

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2020-2021

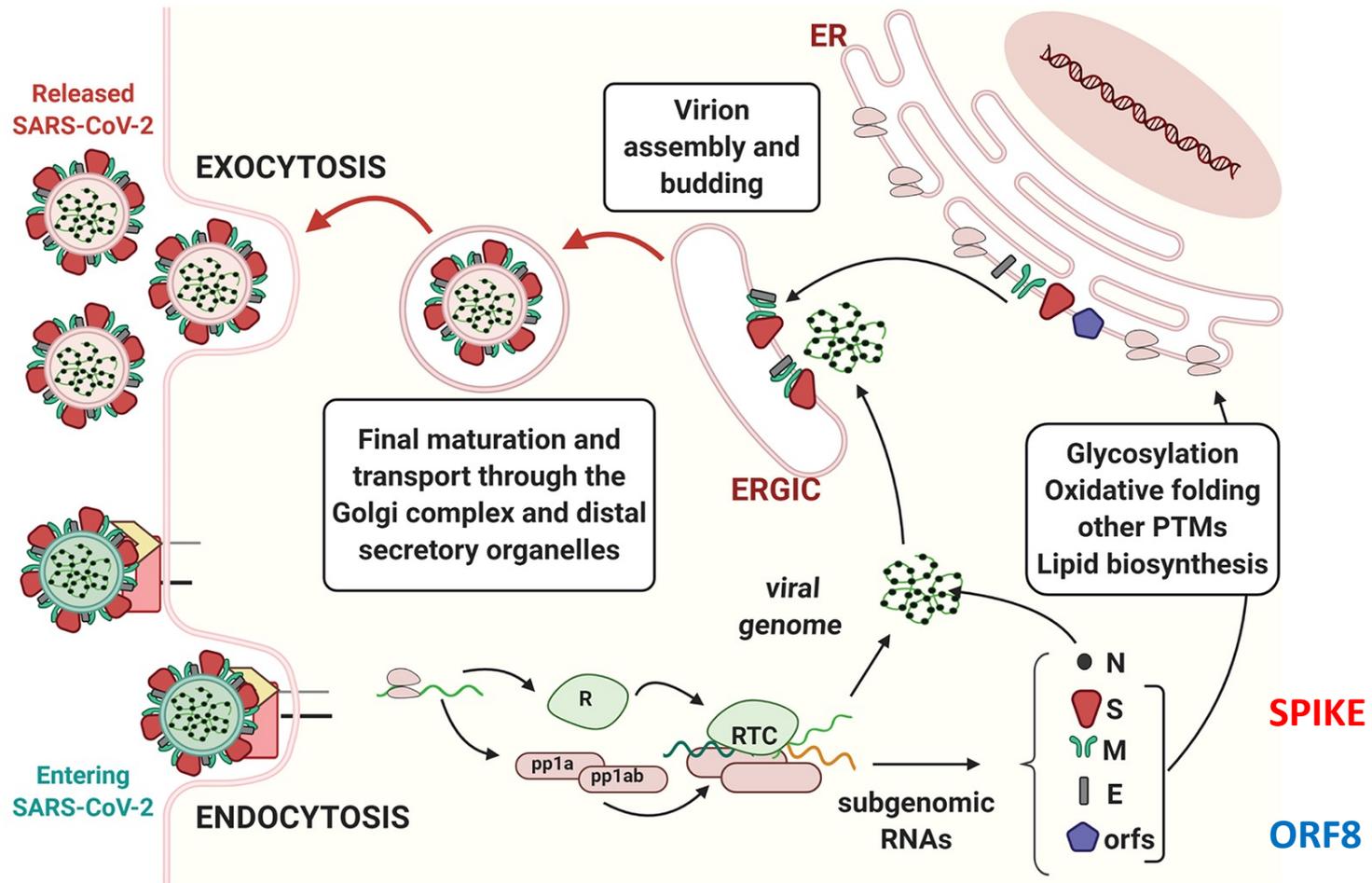
Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

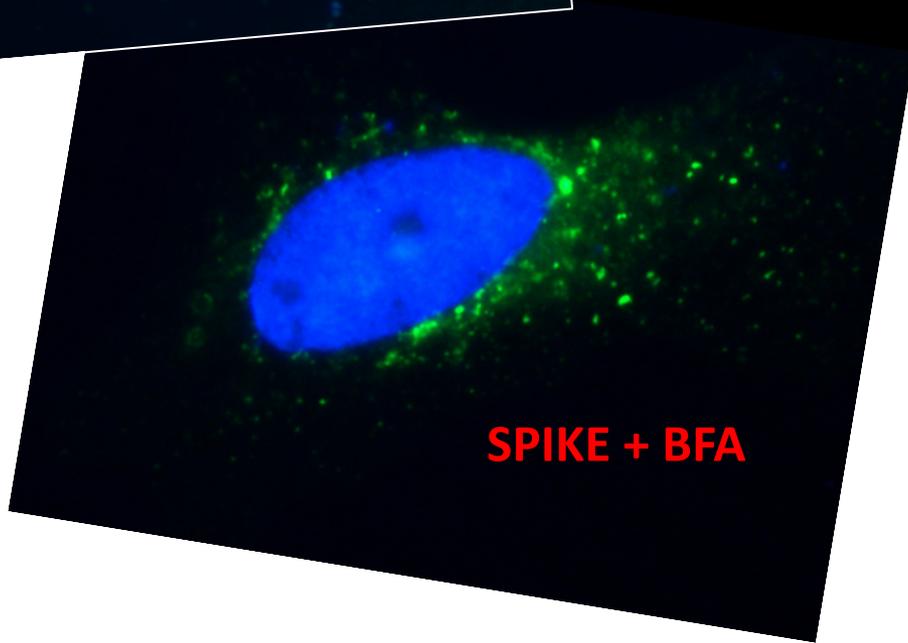
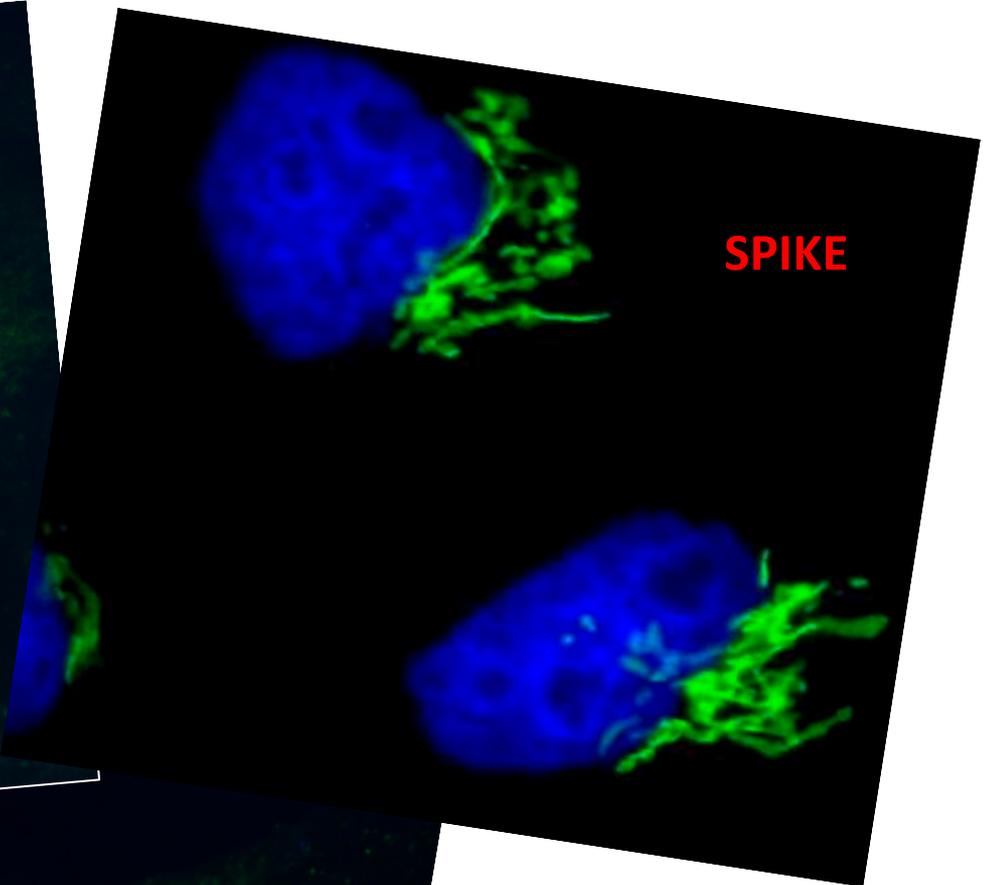
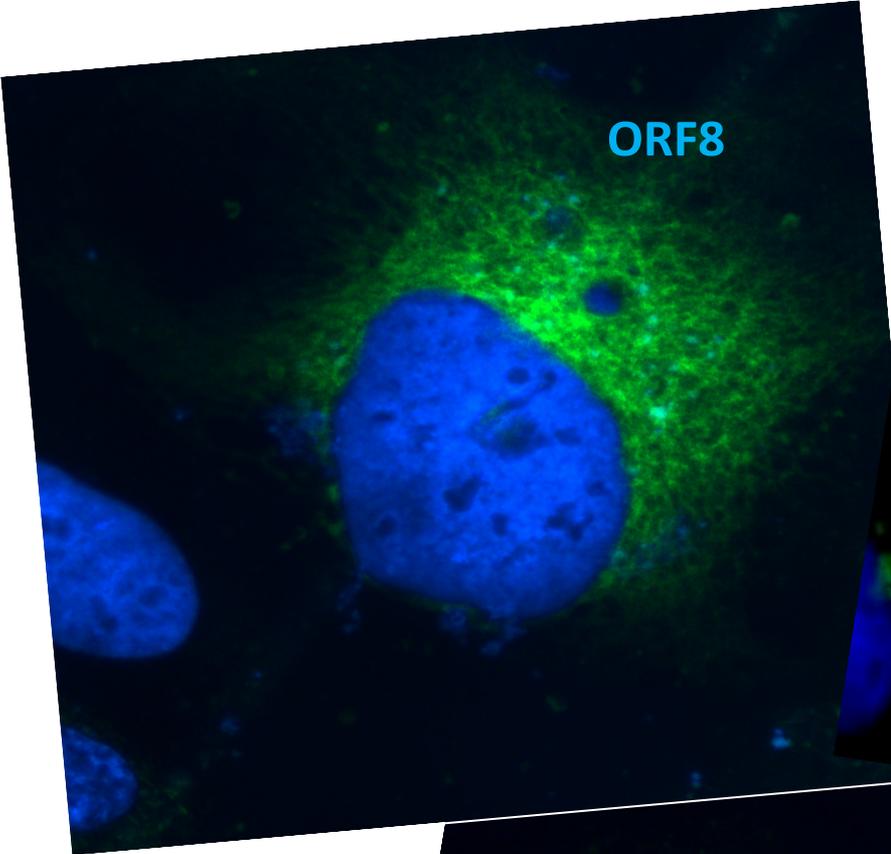
Lezione 12

**STUDIARE LE FUNZIONI CELLULARI
DELLE PROTEINE VIRALI PER COMPRENDERE E
CONTRASTARE LA PATOGENESI DELLA COVID-19**

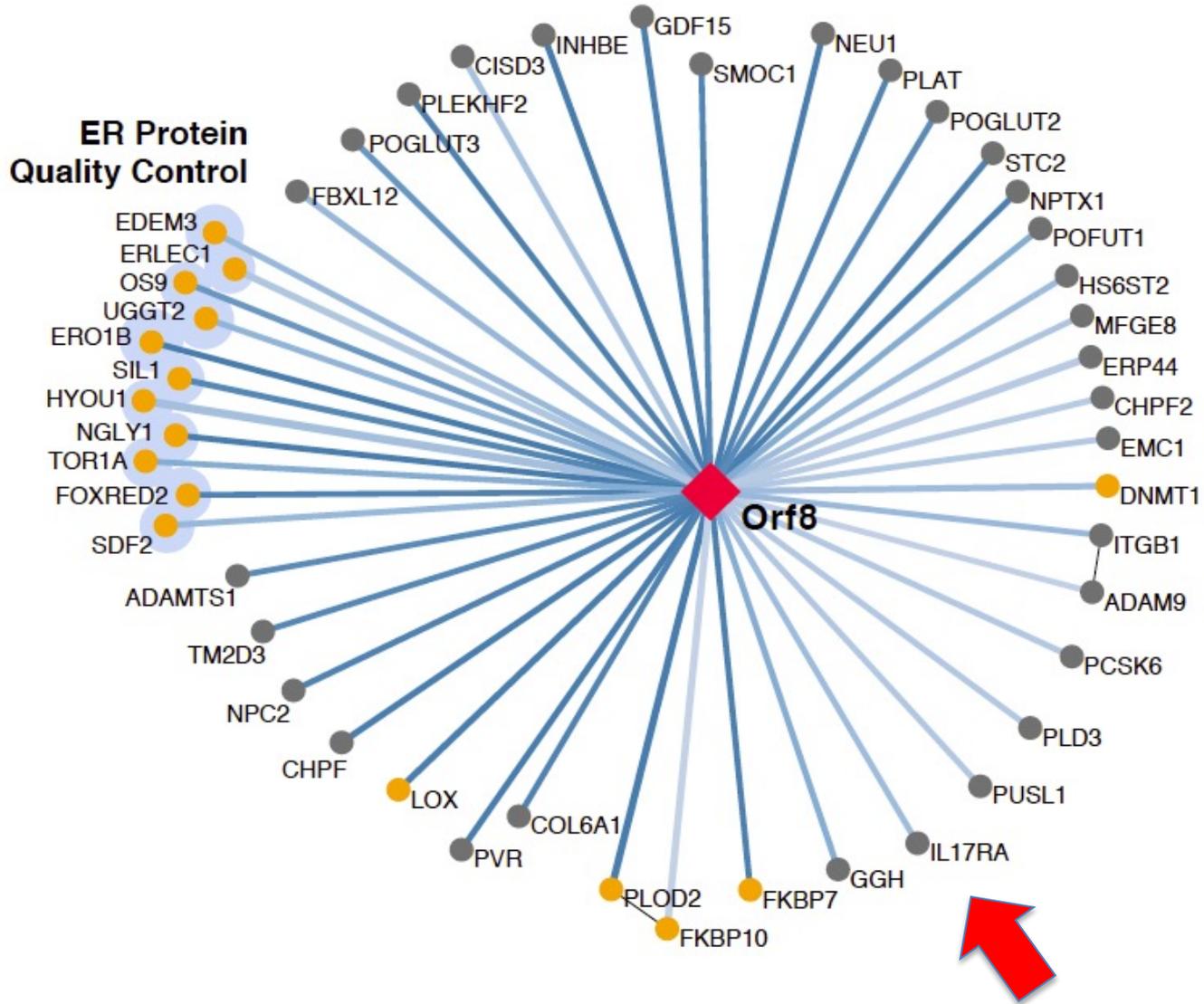
**APPROCCIO SPERIMENTALE:
ANALISI DELLA LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE E
DELL'INTERATTOMA DELLE PROTEINE VIRALI**

Esperimento 1: LE PROTEINE SPIKE E ORF8 LOCALIZZANO LUNGO LA VIA SECRETORIA



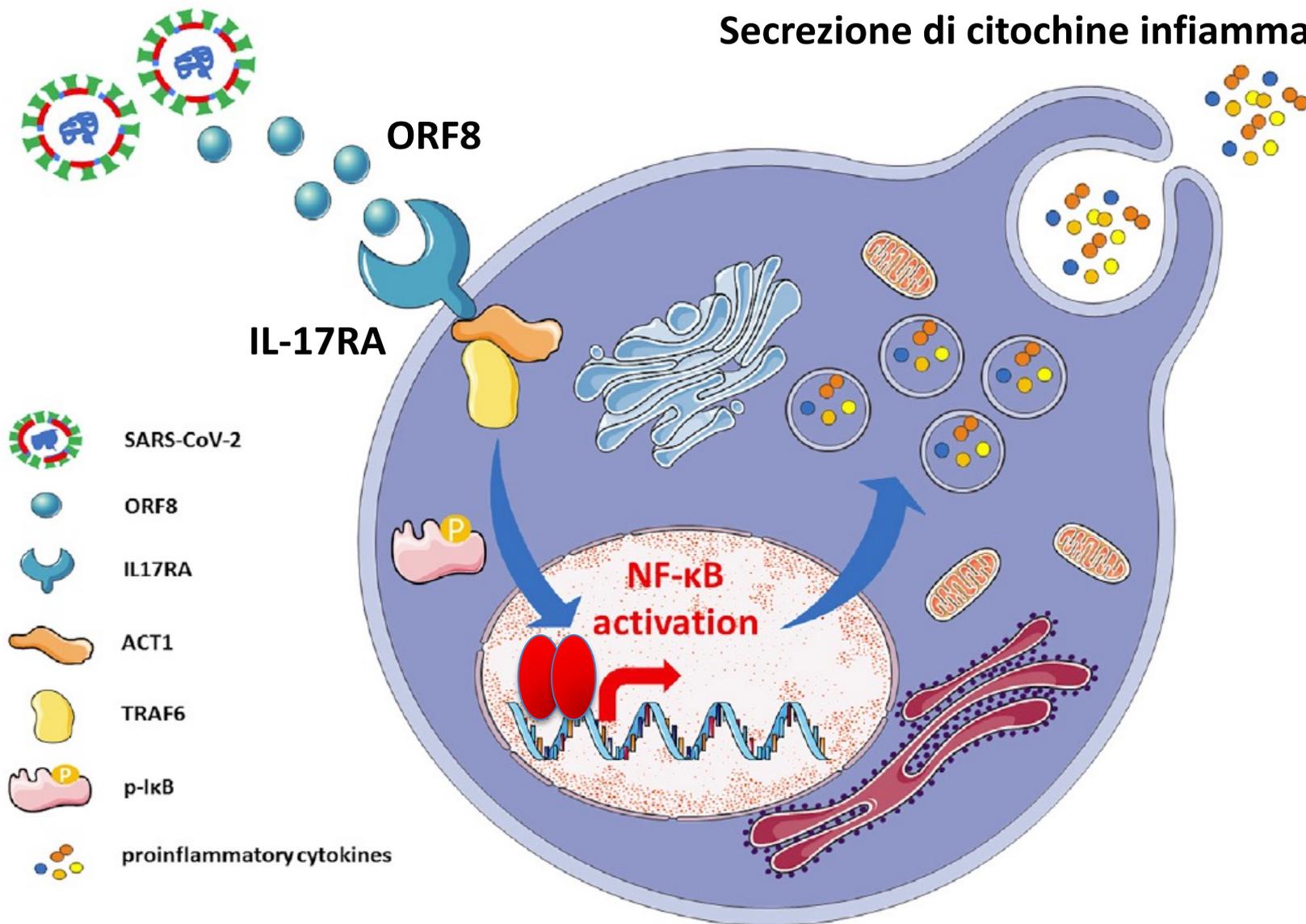


Interattoma di ORF8

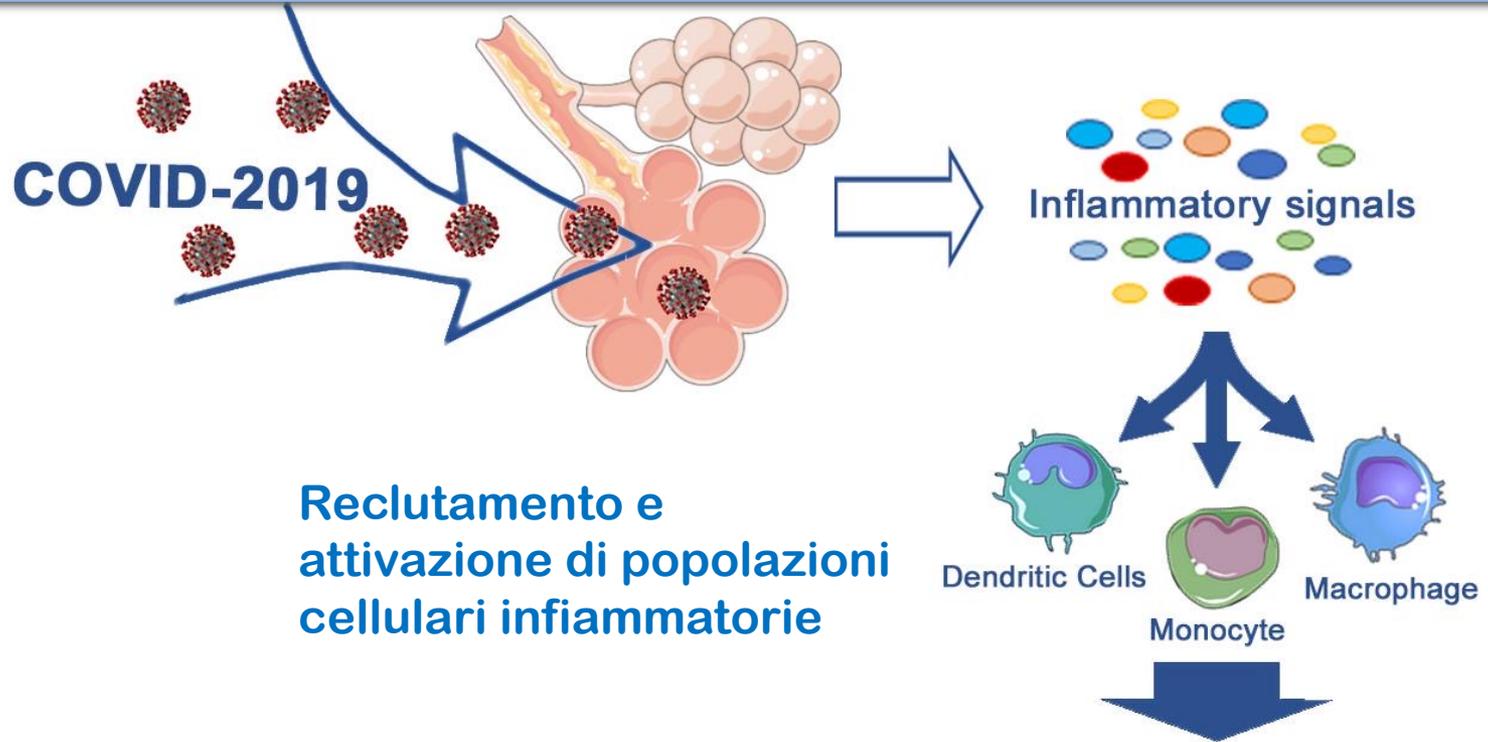


ORF8 causa il reclutamento di cellule infiammatorie

Secrezione di citochine infiammatorie



La "cytokine storm" causa effetti gravi della COVID-19



Reclutamento e attivazione di popolazioni cellulari infiammatorie

CYTOKINE STORM

OUTCOME:
ARDS
Multi-organ failure
Hyperinflammation syndrome
Death

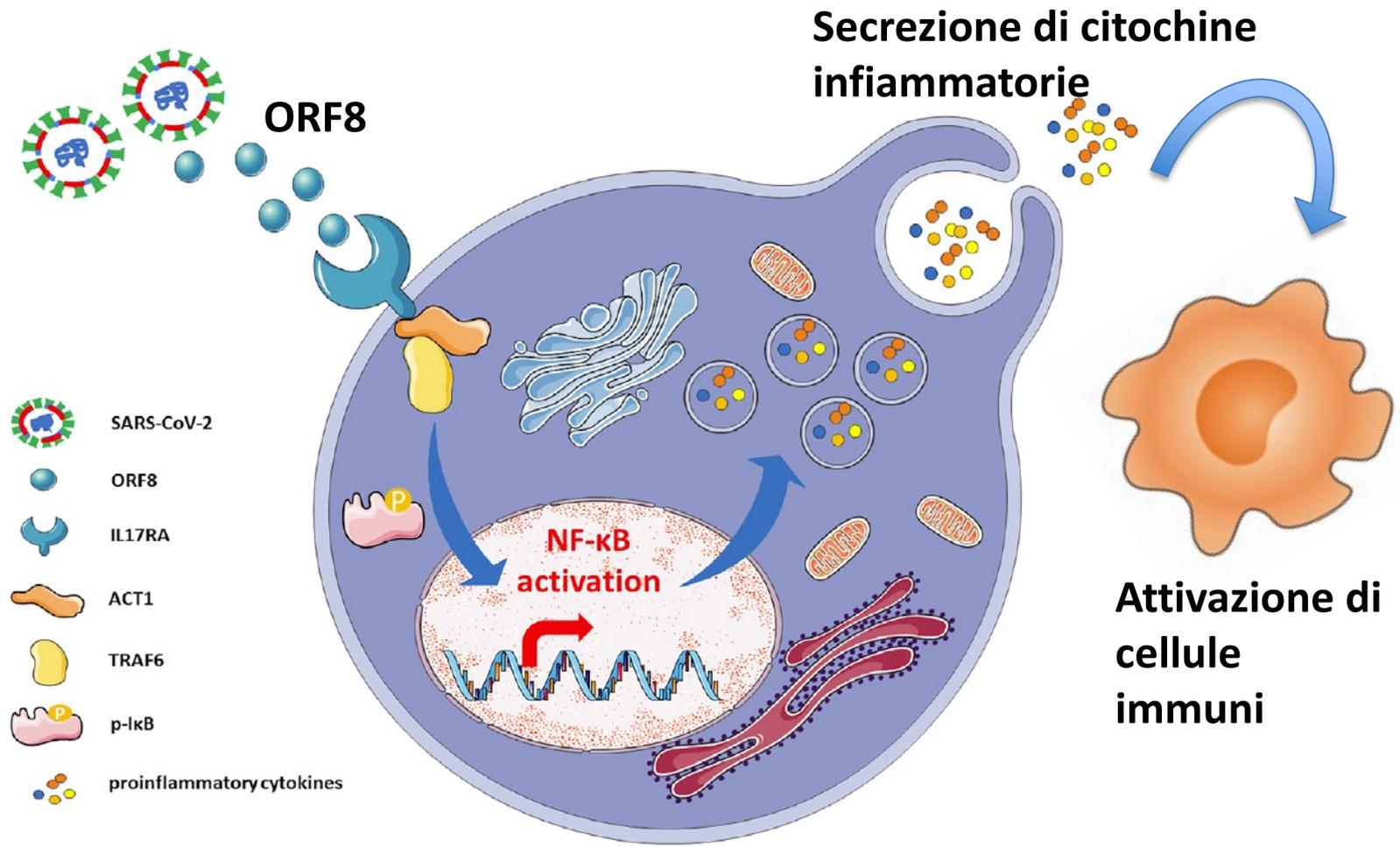
The "CYTOKINE STORM" is depicted as a grey, swirling storm with several colorful dots (red, green, yellow, blue) embedded within it. A white arrow points from the storm towards the "OUTCOME" text, which lists the severe clinical consequences of this condition.

**APPROCCIO SPERIMENTALE:
ANALISI DELL'ATTIVITA' PRO-INFIAMMATORIA DI ORF8**

- 1) Analisi della capacità di ORF8 di indurre attivazione di cellule infiammatorie via NF κ B pathway
- 2) Analisi della capacità di ORF8 di attivare NF κ B via IL17RA

ESPERIMENTO 2:

Analisi della capacità di ORF8 di indurre reclutamento e attivazione di cellule infiammatorie via NFκB



ESPERIMENTO 2:

Analisi della capacità di ORF8 di indurre reclutamento e attivazione di cellule infiammatorie via IL17RA e NFκB

STRATEGIA SPERIMENTALE:

1) Scelta dei modelli cellulari

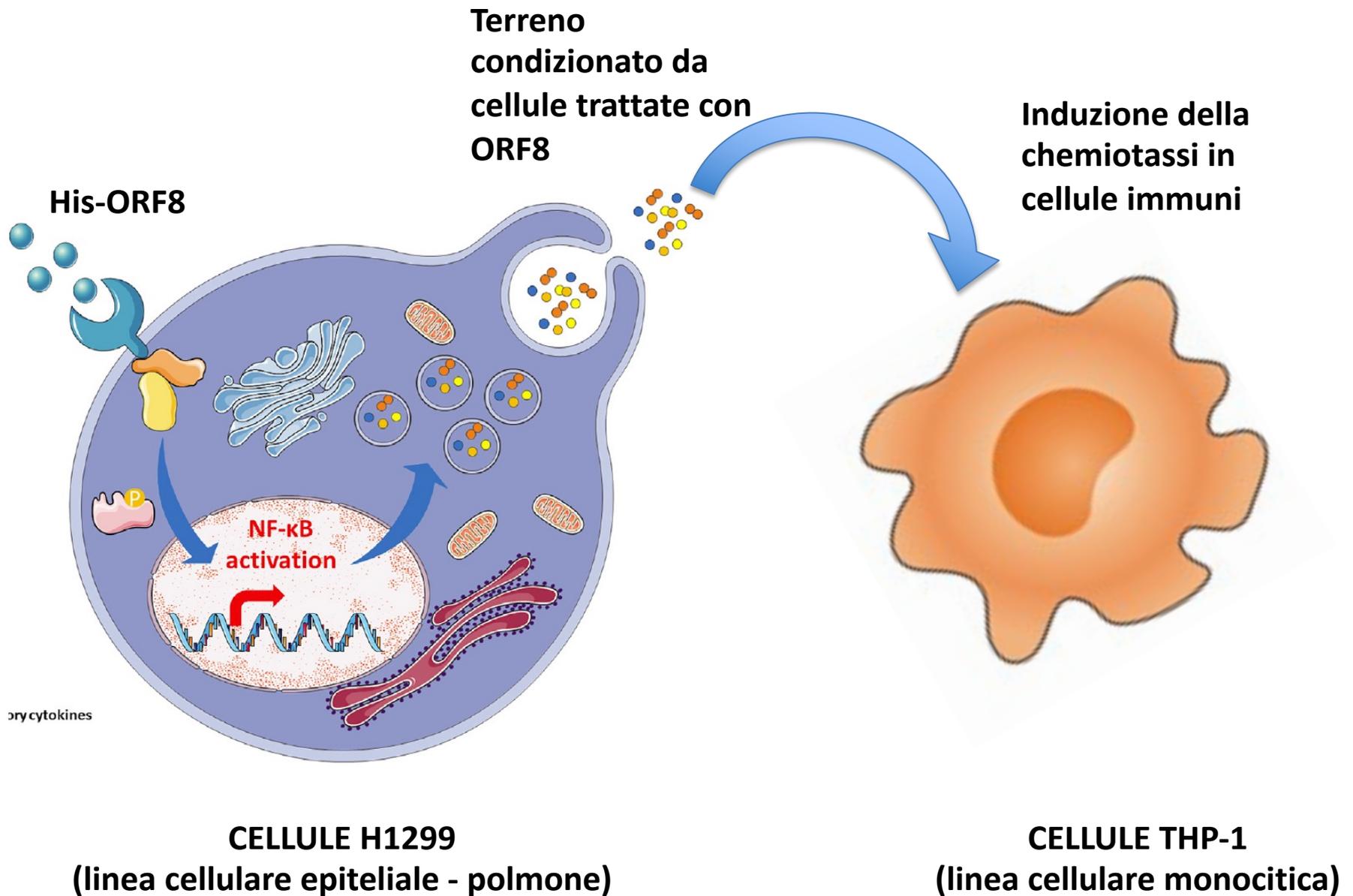
Cellule trattate con ORF8: H1299 (linea di cellule epiteliali – origine polmone)

Cellule infiammatorie: THP-1 (linea cellulare monocitica umana)

2) Trattamento di cellule H1299 con proteina His-ORF8

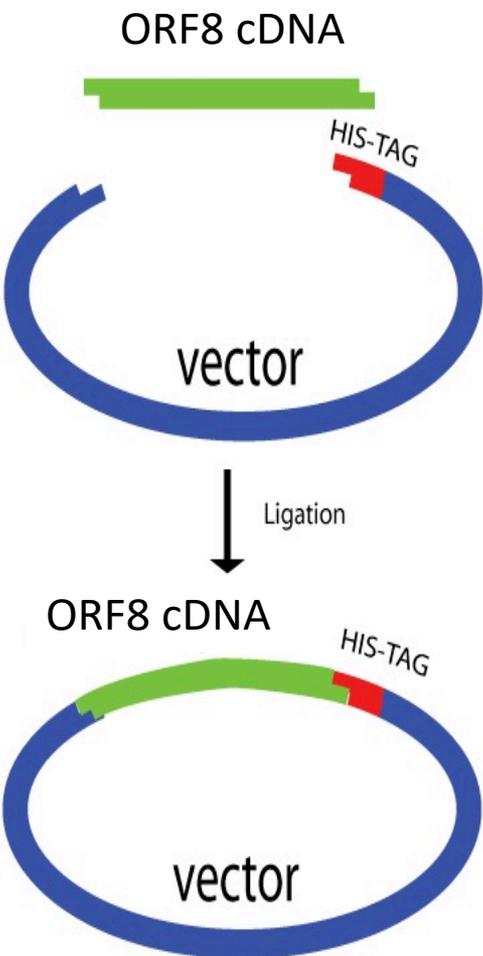
3) Prelievo del terreno condizionato da cellule H1299 e analisi dell'induzione di chemiotassi in cellule THP-1

- Scelta del saggio: migrazione in camera di Boyden
- Strumento per l'analisi: microscopio ottico

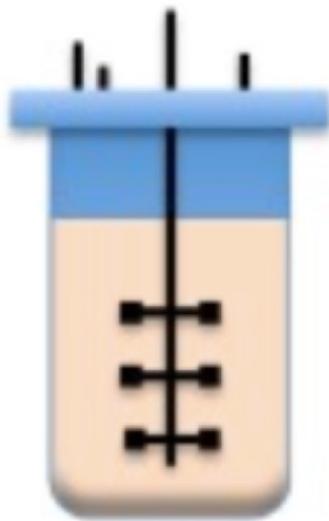


Produzione della proteina ORF8-His

Clonaggio

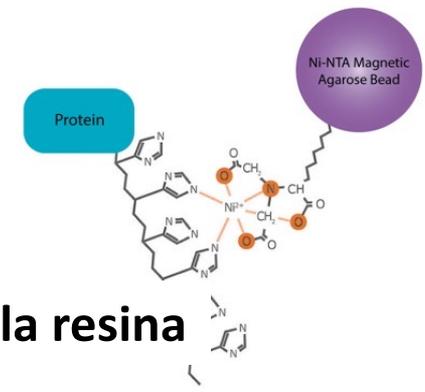


Trasformazione batterica Selezione coltura

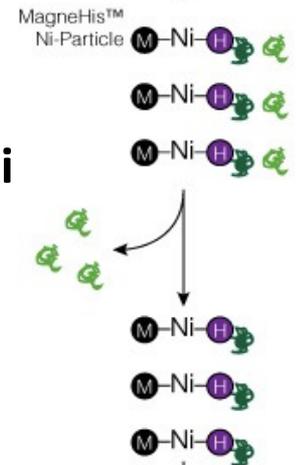


Lisi dei batteri

Legame alla resina



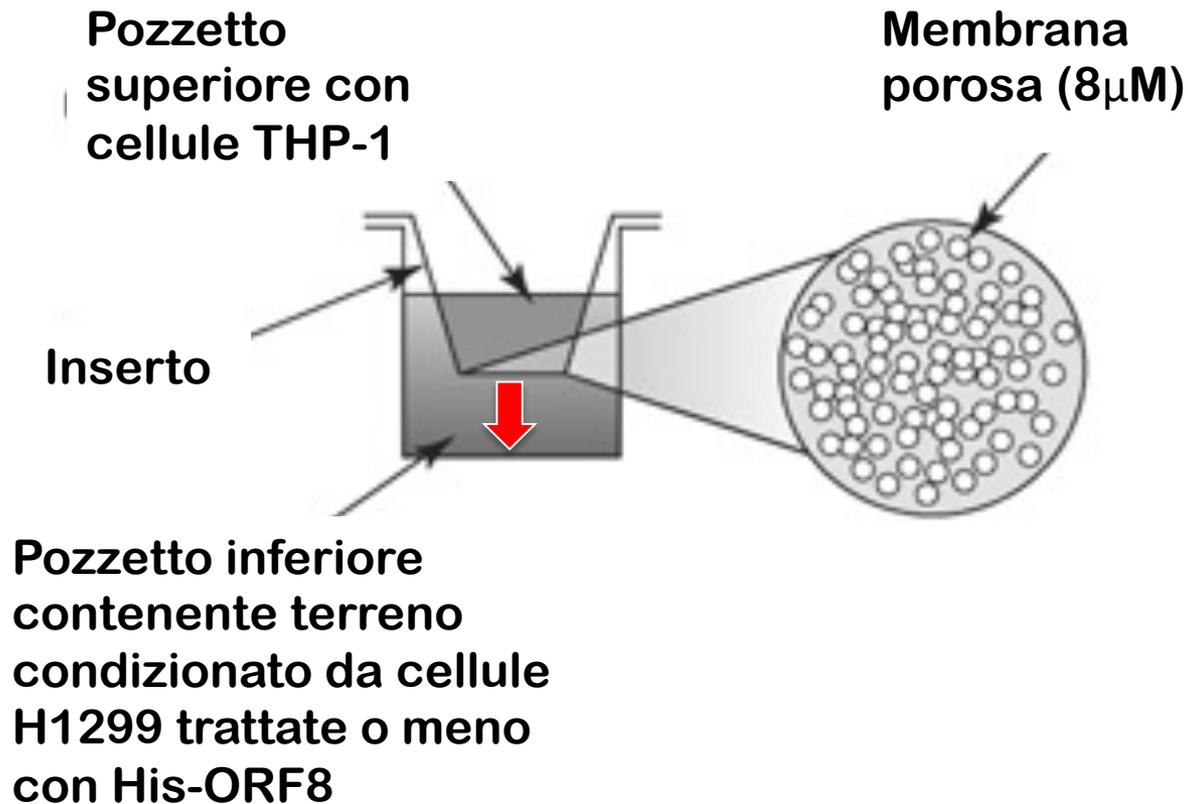
lavaggi



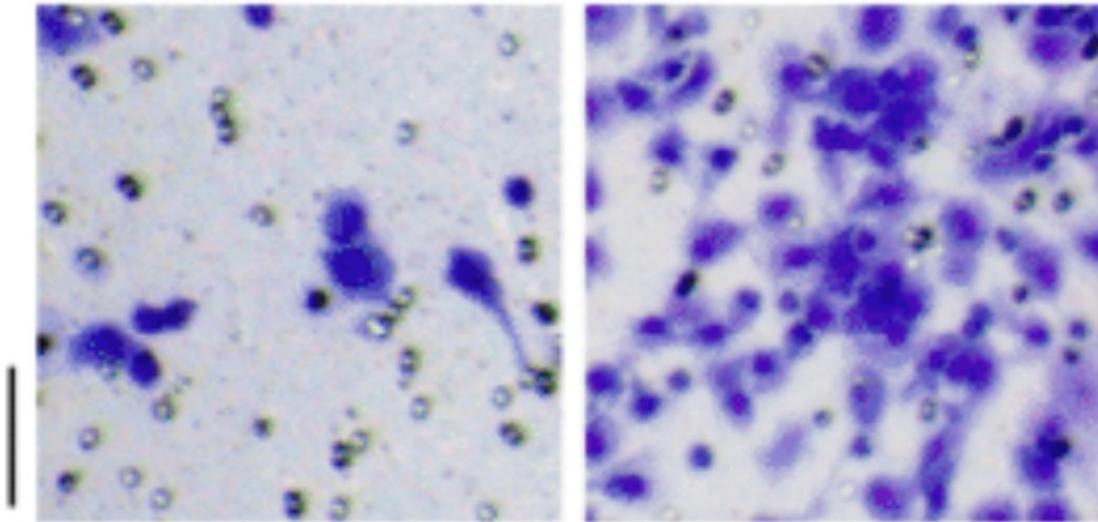
eluizione



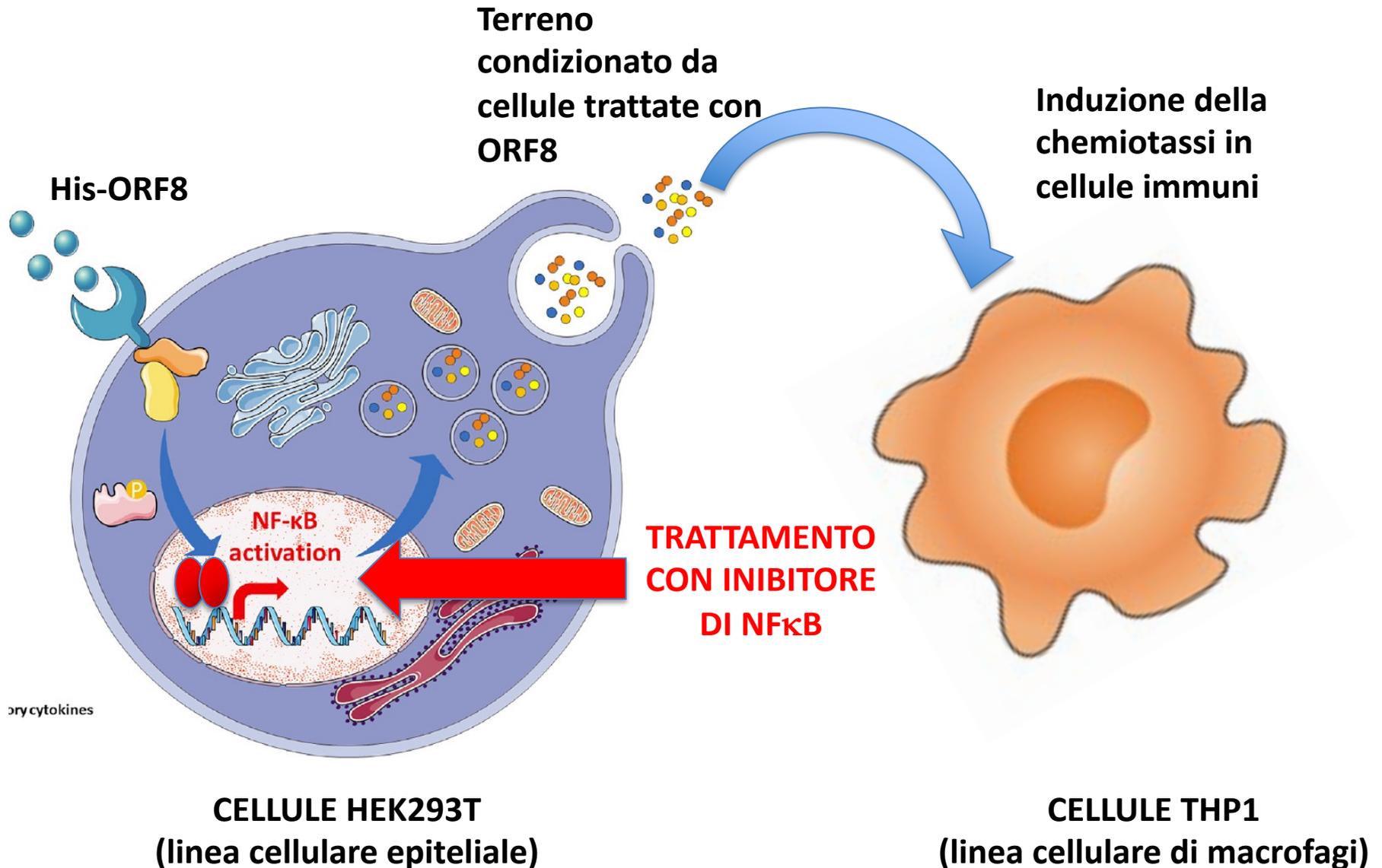
Saggi di chemiotassi: migrazione in camera di Boyden



Le cellule migrate vengono colorate e contate al microscopio ottico



Analisi del ruolo di NF- κ B



ESERCITAZIONE: Saggio di chemiotassi

STRATEGIA SPERIMENTALE:

Si vuole valutare l'effetto della proteina **Cov-2-ORF8** sulla produzione di citochine infiammatorie da parte di cellule epiteliali (**H1299**: linea cellulare di carcinoma polmonare umano) attraverso la pathway di **NFκB**. Mediante il saggio di chemiotassi si valuterà la migrazione di cellule THP-1 attraverso un supporto permeabile con pori di diametro 8 μm (**camera di Boyden**) in risposta a citochine rilasciate da cellule H1299 stimulate o meno con ORF8. Il ruolo di **NFκB** sarà valutato mediante inibizione specifica della pathway.

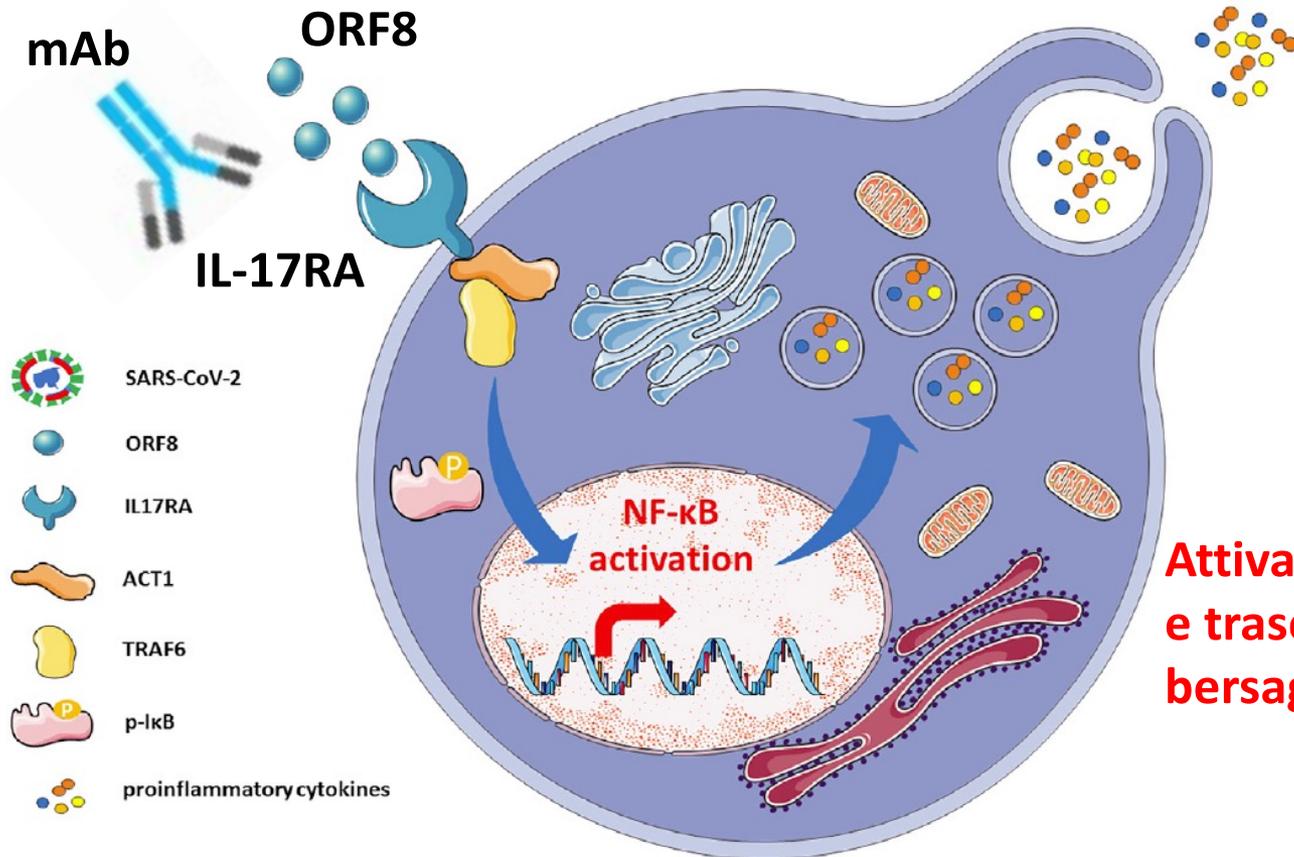
PROCEDIMENTO:

Ogni gruppo costituito da 3 studenti esaminerà la migrazione (chemiotassi) di cellule della linea THP-1 in risposta a:

- 1. Esposizione a terreno condizionato da cellule H1299 non trattate.**
- 2. Esposizione a terreno condizionato da cellule H1299 trattate con proteina His-ORF8.**
- 3. Esposizione a terreno condizionato da cellule H1299 preventivamente incubate con un inibitore di NFκB e trattate con His-ORF8.**

ESPERIMENTO 3:

Analisi della capacità di ORF8 di attivare NFκB via IL17RA



Attivazione di NF-κB e trascrizione di geni bersaglio

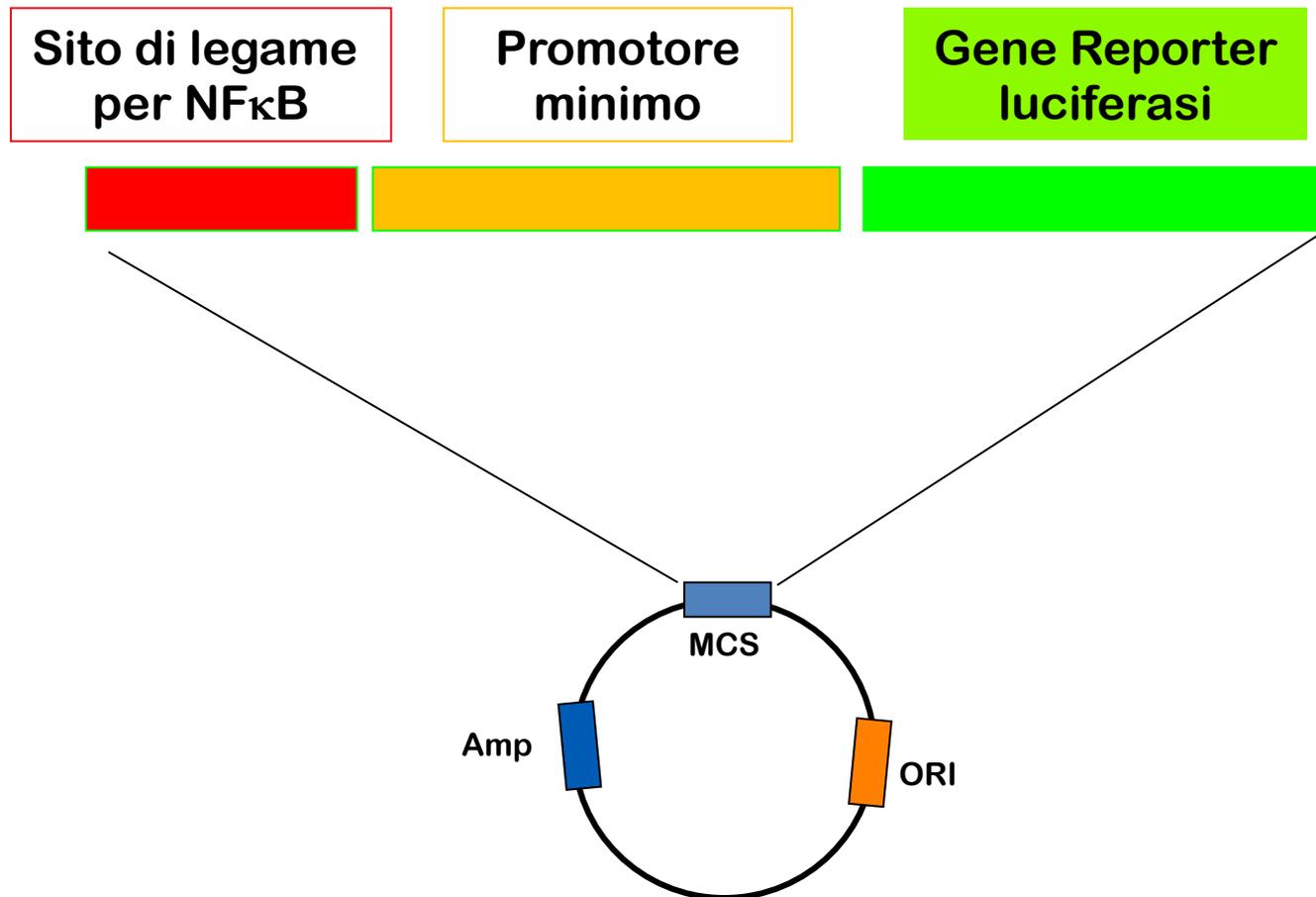
ESPERIMENTO 3:

Analisi della capacità di ORF8 di attivare NF κ B via IL17RA

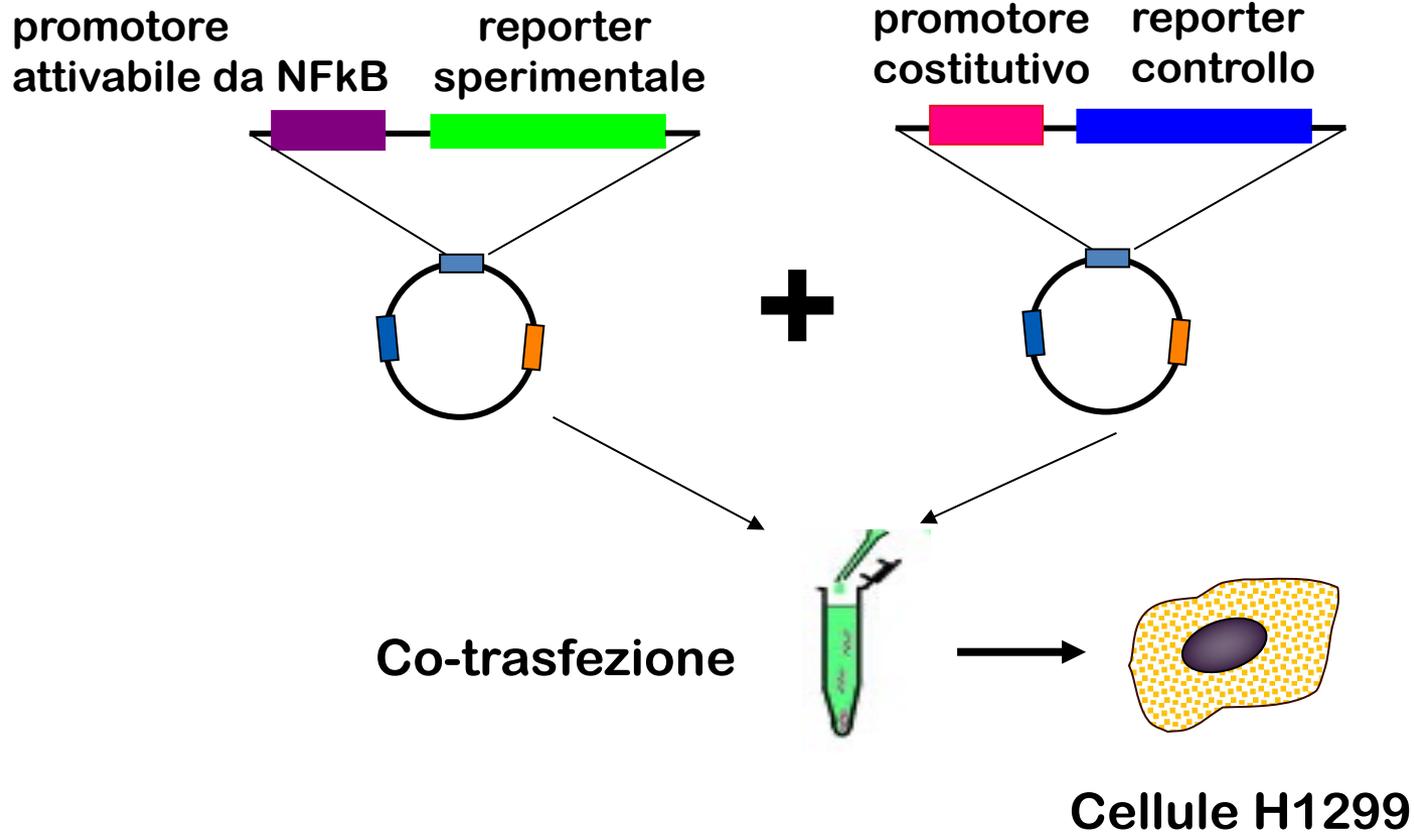
STRATEGIA SPERIMENTALE:

- 1) Scelta del modello cellulare
H1299 (linea di cellule epiteliali da polmone)
- 2) Trattamento di cellule H1299 con proteina His-ORF8 e/o Ab anti-IL17RA
- 3) Analisi dell'attivazione di NF κ B
 - Scelta del saggio: saggio di transattivazione mediante reporter
 - Scelta del reporter: luciferasi
 - Strumento per l'analisi: luminometro

Step 1: generazione del costrutto reporter
clonaggio di un promotore bersaglio di NF κ B a monte del
gene reporter luciferasi

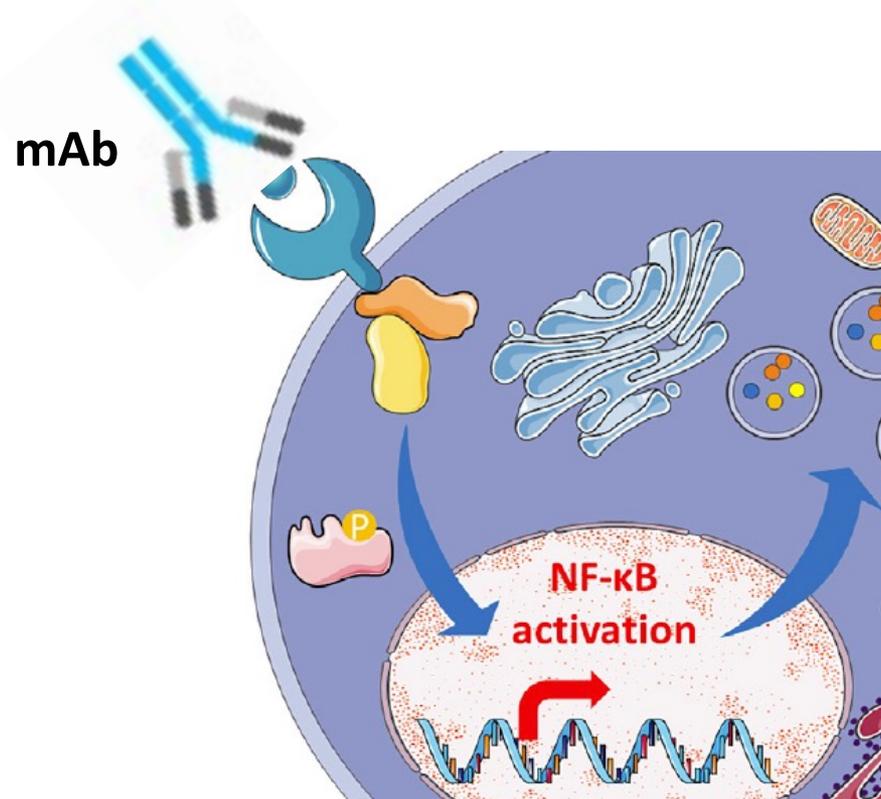


Step 2: co-trasfezione dei costrutti reporter in cellule in coltura

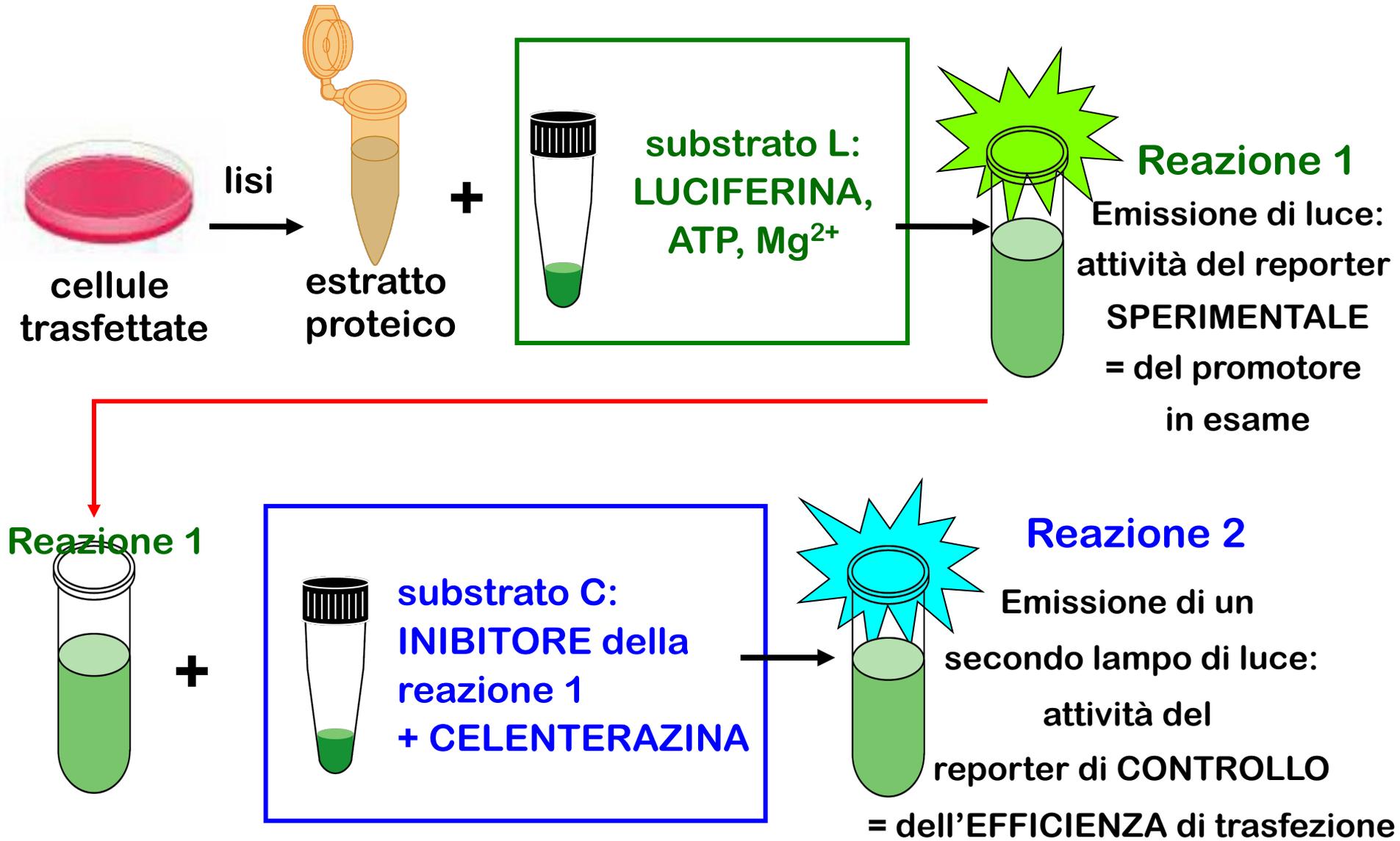


Step 3: TRATTAMENTI

- 1) cellule non trattate
- 2) cellule trattate con His-ORF8 dopo la trasfezione
- 3) cellule **incubate preventivamente** con anticorpo anti-IL17RA e successivamente con His-ORF8 (dopo la trasfezione)



STEP 4: saggi di attività dei reporter con doppio sistema reporter **F-luc/R-luc**:



STEP 5: NORMALIZZAZIONE

NORMALIZZAZIONE:

Se ho più campioni con efficienze diverse,
divido il valore misurato di ciascun campione
per la propria **efficienza** di trasfezione
(oppure per il valore letto per il reporter enzimatico)

STEP 6:

**Analisi e discussione dei risultati, conclusioni,
disegno di strategie sperimentali future**

STEP 6:

**Analisi e discussione dei risultati, conclusioni,
disegno di strategie sperimentali future**

**CHE TIPO DI ESPERIMENTI FARESTE VOI A QUESTO
PUNTO?**