

**Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche**

**AA 2020-2021**

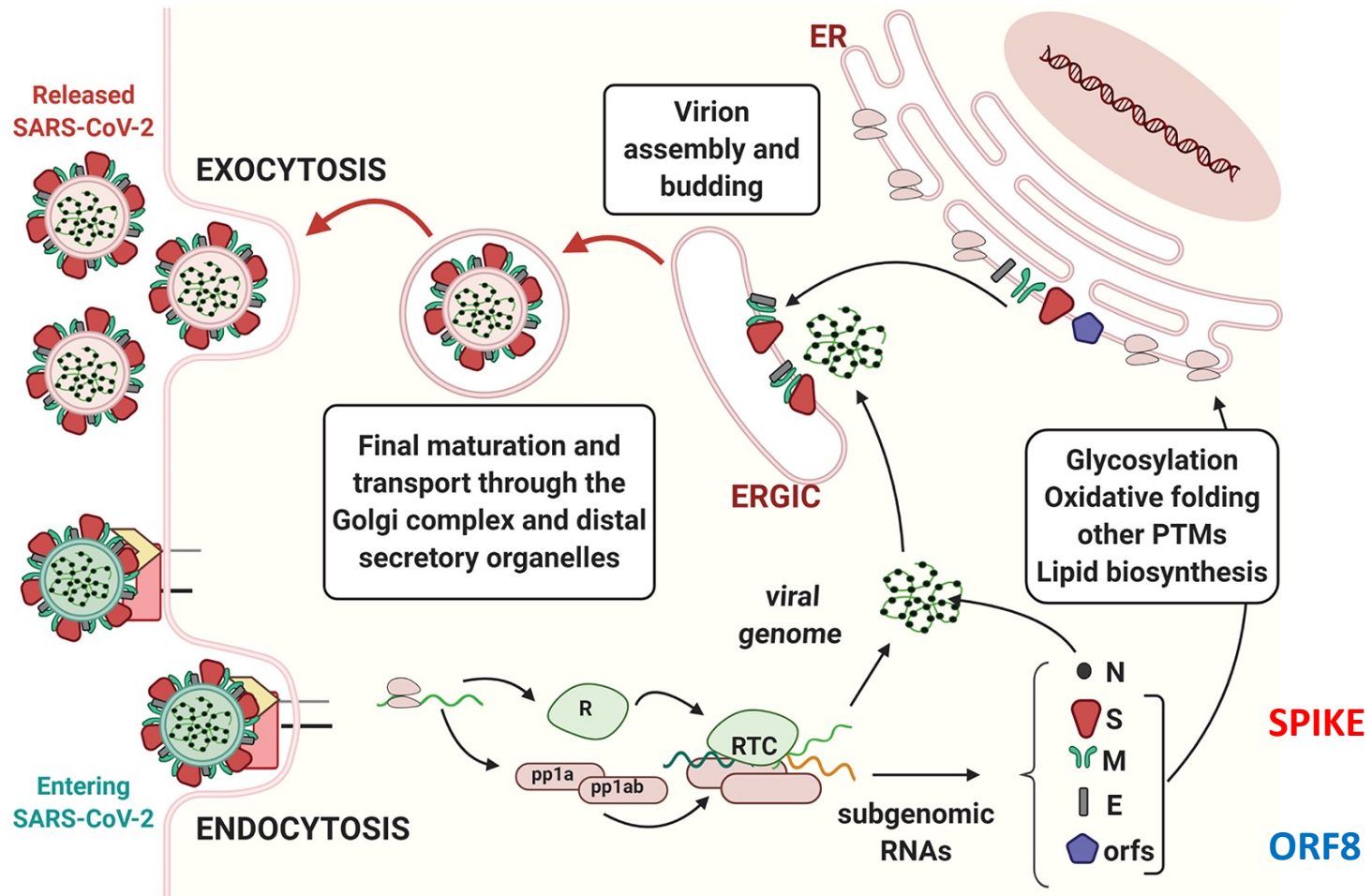
**Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare**

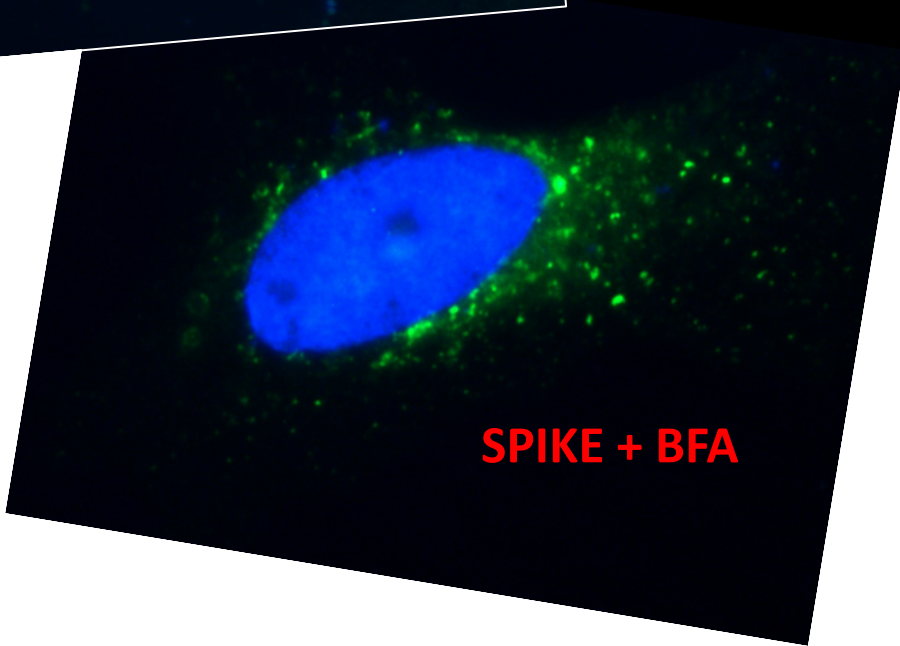
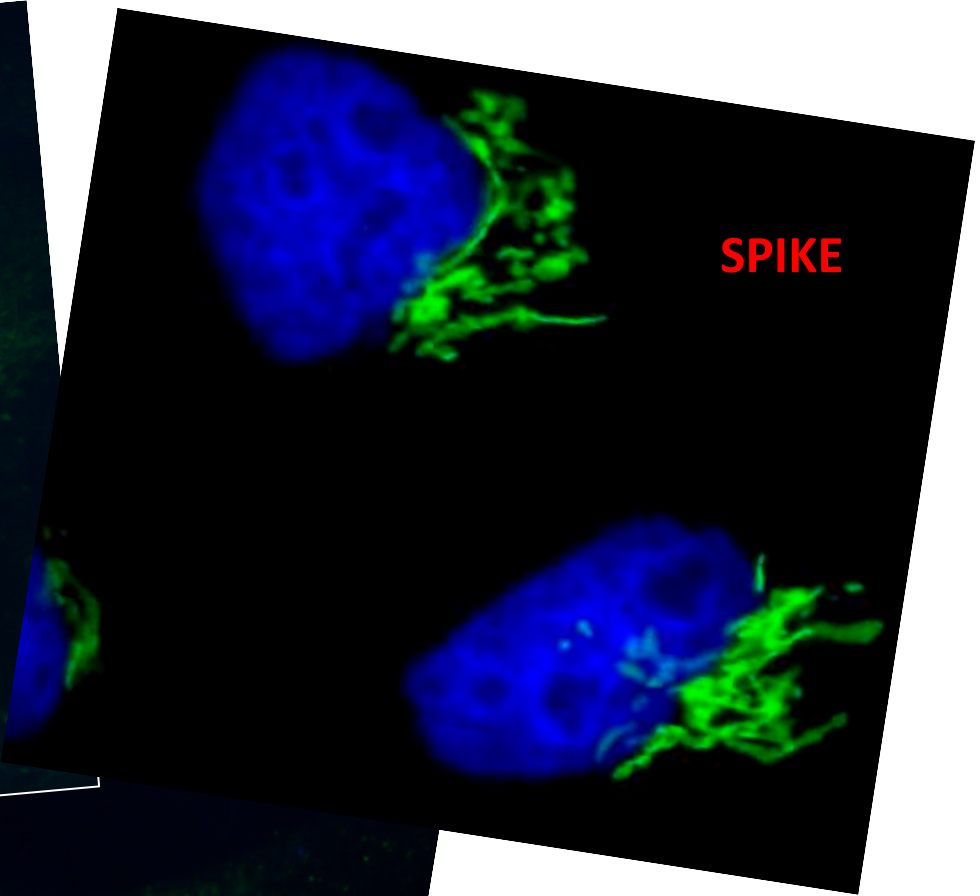
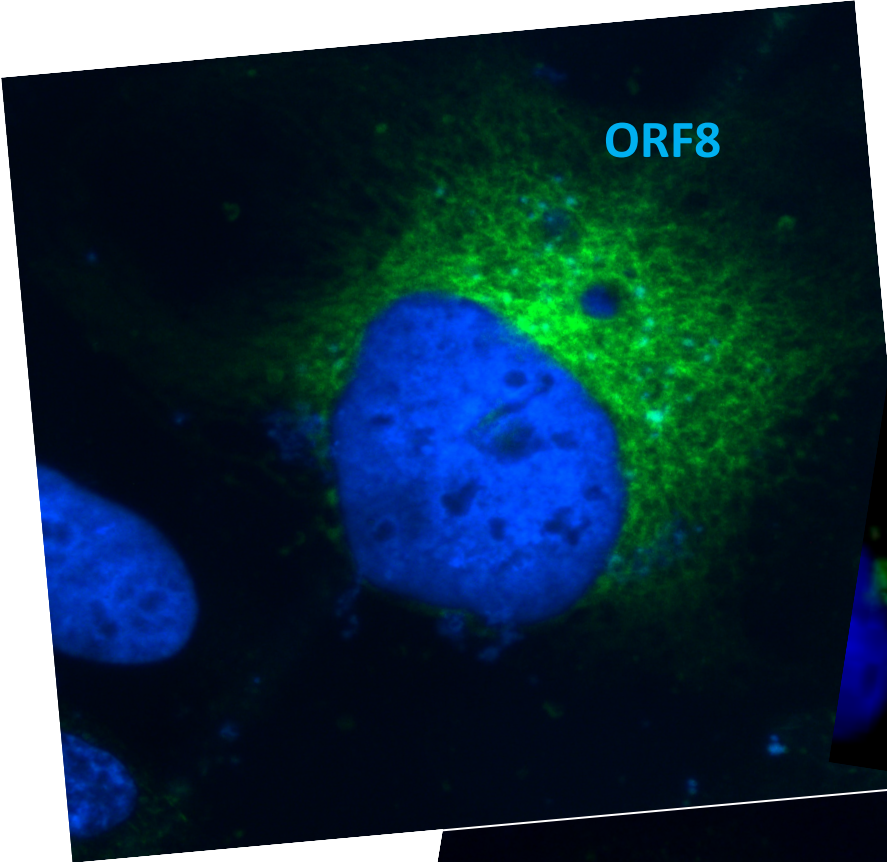
**Lezione 12**

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

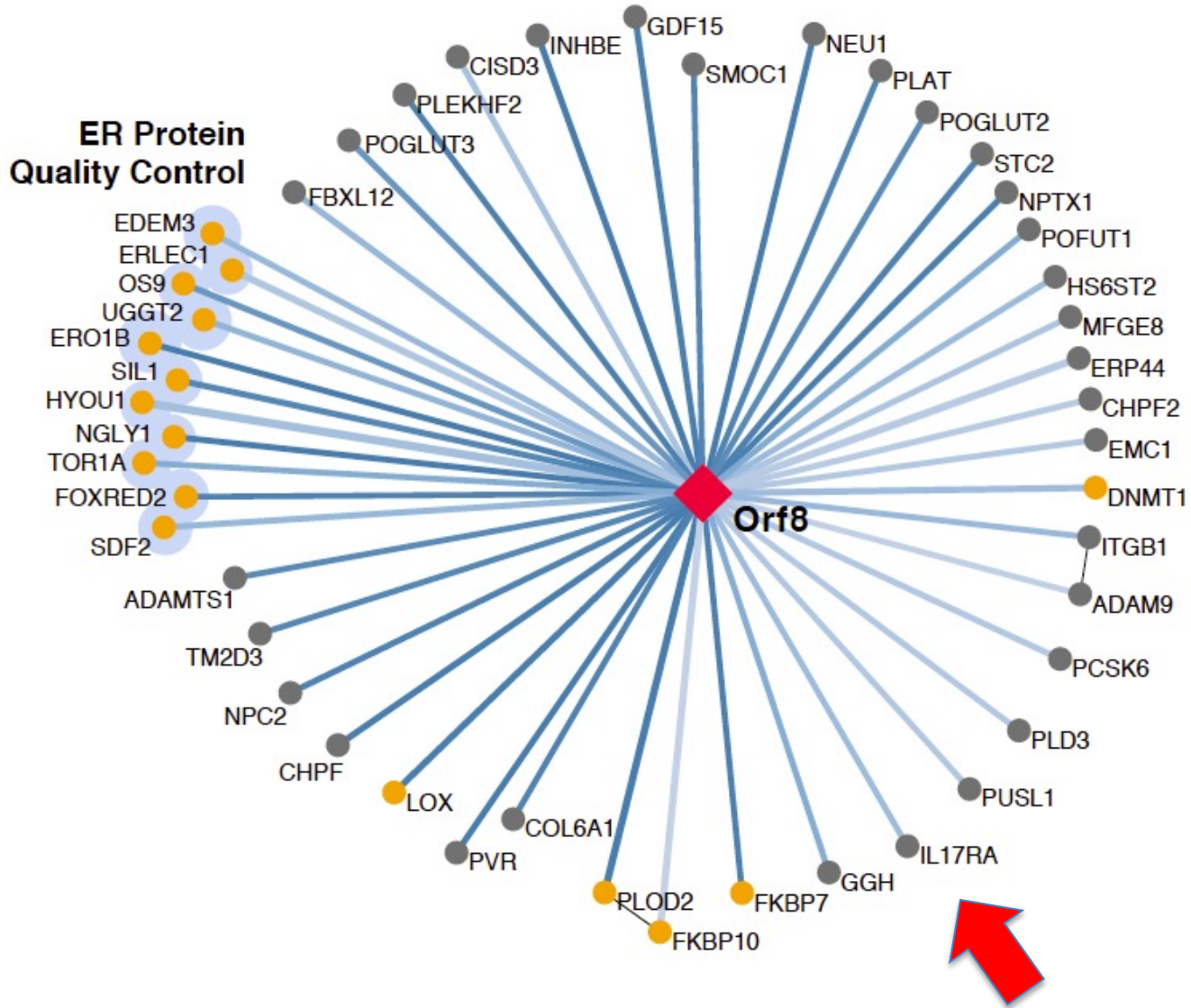
**APPROCCIO SPERIMENTALE:  
ANALISI DELLA LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE E  
DELL'INTERATTOMA DELLE PROTEINE VIRALI**

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



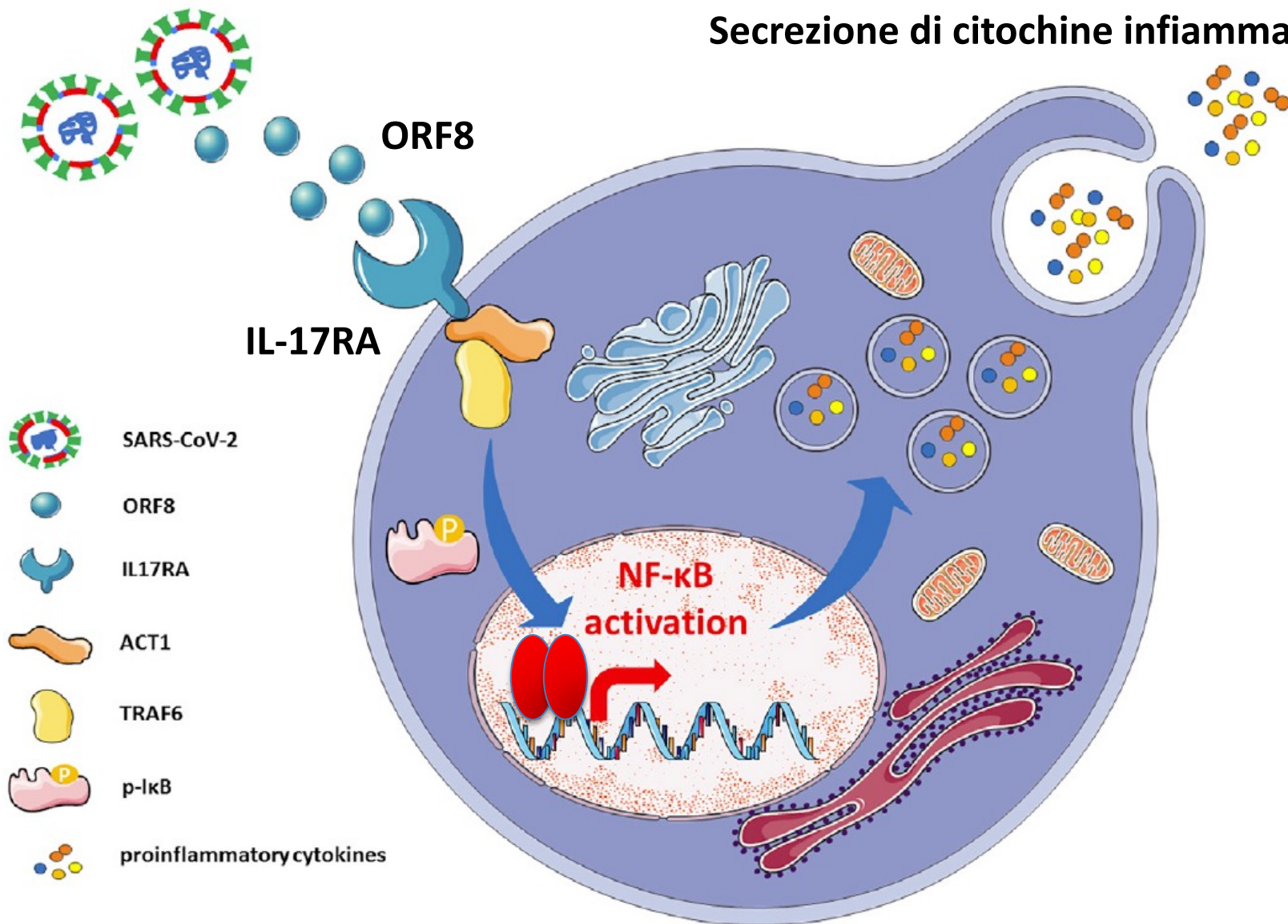


# Interattoma di ORF8

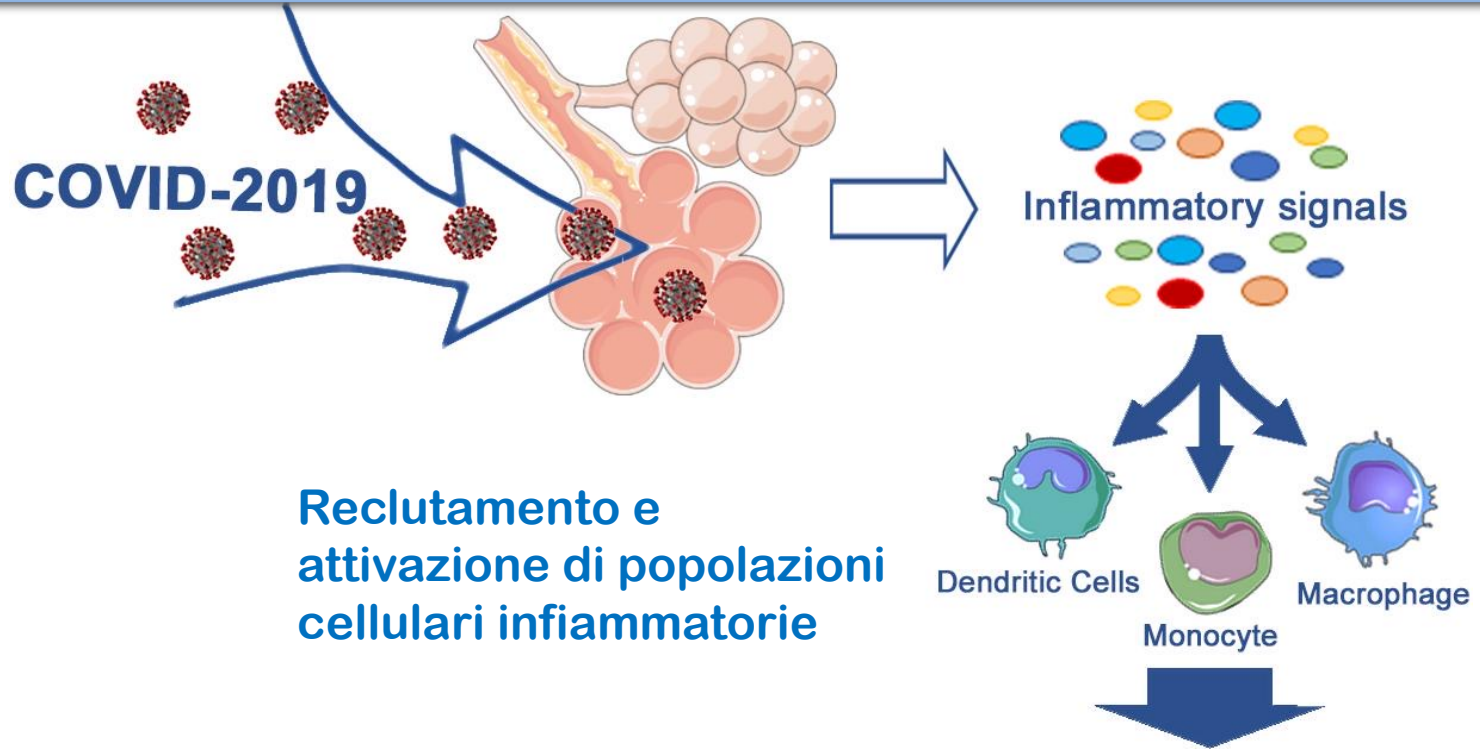


# ORF8 causa il reclutamento di cellule infiammatorie

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 diagram shows a grey, swirling tornado-like structure representing a "CYTOKINE STORM", with several colorful dots (red, blue, yellow, green) embedded within it. A large white arrow points from this storm towards the "OUTCOME" text on the left, which lists the severe clinical consequences of the storm: ARDS, Multi-organ failure, Hyperinflammation syndrome, and Death.

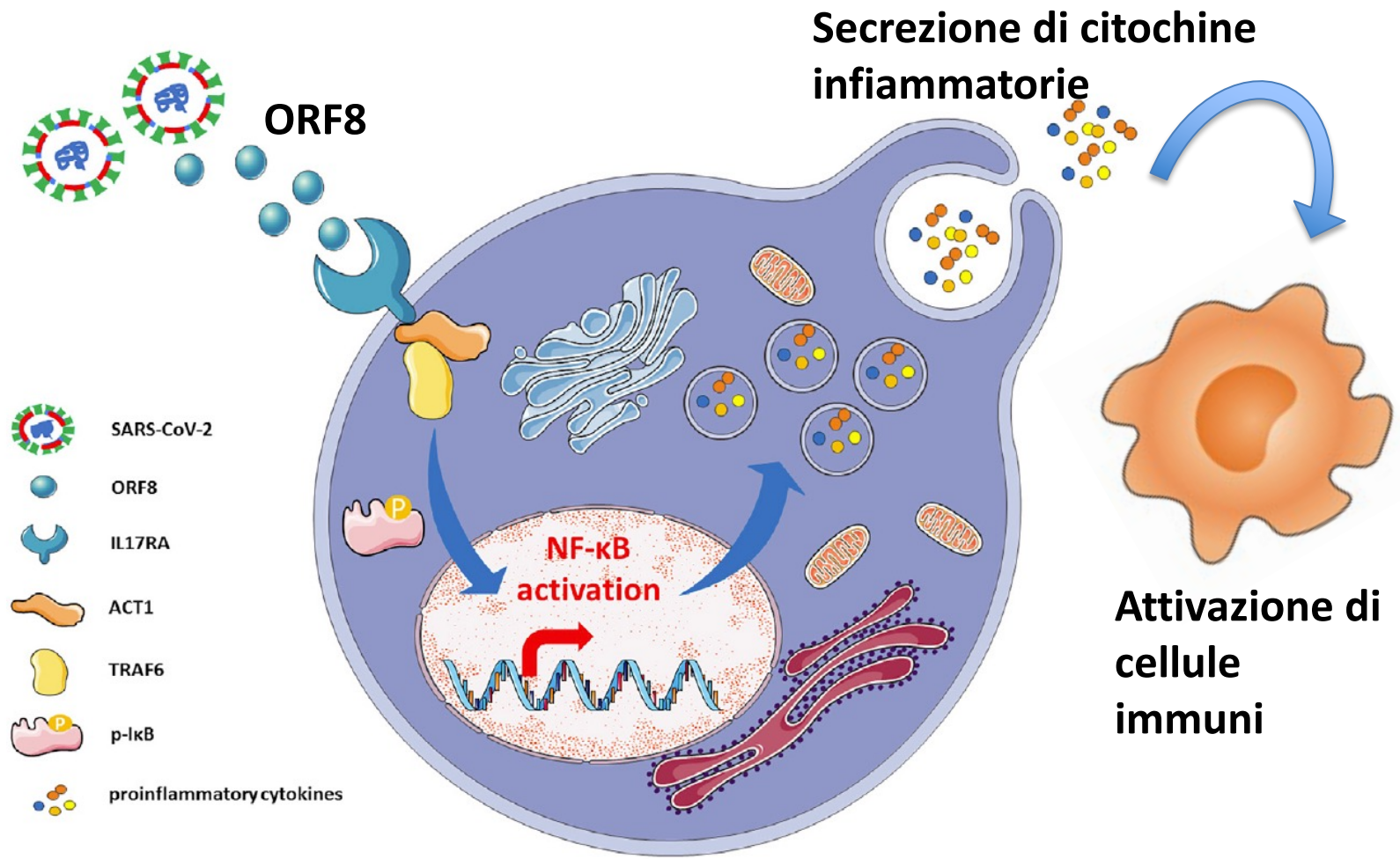
**APPROCCIO SPERIMENTALE:  
ANALISI DELL'ATTIVITA' PRO-INFIAMMATORIA DI ORF8**

- 1) Analisi della capacità di ORF8 di indurre attivazione di cellule infiammatorie via NF $\kappa$ B pathway
- 2) Analisi della capacità di ORF8 di attivare NF $\kappa$ 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 NF $\kappa$ B**

### **STRATEGIA SPERIMENTALE:**

#### **1) Scelta dei modelli cellulari**

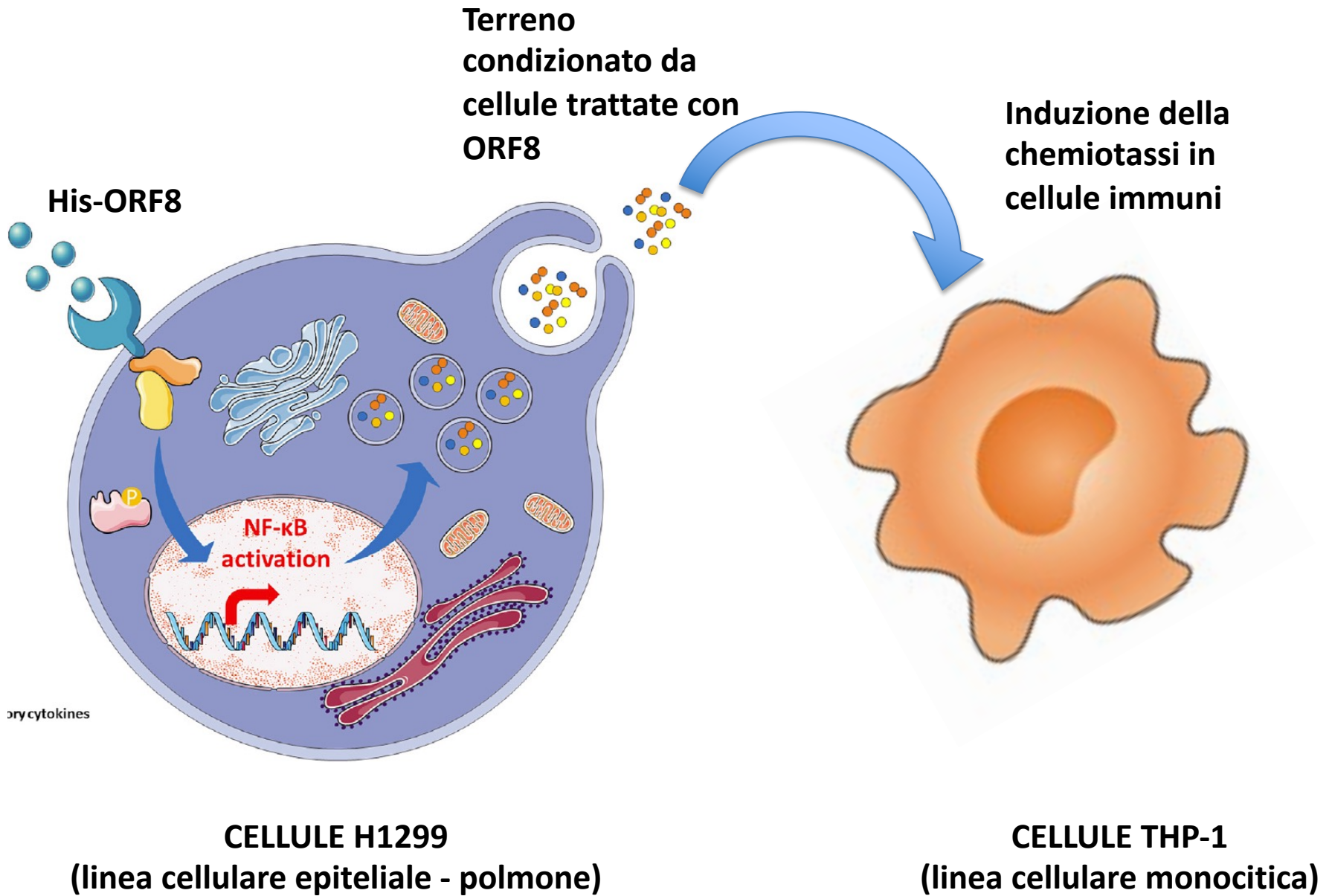
Cellule trattate con ORF8: H1299 (linea di cellule epiteliali – origine polmone)

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

#### **2) Trattamento di cellule H1299 con proteina His-ORF8**

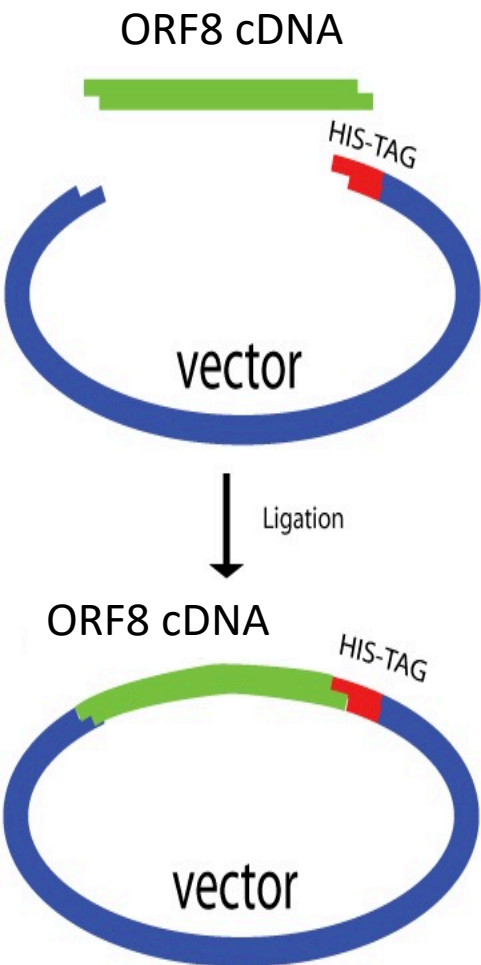
#### **3) Prelievo del terreno condizionato da cellule H1299 e analisi dell'induzione di chemiotassi in cellule THP-1**

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

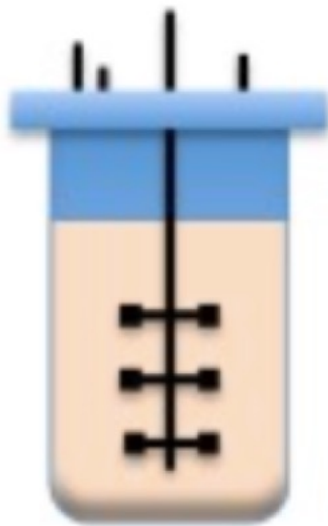


# Produzione della proteina ORF8-His

## Clonaggio

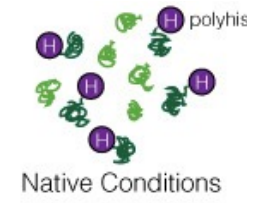
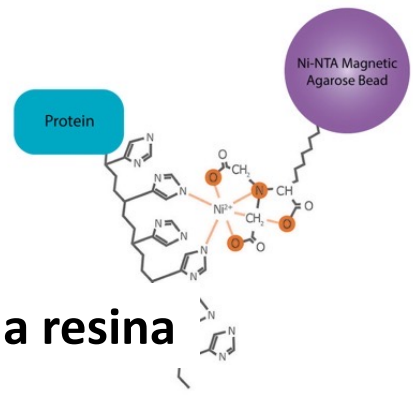


## Trasformazione batterica Selezione coltura

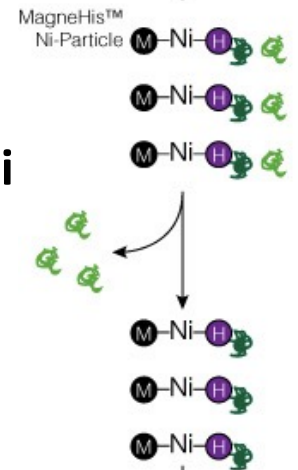


## Lisi dei batteri

## Legame alla resina



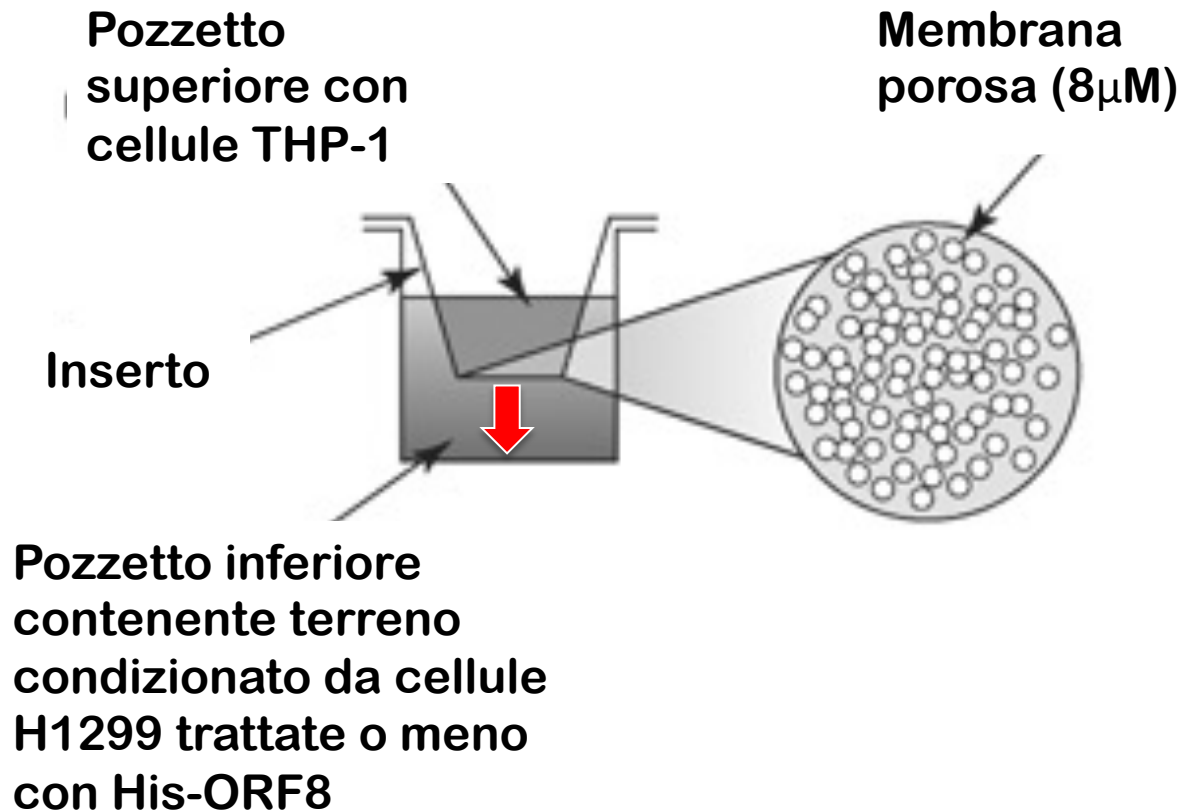
## lavaggi



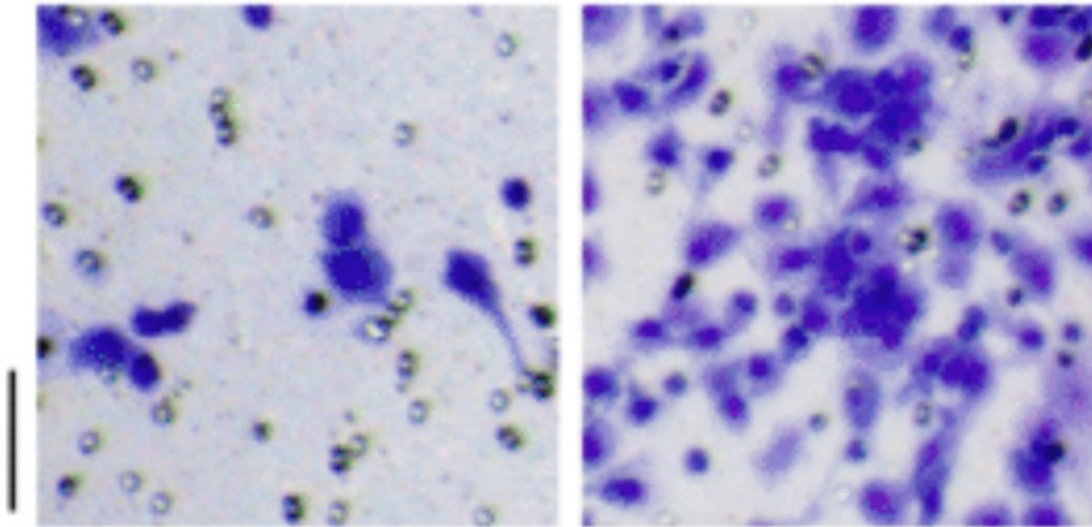
## eluizione



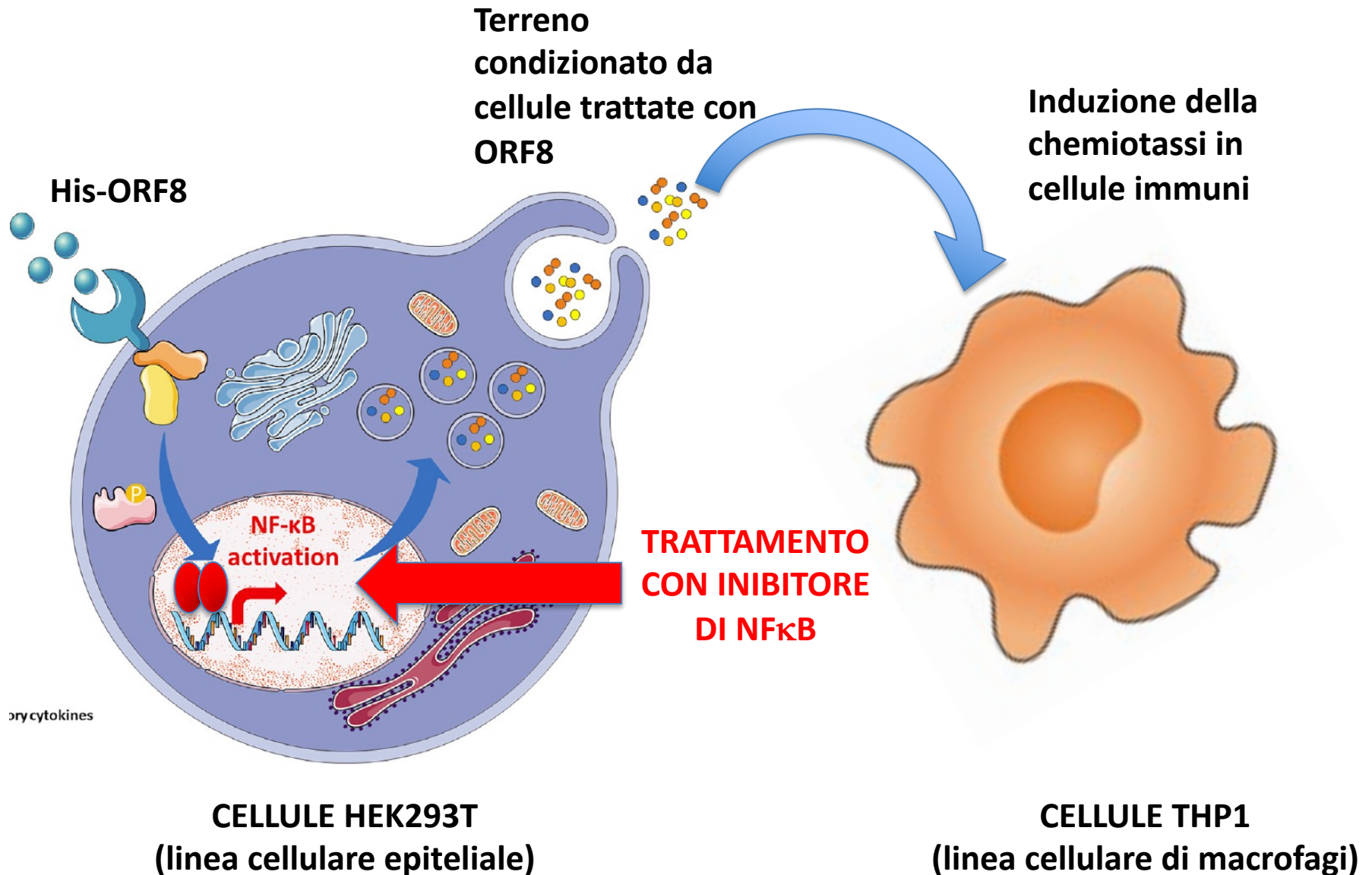
## Saggi di chemiotassi: migrazione in camera di Boyden



**Le cellule migrate vengono colorate e contate al microscopio ottico**



# Analisi del ruolo di NF- $\kappa$ 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  $\text{NF}\kappa\text{B}$ . Mediante il saggio di chemiotassi si valuterà la migrazione di cellule THP-1 attraverso un supporto permeabile con pori di diametro 8  $\mu\text{m}$  (**camera di Boyden**) in risposta a citochine rilasciate da cellule H1299 stimulate o meno con ORF8. Il ruolo di  **$\text{NF}\kappa\text{B}$**  sarà valutato mediante inibizione specifica della pathway.

### **PROCEDIMENTO:**

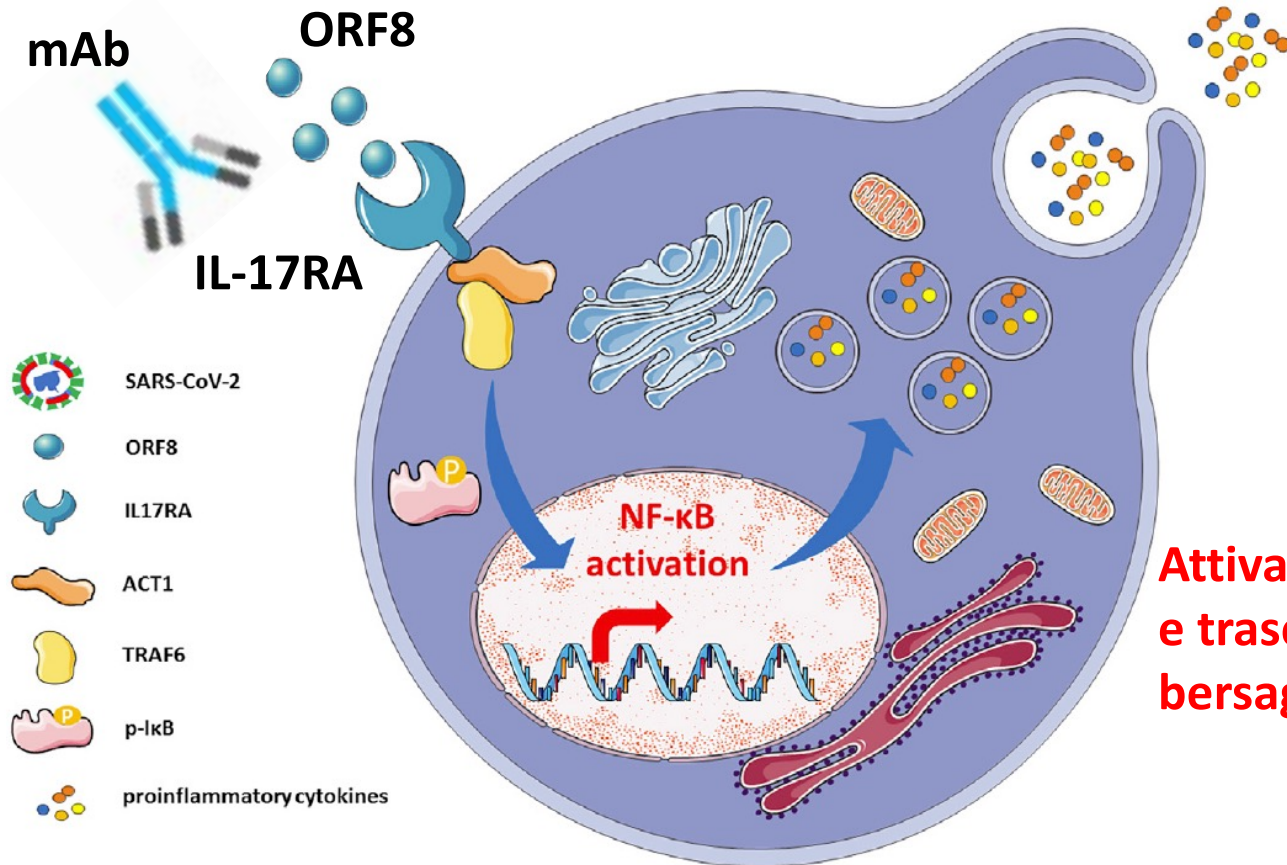
**Ogni gruppo costituito da 3 studenti** esaminerà la migrazione (chemiotassi) di cellule della linea THP-1 in risposta a:

- 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  $\text{NF}\kappa\text{B}$  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**

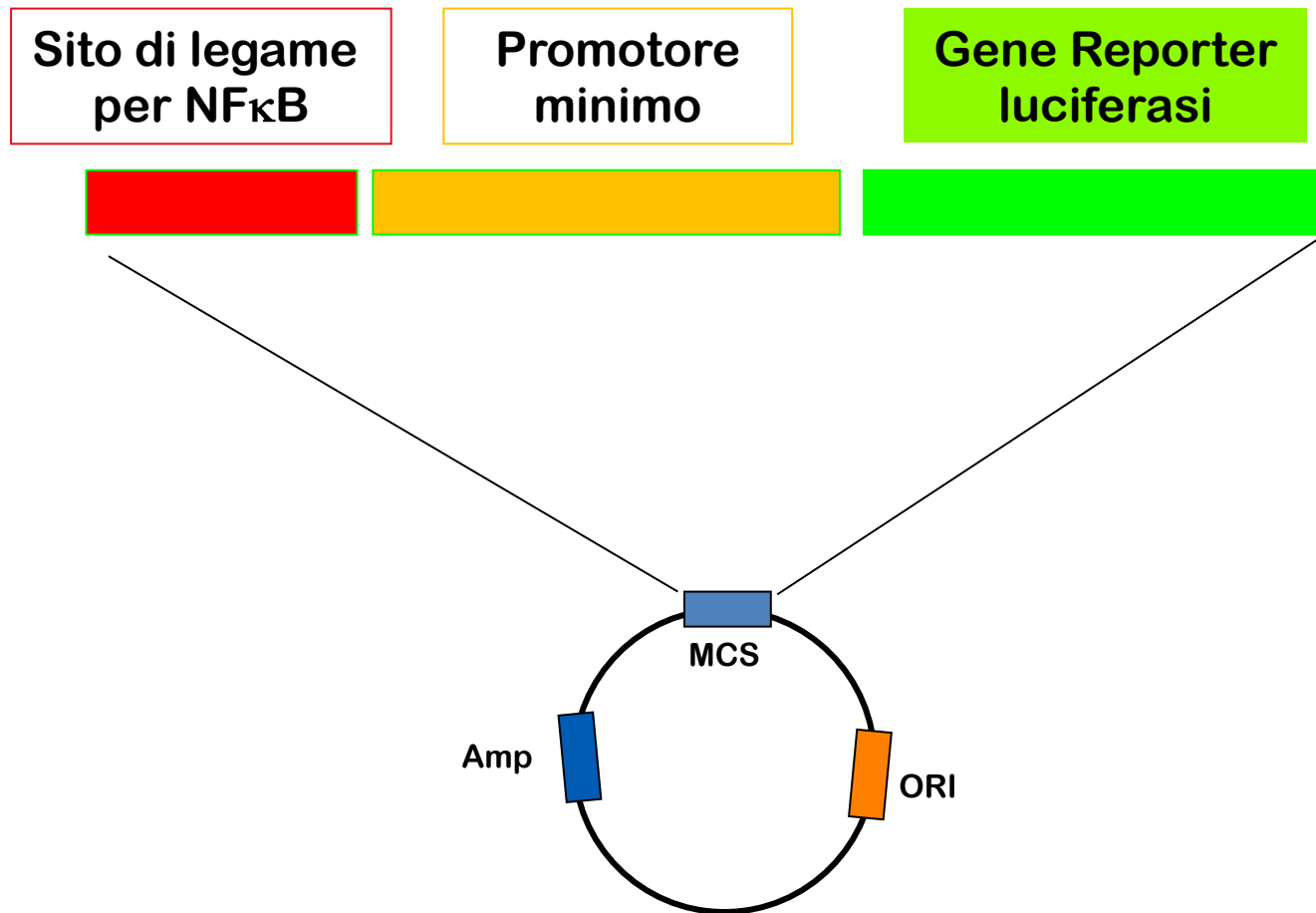
## **ESPERIMENTO 3:**

### **Analisi della capacità di ORF8 di attivare NF $\kappa$ B via IL17RA**

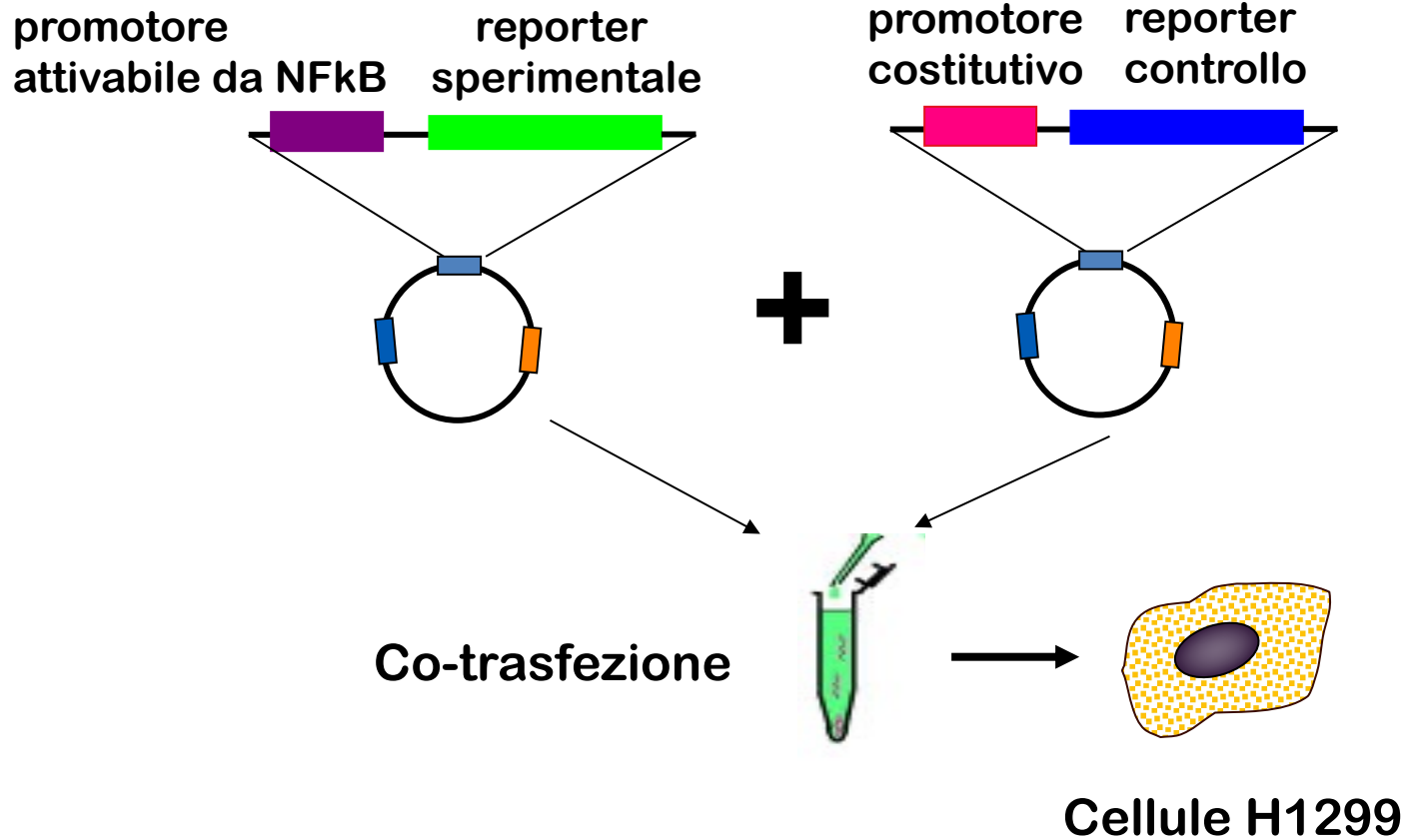
#### **STRATEGIA SPERIMENTALE:**

- 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 $\kappa$ 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 $\kappa$ B a monte del**  
**gene reporter luciferasi**

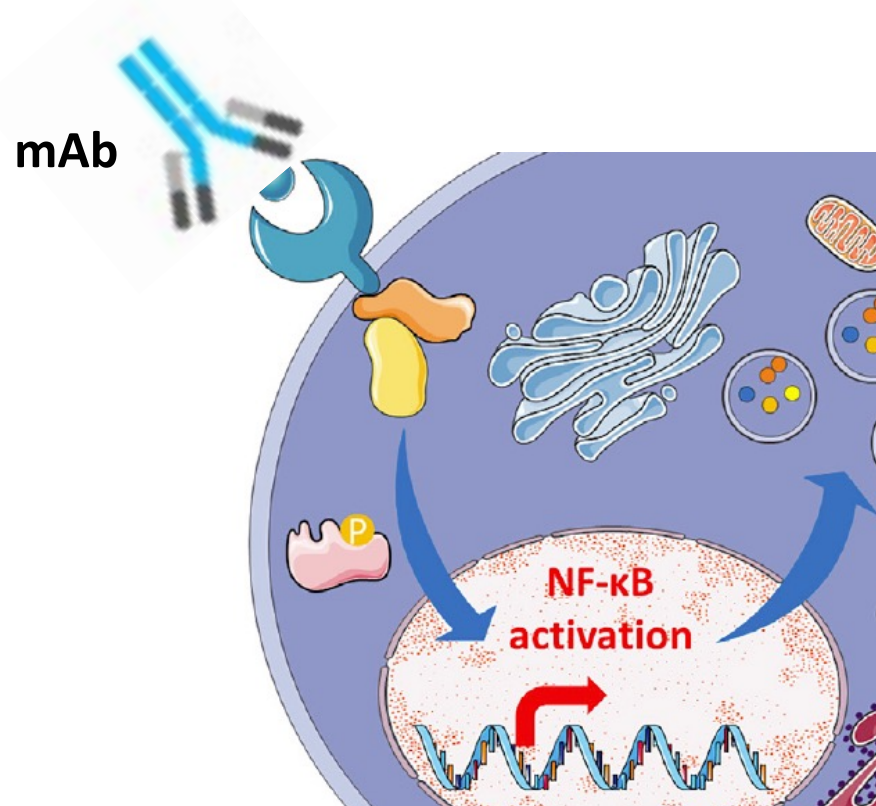


## Step 2: co-trasfezione dei costrutti reporter in cellule in coltura

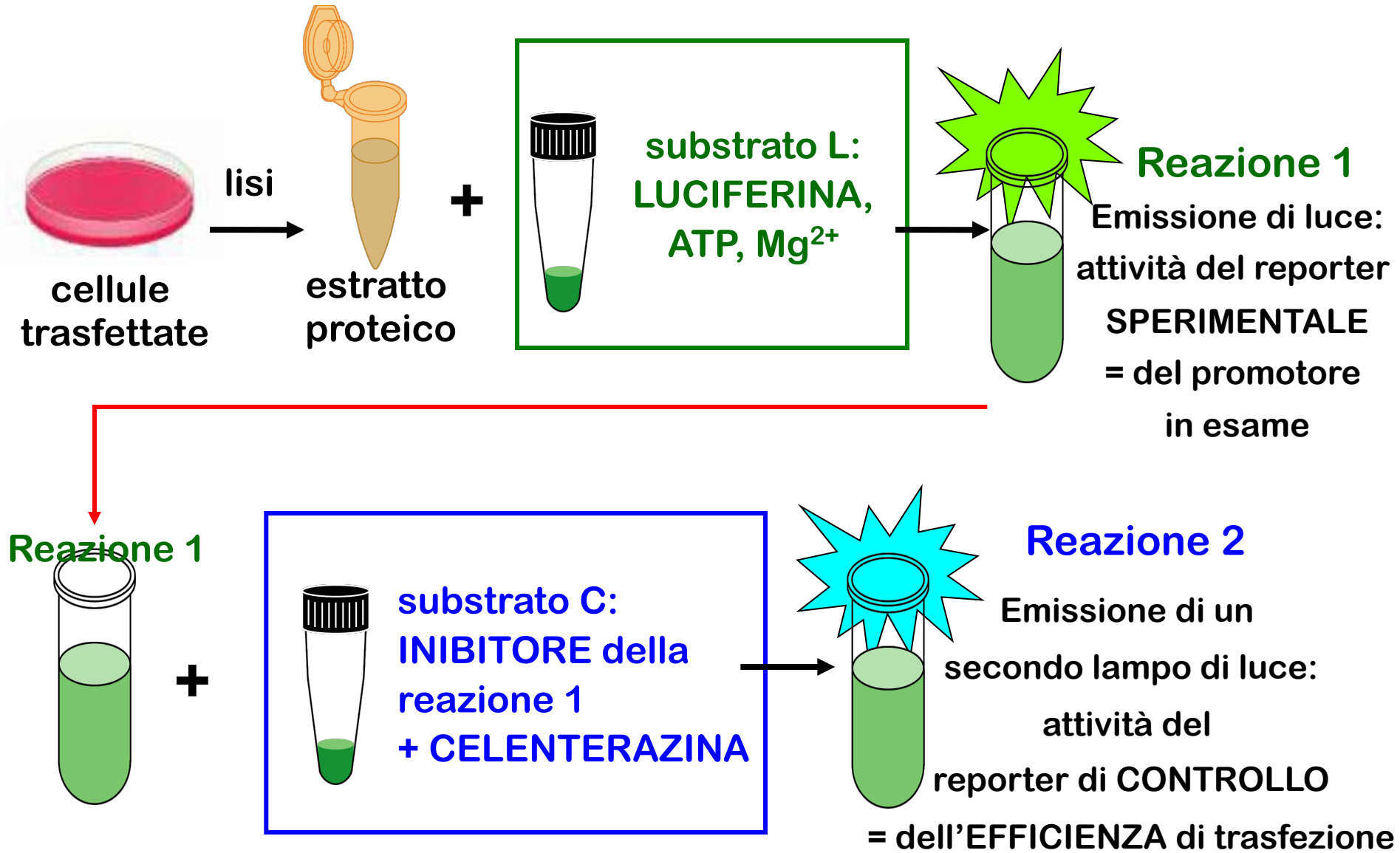


## Step 3: TRATTAMENTI

- 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?**