



*Fondazione per la Ricerca
sulla Fibrosi Cistica - Onlus
italian cystic fibrosis research foundation*

SCP – Servizio Colture Primarie

Elvira Sondo, Phd

Istituto Giannina Gaslini, Genova

elvirasondo@gaslini.org

Phone 010-56362400

Servizio alla ricerca: Servizio Colture Primarie



Scopo: Il servizio nato nel 2012 dalla collaborazione tra la Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica (FFC Ricerca) e il laboratorio di Genetica Medica dell'Istituto Giannina Gaslini, ha lo scopo di fornire un modello biologico importante:

- 1) Per lo studio della fisiopatologia della fibrosi cistica.
- 2) Per la valutazione di strategie terapeutiche.

Servizio alla ricerca: Servizio Colture Primarie



Offerta: Il servizio mette a disposizione dei ricercatori una collezione di colture primarie bronchiali isolate da bronchi di polmoni espantati da individui sottoposti a trapianto di polmone (pazienti FC oppure soggetti trapiantati per altre patologie).

Forniamo a tutti gli utilizzatori del servizio:

- **Un protocollo per la corretta coltura delle cellule inviate.**
- **La possibilità, ai ricercatori interessati, di effettuare un periodo di training presso i nostri laboratori.**
- **La nostra competenza tecnica.**

Servizio alla ricerca: Servizio Colture Primarie

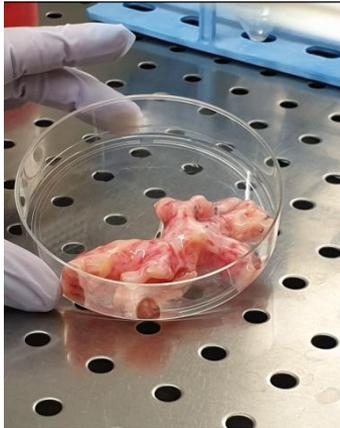


WARNING

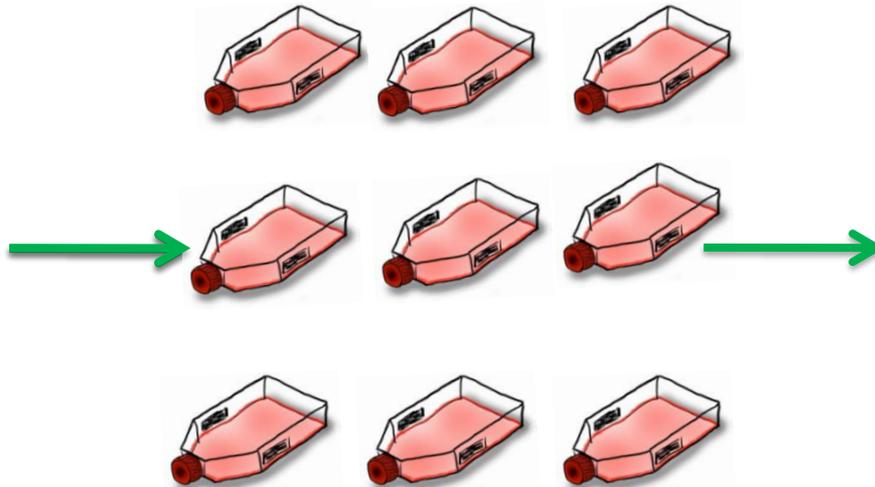
Il numero limitato di bronchi a disposizione e l'impossibilità di amplificare le cellule oltre un numero relativamente basso di passaggi richiedono un controllo accurato sul loro corretto uso.

Dall'isolamento delle cellule alla conservazione...

Isolamento cellule da Bronchi



Espansione



Stoccaggio



***In vitro* Methods for the Development and Analysis of Human Primary Airway Epithelia**

Ambra Gianotti¹, Livia Delplano¹ and Emanuela Caci^{1*}
U.O.C. Genetica Medica, IFCSO Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy

 **frontiers**
in Pharmacology

 **Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica - Onlus**
fibrosicisticaricerca.it

Dati del Servizio dal 2012

- Il Servizio ha ricevuto **110 bronchi**



- Ha permesso di isolare e coltivare cellule da pazienti corrispondenti a quasi **30 genotipi FC differenti**.
- E' stato utilizzato da più di 60 gruppi di ricerca ai quali sono state inviate **372 fiale** di cellule congelate (**243 FC** e **129 non FC**) insieme al materiale necessario per la loro coltura.

Genotipo

F508del/F508del
F508del/G542X
F508del/R1162X
G542X/711+5G->A
del Ex 22-23-24/UK
F508del/1717-1 G->A
F508del/R553X
F508del/dele 17A-18
R1162X/3849+10KbC->T
F508del /3849+10KbC->T
F508del/R1066H
F508del/N1303K
F508del/621+1G>T
F508del/G85E
F508del/2184insA
F508del/1259insA
F508del/3878delG
F508del/1874insT+Y577F
1525-1G->A/G458R
F508del/L927P
N1303K/711+5G->A
F508del/L1077P
F508del/C276X
R1162X/2789+5G->A
R1006C/M1V
N1088D/G542X
2789+5G>A/R1070Q

Elenco dei genotipi delle cellule bronchiali FC isolate dal Servizio Colture Primarie 2012/2021



Fondazione per la Ricerca
sulla Fibrosi Cistica - Onlus
fibrosicisticaricerca.it

Come accedere al Servizio



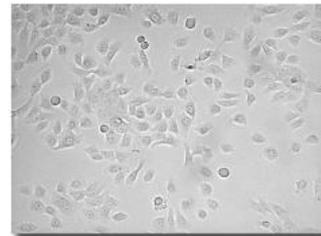
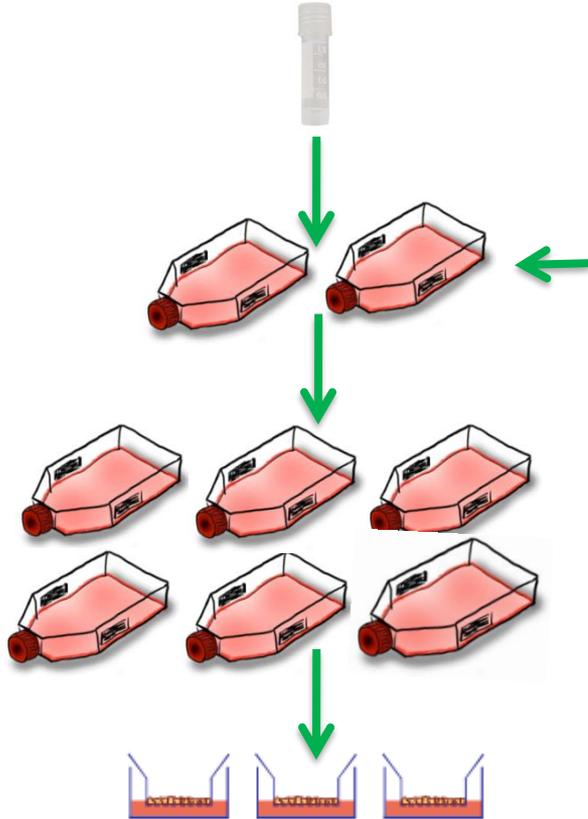
Il ricercatore deve:

- Fornire nel modulo scaricabile dal sito FFC Ricerca una breve descrizione dello studio che permetta di valutare la compatibilità degli esperimenti proposti con le finalità del Servizio ed il corretto utilizzo delle cellule stesse.
- La descrizione, al fine di tutelare la riservatezza dei risultati del proprio progetto di ricerca, deve essere generale (non è necessario che il richiedente ne riveli i dettagli es. identità di geni, proteine, meccanismi molecolari specifici). Il progetto deve essere stato già approvato, in corso o in fase di avvio.
- La validità dello studio sarà valutata da una Commissione esaminatrice.

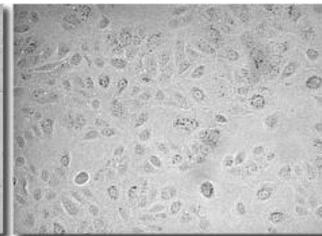
Schema generale

1) **Scongelamento.** Le cellule vengono scongelate rapidamente a 37° C risospese in terreno privo di siero, centrifugate risospese nuovamente in terreno privo siero e seminate in due fiasche precedentemente trattate con collagene

2) **Primo Passaggio.** Durante questa prima fase le cellule vanno controllate attentamente . E' bene tripsinizzare le cellule prima che raggiungano il 70% della confluenza. Una densità maggiore potrebbe limitare la crescita cellulare e rendere le cellule incapaci di differenziare. Cambiare il terreno ogni due giorni

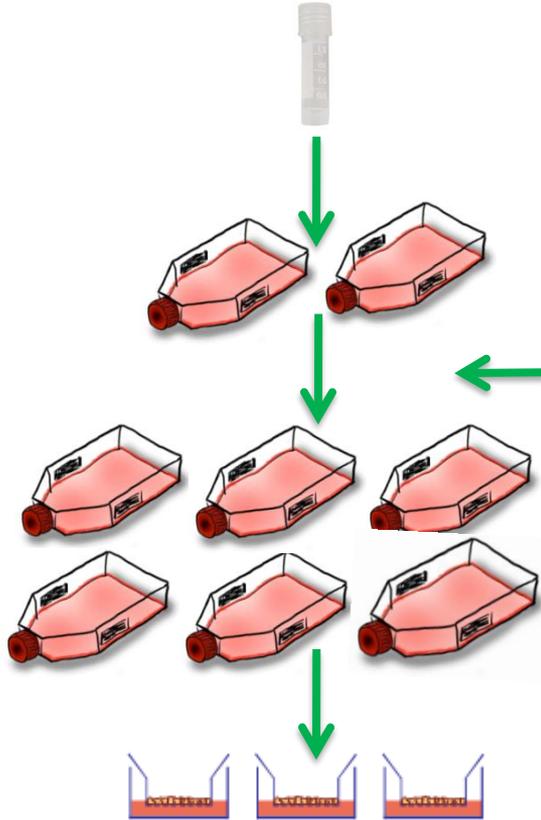


Cellule a media densità con un buon aspetto (piccole e tondeggianti)



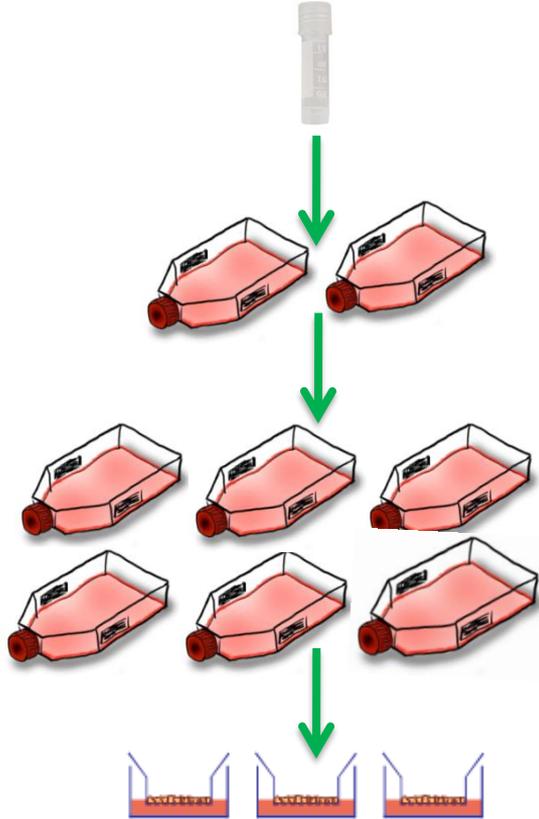
Cellule ad alta densità (presenza di cellule grosse e molto piatte)

Schema generale

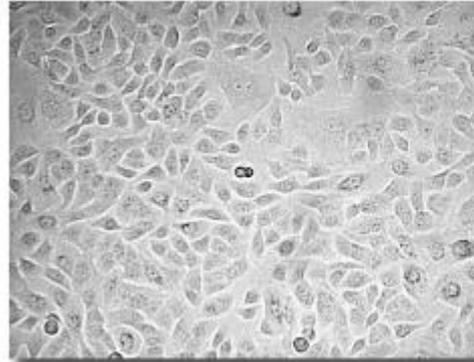


3) **Tripsinizzazione.** Le cellule vengono tripsinizzate, centrifugate ed il pellet viene risospeso in terreno LHC)/RPMI 1640 in un volume tale da seminare 750.000 cellule per fiasca T75 (12ml per fiasca). Generalmente dalle 2 prime fiasche si ottiene un numero di cellule sufficiente per 6 fiasche .

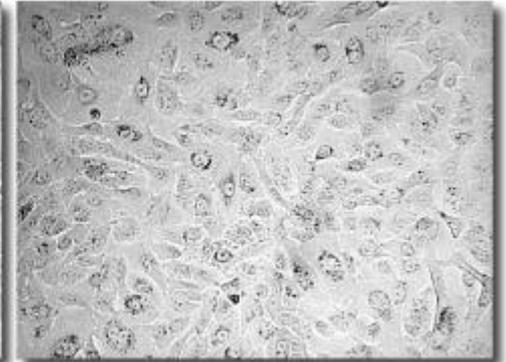
Schema generale



4) **Secondo Passaggio:** Durante questa fase le cellule possono essere lasciate crescere fino ad una densità maggiore rispetto a quelle della prima fase .

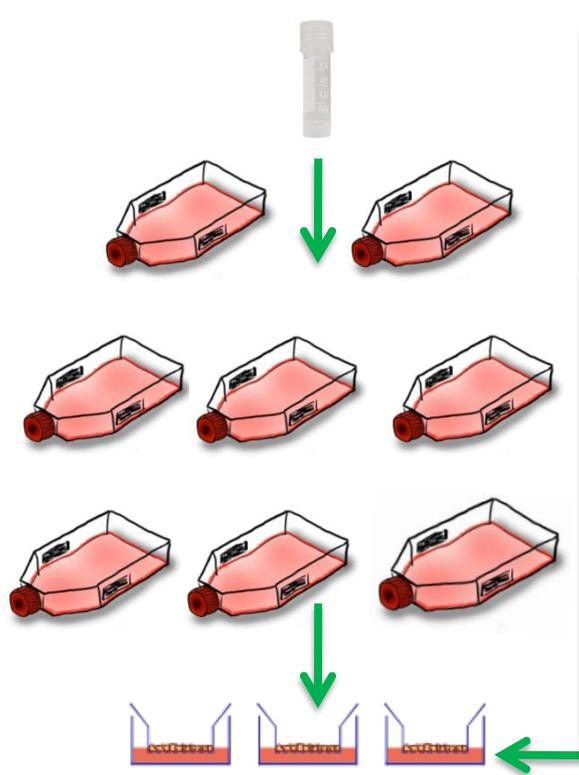


Esempio di cellule dopo il secondo passaggio ad alta densità prima della tripsinizzazione.



Esempio di coltura con gran numero di cellule piatte e squamose

Schema generale



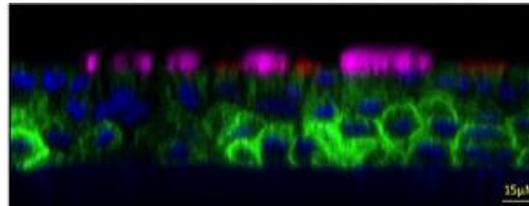
5) **Semina su supporti porosi:** le cellule vengono tripsinizzate e la sospensione cellulare viene contata e centrifugata. Il pellet viene risospeso in terreno LHC9/RPMI e le cellule vengono seminate sul supporto poroso.

Snapwell 3801 (1cm²) 500.000 cellule

Transwell 3450(2.5 cm²) 2.5 milioni di cellule

Dopo 24 ore dalla semina il terreno viene sostituito con DMEM/F12 con 2% di Ultrosor G (2mM L glutammina, 100U/ml penicillina, 100µg/ml streptomicina.

Differenziamento:Il terreno viene cambiato ogni 24 ore. Al quinto giorno viene sostituito solo il terreno basale, lasciando asciutto il lato apicale (condizione di air liquid interface (ALI).Se le cellule generano un epitelio ad alta resistenza la superficie apicale resterà asciutta. Dopo 2-4 settimane le cellule dovrebbero mostrare un marcato differenziamento.



Esempio di epitelio bronchiale differenziato osservato al microscopio confocale. Le ciglia sono marcate in **magenta**, le goblet cells in **rosso** e la membrana apicale in **verde**.

Componenti forniti dal servizio:

SERVIZIO BASE

- **Fiala di cellule epiteliali bronchiali congelate (ciascuna fiala contiene circa 500.000 cellule possibilmente al terzo passaggio)**
- **Terreno LHC9/RPMI 1640 (congelato in aliquote da 40ml)**
- **Soluzione collagene**
- **Ultrosor G**

SERVIZIO AVANZATO

- **Servizi basati sulla specifica expertise acquisita dal nostro gruppo di ricerca**



Costi del servizio base

Voce	Costo
Aliquota di cellule senza terreno	€125.00
Aliquota di cellule con terreno proliferativo	€175.00
Ultroser G per la preparazione del terreno differenziativo	€125.00

Costi del servizio avanzato

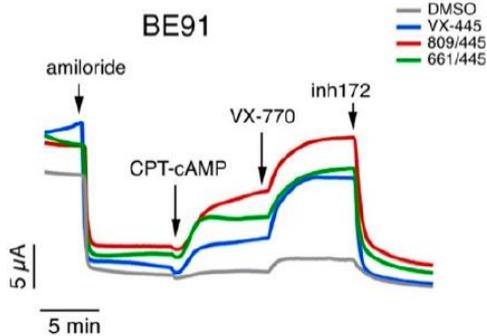
Voce	Costo
Preparazione Epiteli	€2000
Preparazione Epiteli+Esperimenti	€2000



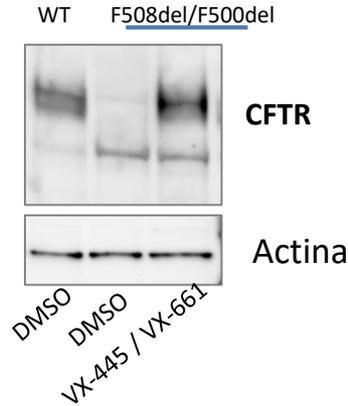
Applicazioni delle colture di cellule bronchiali

- Studiare il trasporto ionico transepiteliale e l'attività di CFTR e altri canali/ trasportatori mediante camera di ussing o sistemi analoghi
- Studiare l'espressione di proteine mediante immunofluorescenza o western blot
- Studiare l'espressione genica mediante estrazione di RNA seguita da RT-PCR o analisi con microarray/macroarray
- Studiare l'effetto di interazioni tra batteri e cellule epiteliali
- Valutare la tossicità di nuovi composti sull'epitelio bronchiale

Come migliorare il Servizio..Fornendo al ricercatore la nostra expertise...in che modo?



Studiare il trasporto ionico transepiteliale e l'attività di CFTR e altri canali mediante Camera di Ussing o sistemi analoghi



Studiare l'espressione di proteine mediante western blot

Valutare la tossicità di nuovi composti sull'epitelio bronchiale

Estrarre RNA da epitelii bronchiali

Studiare l'effetto di interazioni tra batteri ed epitelio bronchiale

Nuovo bando per progetti per la Ricerca Fibrosi Cistica (FFC Ricerca)

- Indicare nel progetto alla voce “**Services**” il costo del Servizio.
- Il costo comprende unicamente la preparazione degli epiteli bronchiali (20-24 epiteli circa Euro 2000)
- Gli esperimenti saranno completamente a nostro carico. (**Collaborazione Scientifica**)

Ist. Giannina Gaslini
UOC Genetica Medica



Nicoletta Pedemonte

Elvira Sondo

Valeria Capurro

Valeria Tomati

Emanuela Pesce

Maria Teresa Lena



Luis Galletta



Valeria Tomati

Maria T.
Lena

Cristina
Pastorino

Elvira Sondo

Valeria Capurro

Emanuela Pesce

Nicoletta Pedemonte