

# Sistema stabile di coltura in vitro di cellule precursori granulari cerebellari (GCP), metodo stabile per la coltura in vitro di dette cellule e usi di detto sistema o metodo per la coltura in vitro.

## KEYWORDS

- COLTURA STABILE
- PRECURSORI DI GRANULI (GCP)
- CERVELLETTO
- CULTURA NEURONALE IN 3D
- NEUROSFERE
- VIA DI SHh
- MEDULLOBLASTOMA

## AREA

- CHIMICA E BIOTECNOLOGIE

## CONTATTI

- TELEFONI  
+39.06.49910888  
+39.06.49910855
- EMAIL  
u\_brevetti@uniroma1.it

## Priorità

n. 102019000004377 del 26.03.2019.

## Tipologia Deposito

Brevetto per invenzione.

## Co-Titolarità

Sapienza Università di Roma 80%, Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia 20%.

## Inventori

Giuseppe Giannini, Valeria Colicchia, Carlo Capalbo, Francesca Fabretti, Stefano Di Giulio, Francesca Belardinilli, Marialaura Petroni, Maria Sahùn Roncero.

## Settore industriale & commerciale di riferimento

Industrie che producono modelli cellulari in vitro.

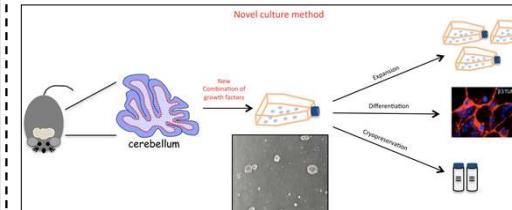
## Stato di sviluppo

TRL 4 = validazione tecnologica in ambiente di laboratori.

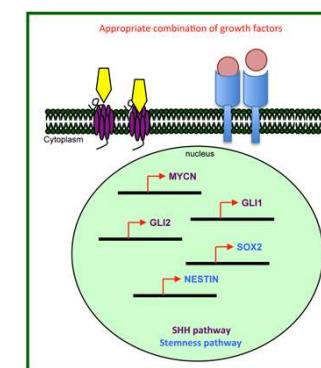
## Disponibile

Cessione, Licenza, Ricerca, Sviluppo, Sperimentazione, Collaborazione, e avviamento impresa.

SISTEMI	PRO	CONTRO
Coltura transiente di granuli cerebellari primari	Sistema fisiologico	Breve emivita in vitro, materiale limitato
Linee cellulari di medulloblastoma	Nessuna limitazione temporale	No sistema fisiologico
Linee cellulari ingegnerizzate con costrutti esprimenti componenti della via di Shh	Nessuna limitazione temporale. Studi biochimici e molecolari	No contesto neuronale: Fibroblasti
Colture di neurosfere da espianti cerebellari (bFGF)	Nessuna limitazione nel tempo	bFGF in coltura → Inibizione pathway di Shh
Colture di neurosfere da espianti cerebellari (SAG)	Sistema fisiologico	Circa 2 settimane di emivita
Colture di neurosfere da espianti cerebellari (nuova mix di fattori di crescita)	Sistema fisiologico e nessuna limitazione nel tempo.	



**Fig. 1** Schematizzazione del nostro nuovo metodo di coltura: GCP prelevati da cerebelletto di topo vengono coltivati in vitro sotto forma di neurosfera e in questa forma espansi, differenziati e crioconservati.



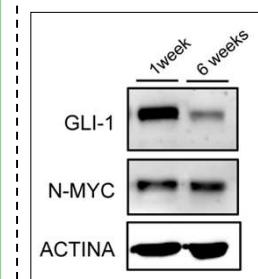
**Fig. 2** La nuova combinazione di fattori di crescita utilizzata per le nostre colture garantisce che i GCP esprimano in vitro marcatori della pathway di Sonic Hedgehog e di staminilità.

## Abstract

La presente invenzione si riferisce ad un sistema di coltura stabile in vitro di cellule precursori dei granuli cerebellari (GCP). Il suddetto sistema di coltura mantiene nei GCP un'elevata espressione della via di Sonic Hedgehog e un illimitato potere proliferativo garantito dagli alti livelli delle proteine staminali Sox2 e Nestin. Per tali motivi il sopra citato sistema di coltura può rappresentare un valido modello in vitro per lo studio della fisiopatologia dei granuli cerebellari, per lo studio di malattie cerebellari conseguenti a danno o a neurodegenerazione, e potenzialmente per il loro trattamento mediante approcci di terapia genica.

## Pubblicazioni

SMO-M2 mutation does not support cell-autonomous Hedgehog activity in cerebellar granule cell precursors. M. Petroni and M. Sahùn Roncero, et al. Scientific reports. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56057-y>



**Fig. 3** GCP mantenuti secondo il nostro sistema di coltura mantengono l'espressione della pathway di Sonic Hedgehog nel tempo. Gli1 e N-Myc sono marcatori della suddetta pathway e l'actina è utilizzata come normalizzatore del caricamento.



# Sistema stabile di coltura in vitro di cellule precursori granulari cerebellari (GCP), metodo stabile per la coltura in vitro di dette cellule e usi di detto sistema o metodo per la coltura in vitro.

## Descrizione Tecnica

Dopo resezione chirurgica da topo al 7° di giorno di vita postnatale, il cervelletto è triturato meccanicamente in un buffer contenente HBSS, Glucosio e antibiotici, e le singole cellule così ottenute piastrate in un terreno composto da DMEM-F12, Glucosio, B27 W/O VitA, insulina, NALC, eparina, antibiotici e fattori di crescita. In questo mezzo le cellule possono essere espanso e mantenute per un tempo illimitato, previa dissociazione periodica delle sfere e propagazione per diluizione (onde impedirne l'eccessiva crescita e la conseguente morte da mancanza di nutrienti e ipossia).

## Tecnologia & Vantaggi

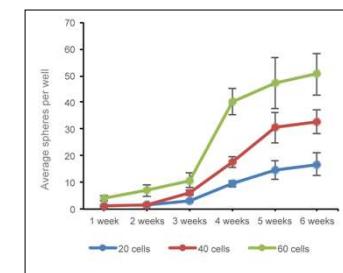
Il funzionamento del cervelletto è dipendente dalla espansione, dalla migrazione e dal differenziamento dei GCP tanto che difetti nelle vie molecolari che regolano questi processi sono responsabili di diverse condizioni patologiche (<https://medlineplus.gov/cerebellardisorders.html>) tra cui il medulloblastoma. La mancanza di appropriati modelli di studio in vitro che conservino a pieno le caratteristiche fisiologiche dei GCP e rimangano 'permissivi' allo studio delle principali vie che ne regolano i processi (i.g. la via di Shh), ha reso gli studi sull'argomento condotti fino ad oggi incompleti e opinabili. Infatti i GCP coltivati secondo i modelli di coltura noti o smettono rapidamente di proliferare, esponendo alla necessità di generare ogni volta colture ex-novo, oppure sono di origine tumorale e quindi non possono rappresentare correttamente la fisiologia dei GCP.

La presente invenzione descrive un nuovo protocollo che consente di ottenere colture di GCP in uno stato di proliferazione illimitata e con un profilo di espressione genica/biochimica paragonabile a quello delle colture fresche di GCP, anche dopo scongelamento.

## Applicazioni

1. Generazione di modelli in vitro per lo studio della fisiopatologia dei granuli cerebellari;
2. Valutazione degli effetti tossici di nuovi farmaci sui GCP 'normali' rispetto a quelli tumorali in vitro prima di avviare studi in vivo;
3. Implementazione dell'invenzione verso il suo uso nel trattamento di malattie cerebellari dovute a danno o a neurodegenerazione, mediante approcci di terapia genica. Colture di GCP preparate secondo il nostro metodo, potrebbero essere espanso in vitro e reimpiantate nell'organo (cervelletto). In linea di principio, GCP provenienti da individui malati potrebbero essere 'corretti in vitro' tramite gene transfer o gene editing del difetto genetico, espansi in vitro secondo il nostro metodo e conseguente re-impantati in sede.

Fig. 4 GCP mantenuti secondo il nostro sistema di coltura mantengono capacità clonogenica (marcatore di proliferazione e di salute delle cellule) nel tempo.



## CONTATTI

- TELEFONI  
+39.06.49910888  
+39.06.49910855
- EMAIL  
u\_brevetti@uniroma1.it

