

PROGETTUALITA' Flow Sorting

Titolo:

Progetto **Flow Sorting**

Studio dell'eterogeneità fenotipica, genomica, trascrittomica e funzionale di neoplasie solide ed ematologiche finalizzato all'individuazione di strategie di personalizzazione della terapia, mediante identificazione e isolamento di popolazioni cellulari e vescicole extracellulari

PI: Francesco Fabbri

Unità Operativa: Laboratorio di Bioscienze / Nanobiomics and Liquid Niche

Razionale

La citometria a flusso è una tecnica di laboratorio che utilizza un fascio di luce laser per la rilevazione, il conteggio, la caratterizzazione e la separazione di cellule/eventi in sospensione. La citometria si avvale dell'impiego di uno strumento, il citometro a flusso, in grado di misurare contemporaneamente multipli parametri derivanti dall'attraversamento di singole cellule o eventi da parte di uno o più fasci di luce laser. Le procedure di separazione di cellule/eventi in sospensione mediante citometro a flusso (FLOW SORTING) sono metodiche strumentali che prevedono di prelevare eventi mono-dispersi da un campione e separarli in base a caratteristiche specifiche. Gli eventi in esame possono essere, ad es., cellule, sane e/o tumorali, vescicole, altri elementi biologici o particelle come biglie sintetiche leganti molecole di interesse. Il citofluorimetro sorter può rilevare le eventuali popolazioni di eventi presenti nel campione in esame, identificarle per permettere allo strumento una facile separazione e destinarle ad aree di raccolta specifiche con precisione ed accuratezza. Gli eventi possono essere separati in base a differenze nelle dimensioni, nella morfologia e nell'espressione di proteine di superficie. La separazione delle popolazioni ha importantissime applicazioni sia nell'ambito della ricerca preclinica sia traslazionale.

Selezionare e recuperare eventi e sottopopolazioni cellulari mediante cell sorting permette infatti, e solo a titolo esemplificativo, di:

1. valutare profili fenotipici, genetici e genomici senza bias dovuti alla compresenza di cellule con diverse caratteristiche (*inquinamento* cellulare), favorendo e ottimizzando i risultati e i costi di analisi "a valle", come metodiche e strumentazioni dedicate a NGS su singola cellula (ad es., RNASeq) (vd. 10X Chromium Controller, BD Rhapsody Single-Cell Analysis System for gene expression profile o Tapestry Single Cell Sequencing Platform for genotype and phenotype profile) o di trascrittomica;
2. selezionare cellule tumorali e approntare colture primarie da tumore solido senza bias dovuti alla compresenza di cellule sane o non desiderate, identificando, separando e recuperando fino a quattro popolazioni contemporaneamente;
3. valutare funzionalmente l'effetto della compresenza o del contatto tra cellule e cellule e tra cellule e vescicole extracellulari mediante esperimenti di co-cultura;
4. isolare di popolazioni tumorali rare, staminali, ibride mesenchimali-staminali, da materiale biotico solido o liquido (da liquid biopsy), da colture primarie;
5. selezionare e isolare vescicole extracellulari da tessuto normale e tumorale e investigarne le funzionalità e il ruolo biologico e clinico in diversi setting.

Il citometro sorter si rivela quindi una strumentazione di base, prima ed essenziale fase di lavoro per diversi approcci sperimentali, e molto utile a diverse applicazioni e progettualità completamente trasversali tra progetti e Unità/gruppi che compongono un laboratorio di ricerca.

Obiettivi

Il principale obiettivo del Progetto Flow Sorting è lo studio dell'eterogeneità fenotipica, genomica, trascrittomica e funzionale di neoplasie solide ed ematologiche finalizzato alla medicina personalizzata, mediante identificazione, selezione e recupero di popolazioni cellulari tumorali e vescicole extracellulari come marcatori prognostici e predittivi di risposta alle terapie.

Questo obiettivo generale si esplicita in diverse linee di ricerca di cui:

1. Valutazione di profili fenotipici, genetici e genomici senza bias di analisi;
2. Selezione e preparazione di cellule tumorali e di colture primarie da tumore solido senza bias di analisi;
3. Valutazione funzionale di co-cultura tra cellule e cellule e tra cellule e vescicole extracellulari;
4. Isolamento di popolazioni tumorali rare, staminali, ibride mesenchimali-staminali, da materiale biotico solido o liquido (liquid biopsy) e da colture primarie;
5. Selezione e isolamento vescicole extracellulari da tessuto normale e tumorale e studio delle loro funzionalità e ruolo biologico/clinico in diverse neoplasie.

Queste applicazioni sottolineano come tale strumentazione dovrebbe essere acquistata perché propedeutica all'ottimale e avanzato utilizzo di tecnologie già esistenti in IRST (NexTSeq, 10XGenomics, Nanostring). Infatti queste strumentazioni rendono possibile analisi di RNAseq, trascrittoma a singola cellula o profili di espressione predefiniti, rispettivamente, ma tutte queste applicazioni sarebbero ancora più rilevanti se eseguite su popolazioni cellulari mirate o per fare delle comparazioni accoppiate o multiple tra sotto popolazioni arricchite grazie a procedure di Flow Sorting. Identificare, separare e recuperare fino a quattro popolazioni di eventi contemporaneamente, mediante uno strumento ad elevata sensibilità e specificità, elevata risoluzione [almeno 0,2 microm (μm)], dotato di una configurazione base di almeno 2 laser ed eventualmente upgradabile, ad elevata velocità di acquisizione (fino ad almeno 40.000 eventi/sec) e un "rate" di sorting di almeno 10.000 eventi/sec (almeno 98% purezza e 80% resa), è la strumentazione necessaria alle sperimentazioni citate. Risulta indispensabile anche un modulo di gestione dell'aerosol o equivalente.

Attualmente il Laboratorio di Bioscienze è sprovvisto di un Cell Sorter di ultima generazione ed è quindi impossibilitato a eseguire rapidamente ed in modo efficiente diverse fasi di progettualità di diverse Unit. Un Flow Sorter di ultima generazione consentirebbe, faciliterebbe e velocizzerebbe diversi progetti.

Risultati attesi

Più specificamente il progetto Flow Sorting consentirà di:

- selezionare in purezza cellule trasdotte con vettori CAR (L2P2244.01)
- eseguire screening per l'identificazione di anticorpi contro antigeni specifici (L2P2244.01)
- isolare e selezionare cellule T che siano in grado di riconoscere peptidi specifici montati su HLA sotto forma di tetrameri fluorescenti (L2P2320)
- isolare e selezionare popolazioni cellulari che abbiano fenotipi definiti per successive analisi molecolari (Nk, Tscm, cellule quiescenti, cellule ad un determinato stadio del ciclo cellulare) (vari e L2P2244.01)

- isolare e selezionare popolazioni di vescicole extracellulari esprimenti specifici antigeni e trasportatrici di lncRNA (L3P1473)
- sorting di rare popolazioni immunologiche o subsets di cellule immuni direttamente da campioni ex vivo o da esperimenti in vitro (e.g. coculture, assay 3D)
- sorting di una o più popolazioni cellulari immunitarie e non (anche cellule tumorali) a seguito di esperimenti di co-culturing (2D) o da sistemi in vitro multicellulari 3D
- possibilità di sortare subsets immunitari di vario tipo per utilizzo in downstream analisi di proteomica, metabolomica, gene expression (NGS) o per il design mirato di assay funzionali tra sottopopolazioni di vario tipo.
- isolare e selezionare popolazioni di cellule tumorali circolanti con diverso fenotipo caratterizzante, come cellule epiteliali, mesenchimali, staminali o con caratteristiche simil-staminale (circulating cancer stem cells, C-CSC) e fenotipi ibridi (L3P1072, L3P957)
- identificare fattori predittivi nel cancro del pancreas avanzato mediante analisi delle vescicole extracellulari (L3P2412)
- Lo strumento sarà funzionale anche ai progetti identificati da codici L3P2056, L2P1274, L3P1377, L3P1596, L2P39, L2P1730, L3P2208, L3P1919.

In totale **15 progetti di ricerca, già in corso, sfrutterebbero la nuova piattaforma**, senza citare la possibilità di nuove progettualità o di eventuali service per esterni, potendo essere l'unico laboratorio in area vasta dotato di una tale strumentazione.

Orizzonte temporale e GANTT

Il progetto Flow Sorting non ha un orizzonte temporale definito in quanto, una volta acquisito, lo strumento sarà utilizzato in diversi progetti di ricerca (vd sez. Risultati attesi), ognuno con le sue relative tempistiche e GANTT chart. Si può comunque stimare che entro 6 mesi dall'acquisto, compatibilmente con le progettualità citate, lo strumento sarà a pieno regime.

Si rileva inoltre che lo strumento in questione andrebbe a sostituire un vecchio citometro obsoleto e ormai in pratica in disuso quasi totale a causa degli avanzamenti delle necessità scientifiche e tecnologiche attuali. Lo spazio adatto a questo nuovo strumento sarebbe quindi ricavato da quello dello strumento obsoleto.

Per questi motivi e quindi per eseguire, al massimo delle possibilità sperimentali, strumentali e di facilità di esecuzione delle procedure, l'identificazione e la raccolta di popolazioni di eventi mono-dispersi da un campione e separarli in base a caratteristiche specifiche, anche quattro popolazioni alla volta, si rende necessario l'acquisto di un sistema / strumento con almeno le seguenti caratteristiche qui riassunte:

- a. Tecnologia di sorting a 4 vie con nozzle da 100 micron;
- b. Sensibilità/performance minima: < 110 MESF per FITC e < 30 MESF per PE;
- c. Banco Ottico con dotazione iniziale di minimo 2 laser ad allineamento fisso, ad es., Blue (488 nm) e Red (640 nm) o Blue (488 nm) e Yellow (561), al fine di consentire la rilevazione contemporanea di almeno 5 parametri di fluorescenza (ad es., "3" parametri sul laser Blu e di "2" parametri di fluorescenza sul laser Red o "n" parametri su laser Blu e "m" parametri su laser Yellow, dove "n" e "m" dipenderanno dalla

- configurazione proposta), oltre ai 2 parametri fisici (FSC e SSC) per complessivi 7 parametri contemporanei minimi (5 parametri di fluorescenza + 2 parametri fisici);
- d. Ottica a riflessione con banchi ottici dedicati tali da consentire in maniera prioritaria la rilevazione dei fluorocromi con minore energia, favorendo una maggiore flessibilità nella costruzione dei pannelli multi-parametrici;
 - e. Risoluzione SSC fino a 0,2 μm ;
 - f. Elettronica completamente digitale.
 - g. Memorizzazione contemporanea di Area, Altezza ed Ampiezza per tutti i parametri di fluorescenza e di scatter con almeno 5 decadi;
 - h. Velocità di acquisizione fino ad almeno 40.000 eventi/sec;
 - i. Modulo di gestione dell'aerosol;
 - j. Rate di sorting: almeno 10.000 eventi/sec (almeno 98% purezza e 80% resa);
 - k. Supporto provette per tubi di input campione almeno 12x75 mm;
 - l. Possibilità di sorting anche su piastra da 6, 24, 96, 384, vetrino da microscopio o su supporto PCR.

Meldola, 22.07.2021

f.to Francesco Fabbri

Coordinatore Unità Nanobiomica & Nicchia Liquida

Laboratorio di Bioscienze

Mob. 3495363197 - Tel. +39 0543 739230 - Fax. +39 0543 739221

francesco.fabbri@irst.emr.it