



Malattie genetiche: dalla diagnosi alla terapia

GRUPPO 1:

Bacchi Yodit Maria , Barillari Cristian , Colombo Alice, Colombo Althea,
Dittonghi Pietro, Gracioppo Rossella, Hakkani Qamar.

Università degli studi Milano - Bicocca



DOVE:

Il **Policlinico di Milano** (Fondazione IRCCS Ca' Granda) ospita il **Centro Regionale per la Fibrosi Cistica (CRFC)** della Lombardia, uno dei principali punti di riferimento in Italia per questa patologia.

L'**Istituto Nazionale di Genetica Molecolare (INGM)** "**Romeo ed Enrica Invernizzi**" rappresenta il "cuore pulsante" della ricerca avanzata.

Dott. Luigi Porcaro: dirigente biologo specializzato in fibrosi cistica.

Dott.ssa Palma Finelli: responsabile diagnostica.



Fondazione IRCCS Ca' Granda
Ospedale Maggiore Policlinico

Sistema Socio Sanitario



Regione
Lombardia

WORKFLOW DI LABORATORIO:

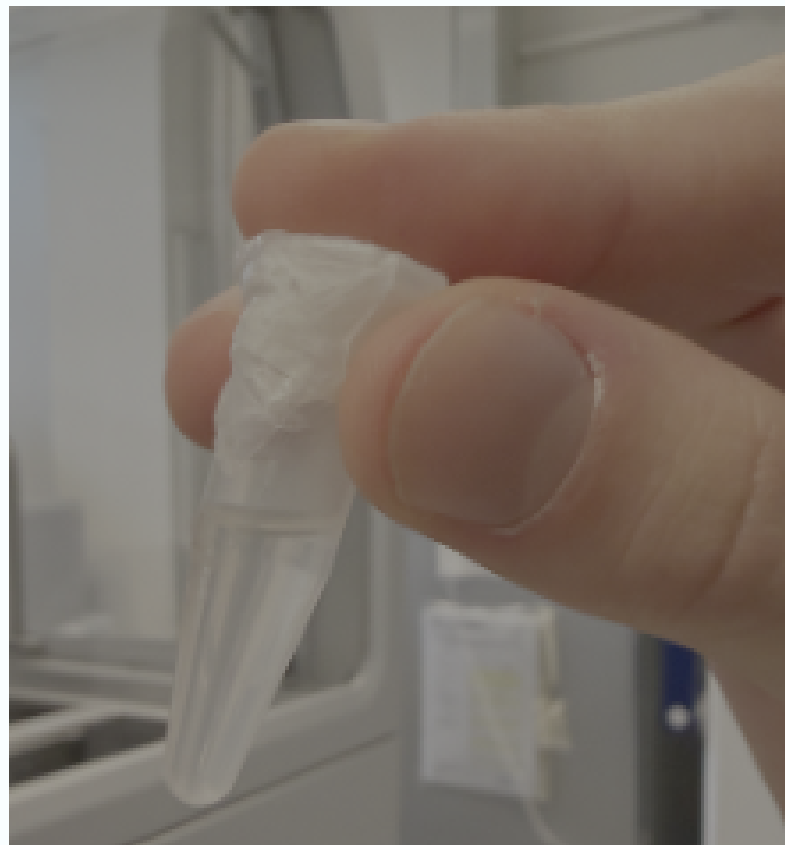


ESTRAZIONE DEL DNA

Substrato di partenza: **sangue periferico** → Output: **DNA in soluzione**

Estrazione manuale:

- Precipitazione Chimica: uso di solventi (Isopropanolo).
- Riservata a campioni delicati o preziosi (villi coriali).
- DNA visibile come filamenti biancastri.
- Alta resa e qualità per campioni esigui.



Estrazione automatizzata:

- Biglie Magnetiche: il DNA si lega a microsfere cariche che vengono spostate da magneti.
- Standard per l'alto flusso di campioni (routine).
- DNA non visibile (soluzione limpida).
- Riproducibilità, velocità.



QUANTIFICAZIONE DEL DNA



- *Strumento:* **Spettrofotometro.**
- *Obiettivo:* Misurare la concentrazione del DNA estratto.
- *Funzionamento:* Sfrutta la capacità degli acidi nucleici di assorbire la luce a una specifica lunghezza d'onda (260 nm).
- *Unità di misura:* nanogrammi per microlitro (**ng/μL**).

La quantità di DNA ottenuta non è mai fissa, dipende dal numero di cellule iniziali, tipo di substrato, efficienza dell'estrazione.

Normalizzazione: **5ng/μL**

Risultato atteso:

- **Nessun valore standard:** Ogni campione è unico; si possono ottenere concentrazioni molto varie tra individui differenti.
- **Purezza:** Lo strumento valuta anche la presenza di contaminanti (proteine o solventi).

WORKFLOW DI LABORATORIO:



AMPLIFICAZIONE DEL DNA

Obiettivo: **Fotocopiare** milioni di volte una regione specifica di DNA (es. il gene CFTR).



INGREDIENTI (*MIX DI REAZIONE*):

- **DNA stampo:** Il DNA estratto dal paziente.
- **Primer:** "Inneschi" che delimitano la zona da copiare.
- **Taq Polimerasi:** Enzima termostabile che sintetizza il nuovo DNA.
- **Nucleotidi (*dNTPs*):** I mattoncini per costruire la nuova catena.
- **Cofattori:** Magnesio e tampone per il funzionamento dell'enzima.

Strumento: **Termociclatore**, che alterna ciclicamente le temperature.

CICLO DELLA PCR

Fase Iniziale (Attivazione):

94–95 °C per 3–20 minuti. Serve per denaturare completamente il DNA stampo e attivare la Taq Polimerasi.

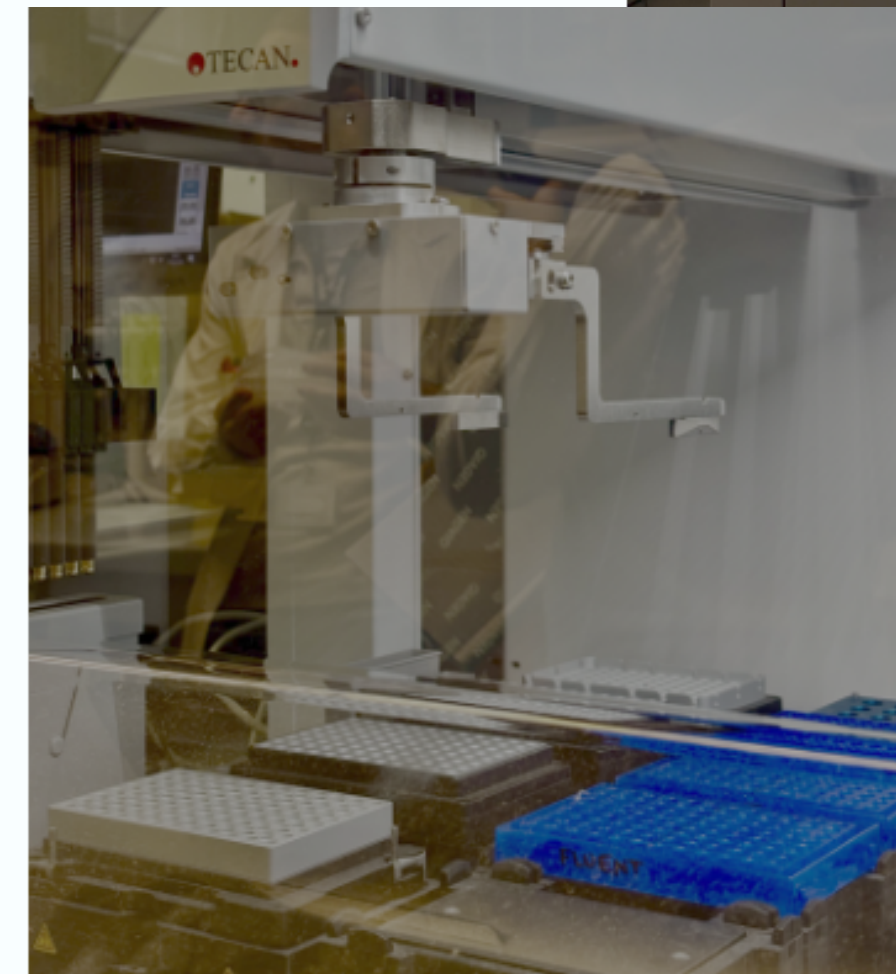
Fase Ciclica (20–35 ripetizioni):

1. **Denaturazione (94–98 °C):** La doppia elica si apre.
2. **Annealing:** (T_m melting dei primer) i primer si agganciano alle sequenze specifiche.
3. **Estensione (72 °C):** La polimerasi allunga il filamento.

Fase Finale:

72 °C ca. blocca la Taq Polimerasi e stabilizza il prodotto finale.

L'allestimento può essere manuale o tramite **Liquid** → **Handler** (robot) per la massima precisione.

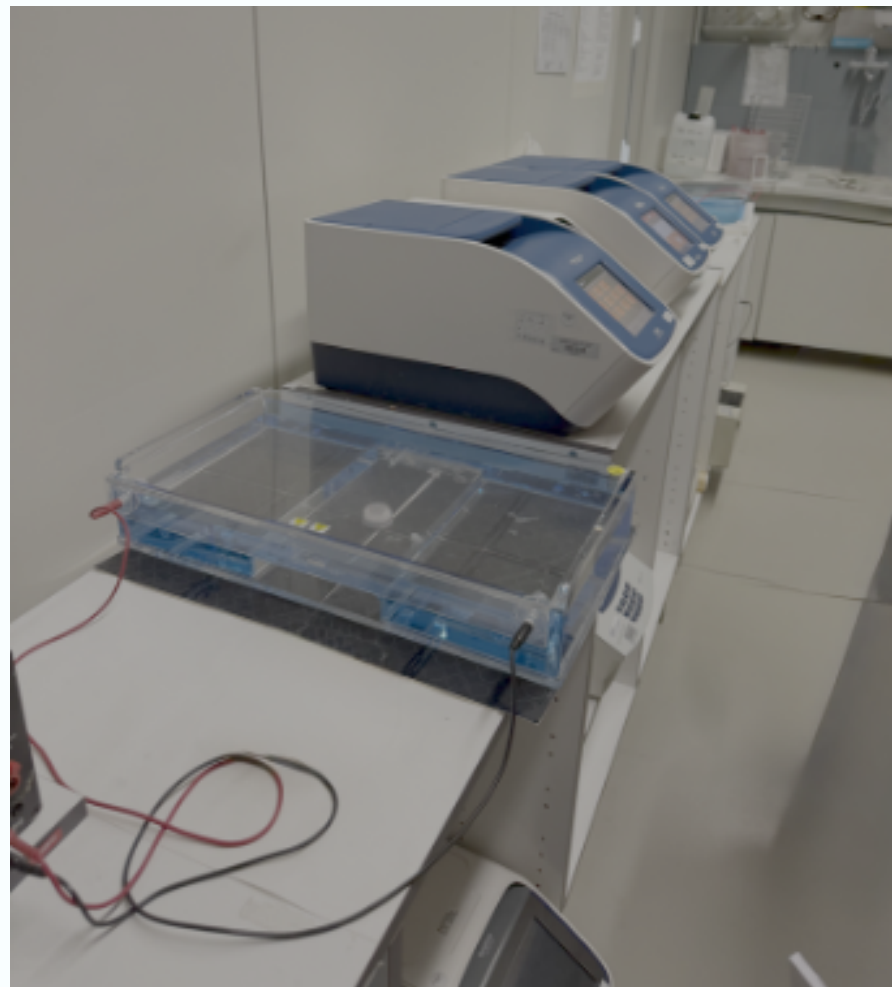


Il **Liquid Handler** è un sistema robotizzato progettato per automatizzare il pipettamento, garantendo un'elevata riproducibilità e riducendo al minimo l'errore umano e le contaminazioni crociate durante la preparazione delle piastre PCR.

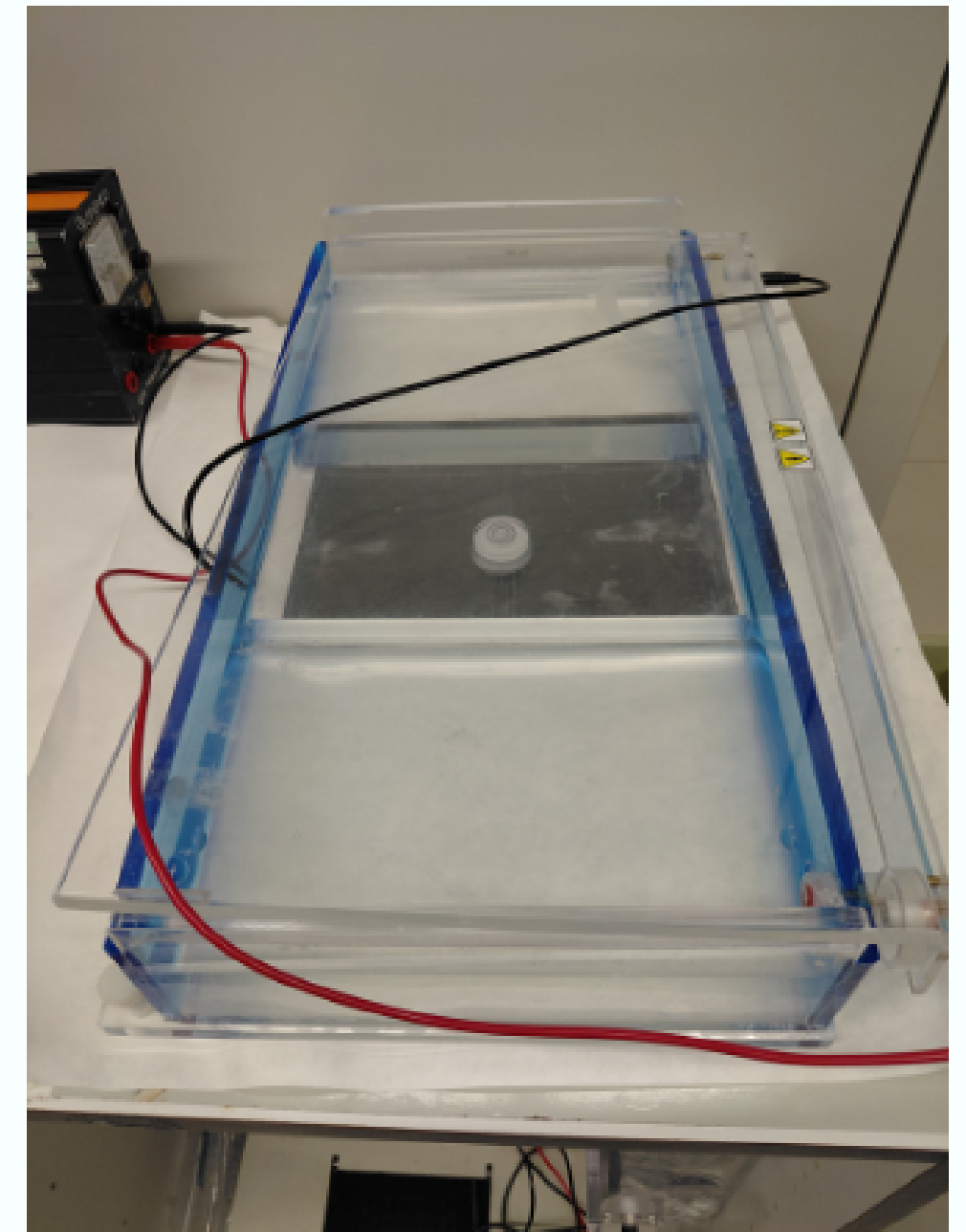


ELETTROFORESI SU GEL

- *Scopo:* **Verificare se la PCR è avvenuta correttamente.**
- *Principio fisico:* Migrazione del DNA in un campo elettrico attraverso un gel di agarosio. I frammenti di DNA si separano in base alla dimensione (i più piccoli corrono più velocemente).
- *Visualizzazione:* Si usano agenti intercalanti fluorescenti e luce UV per rendere visibili le bande.



Volume di amplificazione: **50ng/μL**
Per elettroforesi: **ca.2-5 μL** si semina su gel

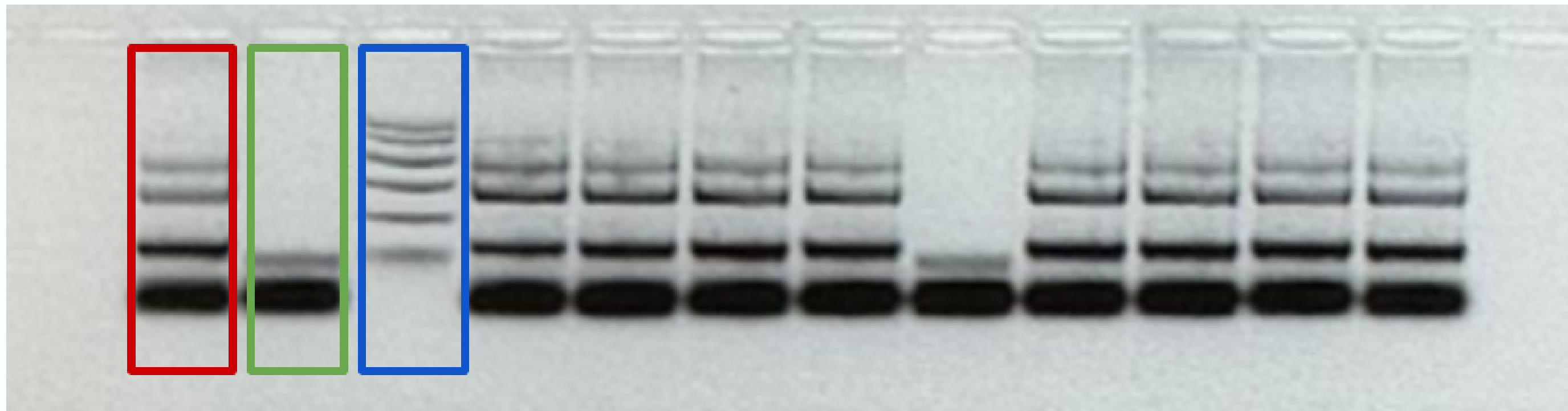


L'**elettroforesi orizzontale** è lo standard per il DNA, e l'uso del TBE (Tris-Borato-EDTA) garantisce una risoluzione ottimale dei frammenti.

Componenti di controllo: **loading dye** (colorante di caricamento), **Ladder** (righello molecolare per dimensione frammenti), **controllo +/-**.

Elettroforesi su gel di agarosio e TBE:

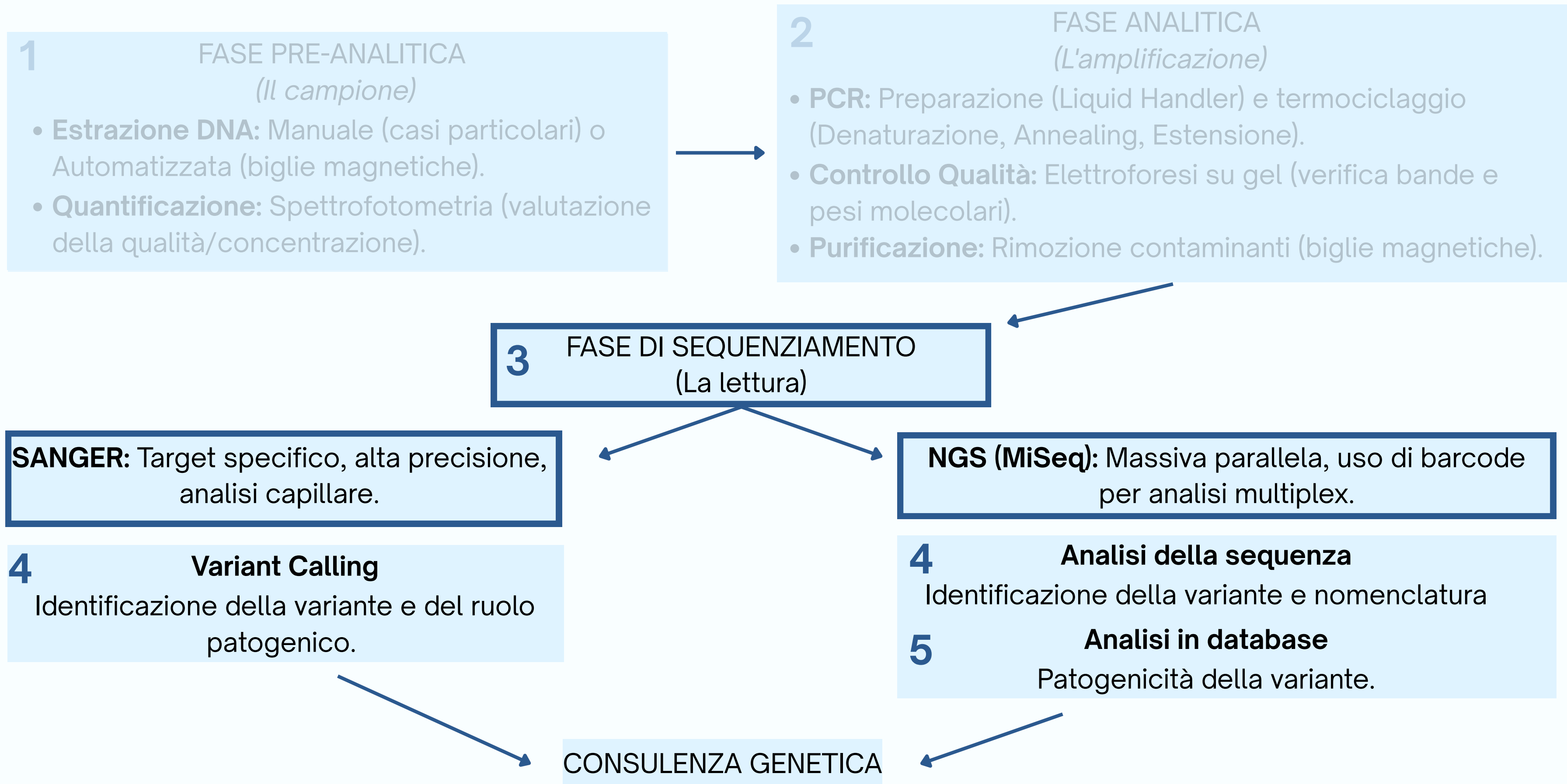
- Campo elettrico: il DNA migra verso il polo positivo: più il frammento di DNA è piccolo e più migra velocemente.
- Bromuro di Etidio: intercalante, non più usato.
- Blu di metilene: intercalante, visualizzato sotto i raggi UV.



PURIFICAZIONE POST-PCR

- *Obiettivo*: **Isolare il prodotto di PCR** (amplificato) **eliminando i "rifiuti" della reazione** (primer in eccesso, nucleotidi liberi, enzimi).
- *Metodo*: Uso di **biglie magnetiche**. Il DNA si lega alla superficie delle biglie tramite interazioni elettrostatiche.
- *Perché è necessaria*: Evita interferenze e rumore di fondo durante il sequenziamento (Sanger o NGS).

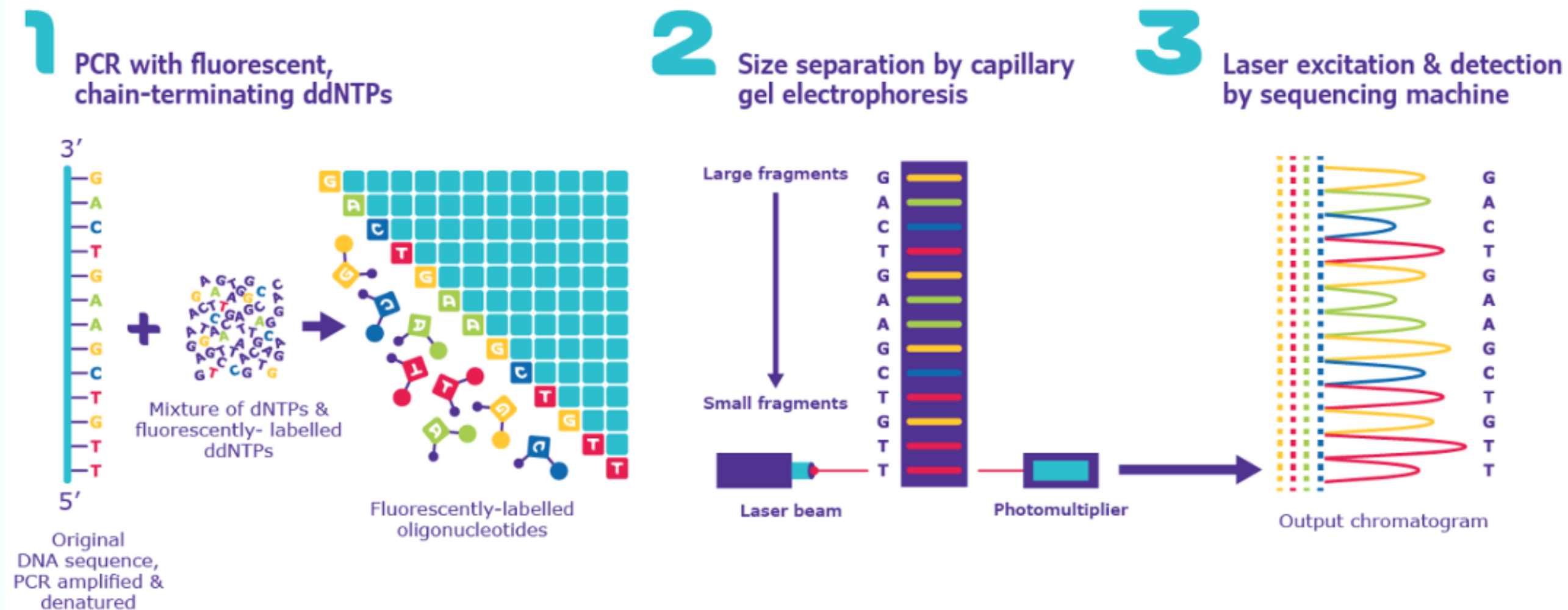
WORKFLOW DI LABORATORIO:



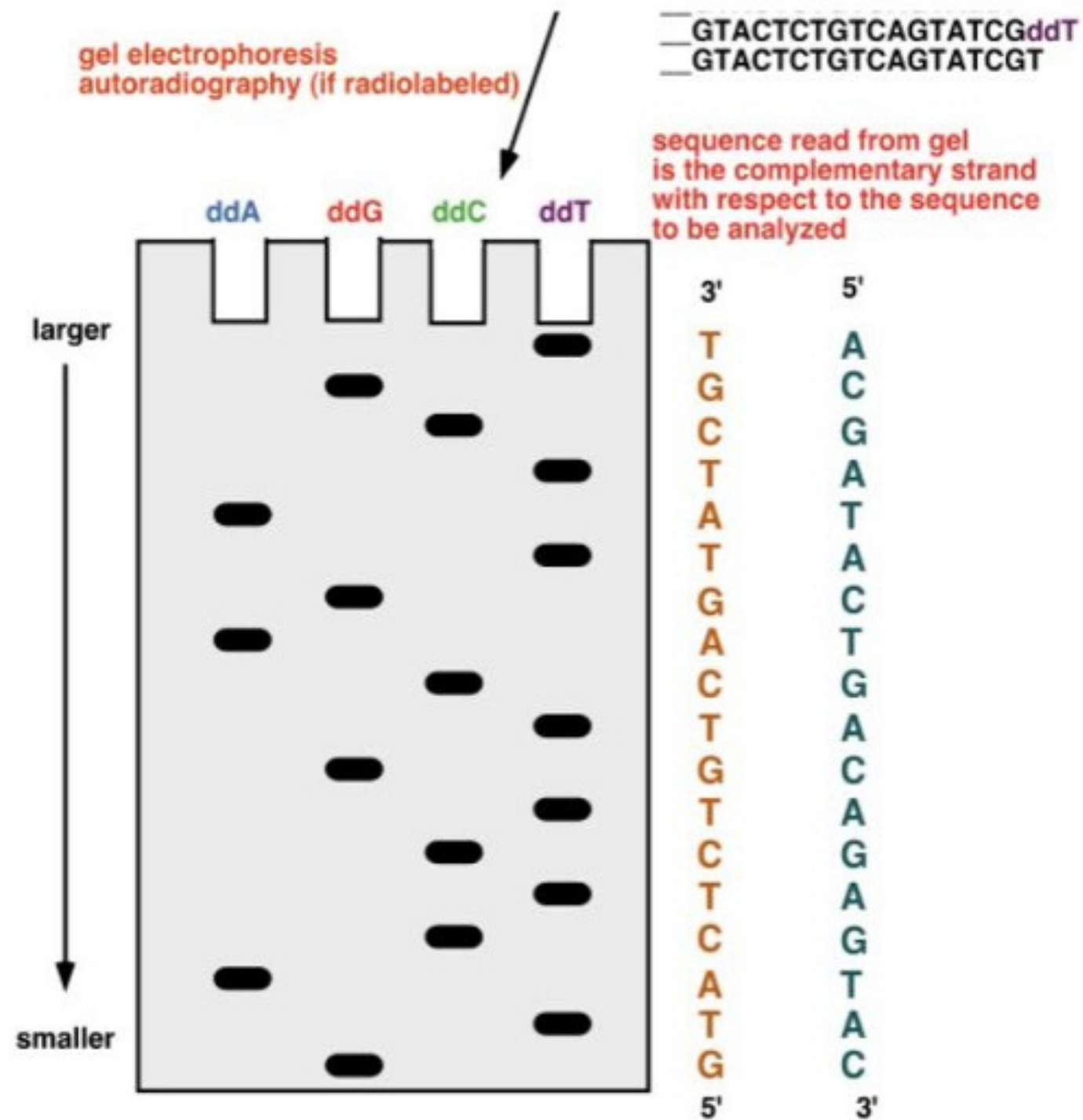
SANGER

1. dNTPs, ddNTPs+fluoroforo, Taq-Pol, *forward* and *reverse* primer, buffer e cofattori.
2. Elettroforesi **capillare** (verticale)
3. Cromatogramma

LIMITE: tempo richiesto per il sequenziamento del gene CFTR di un singolo paziente di circa **6 ore**.



Sanger Sequencing



IL PRIMO METODO SANGER:

lettura delle basi fatta a mano dell'operatore.

NGS - Illumina

Vantaggi delle NGS:

- Possibilità di caricare fino a **42 campioni** contemporaneamente;
- Minor tempo di sequenziamento (**circa 18 ore**).

Pre-NGS

1. **Amplificazione** target con **multiplex PCR**;
2. **Barcoding e Adapter**;
3. Unico campione con somma degli amplificati di tutti i pazienti;
4. **Quantificazione** del prodotto totale: **fluorimetro** e pool diluito per portarlo a **5ng/μL**;
5. Caricamento su cartuccia (che contiene i reagenti) e inserimento in MiSeq;
6. **Sequenziamento sulla *flow cell***.



SEQUENZIAMENTO CON ILLUMINA

Overview of Illumina Sequencing by Synthesis Workflow | Standard SBS chemistry



Introduction to Sequencing by Synthesis

illumina

Pausa K

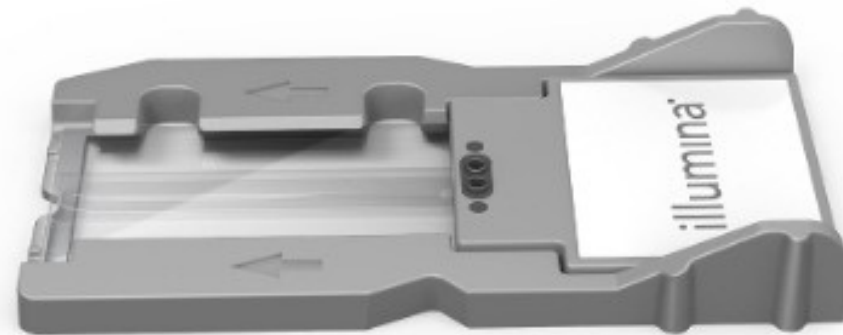


0:03 / 5:12

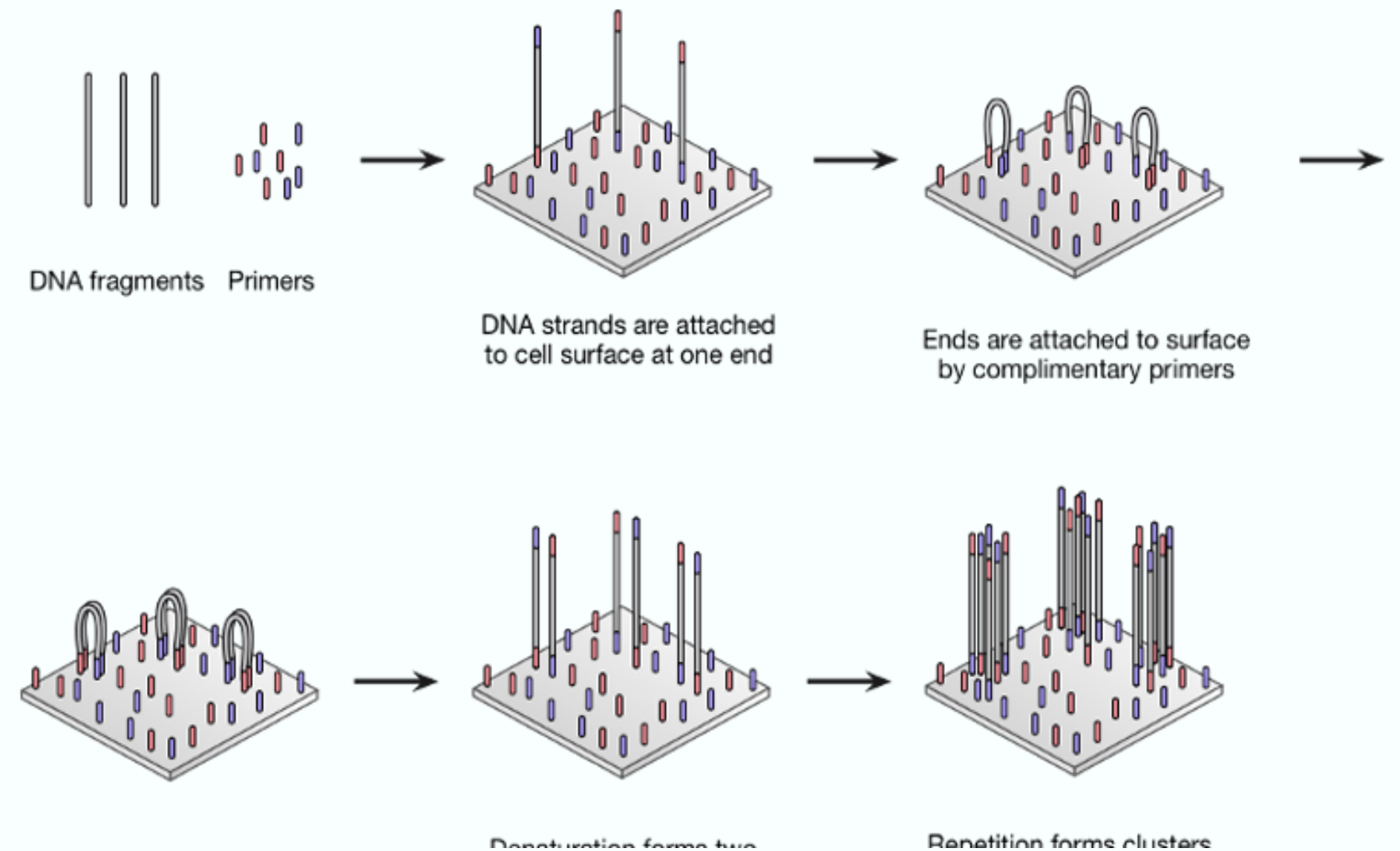
Intro >



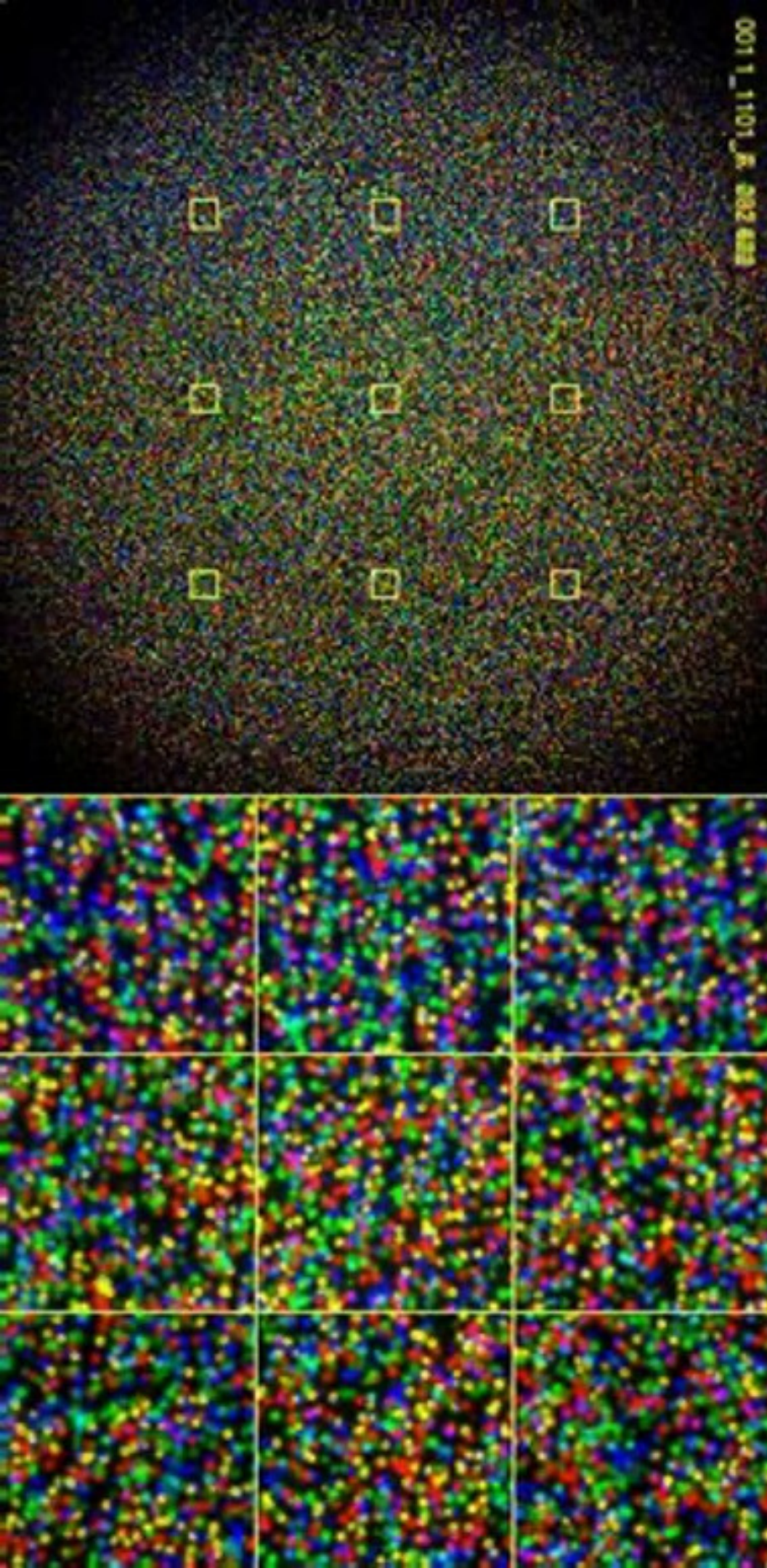
SEQUENZIAMENTO CON ILLUMINA



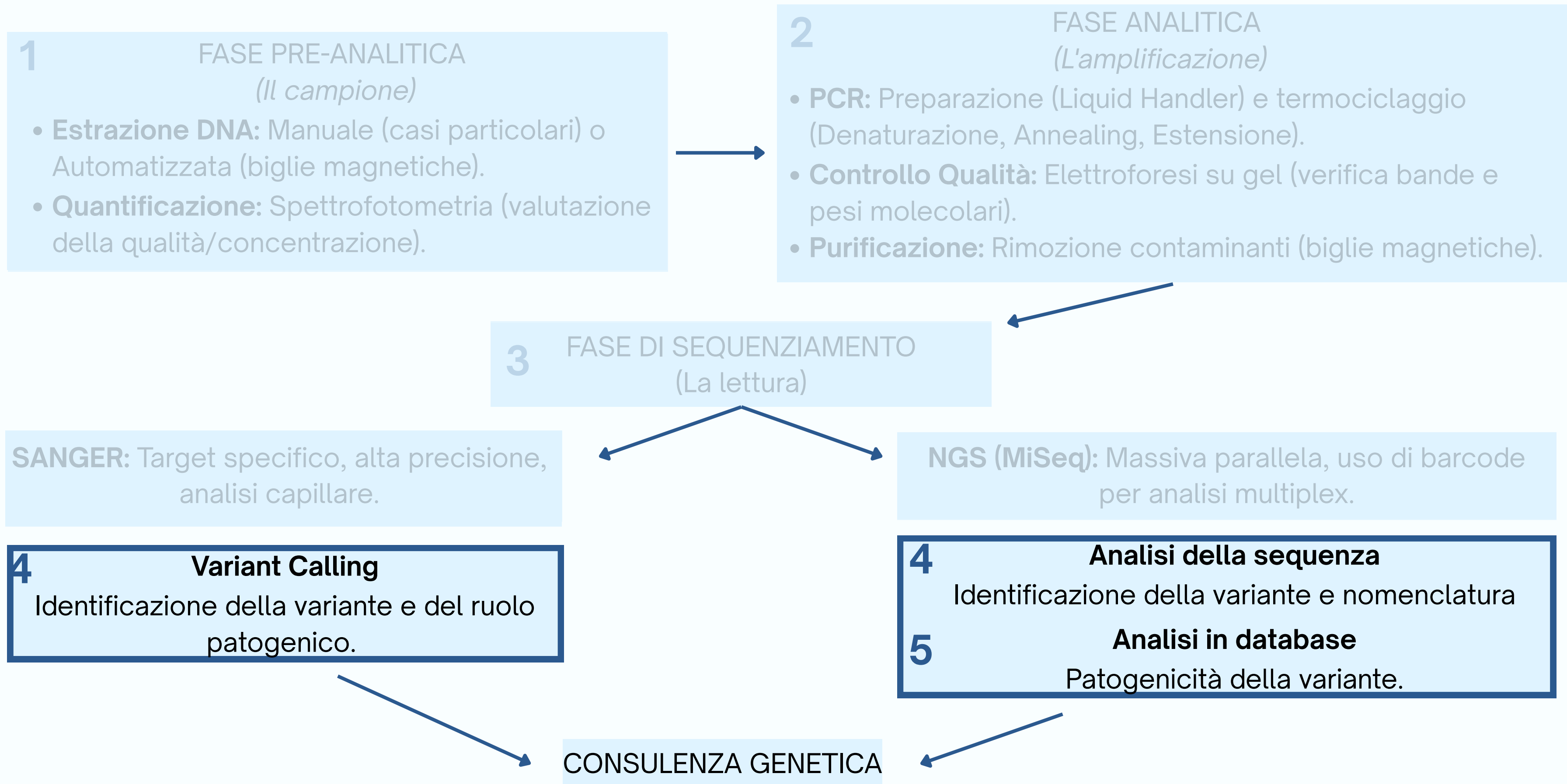
FLOW CELL: sequenziamento a ponte
2 x 150 cicli (*forward and reverse*)



PARAMETRI

- 
- ➡ **CLUSTER DENSITY:** ci dice quanti clusters vengono generati. I cluster diventeranno le reads, il loro numero non deve essere né troppo alto né troppo basso.
 - ➡ **Q30:** indice dell'errore di polimerizzazione della polimerasi. Maggiore è il valore del Q30, più bassa è la frequenza dell'errore.
 - ➡ **PASSING FILTER:** quantifica i clusters validi. Maggiore è il valore del passing filter, migliore è la reazione. Per il gene CFTR un valore di 75% o maggiore va bene.
 - ➡ **STIMA DELLA QUANTITÀ DI BASI**

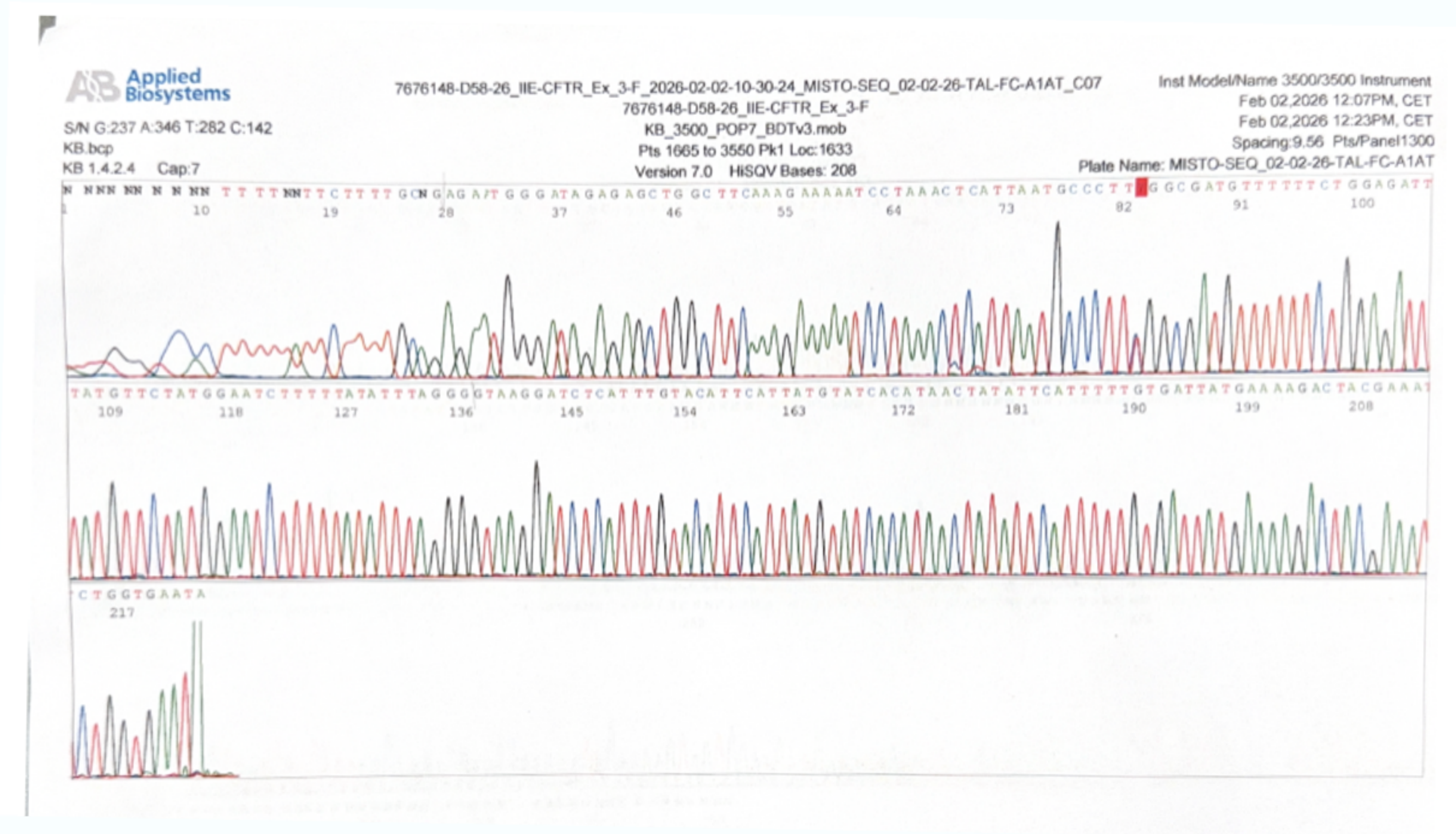
WORKFLOW DI LABORATORIO:



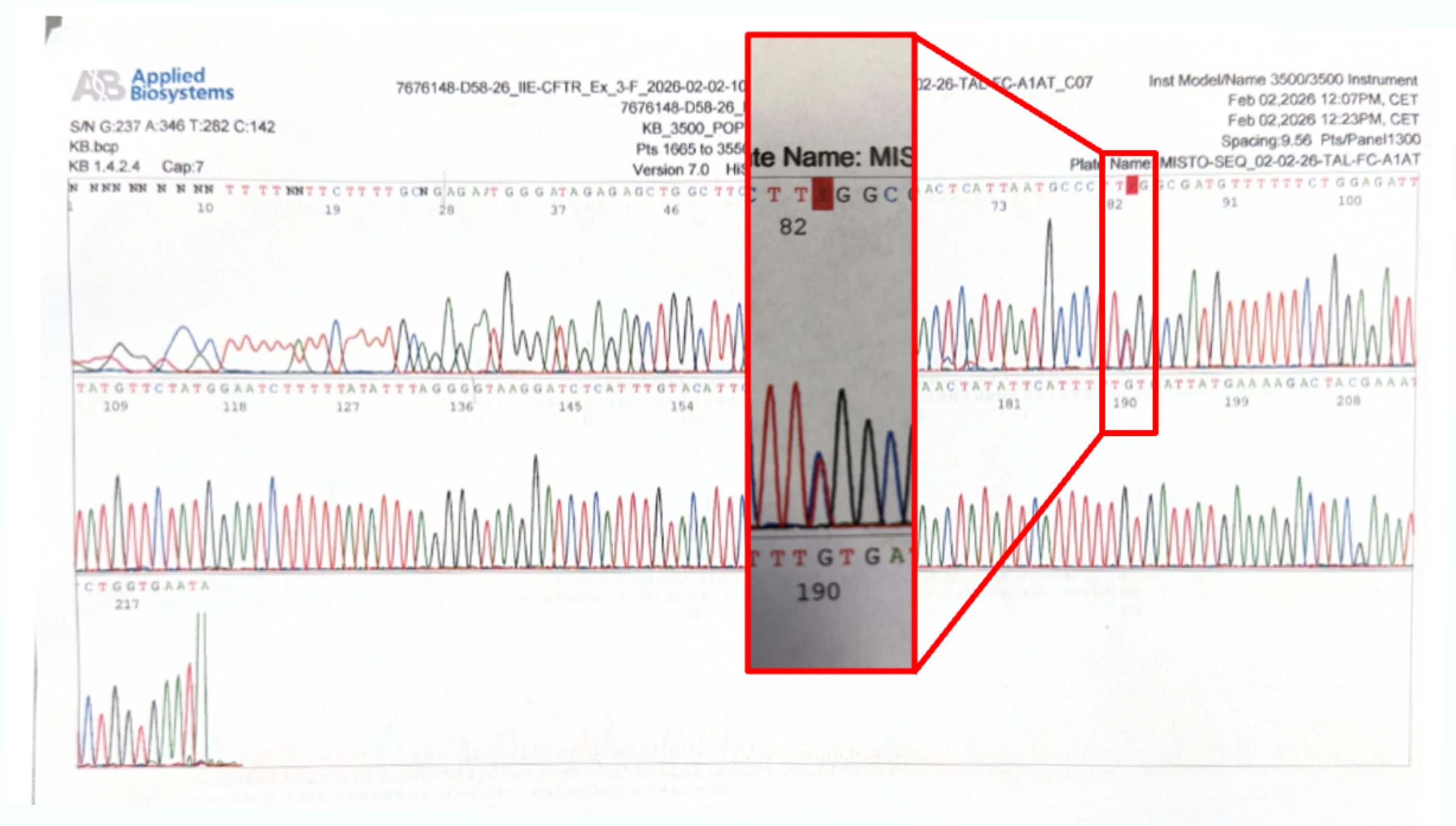
VARIANT CALLING - NGS (II Livello)

OVERVIEW SCREENING GENES SNPs-INDELS CNVs WARNINGS										
Variant List - sorted by: PRED_CAT > PATHOGENICITY_CLASS > GENE										
Pred. ▲	Pat. ▼	id	type	cod. cons.	gene ▲	refSeqId	c.DNA	Protein	VF%	
A		21	IVS8_polyT	splice_acceptor_indel	CFTR	NM_000492	c.1210-34TG[10];[=]			
C	1	15	INDEL	intronic	CFTR	NM_000492	c.2619+86_2619+87delTA			54.75
C	1	13	SNP	intronic	CFTR	NM_000492	c.1680-870T>A			46.61
C	1	17	SNP	intronic	CFTR	NM_000492	c.2909-92G>A			51.25
C	1	19	SNP	intronic	CFTR	NM_000492	c.4137-139G>A			47.43
C		11	SNP	intronic	CFTR	NM_000492	c.1585-9218G>A			48.05
D	1	3	SNP	synonymous	CFTR	NM_000492	c.4389G>A	p.= (p.Gln1463Gln)		51.78
D	1	2	SNP	synonymous	CFTR	NM_000492	c.2562T>G	p.= (p.Thr854Thr)		50.11
D	1	1	SNP	missense	CFTR	NM_000492	c.1408G>A	p.Val470Met		52.32

IDENTIFICAZIONE DELLE VARIANTI- *Sanger*



IDENTIFICAZIONE DELLE VARIANTI- *Sanger*



NOMENCLATURA VARIANTI EOSNICHE

FONDAMENTALE per identificare in modo univoco le varianti.
Esistono **2 nomenclature**:

Nomenclatura classica-storica:

- posizione 1: nucleotide a -132 da codone di inizio ATG

“CFTR 133A>T”

Nomenclatura HGVS

(Human Genome Variation Society):

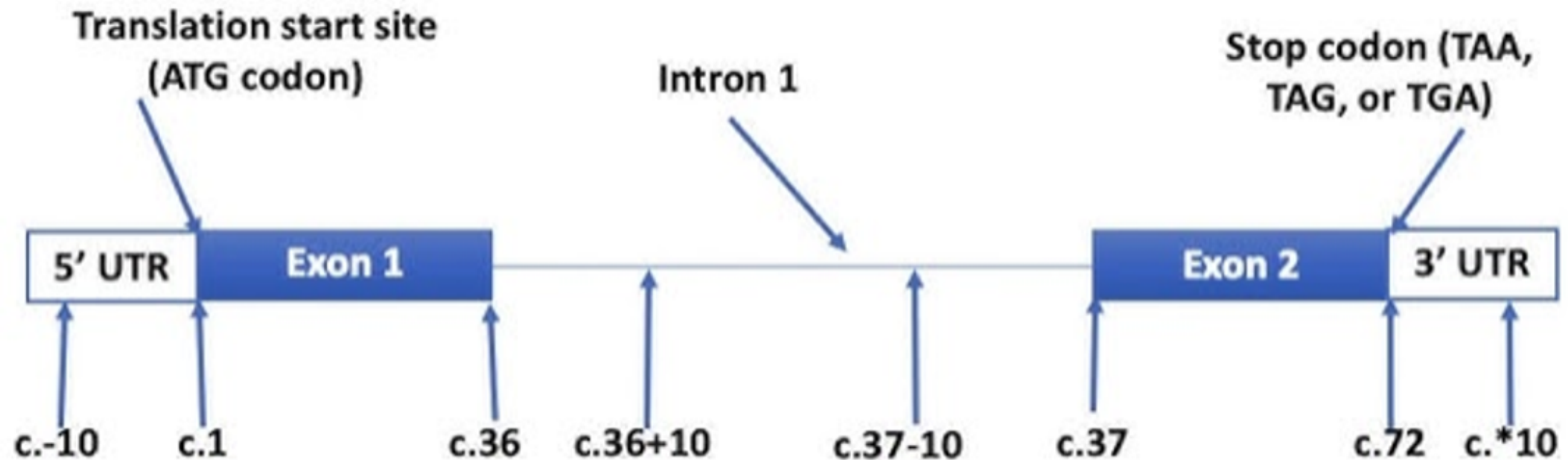
- posizione 1: nucleotide di inizio traduzione del codone ATG

“CFTR c.1A>T”

- “c.” $\Rightarrow$ *coding*
- “p.” $\Rightarrow$ *protein*

“CFTR c.220C>T p.(R74W)”

NOMENCLATURA DELLE VARIANTI NON-CODIFICANTI



DATABASE DI INTERESSE

***Cystic Fibrosis
Mutation Database***



CFTR-France database



e!Ensembl



Results for R74W

Variant R74W can be referred to as R74W, p.Arg74Trp, c.220C>T, or 352C>T

- R74W is a variant often seen as part of a complex allele (see [Glossary](#)). Individuals with R74W frequently also have the variant D1270N (c.3808G>A) in the same copy of the CFTR gene. Occasionally, other variants such as V201M (c.601G>A) may also be present in the same copy of the CFTR gene. The presence of one or more additional variants may influence whether or not someone has symptoms of CF.

The information shown below is for a single variant. To search for a variant combination, enter your first variant in the search box above and then start typing in the "Second variant (optional)" search box. If you do not find your second variant listed or don't know what it is, you can select a group of variants to search.

Summary Information

Clinical Information

Functional Testing

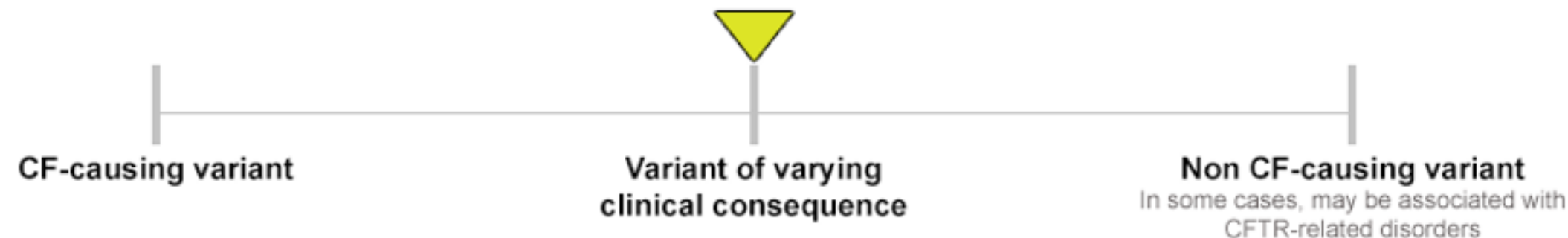
Penetrance Analysis

CFTR Therapies

Additional Information

The variant R74W is seen in 38 patients in our worldwide database. This variant, when in combination with a CF-causing variant, results in varying clinical consequences.

- This means that some individuals who have R74W and a CF-causing variant have CF, while others do not.
- In individuals with R74W who do not have CF, the R74W variant may contribute to clinical symptoms such as CFTR-related disorder.



The diagnosis of any individual patient with CF should be made based upon clinical parameters. The content of this website should not be used as a substitute for clinical judgement.

NC_ ⇒ regione genomica
NM_ ⇒ cDNA
NP_ ⇒ proteina

Franklin
by QIAGEN

CFTR:c.220C>T

SEARCH

KNOWLEDGE BASE

MY CASES

Learn More

Log In

Sign Up

Search Page > CFTR:c.220C>T

CFTR:c.220C>T

chr7-117509089 C>T | p.Arg74Trp | NM_000492.4 | rs115545701 (V) | UCSC (V) | gnomAD (V)

Classify Variant

Follow

Save Case

Export Summary

Improve Interpretation

Add your case details to help Franklin show you the most relevant data

0%

Franklin ACMG Classification

Variant Assessment

Publications

Gene Assessment

Suggested Classification

VUS

Benign

Likely Benign

VUS

Likely Pathogenic

Pathogenic

Apply Classification

EVIDENCE

Aggregated from public databases using ACMG Guidelines

Functional Data

VARIANT COMMUNITY FEED

Share Classification

Post a Note

Link a Publication

Carla Papa | Oasi IRCCS Troina

Nov 05, 2025 at 12:21 PM

VUS

Zygosity: Heterozygote

Patient phenotypes systems: Abnormality of the genitourinary system, Abnormality of the integument

REFERTO



FONDAZIONE IRCCS CA' GRANDA
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO

Laboratorio di Genetica Medica
Settore di Genetica Molecolare
via Commenda 12, 20122 - Milano
tel: 02 55032432-2433

INDAGINI MOLECOLARI PER LA FIBROSI CISTICA

Milano, 16/02/2012

Data prelievo 09/02/2012

Nome paziente:

Cod. FC95/12

D.nascita

Sesso

Reparto/Centro:

Motivo della richiesta: Accertamenti pre-fecondazione assistita

Materiale pervenuto: Sangue intero

Materiale utilizzato: DNA estratto da leucociti del sangue periferico

Risultati Presenza in eterozigosi della mutazione : c.3909C>G, p.Asn1303Lys (N1303K in eterozigosi)

Interpretazione Il soggetto in esame è risultato portatore di una mutazione che causa Fibrosi Cistica ed è pertanto da considerarsi eterozigote per fibrosi cistica. E' opportuno estendere l'indagine molecolare per la fibrosi cistica al partner ed ai familiari.

Si consiglia consulenza genetica

Il Biologo
Dott. Luigi Porcaro

Il responsabile del Laboratorio di Genetica Molecolare
Dott.ssa Manuela Seia

Mutazioni studiate

[delta]F508,G551D,G542X,[delta]I507,R553X,N1303K,W1282X,1717-1G->A,CFTRdel2.3(21Kb), 3199del6,3272-26A>G,S1251N,Q552X,R560T,3905insT,3120+1G>A,711+1G->T, 1898+1G->A,394delTT,2184delA,711+5GA,3849+10kbC->T,R1162X,3659delC,G85E, 621+1G->T,R117H,1078delT,R347P,R334W,A455E,2183AA->G,2789+5G->A,2143delT, E60X,1259insA,4016insT,4382delA,852del22Bp,D579G,G1244E,G1349D,I502T,L1065P, R1158X,T338I,S549R(A>C),991del5,D1152H,1898+3A->G,R1070Q,R1066H,621+3A->G, E217G,R334Q,R347H,L1077P,1677delTA,1706del17, E585X, R1066C, S912X. Screening delezioni es.1, es.2 (ins.182bp), es.2, es.2-3, es. 14b-17b, es. 22-23, es. 22-24, es. 17a-18 (3120+1Kb del. 8.6Kb).
Le mutazioni ricercate coprono circa l'85% dei difetti che causano Fibrosi Cistica (frequenze analizzate su 1200 alleli CF - dati casistica interna).

Polimorfismi osservati Poli T, Intr. 8 = 7/9

Con tecnica di sequenziamento sono stati inoltre indagati per la presenza di mutazioni i seguenti esoni del gene CFTR:

13

Metodiche utilizzate INNO-LIPA CFTR19, CFTR17+TN Update,CFTR Italian Regional; CFTR Deletions +6 (reverse dot blot)

Riferimento numerazione sequenza NM_000492.3. Nomenclatura secondo HGVS V 2.0 (in parentesi nomenclatura tradizionale: Cystic Fibrosis Mutation Database: www.genet.sickkids.on.ca)

Il laboratorio di Genetica Molecolare partecipa al controllo di qualità Europeo organizzato dal Cystic Fibrosis European Network.

Legge 196/03 sulla privacy

Laboratorio certificato UNI EN ISO 9001-2008

Pag1/1

Ora provate voi!!

