

Lavoro di diploma 2012

Scuola Superiore Medico Tecnica Locarno

Messa a punto della metodologia per il sequenziamento del gene FGFR3

Autore: Roberto Accogli

Responsabili: Dott.ssa Francesca Molinari e Dott. Milo Frattini

Svolto presso: Laboratorio di Patologia Molecolare dell'Istituto Cantonale di Patologia di Locarno

Riassunto

Introduzione Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) è un recettore tirosin chinasi che gioca un ruolo essenziale nella regolazione della proliferazione, della sopravvivenza, della migrazione e del differenziamento cellulare. Diverse deregolazioni di FGFR3 sono state identificate in molti tumori umani. In particolare, una delle principali alterazioni oncogeniche a cui il gene FGFR3 va incontro consiste nell'insorgenza di mutazioni puntiformi negli esoni 7, 10 e 15, le quali sono molto frequenti soprattutto nel carcinoma della vescica, nel tumore alla cervice e nel mieloma multiplo. Lo scopo principale di questo lavoro di diploma è quello di ottimizzare un protocollo di PCR per l'analisi degli esoni 7, 10 e 15 del gene FGFR3 nel Laboratorio di Patologia Molecolare dell'Istituto Cantonale di Patologia di Locarno. Un obiettivo secondario è stato quello di validare tali protocolli in una casistica di carcinomi ovarici e di stabilire se le mutazioni di FGFR3 siano presenti in tale tipo di tumore.

Materiali e metodi L'ottimizzazione dei protocolli di PCR per l'analisi di FGFR3 (esoni 7, 10 e 15) è stata effettuata tramite PCR a gradiente di temperatura utilizzando primers pubblicati in letteratura. È stato quindi eseguito purificazione del prodotto di PCR, PCR di sequenza, purificazione del prodotto di PCR di sequenza e sequenziamento diretto utilizzando Genetic Analyser. Come materiale sono stati utilizzati tre campioni di DNA di buona qualità estratti da tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE) utilizzando kit commerciali. Dopodiché sono stati analizzati 21 casi di carcinoma ovarico.

Risultati In base ai risultati delle reazioni di PCR a gradiente di temperatura, sono state scelte le coppie di primers 7A (Temperatura di annealing, Ta: 61°C), 10A (Ta: 58°C) e 15B (Ta: 53°C). Nell'analisi mutazionale del gene FGFR3 dei 21 casi di carcinoma ovarico, non è stata osservata nessuna mutazione. Tuttavia, è stata rilevata una mutazione intronica in posizione -2 rispetto all'inizio dell'esone 7, il cui significato biologico è attualmente sconosciuto.

Discussione I protocolli per l'analisi degli esoni 7, 10 e 15 del gene FGFR3 sono ottimizzati, validati e quindi disponibili per l'utilizzo in diagnostica. Inoltre i risultati ottenuti dall'analisi dei 21 casi di carcinoma ovarico dimostrano che la deregolazione di FGFR3 attraverso mutazione puntiforme ha un ruolo minore nella progressione e sviluppo del tumore ovarico.

Abstract

Introduction Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) is a receptor tyrosine kinase that plays essential roles like regulating cell proliferation, survival, migration and differentiation. Several deregulations of FGFR3 have been associated with many human cancers. In particular, one of the main oncogenic alterations in the FGFR3 gene is represented by point mutations in exons 7, 10 and 15, which are very common especially in carcinomas of the bladder, of the cervix, and in multiple myeloma. The main aim of this study was to set up a PCR and direct sequencing protocol for the analysis of exons 7, 10 and 15 of FGFR3 gene at the Laboratory of Molecular Pathology of the Istituto Cantonale di Patologia (ICP) in Locarno. A secondary objective was to validate these protocols in a

series of ovarian carcinomas and to determine if the *FGFR3* mutations are present in this type of cancer.

Materials and methods The setting up of PCR protocols for the analysis of *FGFR3* (exons 7, 10 and 15) was performed by a temperature gradient cyler using primers already published in the literature. After that the PCR purification, the cyclesequencing, the subsequent purification and the loading of the sequenced DNA on Genetic Analyser have been performed. As material, we used 3 genomic DNA extracted using commercial kits from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissues. In addition 21 cases of ovarian carcinoma were analyzed.

Results On the basis of temperature gradient experiments results, we choose the following couples of primers: 7A (temperature of annealing, Ta: 61°C), 10A (Ta: 58°C) and 15B (Ta: 53°C). No mutations were detected in 21 cases of all ovarian cancers. However it was detected a "intronic" mutation (in position -2 respect to the beginning of exon 7), whose biological effect is currently unknown.

Discussion Protocols to analyze exons 7, 10 and 15 of the *FGFR3* gene by direct sequencing have been optimized and validated, and therefore they can be used for diagnostics purposes. In addition, the results obtained from the analysis of 21 cases of ovarian cancer showed that the deregulation of *FGFR3* by point mutation has a minor role in the development and progression of ovarian tumors.