

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2024-2025

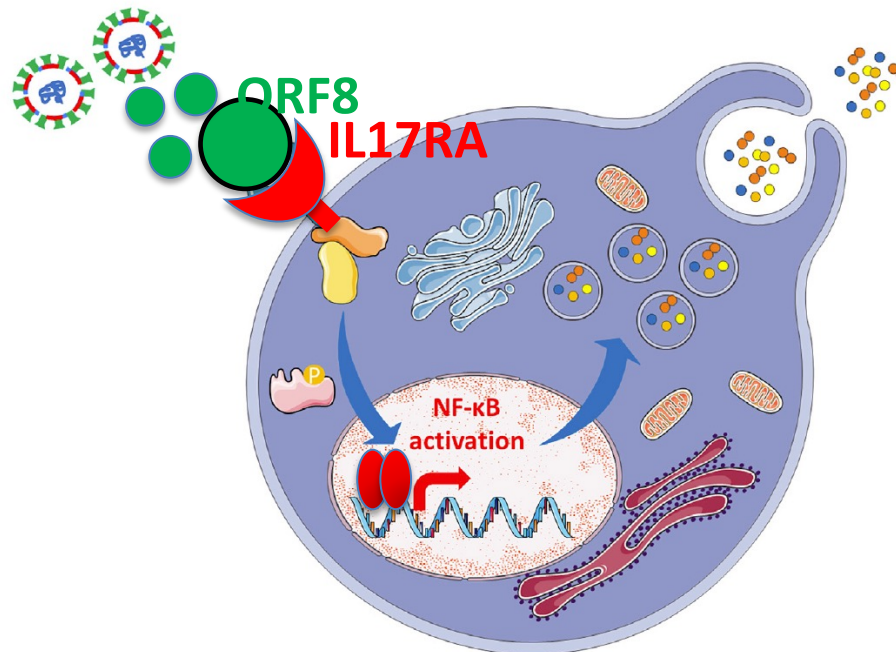
Corso di Biotecnologie Cellulari

Lezione 6

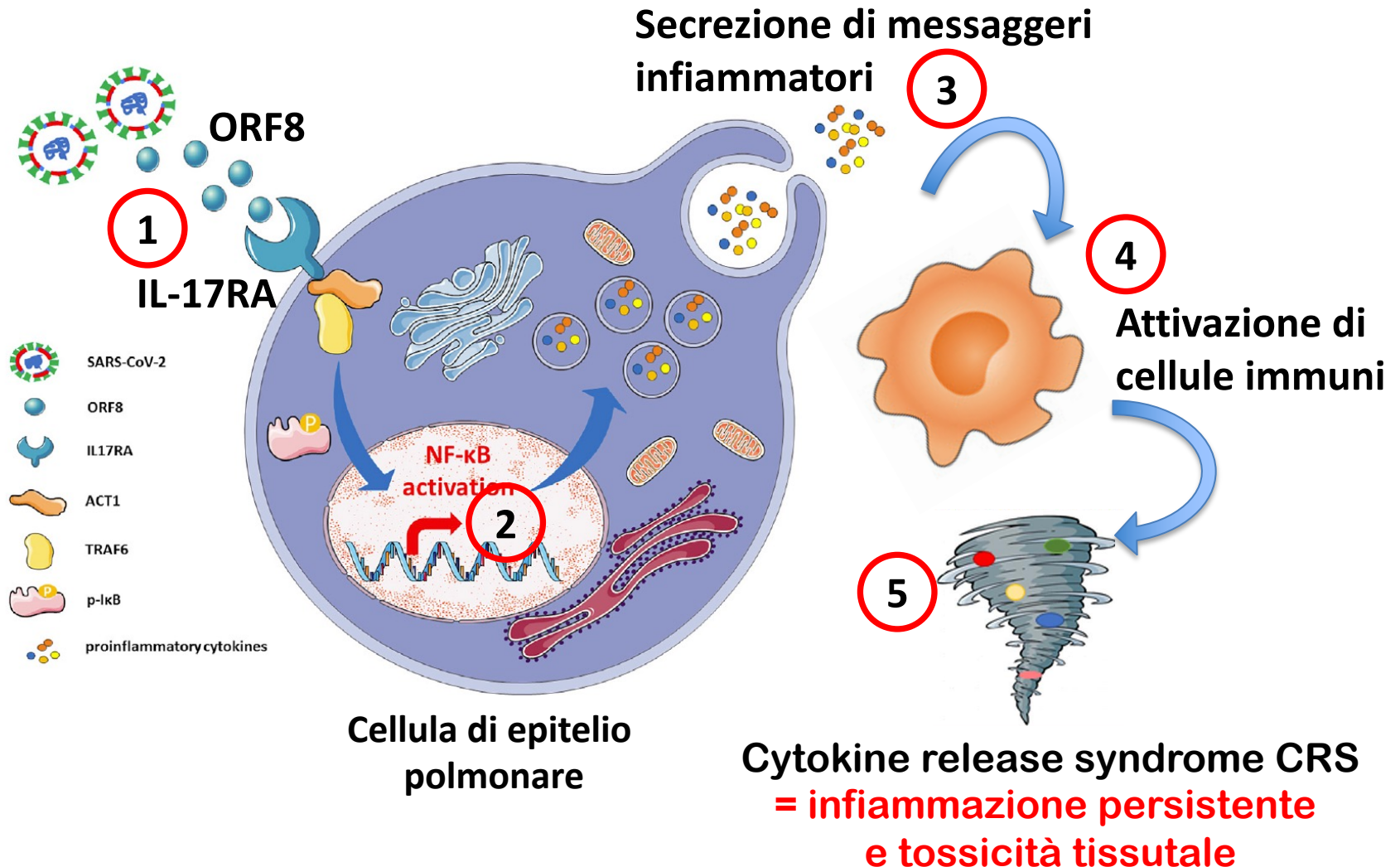
set	data	Teoria tutti	Lab gruppo 1	Lab gruppo 2
7	07/11		14-18 trasfezione 2 gruppi: 1) 14.15-16.00 e 2) 16.00-17.45	
	08/11		13.15-17 IF tutti	
8	14/11		Microscopia 3 gruppi 1) 14.15-16.00 2) 16.00-17.45	14-18 trasfezione 2 gruppi: 1) 14.15-16.00 e 2) 16.00-17.45
	15/11		Microscopia gruppo 3) 13.15-15.00	13-17 IF
9	21/11		14-18 chemotassi 1 parte	Microscopia 3 gruppi 1) 14.15-16.00 2) 16.00-17.45
	22/11		13-17 chemotassi 2 parte	Microscopia gruppo 3) 13.15-15.00
10	28/11			14-18 chemotassi 1 parte
	29/11			13-17 chemotassi 2 parte
11	05/12	14-17 Lez 7	17-18 morte cellulare	
	06/12		13-17 morte cellulare	
12	12/12	14-17 Lez 8		17-18 morte cellulare
	13/12			13-17 morte cellulare
13	19/12			

1. **ESPERIMENTO 1: sovraespressione transiente delle proteine virali Spike e ORF8 (in fusione con TAG HA) in un modello cellulare;**
2. **ESPERIMENTO 2: Analisi dell'interattoma delle proteine virali (esperimento virtuale).**

RISULTATO: ORF8 lega la porzione extracellulare del recettore per IL-17



IPOSTESI: ORF8 lega e attiva il recettore IL-17RA nelle cellule di epitelio polmonare innescando una risposta infiammatoria



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

ESPERIMENTO 3:

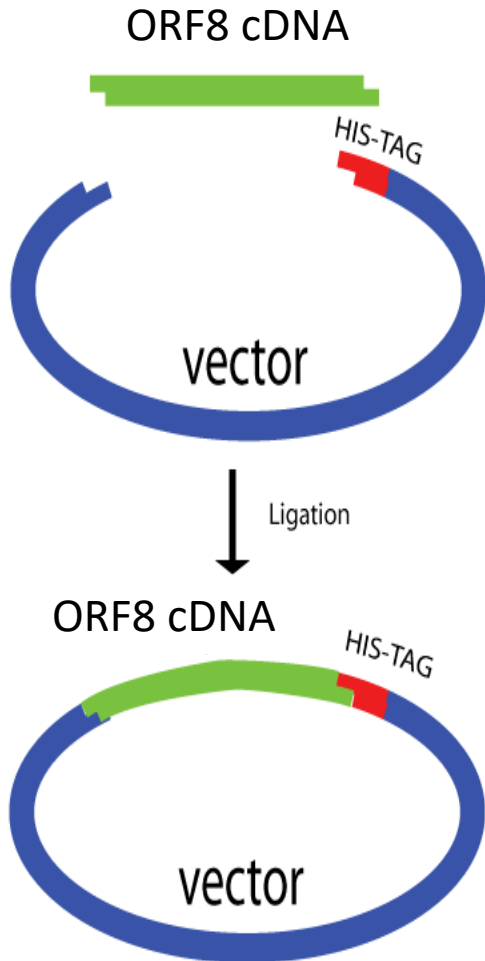
Analisi della capacità di ORF8 di indurre reclutamento e attivazione di cellule infiammatorie da parte di cellule di polmone via IL17RA

STRATEGIA SPERIMENTALE:

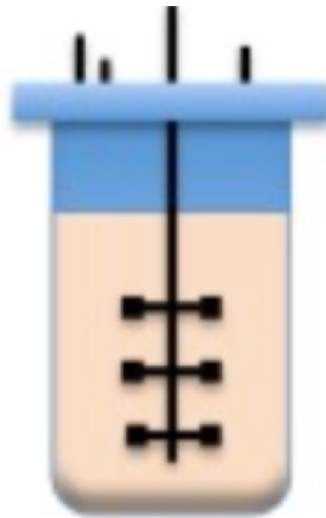
- 1) Scelta dei modelli cellulari**
H1299 (linea di cellule epiteliali – origine polmone)
- 2) Trattamento** di cellule epiteliali H1299 **con proteina ORF8 purificata**
- 3) Analisi degli eventi a valle (secrezione di citochine infiammatorie e attivazione di cellule immuni)**

Produzione e purificazione della proteina ORF8-His

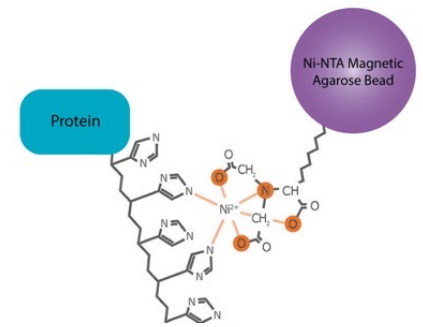
- **Clonaggio**



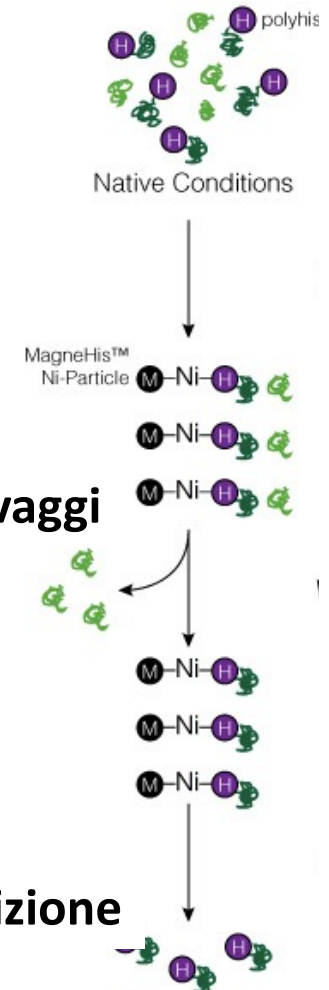
- **Trasformazione batterica**
- **Selezione**
- **Coltura**



- **Lisi dei batteri**



- **Legame alla resina**



- **Lavaggi**

- **Eluizione**

Stimolazione di cellule polmonari con ORF8

CELLULE H1299

(linea cellulare epiteliale - polmone)

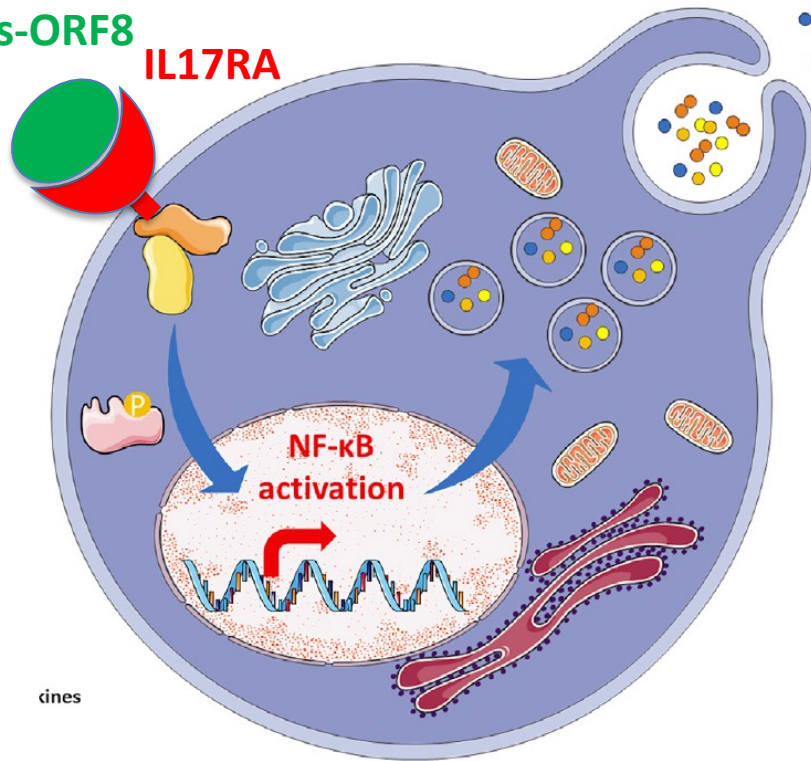
Terreno condizionato
da cellule trattate con
His-ORF8

His-ORF8

IL17RA



citochine infiammatorie



Dosaggio delle citochine secrete (esperimento virtuale)

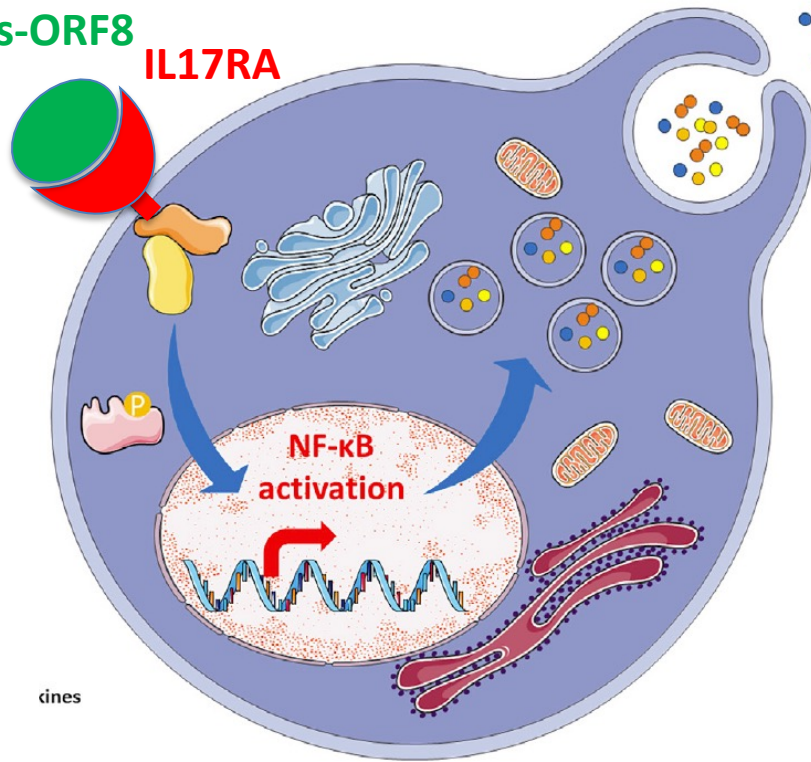
CELLULE H1299

(linea cellulare epiteliale - polmone)

Terreno condizionato
da cellule trattate con
His-ORF8

His-ORF8

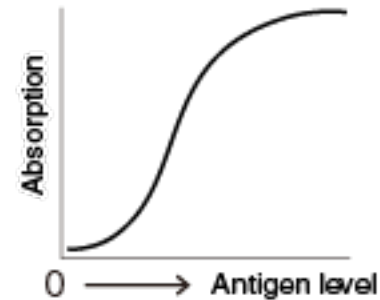
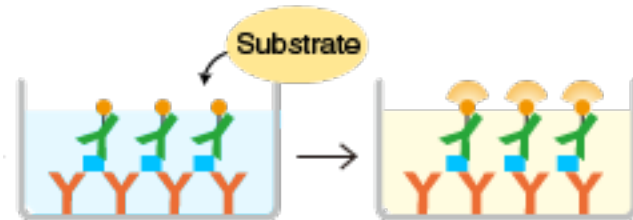
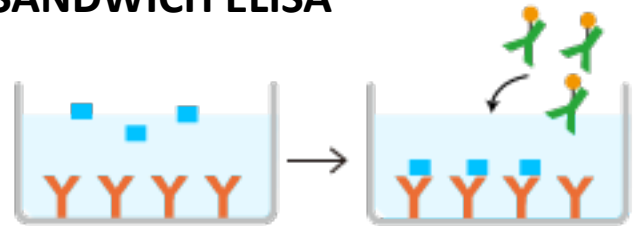
IL17RA



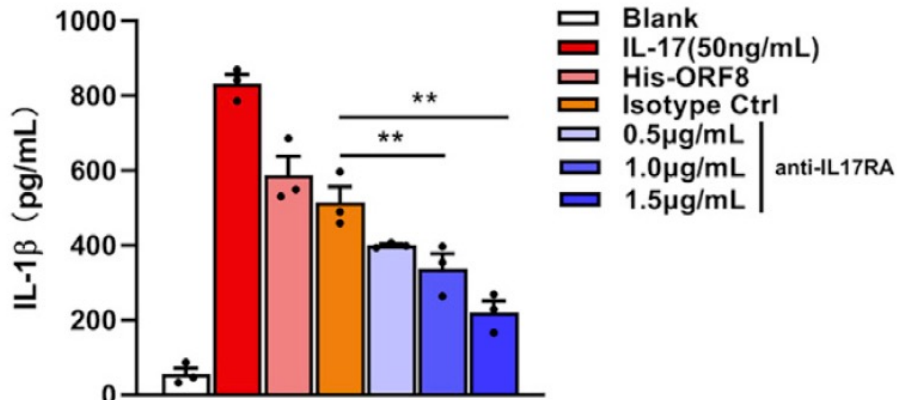
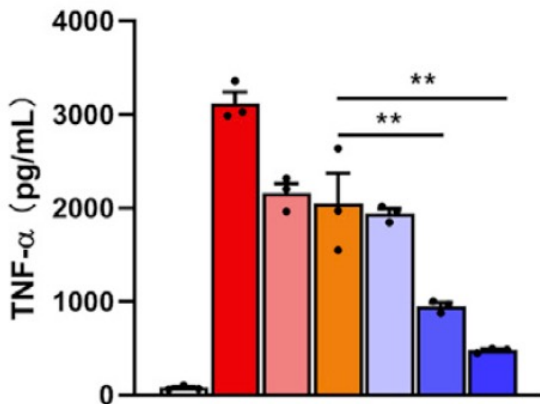
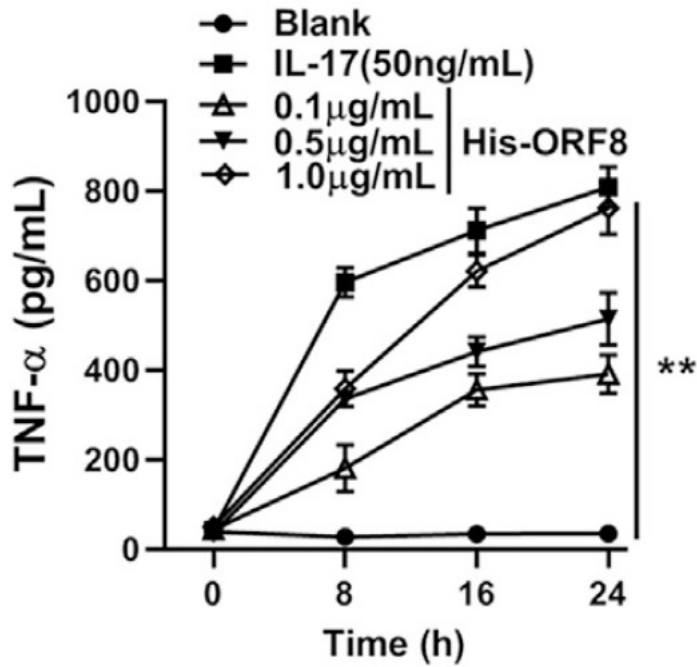
cines



SANDWICH ELISA

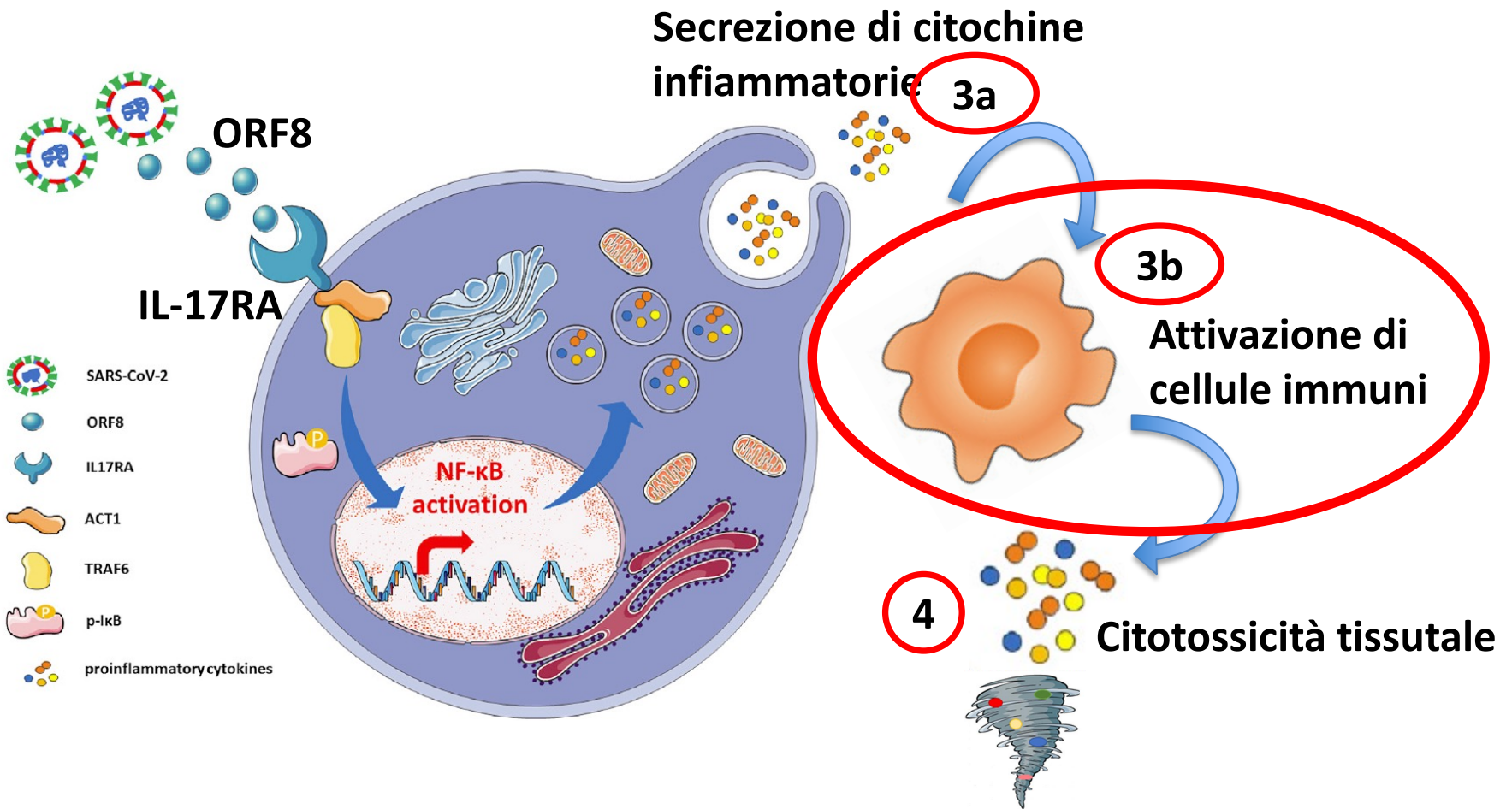


Dosaggio di citochine secrete dopo stimolazione con ORF8 (controllo positivo: IL-17)



ESPERIMENTO 3 - PARTE SVOLTA IN LAB DIDATTICO:

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



ESPERIMENTO 3- PARTE SVOLTA IN LAB DIDATTICO:

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

STRATEGIA SPERIMENTALE:

1) Scelta dei modelli cellulari

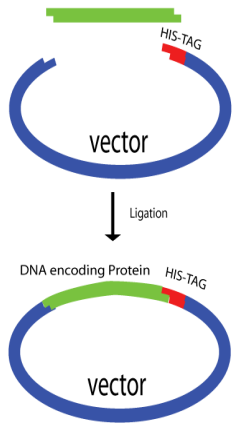
H1299 (linea di cellule epiteliali – origine polmone)

THP-1 (linea di cellule monocitiche)

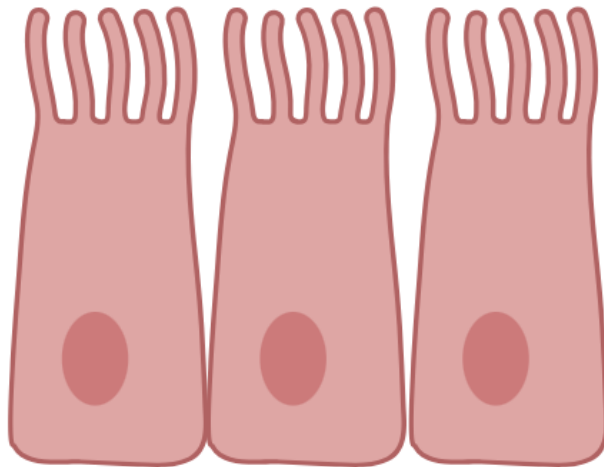
2) Trattamento di cellule epiteliali H1299 con proteina ORF8 purificata

3) Analisi degli eventi a valle (attivazione di macrofagi)

Trattamento di cellule epiteliali H1299 con proteina ORF8 purificata e raccolta del terreno condizionato

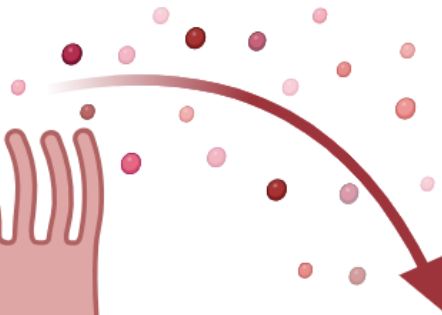


His-ORF8 1 $\mu\text{g/ml}$



CELLULE H1299
(linea cellulare epiteliale - polmone)

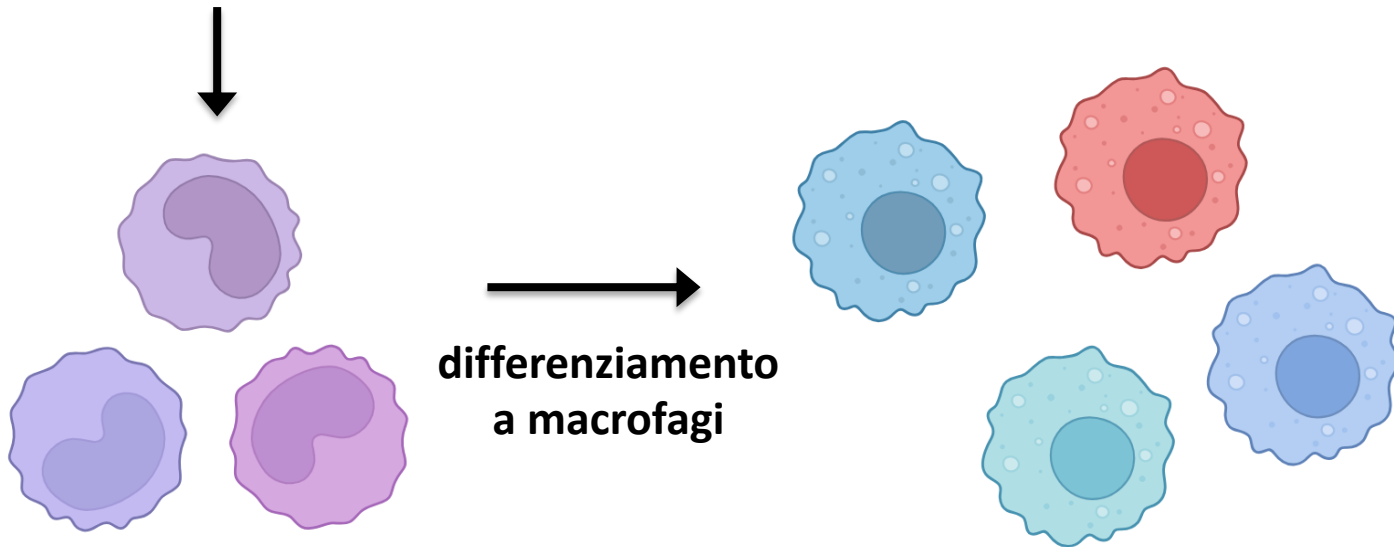
Terreno condizionato da cellule trattate con His-ORF8 1 $\mu\text{g/ml}$



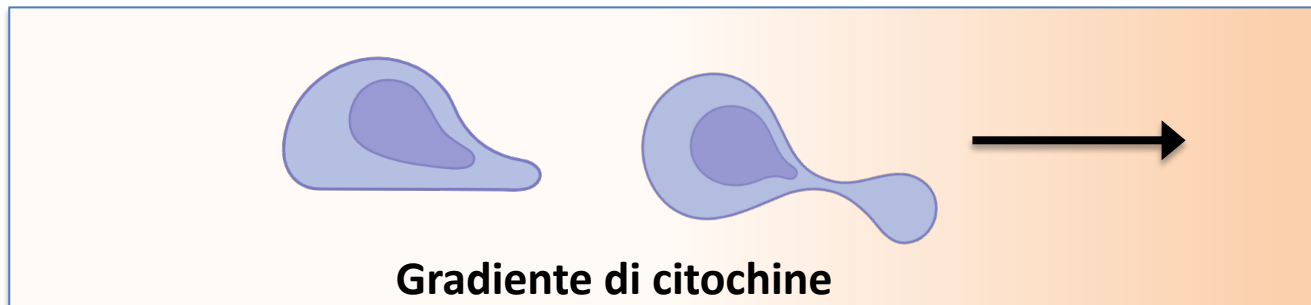
Incubazione di CELLULE THP-1
(linea cellulare monocitica)
con il terreno condizionato

Analisi dell'effetto su cellule immuni/infiammatorie

Incubazione di CELLULE THP-1 (linea cellulare monocitica) con il terreno condizionato da cellule H1299 trattate con His-ORF8



Analisi dell'attivazione e della chemiotassi



ESPERIMENTO:

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

STRATEGIA SPERIMENTALE:

1) Scelta dei modelli cellulari

H1299 (linea di cellule epiteliali – origine polmone)

THP-1 (linea di cellule monocitiche che possono differenziare a macrofagi)

2) Disegno dell'esperimento

1) Trattamento di cellule epiteliali H1299 con proteina ORF8 purificata

2) Scelta dei controlli positivi e negativi

3) Raccolta del terreno condizionato (TC contenente citochine)

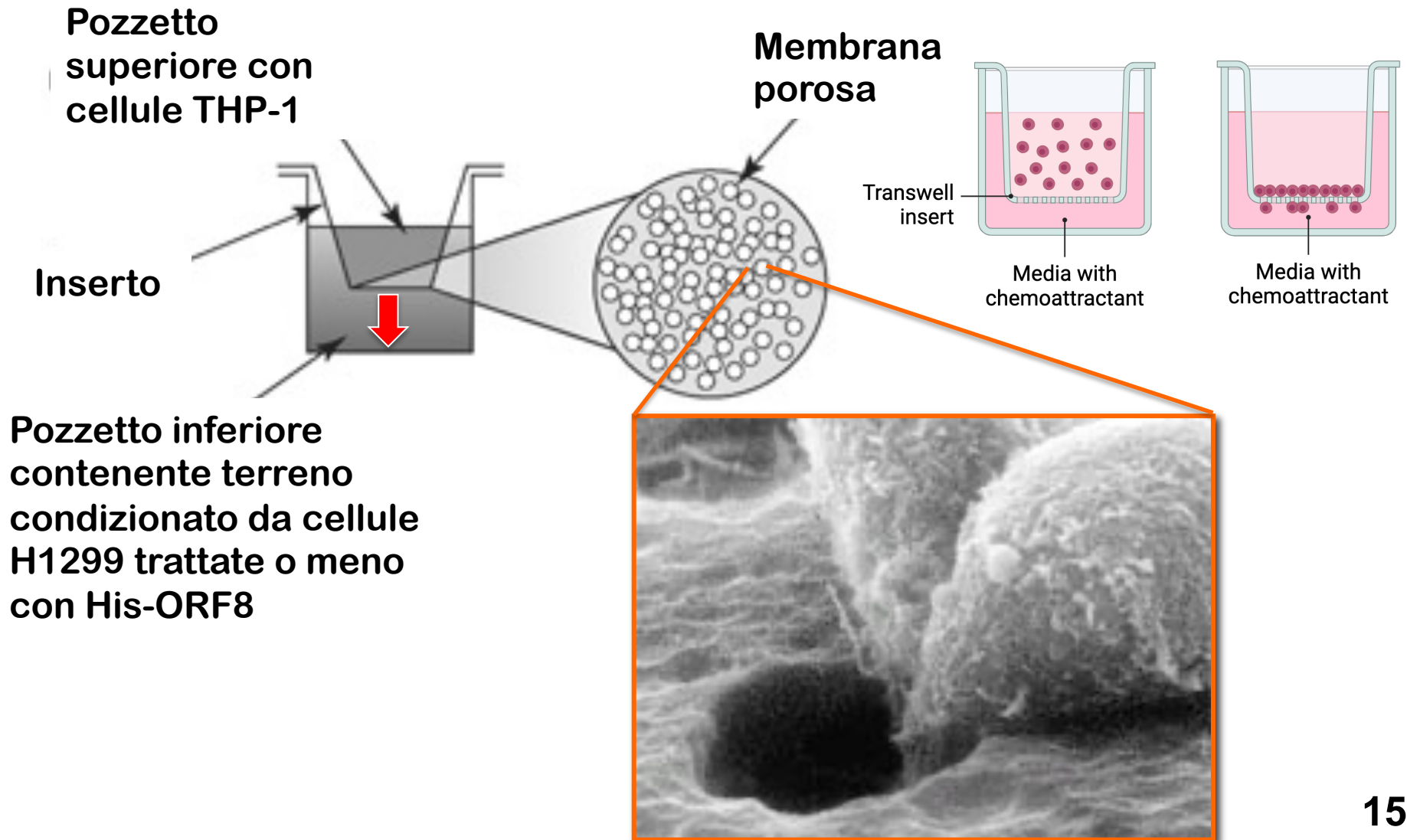
3) Scelta del saggio

analisi dell'effetto del TC sull'attivazione di macrofagi mediante saggio di chemiotassi (transwelling)

4) Scelta dello strumento

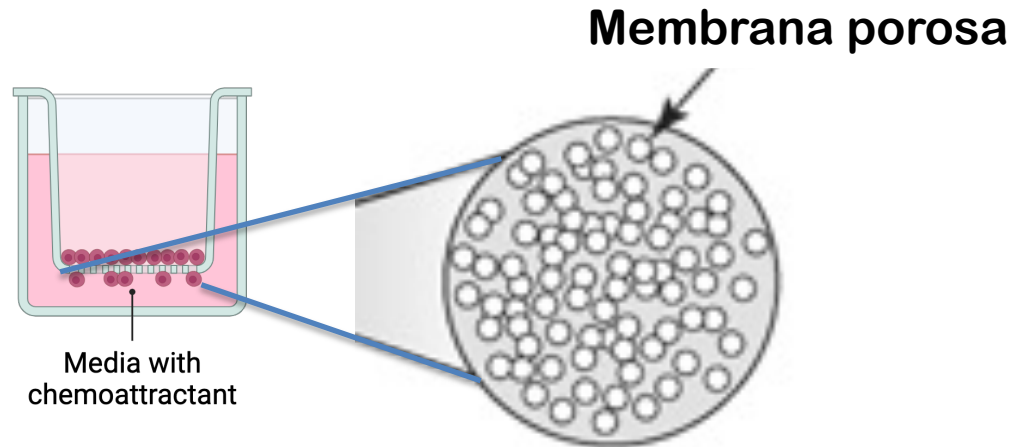
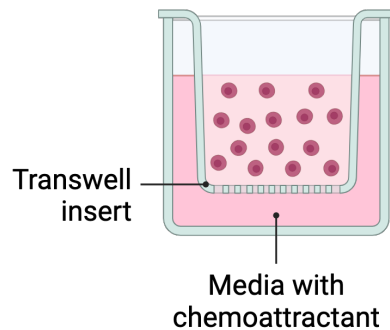
Analisi delle cellule migrate al microscopio ottico

SAGGIO: Saggi di chemiotassi con camera di Boyden (transwelling)

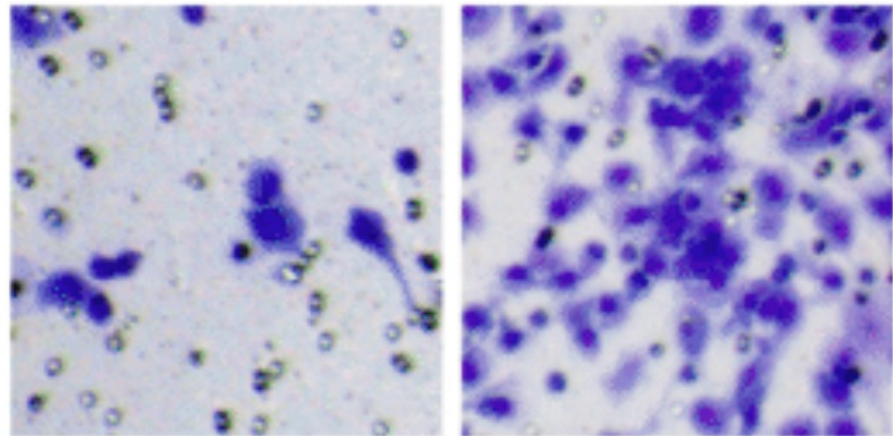


STRUMENTO: conta delle cellule al microscopio ottico dopo colorazione

Pozzetto superiore
con cellule THP-1



Pozzetto inferiore con
terreno condizionato da
cellule H1299 trattate
con His-ORF8

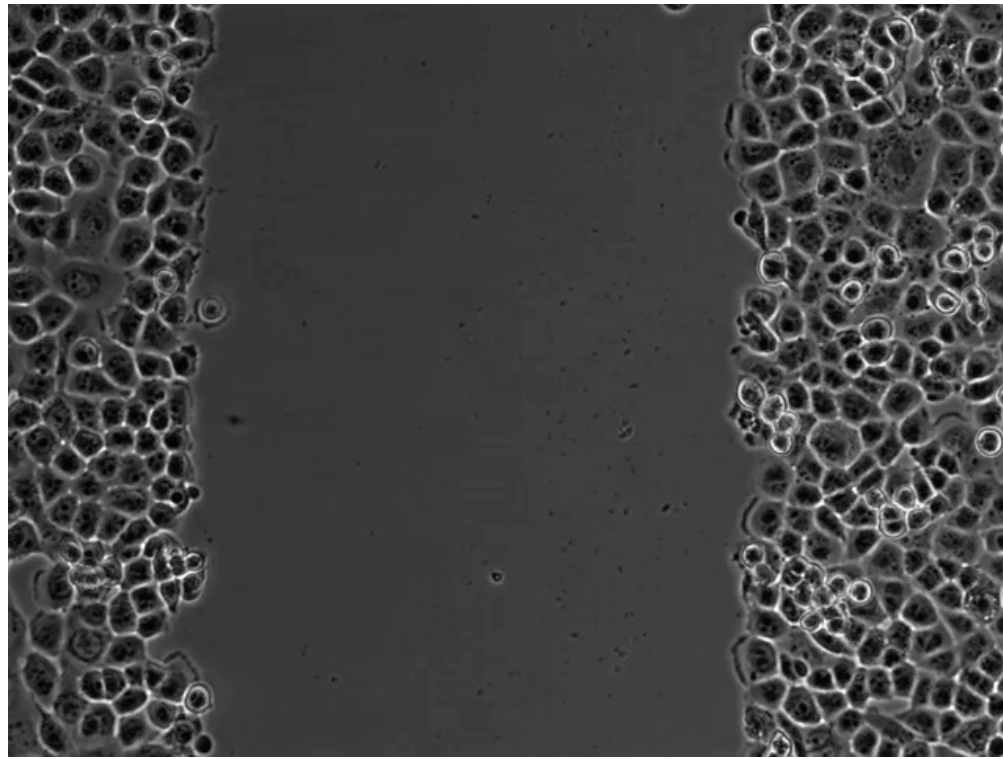
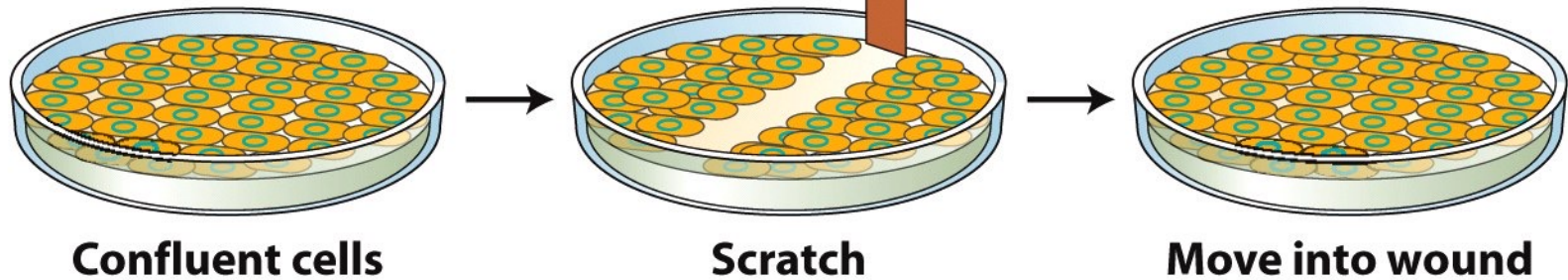


Colorazione con crystal violet
e osservazione delle cellule migrate

Possibilità alternative di saggi e strumenti

Saggi di motilità cellulare 2D per cellule in adesione: wound-healing

(a)



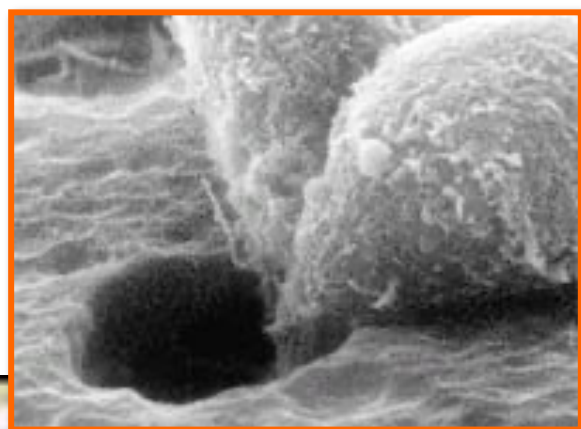
Analisi della migrazione cellulare mediante live imaging



IncuCyte® live-cell analysis system

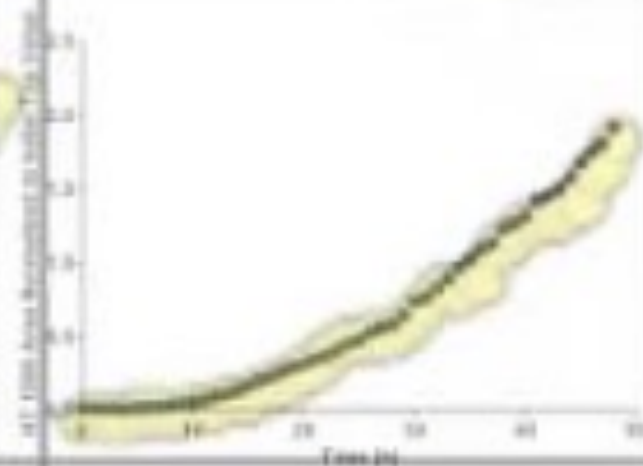
<https://www.sartorius.com/en/products/live-cell-imaging-analysis/live-cell-analysis-instruments#id-819590>

Live imaging per saggi di transwelling



HT-1080 migration to FBS

Real time quantitative data



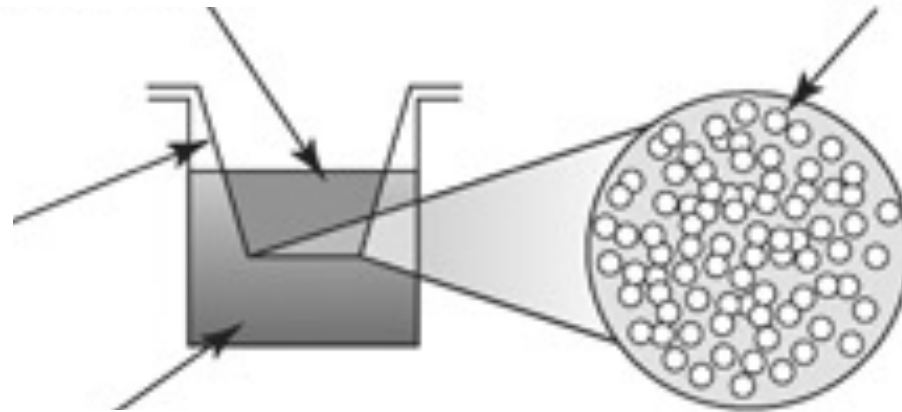
Saggi di invasione

**Pozzetto superiore:
cellule seminate in
matrice 3D**

membrana
porosa

Inserto

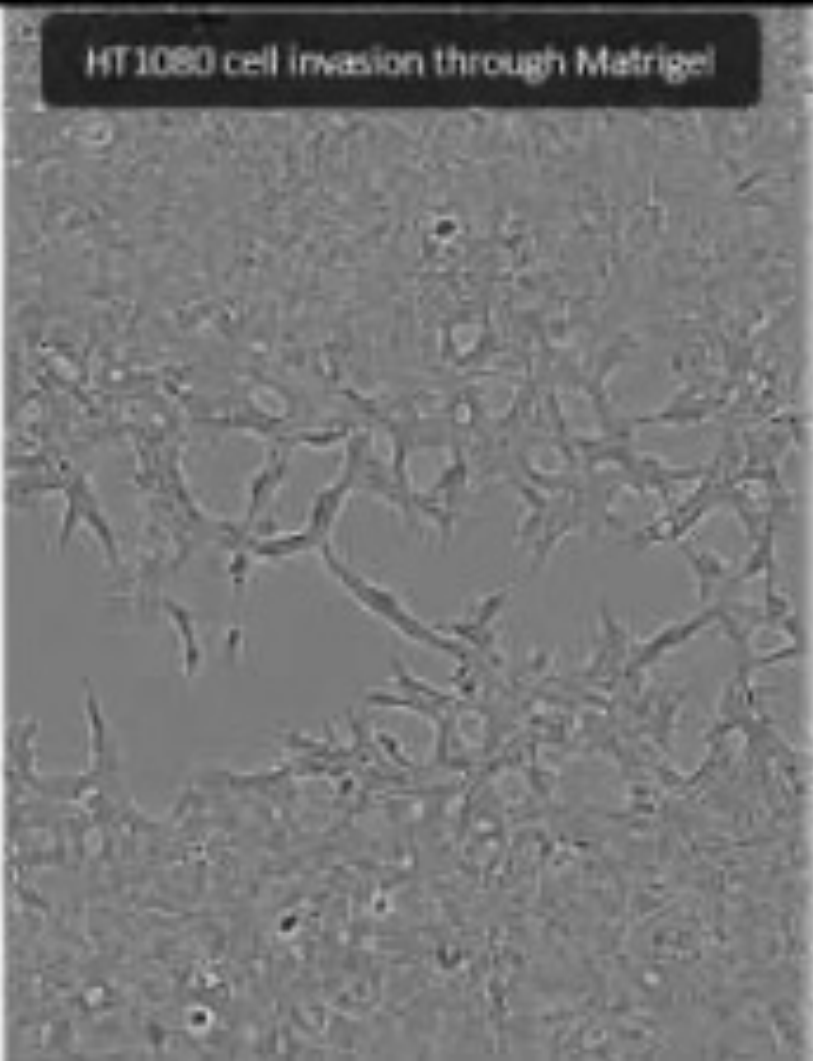
Terreno contenente
siero



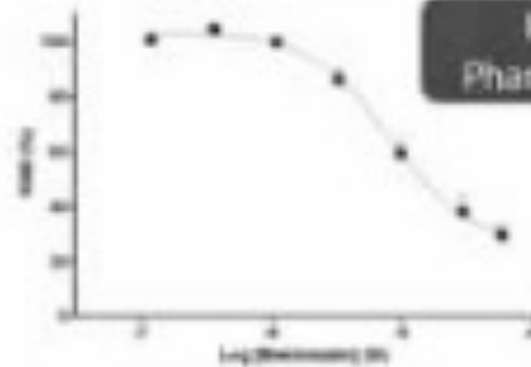
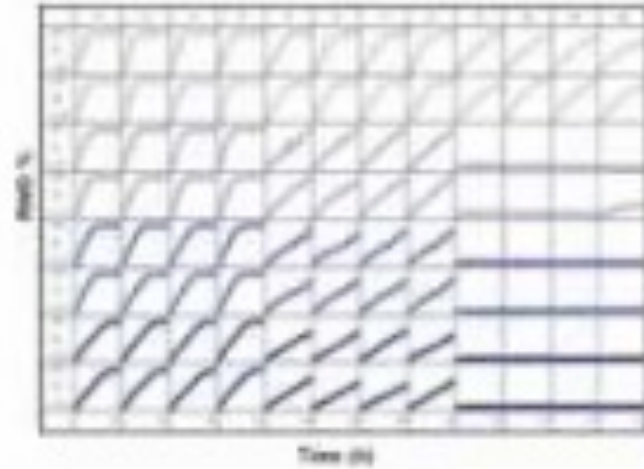
Si misura la capacità delle cellule di migrare attraverso un gel di collagene o Matrigel polimerizzato su un filtro poroso

Live imaging per saggi di invasione

HT1080 cell invasion through Matrigel



96 & 384-well kinetic plate views

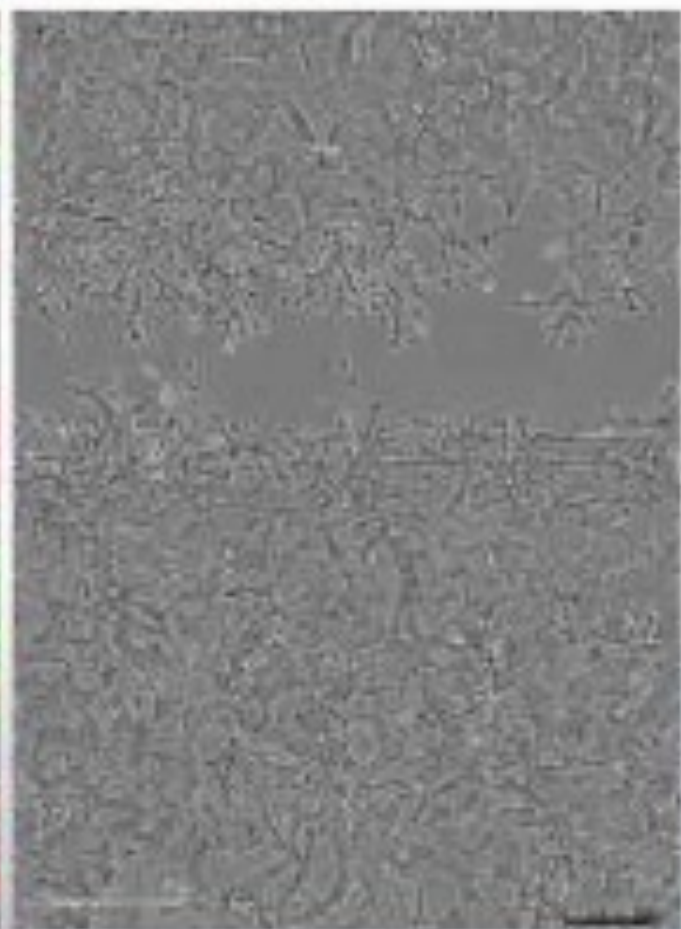
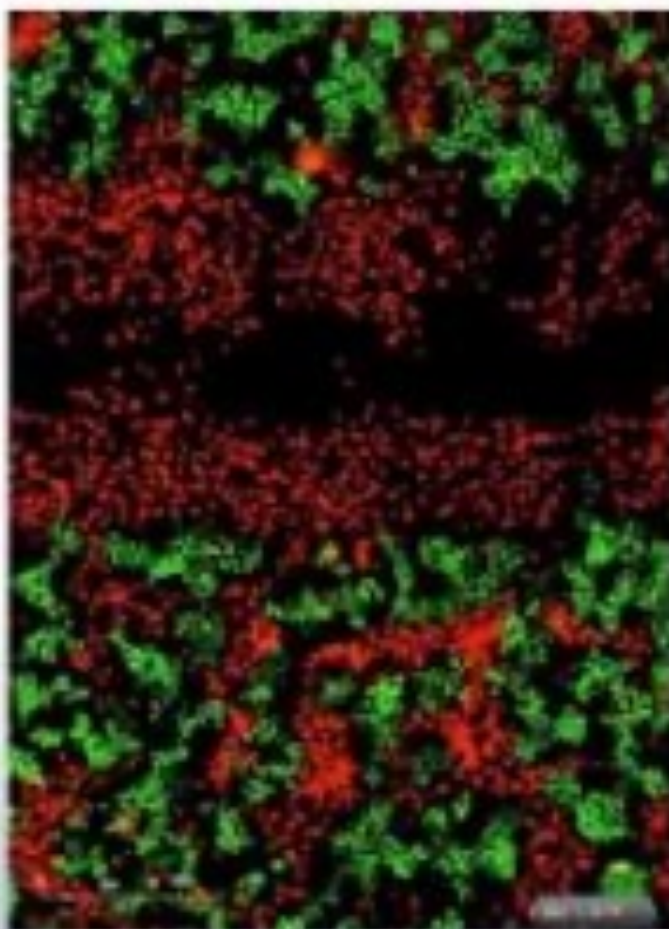


Kinetic Pharmacology

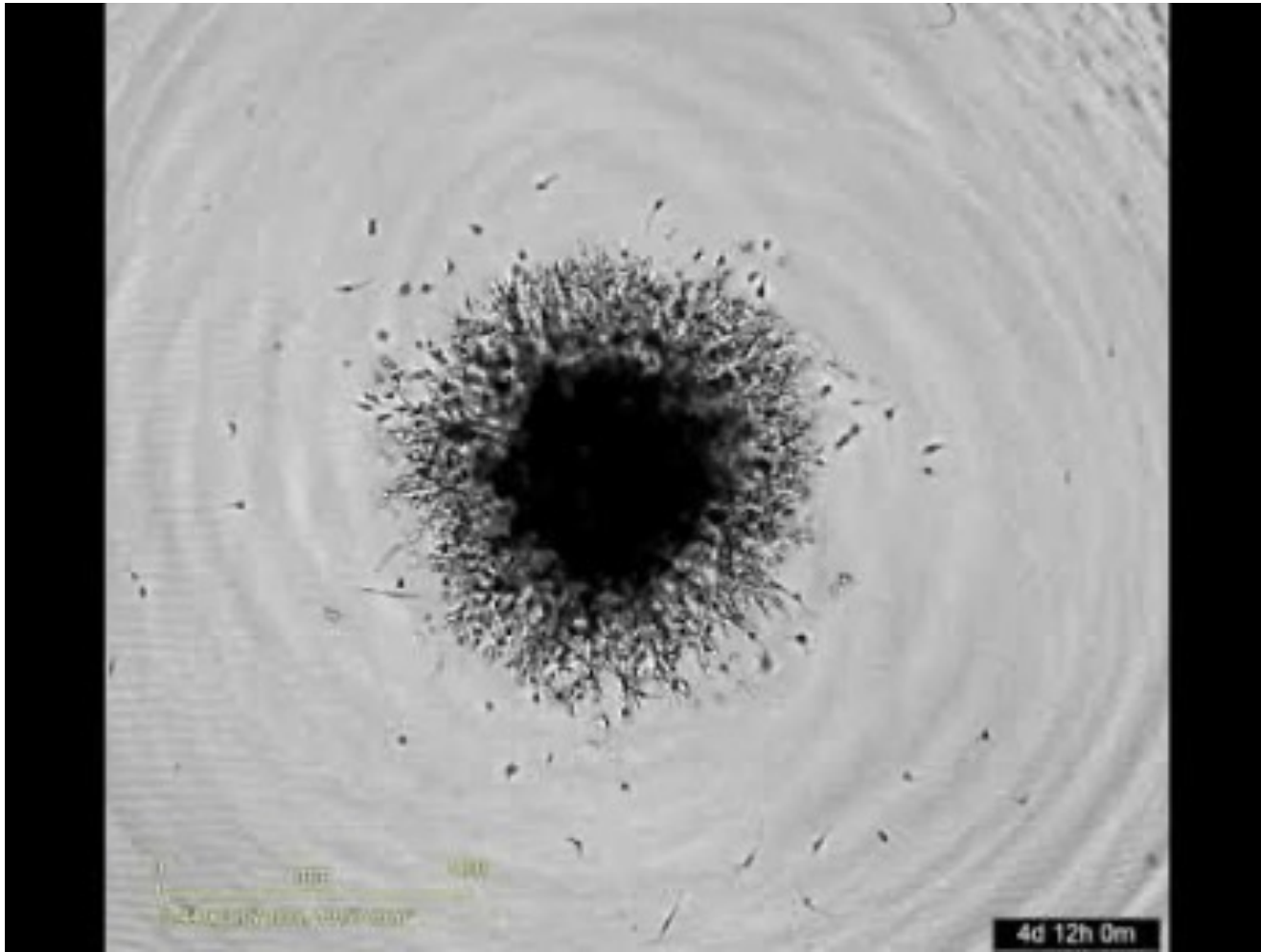
Investigate Migration & Invasion Behavior in Mixed Cultures

Images and data
generated with
the IncuCyte® ZOOM
live-cell analysis system

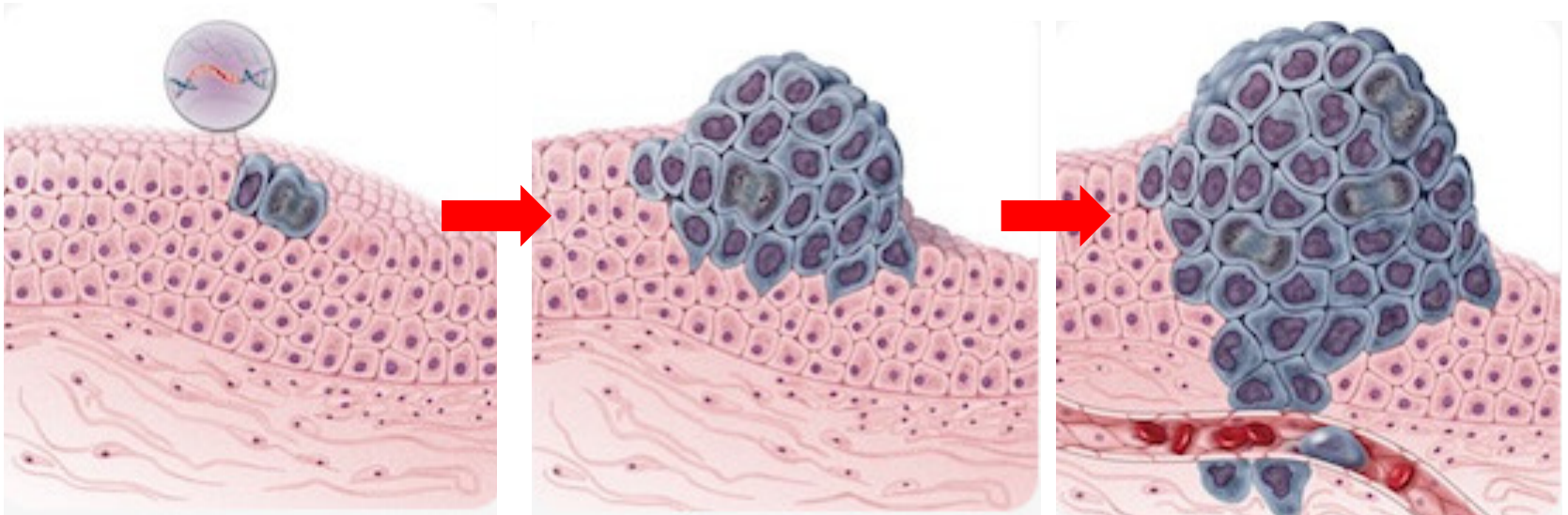
MCF-7 (Green)
non-invasive
+
HT-1080 (Red)
invasive



Saggio di invasione di sferoidi

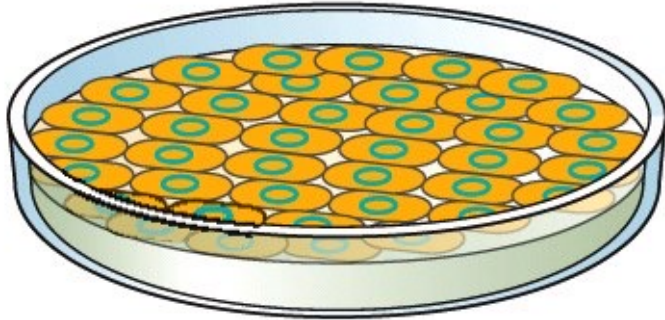


Migrazione e invasione sono fenotipi tumorali



Il cancro è una patologia nella quale le cellule proliferano senza controllo, invadono e colonizzano i tessuti normali.

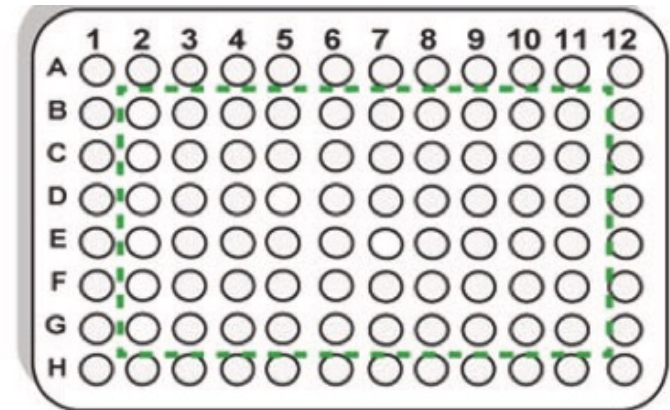
Screening funzionali per farmaci che inibiscono la migrazione



Modello cellulare della patologia



Libreria di farmaci



Saggio morfologico/funzionale

Screening FUNZIONALI per farmaci

Modello cellulare della patologia

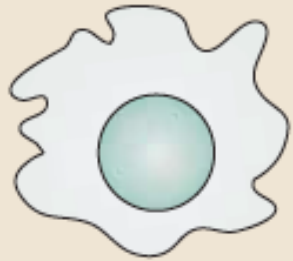
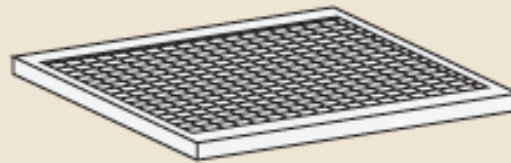
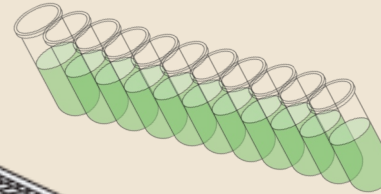


Plate cells onto clear bottom 384-well plate



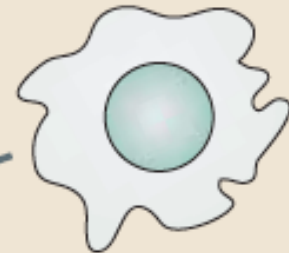
Libreria di farmaci



Transfer compounds onto cells



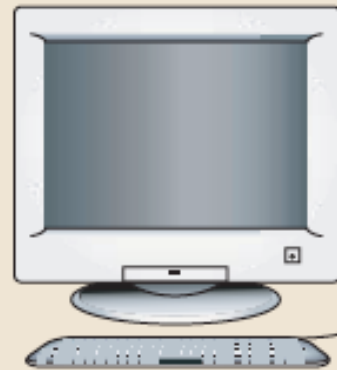
Compound treatment



Cambiamento fenotipico



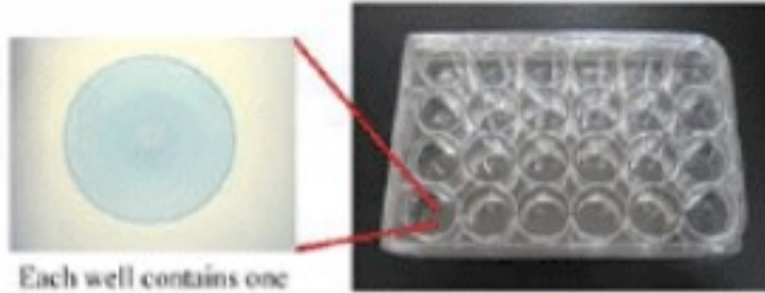
or hits



Analisi del fenotipo mediante opportuno saggio

Identificazione del farmaco

Saggi di migrazione in piastra multipozzetto con lettura automatizzata al microscopio ottico/plate reader



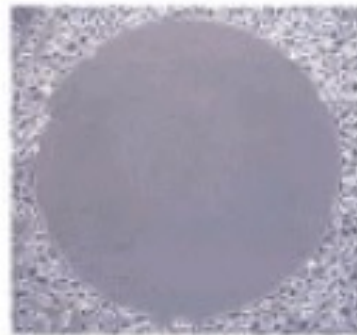
Each well contains one
~ 0.68 mm Radius™
Gel spot (above image
artificially colored blue)

Pretreat desired
wells with Radius™
Gel Pretreatment
Solution



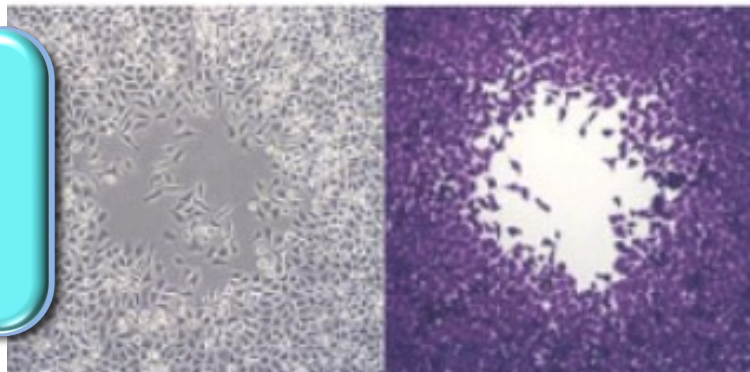
Cells don't attach
in the Radius™
Biocompatible Gel
Layer area

Add cell suspension
to the wells and
allow 4-24 hours for
firm attachment/
spreading

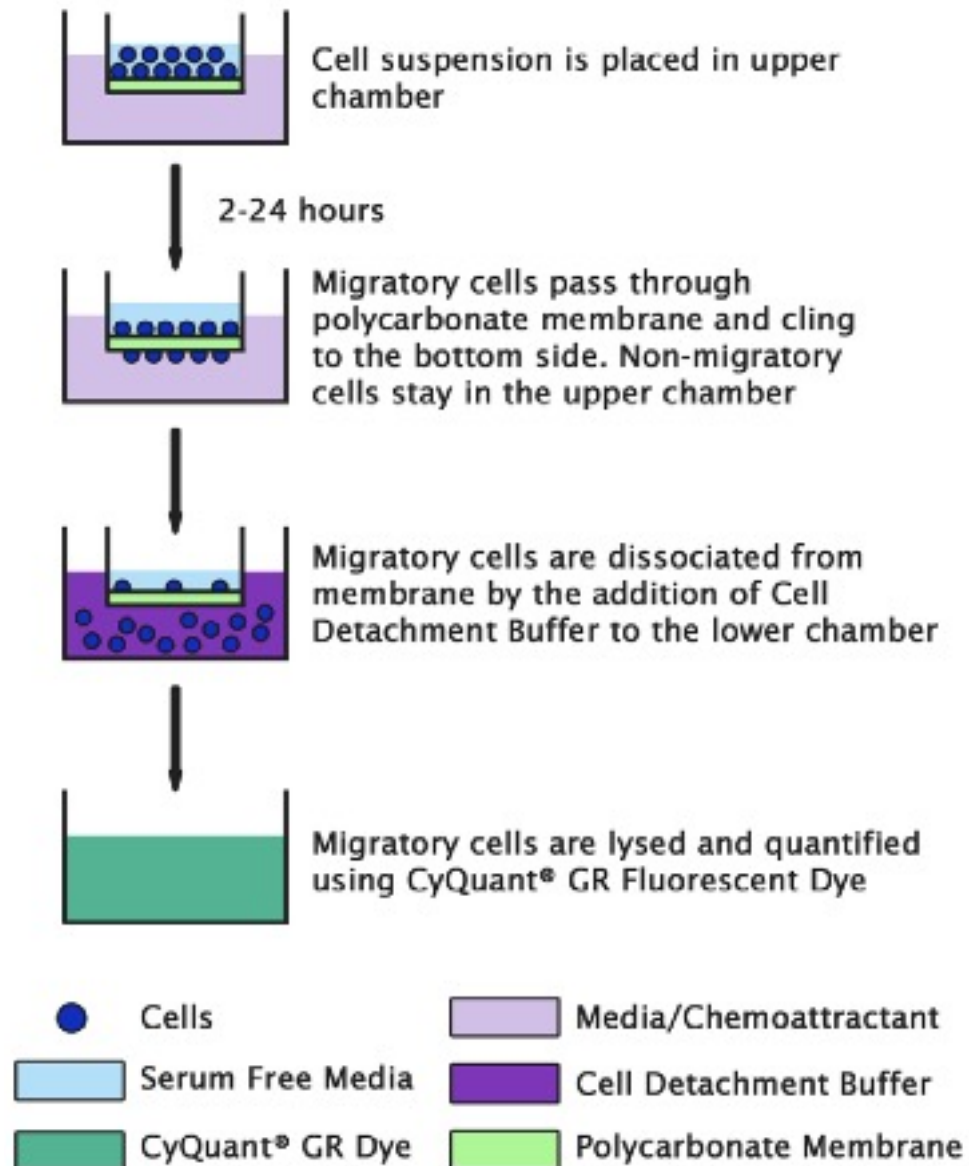


Remove the Radius™
Biocompatible Gel
Layer, exposing the
cell-free area for cell
migration

Le cellule vengono colorate e fotografate al microscopio ottico



Saggi di transwelling (Boyden) in piastra multipozzetto con lettura fluorimetrica



ESPERIMENTO:

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

STRATEGIA SPERIMENTALE:

1) Scelta dei modelli cellulari

H1299 (linea di cellule epiteliali – origine polmone)

THP-1 (linea di cellule monocitiche che possono differenziare a macrofagi)

2) Disegno dell'esperimento

1) Trattamento di cellule epiteliali H1299 con proteina ORF8 purificata

2) Scelta dei controlli positive e negativi

3) Raccolta del terreno condizionato (TC contenente citochine)

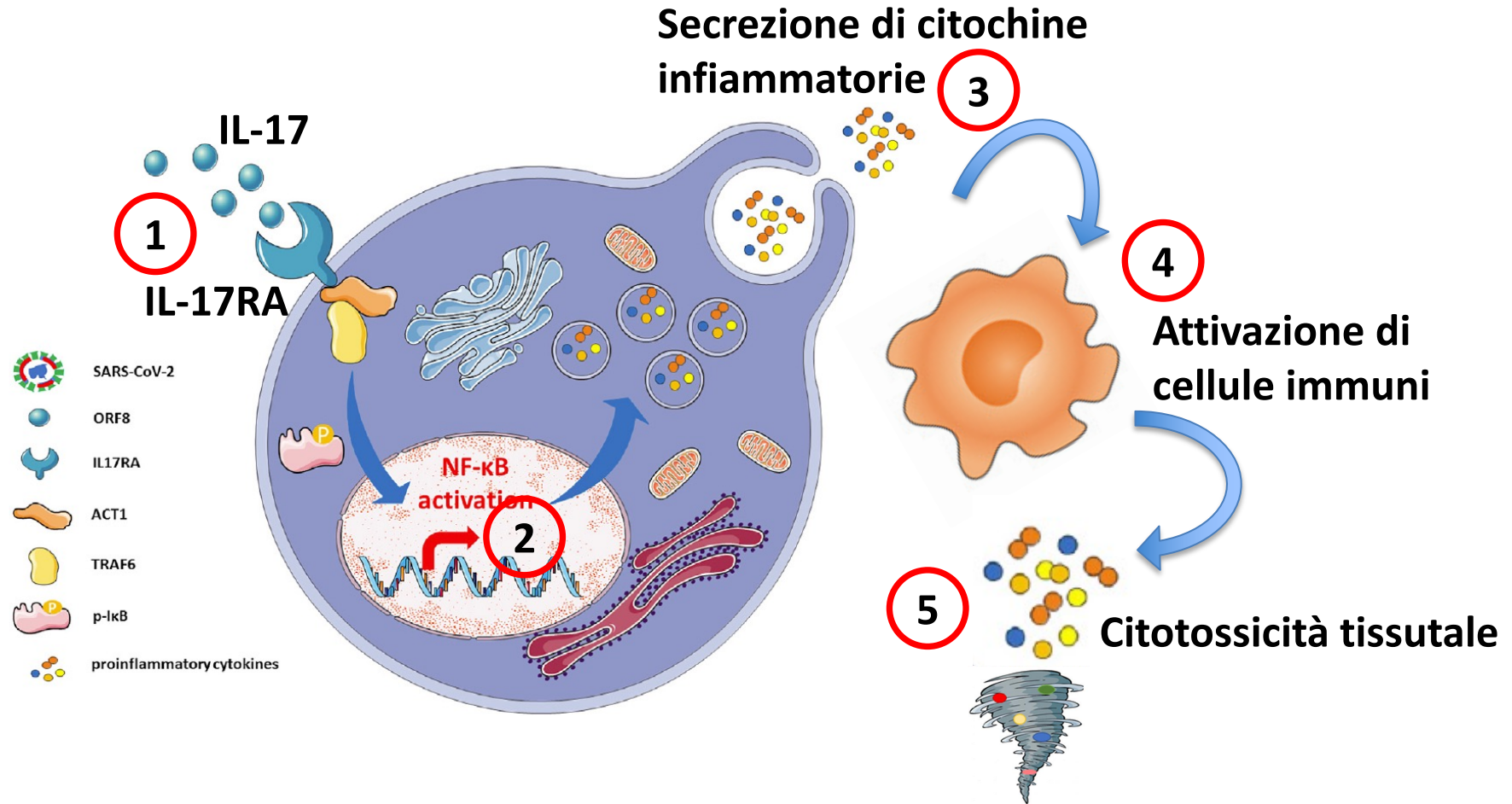
3) Scelta del saggio

analisi dell'effetto del TC sull'attivazione di macrofagi mediante saggio di chemiotassi (transwelling)

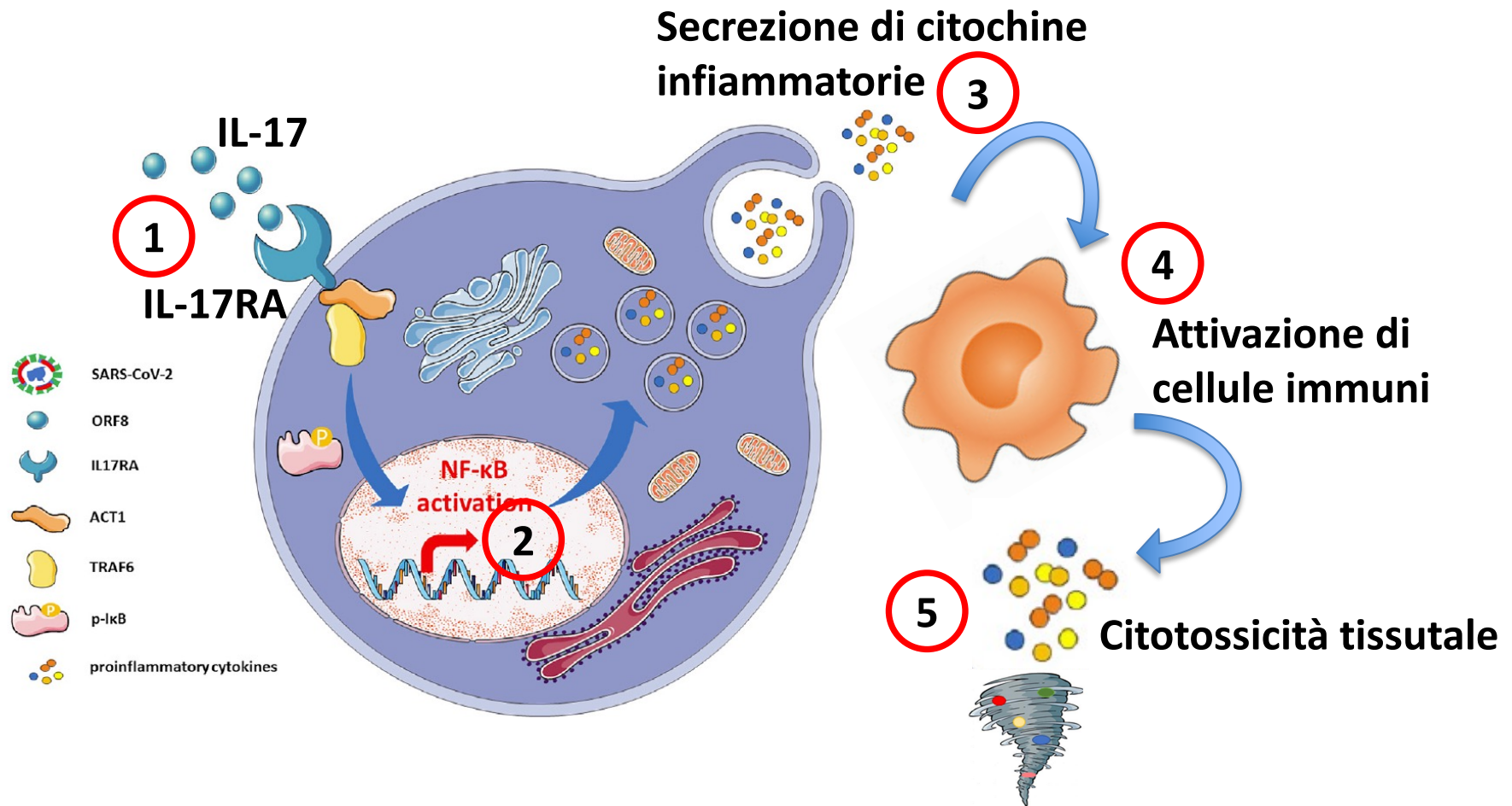
4) Scelta dello strumento

Analisi al microscopio ottico

CONTROLLO POSITIVO per il processo



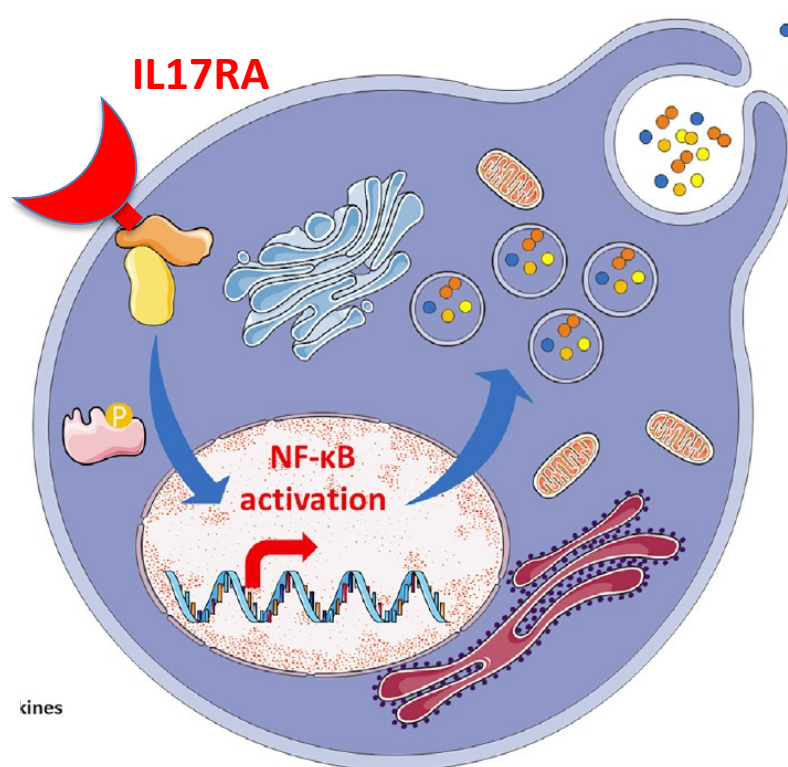
CONTROLLO POSITIVO: analisi dell'effetto di IL-17



Analisi del ruolo di IL-17RA

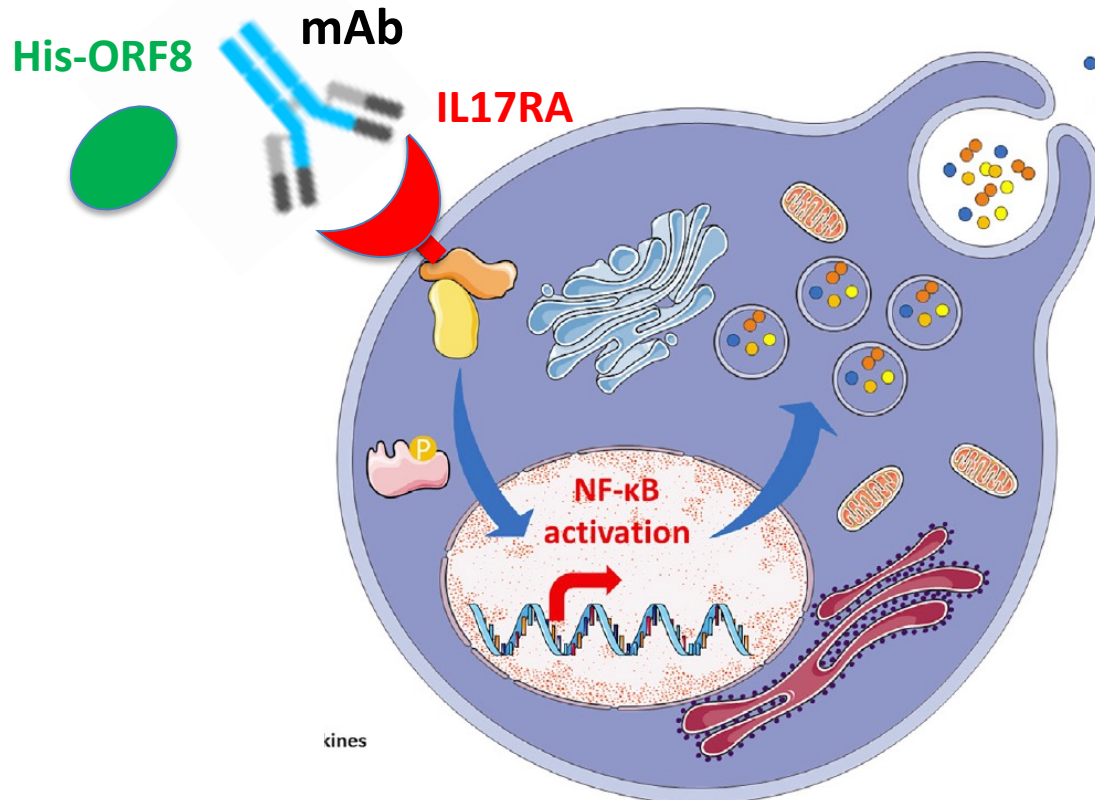
- 1) cellule non trattate
- 2) cellule trattate con **His-ORF8** (1 $\mu\text{g/ml}$ 24h)
- 3) Scelta del controllo per dimostrare il **ruolo** di IL-17RA

His-ORF8

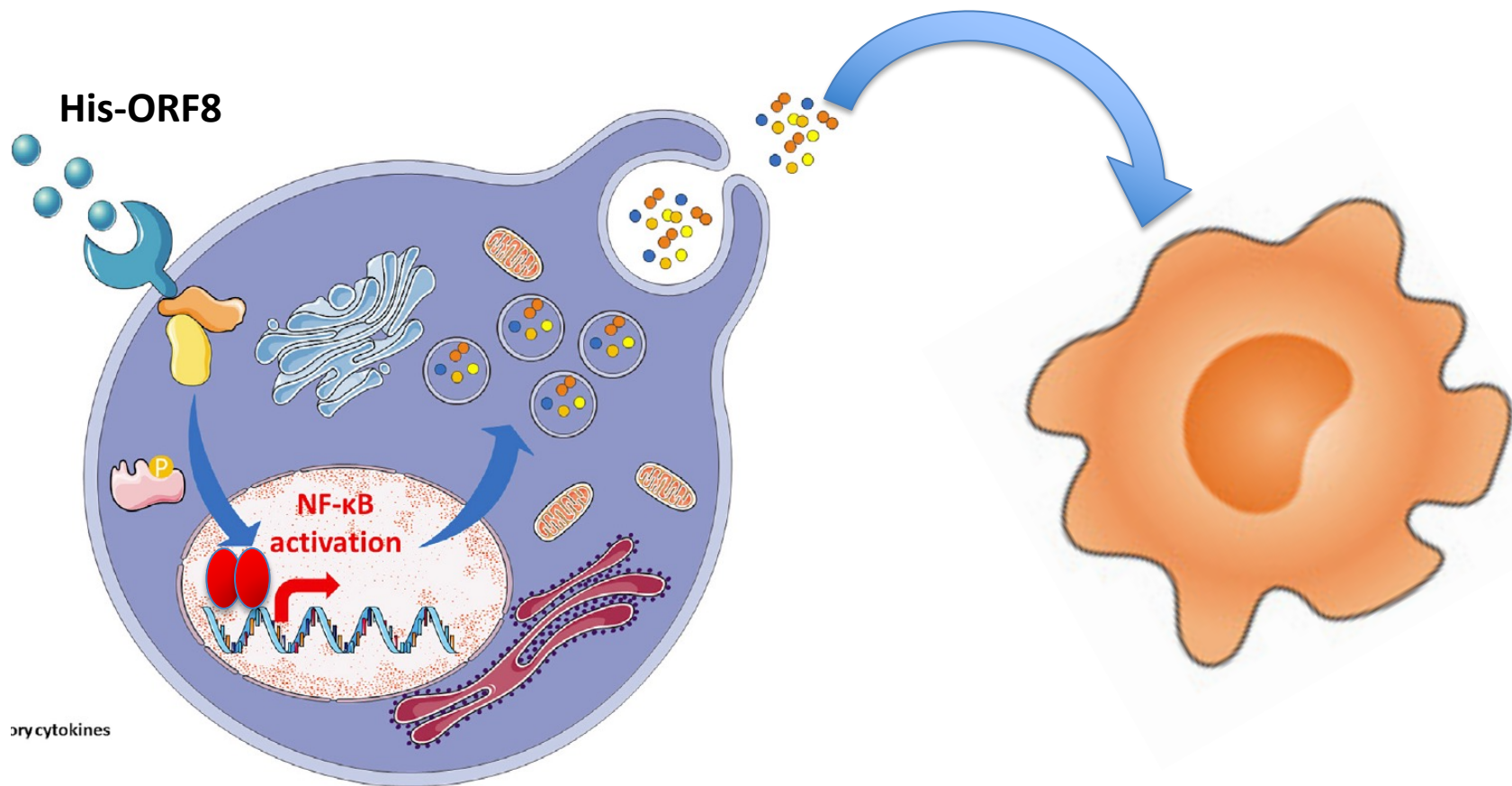


Analisi del ruolo di IL-17RA

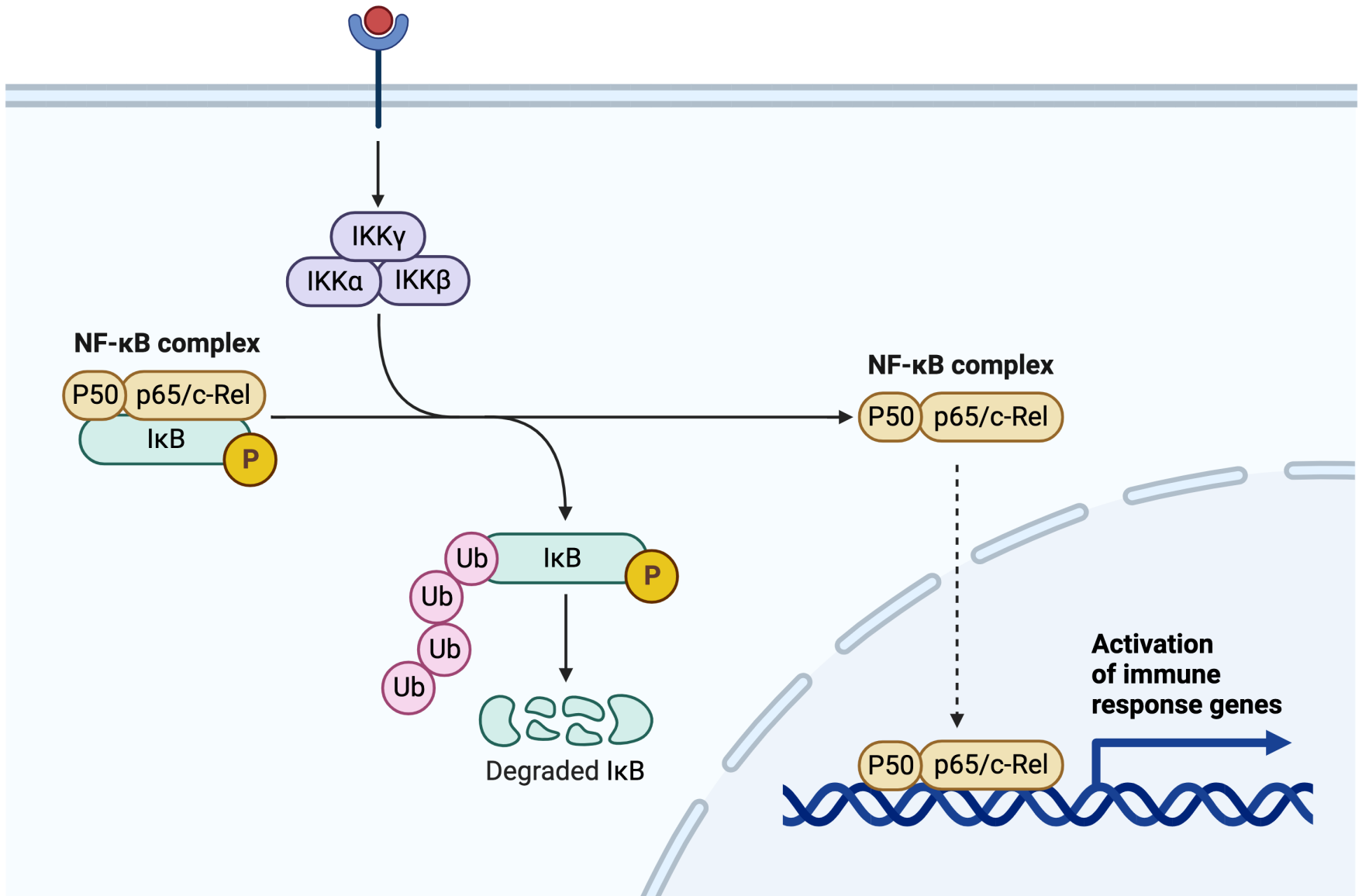
- 1) cellule non trattate
- 2) cellule trattate con **His-ORF8** (1 $\mu\text{g/ml}$ 24h)
- 3) cellule incubate con **anticorpo bloccante anti-IL17RA** (1.5 $\mu\text{g/ml}$ 12h) e successivamente con His-ORF8 (1 $\mu\text{g/ml}$ 24h)



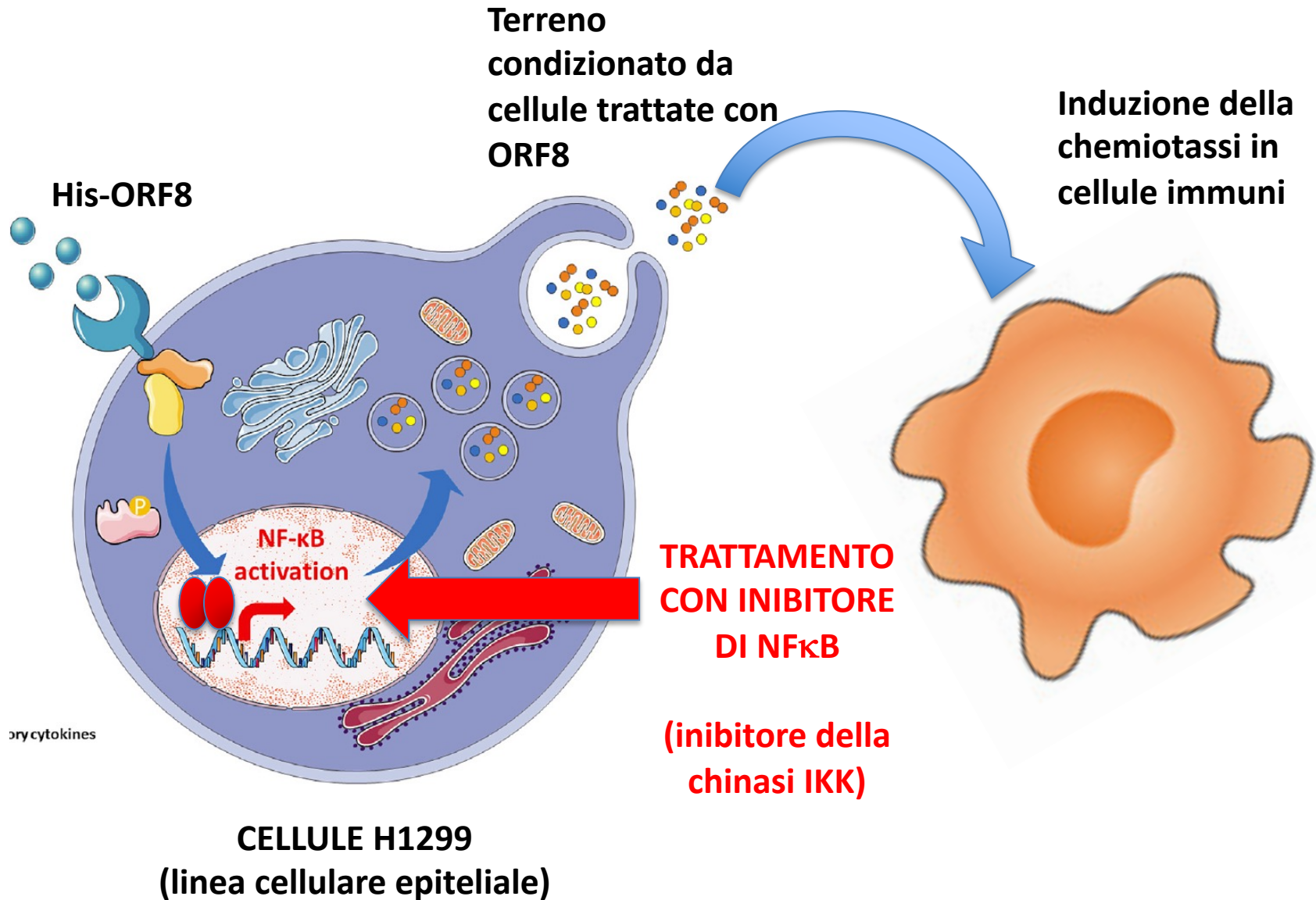
Analisi del ruolo di NF- κ B



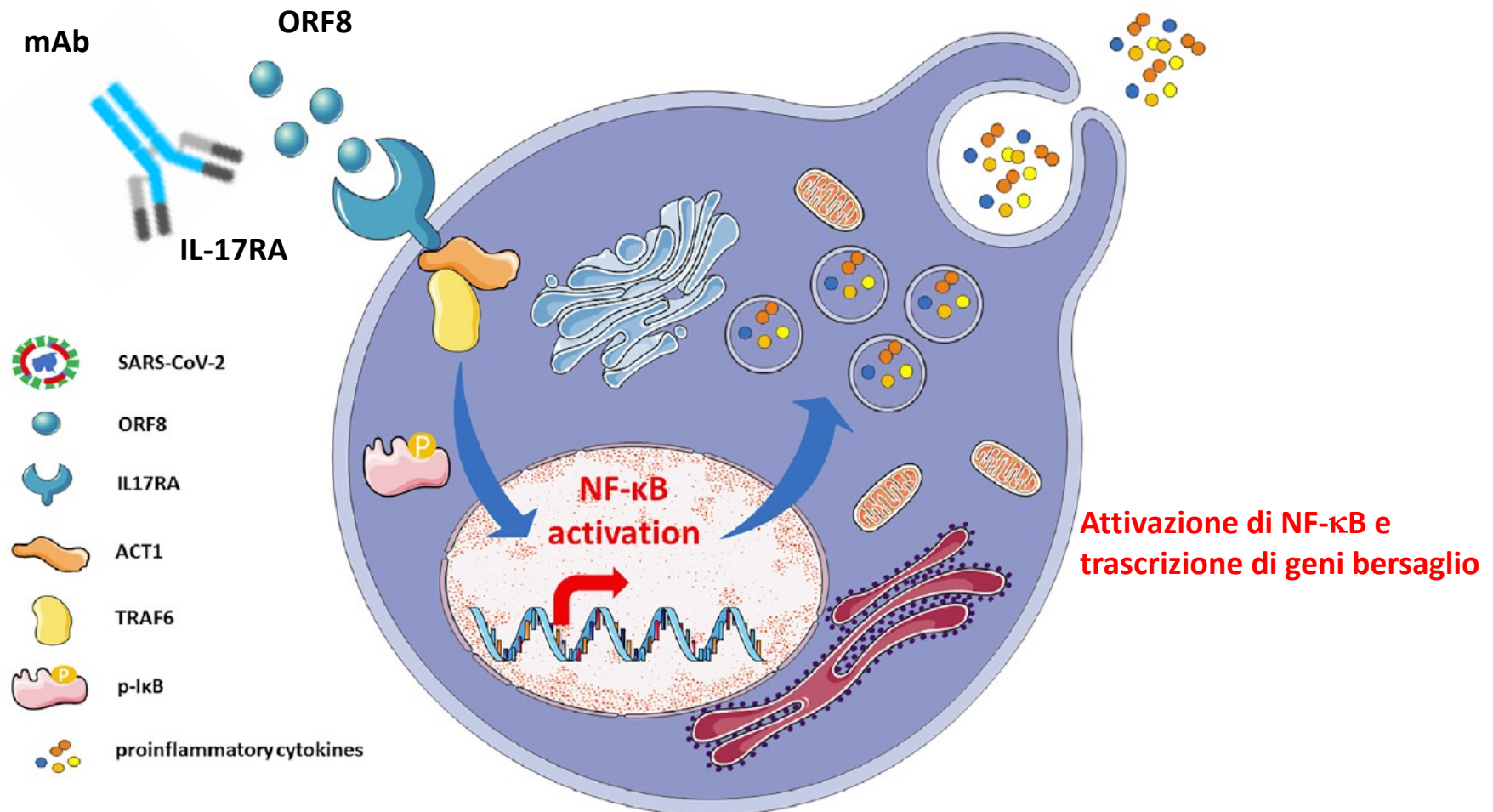
La via di trasduzione (pathway) di NF- κ B



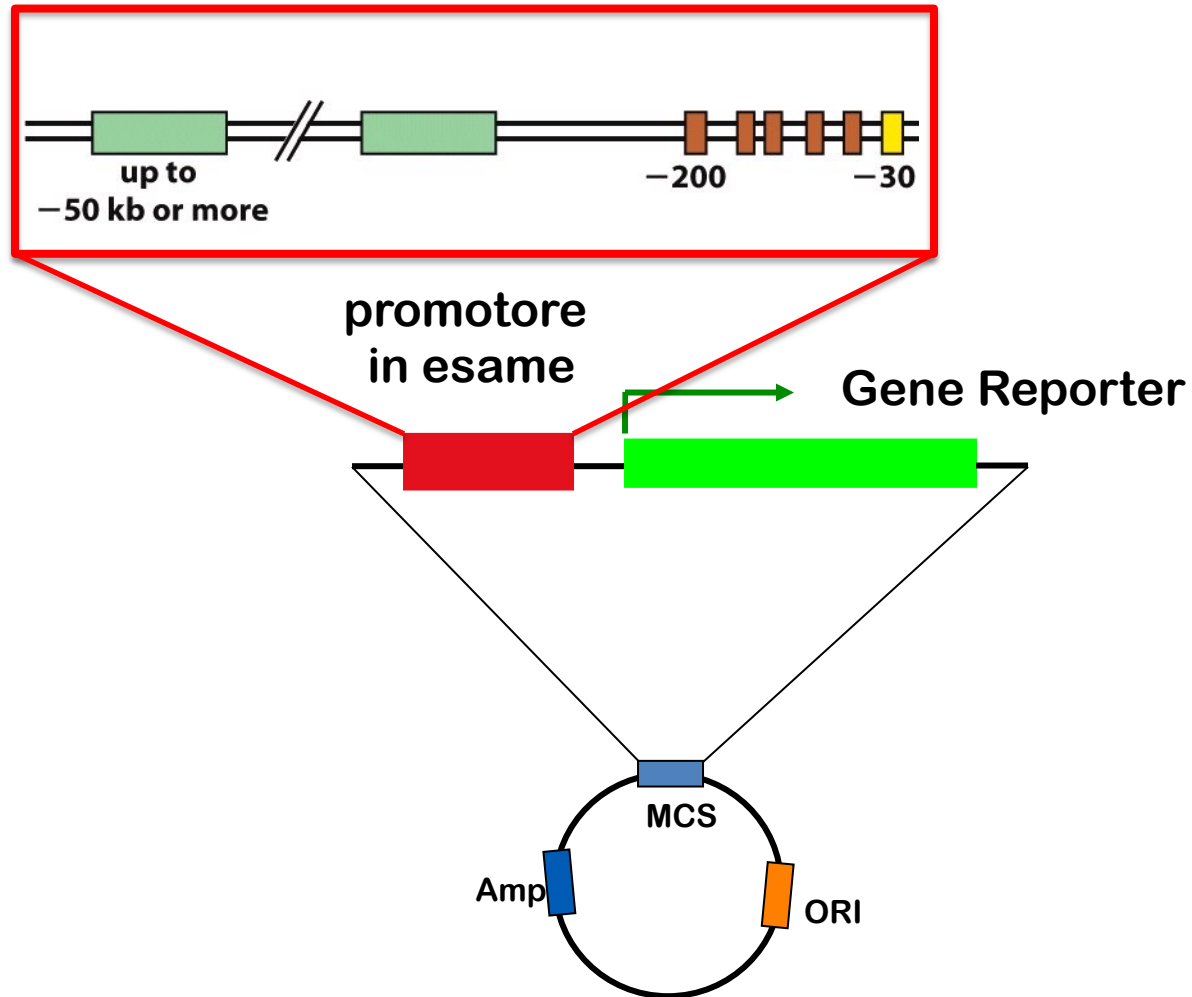
Analisi del ruolo di NF- κ B nel'attivazione delle cellule immuni



Analisi della capacità di ORF8 di attivare NFκB via IL17RA mediante analisi di attività del reporter



Nel caso in cui si voglia saggiare l'attività di un promotore, lo si può clonare a monte di un gene reporter



GENI REPORTER:

Geni la cui espressione ectopica può essere facilmente visualizzata o misurata in cellule e tessuti

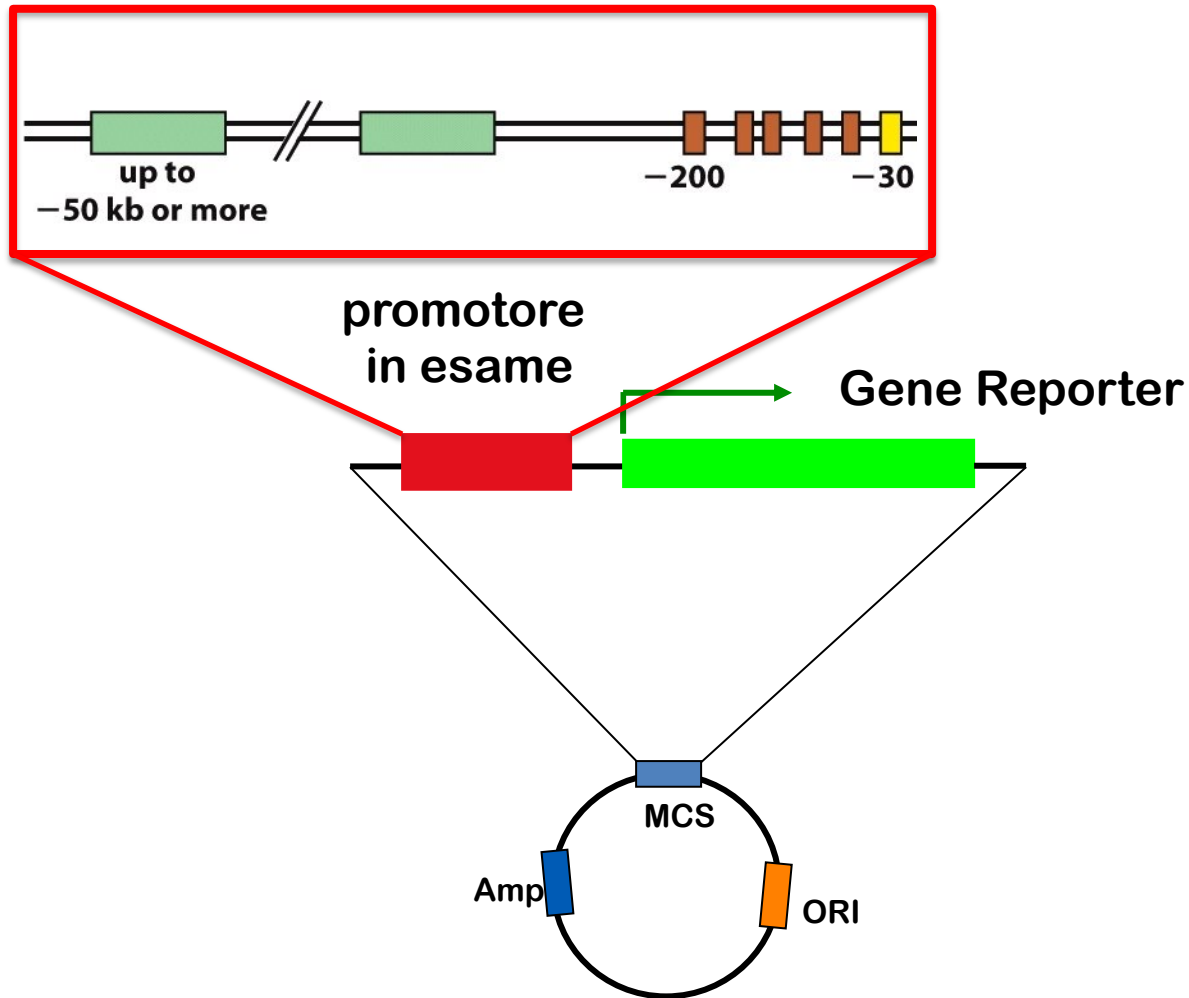
Analisi di espressione genica in cellule in coltura

Per saggiare l'attività di un promotore in diverse condizioni sperimentali, si può **clonare il promotore** in esame a monte di un **gene reporter**, la cui **espressione sia misurabile**.

Quanto più attivo sarà il promotore, tanto maggiore la produzione della proteina codificata dal gene reporter.

L'espressione/attività del reporter **è proporzionale all'attività del promotore**.

Clonaggio di un **promotore** bersaglio per NFkB a monte di un gene reporter (codificante per un enzima con attività misurabile)



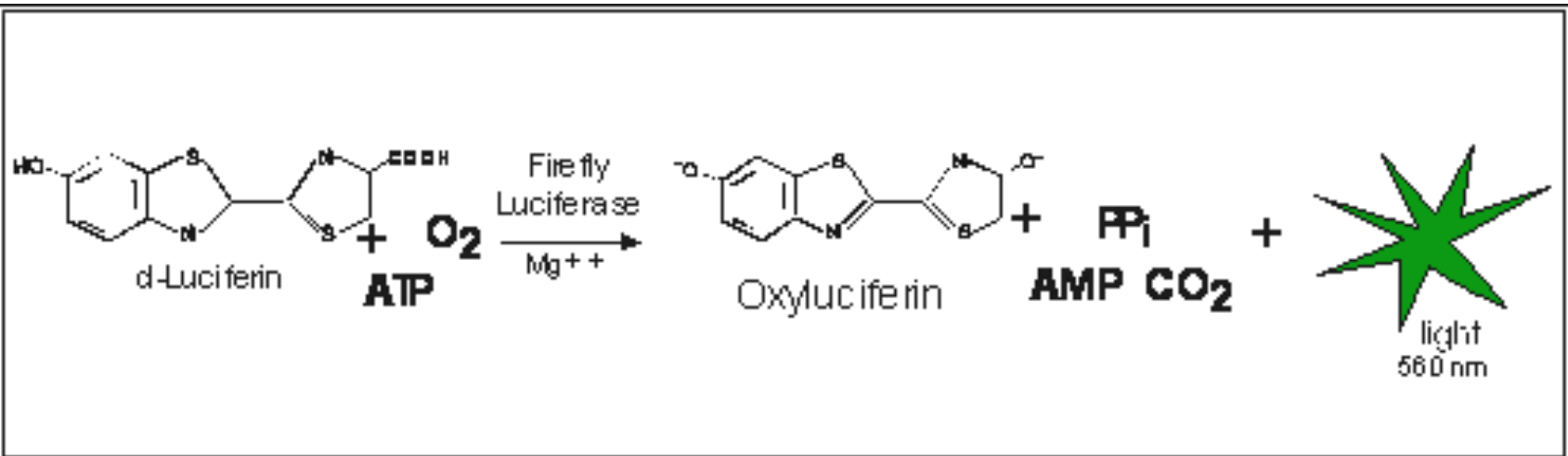
L'espressione/attività del reporter è **proporzionale all'attività del promotore.**

REPORTER: enzima luciferasi di Lucciola (*Photinus pyralis*)

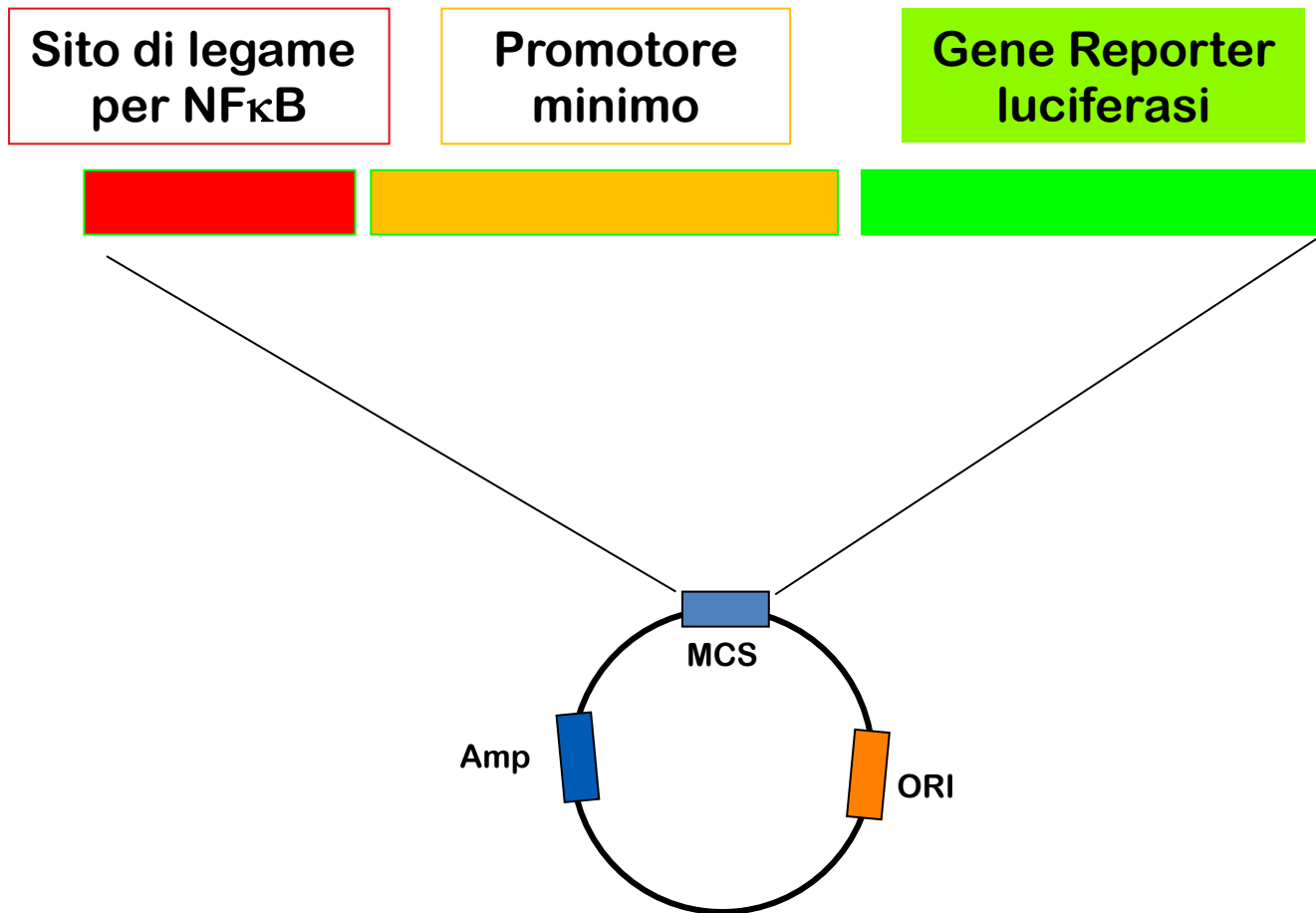
Reazione:

catalizza l'ossidazione ATP-dipendente di un substrato specifico = la **luciferina**.

La reazione è accompagnata dall' **emissione di luce visibile = chemiluminescenza**.

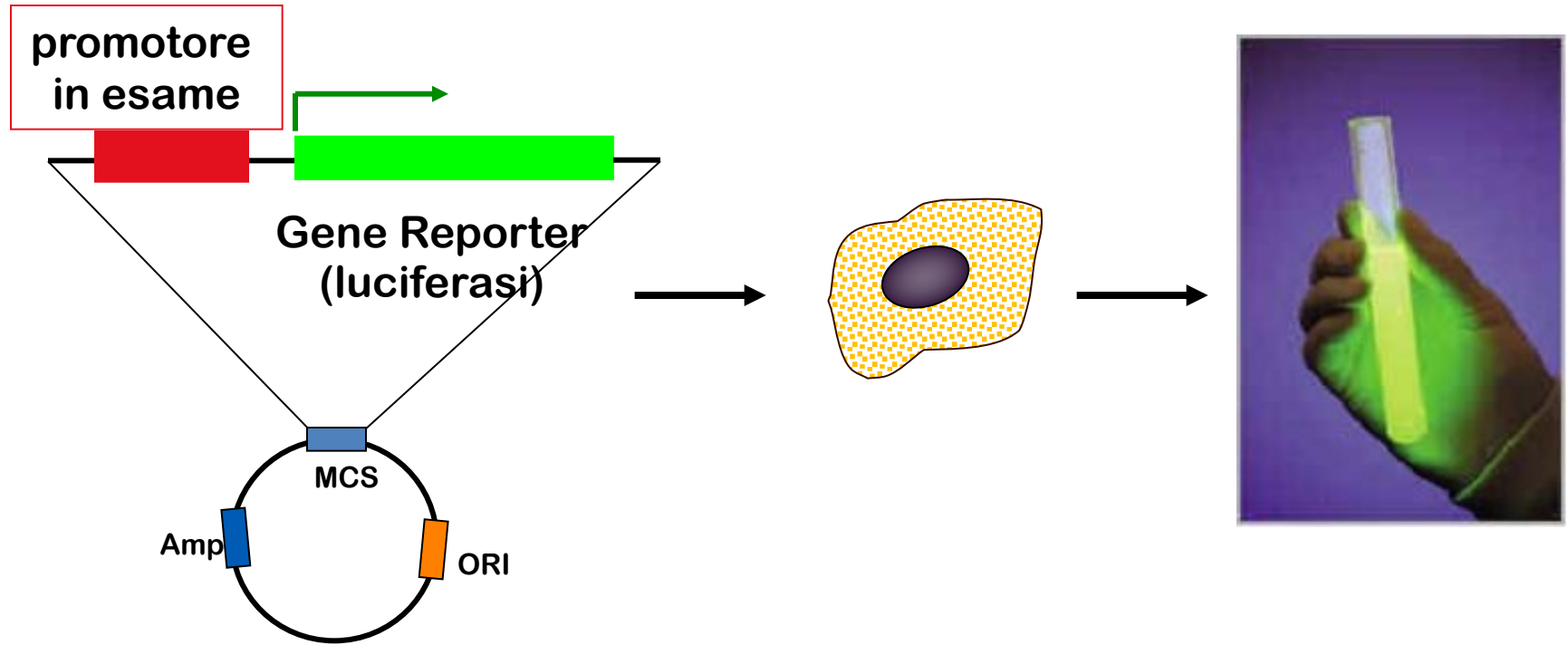


**Generazione del costrutto reporter:
clonaggio di un promotore bersaglio di NF κ B a monte del
gene reporter luciferasi**



Saggi di attività trascrizionale

Se il promotore è attivo nelle cellule si avrà produzione dell'enzima:
aggiungendo il substrato al lisato cellulare, si avrà emissione di luce



la luce emessa può essere misurata con il luminometro ed è direttamente proporzionale alla quantità di enzima e quindi all'attività del promotore

Trasfezione, trattamenti e saggi di attività del reporter



Strumento per la misurazione di luce emessa: luminometro