

Laboratorio Sperimentale per la Medicina Preventiva e Personalizzata (MPP Lab)

Prof.ssa Stefania Mitola, Dott.ssa Arianna Bellucci

Suddivisione per area applicativa del Laboratorio Sperimentale per la Medicina Preventiva e Personalizzata (MPP Lab)

- 1) Laboratorio di Diagnostica Cellulare (laboratorio già avviato);
- 2) Piattaforma Zebrafish (laboratorio già avviato);
- 3) Laboratorio per l'analisi d'immagine "in vivo" sul piccolo animale (nuovo laboratorio).

Il budget previsto è stato studiato al fine di consentire di ampliare e rendere maggiormente competitivi i "deliverables" di due laboratori che sono realtà già presenti all'interno dell'Ateneo ossia il Laboratorio di Diagnostica Cellulare e la Piattaforma Zebrafish, e premetterà inoltre l'apertura di un nuovo Laboratorio per l'analisi d'immagine "in vivo" sul piccolo animale che potrà essere utilizzato per creare modelli sperimentali innovativi al fine di poter eseguire screening terapeutici personalizzati.

In particolare il laboratorio MPP consentirà di eseguire analisi diagnostiche, nonché target identification, validation e screening per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici da utilizzarsi a scopo profilattico, diagnostico o "disease modifying" sul singolo paziente. Questo permetterà di fornire come "deliverable" primario metodiche di analisi altamente competitive nel campo della medicina preventiva e personalizzata.

La presente proposta di rimodulazione del budget per il laboratorio MPP si rende necessaria al fine di riuscire a coprire interamente le spese relative a:

1) l'acquisto del microscopio a due fotoni e dell'attrezzatura necessaria al fine di poter utilizzare lo strumento per gli screening "in vivo" su nuovi modelli sperimentali nel nuovo laboratorio di Analisi d'Immagine "in vivo" sul piccolo animale;

2) la ristrutturazione dei locali preesistenti per la disposizione della strumentazione da acquisire per i tre laboratori.

Si noti che pertanto si propone di rinunciare all'acquisizione di quella strumentazione che, nonostante fosse stata inclusa nel progetto, è risultata riscontrare una minore esigenza di utilizzo quale: NanoDetector e Laser Capture Microdissector.

Totale Budget Lab MPP: 2.000.000 Euro

1) Acquisto di attrezzature e strumentazioni 1.650.000 euro

Da suddividere come segue:

- a) **Laboratorio per l'Analisi d'immagine "in vivo" sul piccolo animale:** Microscopio a due Fotoni (incluso tavolo antivibrante e comprensivo di modulo confocale, detector GaASP, modulo di super-risoluzione) + armadi animali + stereomicroscopio + piccola attrezzatura e adattatori per le procedure sperimentali + contratti di assistenza e riparazione per 5 anni: *euro 1.120.000* da finanziare interamente;
- b) **Laboratorio di diagnostica cellulare:** Cell Sorter + corso di formazione + contratto di assistenza e manutenzione: *euro 280.000*, da finanziare interamente;
- c) **Piattaforma di Zebrafish:** Strumentazione per permettere di raddoppiare in termini di possibilità applicativa gli studi comportamentali e l'analisi dell'immagine: *euro 250.000*, da finanziare interamente.

2) Adeguamento locali 250000 Euro

Spese per adeguamento logistico per l'ampliamento del laboratorio di diagnostica cellulare e Piattaforme di Zebrafish ed all'Istituzione strutturale del Laboratorio di Analisi d'Immagine "in vivo" sul piccolo animale al fine di poter effettuare l'installazione della strumentazione scientifica e fornire lo spazio necessario al personale da impiegare per il progetto.

- a) *Laboratorio per l'Analisi d'immagine "in vivo" sul piccolo animale: 150000 Euro*
- b) *Laboratorio di Diagnostica Cellulare: 30000 Euro*
- c) *Piattaforma Zebrafish 70.000 Euro*

3) Personale 100000 Euro

2 assegni di ricerca biennali: *Euro 50.000 cadauno*. Si prevede di dedicare un Assegnista al laboratorio di Analisi d'Immagine "in vivo" sul piccolo animale e uno alla Piattaforma Zebrafish.

Obiettivi

La piattaforma integrata di imaging per la Medicina personalizzata si prefigge di:

a) sviluppare tecnologie avanzate per identificare i meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi delle più diffuse malattie autoimmuni, cardiovascolari, neurologiche e psichiatriche e nello sviluppo dei tumori utilizzando modelli sperimentali;

b) utilizzare le nuove conoscenze per identificare:

i) biomarcatori per la diagnosi precoce della malattia e per il monitoraggio terapeutico che possano indirizzare verso l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici per lo sviluppo di nuove

strategie farmacologiche;

ii) nuovi polimorfismi metabolici che modificano la risposta e la tossicità ai farmaci e agli alimenti (metabolismo farmaci, tossine etc);

iii) fattori di rischio per lo sviluppo di malattie croniche;

c) trasferire queste nuove conoscenze alla pratica clinica con il fine di promuovere il benessere del cittadino.

L'accento sulla creazione di una nuova piattaforma tecnologica d'avanguardia è dovuto alla consapevolezza che il raggiungimento di uno standard tecnologico adeguato alla competitività europea rappresenta da un lato, il supporto innovativo essenziale per un'attività di ricerca al passo con i tempi e, dall'altro, lo strumento didattico per la creazione di figure professionali altamente specializzate da impiegare sul territorio. Siamo consapevoli infatti che l'obiettivo del progetto non possa prescindere da una ricerca di eccellenza quale presupposto di una didattica moderna e di una formazione avanzata e di impatto sulla realtà clinica e del territorio. Nello specifico, si propone l'acquisizione di una piattaforma di imaging per visualizzare molecole, strutture intracellulari, cellule, tessuti e interi organismi che possa diventare un polo di attrazione e collaborazione per l'intera macroarea di medicina di questa Università e per tutte le realtà geografiche limitrofe dedite alla ricerca biomedica. Tale piattaforma è indispensabile per sostenere gli aspetti di eccellenza già presenti nella realtà locale e per raggiungere gli standard della competitività europea anche in previsione del futuro programma Horizon 2020. La piattaforma si fonda sull'integrazione di tecnologie che permettono un differente livello di dettaglio di visualizzazione in un intervallo compreso tra l'animale da esperimento in strutture cellulari in vivo e in vitro, fino a strutture subcellulari in vitro.

1. Imaging in vivo per la visualizzazione di tumori sperimentali e di metastasi e la visualizzazione di eventi biologici tramite sonde fluorescenti (quali ad esempio proliferazione cellulare, angiogenesi, ipossia, infiammazione). Questo approccio necessita l'utilizzo combinato di uno strumento che permetta l'analisi tridimensionale di cellule/organi fluorescenti (IVIS-Lumina) abbinato ad un sistema di fotoacustica ad alta risoluzione (MSOT) (già presente).

2. Microscopio confocale per l'analisi della fluorescenza e la ricostruzione tridimensionale di cellule e strutture subcellulari in vitro (già presente).

3. Microscopio a due fotoni per l'analisi della fluorescenza in vivo di sistemi cellulari e tissutali, quali piccoli organi e piccoli organismi animali.

4. Preventiva e Laser capture microdissection per la selezione e l'isolamento da un tessuto (preparato bioptico) di singole cellule, per una loro successiva analisi mediante le piattaforme di genomica e/o proteomica in fase di attuazione.

5. EnSpire Detector e Nano Detector, il primo per la valutazione della fluorescenza, assorbanza, luminescenza dotato di tecnica alpha e time-resolved fluorescence da utilizzare con cellule in vitro. Il secondo per lo studio di exosomi e vescicole citoplasmatiche rilasciate da cellule tumorali, neuronali e del sistema immunitario.

6. Cell-sorter, per la separazione fisica di popolazioni cellulari in sterilità che permetta la successiva caratterizzazione di popolazioni cellulari rare umane o murine.

ELENCO STRUMENTI DA ACQUISIRE E SPECIFICHE

3. Microscopio a due fotoni per l'analisi della fluorescenza in vivo di sistemi cellulari e tessutali, quali piccoli organi e piccoli organismi animali.

a. **Configurazione necessaria al fine di poter avere una piattaforma dinamica per effettuare imaging "in vivo":**

Microscopio dritto + microscopio rovesciato con base confocale equipaggiata con 3 laser (405, 488, 543) e laser 2 fotoni indirizzabile alternativamente via splitter su una delle due piattaforme ottiche. 3 Detector per acquisizione in canale blu/violetto, rosso e verde. Testa "resonant" per le immagini in live. La necessità di avere 2 piattaforme ottiche (1 dritto ed 1 rovesciato) è relazionata al fatto che l'imaging "in vivo" su cervello necessita di un microscopio dritto, mentre per effettuare imaging "in vivo" su organi interni o linfonodi è preferibile l'utilizzo di un microscopio rovesciato. In caso non fosse possibile on il budget disponibile acquisire entrambe le piattaforme ottiche è preferenziale comunque l'acquisto di una configurazione con microscopio dritto.

Costo indicativo: da 500000 Euro con solo microscopio dritto a 1 milione di Euro con dritto + rovesciato con detector GaAsP e modulo per super risoluzione.

Tutte le ditte consultate consigliano l'acquisto del laser direttamente da Coherent. Questo consentirebbe di acquistare il laser ad un prezzo + basso ed avere garanzia direttamente dalla ditta produttrice. Ogni configurazione specifica di microscopio a 2 fotoni dalle varie ditte è relazionata pertanto a specifiche tecniche uniche in merito alla richiesta del laser compatibile con ogni determinato sistema a due fotoni.

b. **Strumentazione possibilmente acquisibile:**

1. **Microscopio Ziss LSM 880**

Base confocale dritto + rovesciato con laser splitter come da configurazione sopra specificata. Possibilità di montare detector GaAsP e/o PMT standard. Abbinabile ad un modulo per effettuare super-risoluzione Airyscan. La ditta fornisce anche il tavolo antivibrante.

La ditta ha offerto, nel caso dell'acquisto, di sostituire gratuitamente il nostro confocale con una macchina di ultima generazione con modulo Airyscan.

Per il laser è consigliato acquisto diretto da Coherent

Il microscopio è stato visionato in Zeiss a Monaco dal Prof. Silvano Sozzani e dalla Dott.ssa Stefania Mitola che sono stati invitati alla demo dell'Airyscan superresolution module.

2. **Microscopio NIKON Eclipse Ti**

Base confocale diritto + rovesciato con laser splitter come da configurazione sopra specificata. Abbinabile a modulo di super-risoluzione STORM (E' la tecnica più potente di super-risoluzione ossia 10 volte maggiore rispetto a STED e Airyscan ma richiede tecniche molto particolari di preparazione del campione che ne limitano notevolmente l'effettiva utilità di utilizzo). La ditta fornisce anche il tavolo antivibrante.

Il microscopio diritto è stato visualizzato in funzione dalla Dott.ssa Stefania Mitola e dalla Dott.ssa Arianna Bellucci all'Istituto San Raffaele.

3. Microscopio Leica TCS SP8

Base confocale diritto + rovesciato con laser splitter come da configurazione sopra specificata . Possibilità di montare detector GaAsP di seconda generazione e/o PMT standard. Consente di effettuare analisi quantitative di FLIM (Fluorescent Lifetime Imaging) ed è abbinabile ad un modulo di super-risoluzione STED. La ditta fornisce anche il tavolo antivibrante.

Per il laser è consigliato acquisto diretto da Coherent

Demo in fase di organizzazione con data prevista a Settembre

4. Microscopio Olympus 1000 MPE oppure 1200 MPE

Base confocale diritto + rovesciato con laser splitter come da configurazione sopra specificata. Il modello 1000 MPE è modulabile con richieste specifiche e non ha testa resonant. Il modello 1200 MPE non è modulabile ma offre il vantaggio di effettuare time-lapse con velocità di acquisizione di 400frame/sec con testa resonant. La ditta fornisce anche il tavolo antivibrante.

Per il laser è consigliato acquisto diretto da Coherent

Demo in fase di organizzazione con data prevista a Settembre ma con la difficoltà relativa al fatto che la ditta non ha microscopi installati in laboratori dove lavorano biologi.

Si allega la documentazione ricevuta ad oggi dalle varie ditte fornitrici

c. Possibili locali utilizzabili per la strumentazione e interventi da eseguire:

Eseguendo un sopralluogo con il Dott. Antonio Fusco dell' Ufficio Progettazione di ateneo e Gestione Edifici si sono individuati come possibilmente utilizzabili i locali situati al piano -1, 0 e 1 del Corpo A del Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale:

E necessario poter usufruire di 2 locali adiacenti + un ufficio in stretta prossimità.

Locale 1: stanza ampia per microscopio a 2 fotoni in cui posizionare la stazione di lavoro su tavolo antivibrante (dimensioni circa 2m x 3m, peso 450 kg). Dotazione di sistema di climatizzazione

specialistico per emissione di aria in maniera diffusa (per non compromettere l' allineamento del laser) e pareti oscurate.

Locale 2: stanza da suddividere in a. piccolo box per posizionamento del sistema di raffreddamento del blocco laser con pareti in carton-gesso e accesso via porta dalla stanza del microscopio e b. camera preparatoria per la chirurgia (punto di stabulazione esterno) con un armadio di stabulazione per topi/ratti, un tavolo per chirurgia, un armadio per la deposizione del materiale per chirurgia, 1 armadio per il materiale di stabulazione animali, 1 lavandino.

Locale 3: ufficio per il personale addetto all'utilizzo ed alla supervisione del microscopio

NB: Data la complessità dei lavori di ristrutturazione necessari e la particolarità degli interventi richiesti, si richiede gentilmente se sia possibile, al fine di poter gestire al meglio l'impiantistica da eseguire, prevedere un sopralluogo del personale dell'Ufficio Tecnico UniBS presso una struttura in cui siagà posizionato ed operativo un microscopio a 2 fotoni.

Le varie ditte fornitrici dello strumento, si sono rese disponibili a fornire una guida operativa.

4. Laser capture microdissection per la selezione e l'isolamento da un tessuto (preparato biottico) di singole cellule, per una loro successiva analisi mediante le piattaforme di genomica e/o proteomica in fase di attuazione.

Gli strumenti consentono l'isolamento di porzioni di tessuto sia da preparati istologici su vetrino che su membrana. Prezzo indicativo 150000 + IVA.

Sistemi possibilmente acquisibili:

Leica LMD

Nikon

Zeiss LCM Palm

MMI (Olympus)

Tutte le ditte si sono dimostrate disponibili a fornire demo e specifiche tecniche da settembre

5. EnSpire Detector e Nano Detector, il primo per la valutazione della fluorescenza, assorbanza, luminescenza dotato di tecnica alpha e time-resolved fluorescence da utilizzare con cellule in vitro. Il secondo per lo studio di esosomi e vescicole citoplasmatiche rilasciate da cellule tumorali, neuronali e del sistema immunitario.

EnSpire detector: e' possibile acquistare upgrade di EnSight per Alpha-technology ad un costo di 11000 Euro oppure una macchina in offerta per effettuare solo Alpha-tech al costo di 15300 Euro.

Si allegano le specifiche applicative della tecnologia Alpha e le due offerte della ditta PerkinElmer

NanoDetector: Macchina NanosightNS300 per la conta e la caratterizzazione delle nanoparticelle. Prezzo base 47580 Euro oppure con aggiunta del modulo laser (ottimale per la caratterizzazione delle molecole e la conta) 84408 Euro.

Si allegano le specifiche tecniche ed applicative ed il preventivo della ditta Malvern distribuita da ALFA TEST

6. Cell sorter

La **citofluorimetria** offre un metodo incredibilmente flessibile per la caratterizzazione di cellule in sospensione e permette di analizzare simultaneamente parametri fisici (di light scatter) e caratteristiche di fluorescenza di molte migliaia di cellule ogni minuto. Ciò permette di ottenere e caratterizzare una popolazione per la sua espressione di determinanti specifici, raccogliendo informazioni quantitative e qualitative. Questa tecnologia è applicabile per la separazione fisica di cellule o particelle **cell sorter**.

Strumentazione visionata:

Cell sorter S3 BioRad:

Strumento da banco di piccole dimensioni (70x65x65 cm) con possibilità di inserirlo in una cappa biohazard per la maggior sicurezza dell'operatore. La cappa non assicura la sterilità del campione. Lo strumento di base viene proposto ad un solo laser 488 quindi possibilità di due fluorescenze in contemporanea (2 detector PMT per FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy 5.5, PE-Cy 7, PE-Cy5, PE-Texas, Alexa 488 , IP) o in combinazione con 561 (PE, PE-Texas red, mCherry, IP, PE-Cy5, PE-Cy5.5, PE-Cy7) portando la possibilità a 4 marcature (2 detector PMT per PE ..) o 640 (2 detector PMT APC, APC-Cy7, APC-H7, Alexa 647, Alexa 700). La macchina permetterà quindi di separare cellule utilizzando fino a 4 parametri di fluorescenza più due fisici.

Possiede due vie di separazione permettendo di procedere in contemporanea in modalità "arricchimento" e "purezza". Diversi collettori (falcon, piastre..)

Un solo nozzle di 100u .

Completamente automatizzato il calcolo del drop delay e del drop break . Non necessità di allineamento laser.

Prezzo 160000 Euro

BD FACSAria™ Illu 3 Laser 7 Blue/3 Red/3 Violet con ACDU

Strumento da banco (71 x 71 x 122 cm),

Lo strumento è già corredato da tre laser : 488 con 7 possibili fluorescenze (FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy 5.5, PE-Cy 7, PE-Cy5, PE-Texas, Alexa 488) ; 633 con 3 detector (APC, APC-Cy7, APC-H7, Alexa 647, Alexa 700); 405 con 3 detector (DAPI, BD Horizon™ V450, Pacific Blue, BD™ Horizon V500, AmCyan,).

Lo strumento può essere addizionato di ulteriori tre laser (375; 445, 561) portando la possibilità di analisi a 18 parametri di fluorescenza + 2 fisici in contemporanea.

La radiazione luminosa dei laser è trasportata ai prismi di focalizzazione tramite fibre ottiche. Pertanto il loro allineamento è fisso, sollevando l'operatore da questa incombenza.

Per la salvaguardia dell'operatore la camera di sorting è sigillata e sottoposta a pressione negativa per il contenimento dell'aerosol che si sviluppa durante il processo di separazione.

Lo strumento possiede 4 differenti nozzle intercambiabili (70 , 85, 100 e 130µ)

Sistema di calcolo del "drop delay" di sorting basato su laser telecamera e microsfere con aggiustamento automatico durante la separazione.

Possibilità di raccolta in differenti contenitori (falcon , piastre) con 4 differenti modalità .

Costo 200000 Euro offerta per uno strumento DEMO come descritto nell'offerta, o fronte di uno strumento nuovo a soli 2 laser con costo 300000Euro.

The MACSQUANT Tyto:

Lo strumento è in fase di sviluppo ma sarà presto disponibile sul mercato.

Il suo punto di forza sarà l'utilizzo di una tecnologia microchip per la separazione cellulare, questo permetterà di avere una valvola ad altissima velocità di apertura. Non utilizza un nozzle per la separazione.

La camera fluidica sarà costituita da una unità usa e getta completamente chiusa che assicurerà la sterilità del campione e diminuirà la gestione e la pulizia del sistema a flusso dello strumento stesso.

Lo strumento è corredato da 3 laser (405, 488, 638 nm) permettendo l'analisi contemporanea di 10 parametri in fluorescenza e due fisici.

Ha solo 2 vie di sorting : eventi positivi (sortati) ed eventi negativi (di scarto)

Prezzo 300000 Euro.

Si allega tutta la documentazione .

COLLOCAZIONE STRUMENTAZIONE.

La proposta sarà quella di collocare il cell sorter in un laboratorio provvisto di una cappa biologica e possibilmente di un citofluorimetro.

Lab Prof Sozzani

Lab Prof. Parolini