

Uitdagingen bij de karakterisatie van het FLG exon 3

Fleur Bertels, Annelien Verfaillie (PhD), Wim Meert, Wouter Bossuyt (PhD), Genomics Core Leuven

Inleiding

Ichthyosis vulgaris (IV)

= genetische huidaandoening te herkennen aan schilferende en droge huid

Oorzaak

Twee nonsense mutaties in *filaggrine gen (FLG)*, namelijk R501X en 2282del4

Grootste deel van dit eiwit, functioneel in de epitheliale barrière, ligt gecodeerd in **exon 3** van het FLG

Exon 3 is een fragment van ongeveer 12 000 bp groot, dus moeilijk te analyseren

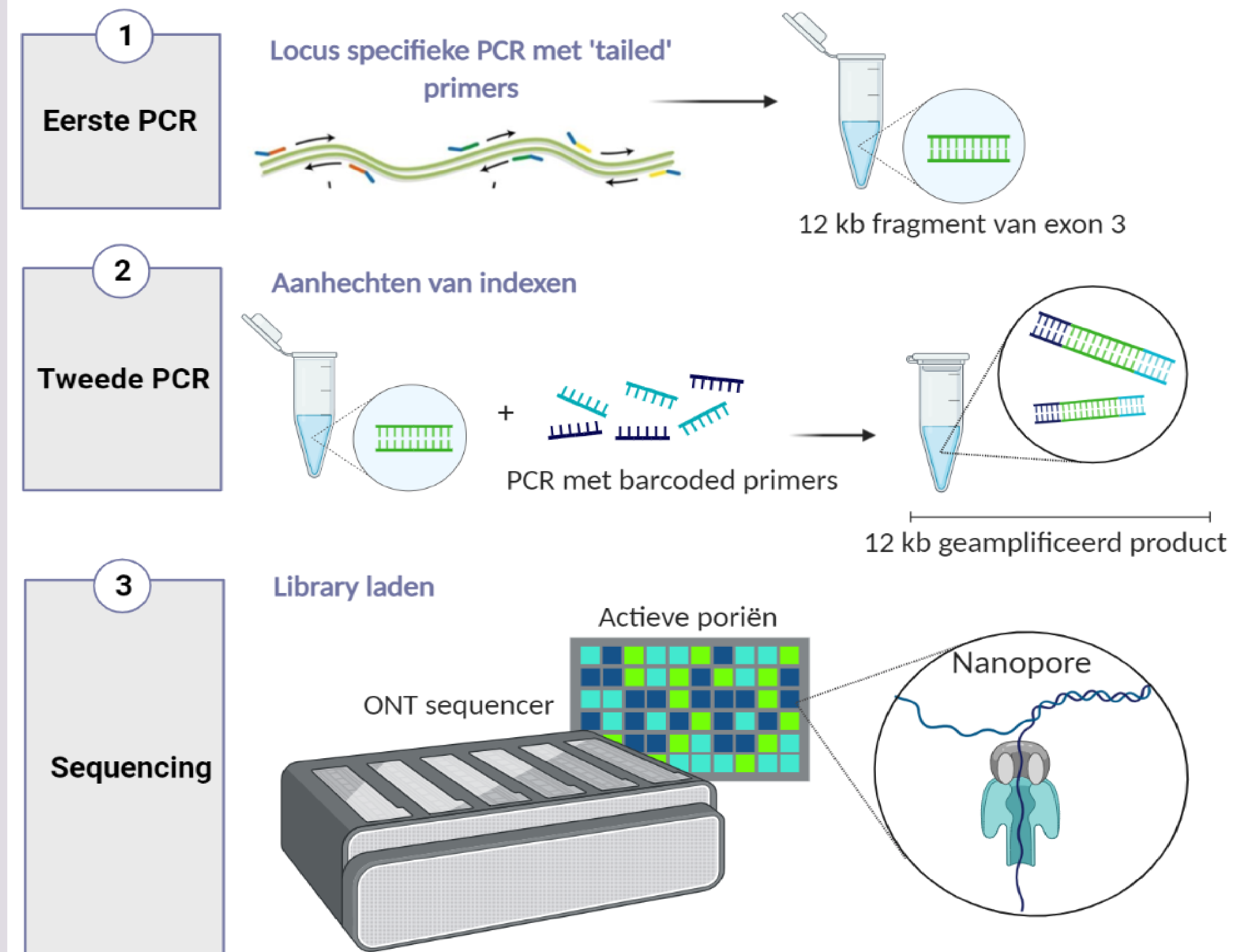
Door specifiek overervingspatroon waarbij homozygoot of samengesteld heterozygoot zich presenteren, is er meer aandacht nodig om dit te kunnen diagnosticeren aangezien deze een ernstiger fenotype tonen ten opzichte van heterozygoten

Doel

Volledige exon 3 in één fragment te analyseren. Er wordt gekozen voor twee polymerase chain reactions (PCR) in combinatie met Oxford Nanopore Technologies (ONT) sequencing

Methode

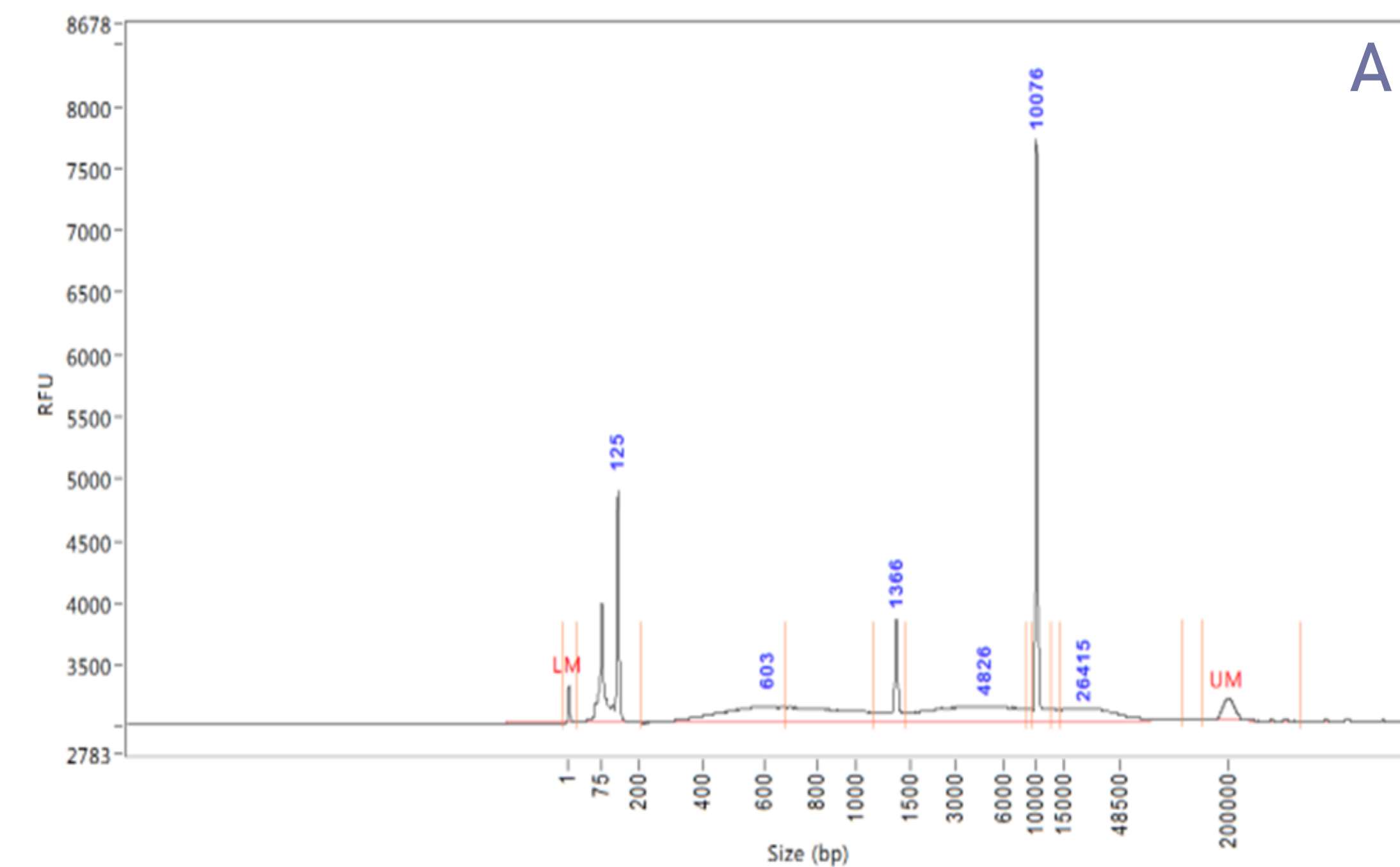
Om het 12 kb fragment uit het genomisch DNA te kunnen amplificeren wordt er gekozen om twee PCR reacties uit te voeren in combinatie met ONT sequencing.



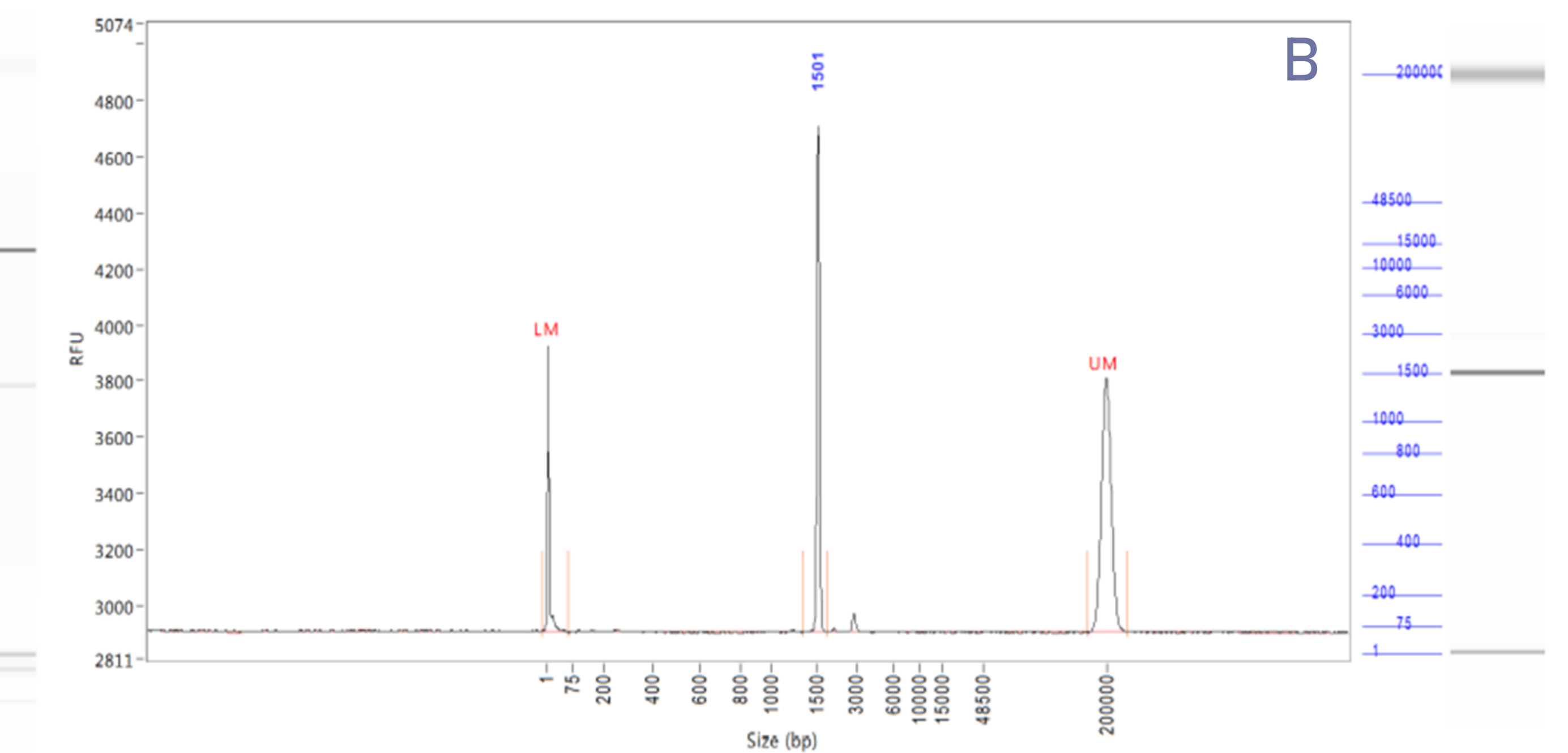
Figuur 1: PCR en sequencing opstelling voor analyse van het FLG exon 3

Resultaten

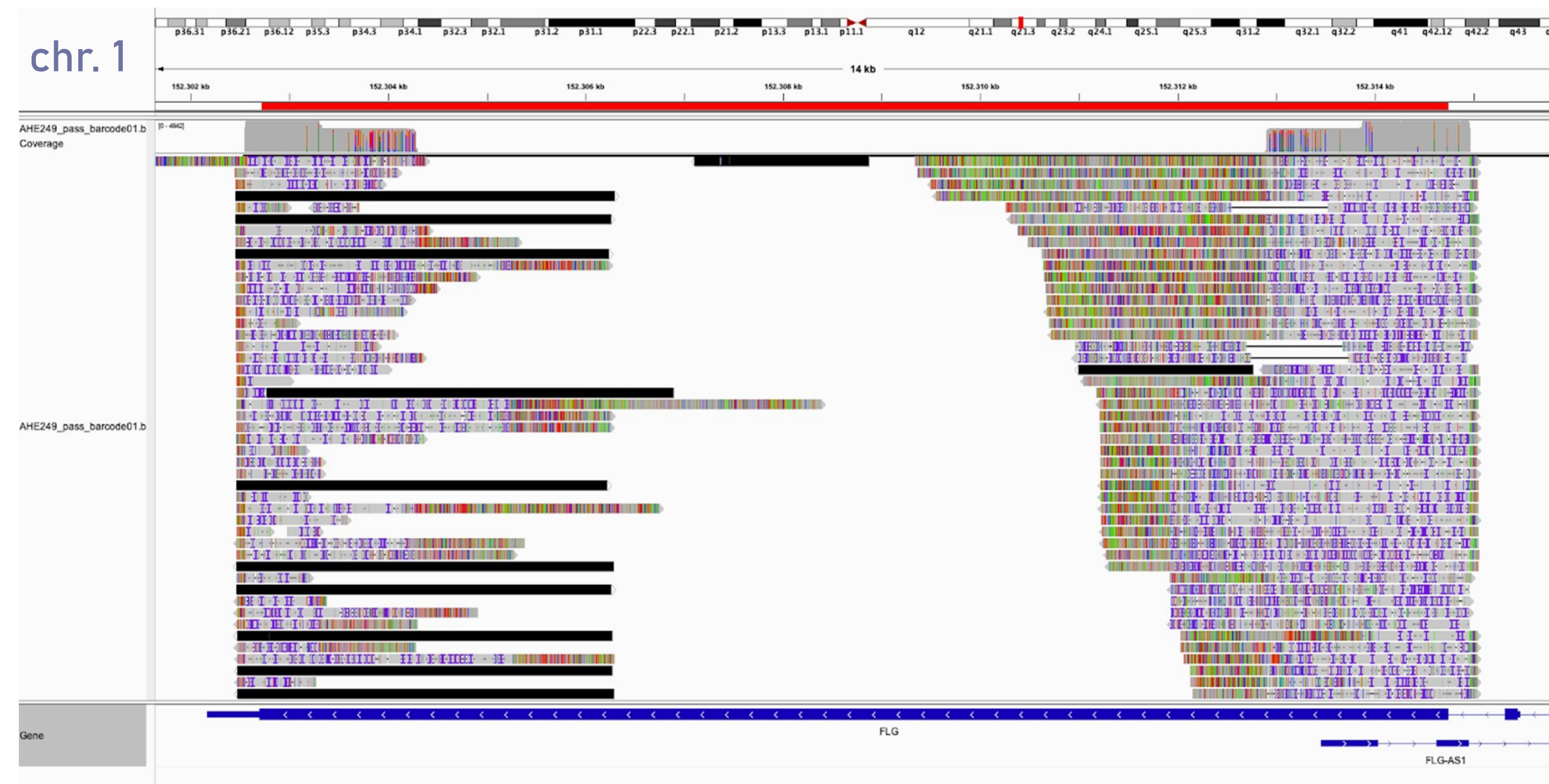
Eerste PCR



Tweede PCR



Figuur 2: Kwaliteitscontrole na beide PCR reacties voor staal PLR



Figuur 3: Mapping van fragmenten ten opzichte van chromosoom 1 na sequencing met ONT sequencing

Het beoogde 12 kb product is aanwezig in combinatie met minder gewenste kleinere fragmenten (Figuur 2A).

In de tweede PCR is het 12 kb fragment niet meer aanwezig in het geanalyseerde staal. Bij staal PLR is een fragment van 1500 bp preferentieel geamplificeerd (Figuur 2B)

De geanalyseerde fragmenten worden deels teruggekoppeld aan het initiële target op chromosoom 1 echter niet met de gewenste lengte van 12 kb zoals geamplificeerd. Er is enkel informatie bekomen over het begin en einde van het fragment. (Figuur 3) Een groot deel van het fragment is dus niet gedekt en verloren gegaan omwille van voorlopig ongekende oorsprong.

Conclusie

Gezien de technisch veeleisende methode van het lange fragment zijn de bekomen resultaten niet meteen zoals gewent. De oorzaak hiervan ligt bij achtergrond interferentie van kleinere fragmenten. Om dit in de toekomst te vermijden zal op zoek gegaan worden naar alternatieve methodes voor library prep die deze problematiek kan vermijden.

Alternatieve methodes

1. Nieuwe primers ontwikkelen tegen het initiële doelwit
2. Selectie op basis van grootte van het fragment aan de hand van AMPure PB Beads
3. Indexen aangehecht via een ligatie protocol aan de hand van 'native barcoding' in plaats van met tweede PCR

Referenties

1. Smith Frances J.D., Irvine Alan D, Terron-Kwiatkowski A et al. Loss-of-function mutations in the gene encoding filaggrin cause ichthyosis vulgaris. Nat Genet. 29 januari 2006; 38: 337-342.
2. Oxford Nanopore Technologies. PCR barcoding amplicons. SQK-LSK109. Oxford, Verenigd Koninkrijk; 2021.
3. Bertels F. Biorender: PCR en sequencing opstelling voor analyse van het FLC exon 3. Beschikbaar op <https://app.biorender.com>

