative of every person with this variant.
- **Patients with CF who have this variant are likely to be pancreatic sufficient.** This means they may not need to take oral pancreatic enzyme supplements every day.
- There are 27 patients with this variant combination in the CFTR2 database.

For help interpreting this information, we recommend you watch this video overview What is Cystic Fibrosis?

CFTR CF transmembrane conductance regulator [*Homo sapiens* (human)]

Download Datasets

Gene ID: 1080, updated on 23-Mar-2024

Summary

Official Symbol	CFTR provided by HGNC
Official Full Name	CF transmembrane conductance regulator provided by HGNC
Primary source	HGNC:HGNC:1884
See related	Ensembl:ENSG00000001626 MIM:602421; AllianceGenome:HGNC:1884
Gene type	protein coding
RefSeq status	REVIEWED
Organism	Homo sapiens
Lineage	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo
Also known as	CF; MRP7; ABC35; ABCC7; CFTR/MRP; TNR-CFTR; dJ760C5.1
Summary	This gene encodes a member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. The encoded protein functions as a chloride channel, making it unique among members of this protein family, and controls ion and water secretion and absorption in epithelial tissues. Channel activation is mediated by cycles of regulatory domain phosphorylation, ATP-binding by the nucleotide-binding domains, and ATP hydrolysis. Mutations in this gene cause cystic fibrosis, the most common lethal genetic disorder in populations of Northern European descent. The most frequently occurring mutation in cystic fibrosis, DeltaF508, results in impaired folding and trafficking of the encoded protein. Multiple pseudogenes have been identified in the human genome. [provided by RefSeq, Aug 2017]
Expression	Biased expression in gall bladder (RPKM 28.8), colon (RPKM 22.3) and 6 other tissues See more
Orthologs	mouse all

NEW **Try the new Gene table**

Try the new Transcript table

PUBMED

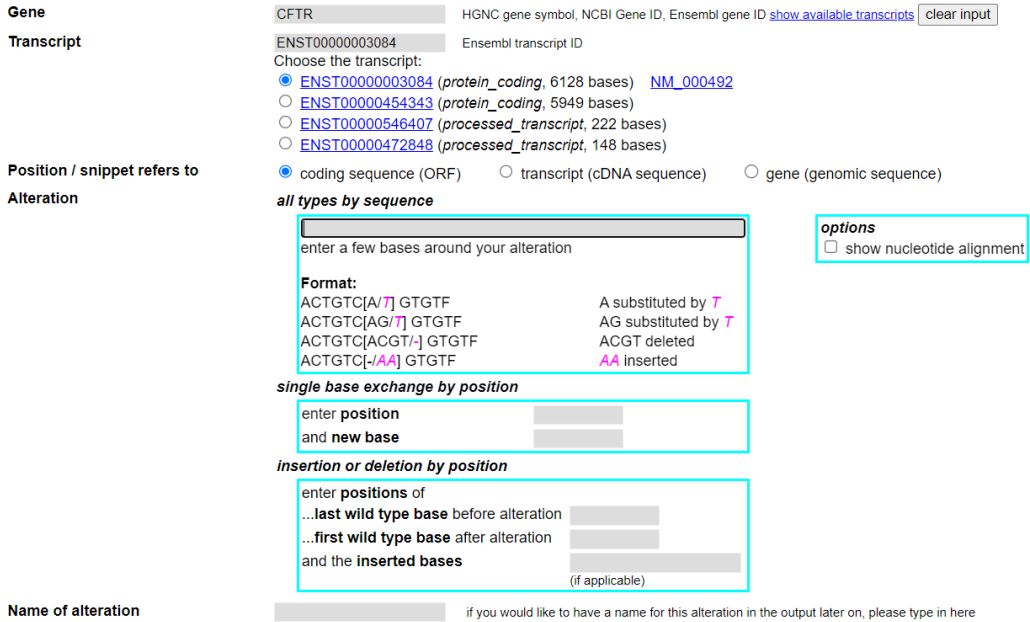
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/?term=CFTR[gene]

FRANKLIN

https://franklin.genoox.com/clinical-db/home

MUTATION TASTER

https://www.mutationtaster.org/




GRAZIE PER L'ATTENZIONE!