**ESERCITAZIONE: Saggio di VITALITA’ CELLULARE**

**STRATEGIA SPERIMENTALE:**

Si vuole analizzare la capacità dell’asse ORF8-IL17RA di indurre citotossicità nei confronti delle cellule del tessuto polmonare come conseguenza dell’attivazione di cellule infiammatorie.

Abbiamo dimostrato che i monociti umani THP-1 si attivano in risposta a stimolazione con terreno condizionato da cellule H1299 trattate con la proteina His-ORF-8 (vedi Saggi di chemiotassi).

Si valuterà quindi l’effetto delle citochine pro-infiammatorie **rilasciate dai** **macrofagi THP-1** (dopo attivazione con terreno condizionato) sulla vitalità delle **cellule epiteliali H1299 (polmone)**.

**PUNTI SPERIMENTALI:**

**Ciascun gruppo** (4 studenti) esaminerà la vitalità delle cellule **H1299** (linea cellulare epiteliale di origine umana -lung adenocarcinoma) a seguito di:

1. Esposizione a terreno condizionato di cellule **THP1** attivate da cellule **H1299** non trattate.
2. Esposizione a terreno di **THP1** attivate da cellule **H1299** trattate con **IL-17 purificata** (50 ng/ml) per 16 ore.
3. Esposizione a terreno di **THP1** attivate da cellule **H1299** trattate con proteina **His-ORF8** (1 mg/ml) per 16 ore.
4. Esposizione a terreno di **THP1** attivate da cellule **H1299** preventivamente incubate con un anticorpo monoclonale **anti-IL17RA** (1.5 mg/ml) per 8 ore e quindi trattate con His-ORF8 (1 mg/ml) per 16 ore.

**Giorno 1**

**MATERIALE:**

Cellule H1299 in piastra multi-well da 96 pozzetti, PBS, terreni condizionati dai punti sperimentali 1, 2, 3, 4.

**PROCEDIMENTO: (ciascuno studente effettuerà tutti i passaggi di seguito)**

1. Prelevare dall’incubatore le cellule **H1299** e scrivere sulla piastra il numero del gruppo e del punto sperimentale.
2. **LAVARE LE CELLULE CON PBS**. Aspirare molto delicatamente il terreno dai pozzetti con la P200 senza staccare le cellule. Lavare molto delicatamente i pozzetti con 0.1 ml di PBS.

1. **TRATTARE LE CELLULE CON IL TERRENO CONDIZIONATO**. Aspirare molto delicatamente il PBS dai pozzetti con la P200 senza staccare le cellule. Aggiungere 0.1 ml di terreno condizionato ad ogni pozzetto.
2. **RIPORRE LE PIASTRE MULTI-WELL NELL’INCUBATORE**.

**Giorno 2**

**MATERIALE:**

Incubatore per colture cellulari, bagno termostatato, microscopio rovesciato, bilancia di precisione, PBS, DMEM, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), Dimethyl sulfoxide (DMSO), lettore di piastre.

**PROCEDIMENTO:**

1. **LAVARE LE CELLULE H1299 CON PBS.**

Prelevare le cellule dall’incubatore e osservarle al microscopio. Aspirare molto delicatamente il terreno dai pozzetti con la P200 senza staccare le cellule. Lavare molto delicatamente le cellule con 0.1 ml di PBS.

1. **INCUBARE LE CELLULE CON L’MTT.**

Trasferire **0.1 ml di terreno con MTT (preparato dal docente)** in ognuno dei pozzetti. Riporre le cellule in incubatore. Incubare per 1 ora.

1. **DISSOLVERE I CRISTALLI DI MTT**.

Prelevare la piastra dall’incubatore e verificare al microscopio che si siano formati cristalli di MTT nelle cellule. Rimuovere completamente il terreno dai pozzetti.

Aggiungere **0.1 ml di** **DMSO** ad ogni pozzetto e spipettare cercando di non creare bolle.

1. **LETTURA DELL’ASSORBANZA AL PLATE READER**.

Verificare che i cristalli si siano completamente dissolti e che la soluzione di DMSO appaia colorata in modo omogeneo. Inserire la piastra nel plate reader e misurare l’assorbanza a **562 nm**.

1. Analizzare i dati ottenuti e trarre le conclusioni in merito all’effetto delle citochine sulla vitalità cellulare.