

CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche

Corso di Biotecnologie Cellulari

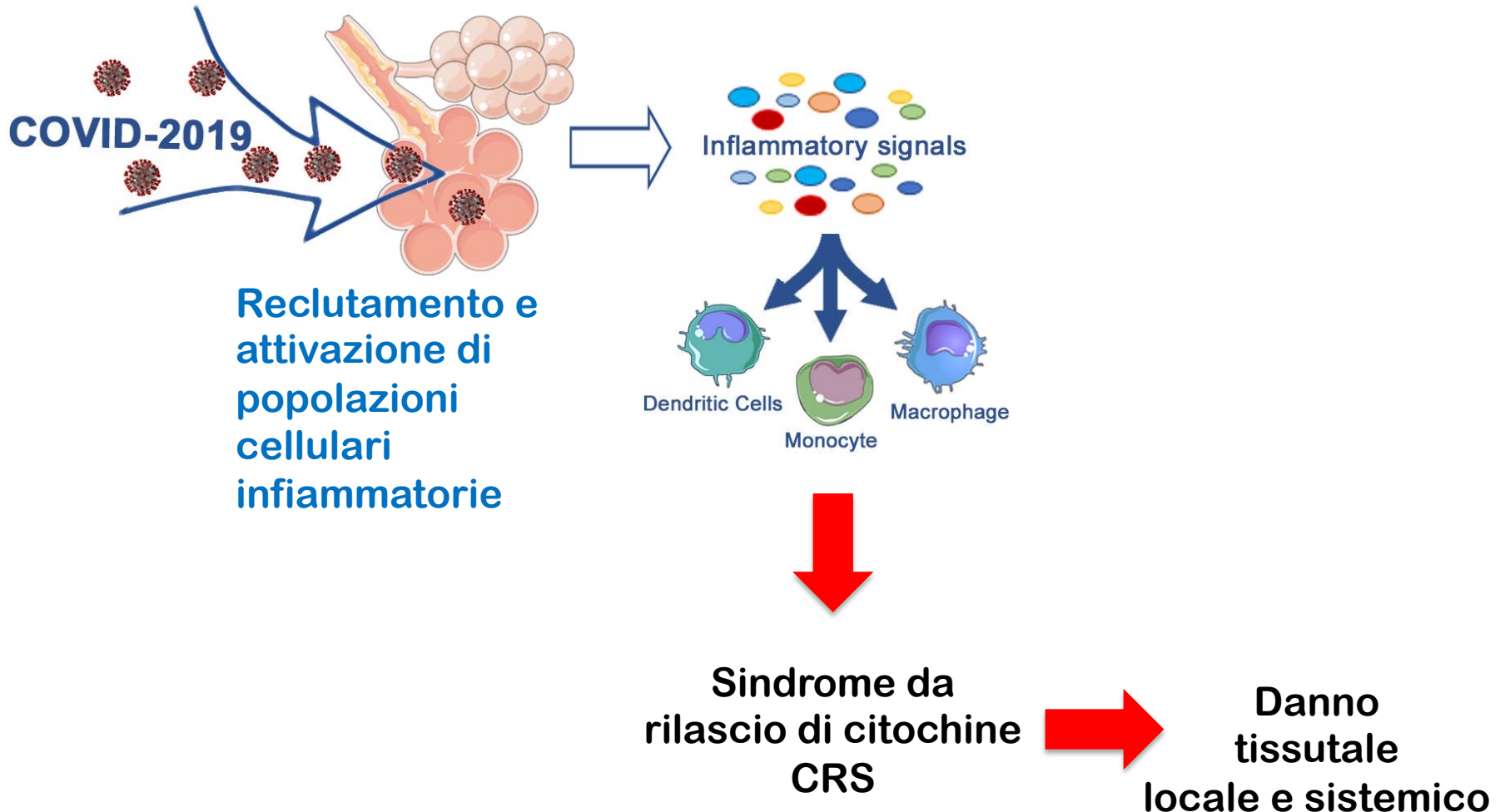
Lezione 3

SVILUPPO DI UN PROGETTO DI RICERCA

- 1) Stato dell'arte
- 2) Domande aperte
- 3) Ipotesi
- 4) Obiettivi
- 5) Approccio sperimentale
- 6) Risultati attesi
- 7) Rischi e possibili soluzioni

IPOSTESI

L'interazione tra specifici **fattori virali e cellulari** scatena nell'ospite una **risposta infiammatoria** responsabile della patologia COVID severa.

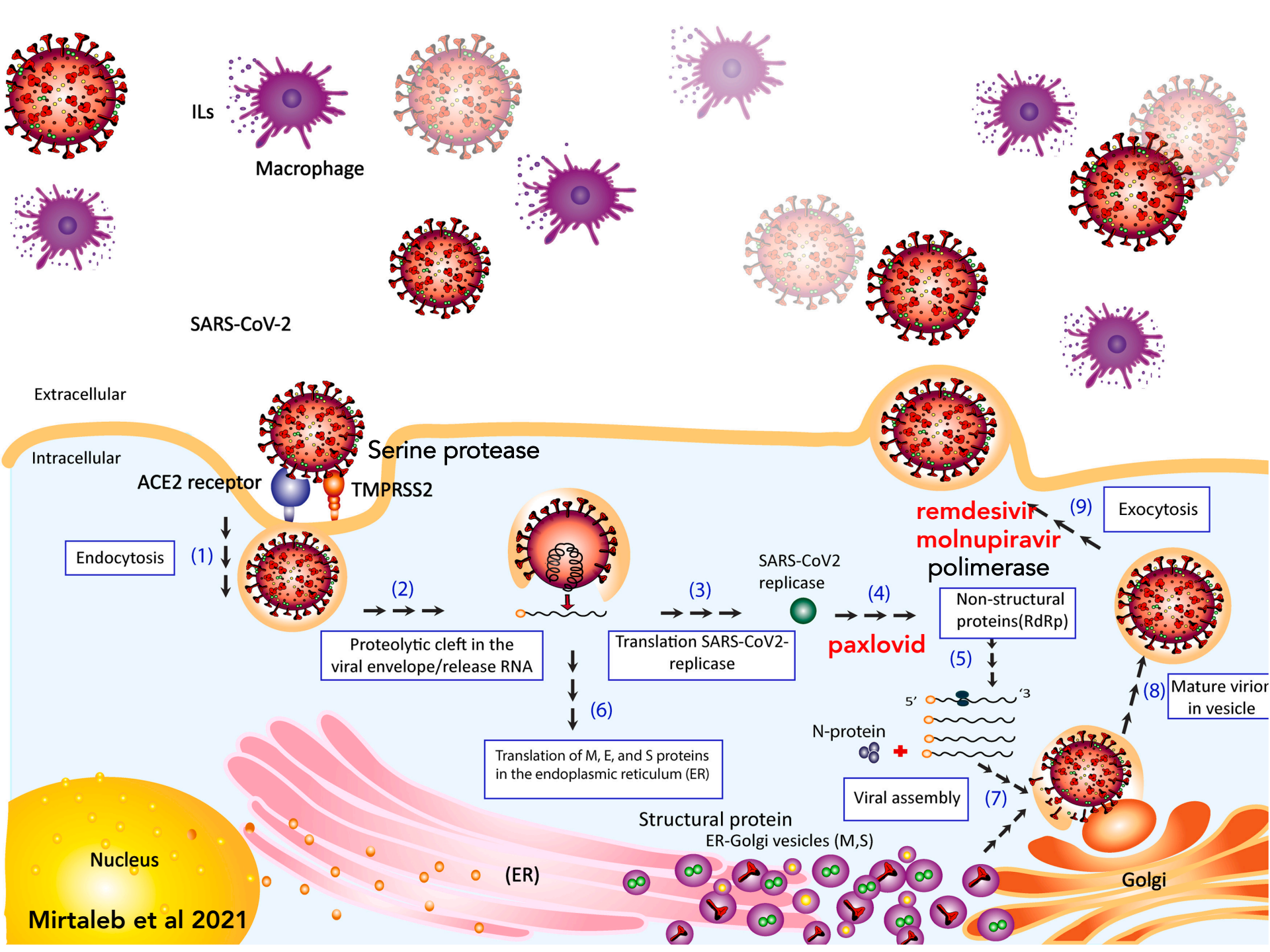


OBIETTIVI

1. Identificare i **fattori** (virali e cellulari) e i **meccanismi** implicati nell'induzione dell'infiammazione;
2. Comprendere se tali meccanismi causino **danni a tessuti** non infettati dal virus
3. Comprendere se i fattori identificati possano rappresentare markers **prognostici**
4. Identificare **bersagli terapeutici** “trattabili” per le forme severe/croniche della patologia.

APPROCCIO SPERIMENTALE

1. Analisi delle **interazioni** dei fattori (proteine) virali con le proteine cellulari, per identificare candidati responsabili dell'innesco dell'infiammazione.
2. Selezionato un **candidato** (interazione tra fattori), studiare gli effetti sulla risposta infiammatoria e sulla tossicità cellulare (in vitro) e i meccanismi coinvolti.
3. **Inibizione** dei meccanismi identificati e analisi delle conseguenze sui processi infiammatori e sulla tossicità cellulare.



ILs

Macrophage

SARS-CoV-2

Extracellular

Intracellular

ACE2 receptor

Serine protease

TMPRSS2

Endocytosis

(1)

(2)

Proteolytic cleft in the viral envelope/release RNA

(3)

Translation SARS-CoV2-replicase

(4)

SARS-CoV2 replicase

paxlovid

Non-structural proteins(RdRp)

remdesivir
molnupiravir
polimerase

(9)

Exocytosis

(6)

Translation of M, E, and S proteins in the endoplasmic reticulum (ER)

(5)

N-protein

5'

3'

Viral assembly

(7)

Mature virion in vesicle

(8)

Structural protein

ER-Golgi vesicles (M,S)

(ER)

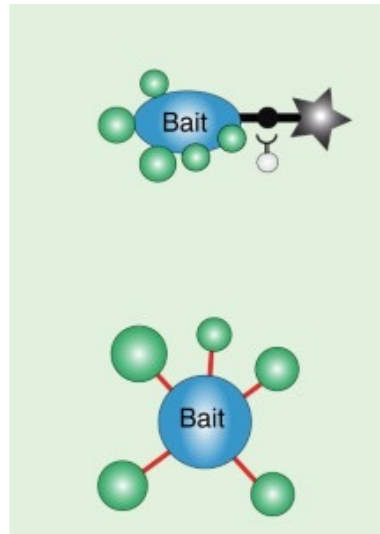
Golgi

Nucleus

Descrizione dell' APPROCCIO SPERIMENTALE

1. Analisi delle **interazioni** dei fattori virali con le proteine cellulari, per identificare candidati responsabili dell'innesco dell' infiammazione.

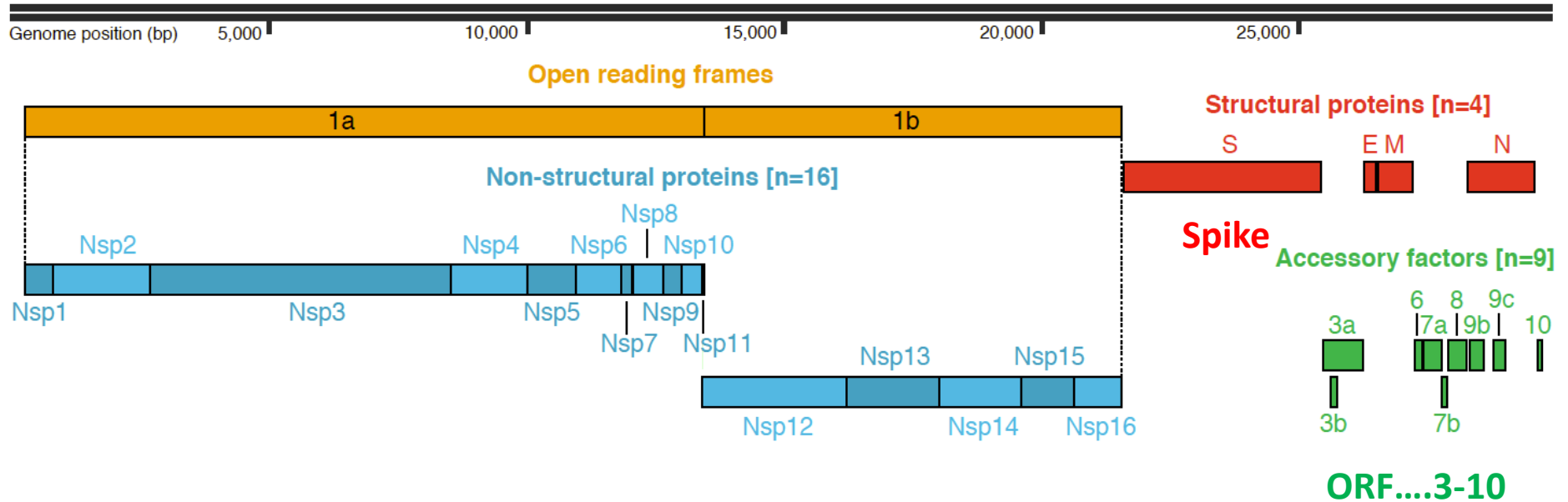
A tale scopo le proteine virali dovranno essere prodotte e fatte interagire con il proteoma cellulare per identificare e studiare specifiche interazioni.



Analisi dell'interattoma
(proteine cellulari associate)
delle proteine virali

Esistono 29 diversi ORFs nel genoma di SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 Genome



APPROCCIO SPERIMENTALE - DETTAGLIO

- 1. SCELTA DEL MODELLO CELLULARE**
- 2. DISEGNO DELL'ESPERIMENTO**
- 3. SCELTA DEI SAGGI**
- 4. SCELTA DEGLI STRUMENTI**

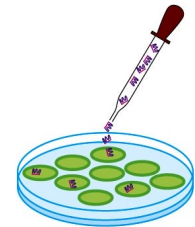
SCELTA DEL MODELLO CELLULARE

FATTORI DA CONSIDERARE:

- esperimenti **high-throughput**: richiesto modello con facilità di mantenimento in coltura e rapidità di amplificazione



- espressione delle proteine virali: richiesta facilità di **trasfezione** con DNA esogeno



- visualizzazione della corretta **localizzazione** delle proteine: richiesta facilità di visualizzazione dei compartimenti subcellulari

- **Coltura 2D o 3D ? ORIGINE?**

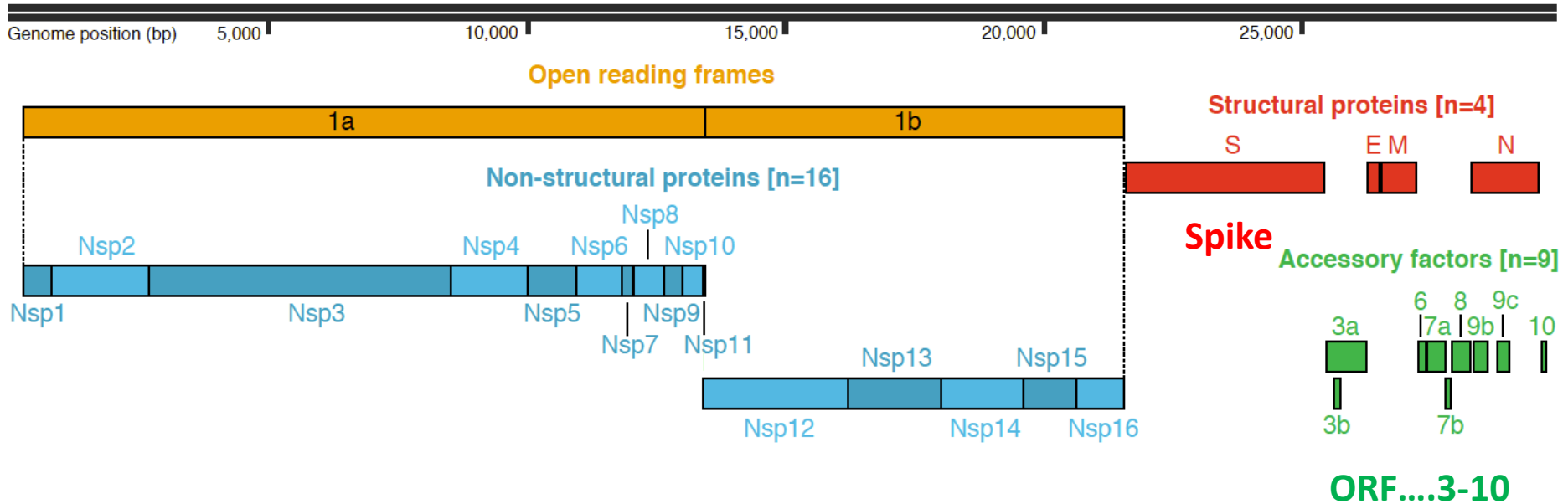
- Finora abbiamo manipolato cellule HEK293T (renali umane trasformate in vitro)

APPROCCIO SPERIMENTALE: DETTAGLIO

1. SCELTA DEL MODELLO CELLULARE
2. DISEGNO DELL'ESPERIMENTO
3. SCELTA DEI SAGGI
4. SCELTA DEGLI STRUMENTI

DISEGNO DELL'ESPERIMENTO: sovraesprimere separatamente diversi ORFs VIRALI

SARS-CoV-2 Genome

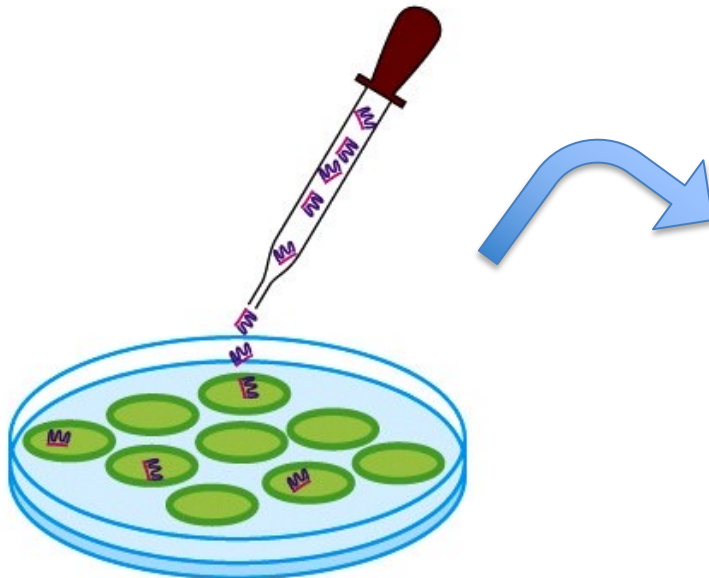


29 ORFs nel genoma virale

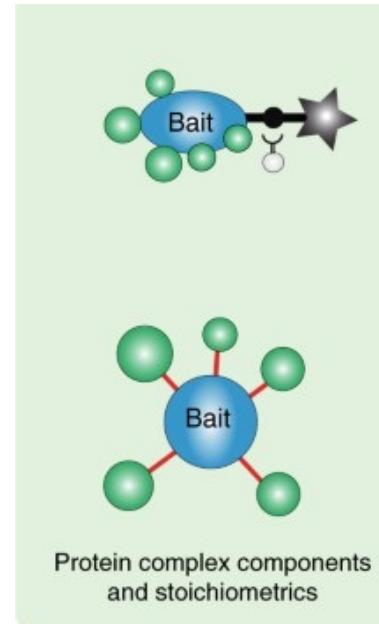


DISEGNO DELL'ESPERIMENTO

1) Sovraespressione transiente di proteine virali in cellule umane

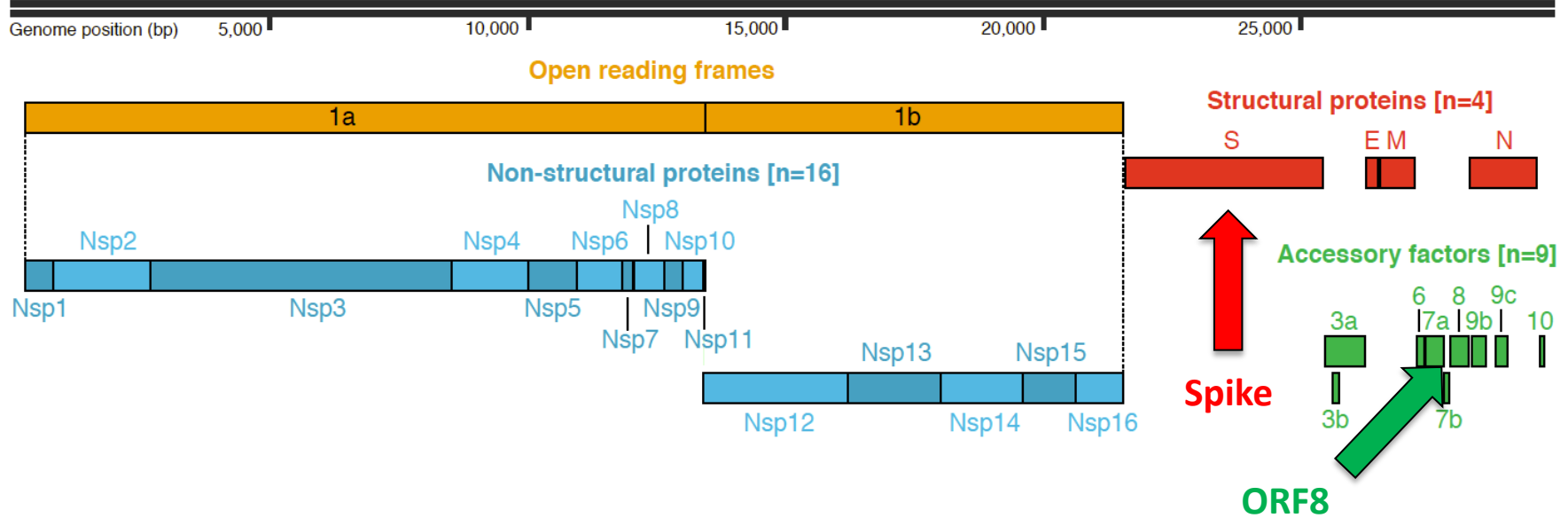


2) Analisi dell'interattoma (proteine cellulari associate) delle proteine virali



= recuperare la proteina virale dalle cellule ed analizzare le proteine cellulari ad essa legate

SARS-CoV-2 Genome



Come procedo per procurarmi i DNA?

- Cerco il clone in una “banca” – repository di vettori
- Invio una richiesta agli autori di pubblicazioni rilevanti

 addgene

[Browse Catalog -](#)

[Deposit -](#)

[Education & Tools -](#)

[Help Center -](#)



e.g. 74218, Cas9, transformation protocol

Search

A Better Way to Share Science

We distribute 97,124 plasmids on behalf of 4,596 labs from around the world. We also produce 588 ready-to-use viral vectors from our plasmid collection. Find what you need for your next experiment.

[View Collections](#)

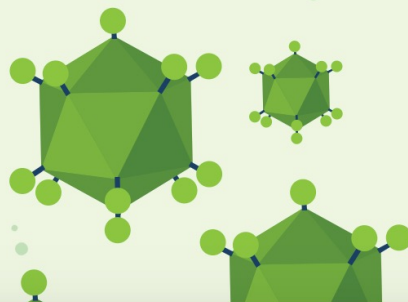
[Deposit a Plasmid](#)



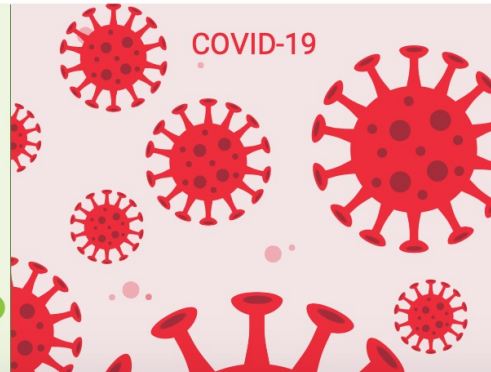
CRISPR



AAV



COVID-19



All Collections



15

[Help Center](#)

DISEGNO DELL'ESPERIMENTO

1. **Ottingo il cDNA** inserito in un vettore “shuttle”
2. Procedo al **subclonaggio** in un **vettore di espressione** adatto al mio scopo
3. Scelgo la **tecnica** appropriata per introdurre il costrutto nelle cellule scelte per l'esperimento

VETTORE:

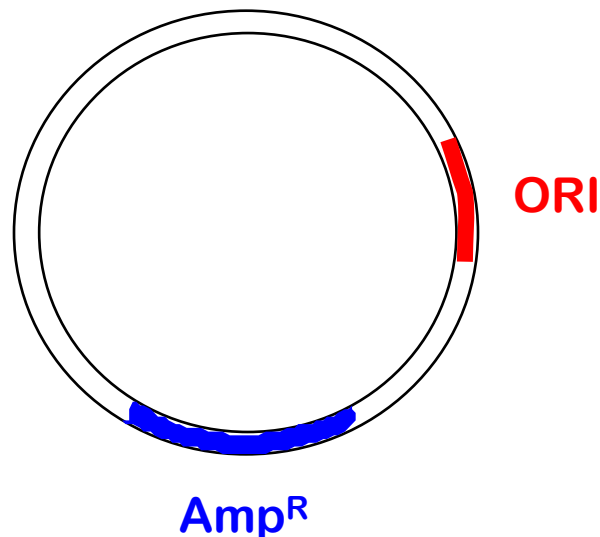
molecola di DNA utilizzata per trasferire materiale genetico esogeno da una cellula ad un'altra: può essere **plasmidico**, **virale**, etc.

Caratteristiche dei vettori plasmidici

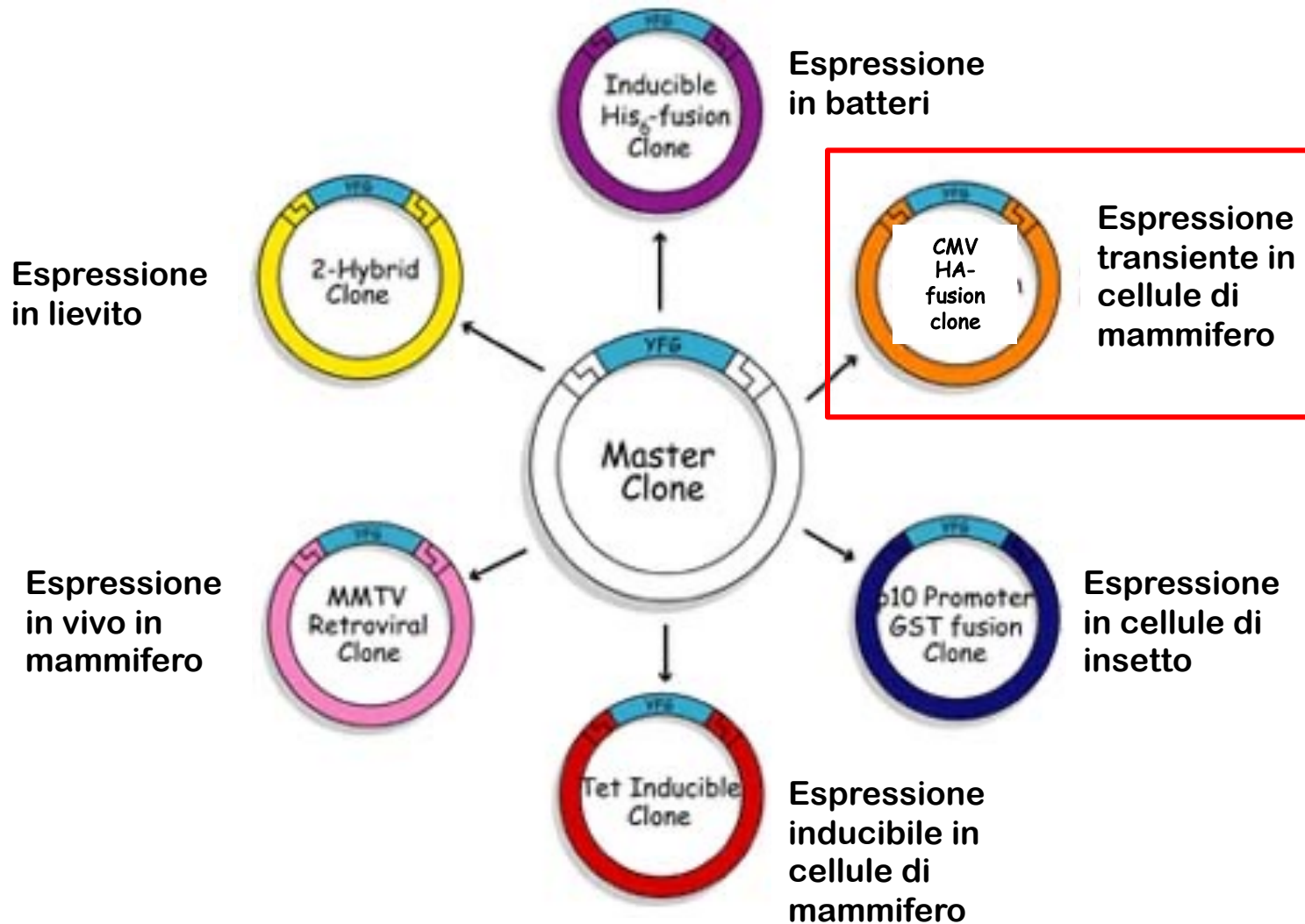
molecole di DNA batteriche extracromosomiche, solitamente circolari,
in grado di replicarsi autonomamente,
spesso contengono geni che conferiscono antibiotico-resistenza

1) Sequenze necessarie per il mantenimento e l'amplificazione in **batteri**

- **Origine di replicazione batterica (ColE1 ori)**
- **Marker per la selezione dei batteri trasformati:
di solito un gene per la resistenza ad un antibiotico (antibatterico)**



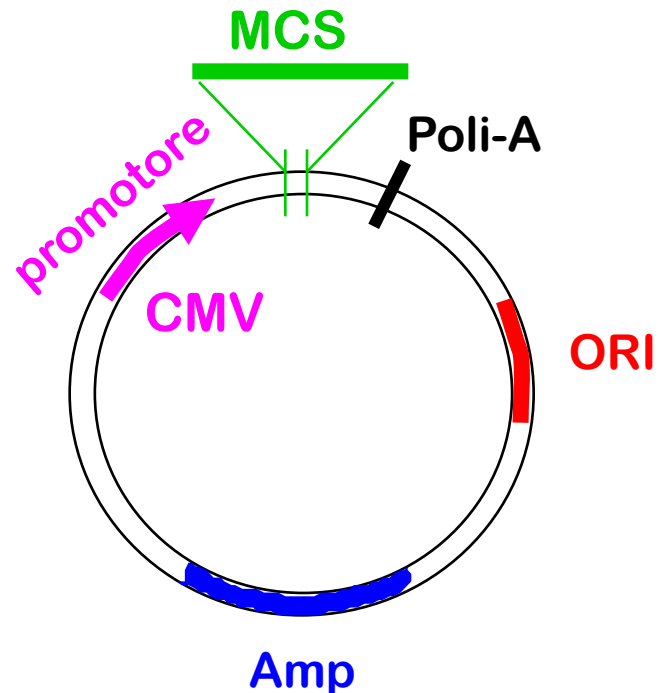
Subclonaggio del master clone da un vettore shuttle



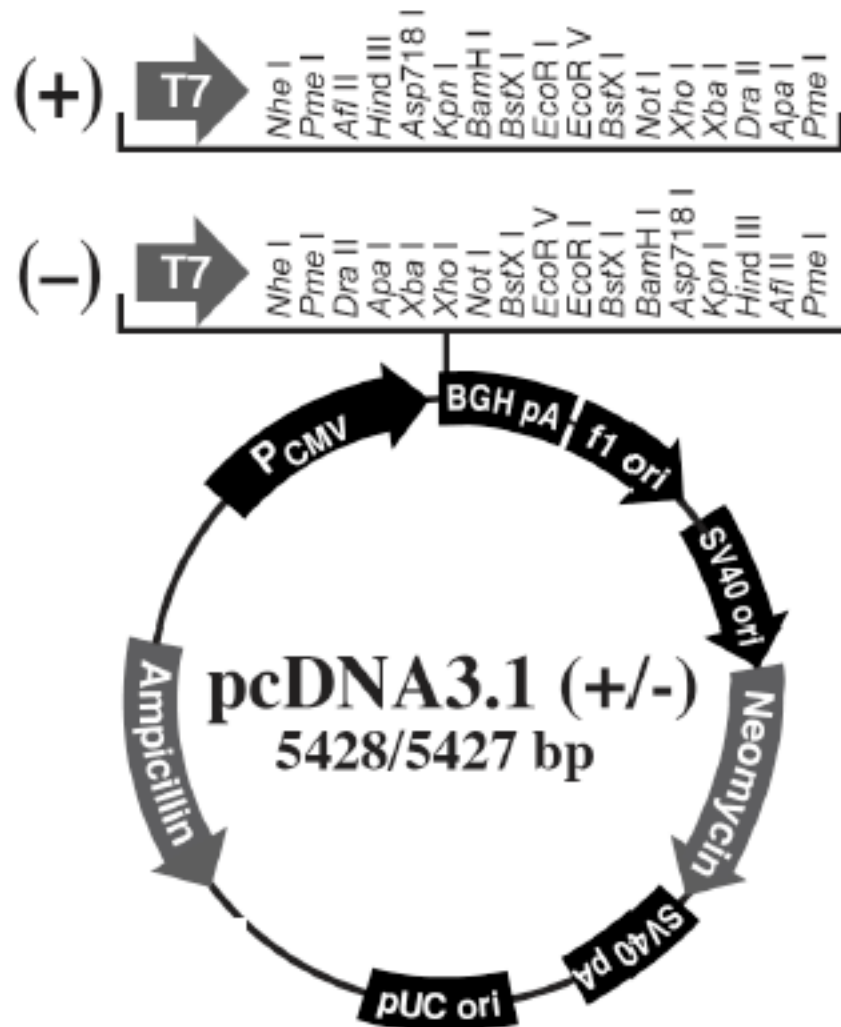
Caratteristiche dei vettori di espressione per cell eucariotiche

2) Sequenze necessarie al **clonaggio** del gene e alla sua **espressione** in cellule **eucariotiche**:

- **MCS** (sito di clonaggio multiplo)
- **promotore** forte virale (CMV, SV40...)
- segnale di poliadenilazione



Il vettore di espressione pCDNA3



P_{CMV}: CMV enhancer-promoter
 BGHpA: BGH polyadenylation
 signal and termination sequence
 f1 origin
 SV40 origin
 SV40 polyadenylation signal
 ampicillin resistance gene
 pUC origin

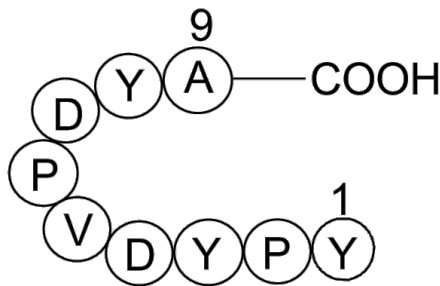
Espressione di proteine di fusione e TAGs

allo scopo di **VISUALIZZARE, RECUPERARE O PURIFICARE** la proteina sovraespressa

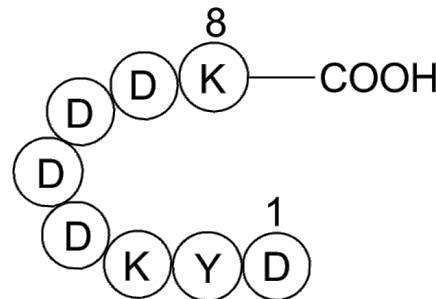
è possibile sovraesprimere la **proteina in fusione** con un **corto peptide detto TAG** (es. HA, FLAG, 6-His, Myc tag) oppure con un **polipeptide** come **GFP, MBP etc.**

La sequenza codificante il TAG è **clonata** in un **vettore di espressione** **nella stessa cornice di lettura (in frame)** al **cDNA** codificante la proteina, a monte o a valle.

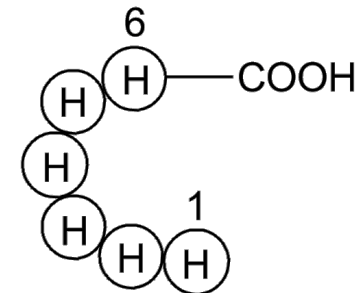
Quindi il TAG può essere fuso all'**N-** o al **C-**terminale della proteina:



Human Influenza hemagglutinin (HA)

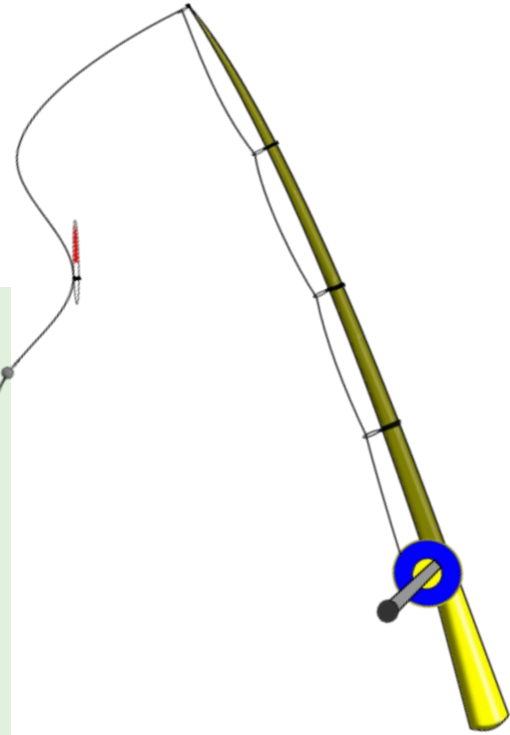
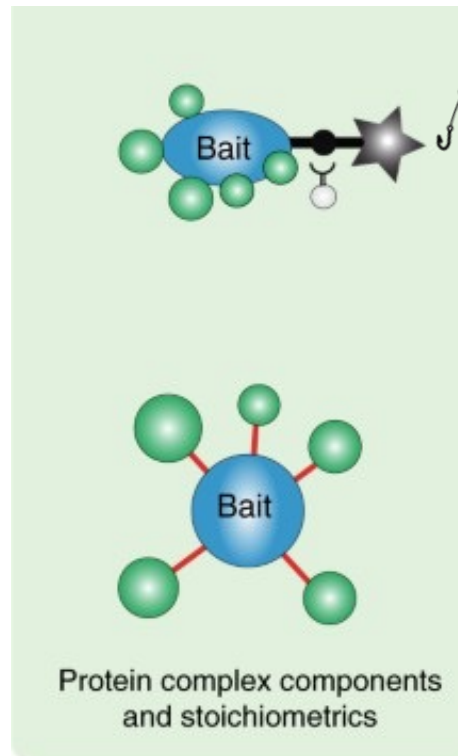


FLAG

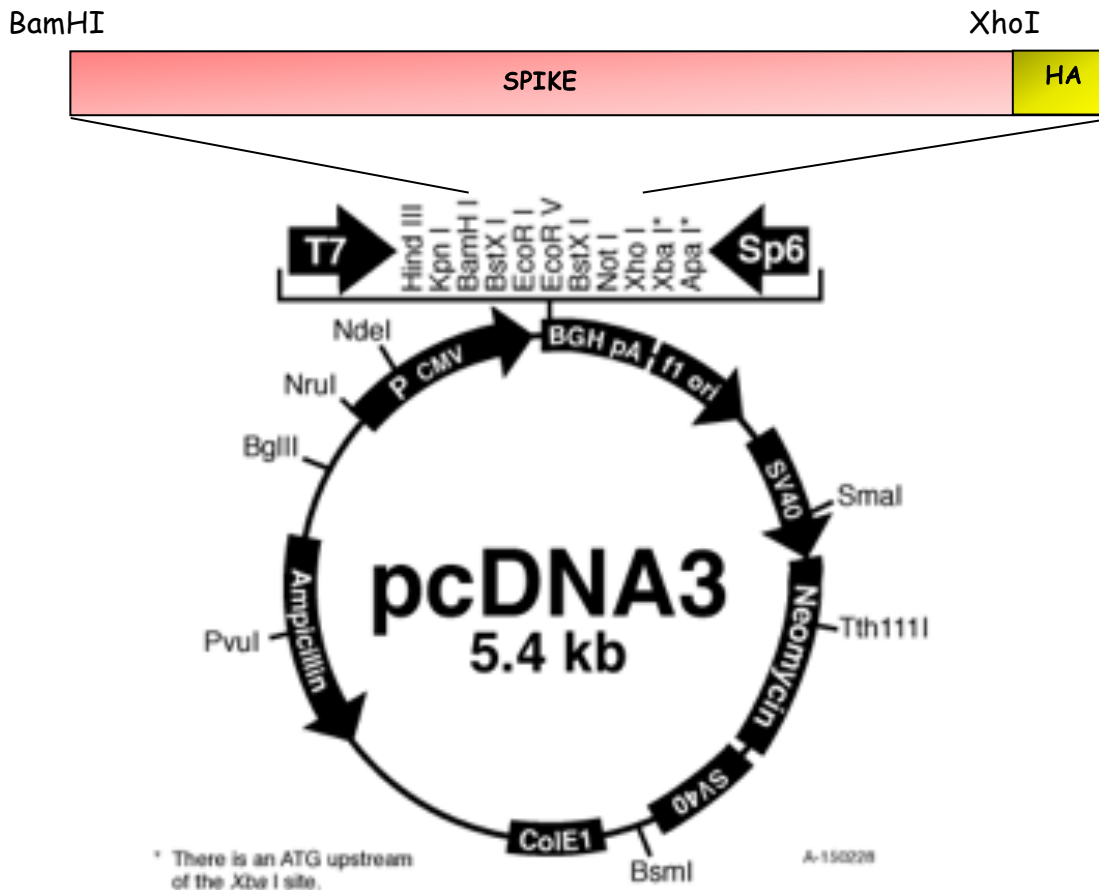


Utilizzo del TAG per “pescare” con l’esca

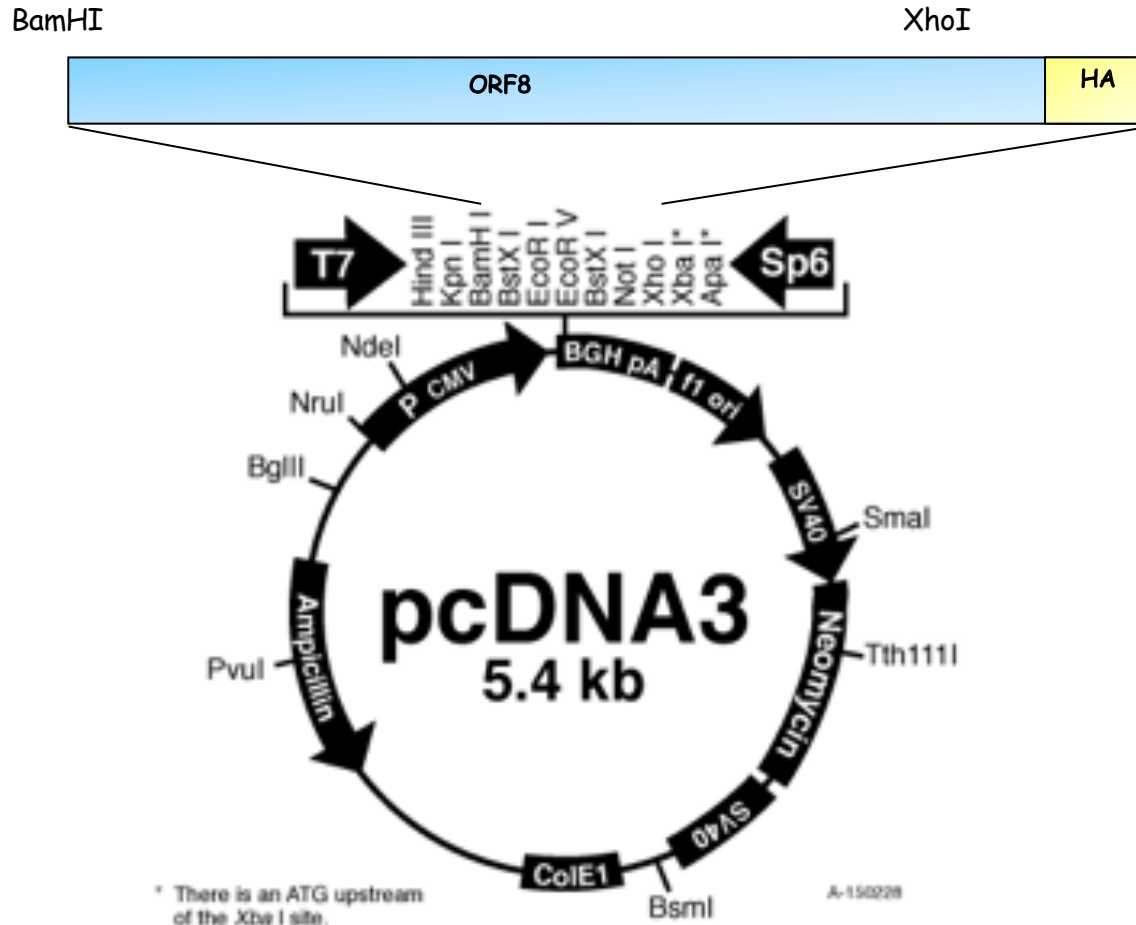
Analisi dell’interattoma
(proteine cellulari associate)
della proteina esca sovraespressa



Step 1a: clonaggio del cDNA (qui 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



Espressione transiente

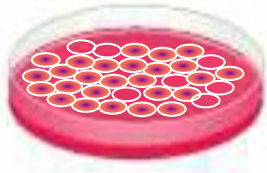
- Il DNA trasfettato rimane in forma di **episoma** ma non può essere replicato, e **viene perso** dopo qualche divisione
- **n° di copie** del plasmide nella cellula trasfettata: elevato e variabile
- **Eterogeneità** di espressione in diverse cellule
- **Esperimenti brevi** (24-72 ore)

Espressione stabile

- Il DNA trasfettato può venir **integrato** nel genoma della cellula ed essere replicato con esso,
- **oppure** può essere mantenuto come **episoma stabile** (se il vettore ha un'**ORI**)
- **L'efficienza** di integrazione varia a seconda del vettore e del tipo cellulare.
- Omogeneità di espressione (ottenimento di cloni stabili)
- Possibilità di effettuare **saggi a lungo termine**.

Ottenimento di trasfettanti stabili

Per ottenere cellule trasfettate stabilmente è necessario **subclonare** il cDNA di interesse in un **vettore** di espressione per cell eucariotiche che contenga un **gene codificante** per un **marcatore selezionabile**, ad es. **resistenza ad un antibiotico** (es. Neomicina).



1. **Trasfezione**



2. **Selezione**: le cellule non trasfettate moriranno

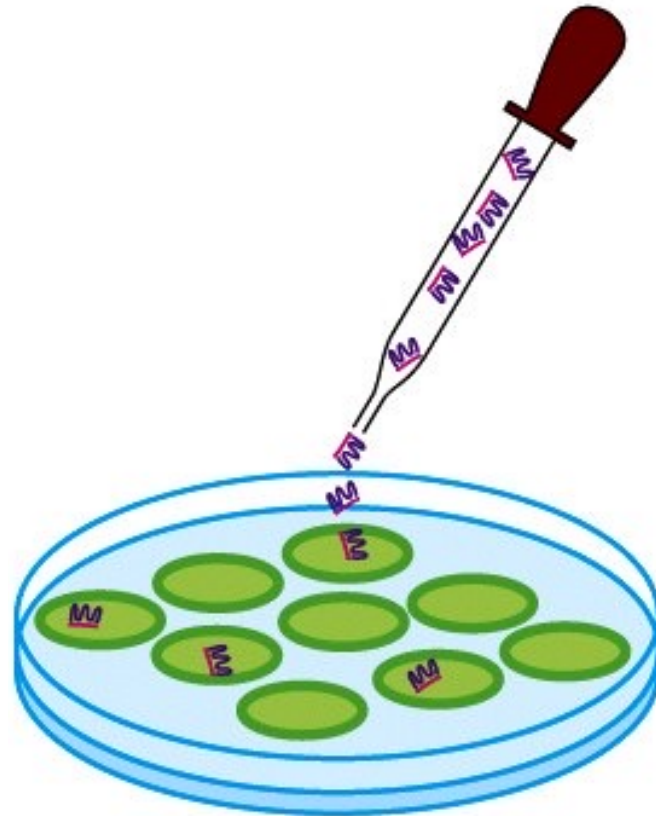


Cloni

Dopo 2 o più settimane...

3. Isolamento di **cloni** di cellule che esprimono la proteina

**Step 2: trasferimento dei vettori di espressione
nel modello cellulare**



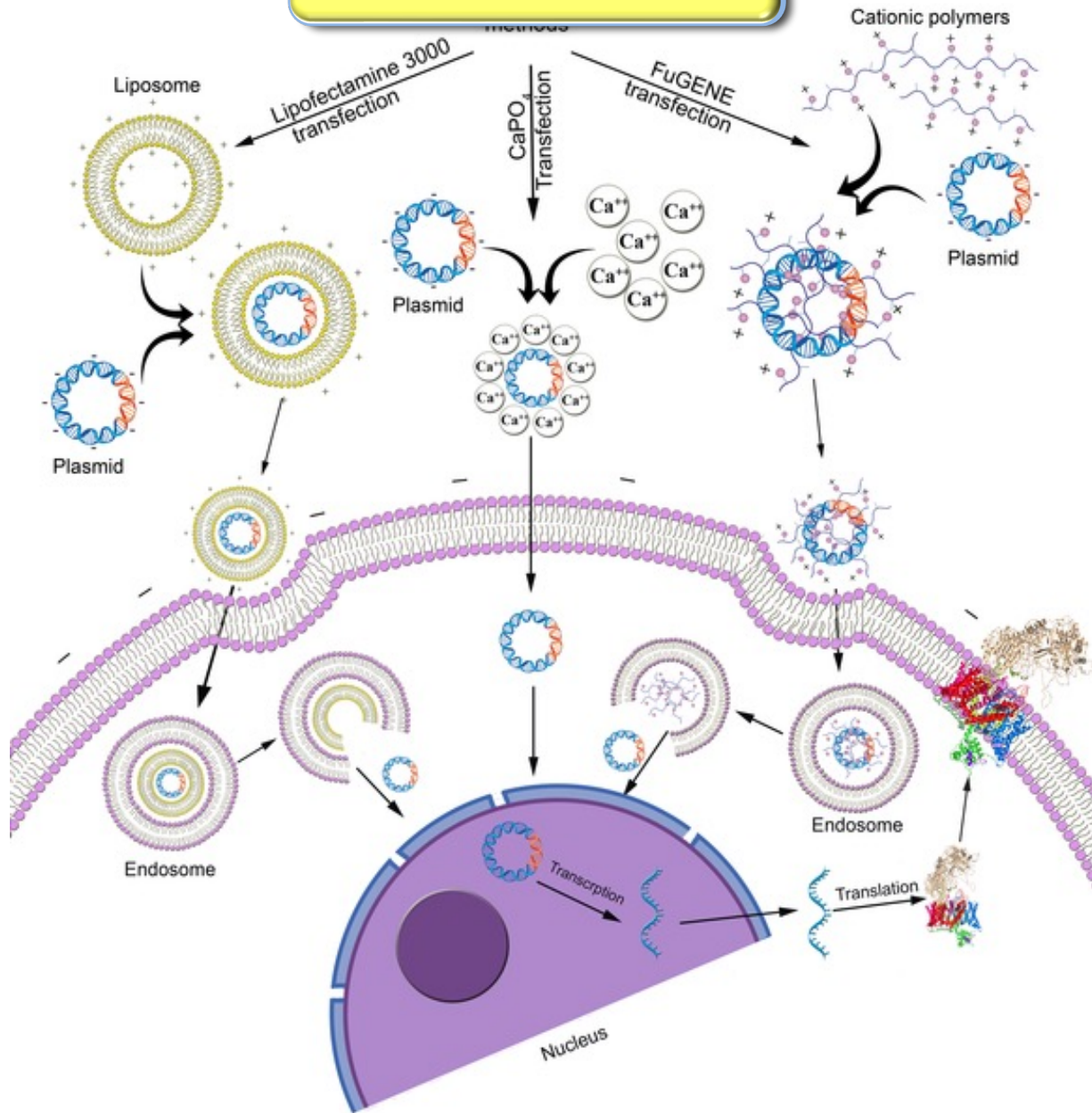
TRASFEZIONE:

Trasferimento di acidi nucleici (DNA o RNA) in cellule eucariotiche (in coltura o in vivo) mediante metodi fisici o chimici

INFEZIONE:

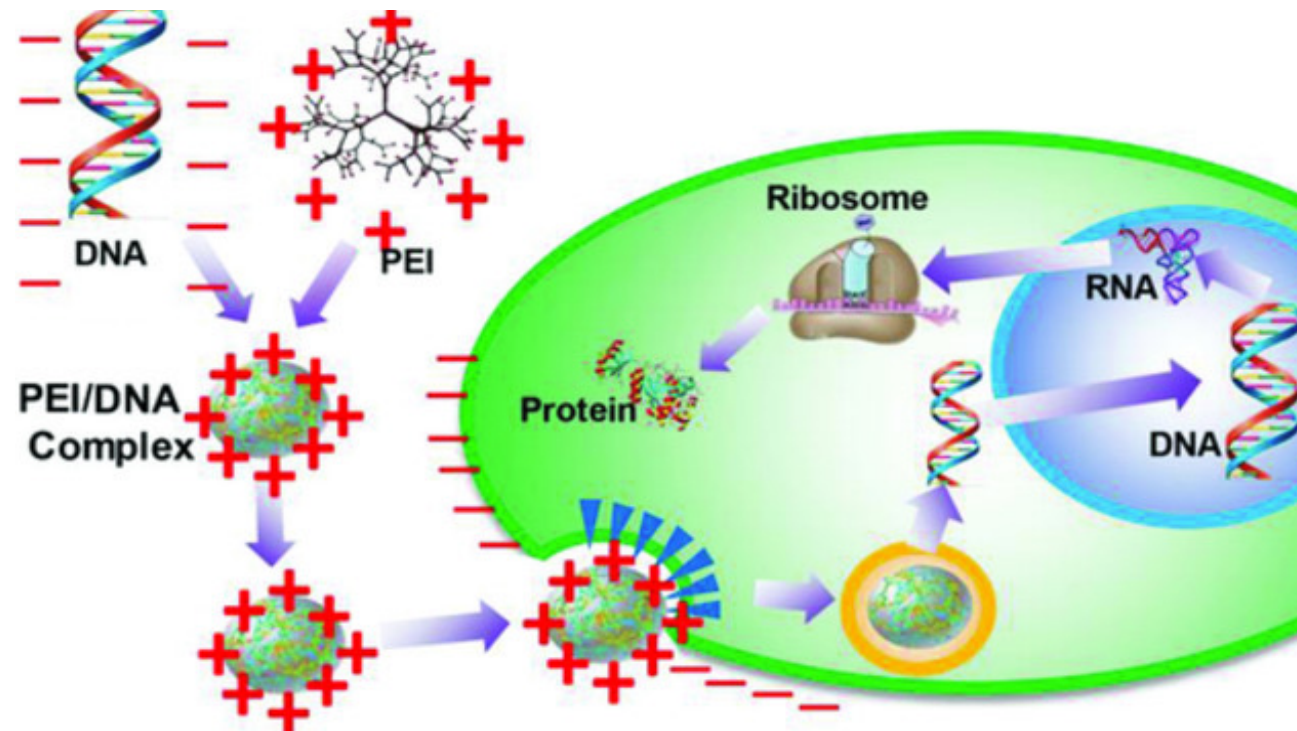
Procedura per il trasferimento di acidi nucleici mediante infezione di cellule (in coltura o in vivo) mediante virus contenenti vettori basati su genomi virali modificati

METODI CHIMICI



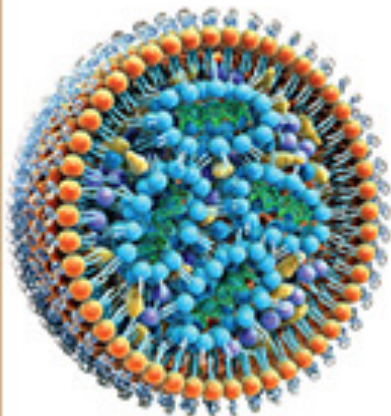
Trasfezione con PEI (polietilenimmina)

Il DNA viene mescolato al PEI (cationico), si formano dei complessi che vengono poi aggiunti al mezzo di coltura e entrano nelle cellule per **endocitosi**.

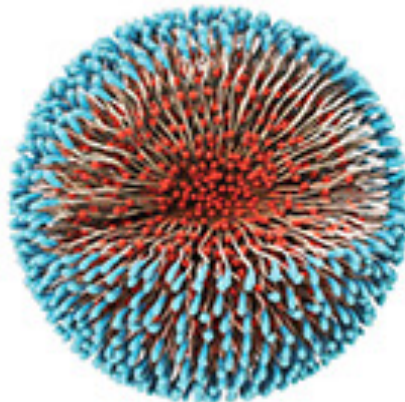


Trasfezioone mediante LIPOSOMI o NANOPARTICLES

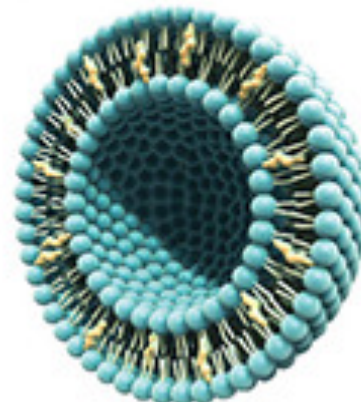
Versatile Nanomedicine Production



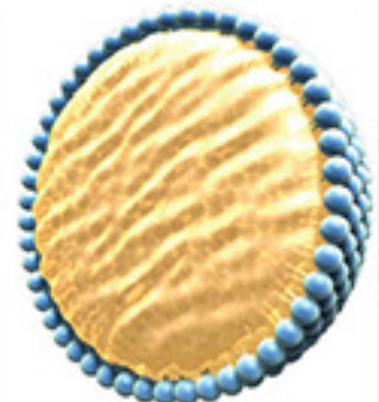
Nucleic Acid
Lipid Nanoparticles



Polymeric
Nanoparticles



Liposomes



Emulsions

Trasferimento genico mediato da virus

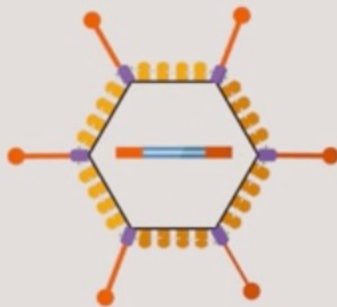


Retrovirus



Lentivirus

**Most
Commonly
Used
Viral Vectors**

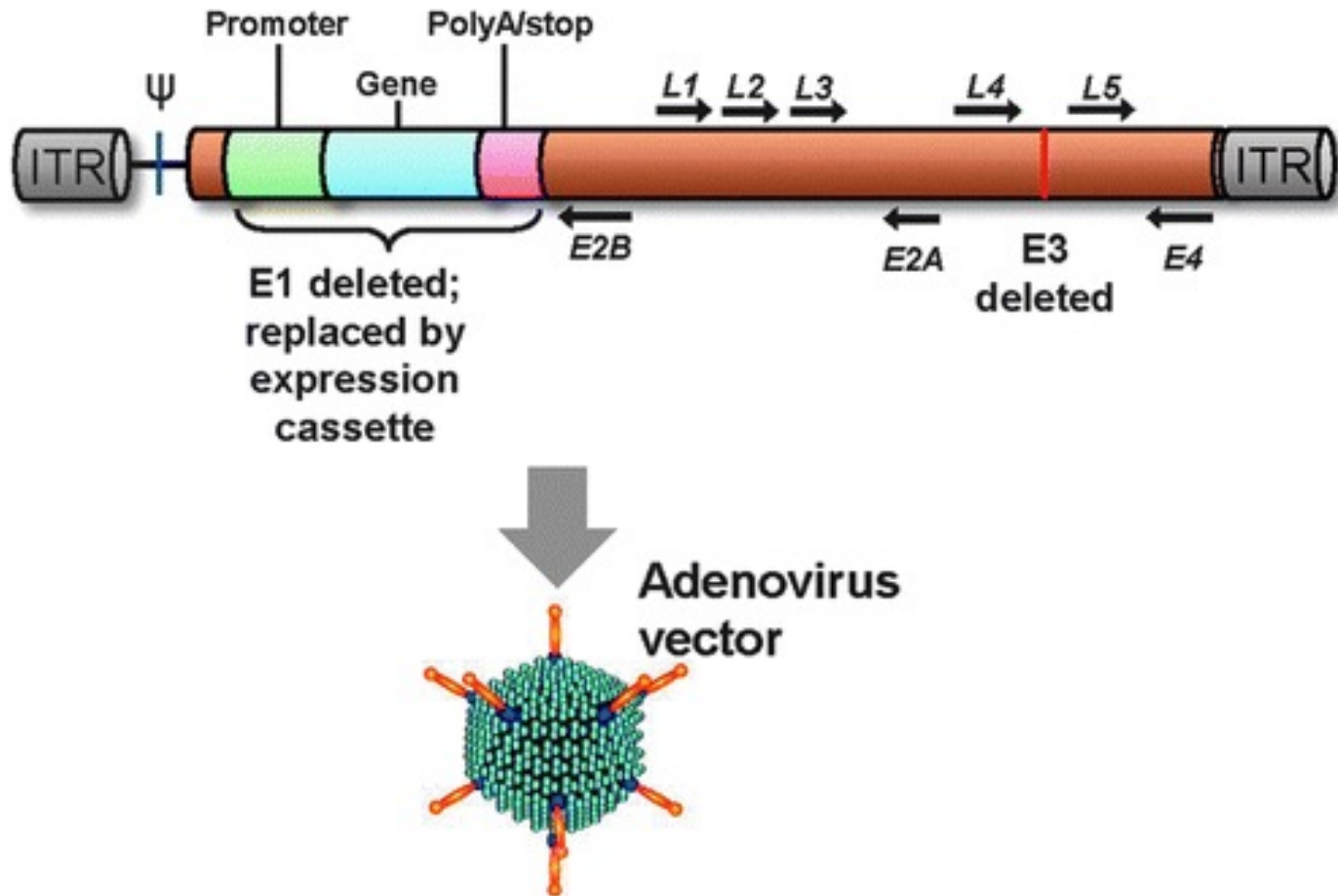


Adenovirus



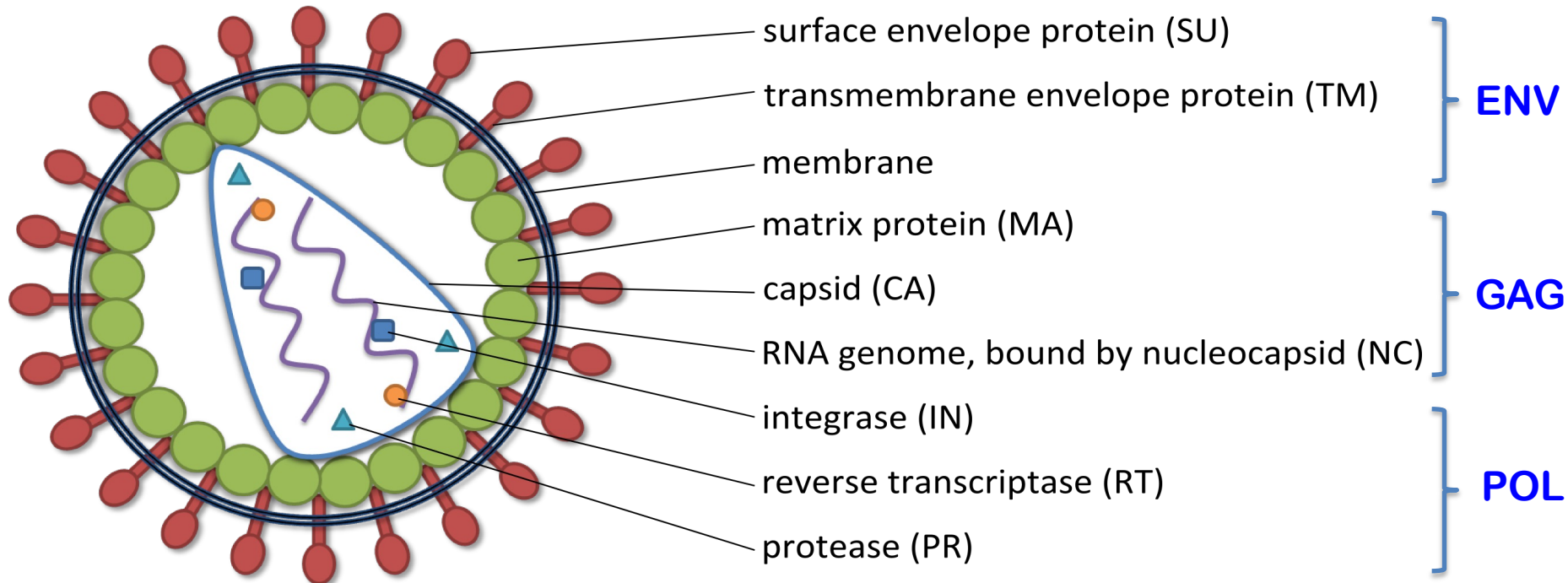
Adeno-associated Virus

Vettori derivati da Adenovirus



Adenovirus e AAV – infettano anche cellule quiescenti, **non** possono **integrarsi** nel genoma cellulare.

Retrovirus e lentivirus



Retrovirus – possono **integrarsi** nel genoma di cellule **proliferanti**

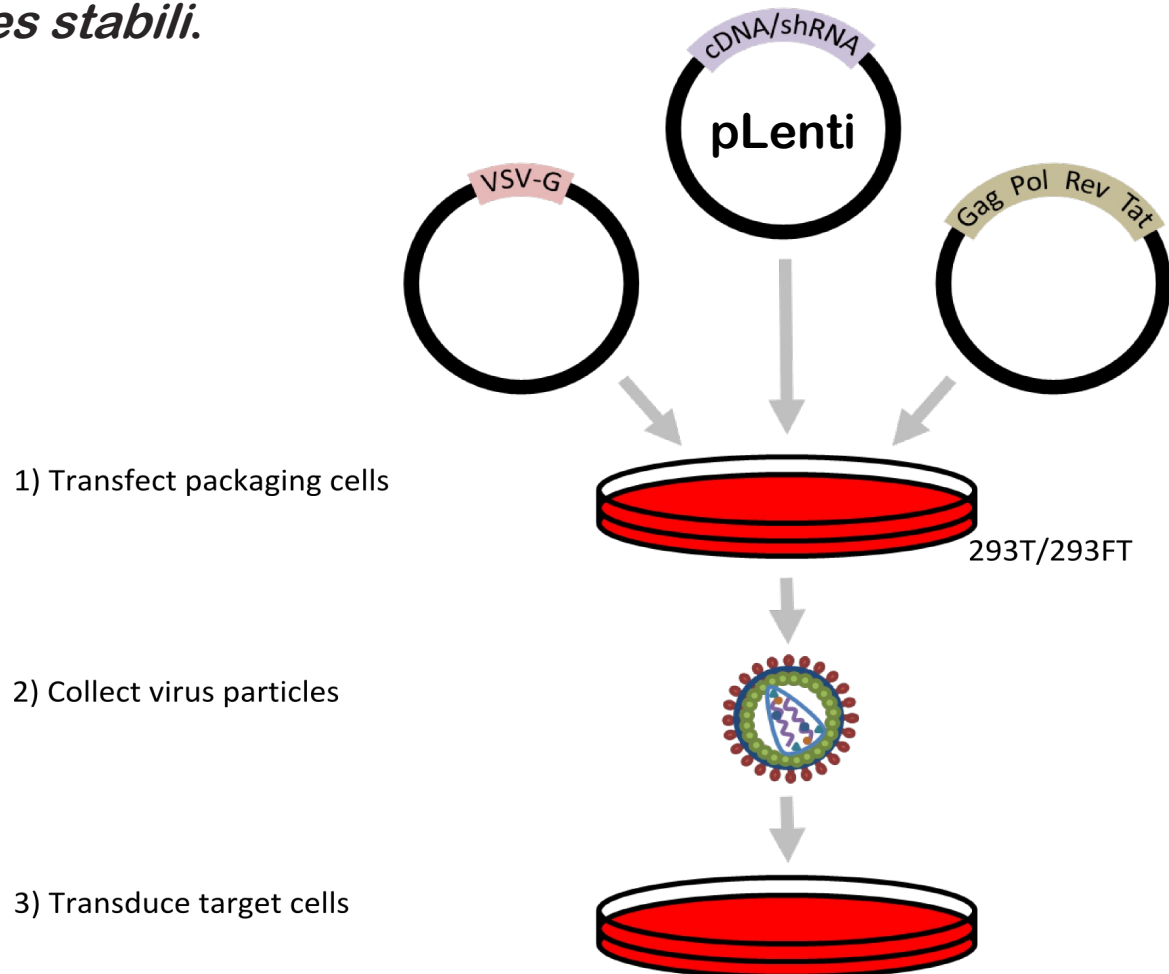
Lentivirus – si integrano anche in cellule **quiescenti**

Utilizzati per cellule primarie in coltura ed anche **in vivo**

Per terapia genica.

Preparazione di virus ricombinanti per trans-complementazione

I **virus ricombinanti** possono essere **impaccati in particelle infettive** facendo esprimere alle cellule le proteine del capside virale e la componente enzimatica per la retrotrascrizione o usando *packaging cell lines stabili*.



Elettroporazione/nucleofezione

La membrana cellulare e quella nucleare sono permeabilizzate mediante l'applicazione di un **campo elettrico**: si formano dei **pori** del diametro di alcuni nm, attraverso i quali può passare il DNA.

Tipo di **saggio**: transienti e **stabili**

Tipo di **cellule**: in adesione e in sospensione

Efficienza: alta

Tossicità : dipende dallo strumento



Trasferimento genico mediato da particelle metalliche

Tecnica che utilizza **microproiettili**



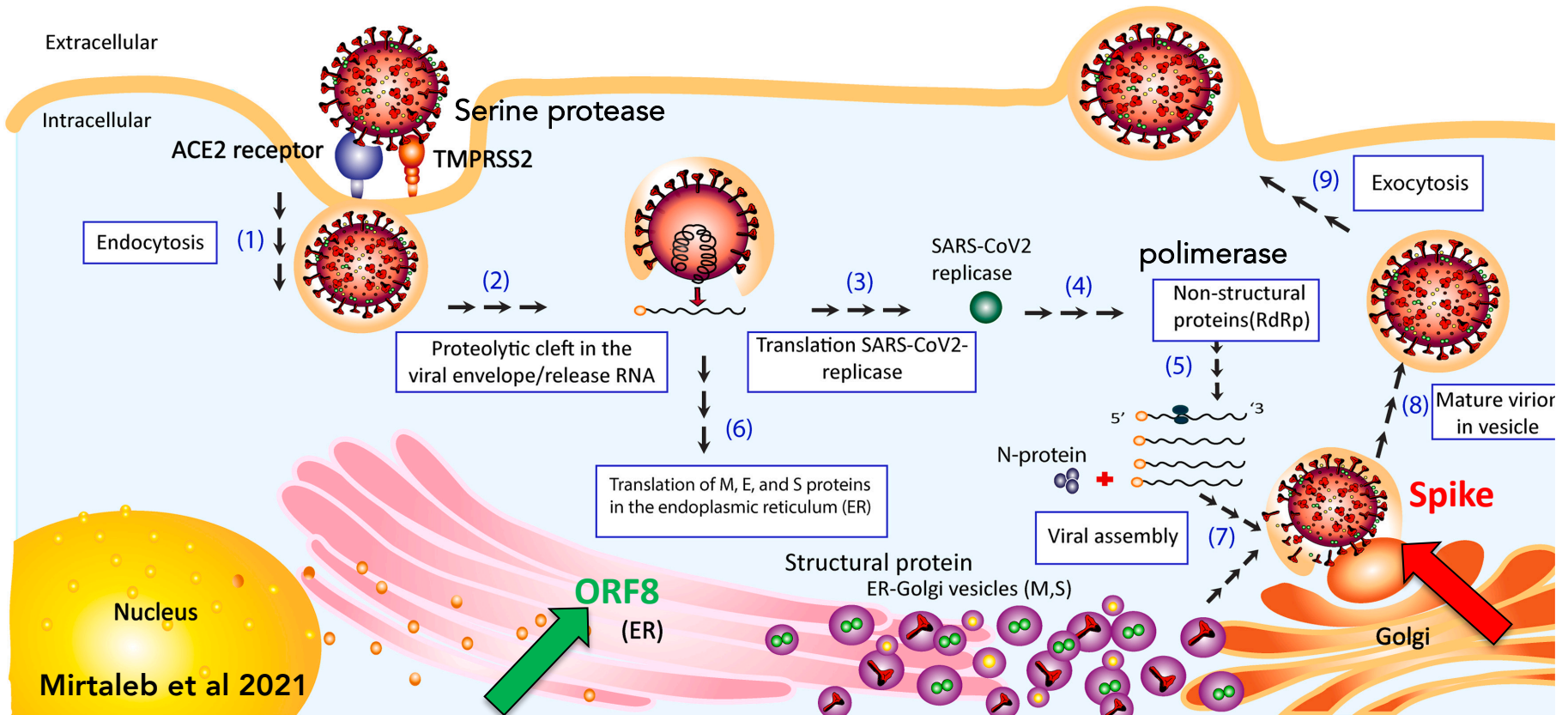
il DNA viene precipitato su **microscopiche particelle d'oro o tungsteno**

che vengono poi “**sparate**” nelle cellule mediante un'apposita strumentazione che usa **elio** ad alta pressione.

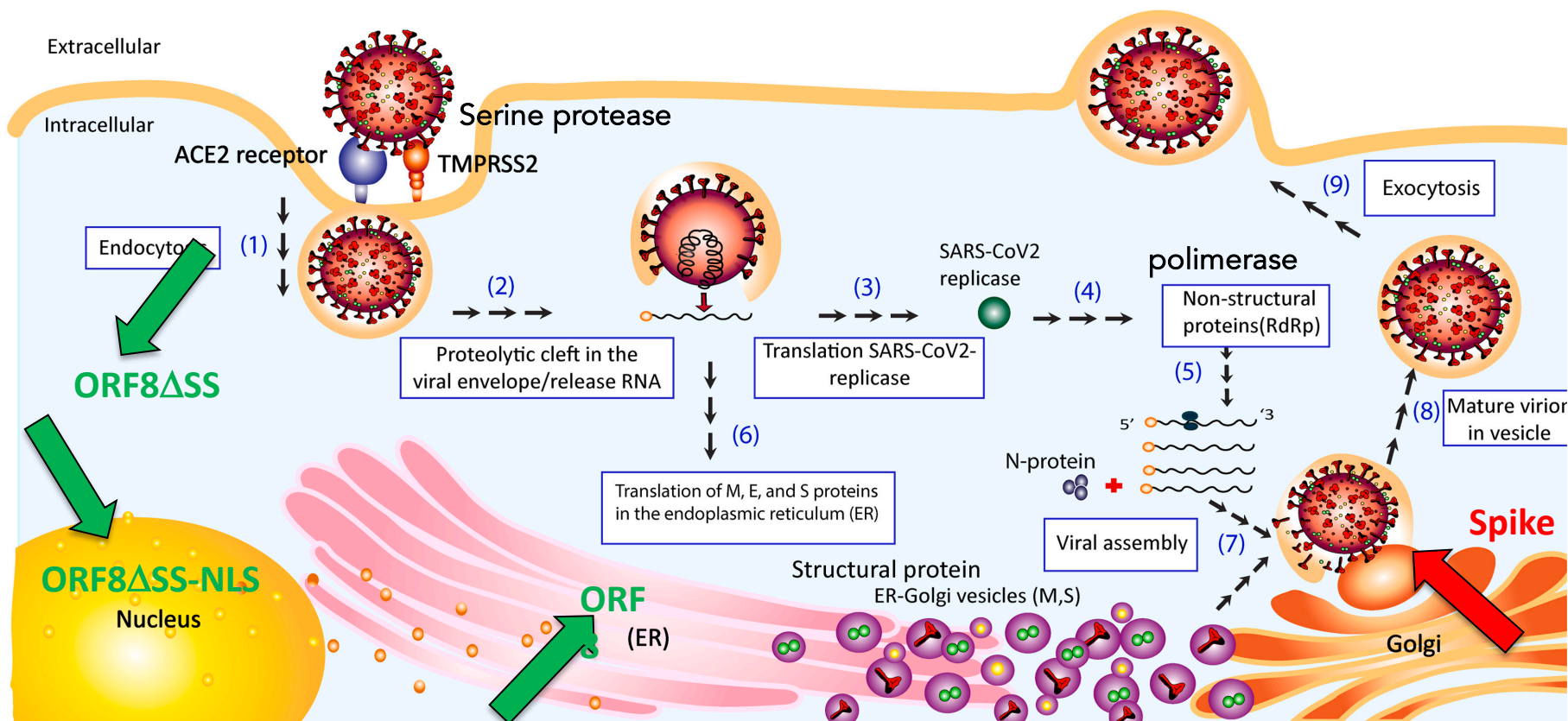
Usato per trasfettare cellule **all'interno di tessuti**, es. cellule vegetali (dotate di parete).



Analisi della localizzazione subcellulare delle proteine virali.



Alterazione della localizzazione delle proteine virali nelle cellule trasfettate.



**Alterazione della localizzazione
delle proteine virali nelle cellule trasfettate.**

Step 2:

mutagenesi del vettore di espressione di ORF8:

generazione dei vettori di espressione

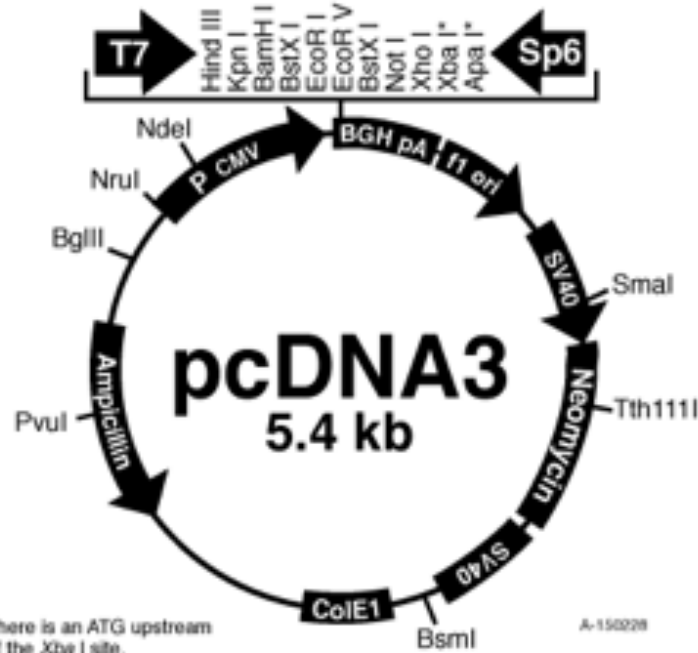
ORF8 Δ SS

ORF8 Δ SS-NLS

pcDNA3 ORF8 ΔSS-HA

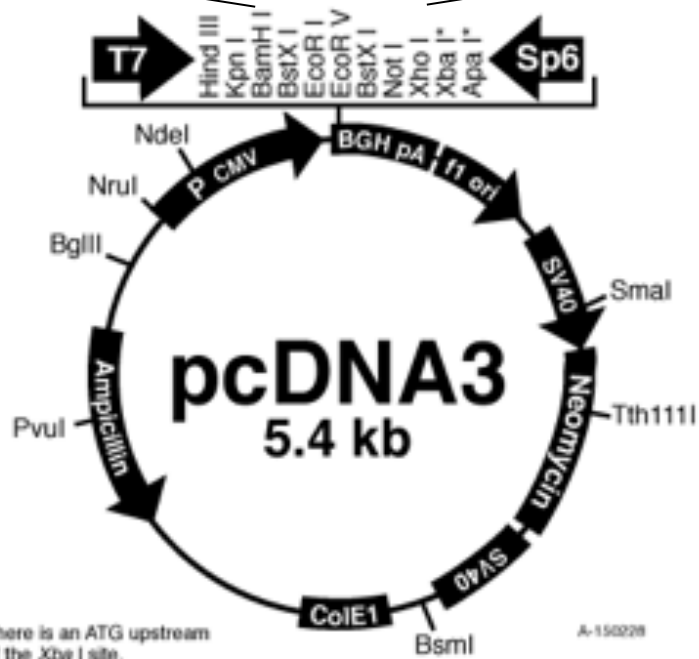
BamHI

XhoI

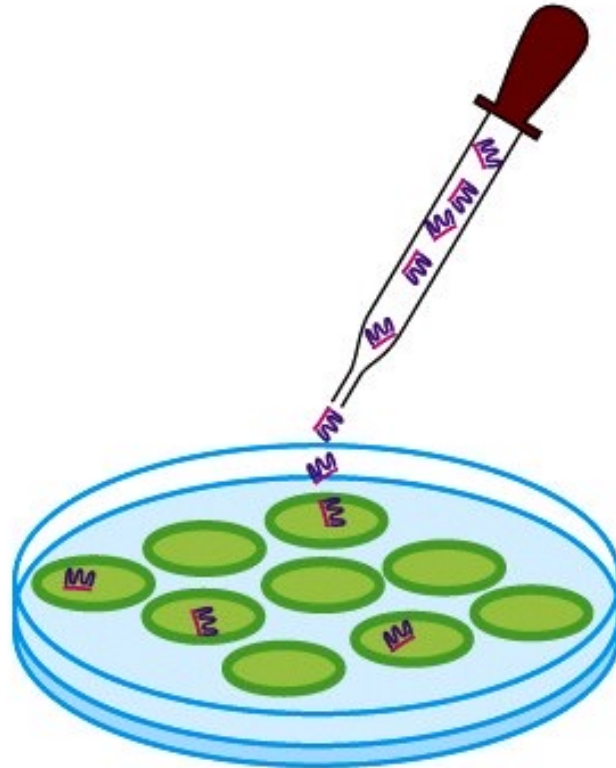


* There is an ATG upstream of the Xba I site.

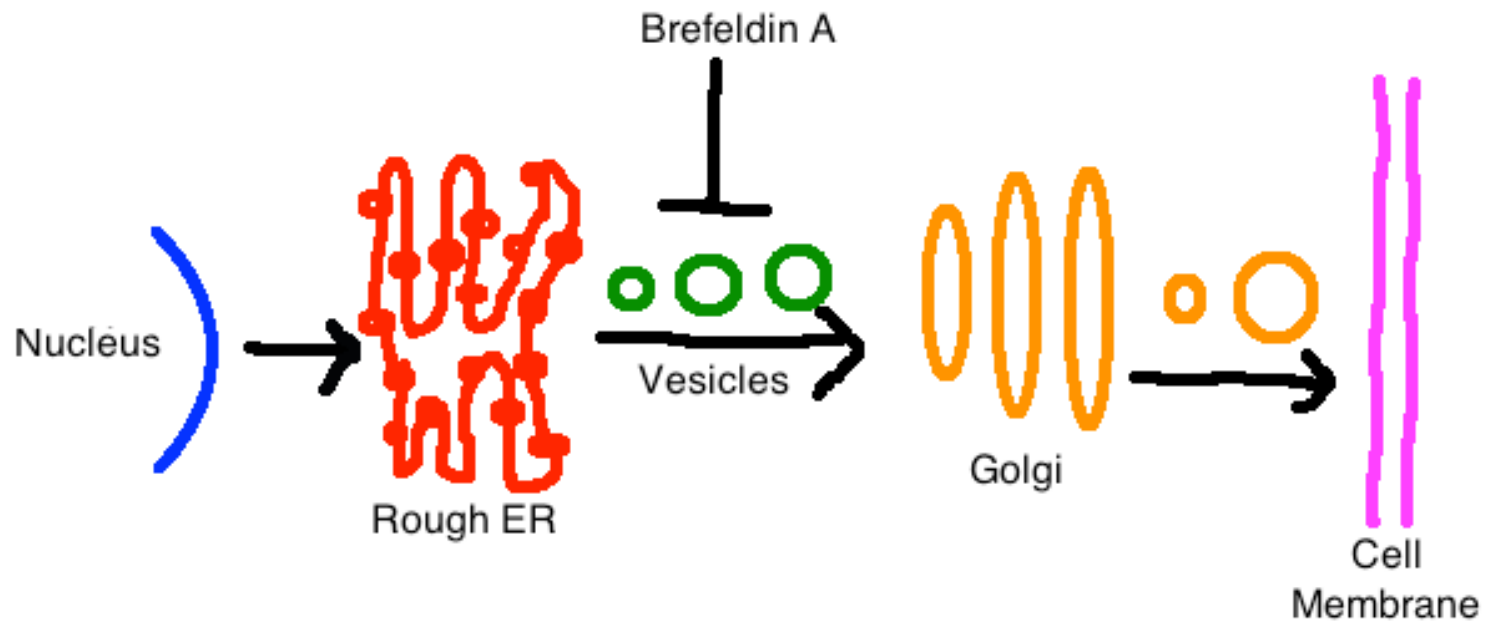
pcDNA3 NLS ORF8 ΔSS-HA



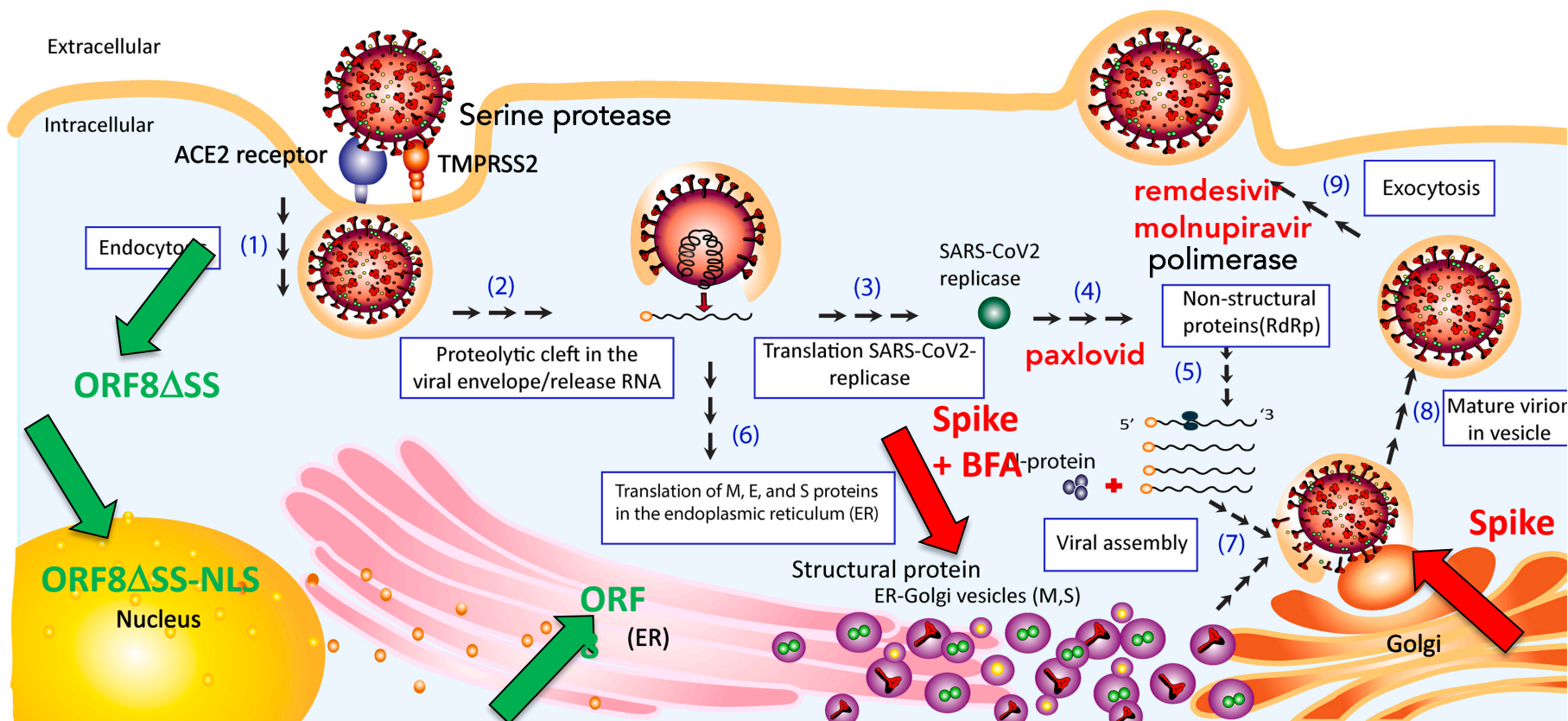
Step 3: trasfezione dei vettori di espressione nel modello cellulare scelto



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

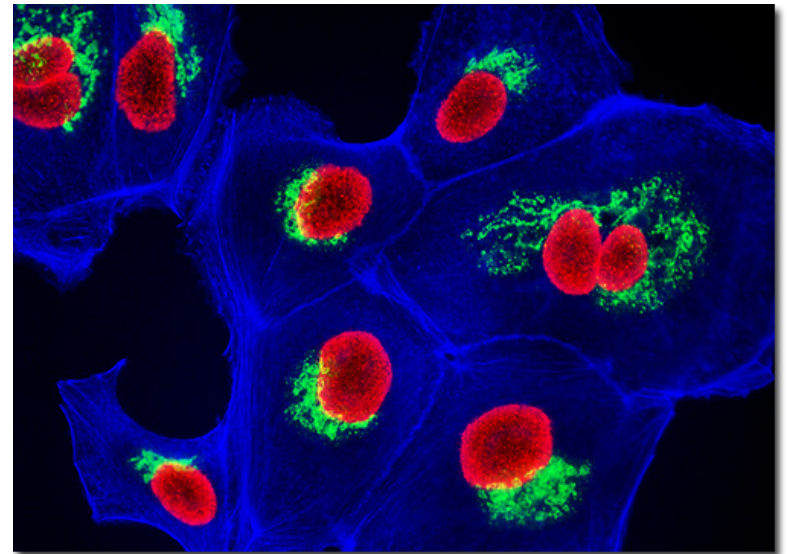


Predizione della localizzazione delle proteine virali nelle cellule trasfettate.

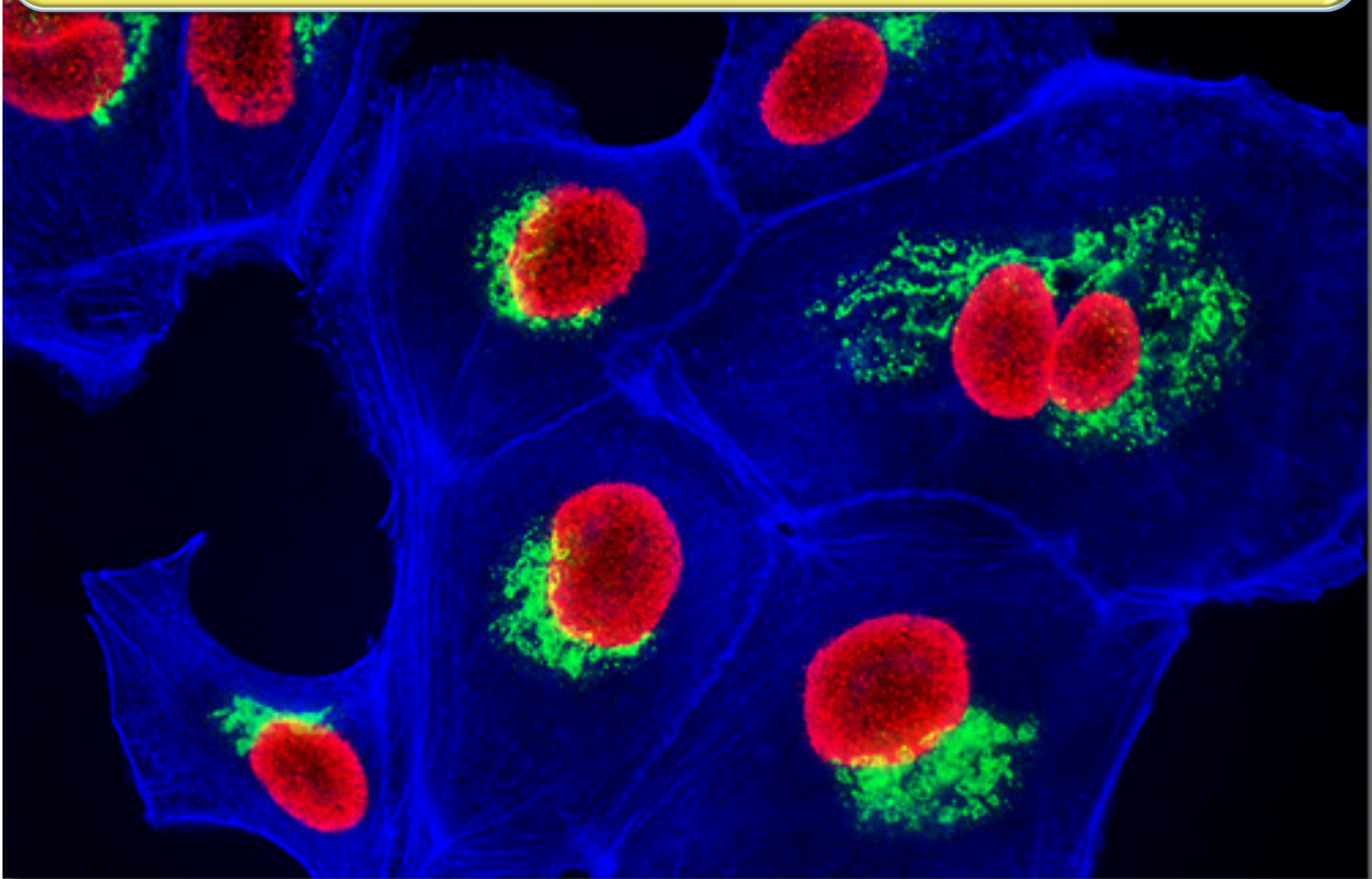


APPROCCIO SPERIMENTALE: DETTAGLIO

1. SCELTA DEL MODELLO CELLULARE
2. DISEGNO DELL'ESPERIMENTO
3. **SCELTA DEI SAGGI**
4. SCELTA DEGLI STRUMENTI



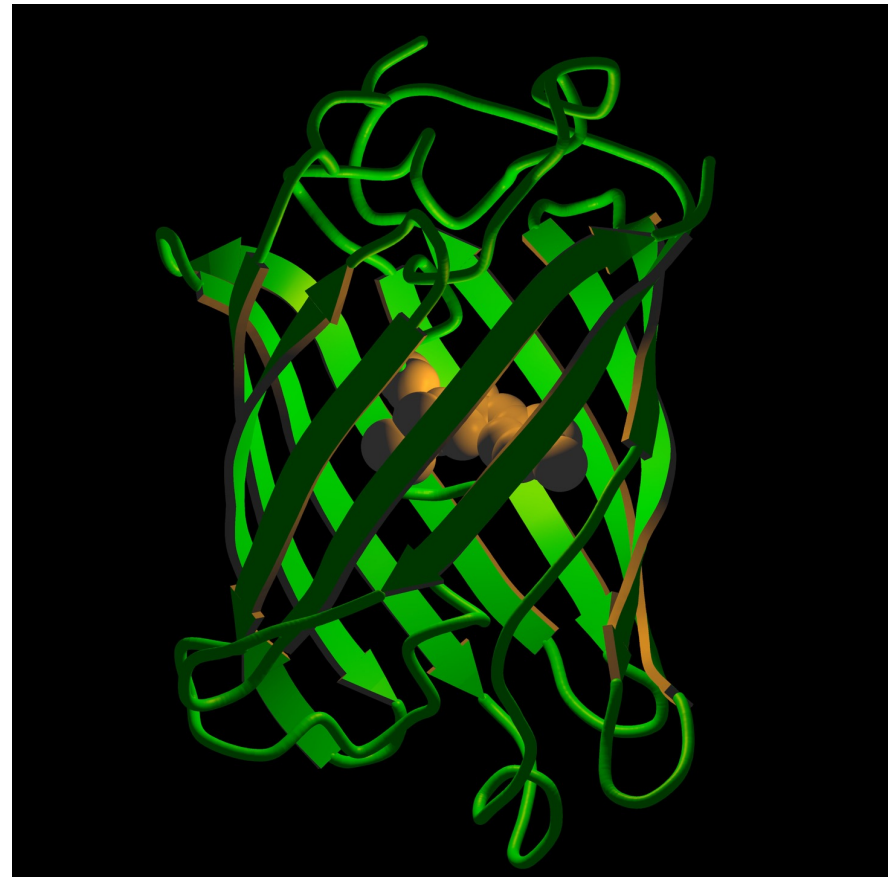
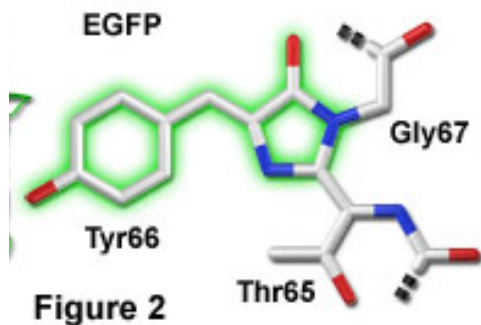
**Analisi della localizzazione subcellulare
delle proteine virali mediante microscopia a
epifluorescenza**



Imaging con reporters fluorescenti (fotoproteine)

GFP = Green Fluorescent Protein

- ◆ Proteina di circa 27 Kda isolata dalla medusa *Aequora victoria*
- ◆ Assorbe ed emette nel **visibile**
Osservazione al microscopio a fluorescenza
Ex: 475 nm
Em: 525 nm
- ◆ Il cromoforo è un **TRIPEPTIDE CICLICO** codificato nella sequenza primaria

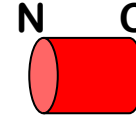


Espressione di proteine in fusione con fotoproteine reporter

Gene X

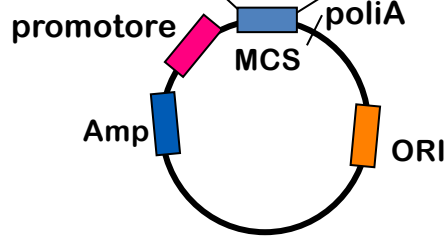


Codifica per la proteina di interesse X

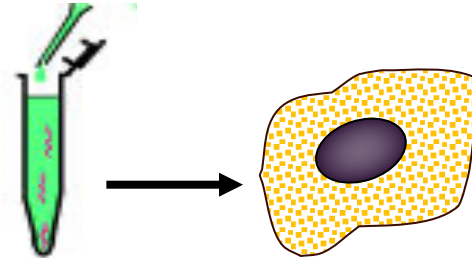


Gene X

GFP

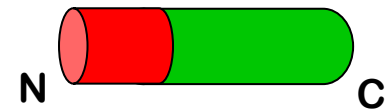


Trasfezione



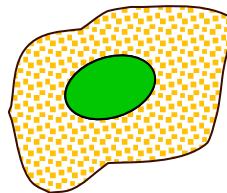
Trascrizione e traduzione:

espressione della
proteina di fusione
nelle cellule



La proteina X
assume
la sua tipica
localizzazione
intracellulare

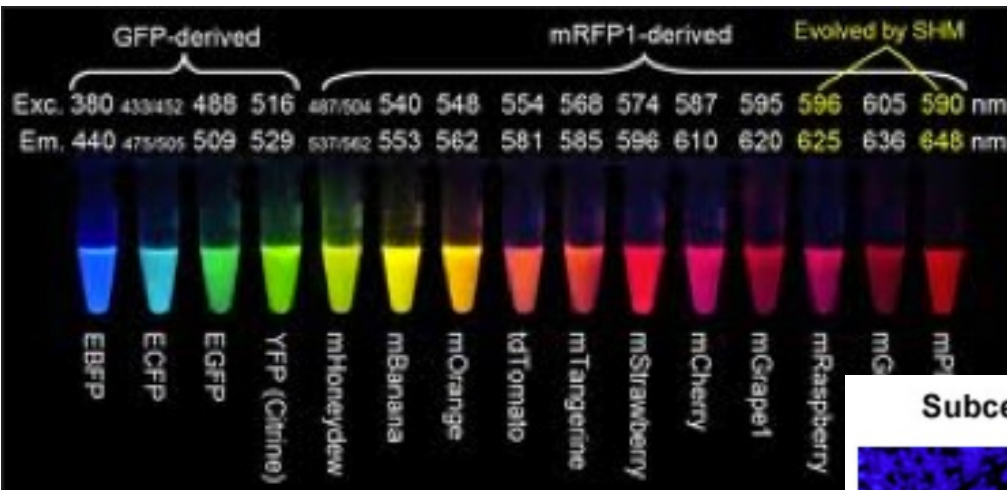
Visualizzazione
in situ



Osservazione al microscopio
a fluorescenza

Ex: 475 nm
Em: 525 nm

Imaging con reporters fluorescenti (fotoproteine)



Subcellular Localization of Fluorescent Protein Chimeras

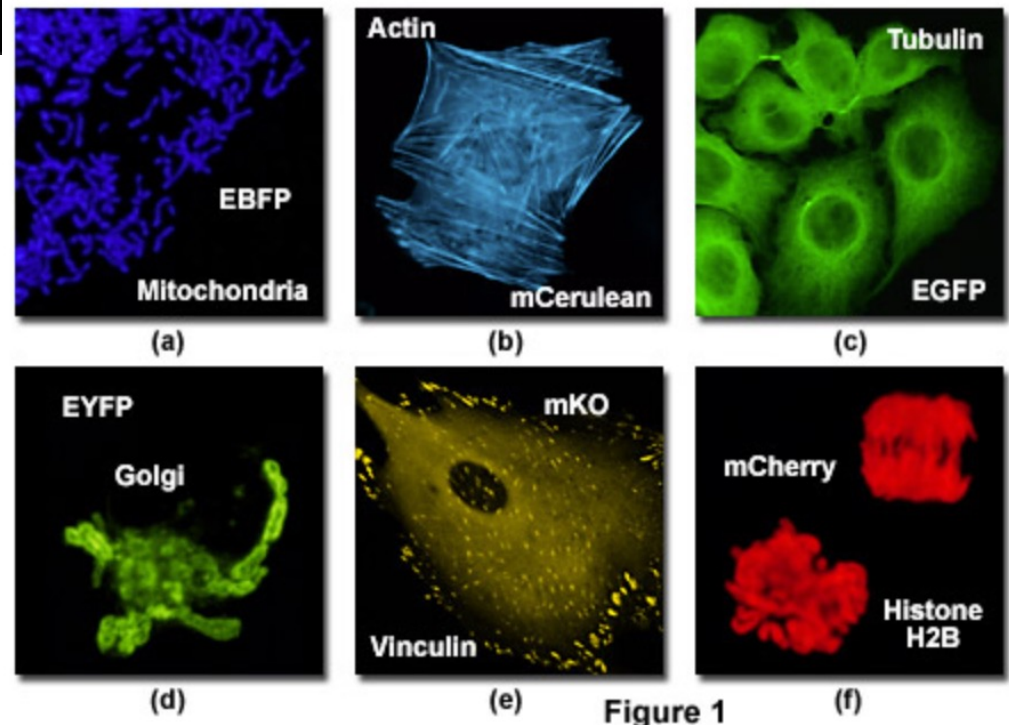
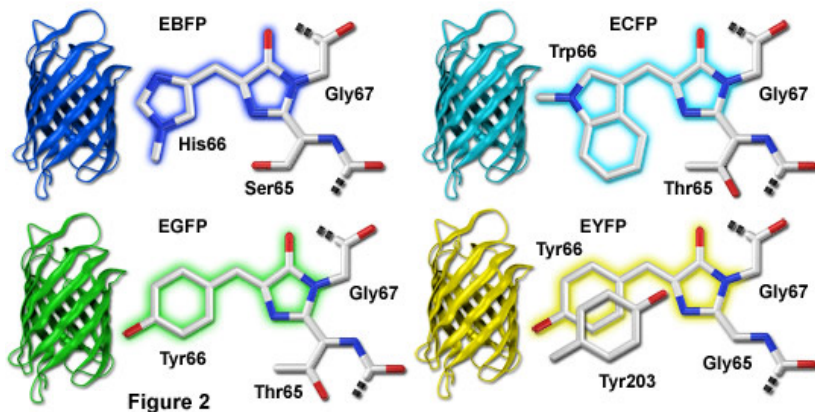


Figure 1

Chromophore Structural Motifs of Green Fluorescent Protein Variants



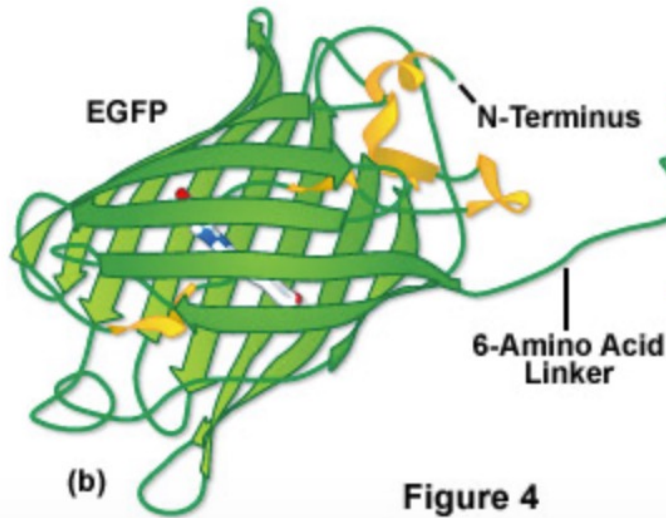
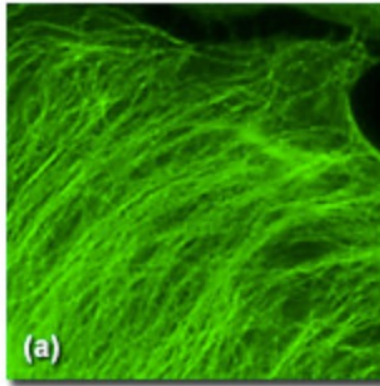
<http://www.olympusconfocal.com/applications/fpcolorpalette.html>



We make it visible.

L'ingombro sterico della GFP potrebbe interferire con le interazioni delle proteine virali in esame

Introduction to Fluorescent Proteins



Fluorescent Protein Gene Fusions for Subcellular Localization Imaging

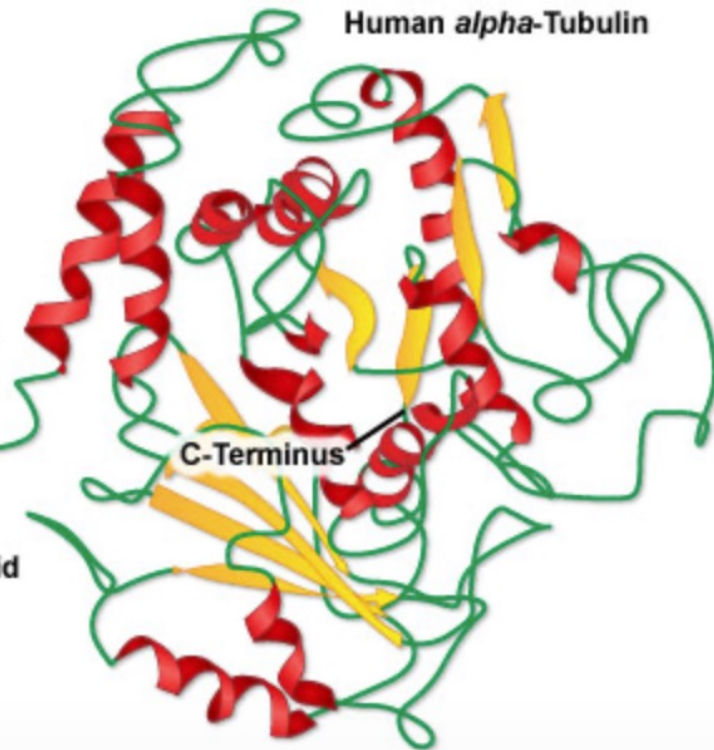
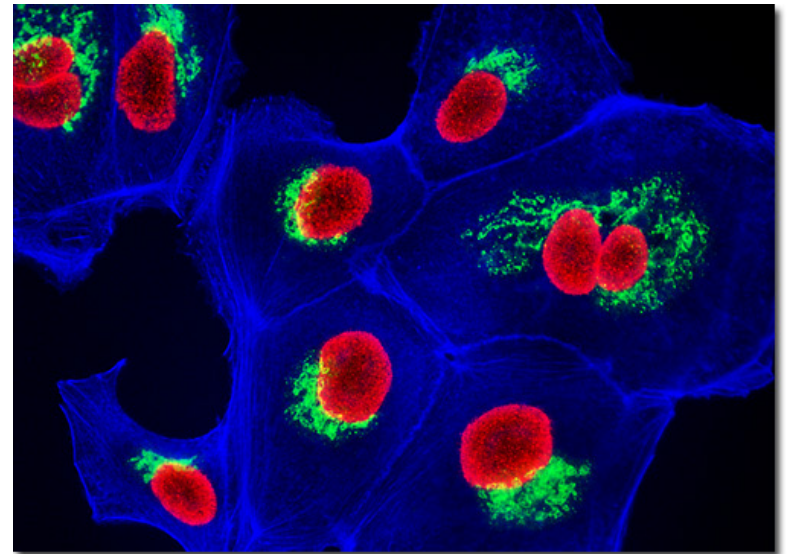


Figure 4

APPROCCIO SPERIMENTALE: DETTAGLIO

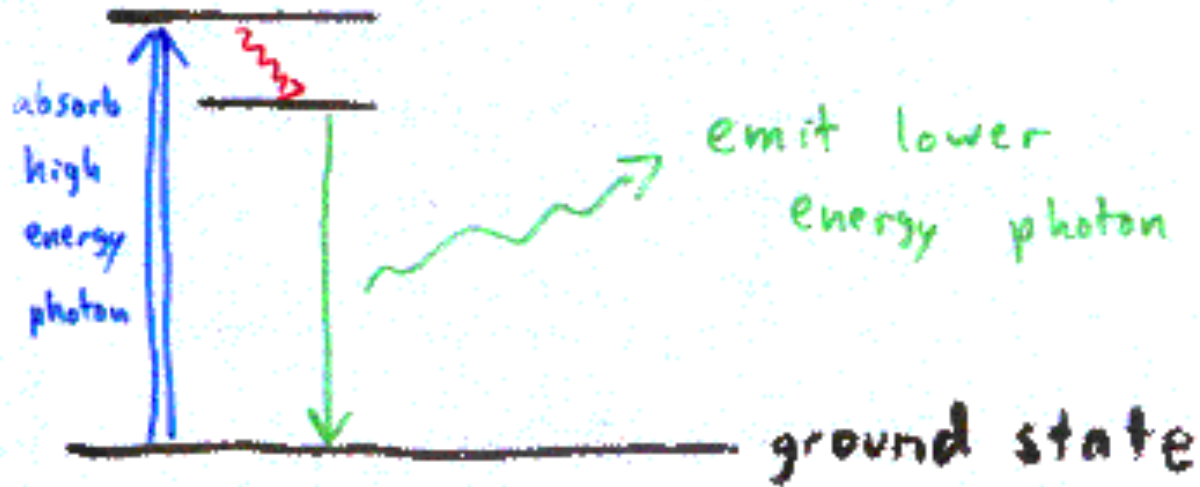
1. SCELTA DEL MODELLO CELLULARE
2. DISEGNO DELL'ESPERIMENTO
3. SCELTA DEI SAGGI
4. SCELTA DEGLI STRUMENTI



MICROSCOPIO A EPIFLUORESCENZA

- visualizza **LUCE DI FLUORESCENZA emessa** dal campione dopo eccitazione
- la **luce di eccitazione e' UV – visibile (può essere IR)**
- il **potere di risoluzione è di 10 nm**
- **l'ingrandimento massimo è 1000 x**
(normalmente 10X per l'oculare e fino a 100X per l'obiettivo)
- la **luce di fluorescenza EMESSA** dal campione è usata per **formare l'immagine**

MICROSCOPIA A FLUORESCENZA



Per la visualizzazione della fluorescenza serve uno **strumento** in grado di eccitare il fluoroforo alla lunghezza d'onda λ eccitazione
E di acquisire la luce emessa = luce di **fluorescenza**

Invitrogen™

EVOS™ M5000 Imaging System

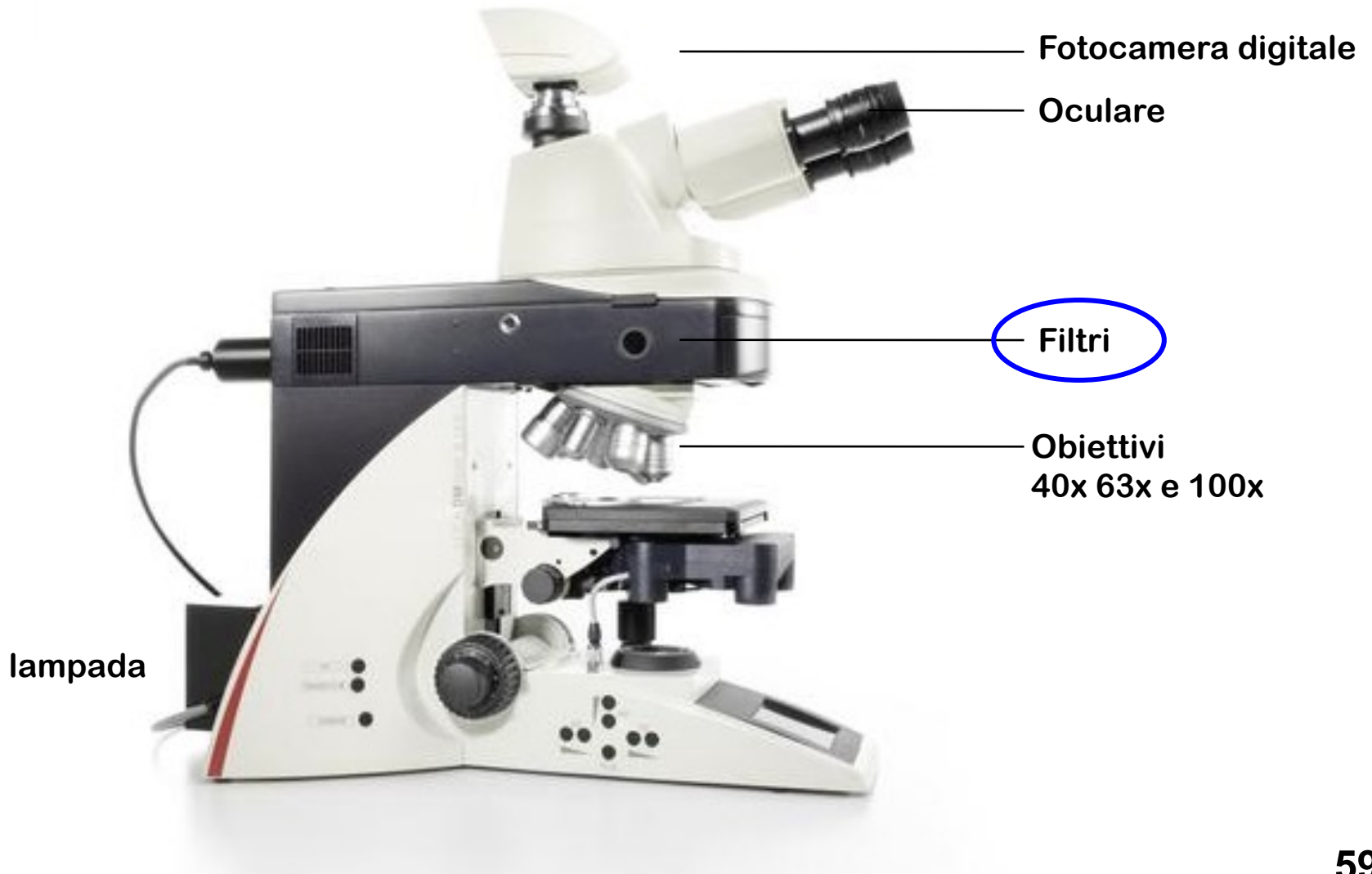
Microscopio campo chiaro/ fluorescenza rovesciato
Fino a 4 canali



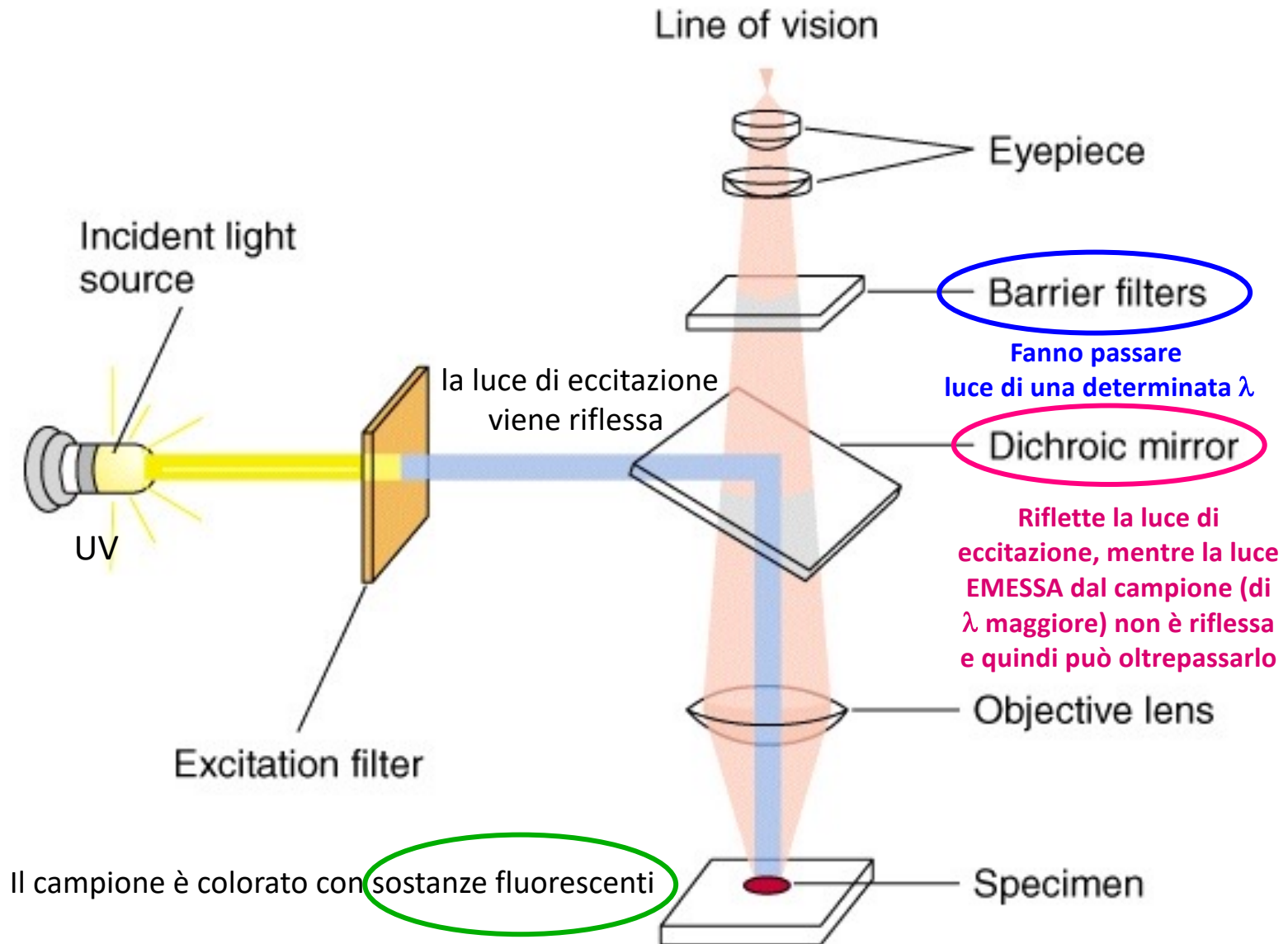
Live imaging

Obiettivi
4x, 10x, 20x e 40x

Microscopio a epifluorescenza upright Leica DM4000

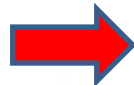


MICROSCOPIO A EPIFLUORESCENZA

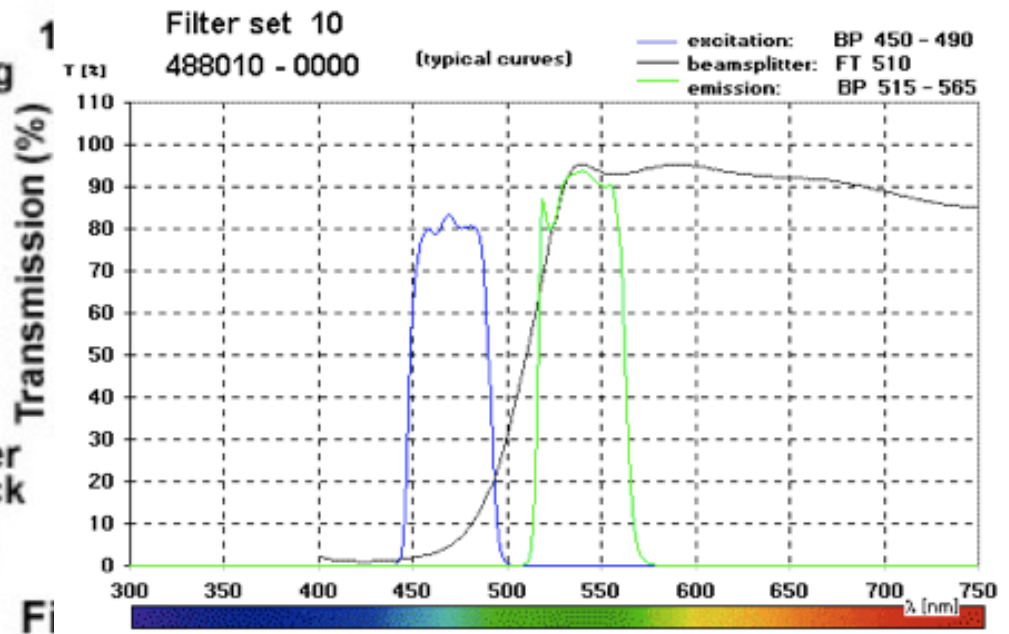
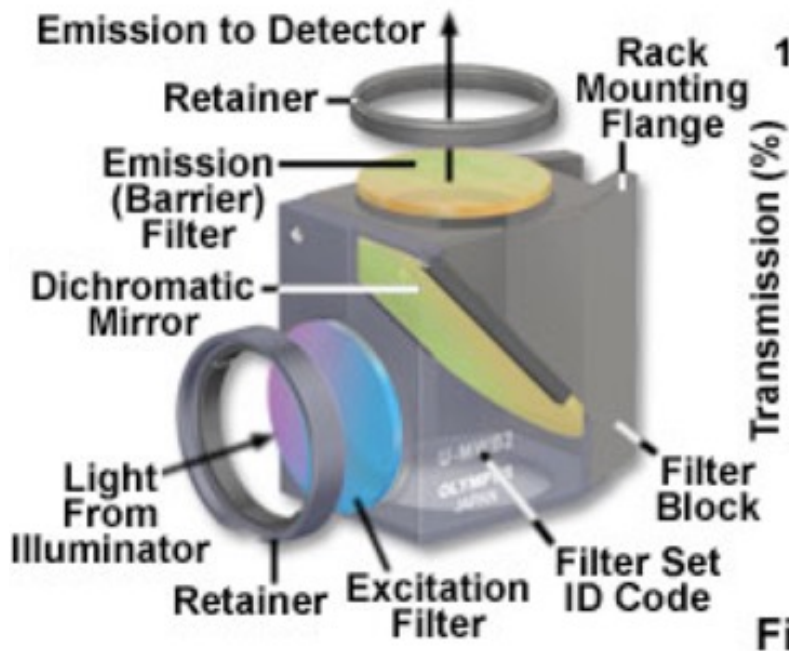


Coloranti fluorescenti comunemente utilizzati in microscopia cellulare

Catalog Code	Description	MW	Excitation (nm)	Emission (nm)	Purpose
890	Certified Blank™				reference
897	Acridine Orange	265	500	526	DNA/RNA
886	Alexa Fluor® 488	643	499	519	conjugate
887	Alexa Fluor® 647	1300	652	668	conjugate
901	Allophycocyanine (APC)	104k	650	660	conjugate
914	APC-Cy™7	104k	650	767	conjugate
898	Chlorophyll (<i>a + b</i>)	8014 (a) 907 (b)	430,453	642,662	plant pigment
895	Cy™5	792	649	666	conjugate
906	DAPI	277	350	470	DNA (A-T)
913	Far-Out Red	-	475,590	663	reference
891	Fluorescein	389	495	519	conjugate
894	Hoechst 33342	616	346	375,390	dsDNA
916	Pacific Blue™	339	410	455	conjugate
899	PE (R-Phycoerythrin)	240k	480, 565	578	conjugate
908	PE-Cy™5	240k	480,565,650	670	conjugate
889	PE-Cy™7	240k	480	767	conjugate
909	PE-TR	240k	480,565,650	670	conjugate
892	Propidium Iodide	668	536	617	DNA intercalator
905	T.M. Rhodamine (TRITC, TAMRA)	430	557	576	conjugate
893	Texas Red® (Sulforhodamine)	625	589	615	conjugate
915	Violet Laser (Glacial Blue)	-	360	450	reference



Fluorescence Filter Cube (Block) and Associated Spectra



Combinazione A:

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

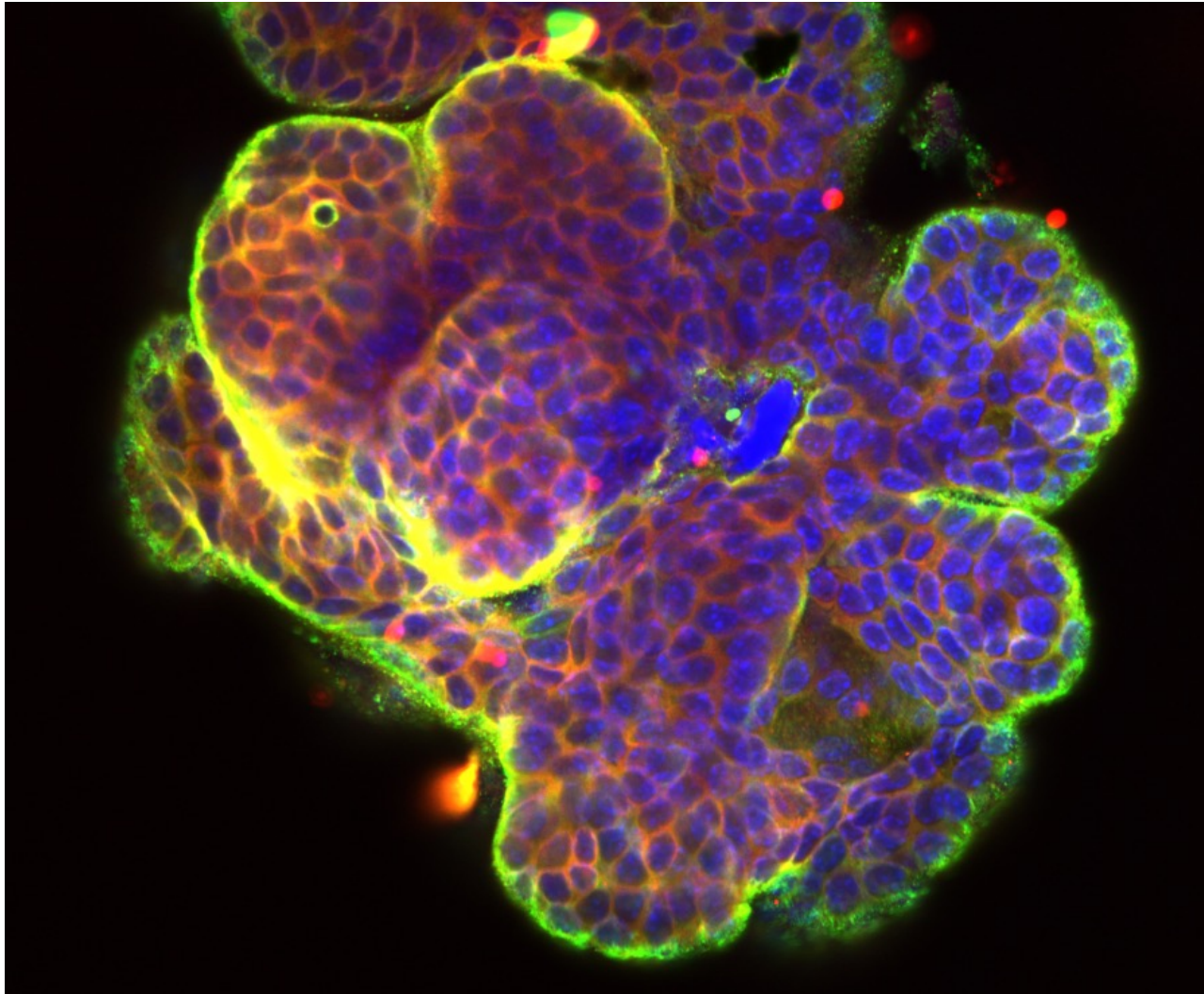
Combinazione I3:

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

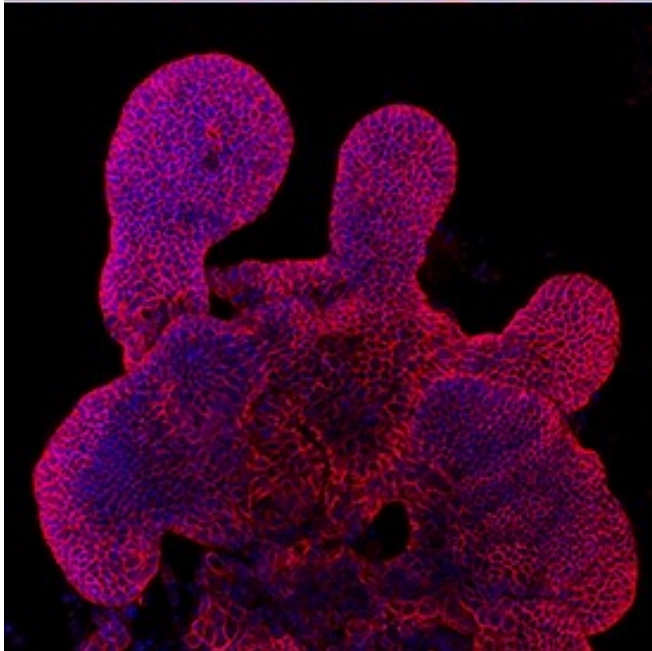
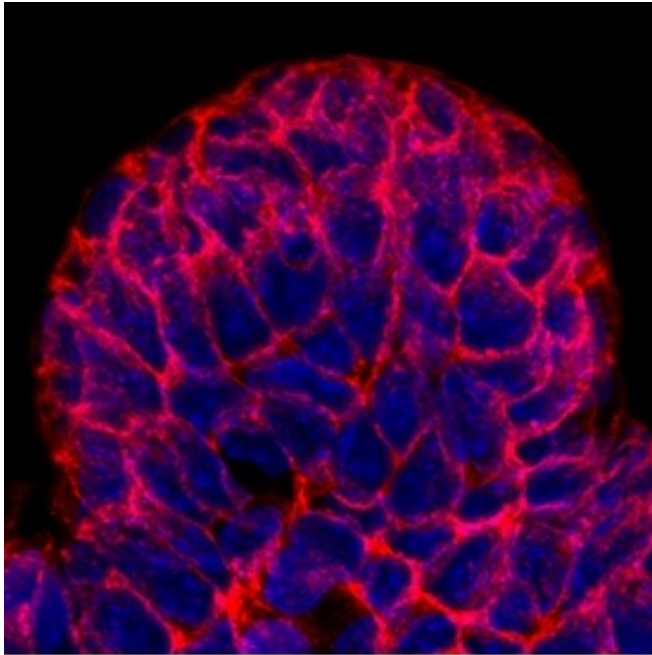
Analisi di campioni 3D



Organoide
derivato da
tessuto epiteliale
mammario di
topo

Nuclei (DAPI)
CK 14 - FITC
CK 18 - RITC

Immagine al
microscopio
a
fluorescenza
confocale



E-Cadherin in Mouse Intestinal Organoids.

E-Cadherin was detected in immersion fixed mouse intestinal organoids using Goat Anti-Human/Mouse E-Cadherin Antigen Affinity-purified Polyclonal Antibody at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 3 hours at room temperature.

Cells were stained using the NorthernLights™ 557-conjugated Anti-Goat IgG Secondary Antibody and counterstained with DAPI (blue).

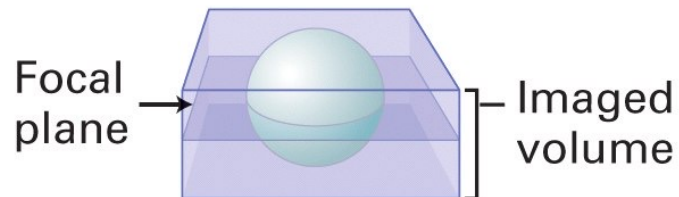
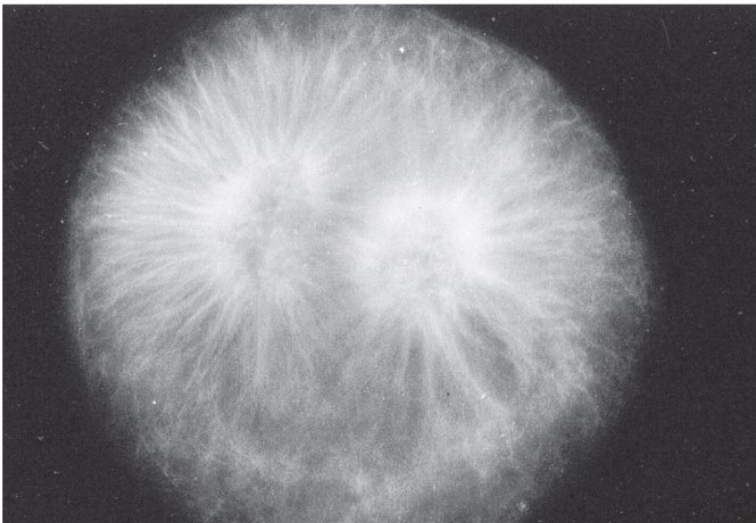
Magnification shown at 100X (upper panel) and 40X (lower panel).

Specific staining was localized to cell surfaces.

TECNICHE DI IMAGING PER CAMPIONI 3D

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

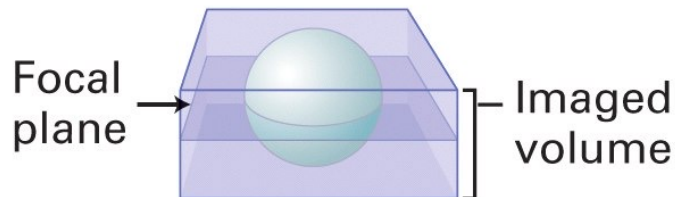
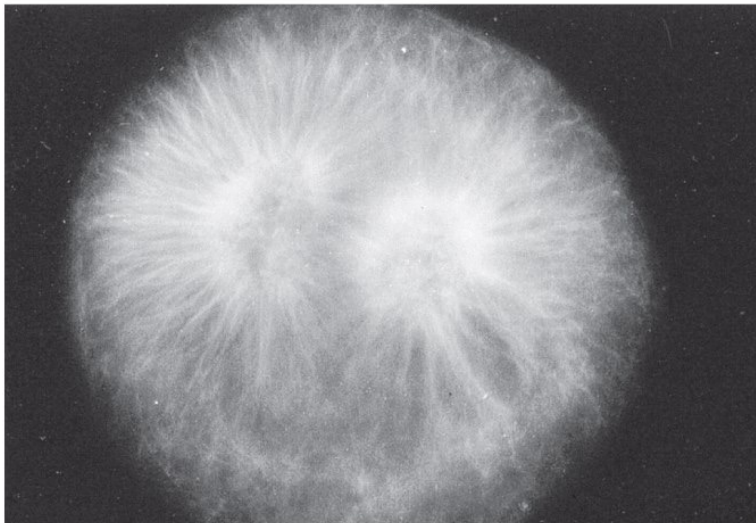
(a) Conventional fluorescence microscopy



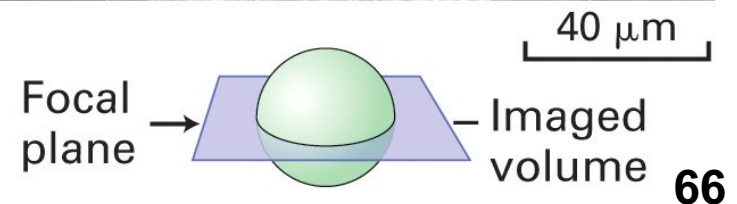
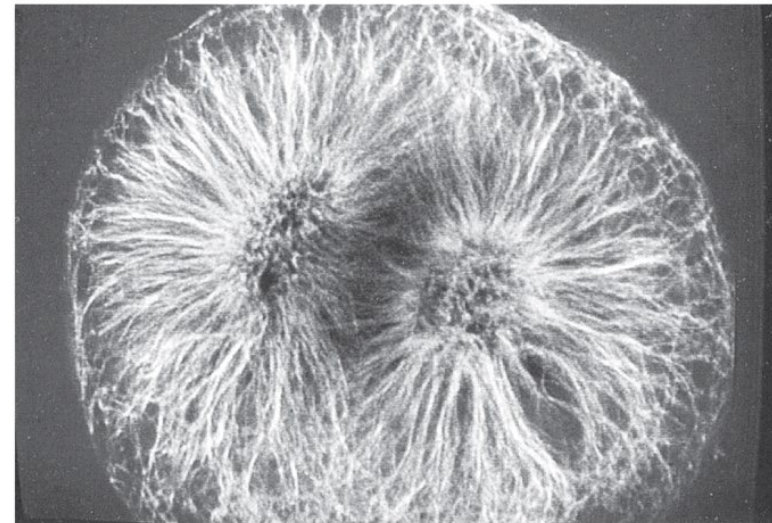
MICROSCOPIA A FLUORESCENZA CONFOCALE

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

(a) Conventional fluorescence microscopy



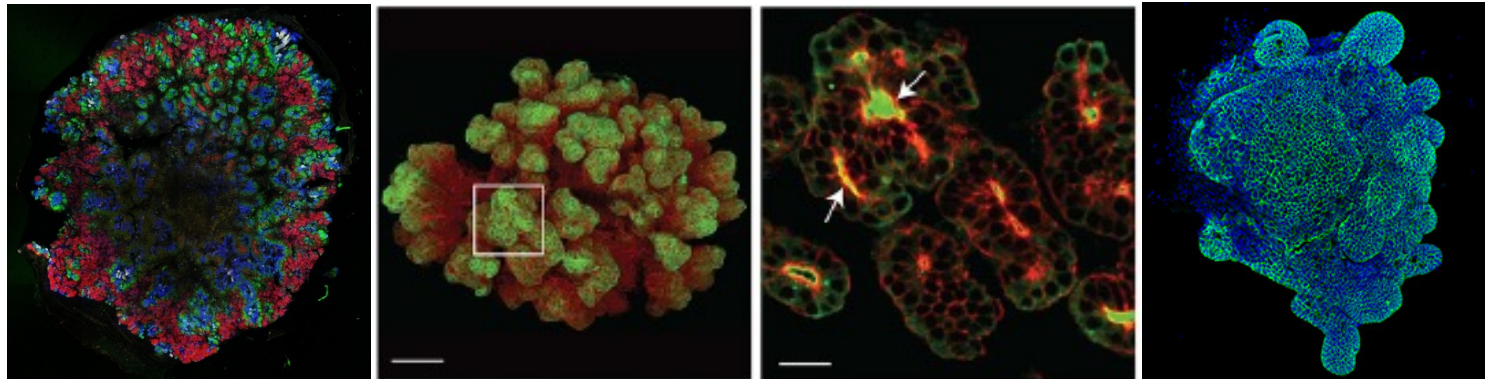
(b) Confocal fluorescence microscopy



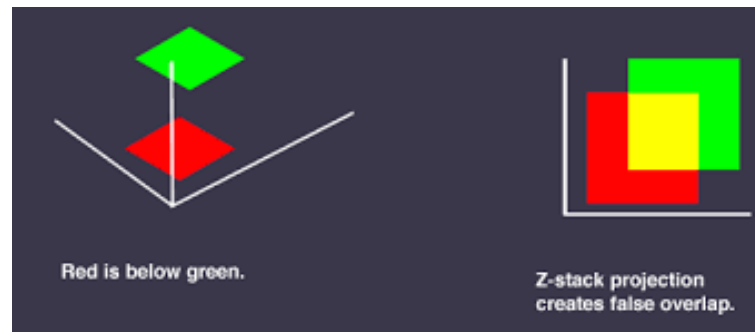
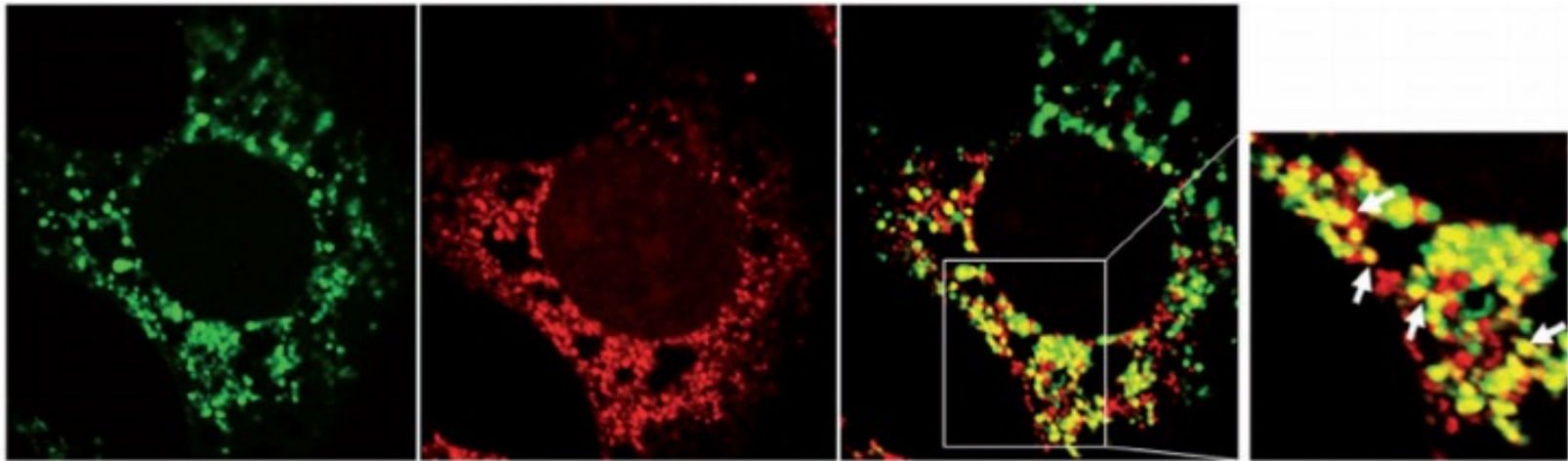
Ottenimento di immagini 3D

mediante microscopia confocale:

diverse sezioni ottiche confocali del campione vengono utilizzate da un algoritmo che ricostruisce un'immagine 3D interamente a fuoco



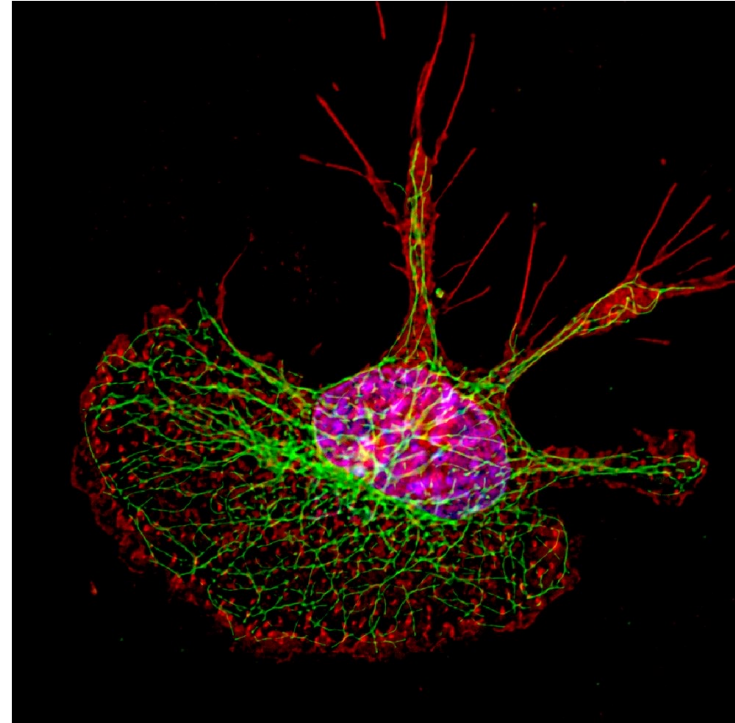
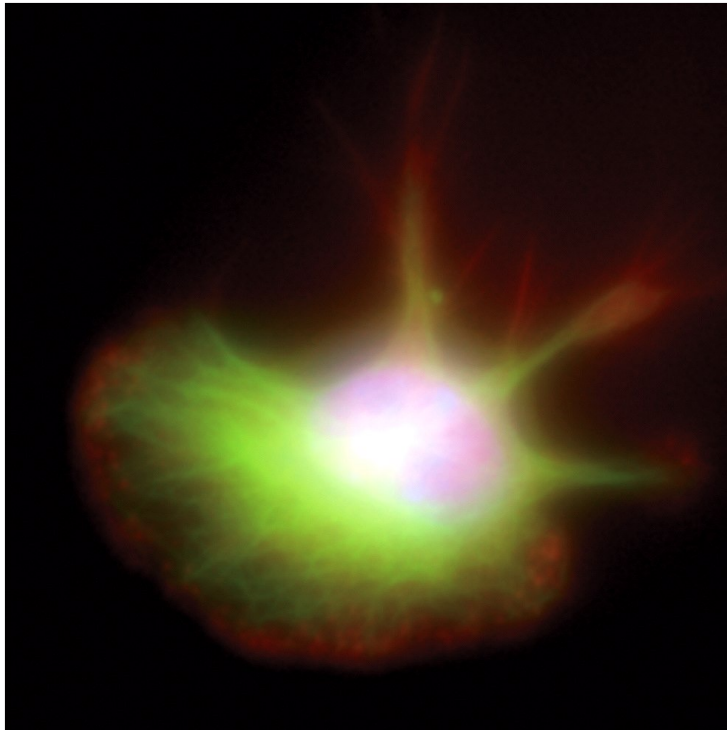
Utilizzo della microscopia confocale per analizzare la colocalizzazione di segnali nella cellula



Se 2 o più segnali colocalizzati sono confocali, le molecole possono essere considerate co-localizzate nella cellula

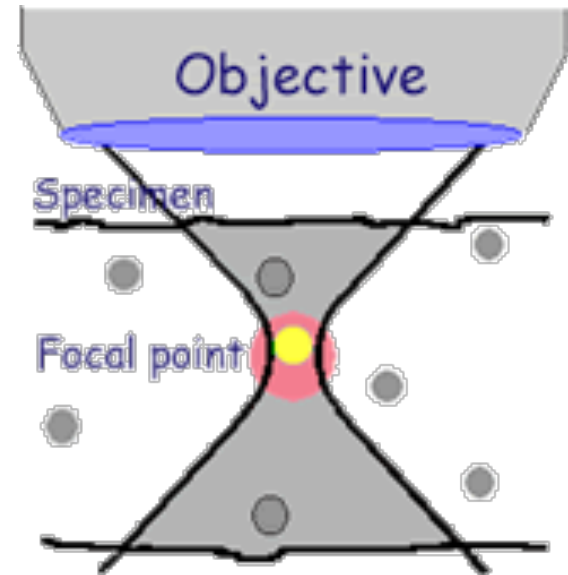
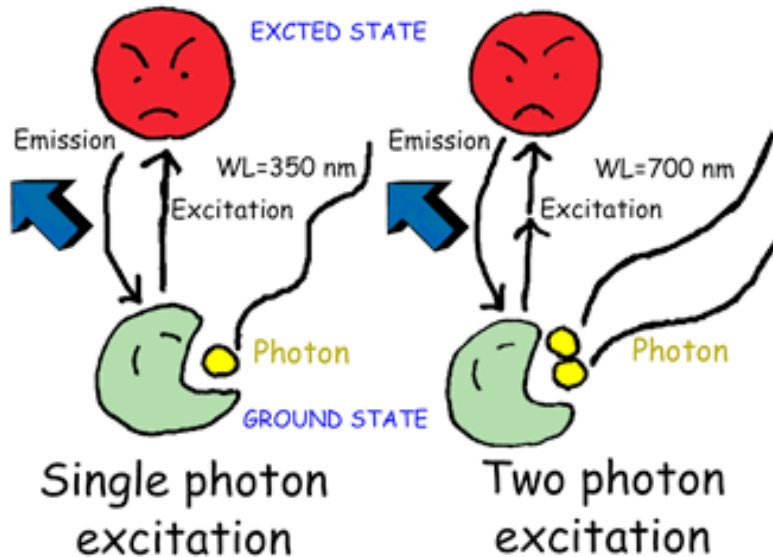
Deconvoluzione e Computational Clearing

Un algoritmo di deconvoluzione o computational clearing ricostruisce l'immagine riassegnando alla luce il corretto piano focale.



MICROSCOPIA A 2 FOTONI per imaging IN VIVO

2-photon/multiphoton excitation microscopy



Eccitazione mediante **assorbimento simultaneo di due fotoni nell'infrarosso** (800-900 nm): la lunghezza d'onda della luce di eccitazione è maggiore di quella della luce emessa, ma l'energia fornita è comunque maggiore (eccitazione = 2 fotoni, emissione = 1 fotone)

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

