

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

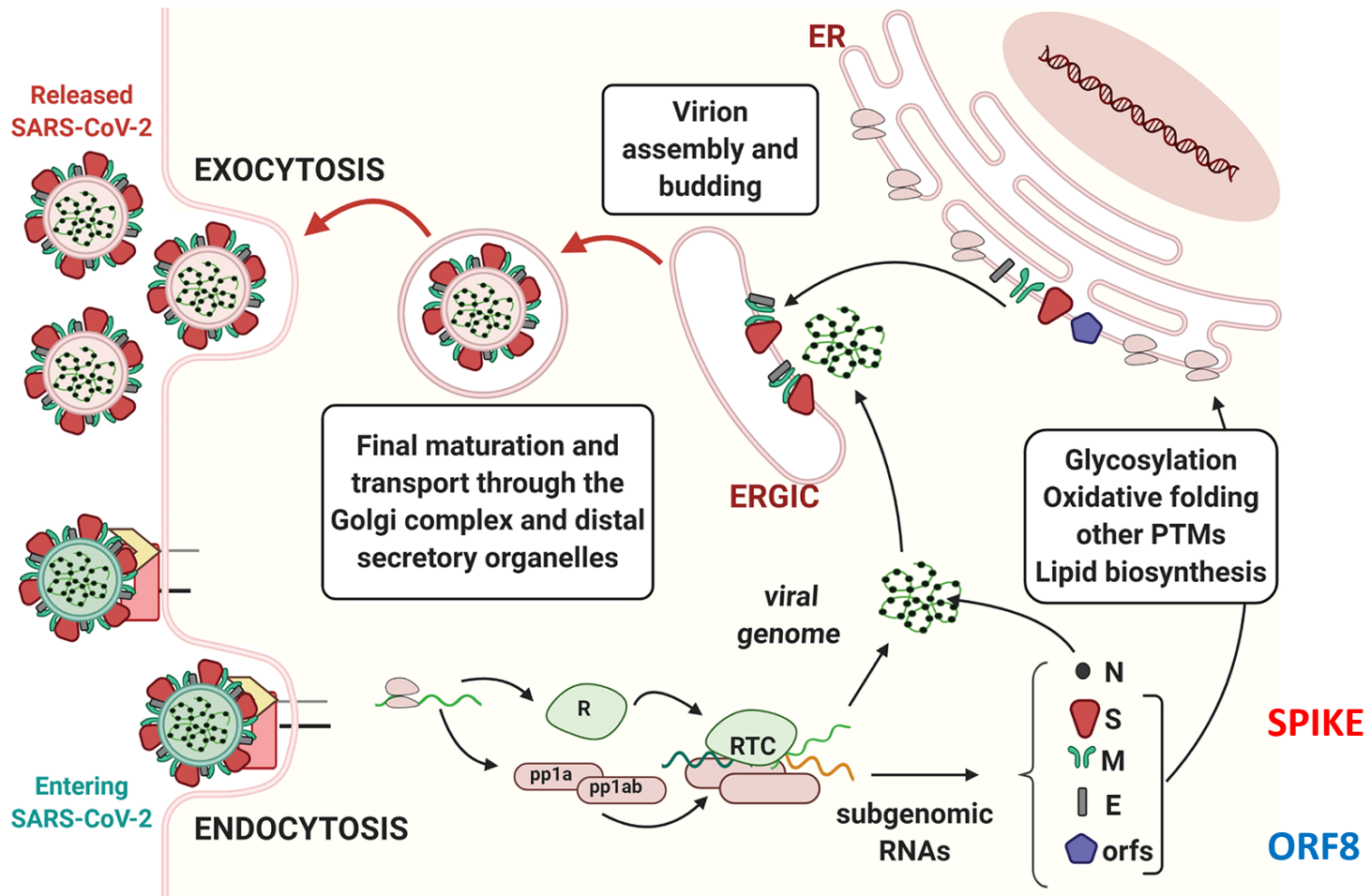
AA 2020-2021

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 5

Esperimento 1:

Sovraespressione transiente di proteine del virus SARS-CoV-2 allo scopo di visualizzarne la distribuzione agli organelli cellulari coinvolti nel ciclo vitale.



A SARS-CoV-2-Human Protein-Protein Interaction Map Reveals Drug Targets and Potential Drug-Repurposing

David E. Gordon^{1,2,3,4}, Gwendolyn M. Jang^{1,2,3,4}, Mehdi Bouhaddou^{1,2,3,4}, Jiwei Xu^{1,2,3,4}, Kirsten Obernier^{1,2,3,4},

Signal Transduction and Targeted Therapy

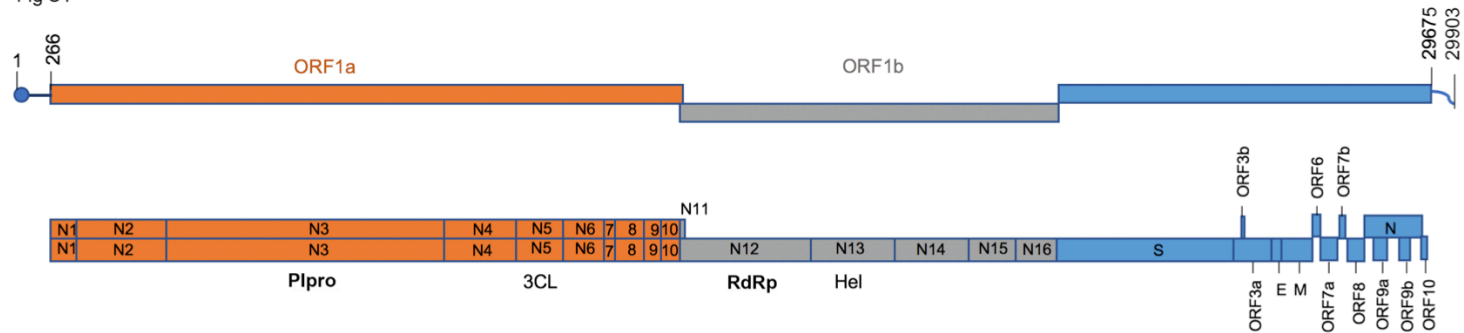
www.nature.com/sigtrans



LETTER OPEN

A systemic and molecular study of subcellular localization of SARS-CoV-2 proteins

Fig S1

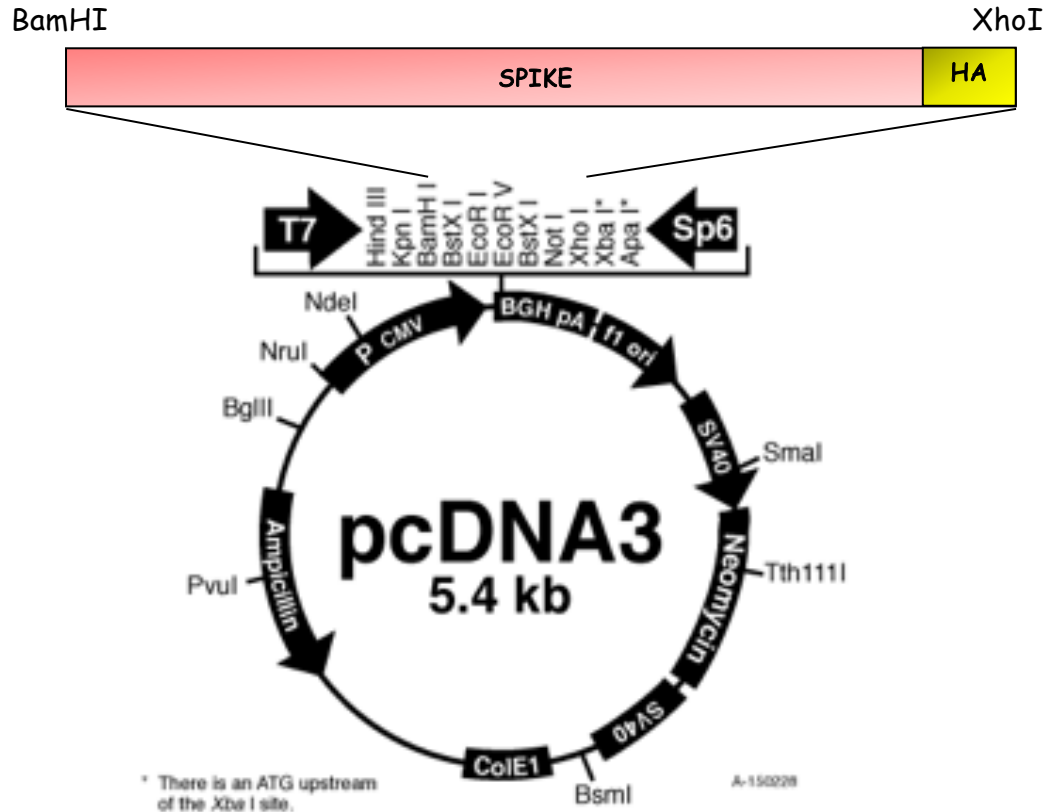


Abbreviations

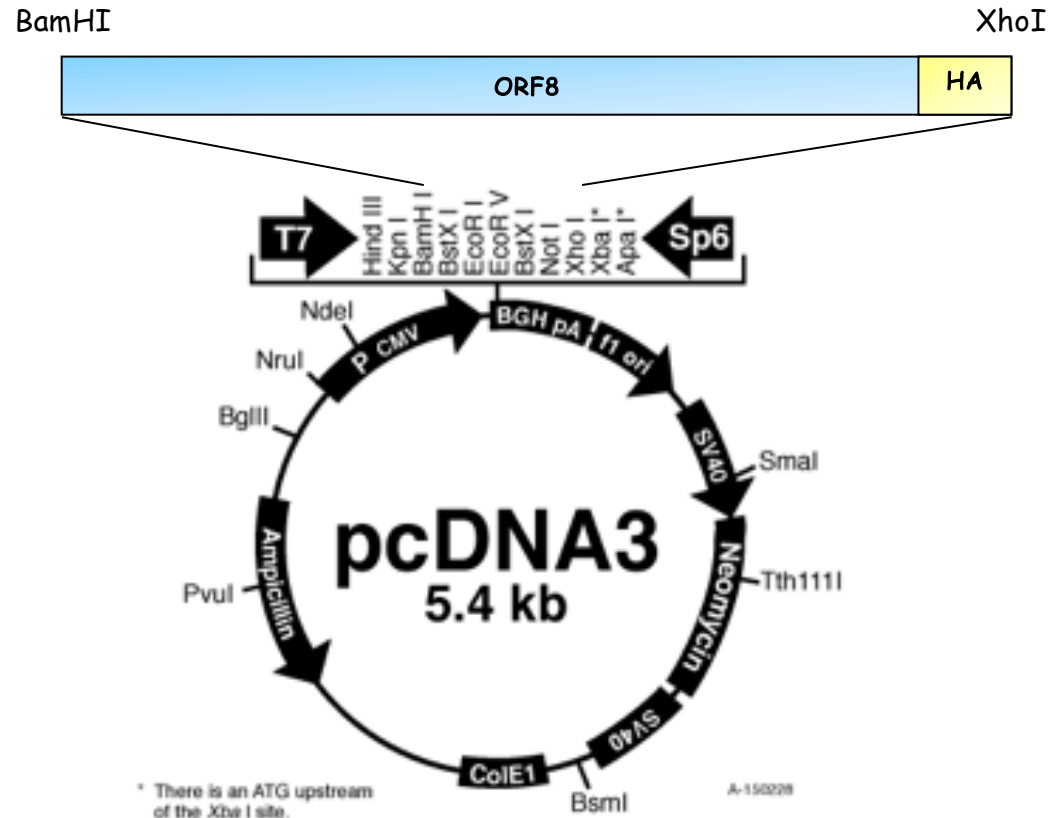
N: NSP, P1pro: Papain-like protease, 3CL: chymotrypsin-like protease, RdRp: RNA-dependent RNA polymerase, Hel: Helicase, S: spike, O: ORF, E: Envelop, M: membrane, N: nucleocapsid

Fig. S1. Diagram of SARS-CoV-2 genome and the names of viral genes. The genome of Wuhan-Hu-1 (NC_045512.2) has 29,903 nucleotides and encodes 12 putative open reading frames responsible for about 29 proteins. The first gene, NSP1 starts from 266, and the last gene, ORF10 ends at 29674. The nucleic acids from 1-265 is modified by methylation to form the RNA cap, and from 29675 to 29903 is the 3' UTR.

Step 1a: clonaggio del cDNA di Spike nel vettore di espressione pcDNA3 in fusione con il TAG HA



Step 1b: clonaggio del cDNA di ORF8 nel vettore di espressione pcDNA3 in fusione con il TAG HA



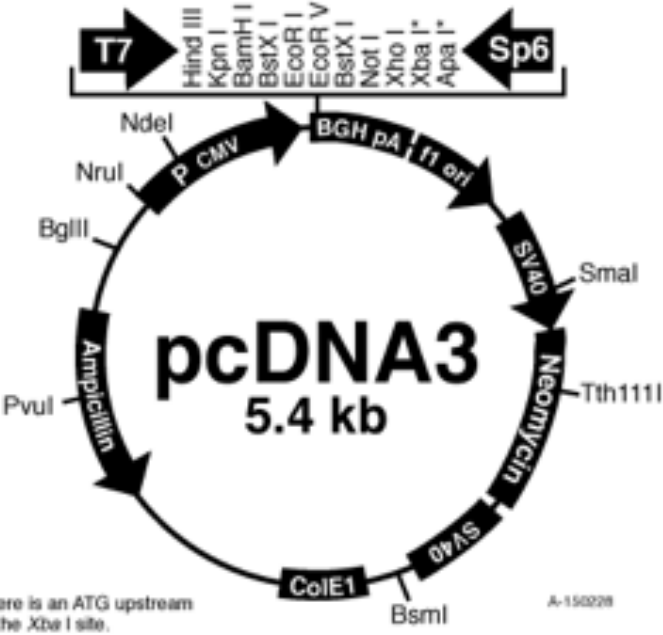
Step 2: mutagenesi del vettore di espressione di ORF8:

generazione dei vettori di espressione

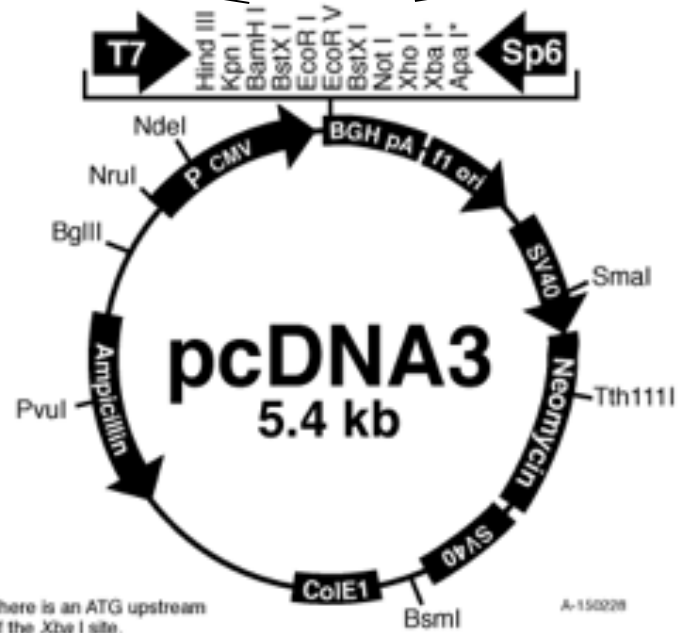
ORF8 Δ SS

ORF8 Δ SS-NLS

pcDNA3 ORF8 ΔSS-HA

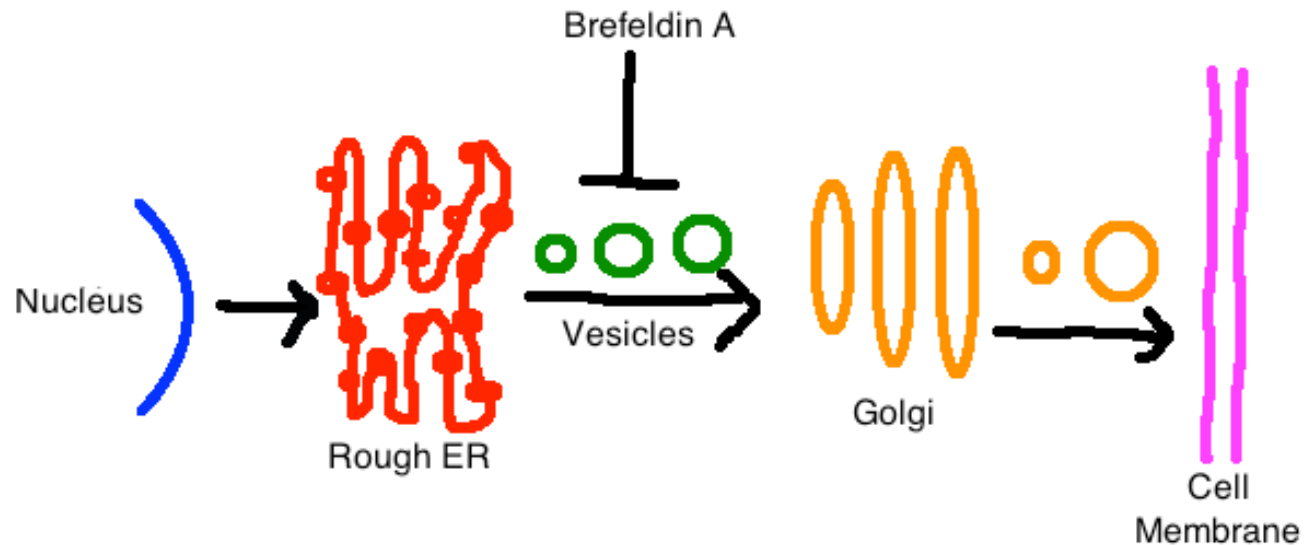


pcDNA3 NLS ORF8 ΔSS-HA



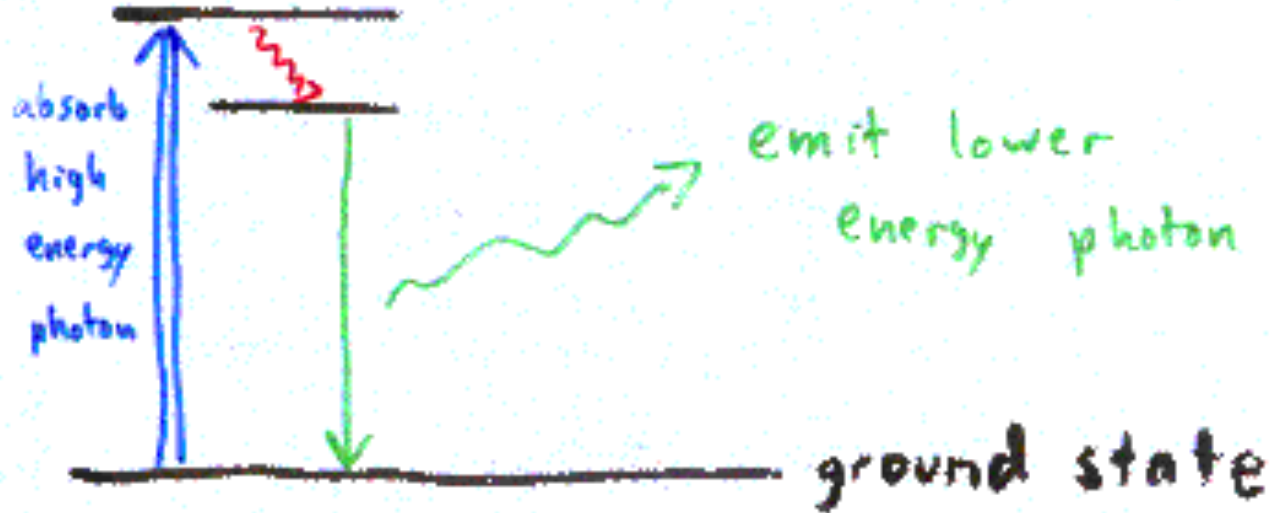
Step 3: trasfezione dei vettori di espressione in cellule U2OS mediante PEI

Step 4: trattamento del trasfettante SPIKE con inibitori del trasporto vescicolare ER-GOLGI (Brefeldin A)



MICROSCOPIA A FLUORESCENZA

FLUORESCENZA



Alcune molecole, dopo **assorbimento** di luce ad una data lunghezza d'onda
(λ eccitazione)

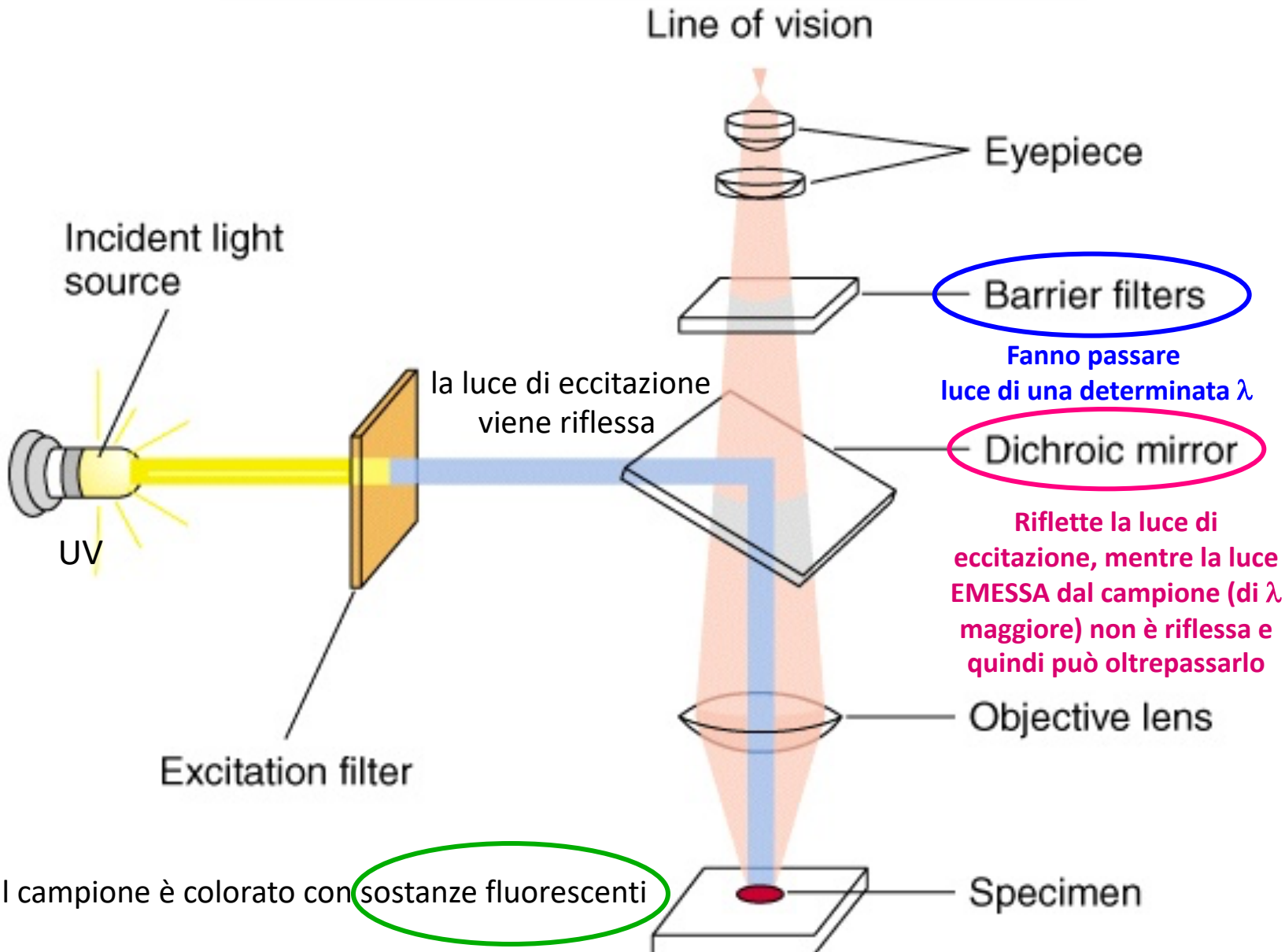
hanno la proprietà di **emettere** luce a lunghezza d'onda superiore
(λ emissione)

Tale proprietà è nota come **fluorescenza**.

MICROSCOPIO A EPIFLUORESCENZA

- permette di visualizzare **LUCE DI FLUORESCENZA emessa** dal campione
- la **luce incidente e' UV/visibile**: il potere di risoluzione è di 10 nm
- **l'ingrandimento** ottenibile e' **fino a 1000 x**
(normalmente 10X per l'oculare e fino a 100X per l'obiettivo)
- **Il campione dev'essere autofluorescente oppure colorato con sostanze fluorescenti**
(che assorbono luce ad una data lunghezza d'onda e la emettono ad una lunghezza d'onda maggiore)
- solo **la luce** di fluorescenza **EMESSA** dal campione è usata per **formare l'immagine**, mentre la luce di eccitazione è schermata da opportuni filtri

MICROSCOPIO A EPIFLUORESCENZA



Barrier filters

Fanno passare luce di una determinata λ

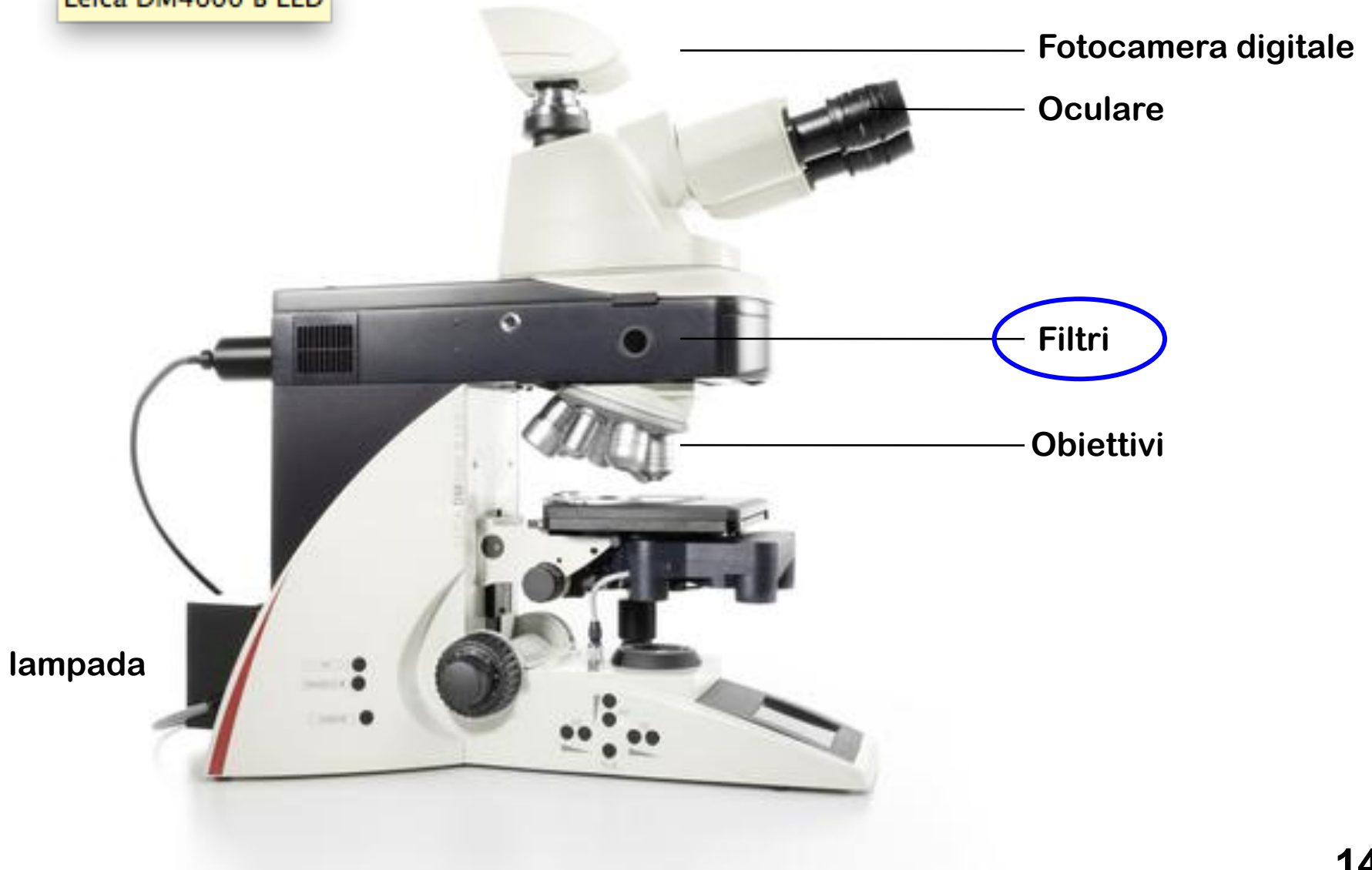
Dichroic mirror

Riflette la luce di eccitazione, mentre la luce EMESSA dal campione (di λ maggiore) non è riflessa e quindi può oltrepassarlo

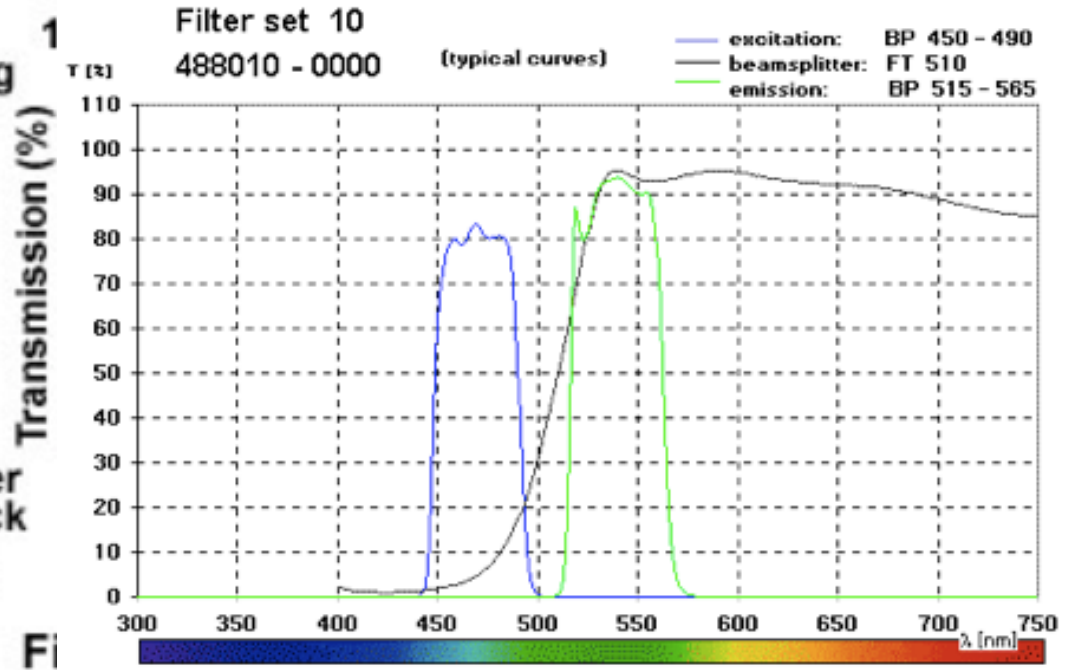
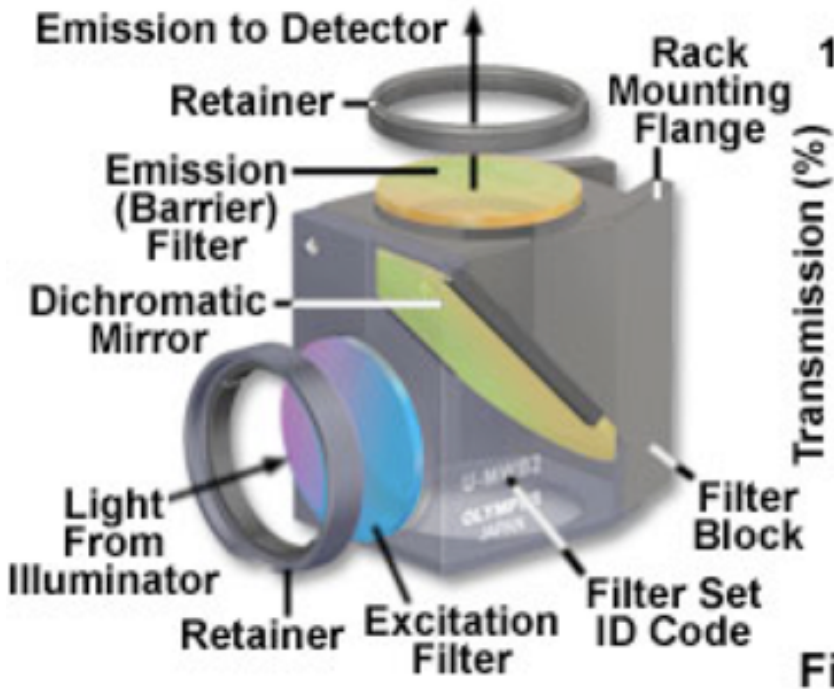
Il campione è colorato con sostanze fluorescenti

MICROSCOPIO A EPIFLUORESCENZA

Leica DM4000 B LED



Fluorescence Filter Cube (Block) and Associated Spectra



Combinazione A:

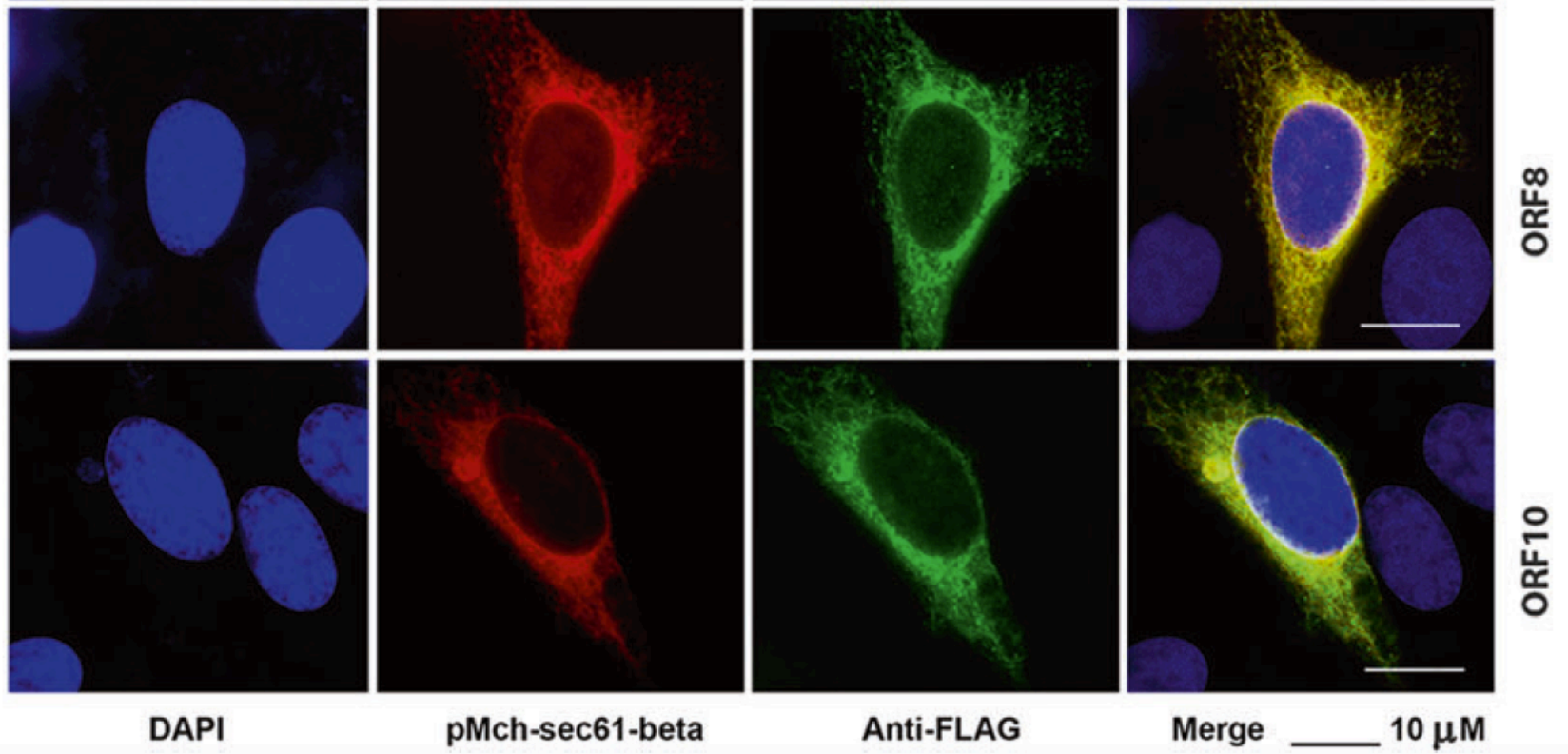
filtro d'eccitazione 340-380/ lamina dicromatica 400/ filtro di sbarramento 430

Combinazione I3:

filtro d'eccitazione 450-490/ lamina dicromatica 510 / filtro di sbarramento 515

Combinazione N2.1:

filtro d'eccitazione 515-560/ lamina dicromatica 580/ filtro di sbarramento 590

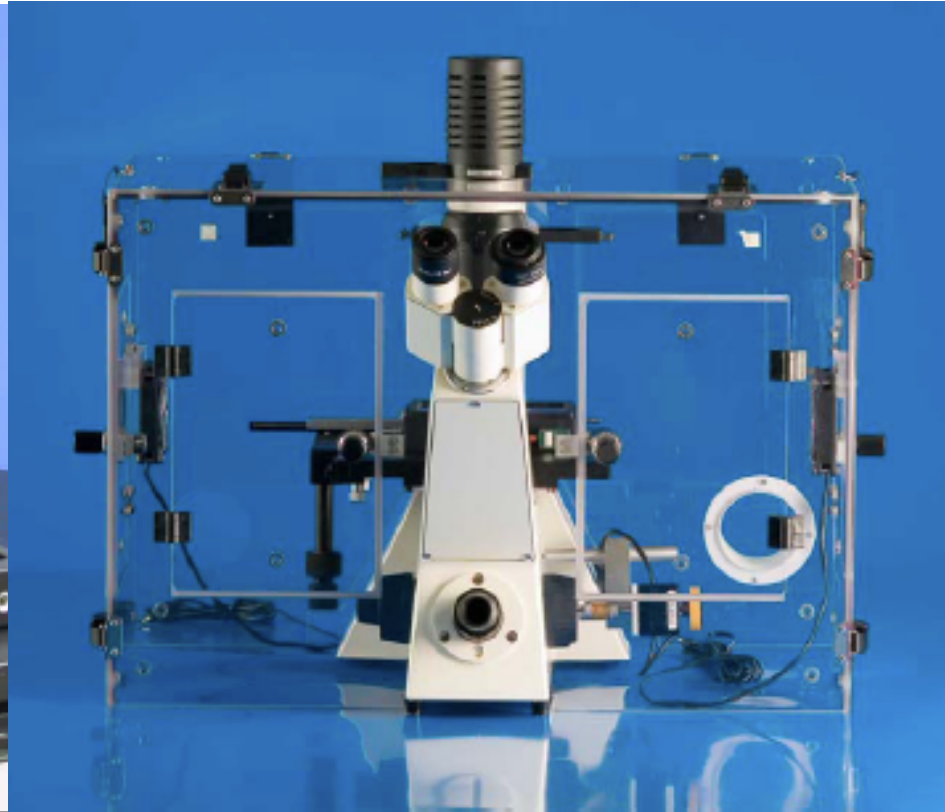
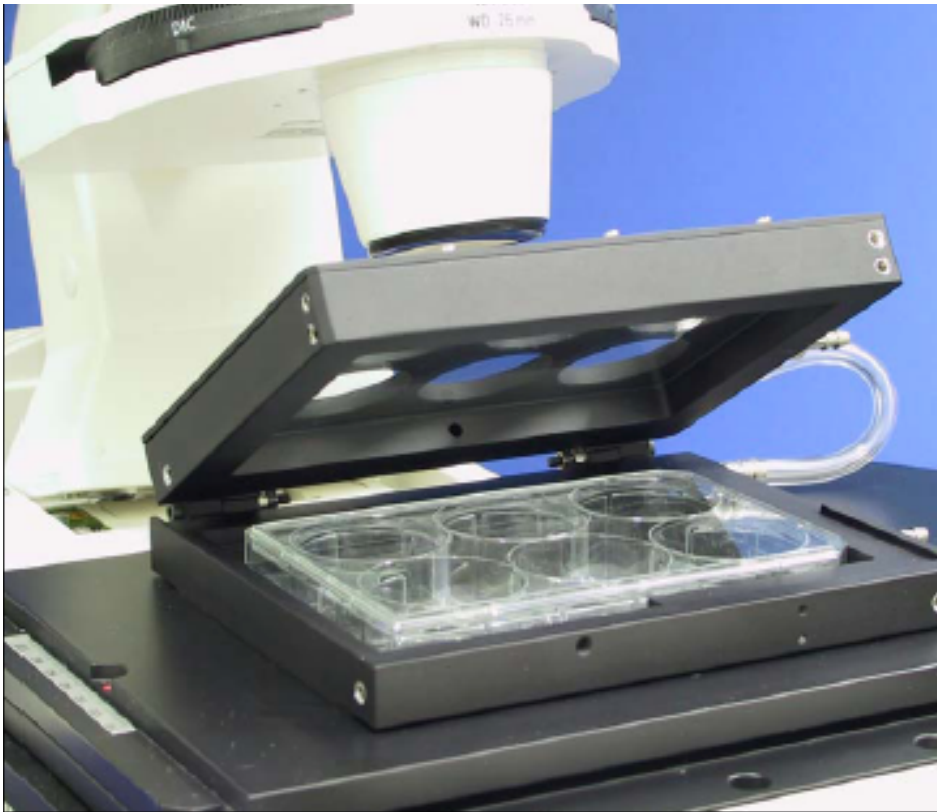


ER e ERGIC

LIVE CELL IMAGING: MICROSCOPIA TIME-LAPSE

STAGE

CAGE



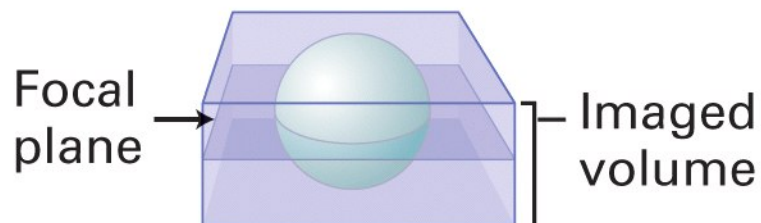
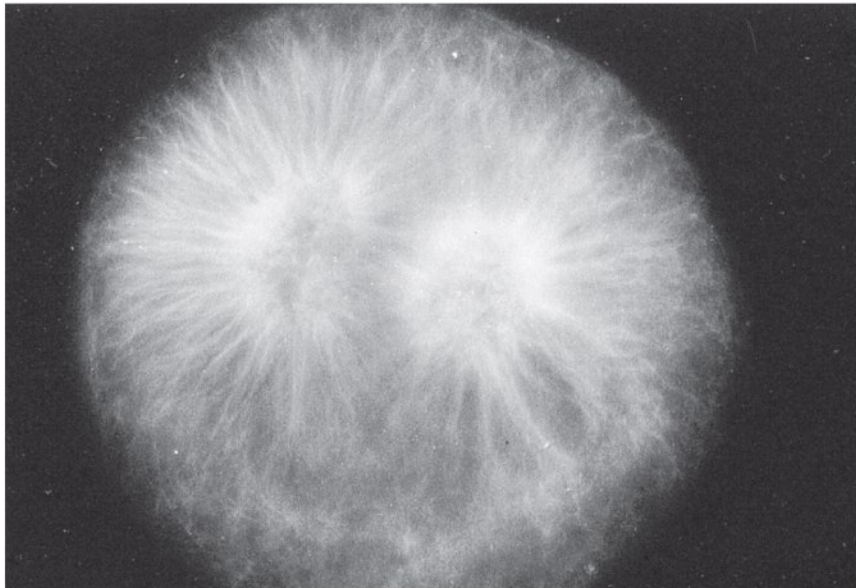
Link a video
LIVE CELL IMAGING microscopia ottica
cellule in adesione

<https://www.youtube.com/watch?v=dnXwm6-BBCQ>

MICROSCOPIA A FLUORESCENZA CONFOCALE

Con un normale microscopio a fluorescenza all'osservatore arriva la luce emessa dalle molecole che stanno nel **piano focale**, ma anche da quelle **sopra e sotto** il piano focale.

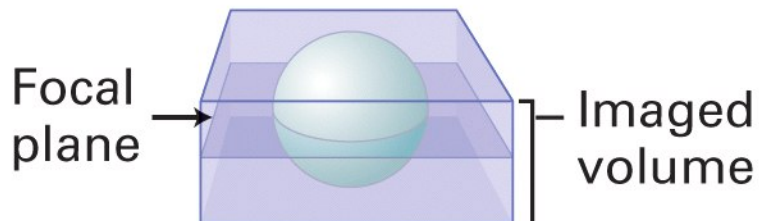
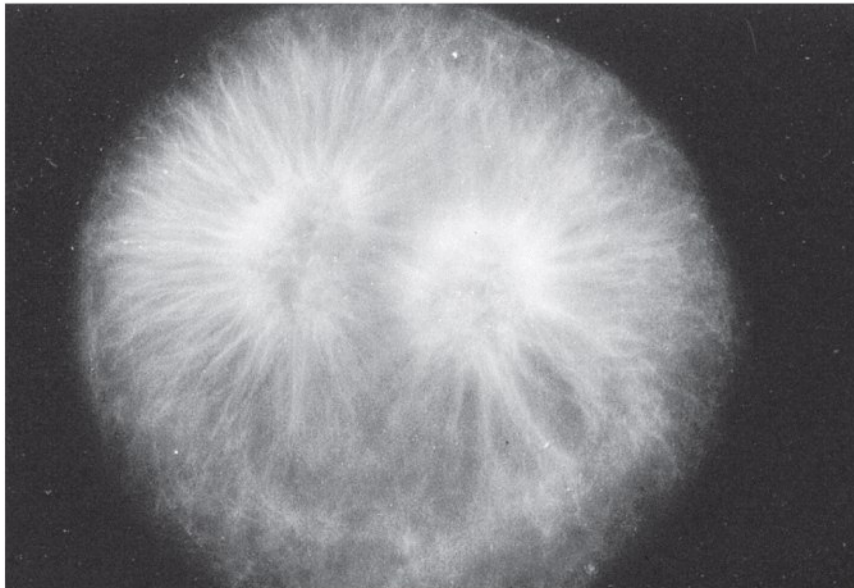
(a) Conventional fluorescence microscopy



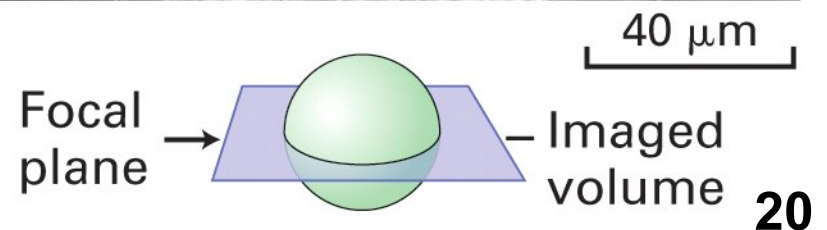
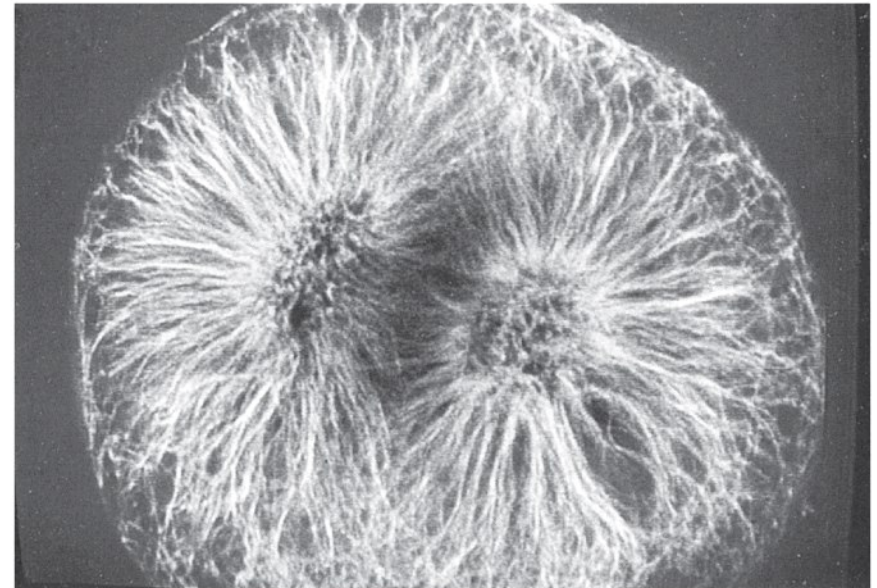
MICROSCOPIA A FLUORESCENZA CONFOCALE

Con un microscopio a fluorescenza confocale solo la luce EMESSA dal campione che **proviene dal PIANO FOCALE** viene utilizzata per formare l'immagine.

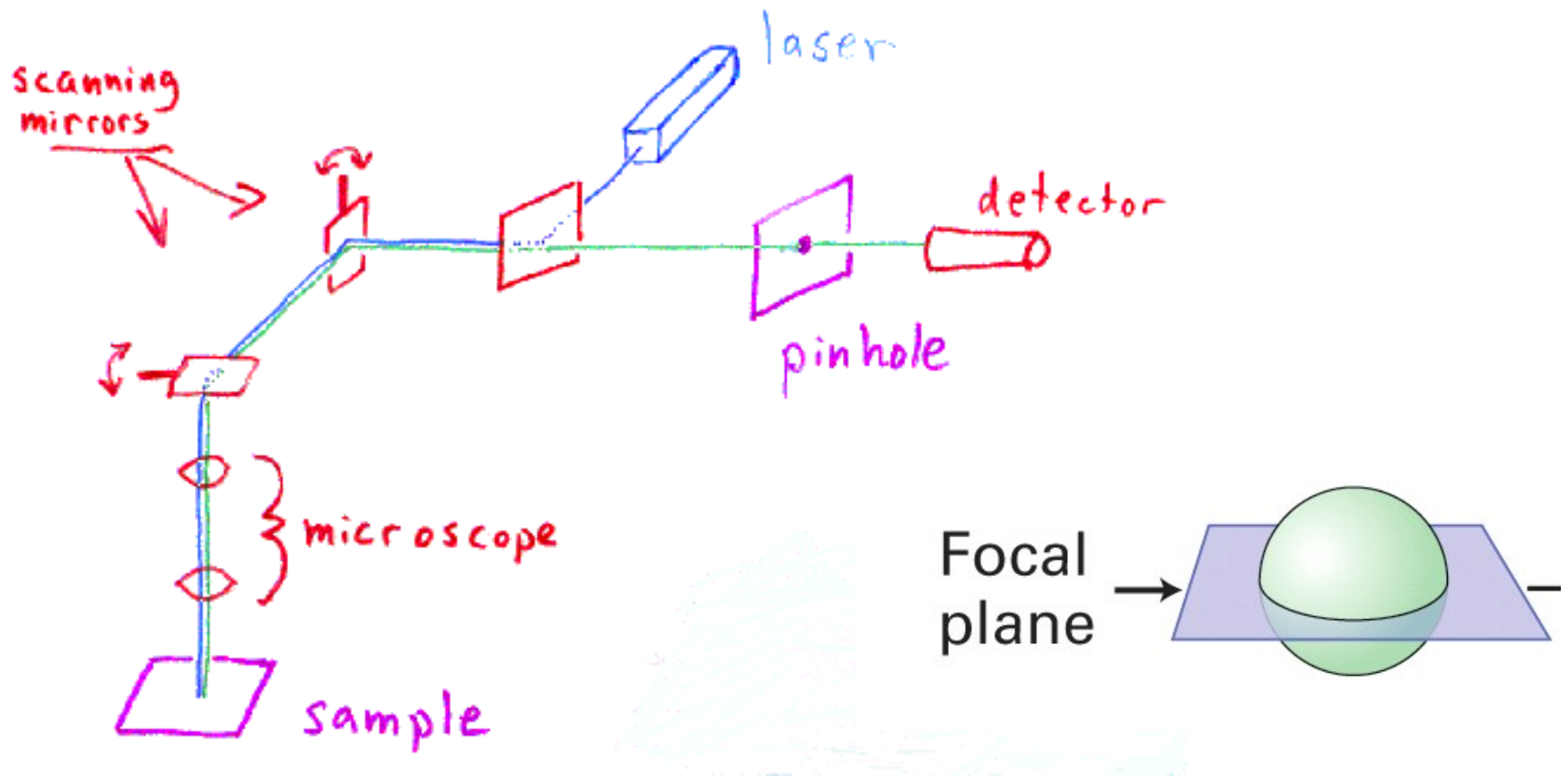
(a) Conventional fluorescence microscopy



(b) Confocal fluorescence microscopy



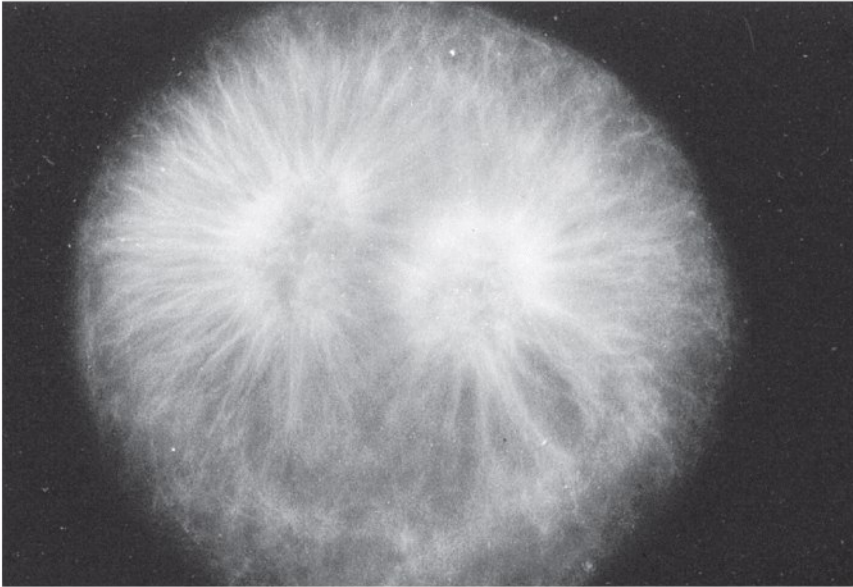
Nel **microscopio confocale** la luce **EMESSA** dal campione passa attraverso un **“pinhole”** che elimina la luce **“fuori fuoco”**, cioè che non proviene dal **PIANO FOCALE**.



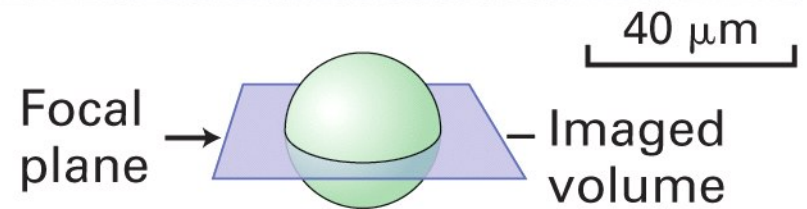
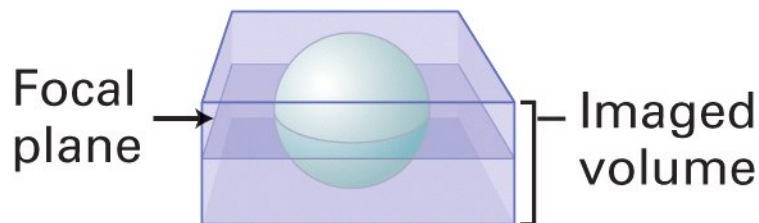
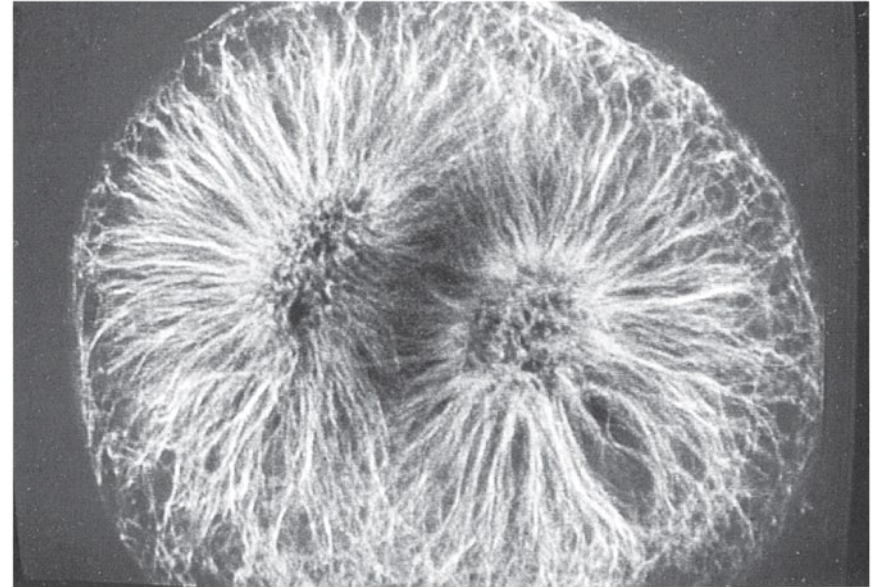
Microscopio confocale a scansione:

Le immagini emesse dopo eccitazione di diversi punti del campione sono immagazzinate ed elaborate al computer: l'immagine ottenuta è bidimensionale = sezione confocale di un oggetto tridimensionale ed è molto più definita.

(a) Conventional fluorescence microscopy

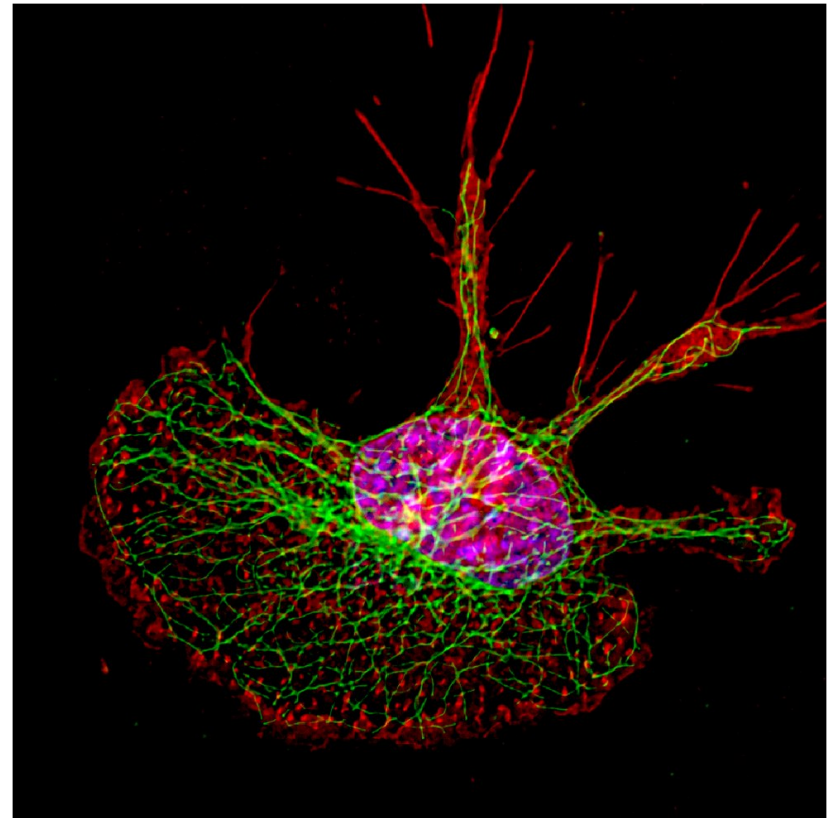
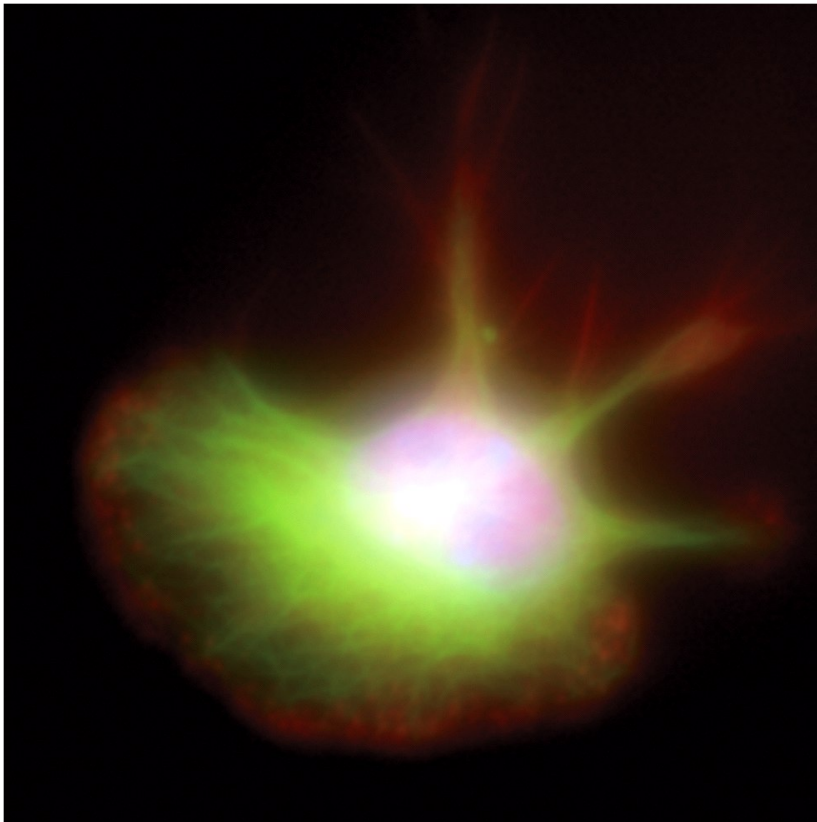


(b) Confocal fluorescence microscopy

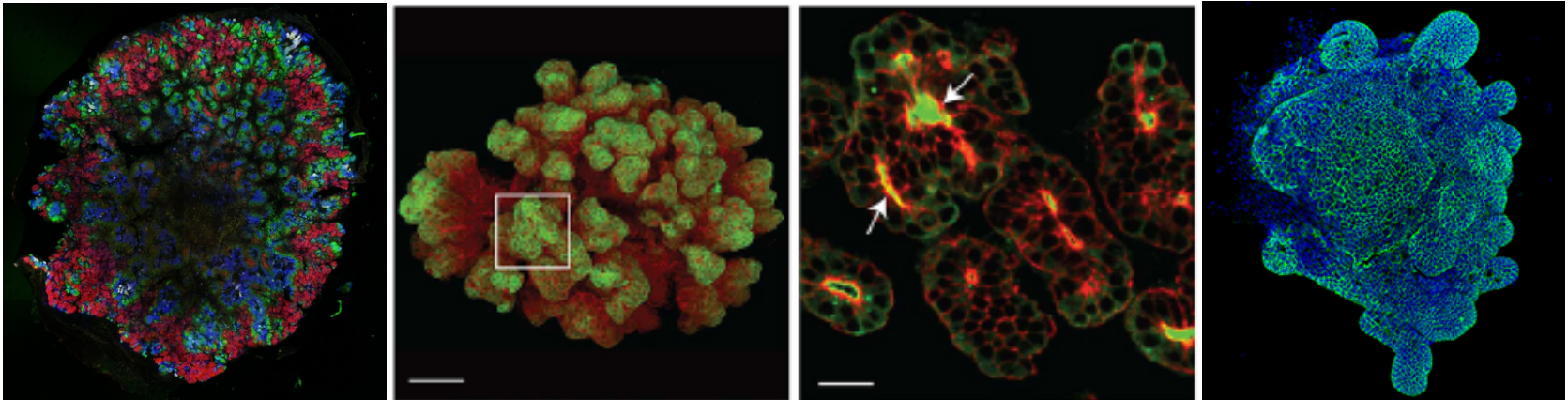


Microscopio a deconvoluzione:

L'obiettivo riceve la luce sia dal piano focale che da altri piani. Un computer ricostruisce l'immagine (2D o 3D) riassegnando alla luce il corretto piano focale mediante un algoritmo di deconvoluzione, che migliora il potere di risoluzione.

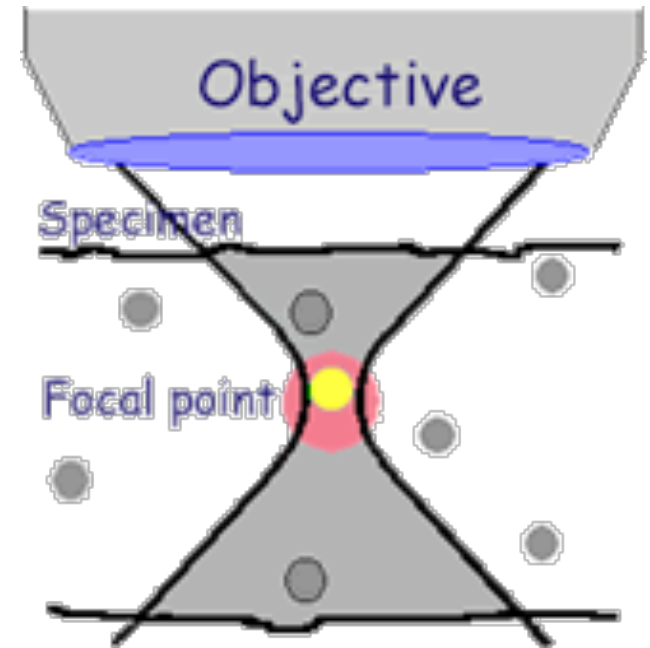
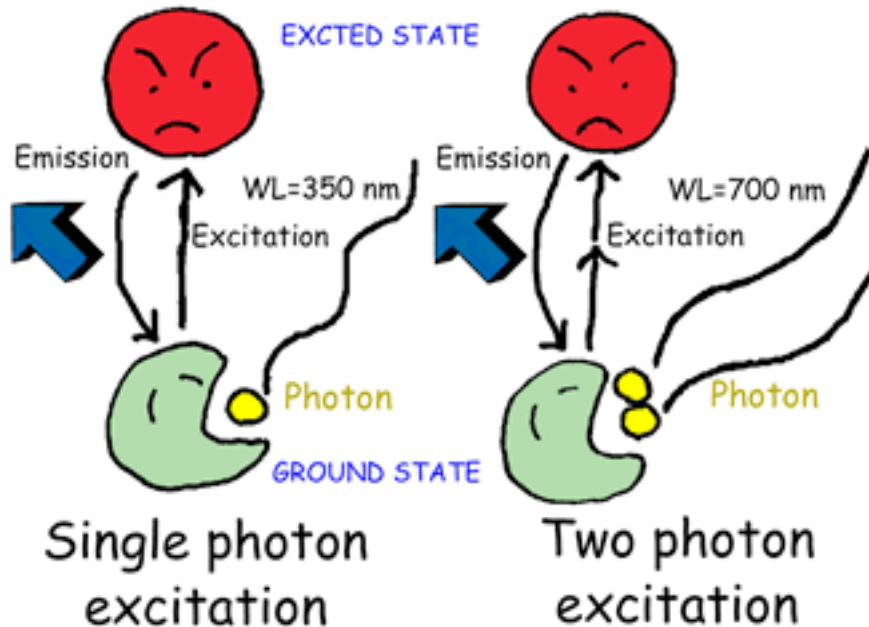


Ricostruzioni 3D mediante microscopia a deconvoluzione:



MICROSCOPIA A 2 FOTONI

2-photon excitation microscopy

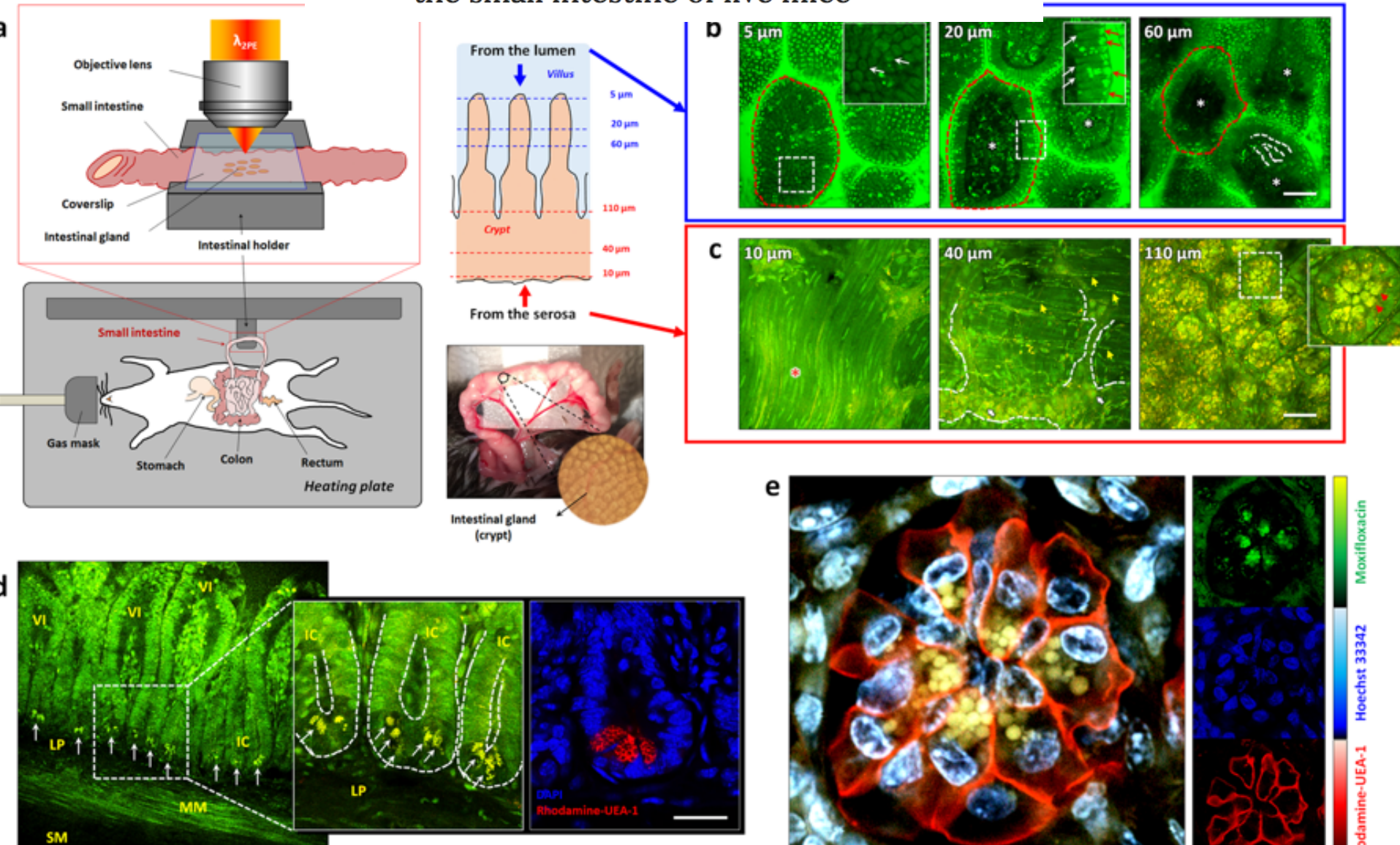


Eccitazione mediante assorbimento simultaneo di due fotoni nell'infrarosso (800-900 nm): più lunga della luce emessa!

La luce IR assicura un'elevata penetrabilità nei tessuti di organismi viventi e un limitato scattering!

Article | OPEN | Published: 21 September 2018

Two-photon microscopy of Paneth cells in the small intestine of live mice

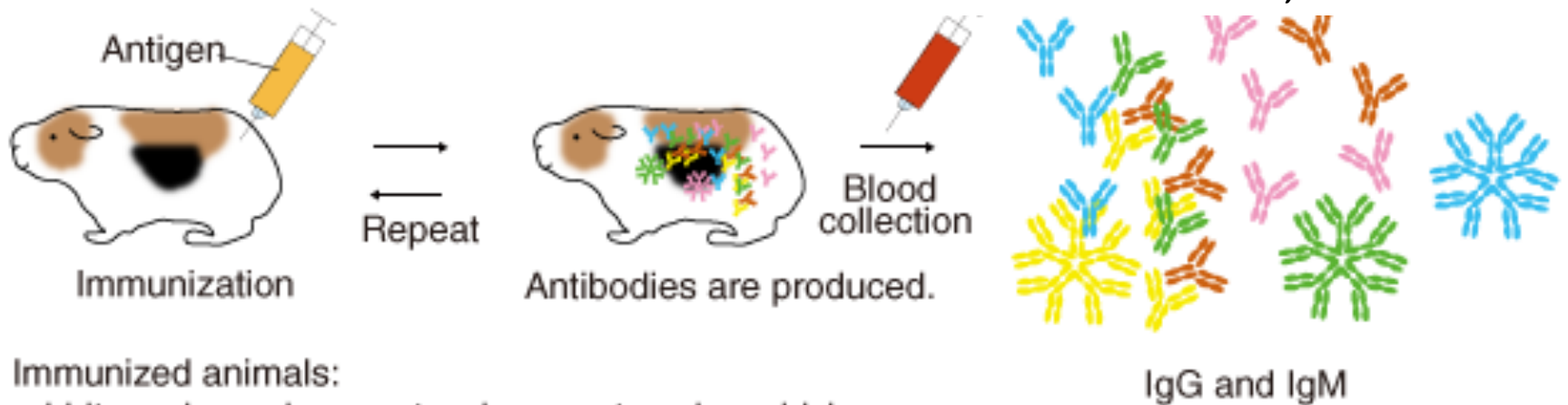


**Tecniche per la produzione
di anticorpi specifici**

OTTENIMENTO di ANTICORPI mediante IMMUNIZZAZIONE :

Mediante **IMMUNIZZAZIONE**
di animali da laboratorio
= iniezione dell' antigene

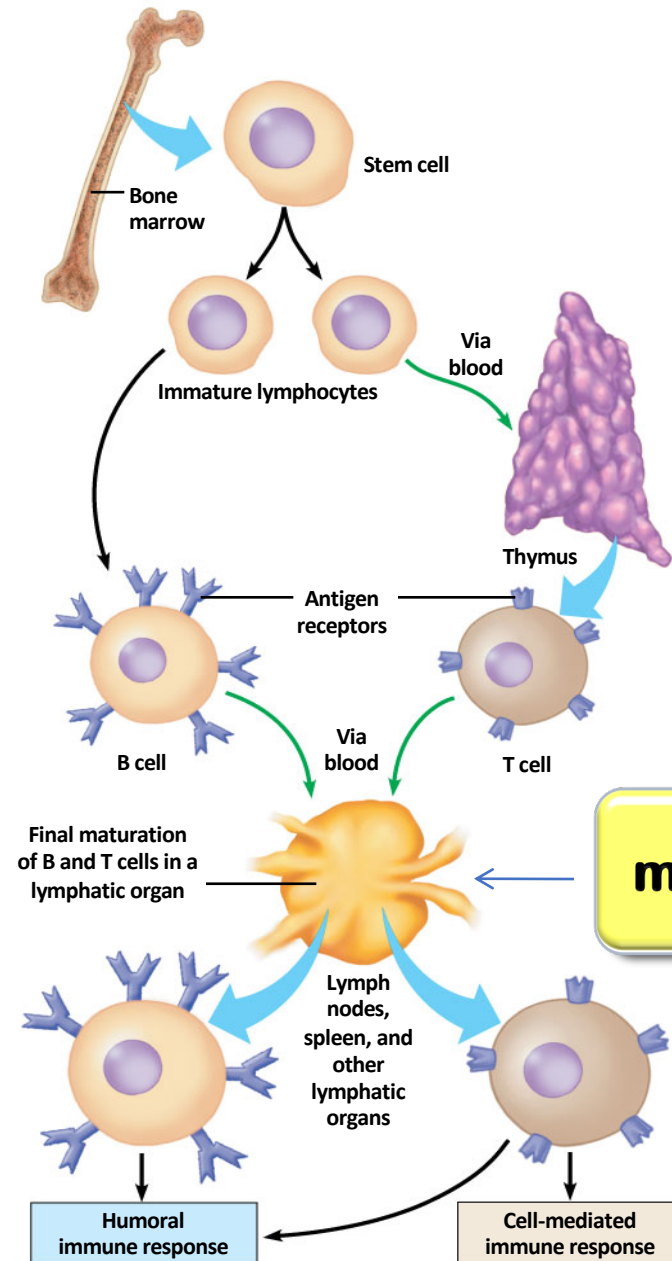
al termine del ciclo di
immunizzazione gli **anticorpi**
policlonali specifici contro l'antigene
sono presenti nel **SIERO** del sangue
dell' animale (prelevato senza
sacrificare l'animale)



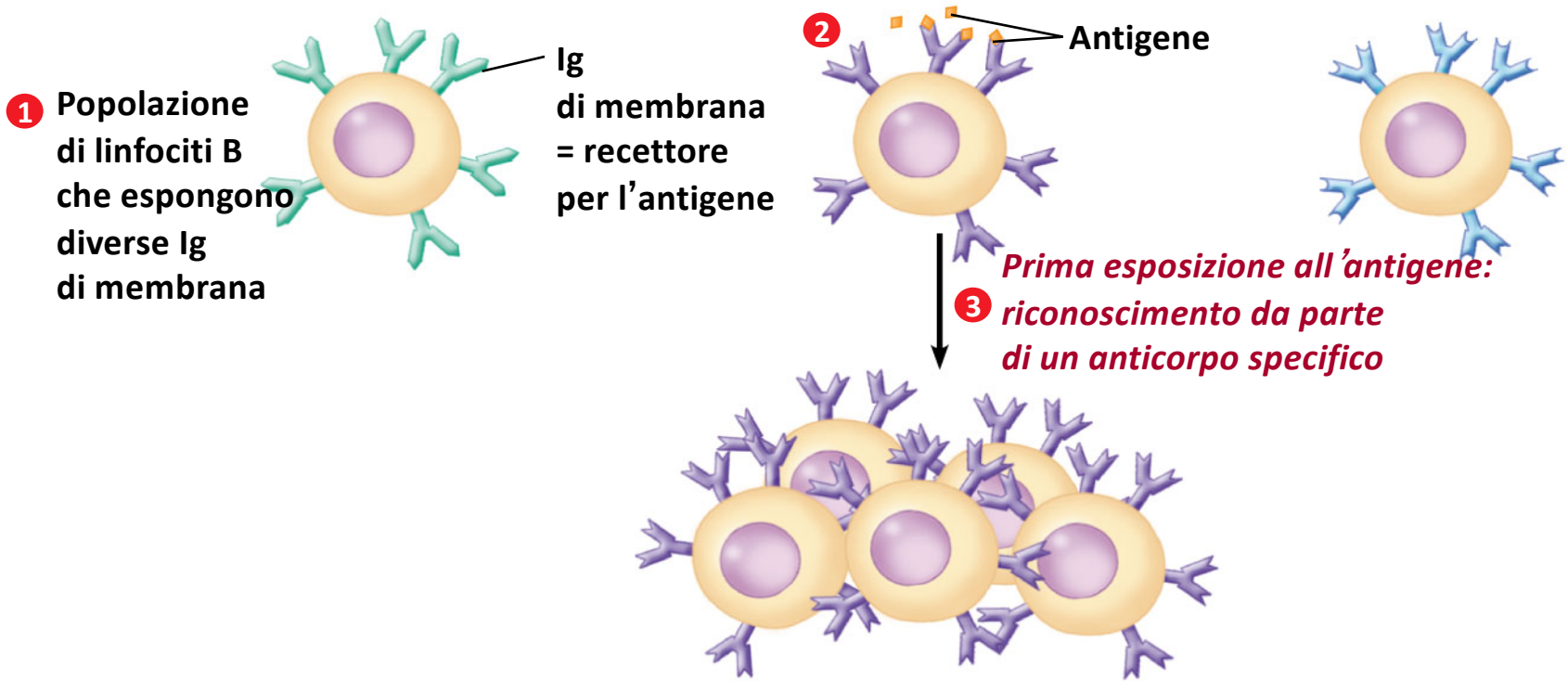
Immunized animals:
rabbits, guinea pigs, goats, sheep, rats, mice, chickens

SIERO IMMUNE o ANTISIERO

NB:
Ciascun
linfocita B
espone e
produce UNO
specifico
anticorpo

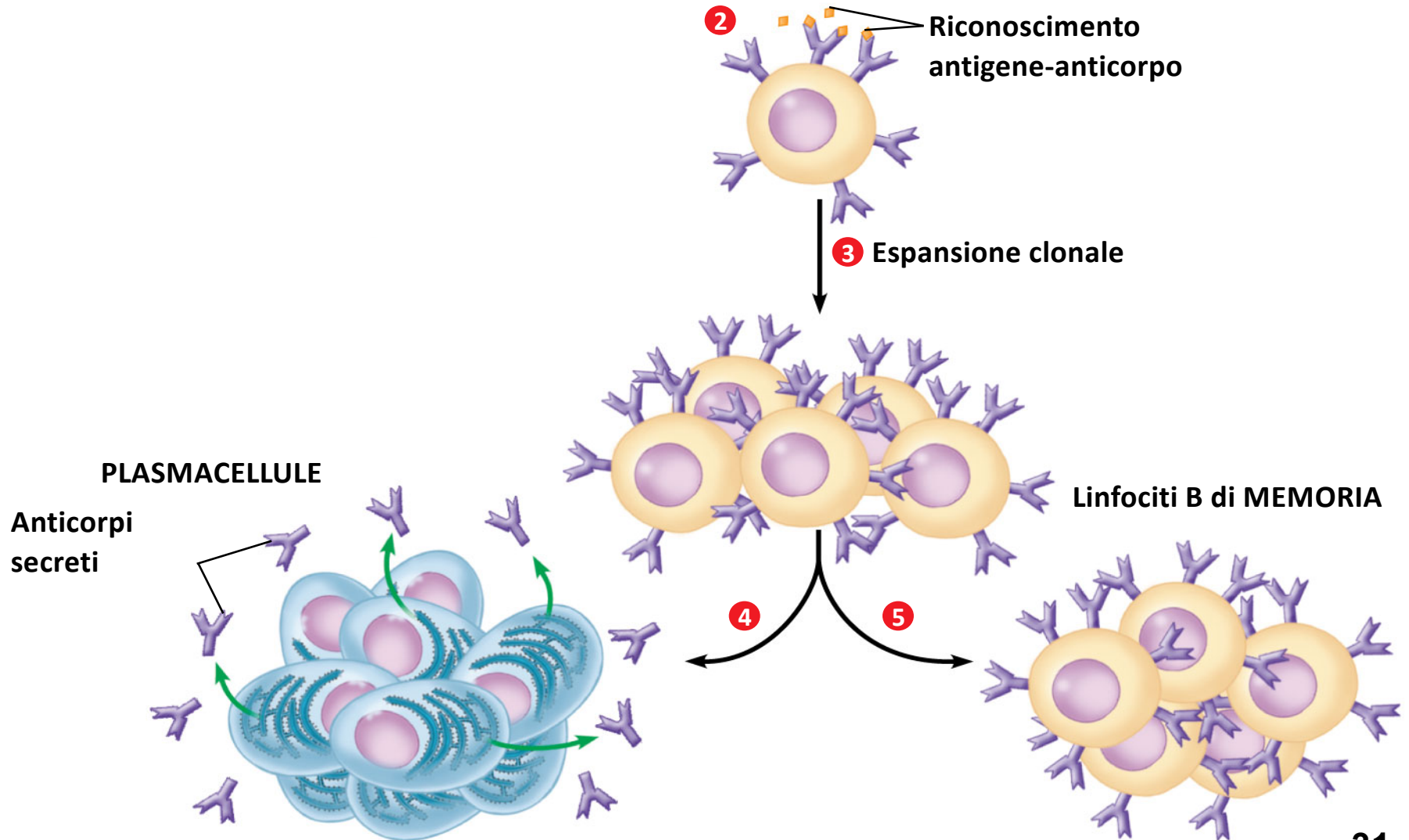


RISPOSTA IMMUNE PRIMARIA: SELEZIONE CLONALE



Rapida divisione del linfocita B selezionato dal legame all'antigene

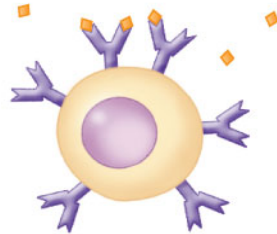
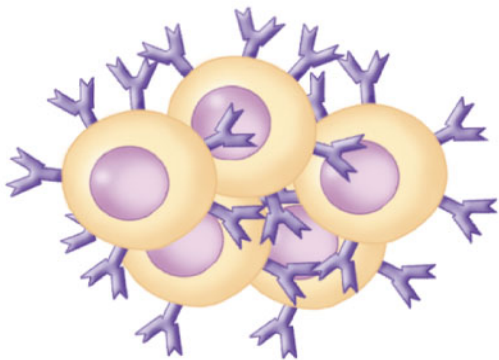
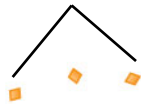
RISPOSTA IMMUNE PRIMARIA: MEMORIA IMMUNITARIA



RISPOSTA IMMUNE SECONDARIA: SECONDA ESPOSIZIONE ALL'ANTIGENE

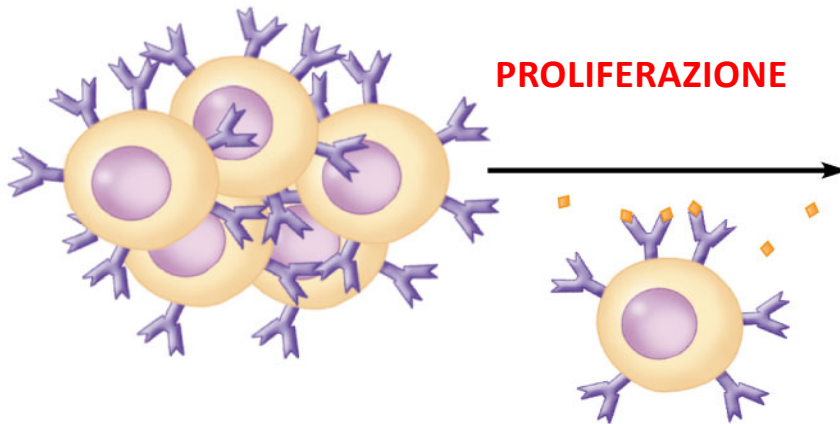
SECONDO INCONTRO CON L'ANTIGENE

Linfociti B di MEMORIA



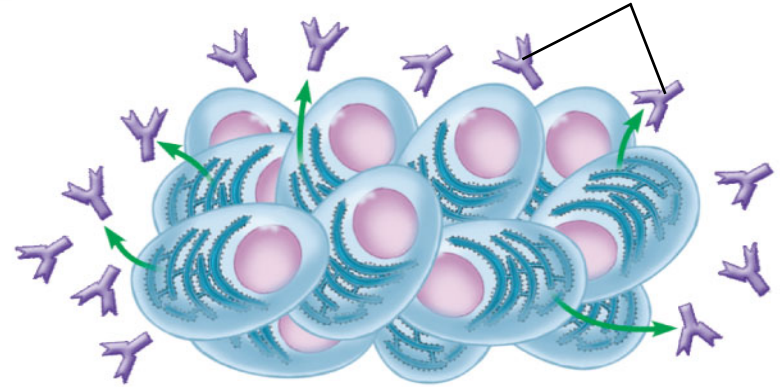
RISPOSTA IMMUNE SECONDARIA: ESPANSIONE CLONALE

Linfociti B di MEMORIA

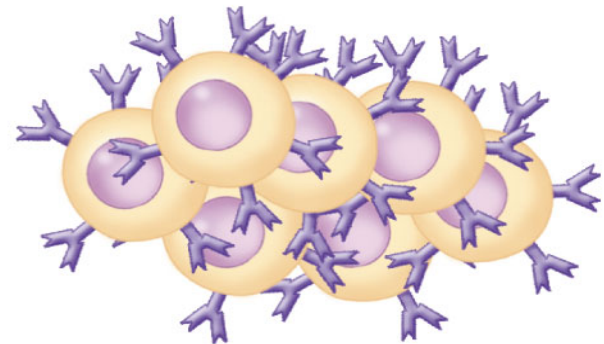


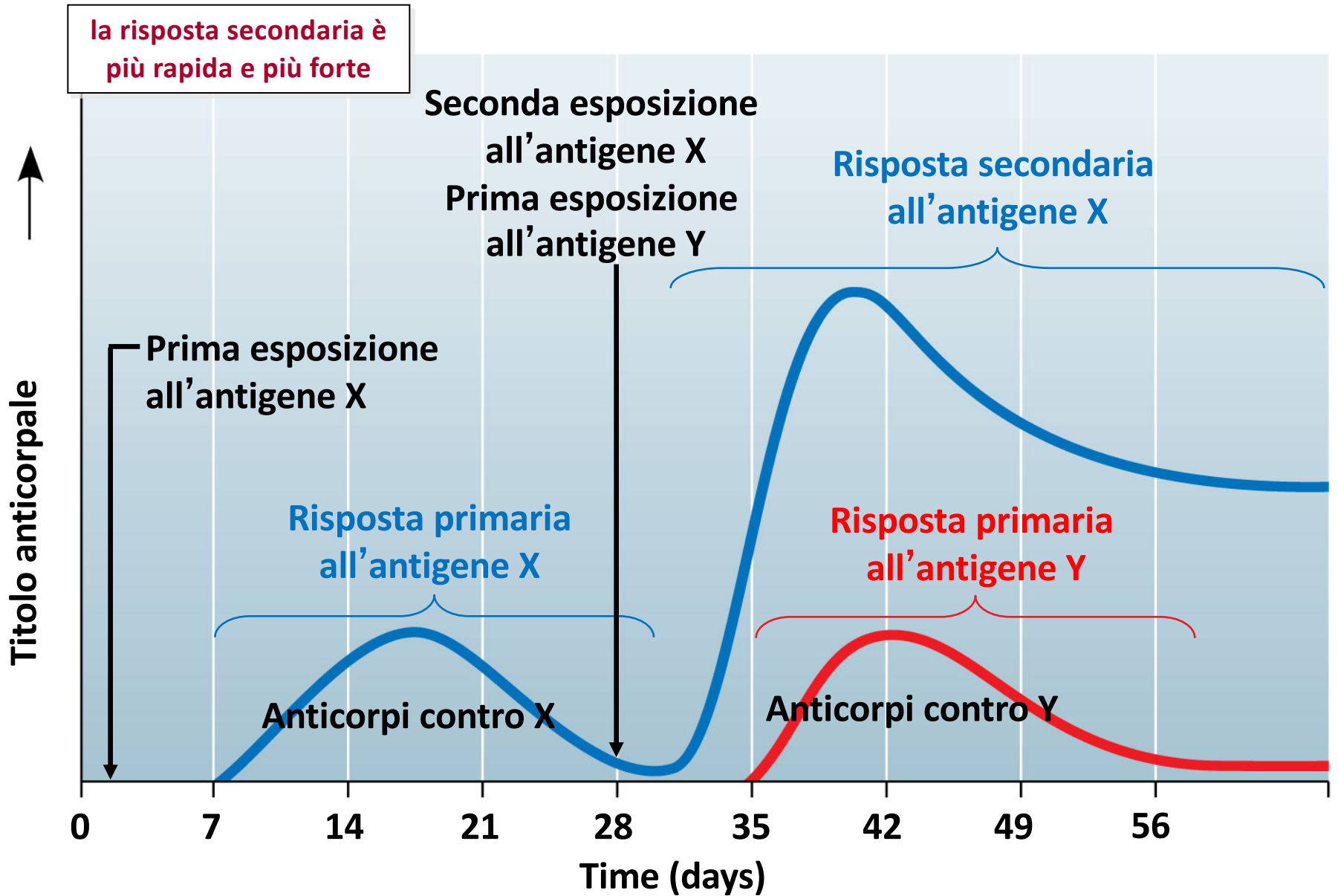
PLASMACELLE

ANTICORPI
SECRETI

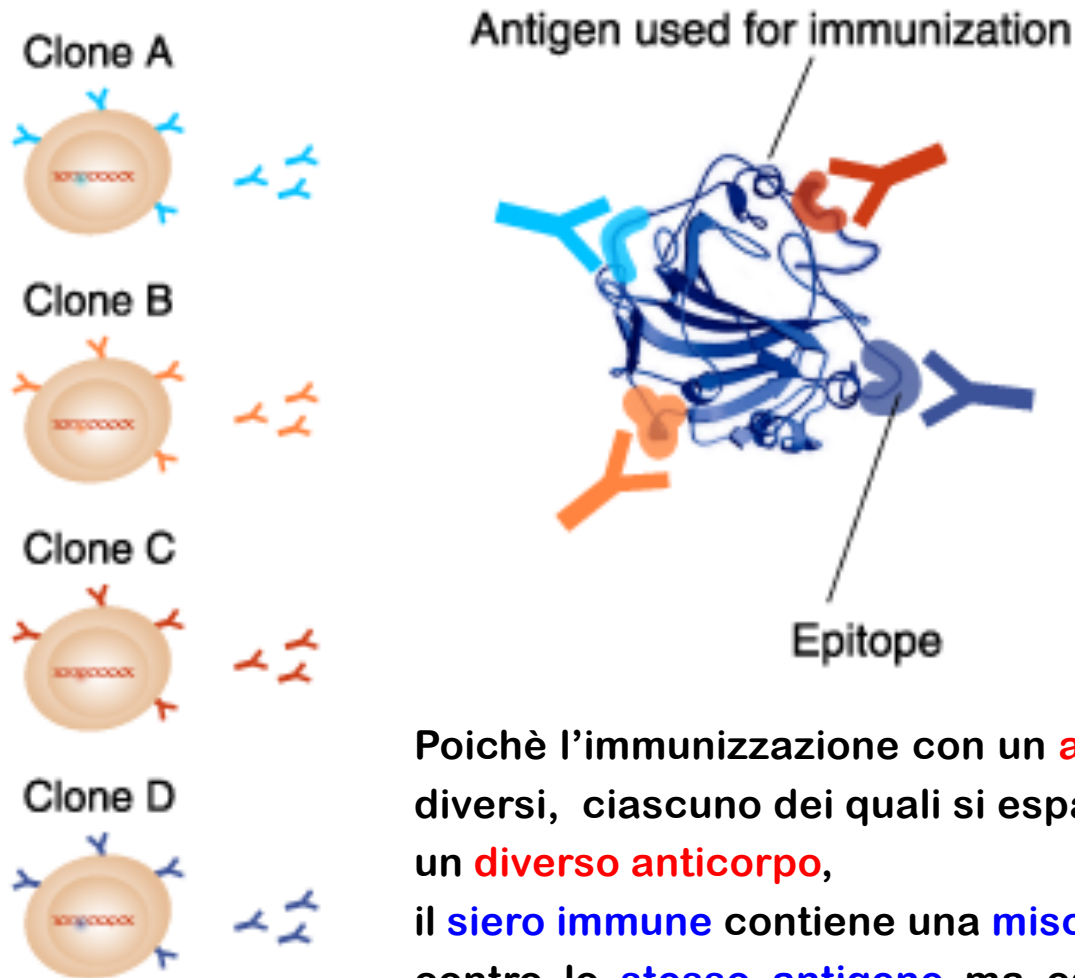


Linfociti B di MEMORIA





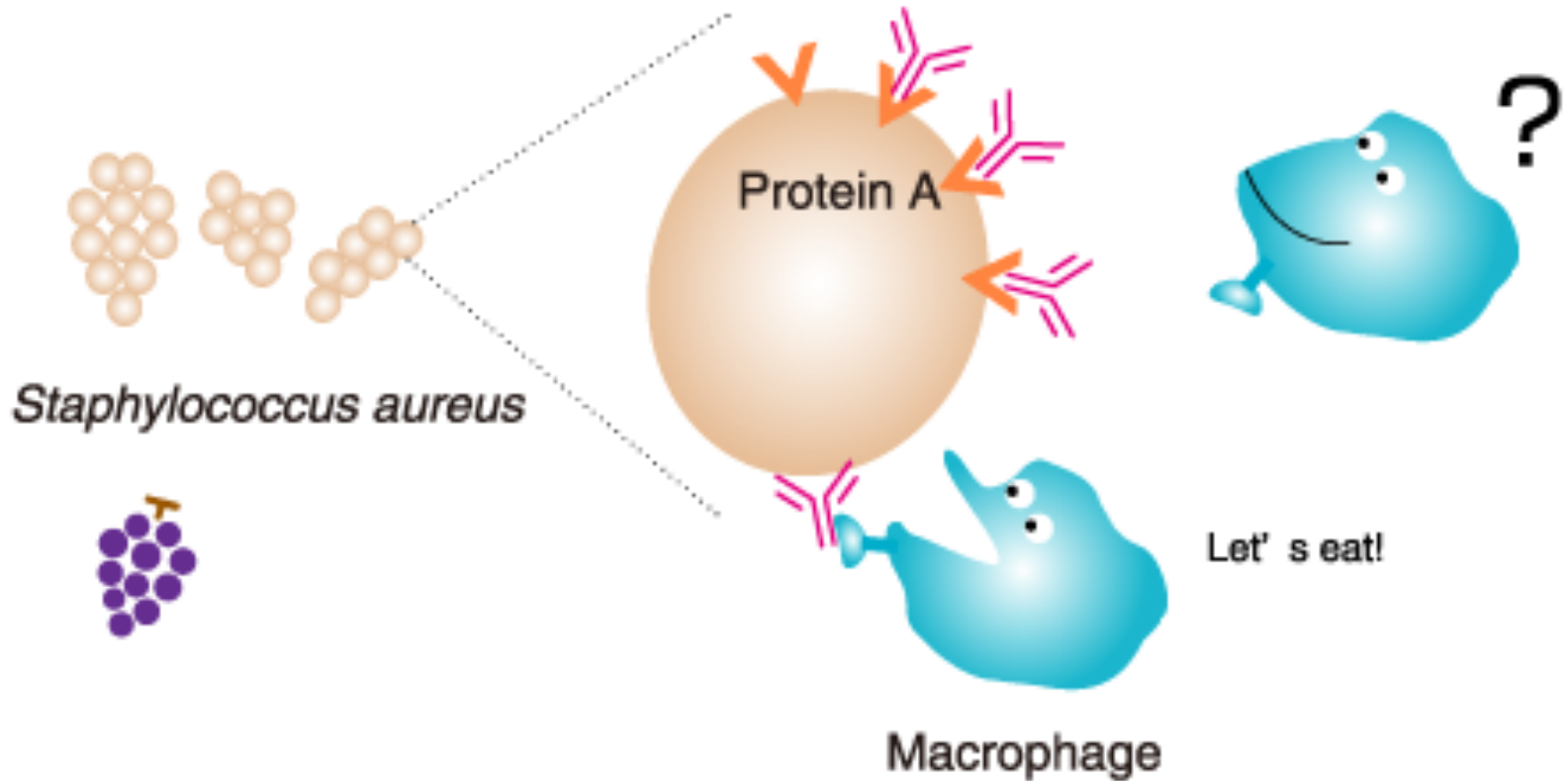
ANTICORPI POLICLONALI:



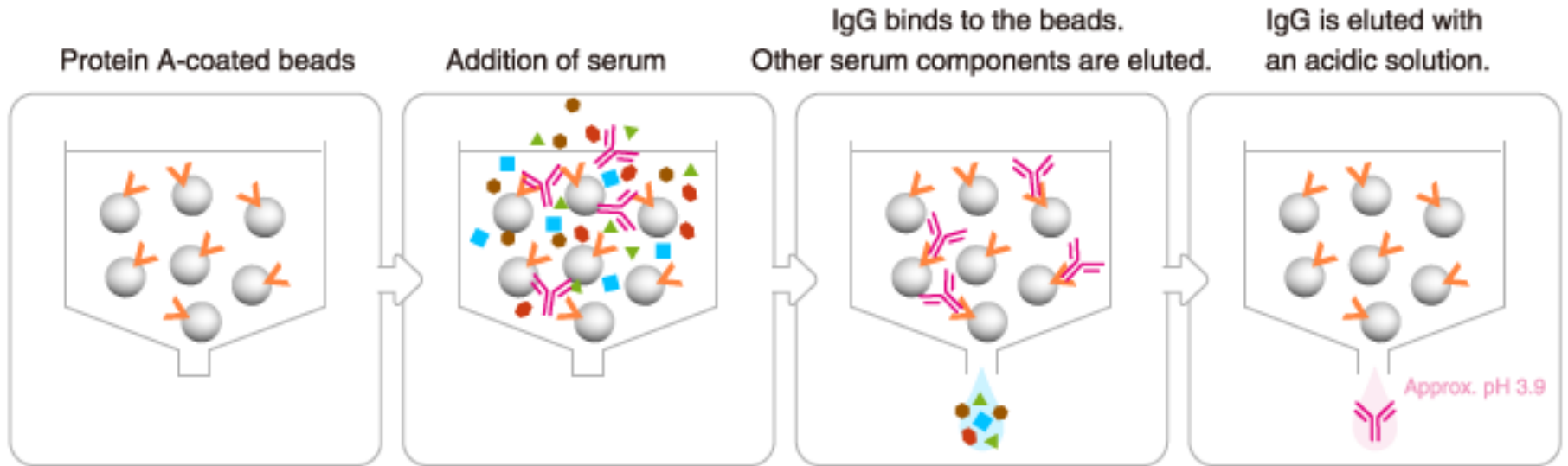
Poichè l'immunizzazione con un **antigene** stimola molti linfociti diversi, ciascuno dei quali si espande in un clone che produce un **diverso anticorpo**, il **siero immune** contiene una **miscela di anticorpi diversi** diretti contro lo **stesso antigene** ma capaci di riconoscere **epitopi diversi** di questo

PURIFICAZIONE DI ANTICORPI CON PROTEINA A:

Immune evasion by *Staphylococcus aureus*

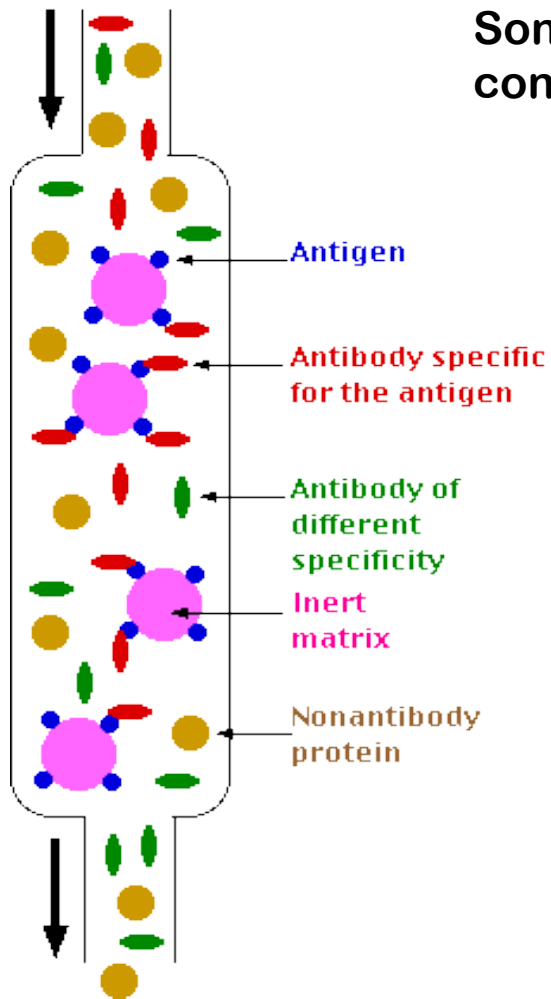


PURIFICAZIONE DI ANTICORPI CON PROTEINA A:



PURIFICAZIONE DI ANTICORPI SPECIFICI MEDIANTE CROMATOGRAFIA DI AFFINITA'

Sono utilizzate resine funzionalizzate con antigeni ricombinanti



ANTICORPI POLICLONALI:

Vantaggi:

- ✓ Segnale forte (più anticorpi riconoscono uno stesso antigene)
- ✓ Basso rischio che l'epitopo sia nascosto / mascherato

Polyclonal antibodies



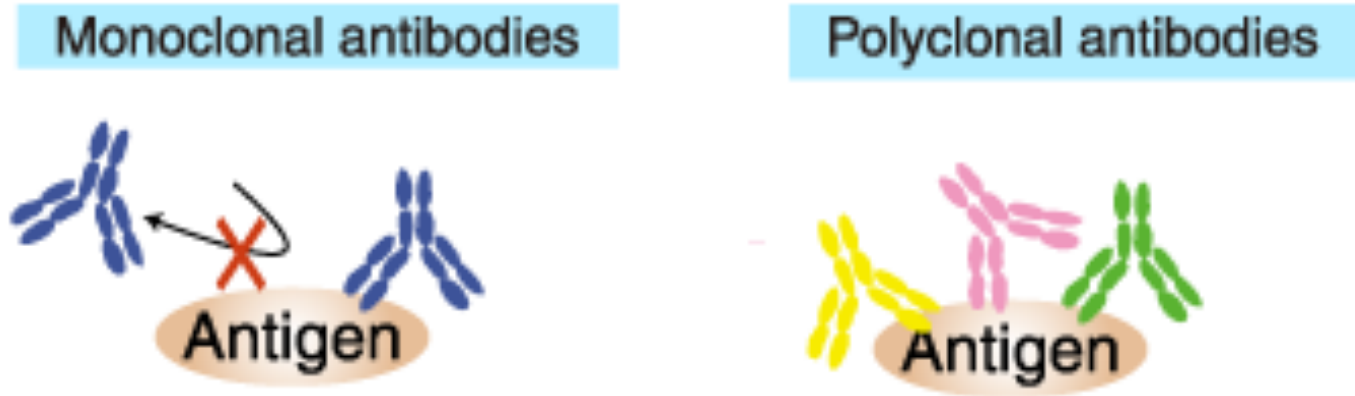
Svantaggi:

- ci può essere **crossreattività** con **antigeni diversi**
- **presenza di altri anticorpi** (risposte immuni) nel siero dell'animale

ANTICORPI MONOCLONALI:

Anticorpi prodotti da un **singolo clone di linfociti B**

Riconoscono **un solo epitopo** dell'antigene utilizzato per l'immunizzazione



Vantaggi:

massima specificità di riconoscimento

(posso eliminare Ab che mostrano crossreattività)

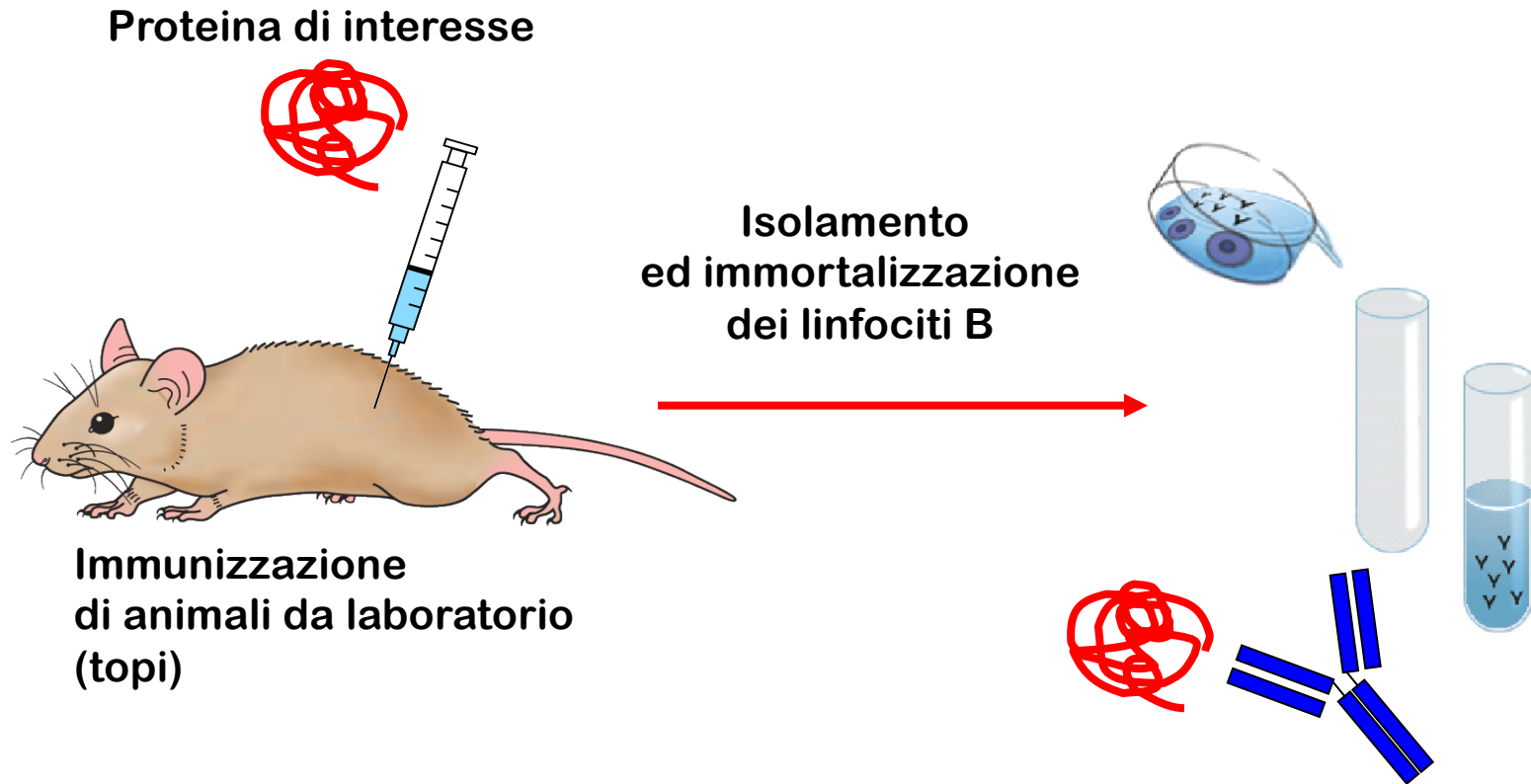
Svantaggi:

Segnale più **debole** (riconosce un solo epitopo dell'antigene)

Rischio che l'epitopo sia **nascosto**/mascherato

ANTICORPI MONOCLONALI:

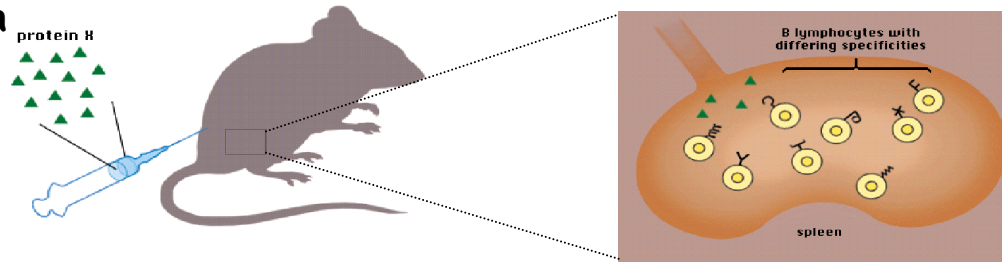
Prodotti mediante isolamento e **immortalizzazione di singoli linfociti** per ottenere **CLONI** di cellule che producono e **secernono anticorpi in vitro**



Anticorpi monoclonali diretti contro **singoli epitopi** dell'antigene di interesse

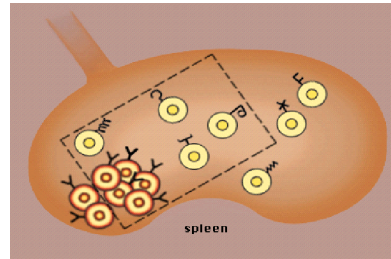
Produzione di anticorpi monoclonali

1 La proteina purificata viene inoculata nel **topo**

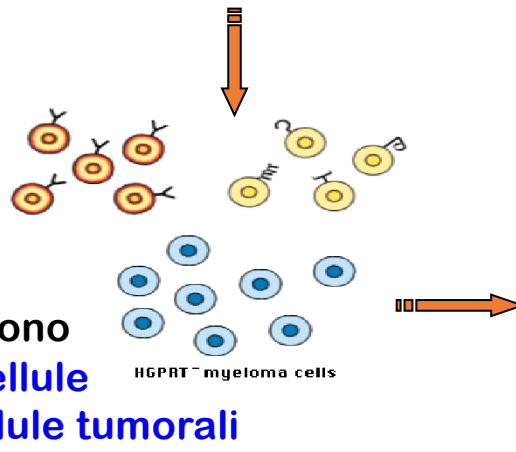


2 Nella **milza** i linfociti B contro l'Ag si attivano ed iniziano a proliferare

3 La milza viene prelevata e si isolano i linfociti

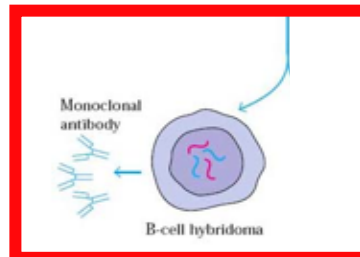
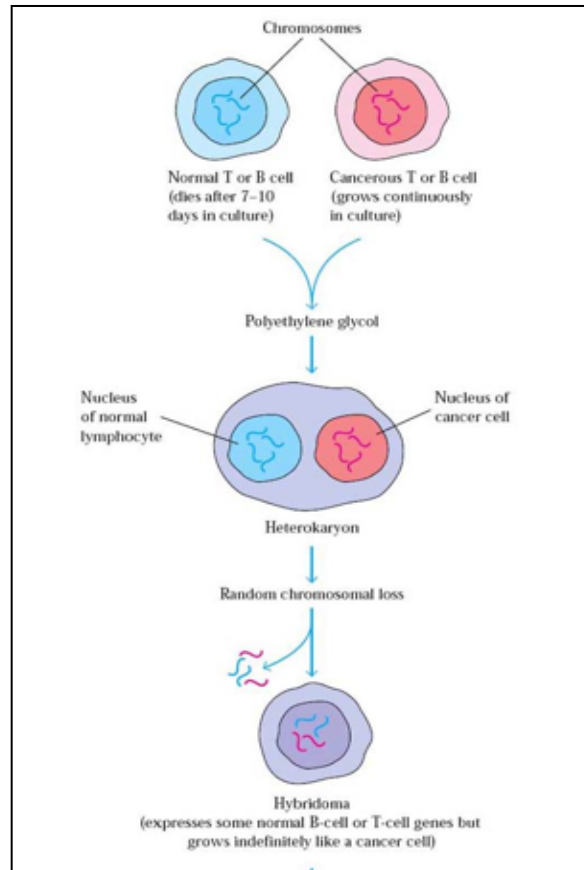


4 I linfociti vengono mescolati a **cellule immortali (cellule tumorali di MIELOMA)**



5 Si effettua una **FUSIONE CELLULARE**:
i linfociti B fusi alle cellule di mieloma si dicono **IBRIDOMI**:
= linee cellulari immortali che producono anticorpi

Formazione di ibridomi attraverso fusione cellulare

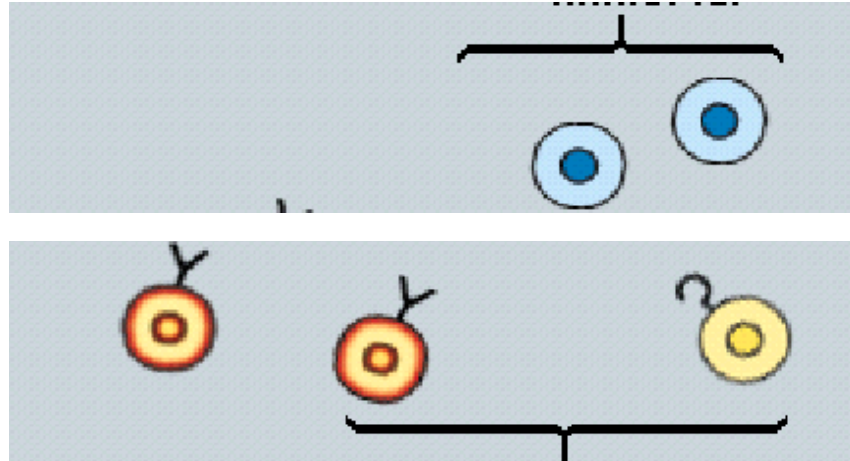


Selezione degli ibridomi in terreno HAT

(Hypoxantine Aminopterine Timidine)

Il terreno HAT blocca la **via biosintetica** “de novo” dei nucleotidi **purinici**: le cellule possono crescere solo se hanno l'enzima **HGPRT** della via biosintetica “di salvataggio”

Cellule di **mieloma**: immortali ma **HGPRT-** → **muiono**



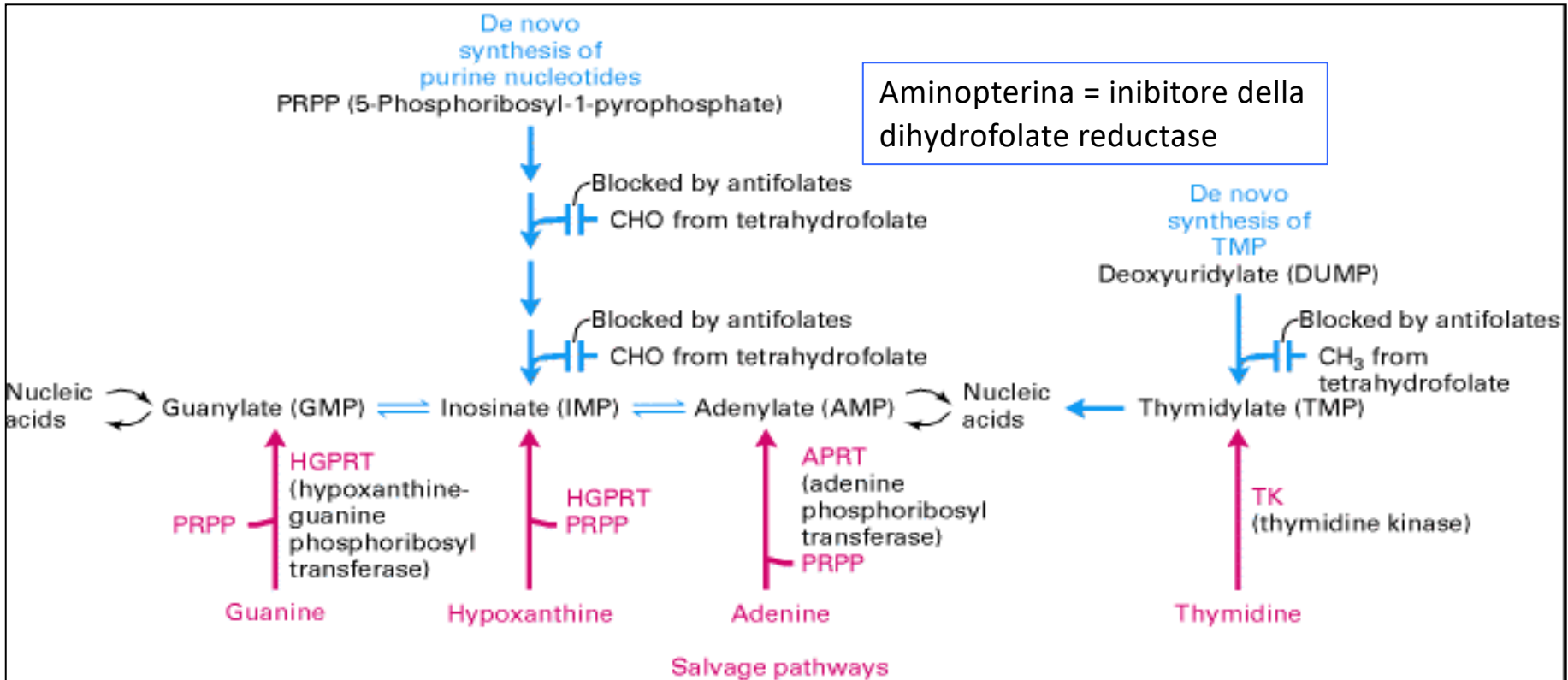
Linfociti: HGPRT + ma non crescono in coltura

Ibridomi: immortali e HGPRT +: possono crescere in terreno HAT



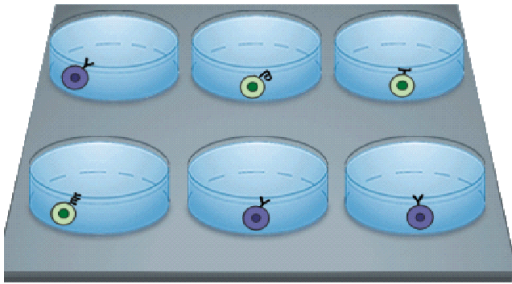
Il terreno HAT (Aminopterina, Hypoxantina, Timidina) blocca la **via biosintetica** “de novo” dei nucleotidi **purinici**: le cellule possono crescere solo se hanno l’enzima **HGPRT** della via biosintetica “di salvataggio”

Biosintesi delle purine

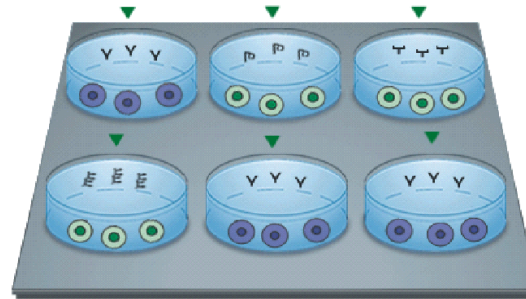


Produzione di anticorpi monoclonali

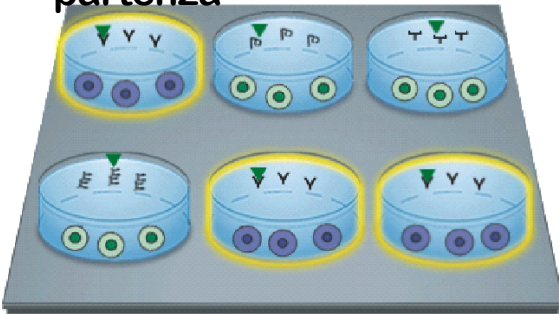
- 7 Gli **IBRIDOMI** ottenuti vengono diluiti e piastrati in piastre multiwell, in modo da avere in media una singola cellula per pozzetto



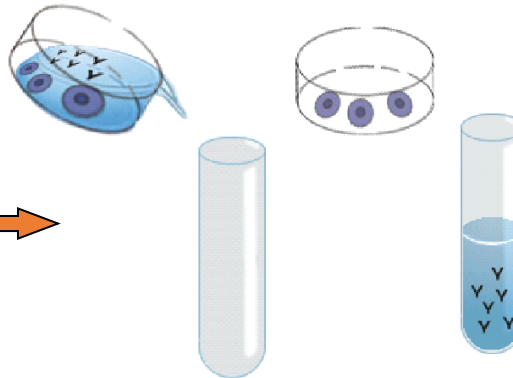
- 8 I **CLONI** crescono e cominciano a produrre anticorpi. Ogni clone produrrà un anticorpo con diversa specificità di antigene



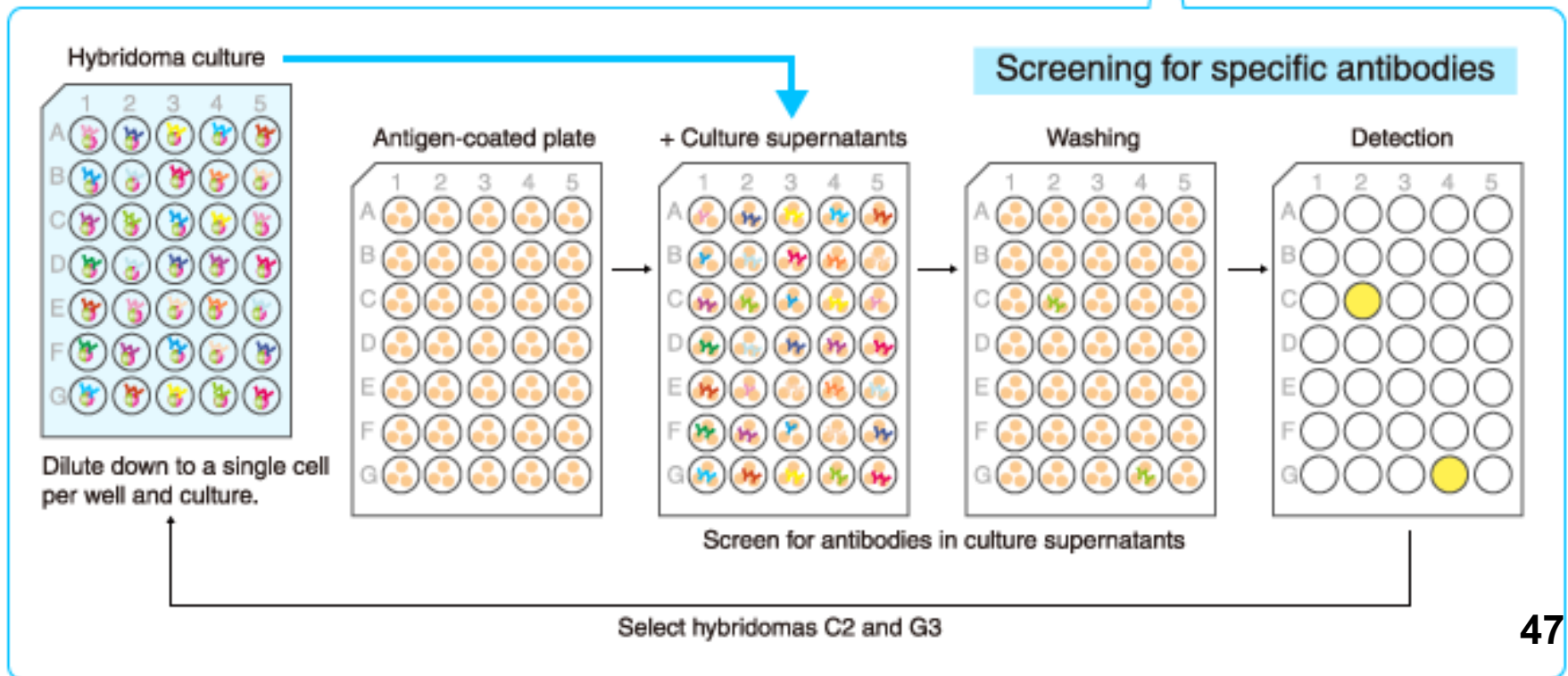
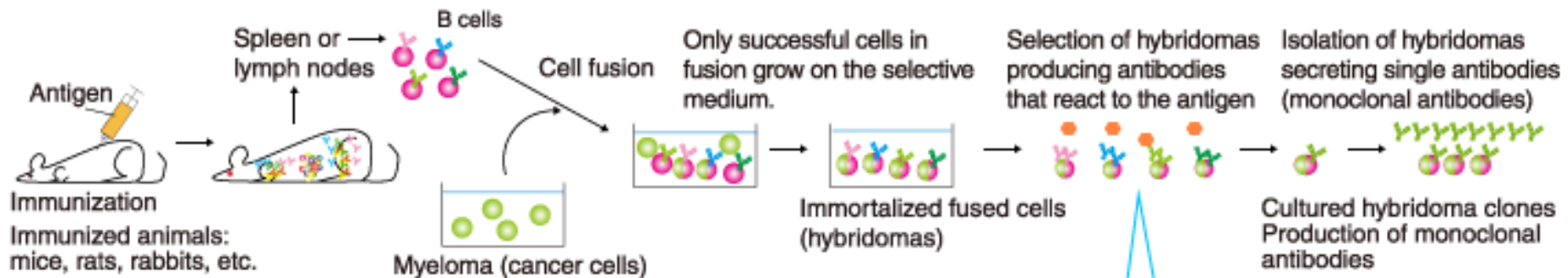
- 9 Con un saggio immunochimico (ELISA) si può determinare quale clone riconosce l'antigene di partenza



- 10 Si ottiene una popolazione pura di **ANTICORPI MONOCLONALI** (derivati da un singolo clone) che riconoscono lo specifico antigene X



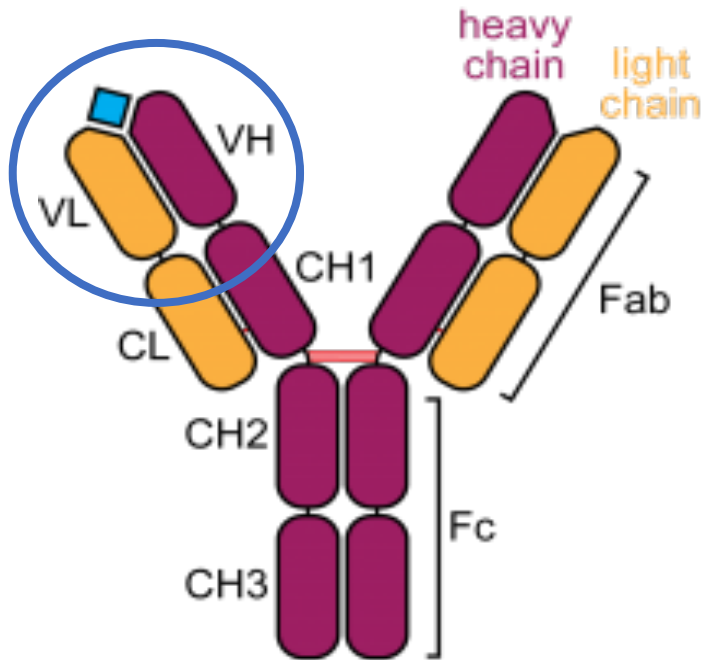
Tecnica utilizzata per selezionare cloni di linfociti B nella produzione di anticorpi monoclonali



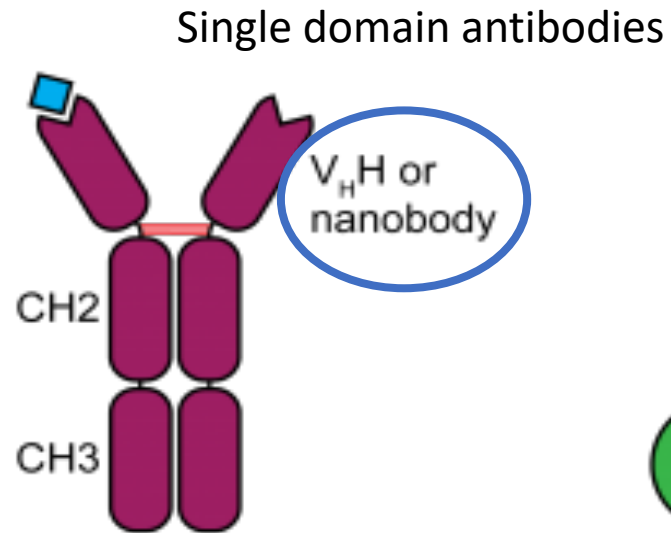
	Polyclonal antibodies	Monoclonal Antibodies
Animal species	Rabbit, guinea pig, goat, sheep, rat, mouse, chicken, etc.	Rat, mouse, chicken, rabbit, human, etc.
Form	Antiserum	Hybridoma
Class, subclass	Mixed classes	Single class
Epitope	React to multiple epitopes	React to a single epitope
Specificity	Lower than monoclonal antibodies because multiple types of antibodies are present.	High if good quality antibodies are selected.
Reproducibility	Variable among lots	The same antibodies are produced indefinitely.
Stability	Binding ability tends to be unaffected by fixation/denaturation of the antigen, because multiple different antibody molecules are present. Tolerate modifications, such as labeling and removal of the Fc region.	Binding ability may be lost if the epitope is lost by fixation/denaturation of the antigen, because monoclonal antibodies are homogeneous. Tend to be sensitive to modifications, such as labeling and removal of the Fc region.

Produzione di anticorpi ricombinanti in vitro mediante tecniche di biologia molecolare (screening di librerie)

Anticorpi camelidi, nanobodies, single chain Fv, sono prodotti in vitro con tecniche di biologia molecolare



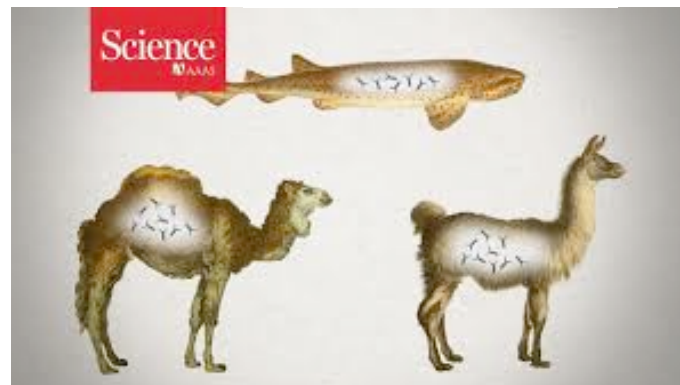
Conventional IgG



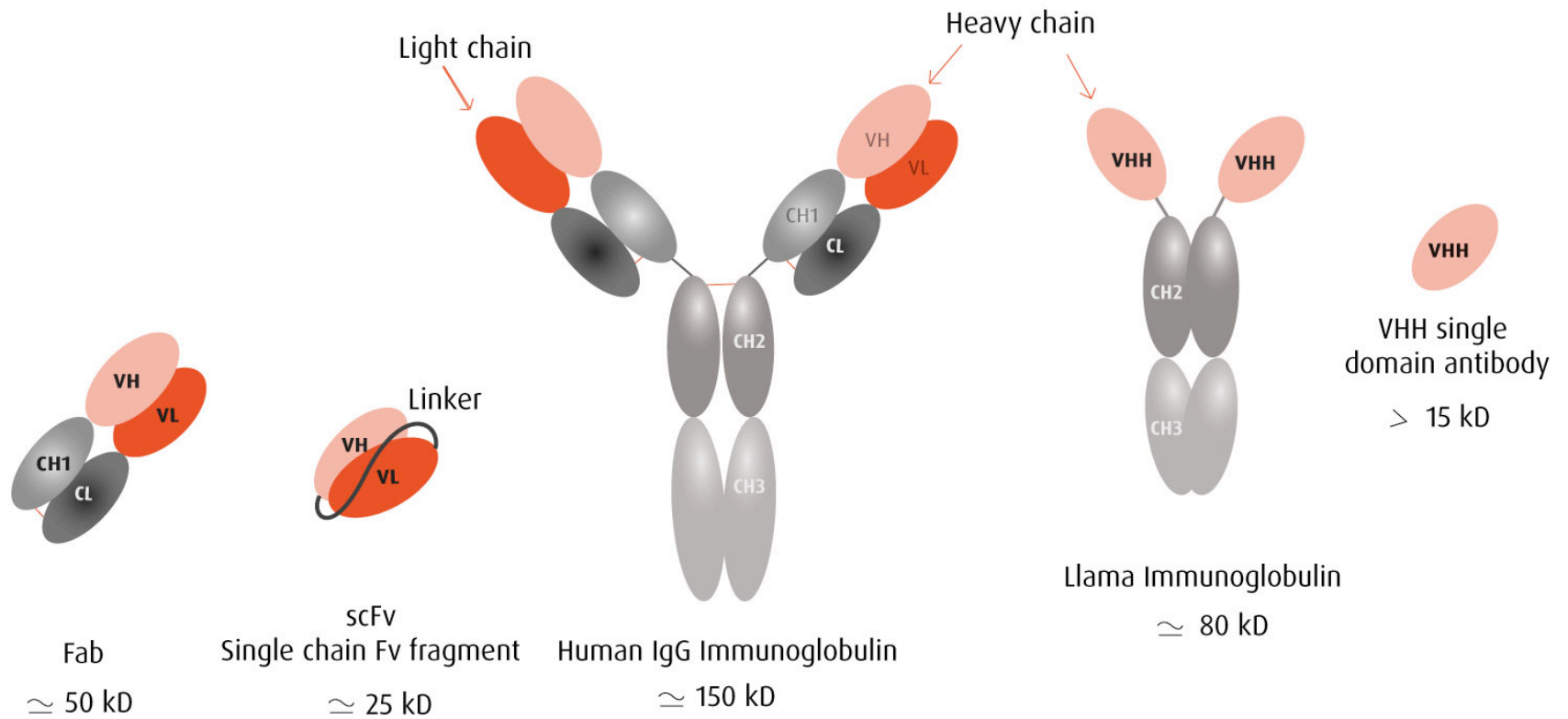
Camelid Heavy chain-only



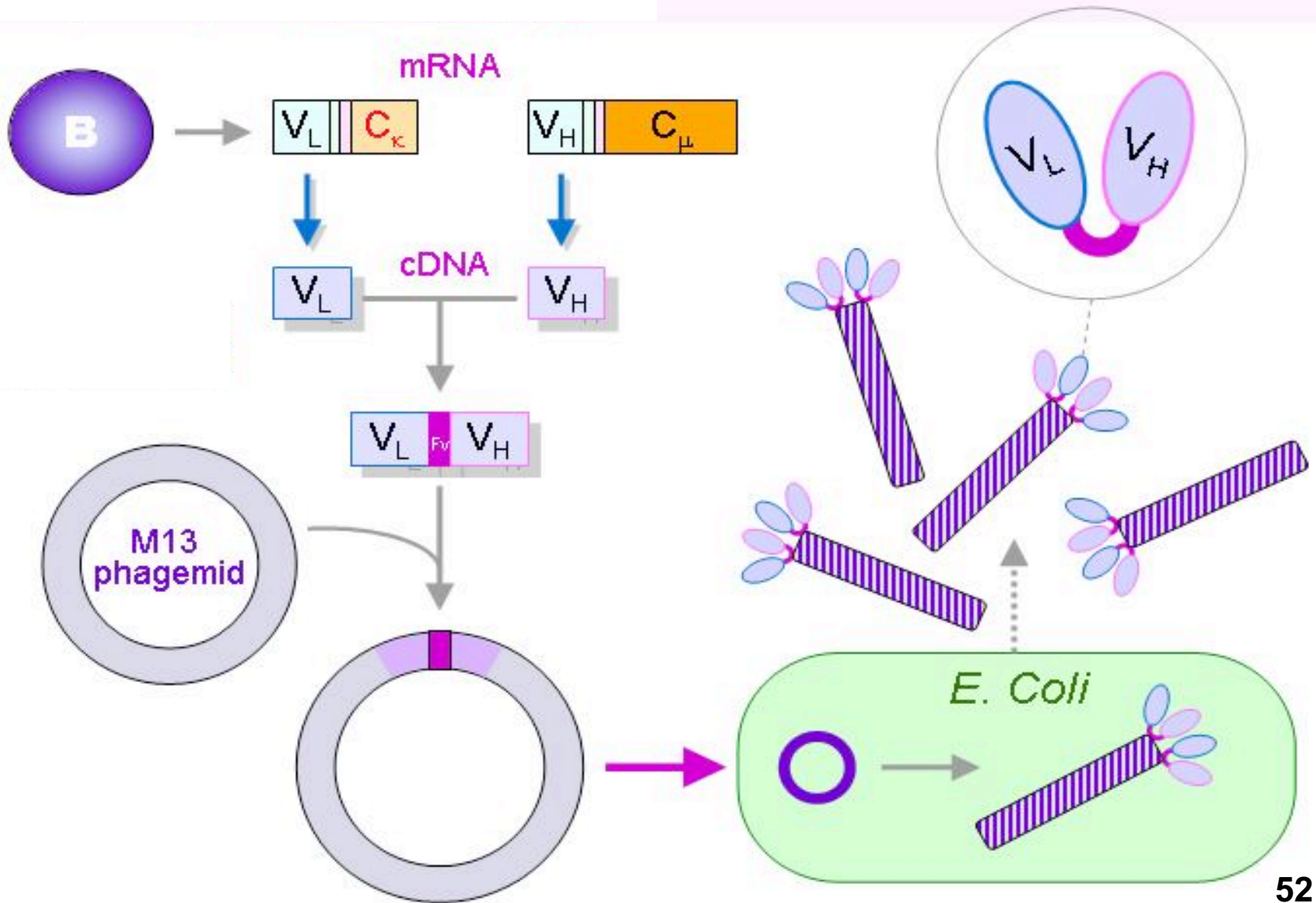
Chromobody



IgG, scFv, VHH



Produzione e selezione di anticorpi in vitro: Phage display



Produzione e selezione di anticorpi in vitro: Phage display

