

Ruolo delle Biobanche Veterinarie

Katia Barbaro

**Laboratorio Allestimento e Gestione dei Substrati Cellulari e Anticorpi Monoclonali e
Medicina Rigenerativa**

UOC Virologia – IZS Lazio e Toscana

28 novembre 2022





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Cos'è una Biobanca?

La biobanca è la struttura che custodisce materiale biologico attraverso attività che vanno dalla raccolta alla distribuzione.

Il materiale biologico è molto vario: può includere batteri, prelievi di sangue, tessuto animale o vegetale e, soprattutto, i prodotti da essi derivati.



E' un patrimonio composito di informazioni, per la ricerca e la medicina, che include il **campione biologico** fisico, **dati epidemiologici e clinici** annotati e associati al campione, **collezione di immagini, di suoni** usati a scopo diagnostico e di ricerca, cioè l'intera «conoscenza» del campione.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Tipologie di biobanche

UMANO



• **Biobanche cliniche e terapeutiche**, per trapianti autologhi o allogenici (materiale umano per applicazioni sull'uomo, es trattamento leucemie con cellule staminali emapotoietiche da cordone ombelicale)

• **Biobanche di ricerca:**

- Biobanche di linee cellulari
- Biobanche di sangue (sacche di sangue intero, sacche di plasma e di altri emocomponenti)
- Biobanche basate su patologia o su più patologie (ad esempio biobanche specificamente istituite per condurre ricerche su malattie neurologiche, oncologiche, vascolari ecc.)
- Biobanche genetiche, per la conservazione di DNA o RNA
- Biobanche basate su popolazione, per lo studio della biodiversità
- Biobanche basate su progetti specifici
- Biobanche tessuto-specifiche (osseo, cornea, ecc.)
- Biobanche virtuali, con l'installazione di software di avanguardia per il controllo di una miriade di dati associati ai campioni

VETERINARIO



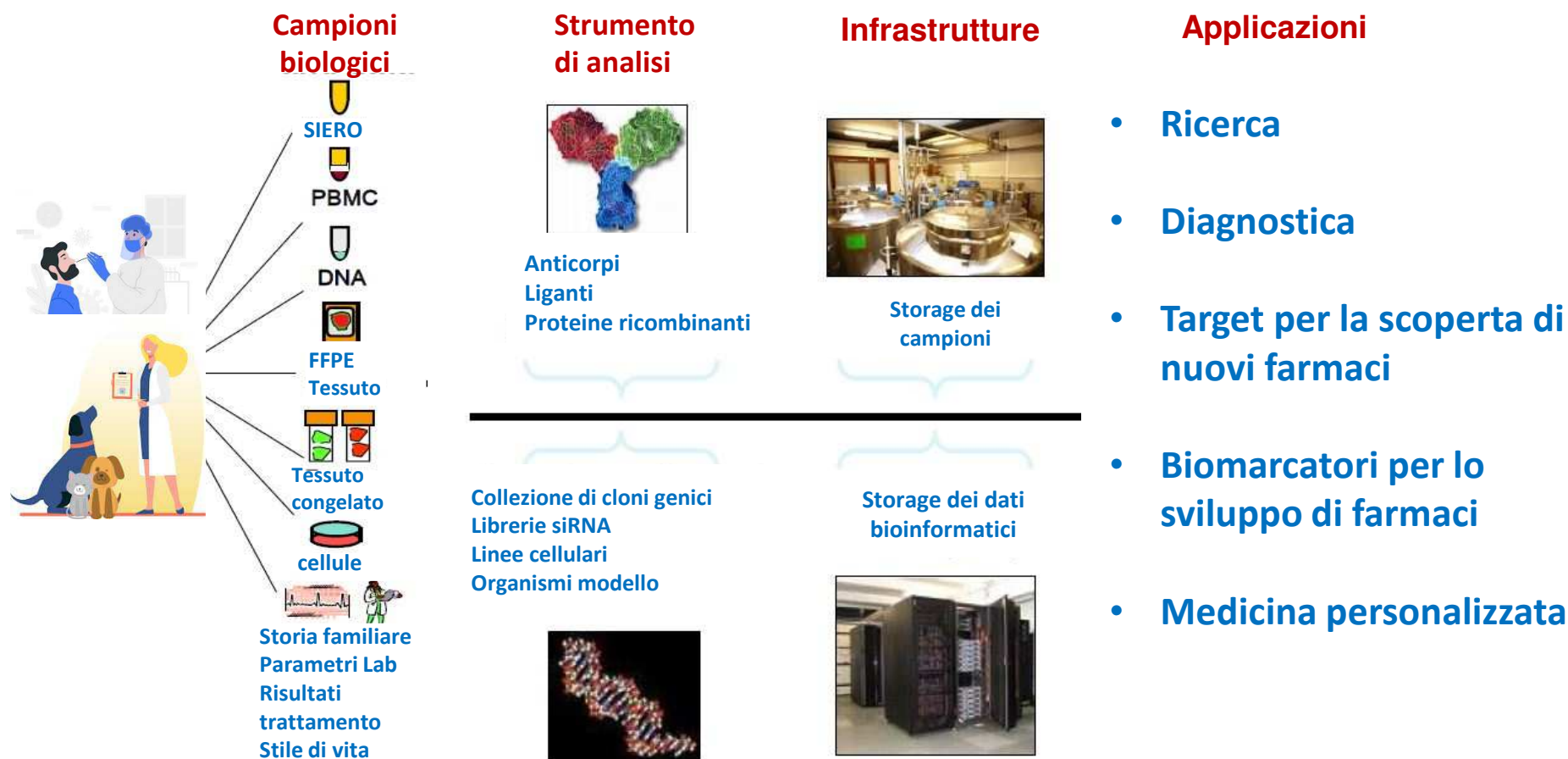
**Rete Biobanche
Veterinarie**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Componenti chiave delle biobanche



Funzione di una Biobanca

1. Raccolta e conservazione di materiale biologico e dei relativi dati clinici, utilizzati per:
 - diagnosi
 - per studi sulla biodiversità
 - per ricerca
2. Garanzia di materiali biologici ad alta qualità e autenticità
- 3. Riduzione sperimentazione animale**
4. Promozione dell'integrazione delle biobanche per le infrastrutture scientifiche
5. Incoraggiare le attività sinergiche tra il pubblico e il privato





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Cosa significa partecipare ad una Biobanca?

In linea generale TUTTI i laboratori COLLEZIONANO biorisorse.

- La partecipazione ad una Biobanca NON prevede alcun trattamento aggiuntivo rispetto a quelli già previsti nell'iter diagnostico.
- La raccolta e la conservazione di materiale biologico – secondo standard qualitativi a garanzia della completa tracciabilità delle attività a cui il campione è stato sottoposto e delle informazioni clinico-scientifiche ad esso collegate – rappresenta una risorsa inestimabile per la ricerca traslazionale, finalizzata alla comprensione dei meccanismi patogenetici e al miglioramento della salute e del benessere dell'uomo e degli animali.



L'importanza delle biobanche nella ricerca scientifica

Negli ultimi anni si è registrato un incremento nella creazione di biobanche nel mondo. L'avanzamento della ricerca va di pari passo con il bisogno di avere luoghi sicuri dove conservare materiale e informazioni preziose.

Il biobanking è uno strumento strategico per il progresso delle biotecnologie e la ricerca scientifica e industriale, per favorire lo sviluppo di nuove terapie e la comprensione delle malattie, nonché per offrire informazioni utili alla cura, alla prevenzione e alla diagnosi precoce.

Infatti i campioni conservati nelle biobanche svolgono un ruolo fondamentale nella traslazione dalla medicina convenzionale alla medicina personalizzata, predittiva e preventiva, considerando le potenzialità in divenire delle nuove metodiche omiche impiegate nello studio di malattie rare e ultrarare, come pure nella ricerca oncologica e immunologica.

La condivisione delle risorse permette di migliorare gli approcci sperimentali sia in medicina umana che veterinaria in ottica di One Health





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Biobanking dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana: identificare, quantificare, stoccare e rendere disponibili i campioni dei Centri di Riferenza e dei singoli laboratori.

Ad esempio:

-D.O. Microbiologia degli Alimenti: colleziona gli isolati delle principali classi di patogeni a trasmissione alimentare di origine umana e alimentare, ne gestisce la ceppoteca ed i relativi metadati.

-D.O. Diagnostica Generale: colleziona ceppi batterici, micotici, protozoari ed algali utilizzati come materiali di riferimento da utilizzare per il controllo di qualità di terreni di coltura, di colorazioni, di kit diagnostici e di reagenti, e per l'allestimento di campioni positivi di riferimento nella valutazione delle caratteristiche di performance di procedure microbiologiche.

-D.O. Virologia: il Centro di referenza dell'Anemia Infettiva Equina (CRAIE) e delle Malattie degli Equini (CERME) producono e distribuiscono agli altri IZZSS o agli altri enti di ricerca i reagenti di referenza (sieri, linee cellulari, ceppi virali).



Linee cellulari

Linee cellulari primarie

- Le cellule isolate da un qualsiasi organo o tessuto animale
- Non sono in grado di compiere un numero finito di divisioni cellulari in vitro (circa 50), dopodiché vanno incontro a degenerazione e morte.
- Tale fenomeno avviene indipendentemente dalla presenza di metaboliti appropriati per la crescita e si indica come **SENESCENZA**.

Linee cellulari continue

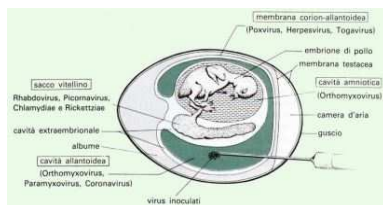
- Derivate da cellule tumorali o ottenute da trasformazione di colture primarie
- Derivano da singole cellule in cui mutazioni spontanee o indotte (ad es. da radiazioni, virus, eventi genetici, sostanze chimiche) hanno annullato il programma genetico della senescenza.





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

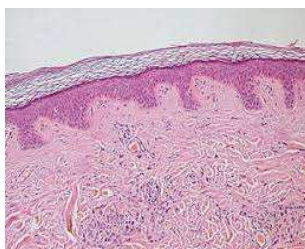
Progetto IZS 01/19 RC: Immortalizzazione e Riprogrammazione cellulare: metodiche innovative per la produzione di linee cellulari in diagnostica veterinaria
Finanziano dal Ministero della Salute



CAM
FBLC
FEP



DOC



SDE



Sertoli

Applicazioni

- Diagnostica virologica
- Studi di tossicità
- Interazione virus-ospite
- Studi funzionali
- Vaccini



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

TRASFEZIONE GENICA

Trasferimento di DNA esogeno in cellule di mammifero per la creazione linee cellulari immortalizzate, lo studio della funzione e dei meccanismi di controllo dei geni

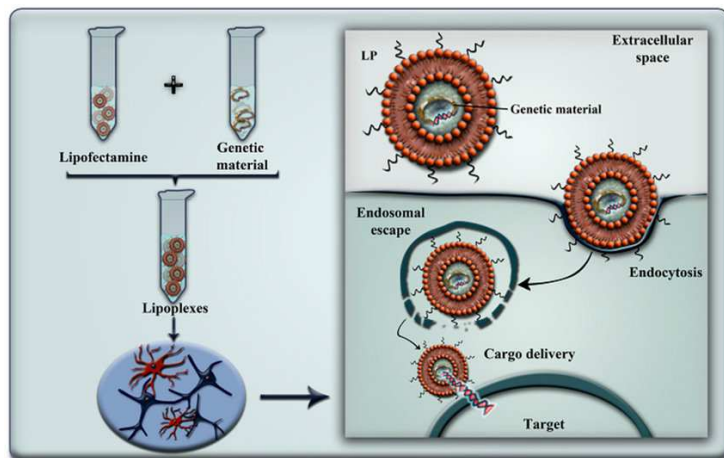
1) METODI CHIMICI

2) METODI FISICI

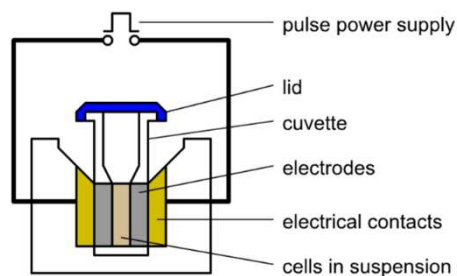


METODI DI TRASFEZIONE

1. METODI CHIMICI



2. METODI FISICI



• VANTAGGI

- ✓ Semplice
- ✓ Efficiente
- ✓ Poco tossico

• SVANTAGGI

- ✓ Condizionato dalla presenza di siero o antibiotici

• VANTAGGI

- ✓ Semplice
- ✓ Efficiente
- ✓ Non condizionato dalla presenza di siero o antibiotici

• SVANTAGGI

- ✓ Pericoloso



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Immortalizzazione linee cellulari

Linee cellulari primarie:

- FEP = fibroblasti embrionali di pollo
- SDE = staminali di derma equino
- DOC= cordone ombelicale di delfino

Trasfettate
con hTERT



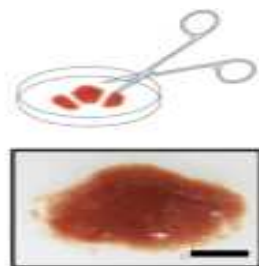
Linee cellulari immortalizzate



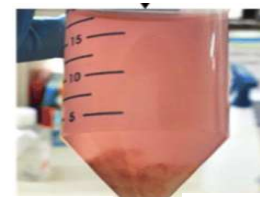
Immortalizzazione linee cellulari – step 1



Embrione di pollo 5
giorni



Isolamento embrione



Digestione enzimatica
per 2h a 37°C



Centrifugazione: separazione
pellet cellulare



Lavaggio in PBS del
pellet cellulare



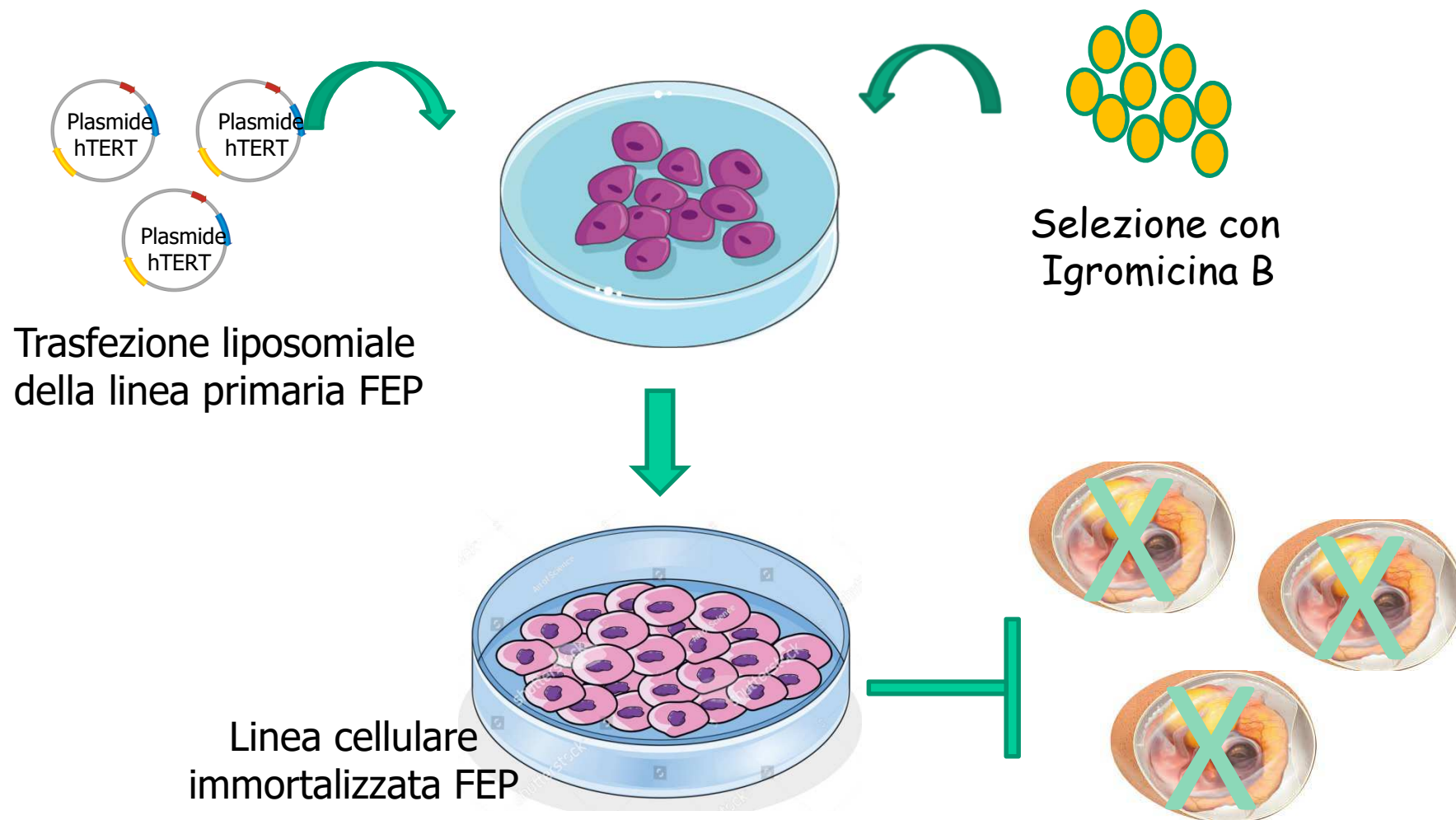
Piastramento delle
cellule FEP





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Immortalizzazione linee cellulari – step 2





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Progetto di Ricerca 8MSS21: Sviluppo di un metodo alternativo al modello animale: biosensori cellulari per l'evidenziazione *in vitro* degli effetti di sostanze con potenziale espressione di Interferenza Endocrina, sul recettore degli estrogeni (*estrogen gene reporter assay*).

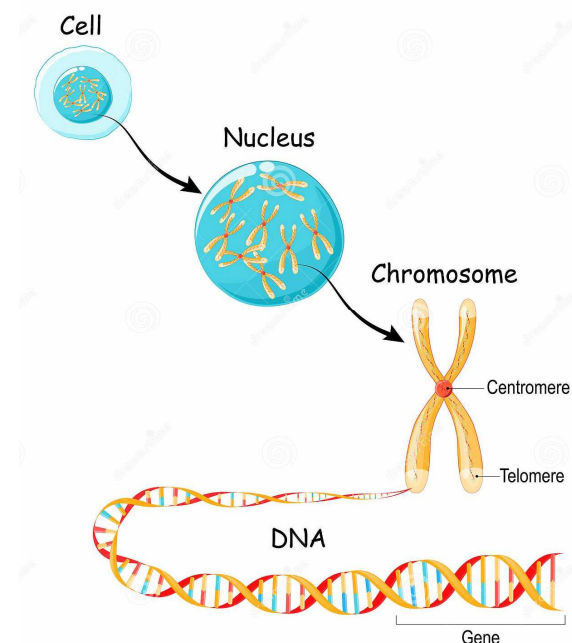
Ad oggi non esiste ancora una metodica ottimizzata e robusta da utilizzare nello studio dall'attività biologica in questa tipologia di sostanze, pertanto lo scopo del presente progetto è quello di proporre un test di screening *in vitro* che, attraverso l'integrazione di varie tecniche di biologia cellulare e molecolare, si dimostri in grado di determinare le sostanze chimiche, quali pesticidi, biocidi e additivi delle plastiche, in grado di agire come interferenti endocrini (EDs), ossia con nota e/o non nota attività simil-estrogenica e/o anti-estrogenica sul recettore nucleare estrogenico (nER).

Editing genico, una tecnica innovativa che diversi laboratori del mondo utilizzano per intervenire sul materiale genetico nella speranza di correggere i difetti all'origine di alcune malattie: con un taglia e cuci (o un copia-incolla) **SPECIFICO** del DNA



Editing genico

Il **genetic editing** o gene targeting è una tecnica di terapia genetica in cui una specifica sequenza di DNA cellulare, definita "target" è direttamente modificata. L'evento di modificazione si ottiene introducendo all'interno della cellula una sequenza esogena di DNA, in grado di riconoscere in maniera specifica la sequenza target e apportare una specifica conversione. Il segmento di DNA esogeno ha una sequenza omologa alla sequenza bersaglio e differisce solo per l'alterazione genica (inserzione, delezione, sostituzione) da "introdurre o da "correggere". In questo modo si fornisce alle cellule l'esatta informazione genica, ristabilendo la normale struttura e il corretto funzionamento della proteina nelle cellule mutate.



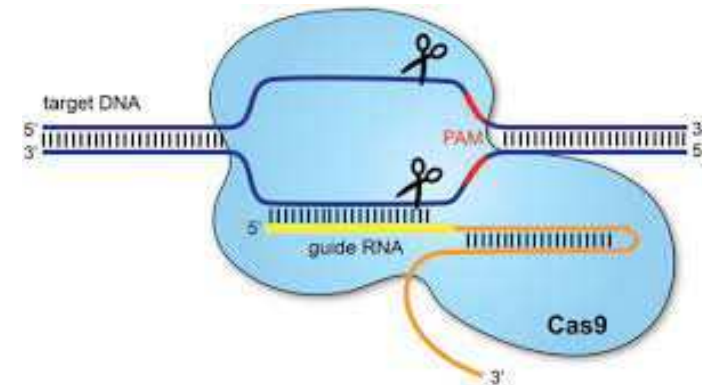
CRISPR CAS 9

La tecnologia **CRISPR/CAS9**, è una tecnologia all'avanguardia (nel settore dell'ingegneria genetica) che consente di realizzare interventi di microchirurgia sui geni, modificando una sequenza di Dna in un punto preciso del cromosoma con **precisione** e **facilità** mai raggiunte prima.

Per tagliare il DNA, Utilizza la proteina Cas9.

Per indirizzarla verso il bersaglio prescelto, la proteina Cas9 deve essere equipaggiata con una guida. Si tratta di una breve sequenza di RNA (complementare a quella del sito che si vuole tagliare sul DNA) e funziona come un sistema di posizionamento.

Una volta tagliato, il DNA viene aggiustato dai naturali meccanismi di riparazione della cellula.

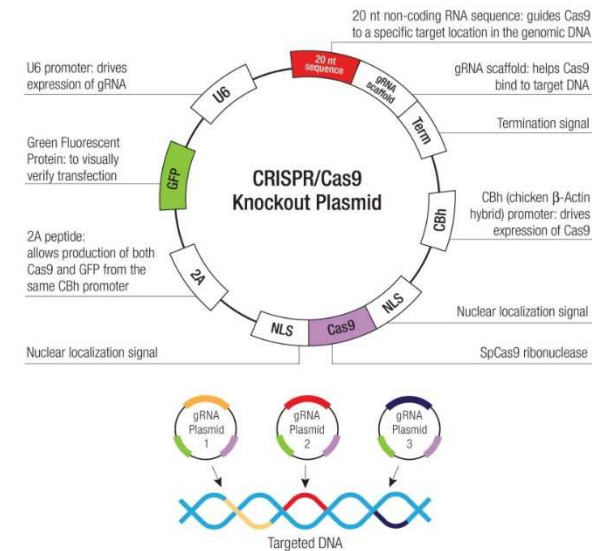
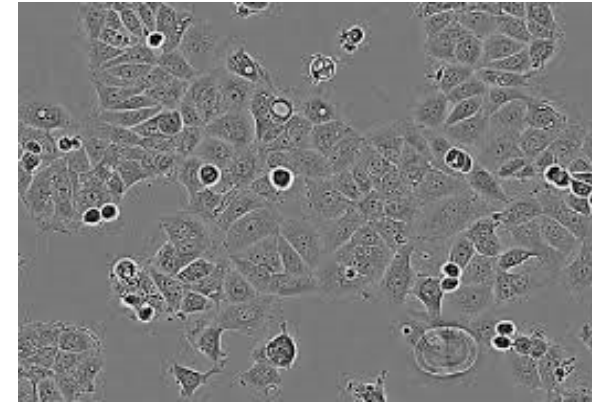


MCF7 KNOCKOUT CON CRISPR CAS9

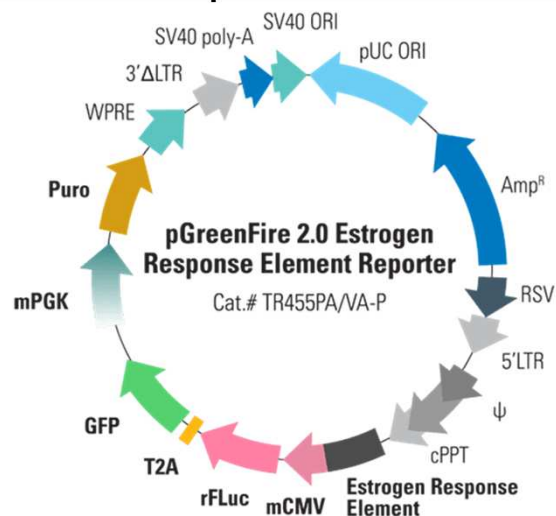
- **Linea cellulare MCF7:** carcinoma mammario che esprime livelli considerevoli di recettore degli estrogeni (Estrogen Receptor, ER), ER **alpha** and ER **beta**.
- **CRISPR/Cas9 Knockout ER:** I plasmidi CRISPR/Cas9 KO consistono in sequenze RNA guida di 20 nt specifici Estrogen Receptor alpha o beta.

Le sequenze gRNA indirizzano la proteina CAS9 ad indurre una doppia rottura sito-specifica dei filamenti (DSB) nel DNA genomico.

Un plasmide contiene un gene per la resistenza alla puomicina per la selezione; un altro plasmide contiene un marker GFP per confermare la trasfezione visivamente.

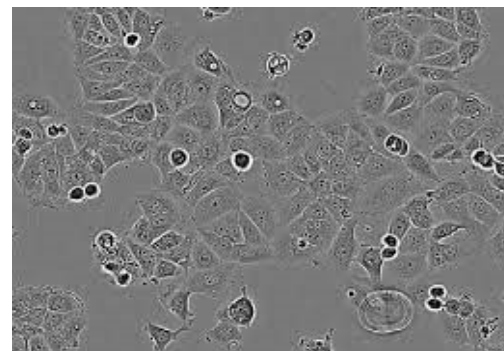


pGreenFire 2.0 Estrogen Response Element Reporter Lentivector

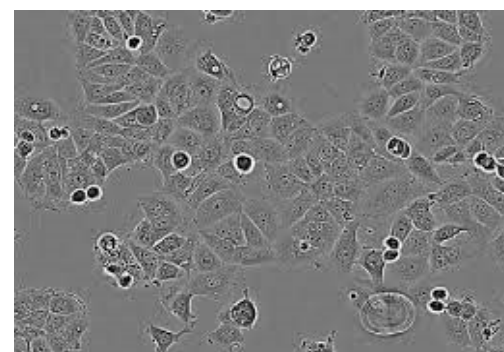


Vengono inseriti elementi di risposta trascrizionale sensibili agli estrogeni a monte di un promotore CMV che insieme guidano la coespressione di rFLuc e GFP in risposta agli estrogeni.

MCF7 Era KO



MCF7 Erβ KO



Le linee cellulari possono essere usate per screenare le sostanze chimiche per l'attività estrogenica o anti-estrogenica recettore specifica





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

