

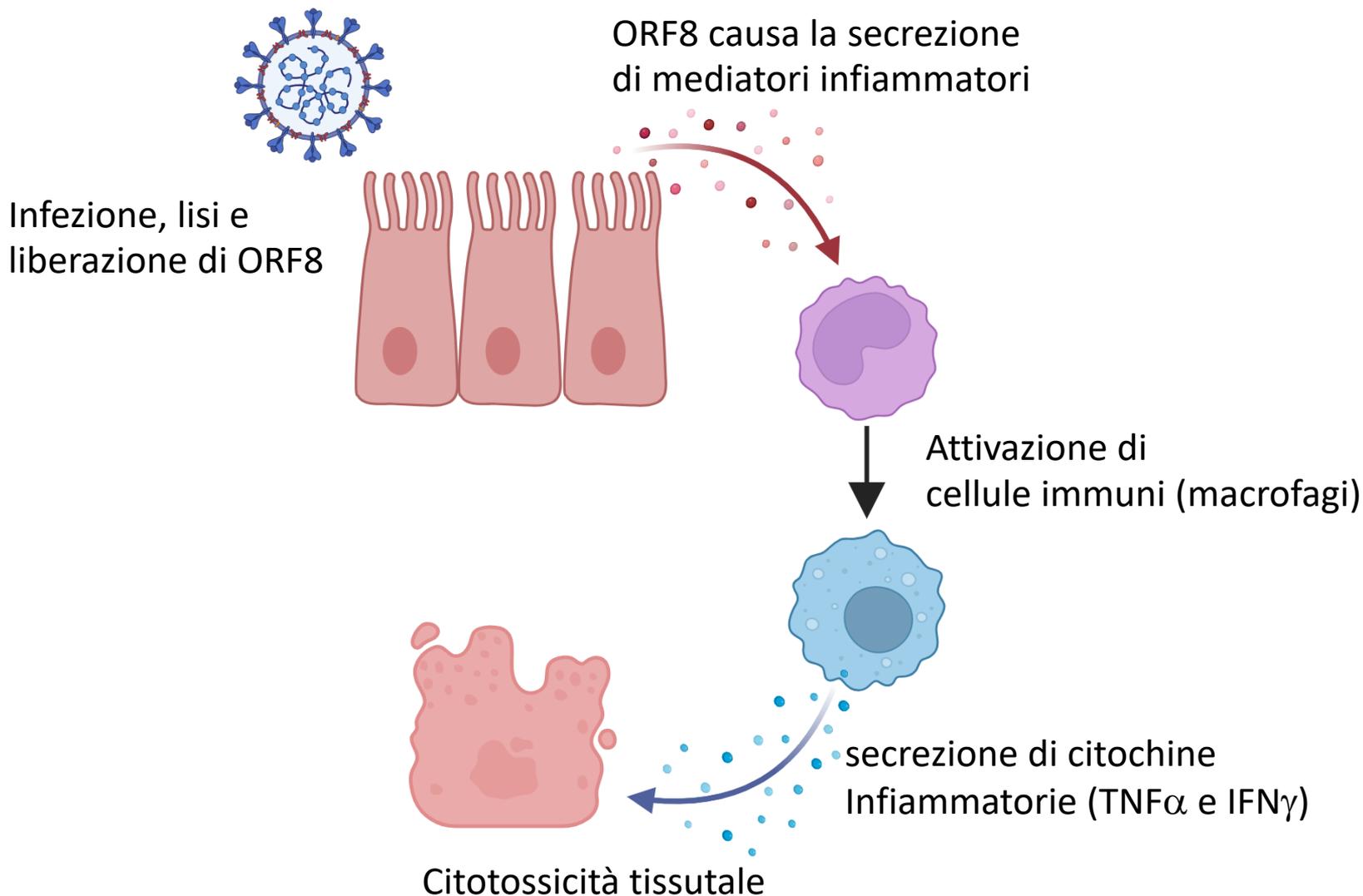
Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2024-2025

Corso di Biotecnologie Cellulari

Lezione 7

ORF8 attiva il recettore IL-17RA nelle cellule epiteliali e il conseguente innesco della risposta infiammatoria



ESPERIMENTO #4:

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

STRATEGIA SPERIMENTALE:

- 1) Trattamento** di cellule epiteliali H1299 **con proteina His-ORF8**
- 2) Analisi dell' attivazione di cellule immuni**

ESPERIMENTO #4:

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

Interazione di ORF8 con IL-17 RA

1

His-ORF8

mAb

IL-17RA

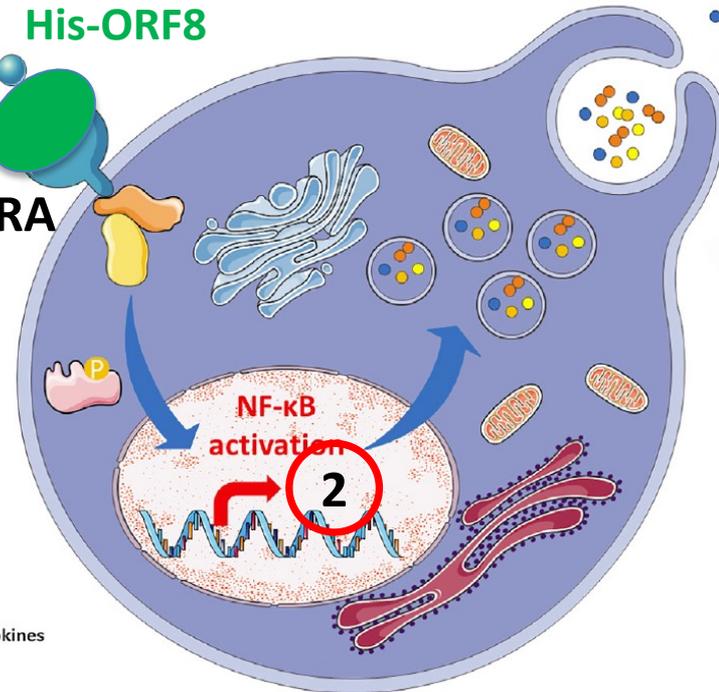
Secrezione di messaggeri infiammatori

3

4

Attivazione di cellule immuni

-  SARS-CoV-2
-  ORF8
-  IL17RA
-  ACT1
-  TRAF6
-  p-IkB
-  proinflammatory cytokines

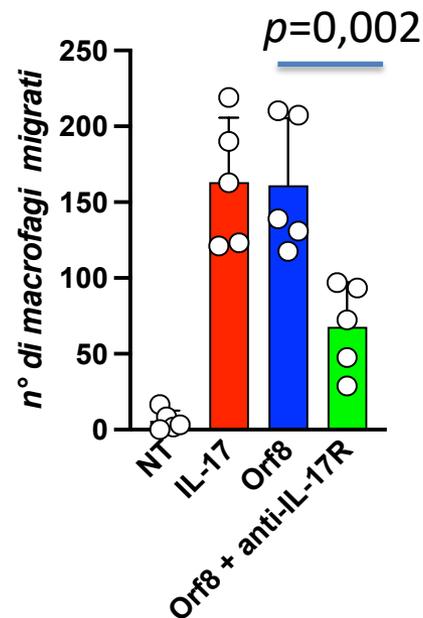
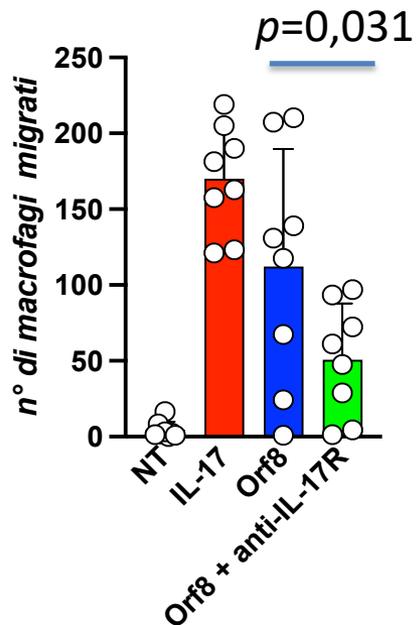


Cellula di epitelio polmonare

RISULTATO dell'ESPERIMENTO #4: Analisi della capacità di ORF8 di indurre reclutamento e attivazione di cellule infiammatorie via IL17RA

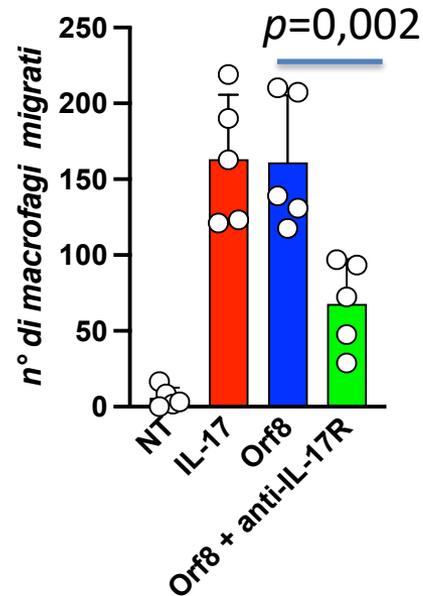
	1A	1B	1C	1D	2A	2B	2C	2D
NT		16,6	8,4	2,4	1,8	0,2	3,2	1
IL-17		162,8	123,2	157,6	121,2	219	190,2	205
Orf8		131	117,6	67,4	139	210,25	207,4	1
Orf8 + anti-IL-17R		97	93,4	61,2	28,8	72,4	47,6	4,4

	1A	1B	1D	2A	2B
NT		16,6	8,4	1,8	0,2
IL-17		162,8	123,2	121,2	219
Orf8		131	117,6	139	210,25
Orf8 + anti-IL-17R		97	93,4	28,8	72,4



ESPERIMENTO #4:

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



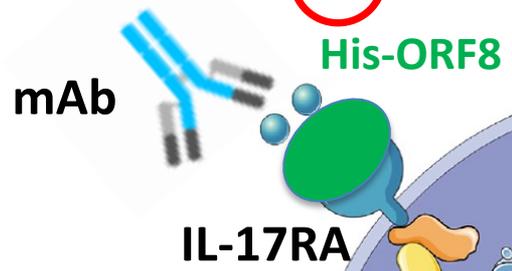
Conclusioni principali degli esperimenti di chemiotassi:

1. Le citochine secrete da cellule epiteliali attivate da ORF8 inducono la maturazione di Monociti in Macrofagi e la loro migrazione nella cameretta di Boyden nella direzione del gradiente;
2. L'azione pro-infiammatoria di ORF8 si esplica in parte attraverso l'interazione con il recettore per l'IL-17.

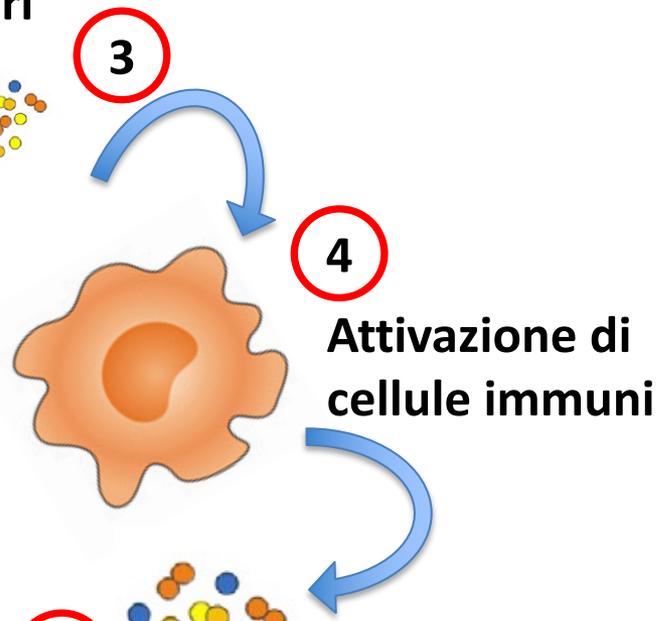
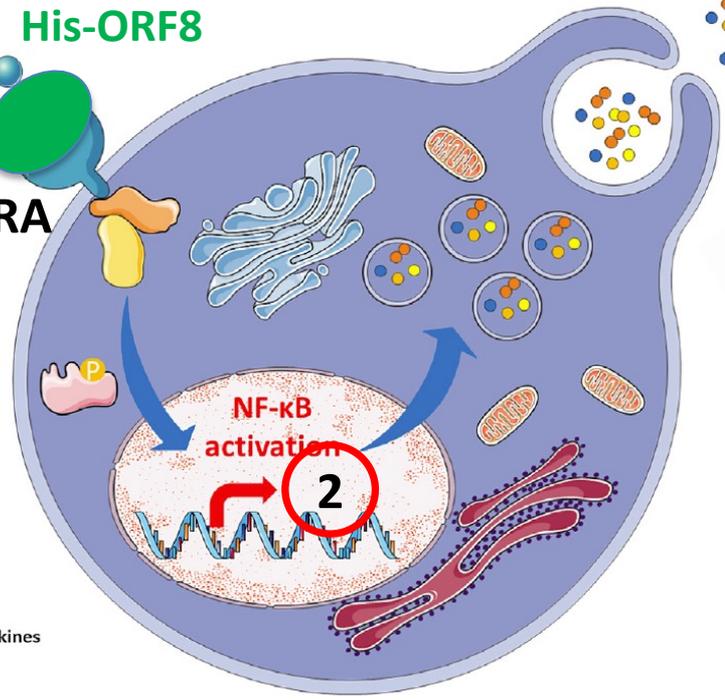
Cosa resta da scoprire?

Interazione di ORF8 con IL-17 RA **1**

Secrezione di messaggeri infiammatori **3**



- SARS-CoV-2
- ORF8
- IL17RA
- ACT1
- TRAF6
- p-IkB
- proinflammatory cytokines

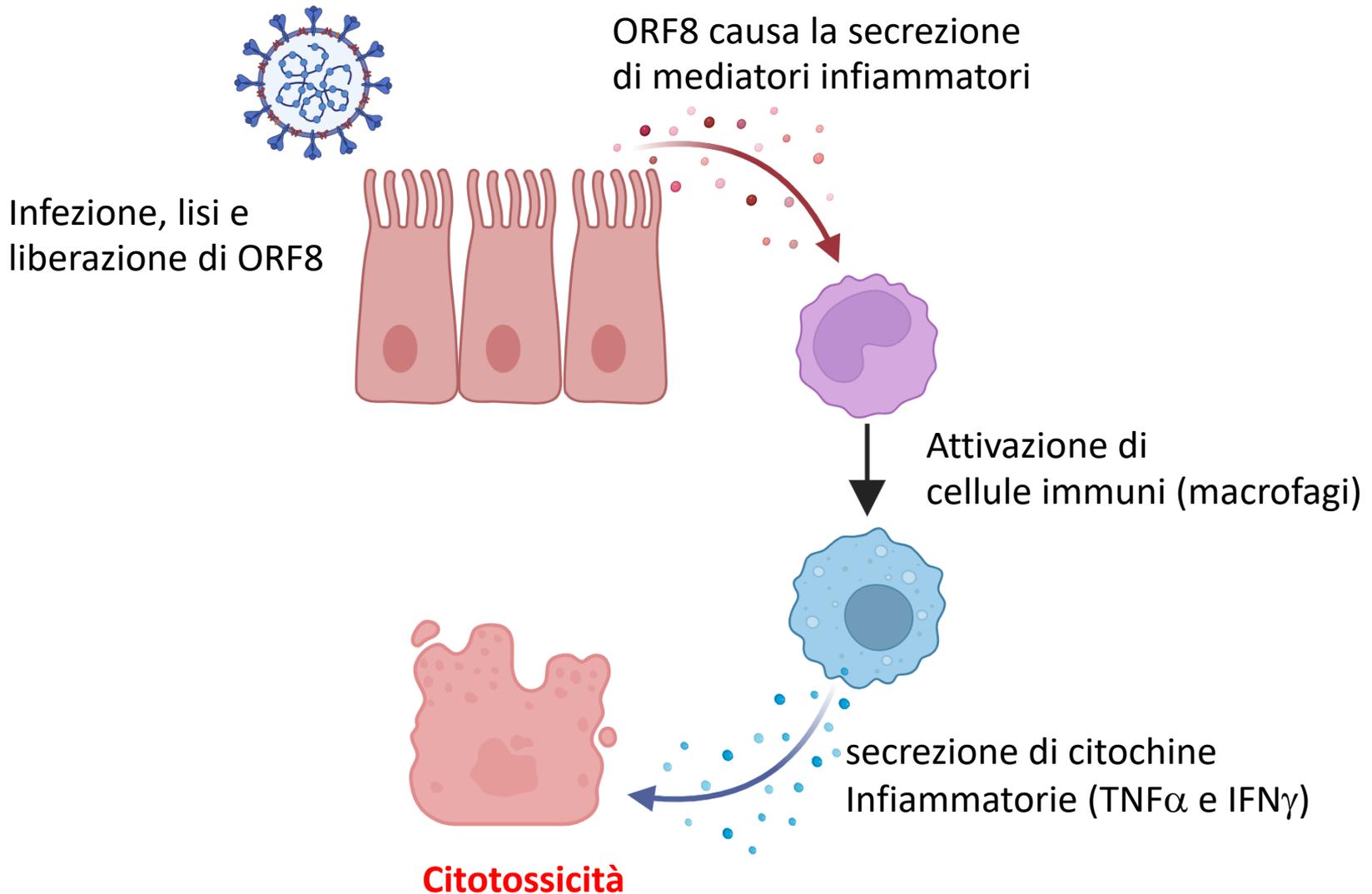


Cellula di epitelio polmonare

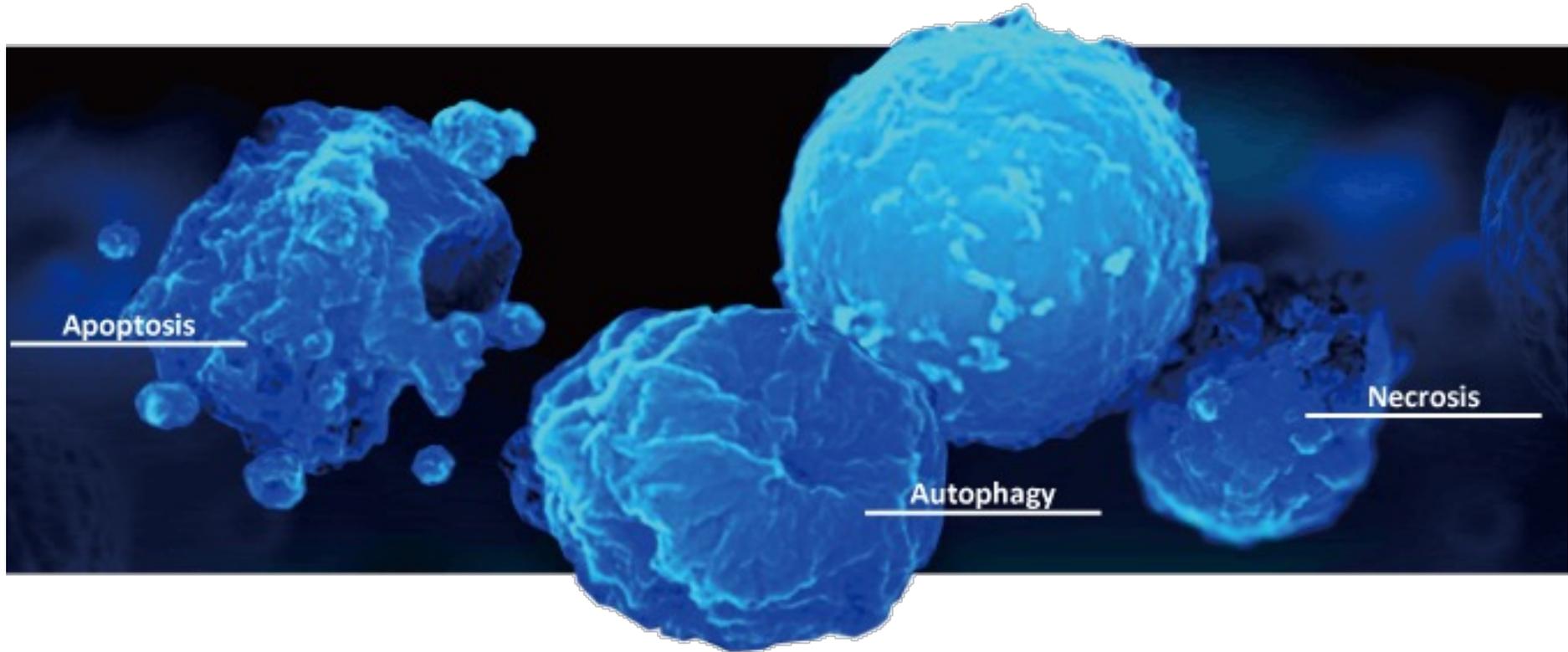
Cytokine release syndrome CRS
= infiammazione persistente e tossicità tissutale

ESPERIMENTO #5:

Analisi della capacità dell'asse ORF8-IL17RA di indurre **citotossicità** attraverso l'attivazione di cellule infiammatorie

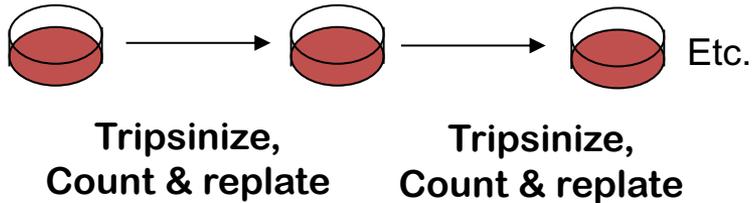


ANALISI della VITALITA' e della MORTE CELLULARE



L'aumento del numero di cellule in coltura è indice di vitalità cellulare

CURVE DI CRESCITA con Metodo 3T3/3T9

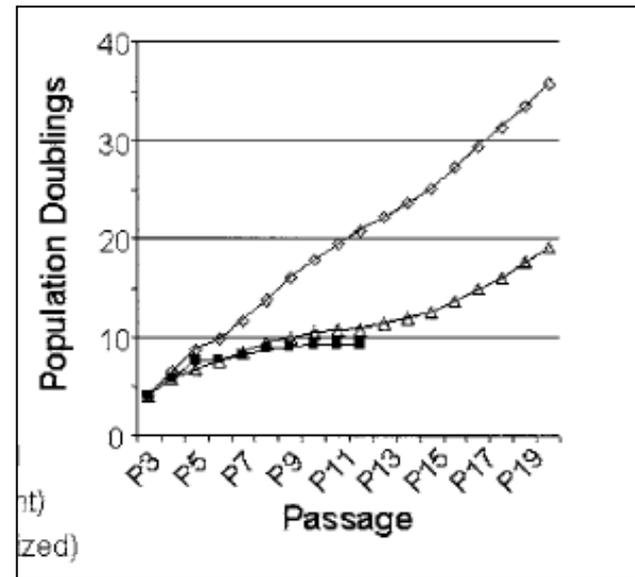


Ad ogni passaggio si semina un numero costante di cellule (9×10^5)

Dopo 3 gg si contano le cellule per capire se c'è stata proliferazione

Si riporta in grafico il **raddoppio della popolazione**

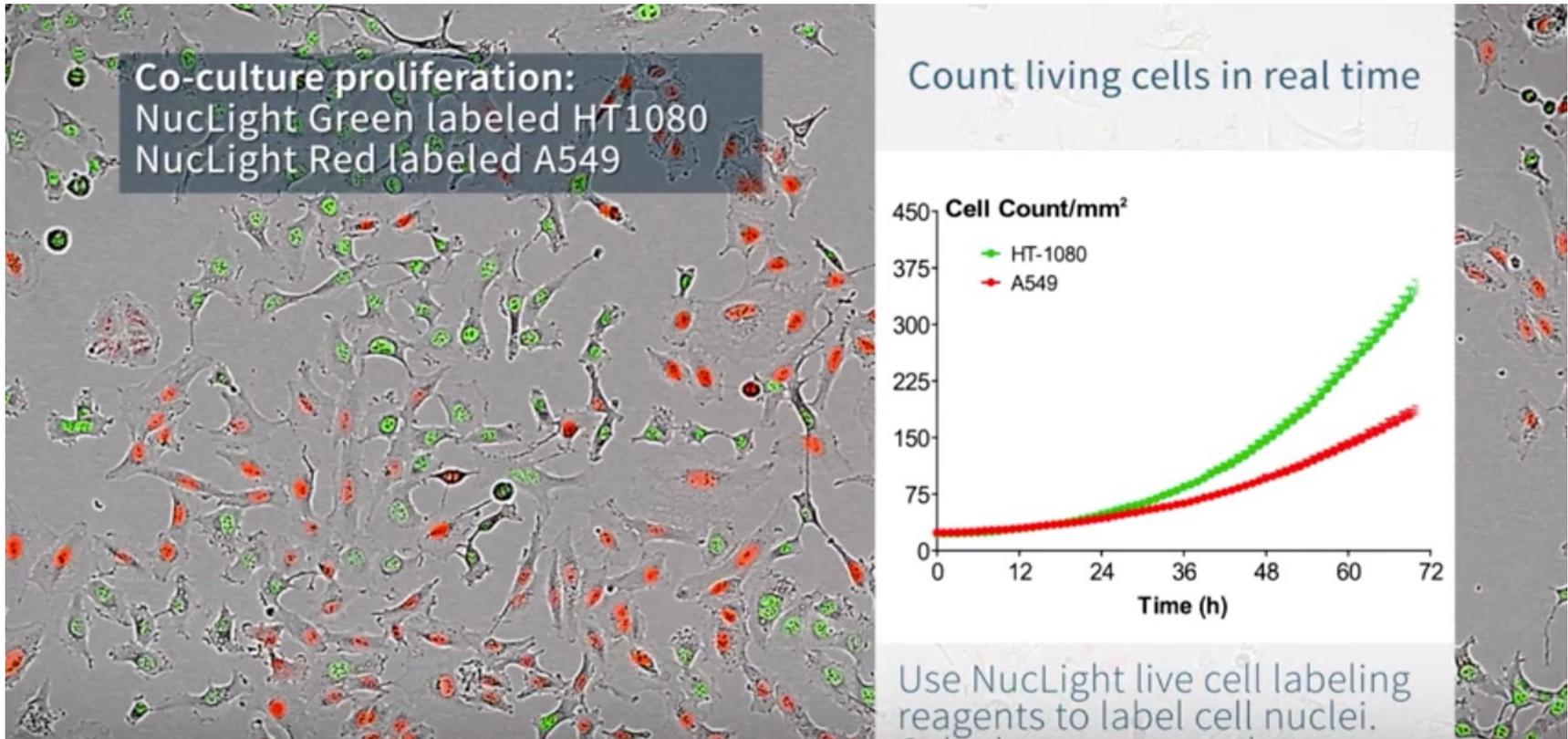
$PD = \log_2 (N_f/N_0)$



Curve di crescita real-time

https://www.youtube.com/watch?v=WaFp5_cArdk

2 diversi tipi cellulari sono colorati con specifici coloranti nucleari fluorescenti e cresciuti in co-coltura, quindi lo strumento effettua la conta del numero di cellule nel tempo.



Valutazione quantitativa di proliferazione mediante live cell labeling

Co-culture proliferation:
NucLight Green labeled HT1080
NucLight Red labeled A549

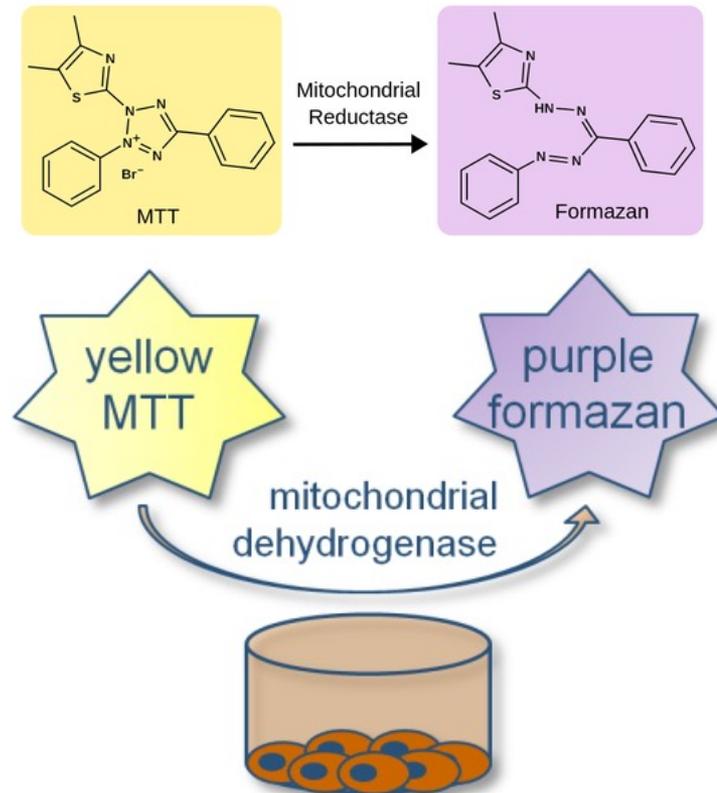


IncuCyte[®]
by ESSEN BIOSCIENCE

Green labeled HT-1080 fibrosarcoma cells were grown in co-culture with Red labeled A549 lung carcinoma cells.

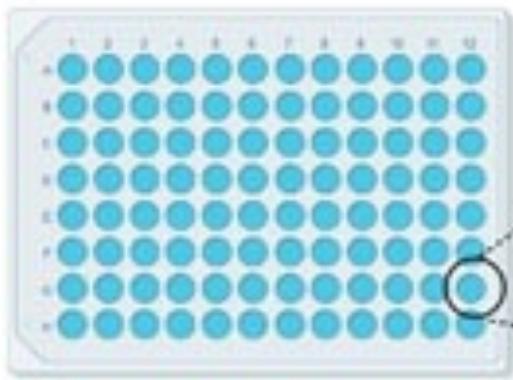
Saggi di vitalità cellulare che misurano l'attività metabolica

La vitalità cellulare può essere stimata valutando l'attività metabolica

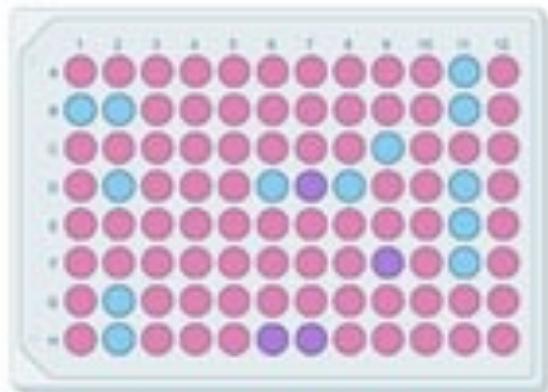
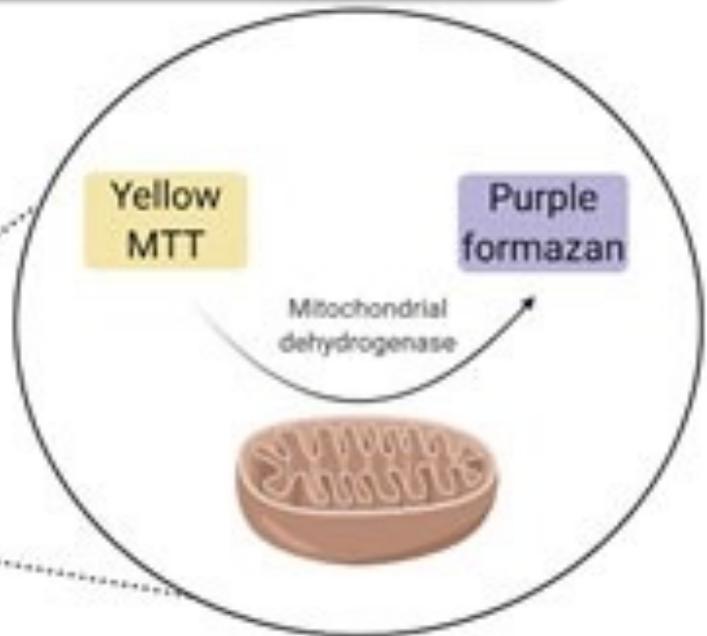


Un substrato solubile (sale di tetrazolio - giallo) viene convertito in un prodotto insolubile (formazan - viola) a seguito del trasferimento di elettroni da parte di riduttasi mitocondriali.

Saggi MTT: procedura



Cells in culture



Absorbance measurement



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 µg/ml) per 16 ore.
4. Esposizione a terreno di **THP1** attivate da cellule **H1299** preventivamente incubate con un anticorpo monoclonale **anti-IL17RA** (1.5 µg/ml) per 8 ore e quindi trattate con His-ORF8 (1 µg/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.
 3. **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.
 4. **RIPORRE LE PIASTRE MULTI-WELL NELL'INCUBATORE.**
-

Giorno 2

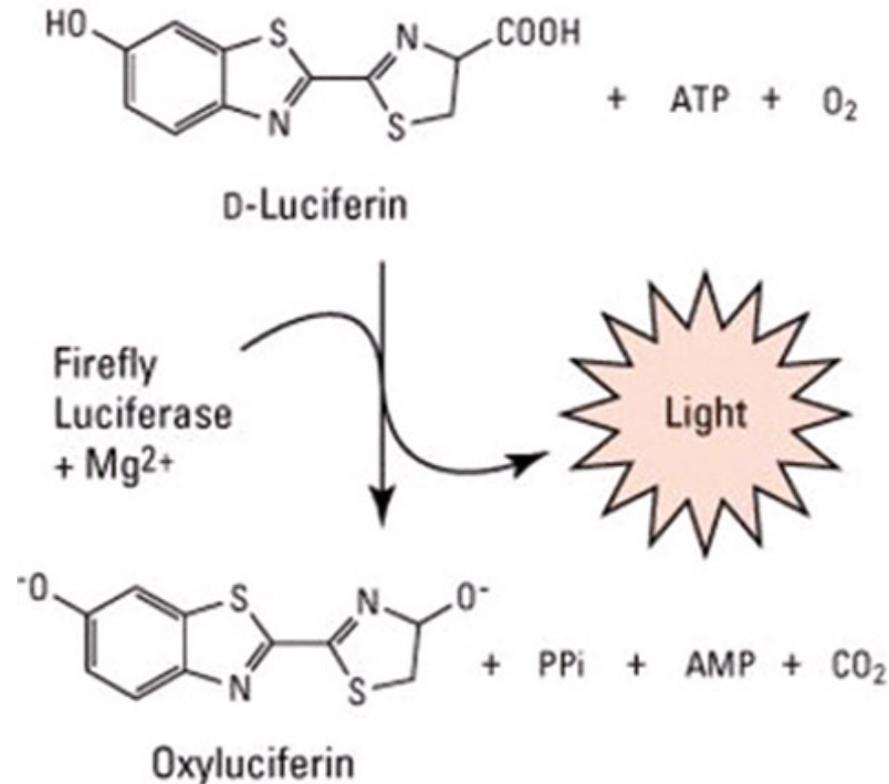
MATERIALE:

Incubatore per colture cellulari, bagno termostato, 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.
- 2. 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.
- 3. 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.
- 4. 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**.
- 5. Analizzare i dati ottenuti e trarre le conclusioni in merito all'effetto delle citochine sulla vitalità cellulare.**

Saggi di vitalità cellulare che misurano l'ATP cellulare



L'enzima luciferasi di Lucciola (*Photinus pyralis*) catalizza l'ossidazione ATP-dipendente del substrato luciferina. La reazione è accompagnata dall'emissione di luce visibile = chemiluminescenza.

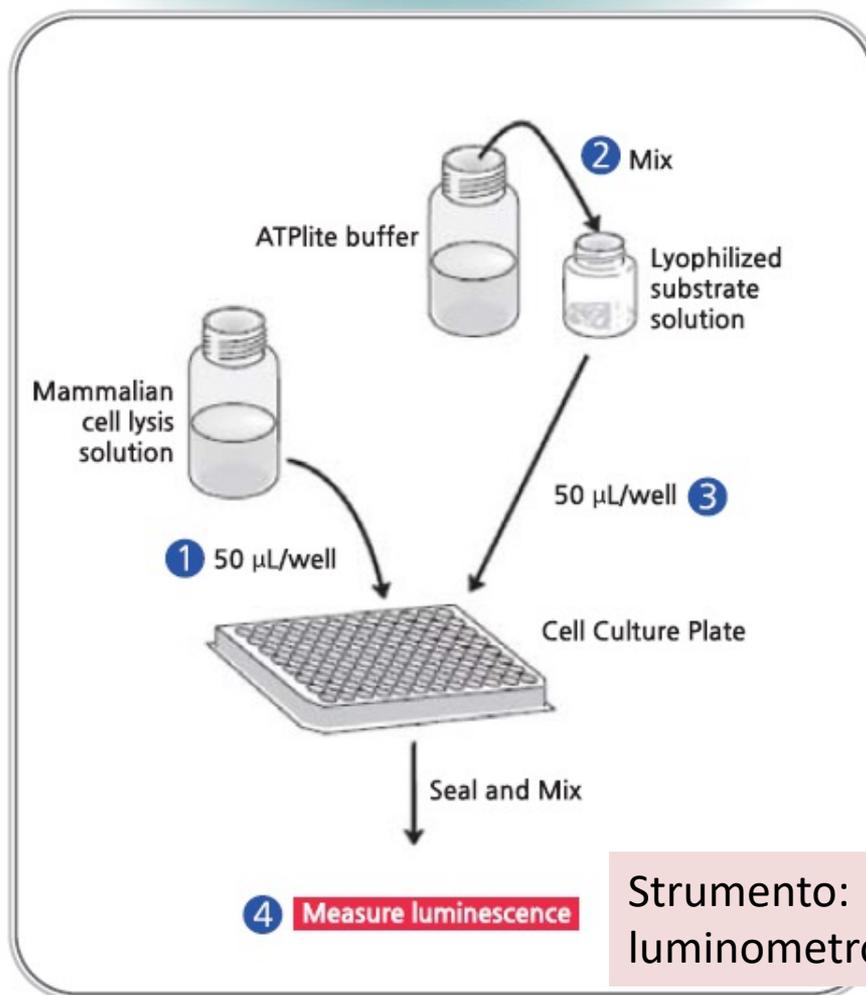
Vantaggi:

la **luce emessa** è direttamente proporzionale alla **concentrazione** di ATP e di enzima (ampio range di linearità).

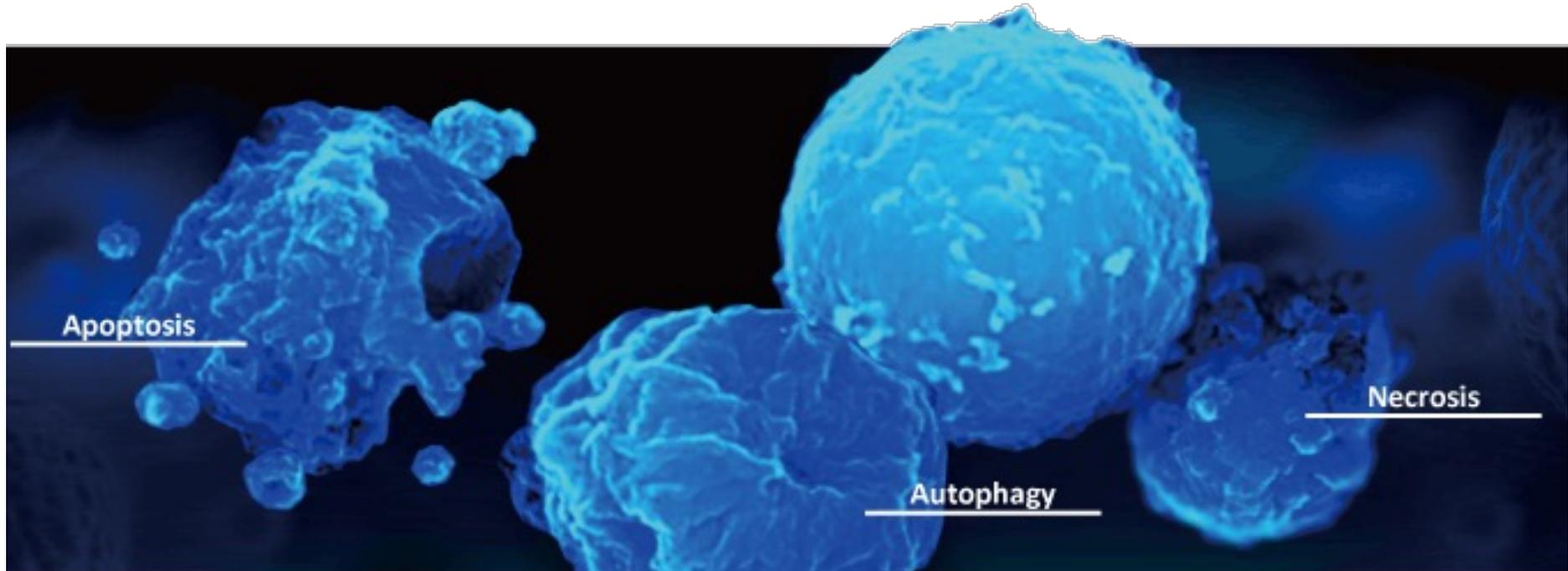
la **luce emessa** può essere **misurata** con un **luminometro** (a singolo raggio o a piastra) che ha elevata sensibilità.

Cellule e tessuti di mammifero hanno bassa luminescenza intrinseca: ridotto background.

Saggi di vitalità cellulare che misurano l'ATP cellulare



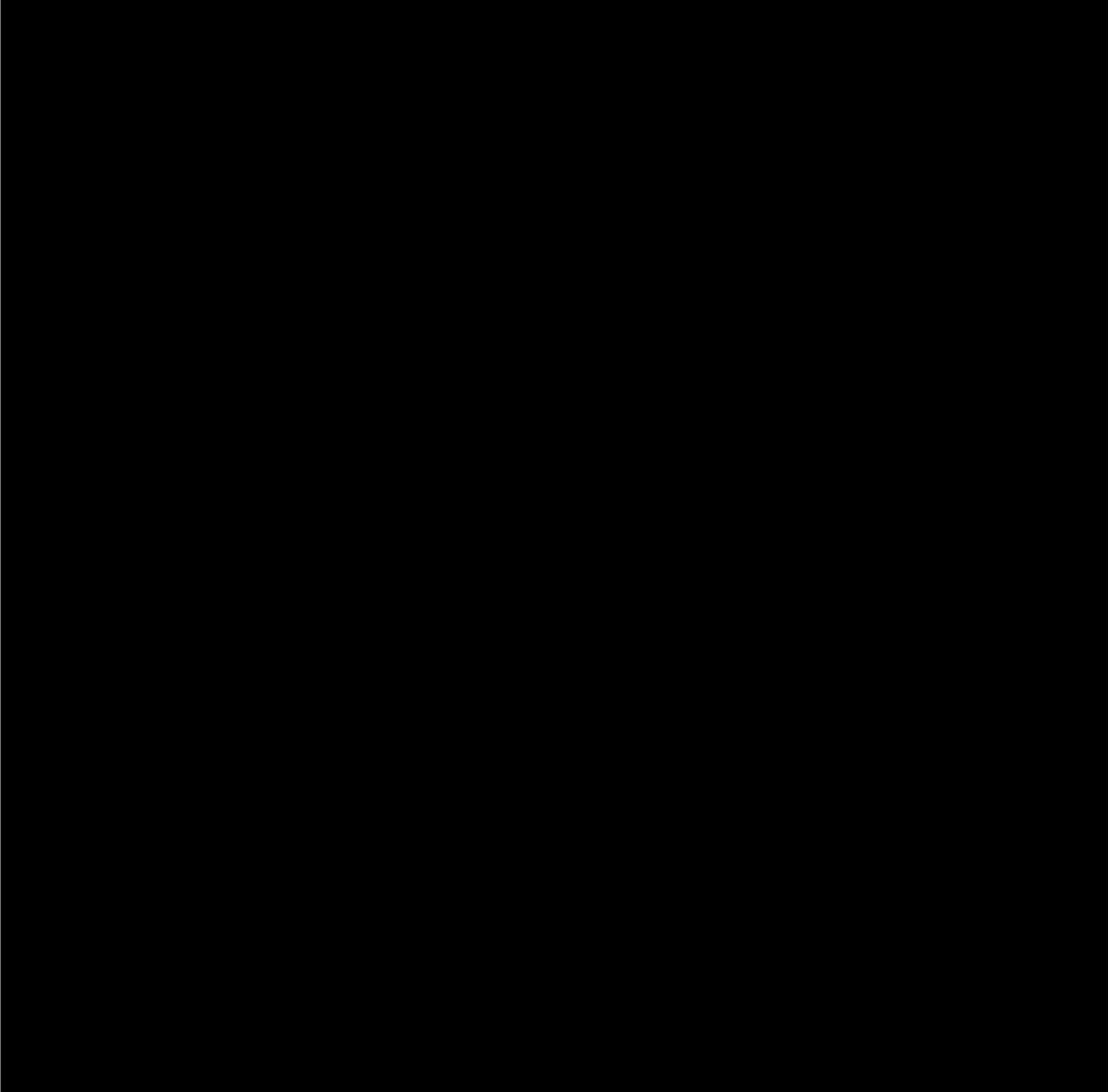
ANALISI DELLA MORTE CELLULARE



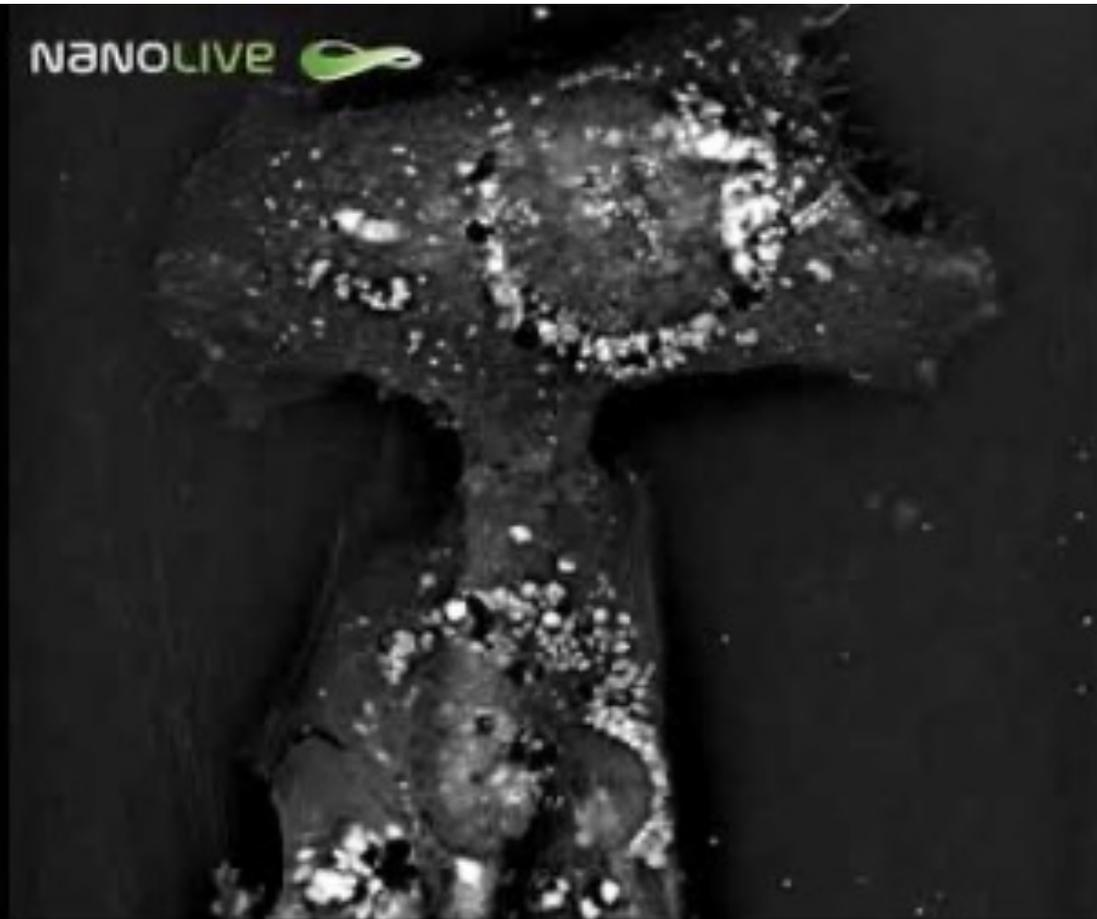
vescicolazione

formazione
di autofagosomi

lisi cellulare

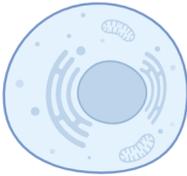


NANOLIVE 



GLIOBLASTOMA CELLS UNDERGOING
AUTOPHAGY

TIPI DI MORTE CELLULARE



Healthy cell

A Apoptosis

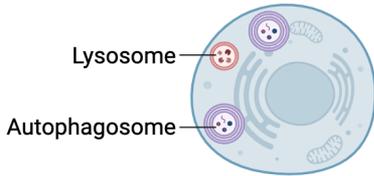


Cell shrinkage and membrane blebbing

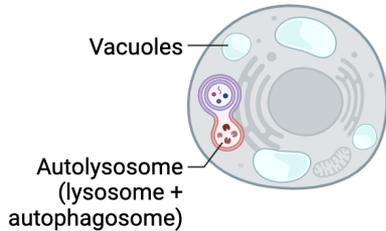


Formation of apoptotic bodies

B Autophagy

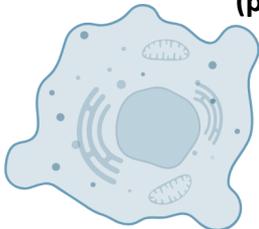


Formation of autophagosome and lysosome



Cytoplasmic vacuolation

C Necrosis & regulated necrosis (pyroptosis etc)



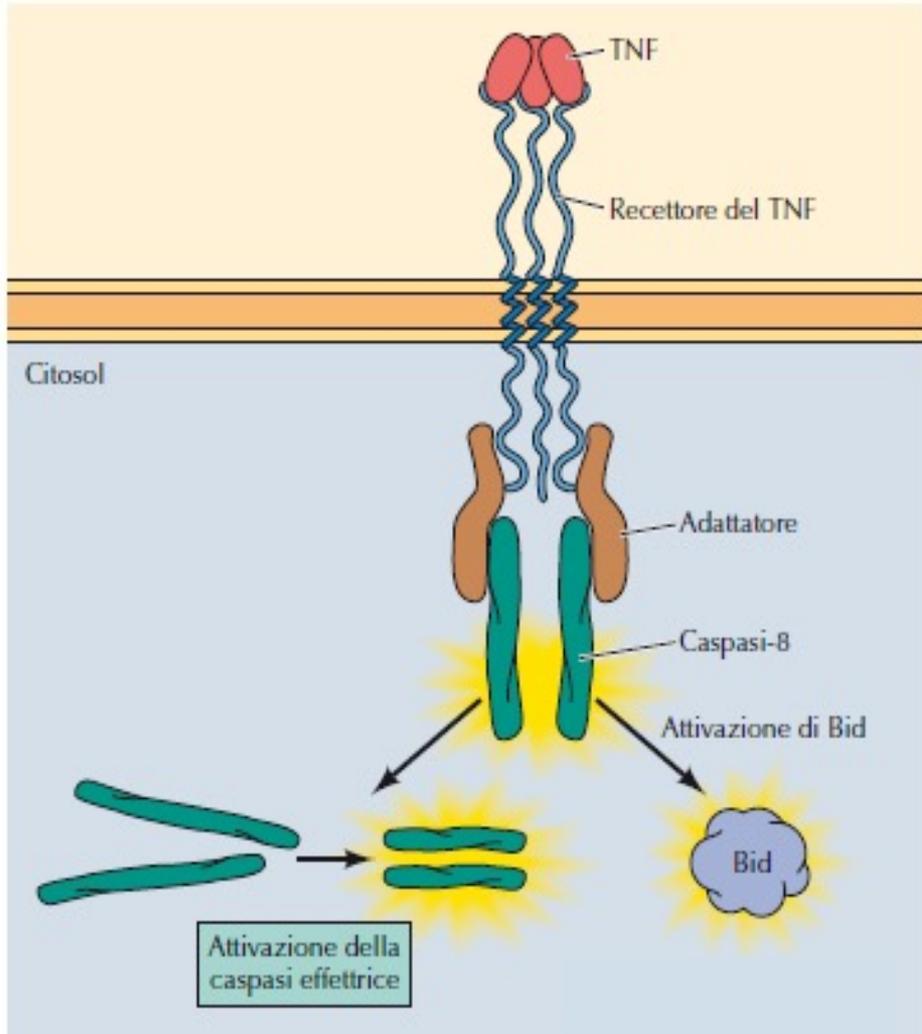
Swelling of the cell and organelles



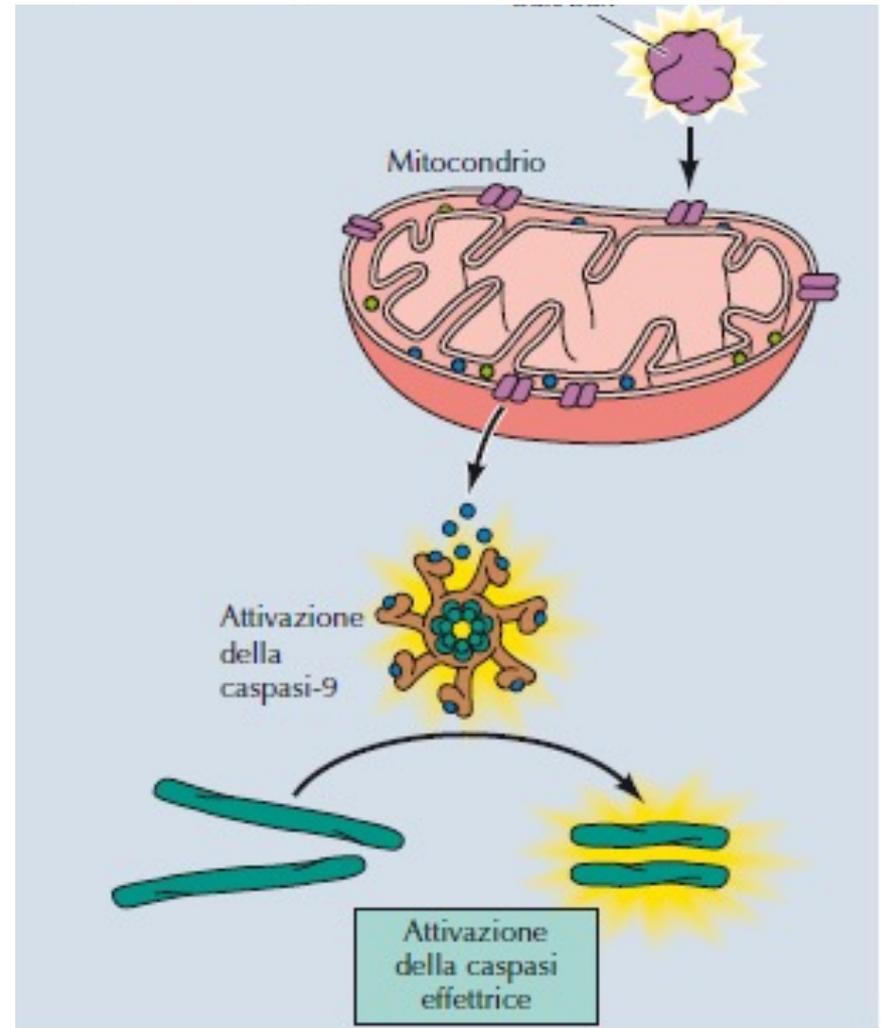
Rupture of the cell membrane

Apoptosi: via estrinseca e via intrinseca

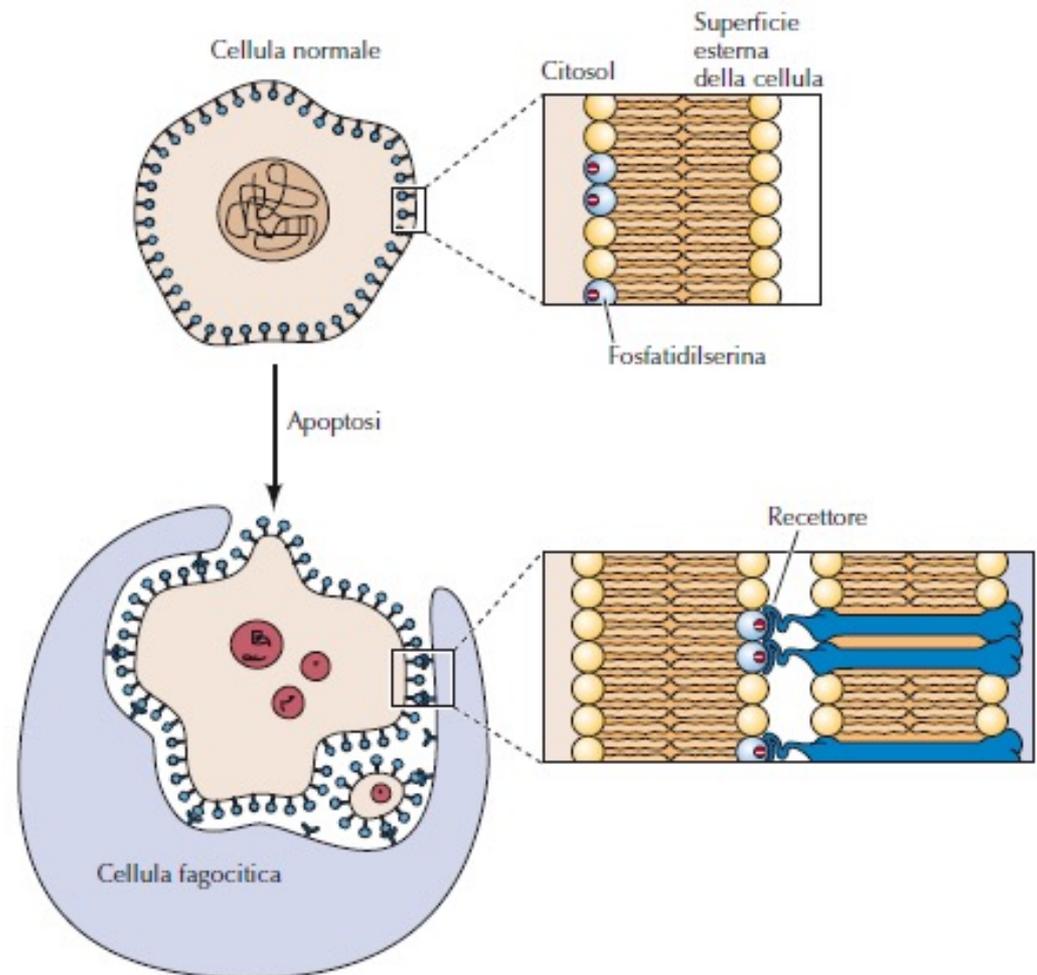
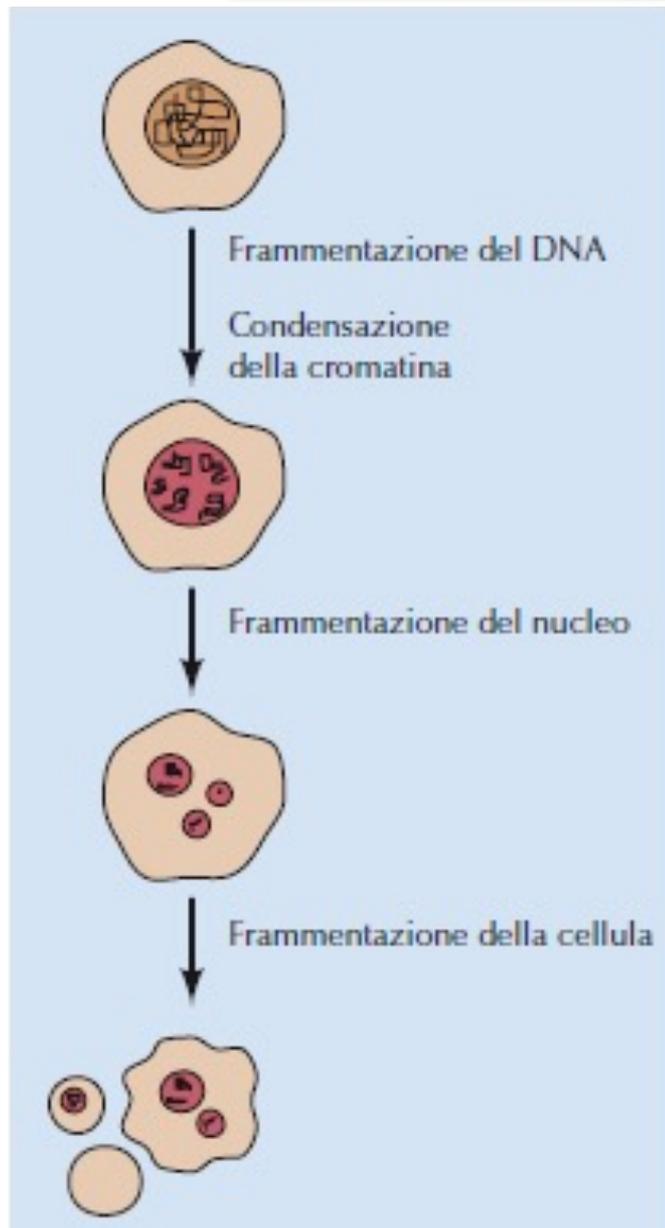
Segnale di morte extracellulare



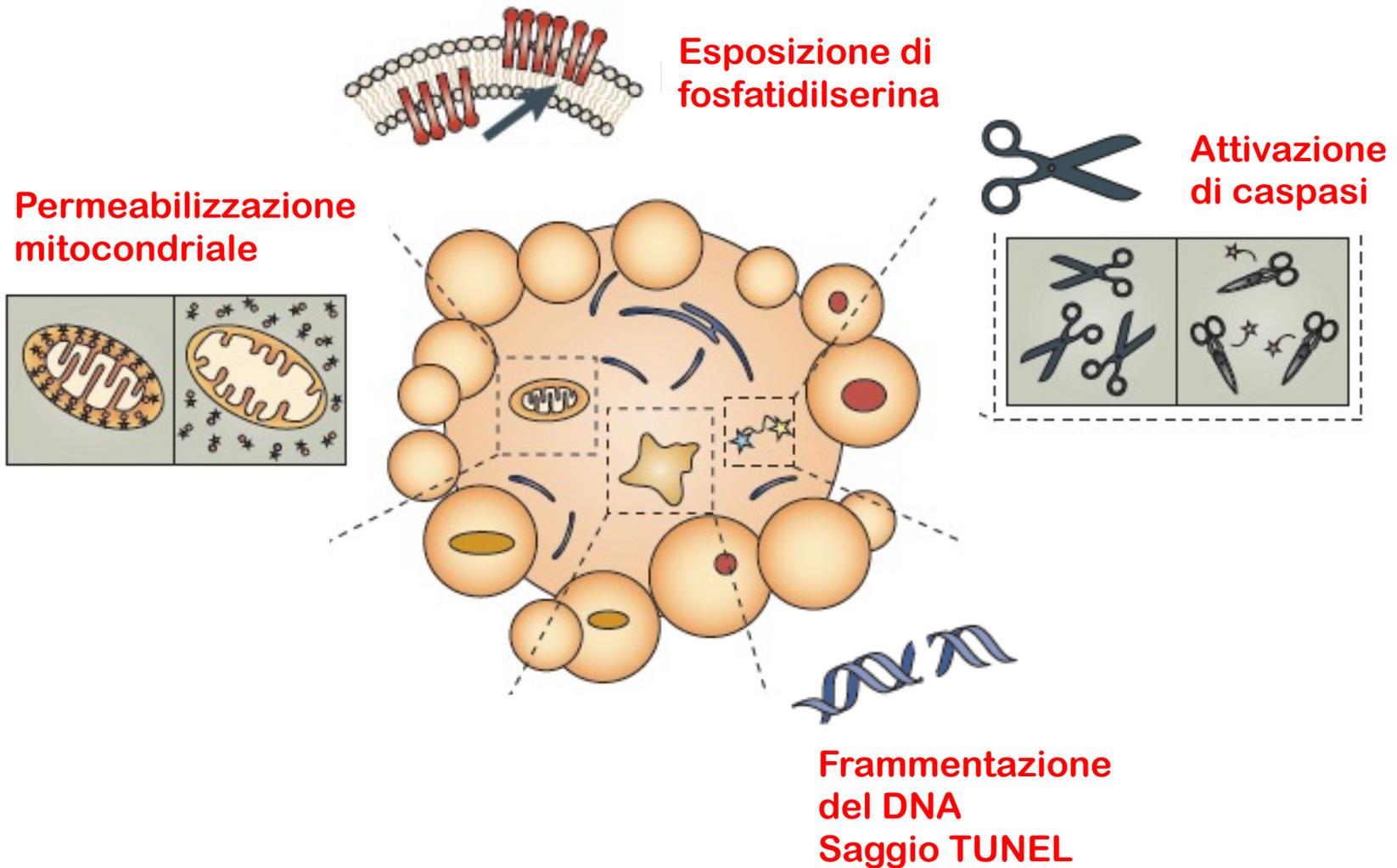
Segnale di morte intrinseco



Sequenza di eventi dell'apoptosi

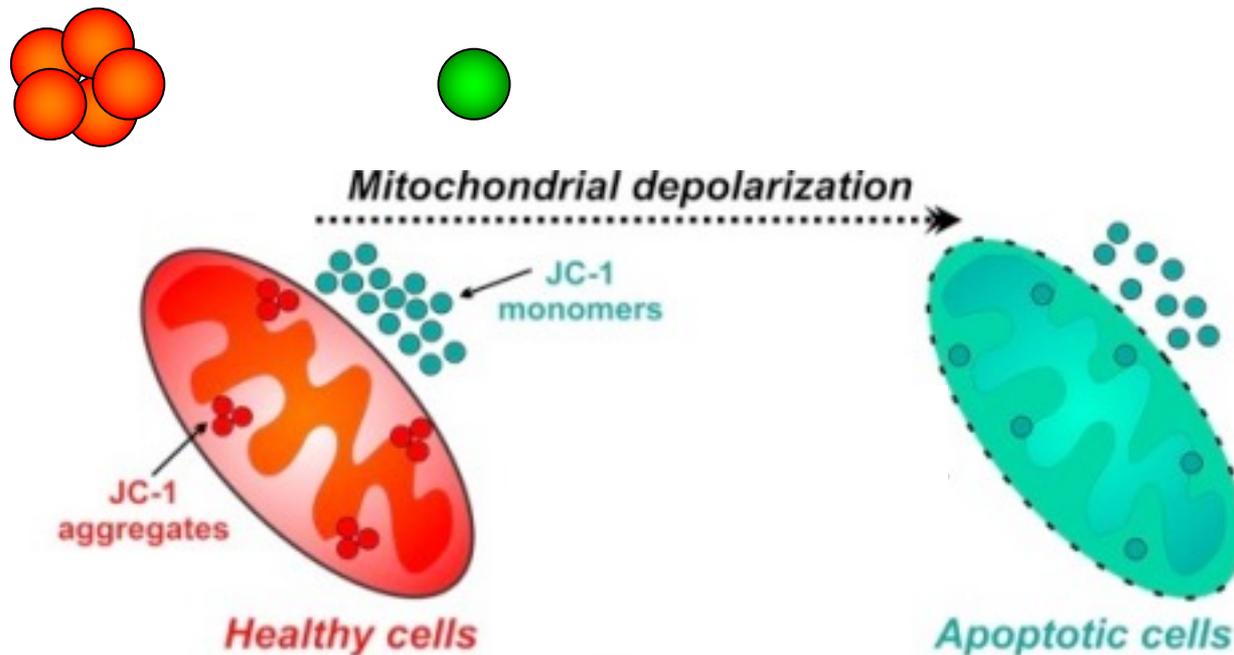


APOPTOSI: diversi SAGGI valutano diversi EVENTI



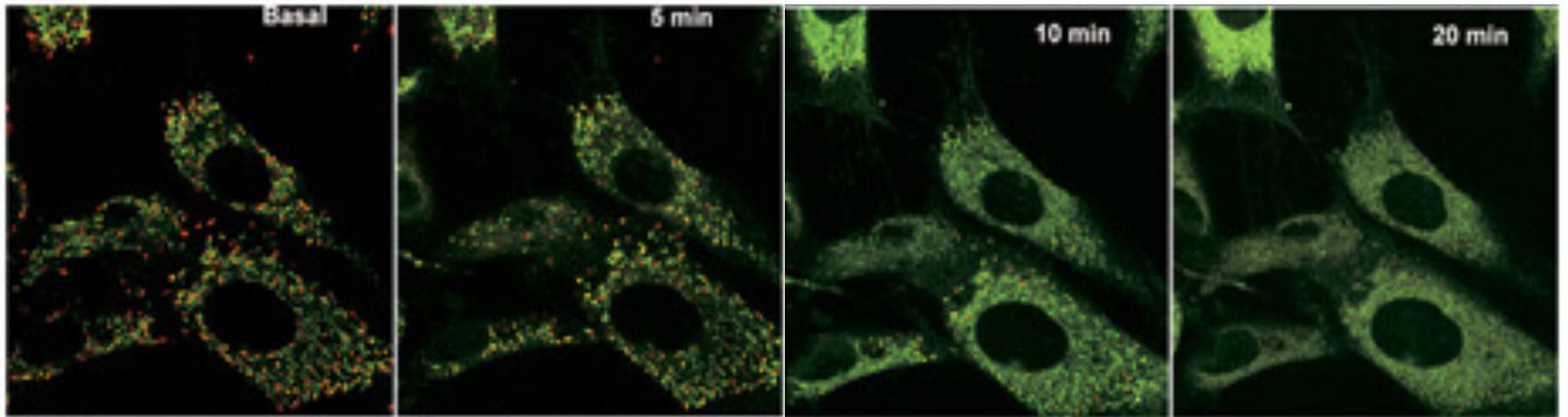
Saggi di permeabilizzazione mitocondriale live (via intrinseca)

colorazione vitale con coloranti mitocondriali la cui fluorescenza cambia da: **rosso (aggregato)** - **verde (monomero)**



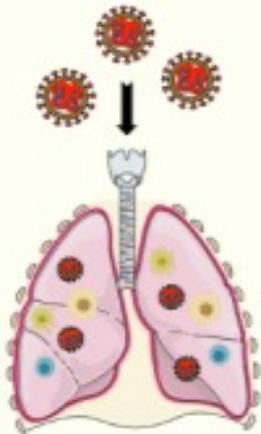
Saggi di permeabilizzazione mitocondriale (live)

colorazione vitale con coloranti mitocondriali la cui fluorescenza cambia da: **rosso (aggregato)** - **verde (monomero)**

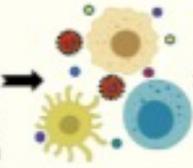


La morte cellulare “infiammatoria”

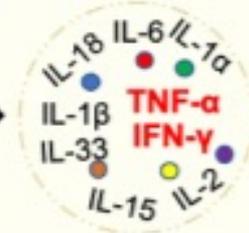
SARS-CoV-2 Infection



Innate Immunity

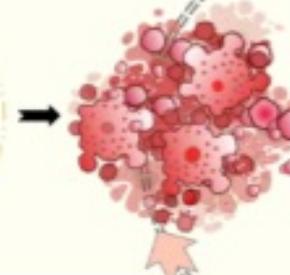


Cytokines

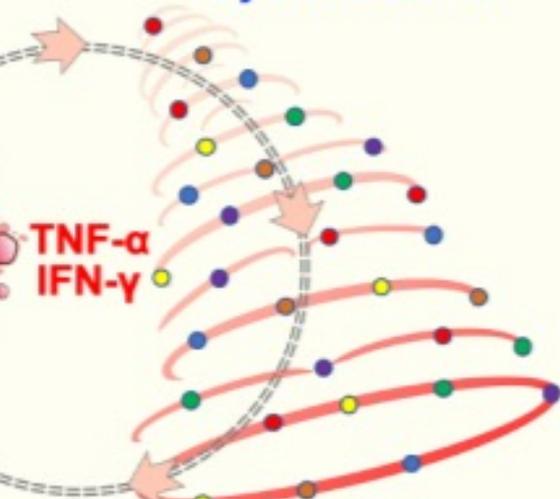


Inflammatory Cell Death

- PANoptosis**
- Pyroptosis
 - Apoptosis
 - Necroptosis



Cytokine Storm



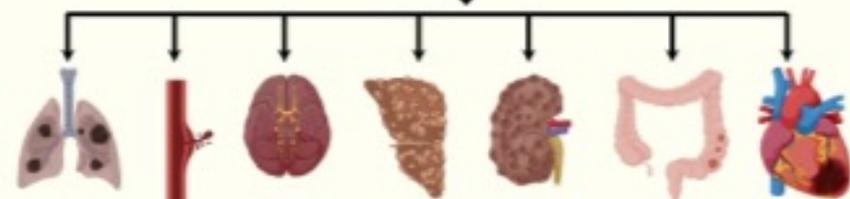
Cytokine Shock Syndromes

- Viruses: SARS, MERS, Influenza
- Bacteria: *Staphylococci*, *Streptococci*
- HLH
- Other cytokine storm-mediated shocks

Cytokine Shock Syndromes Markers

Ferritin	↑	B cells	↓	RBC	↑
LDH	↑	T cells	↓	HCT	↑
ALT	↑	Platelets	↓	Hb	↑
AST	↑	PCT	↓		
BUN	↑				

Cytokine Shock Syndromes

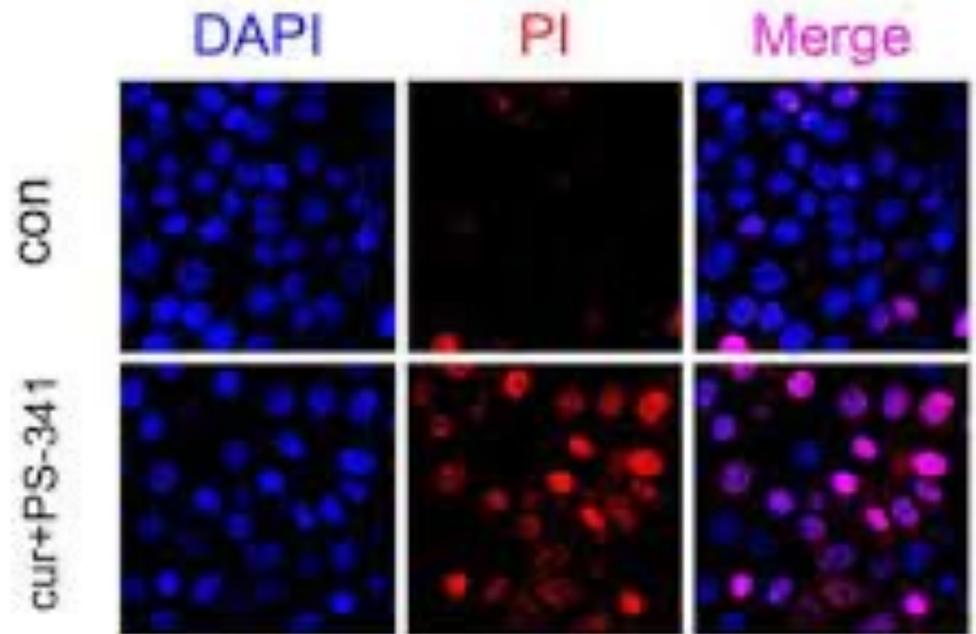
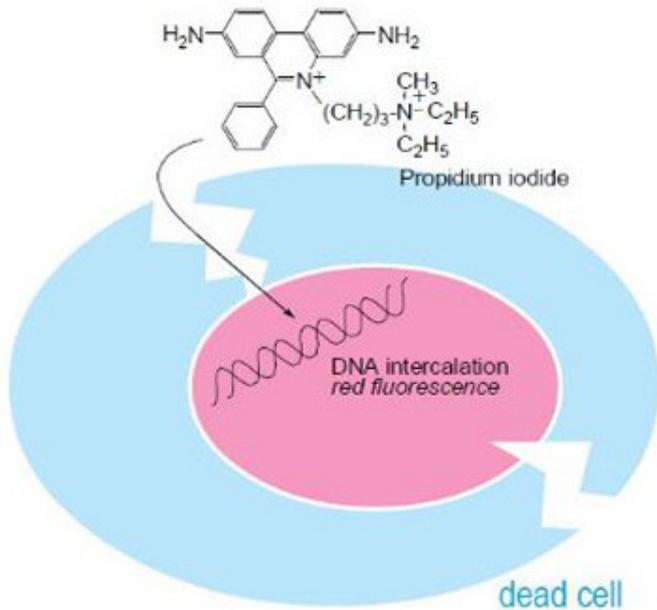


ARDS (Local)

Multi-Organ Failure (Systemic)

Morte cellulare infiammatoria: perdita dell'integrità di membrana

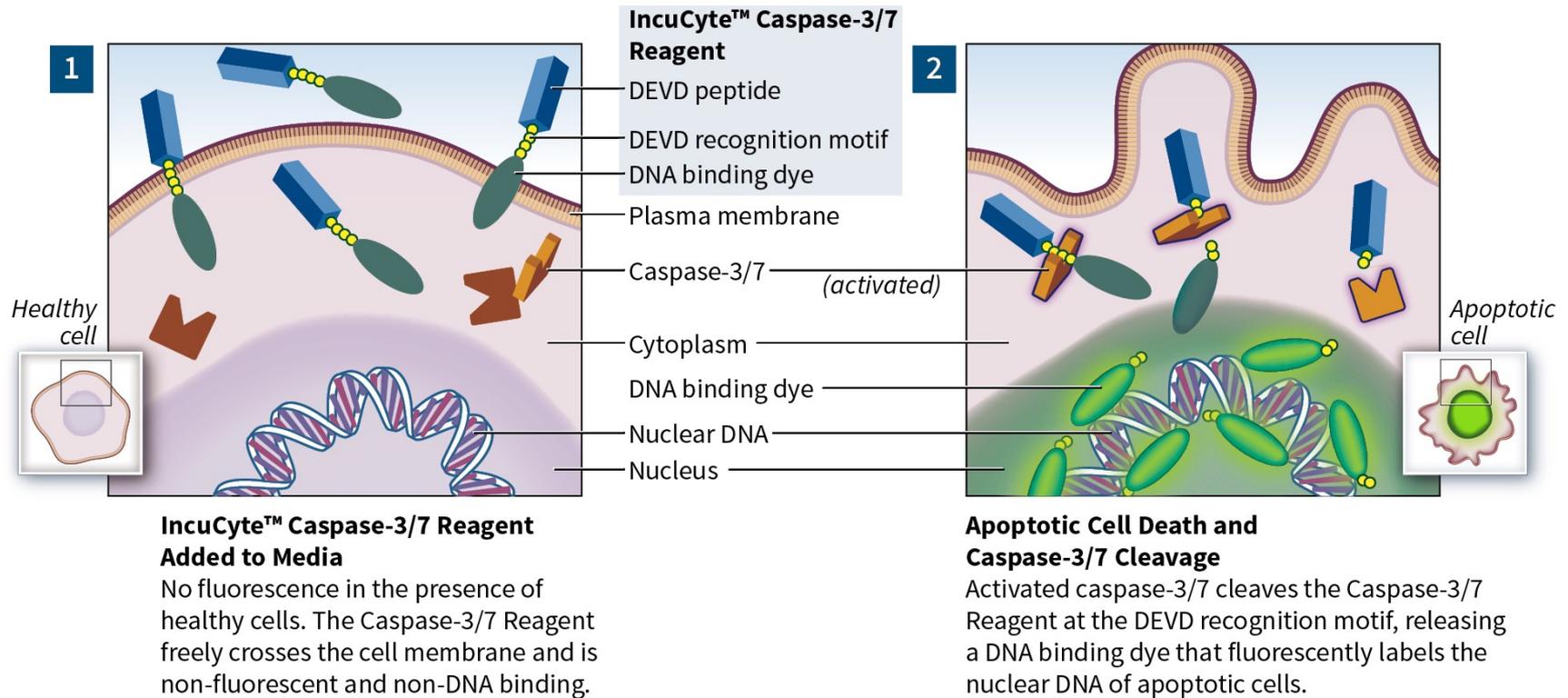
Propidio ioduro



**L'integrità della membrana plasmatica viene persa durante il processo di morte infiammatoria :
il PI può penetrare solo in tali cellule**

Morte cellulare infiammatoria: attivazione di caspasi

Saggi di attivazione di CASPASI (sia live che in cellule fissate)



Molecola con sito di taglio per le caspasi 3/7, il taglio libera:

- un **colorante fluorescente che si intercala al DNA**, oppure
- una molecola chemoluminescente
- ...

Saggi cell-based: SCELTA DELLO STRUMENTO

- Microscopia a fluorescenza (live o fixed)
- Citofluorimetria (live o fixed)

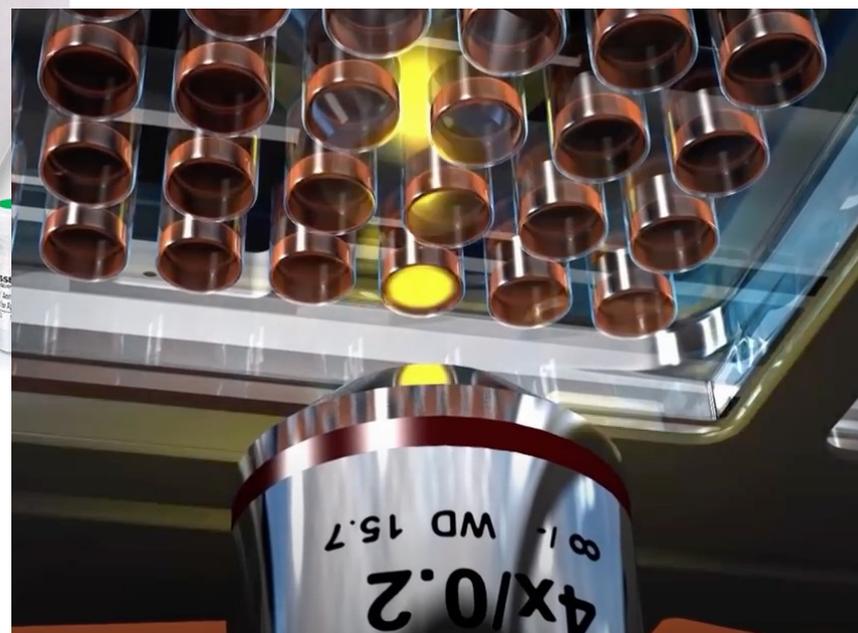


Valutazione realtime mediante live cell labeling



IncuCyte® live-cell analysis system

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

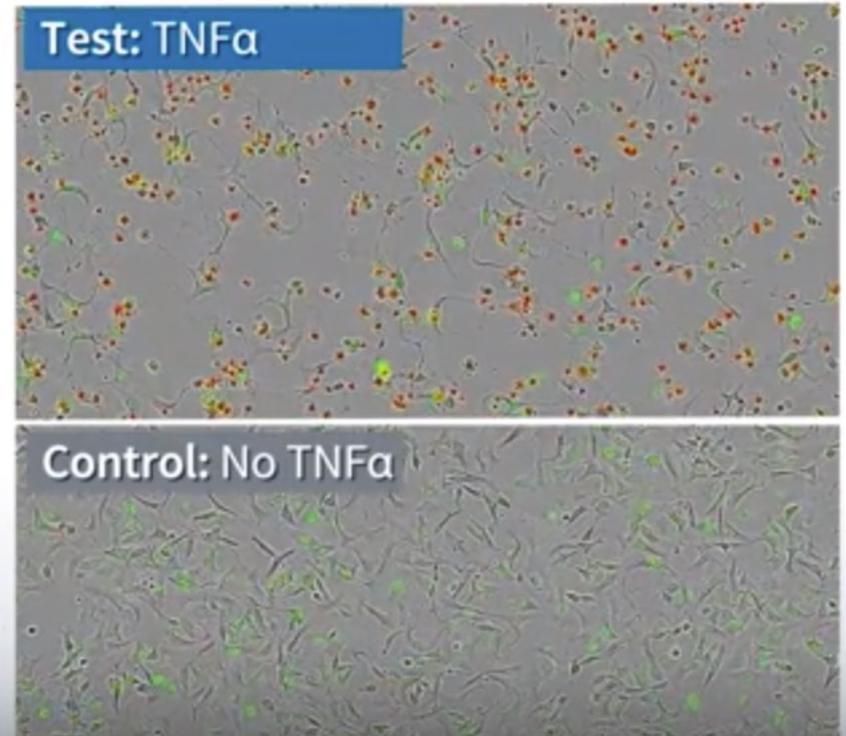
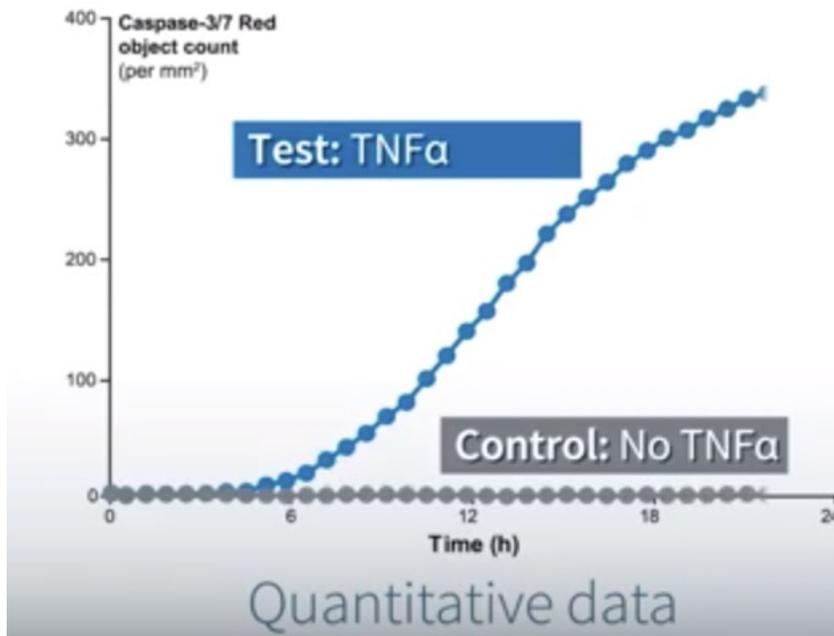


Valutazione realtime di apoptosi mediante live labeling

<https://www.youtube.com/watch?v=FidPF2EJb0I>

Automatically measure the time course of caspase-3/7 mediated apoptosis

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



Real-time detection of apoptosis in Green labeled MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cells treated with **TNF α** and cycloheximide.

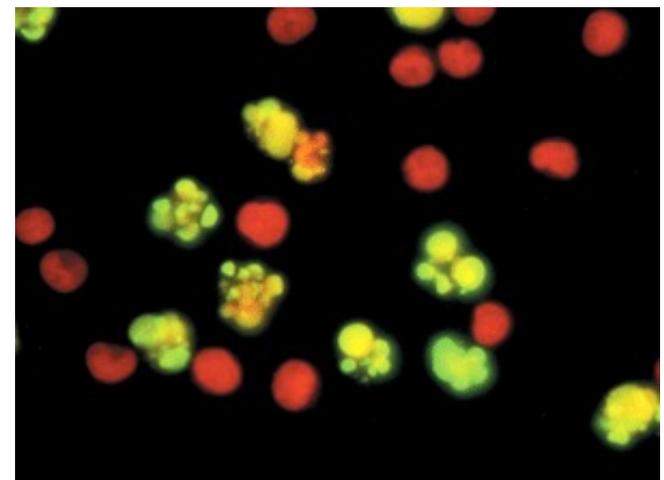
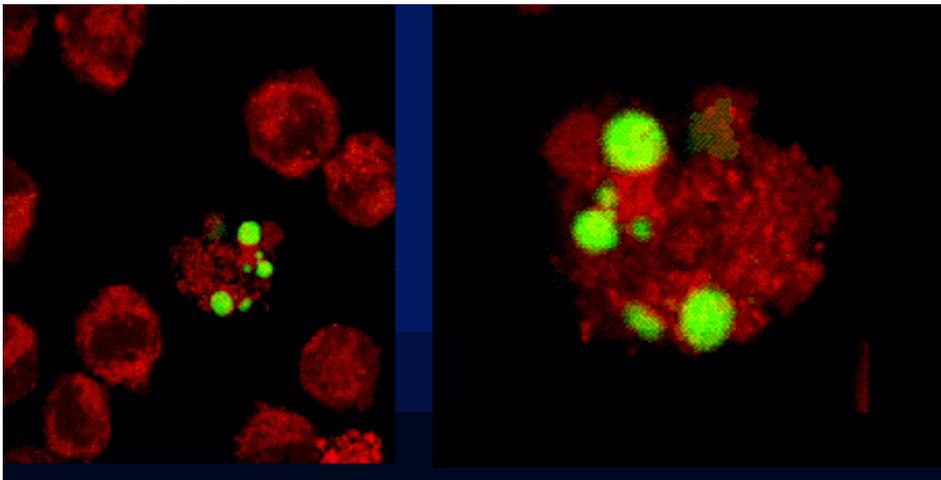
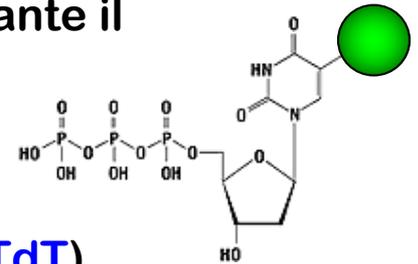
Apoptotic cells are labeled red using Caspase-3/7 Red Reagent. Apoptotic cells are quantified in real time using the IncuCyte Live-Cell Analysis System.

SAGGIO TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick End Labelling) (cellule/tessuti fissati); microscopia/FACS

Marcatura delle **estremità dei frammenti di DNA** generati durante il processo apoptotico con **dUTP** coniugato ad un **fluorocromo** (ad es. **FLUORESCEINA verde = FITC**).

Viene fornito l'**enzima terminal desossinucleotidil transferasi (TdT)**

La fluorescenza può poi essere visualizzata al **microscopio**,
oppure mediante lettore o FACS

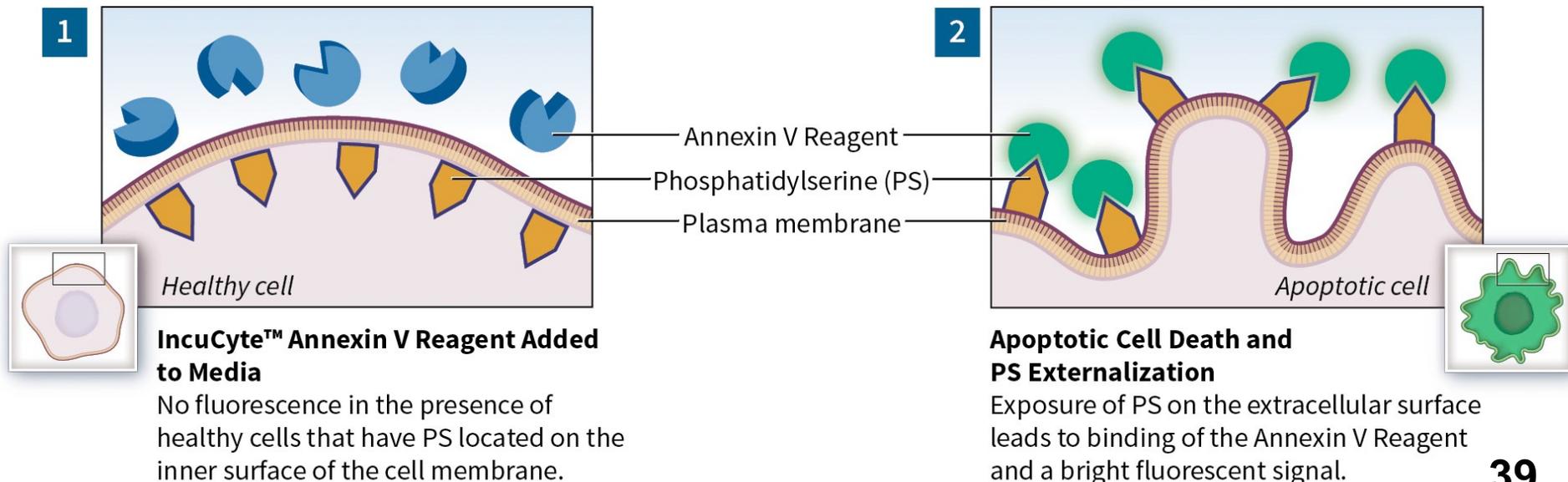


Il **DNA** è contro-colorato con **Propidio Ioduro (rosso)** per visualizzare tutti i nuclei **38**

Saggi di esposizione di fosfatidilserina: ANNEXINA V (sia cellule vitali che fissate)

Le cellule apoptotiche espongono **fosfatidilserina** (PS) sul foglietto esterno della membrana plasmatica. L'**annexina V** lega la PS.

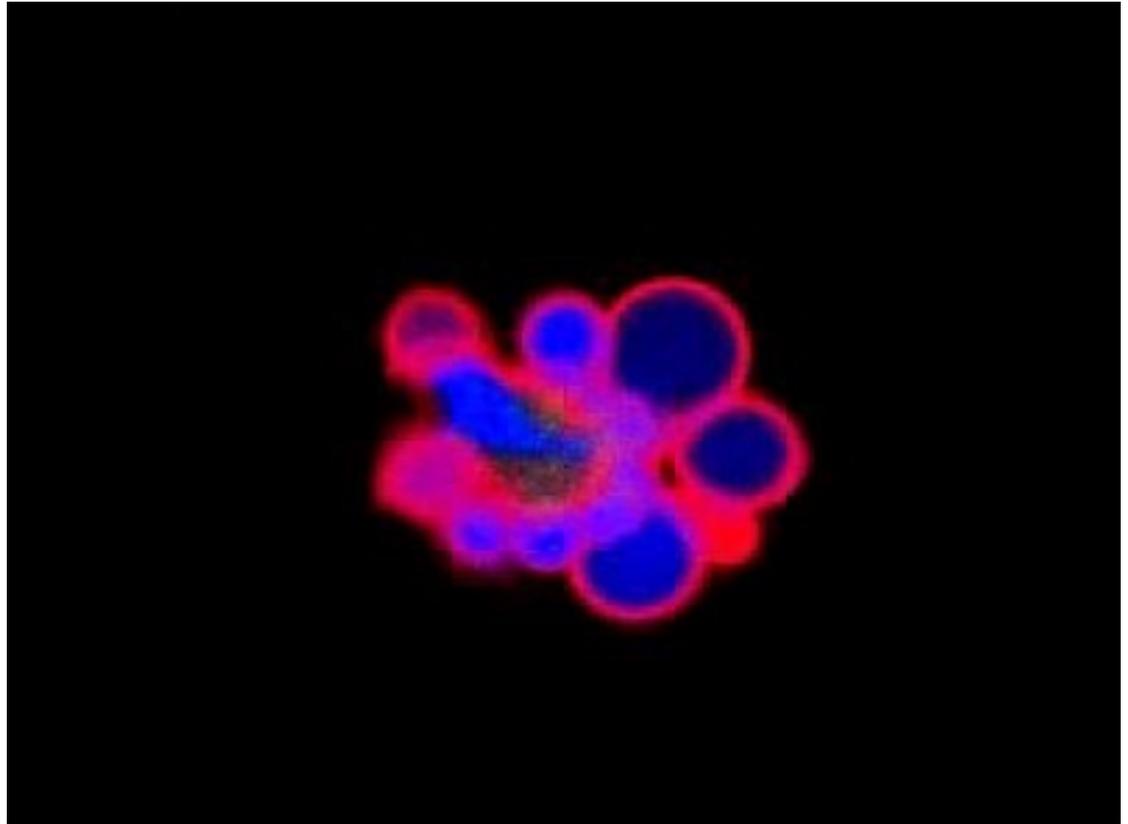
Visualizzazione della PS mediante colorazione con **ANNEXINA V coniugata a un fluorocromo (qui FITC)**



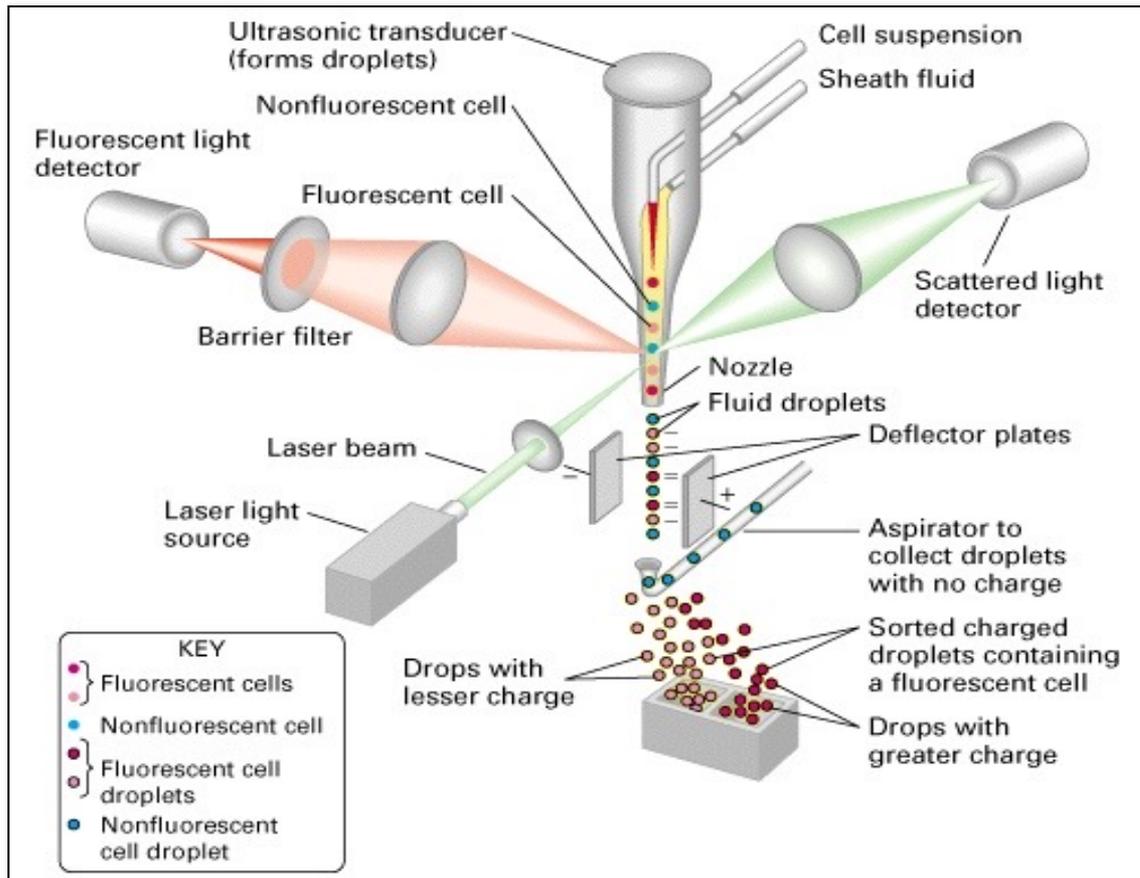
Visualizzazione della cinetica di apoptosi mediante saggi multipli in live cell labeling

<https://www.youtube.com/watch?v=rs1Je-8Y3Po>

- 1) Permeabilizzazione mitocondriale:
(molecola fluorescente verde)
- 2) Alterazioni della membrana plasmatica:
Esposizione della fosfatidilserina (Annexin-RITC rosso) e vescicolazione
- 3) Frammentazione del nucleo:
DNA colorato con DAPI blu



CITOFUORIMETRO:



Il citofluorimetro valuta:

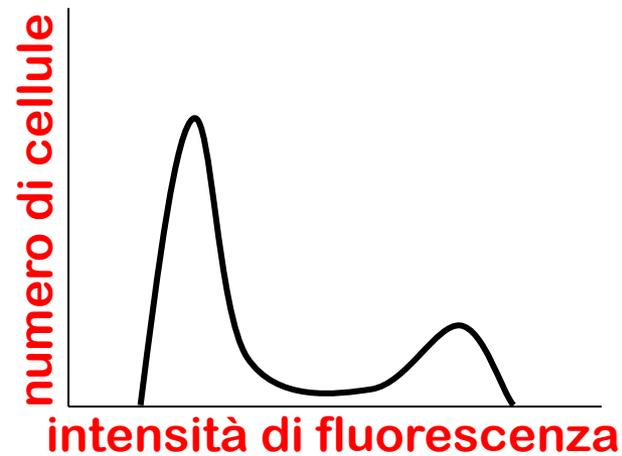
- numero di cellule
- forma cellulare
- intensità di fluorescenza

■ Si può effettuare una colorazione con :

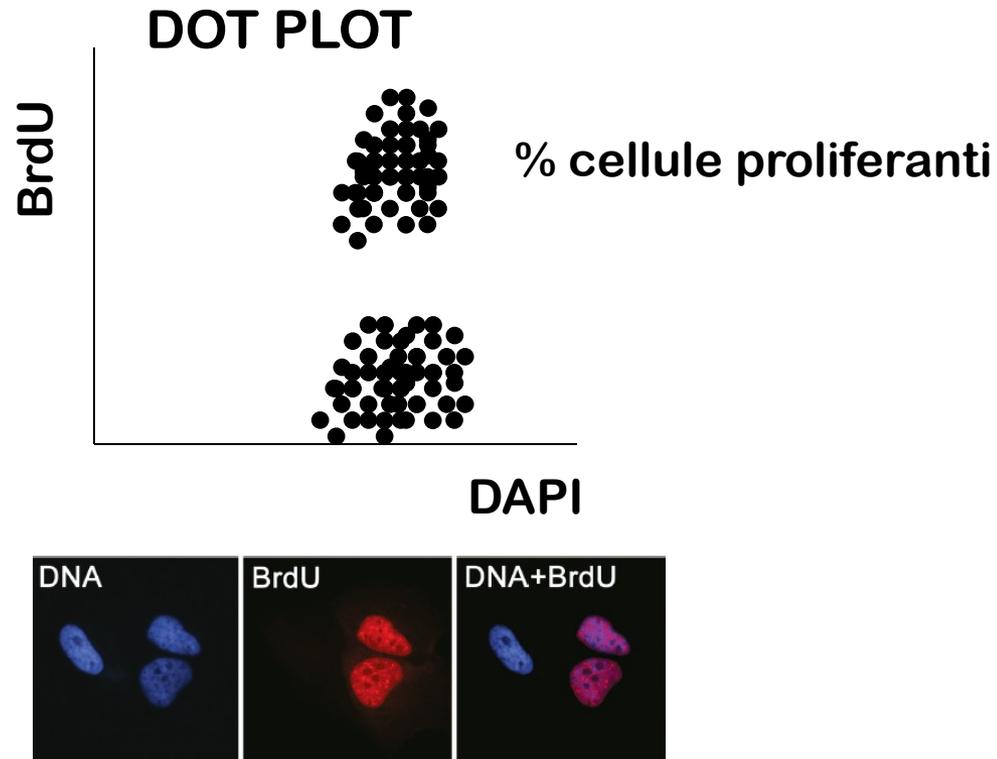
sostanze fluorescenti compresi intercalanti degli acidi nucleici e anticorpi

Lo strumento produce diversi tipi di **output**:

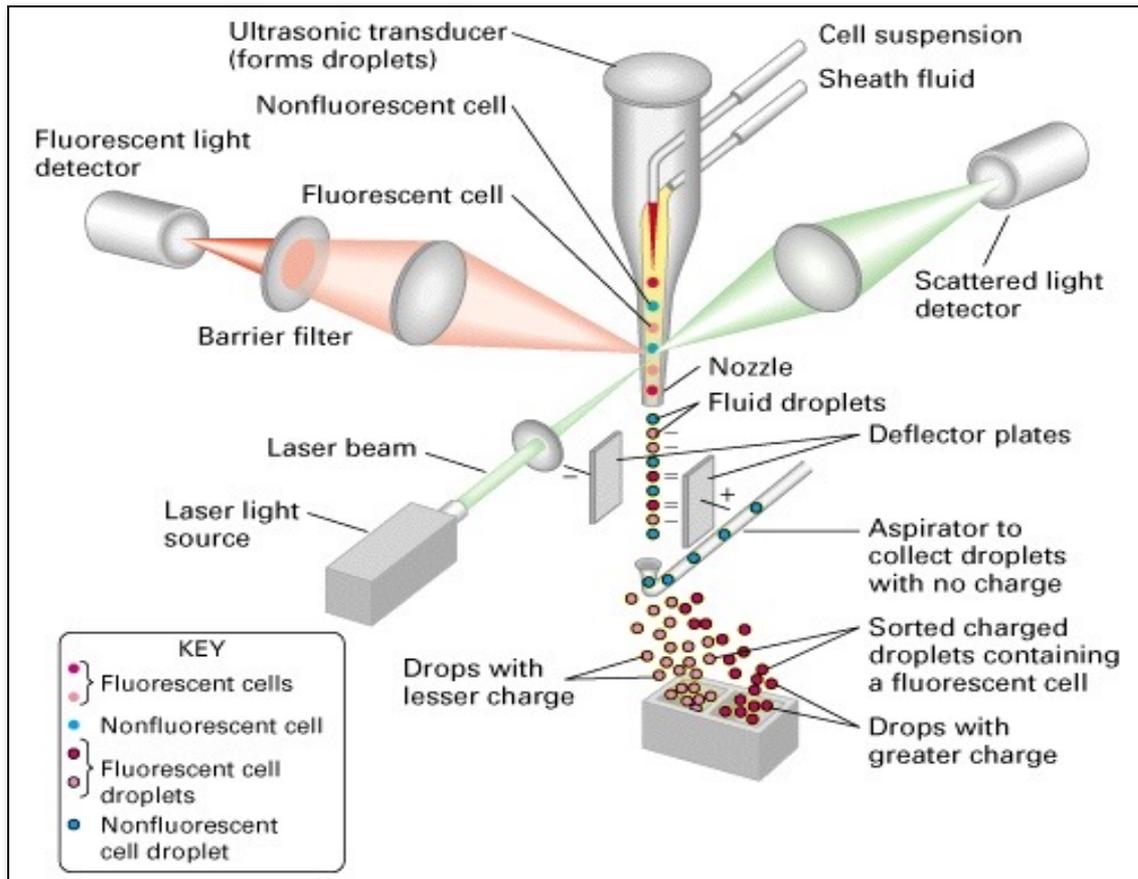
1) **istogrammi**, in cui l'intensità di fluorescenza è riportata in funzione del numero di cellule



2. **dot plot**, in cui un parametro è riportato in funzione di un altro (es. fluorescenza **rossa** vs fluorescenza **verde**) e ogni dot rappresenta una cellula



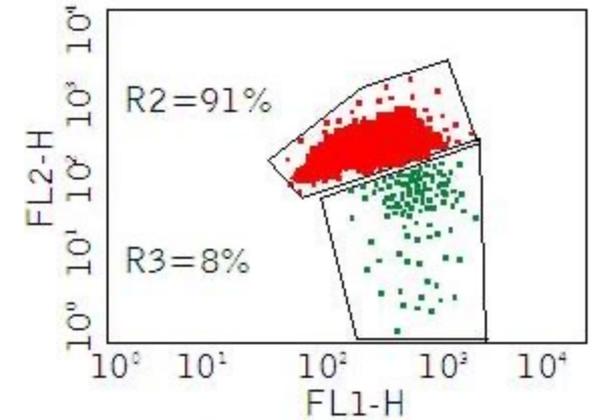
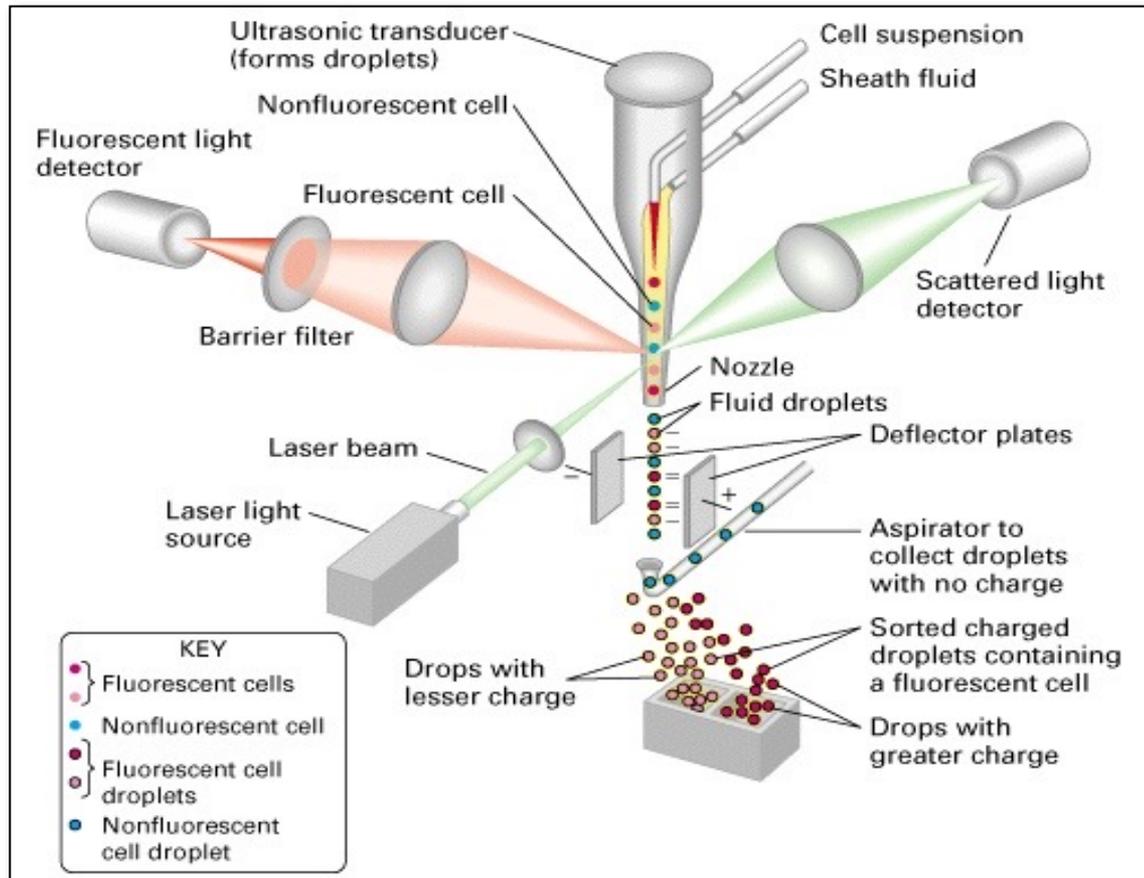
Valutazione quantitativa di apoptosi mediante citofluorimetria



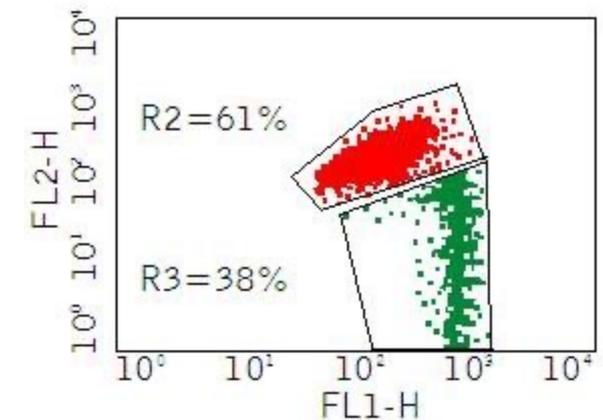
- Si può effettuare una colorazione con :
 1. sostanze fluorescenti (es. **Annexina V, JC1**)
 2. substrati fluorescenti per le caspasi
 3. intercalanti fluorescenti degli acidi nucleici (**PROPIDIO IODURO**)

Valutazione quantitativa di apoptosi mediante citofluorimetria

Si può effettuare una **colorazione con sostanze fluorescenti (es. JC1)** e conta delle cellule rosse/verdi

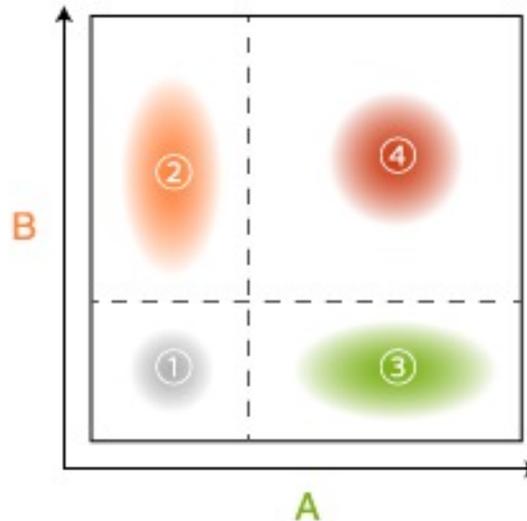
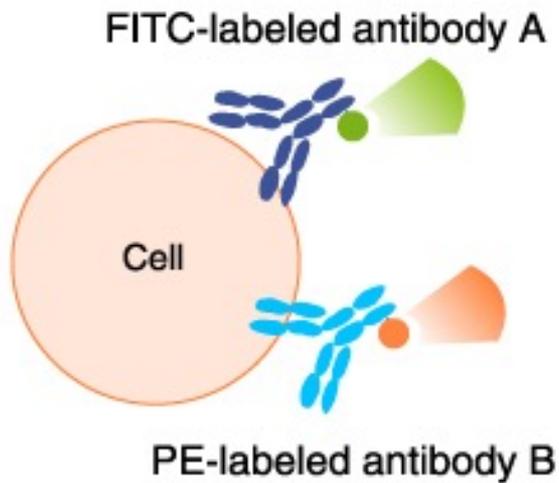


Negative control (non-induced)



Apoptotic (induced)

ANALISI MULTIPARAMETRICHE di popolazioni cellulari eterogenee

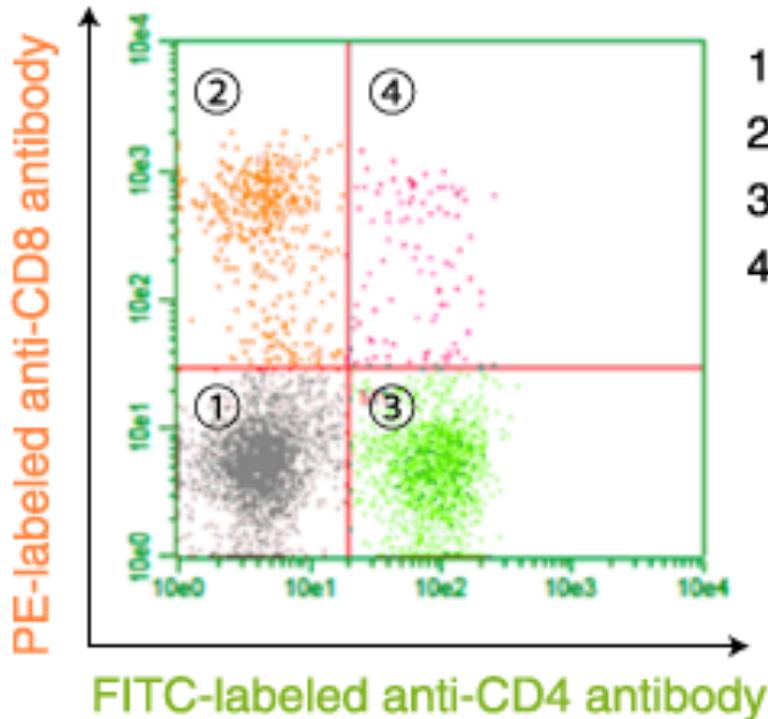


- 1) Cells not expressing either A or B
- 2) Cells expressing only B
- 3) Cells expressing only A
- 4) Cells expressing both A and B

Esempio: immunofenotipizzazione di popolazioni linfocitarie

PE-labeled anti-CD8 antibody

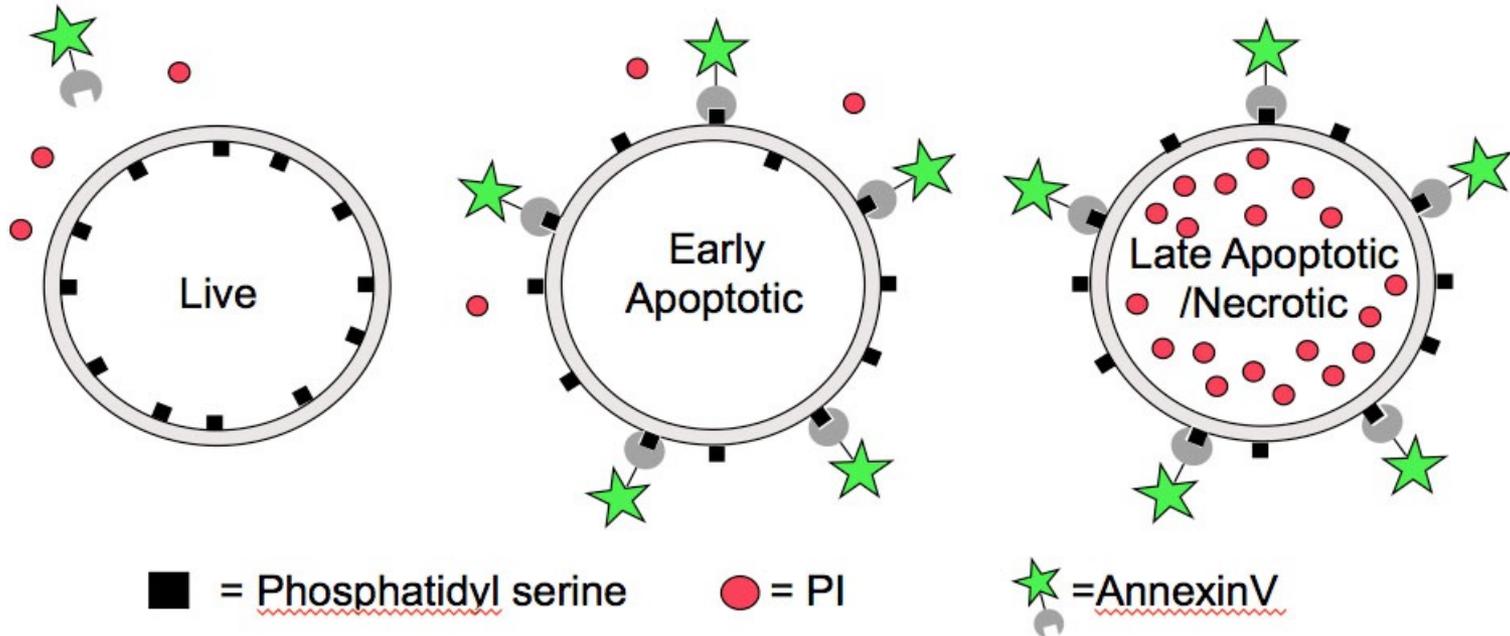
FITC-labeled anti-CD4 antibody



- 1) Cells not expressing either CD8 or CD4
- 2) Cells expressing only CD8 --- Cytotoxic T cells
- 3) Cell expressing only CD4 --- Helper T cells
- 4) Cells expressing both CD8 and CD4

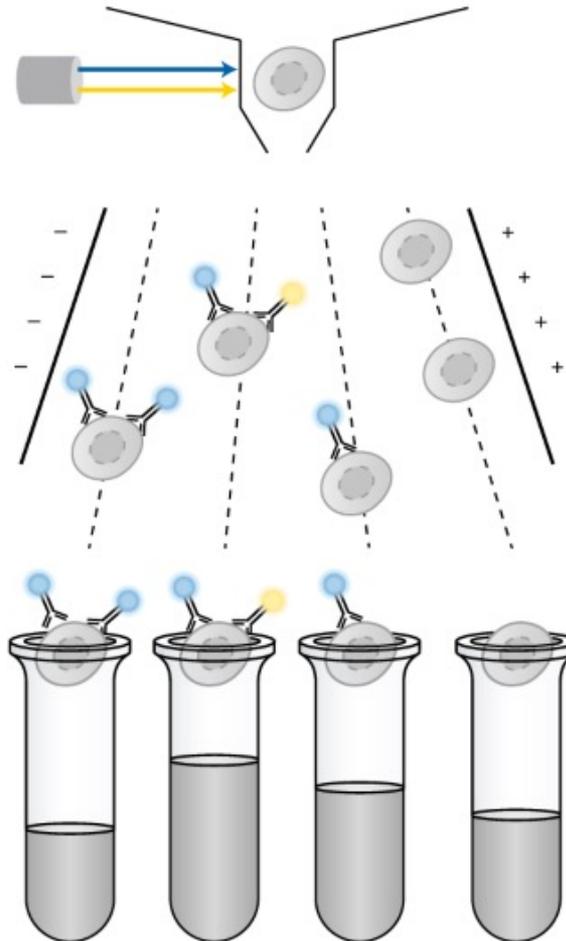
Sample: mouse splenocytes

Distinzione del tipo di morte cellulare mediante CF: Annexina + Propidio Ioduro o Sytox green



L'integrità della membrana plasmatica viene persa durante il processo di morte infiammatoria: il colorante può penetrare nella cellula

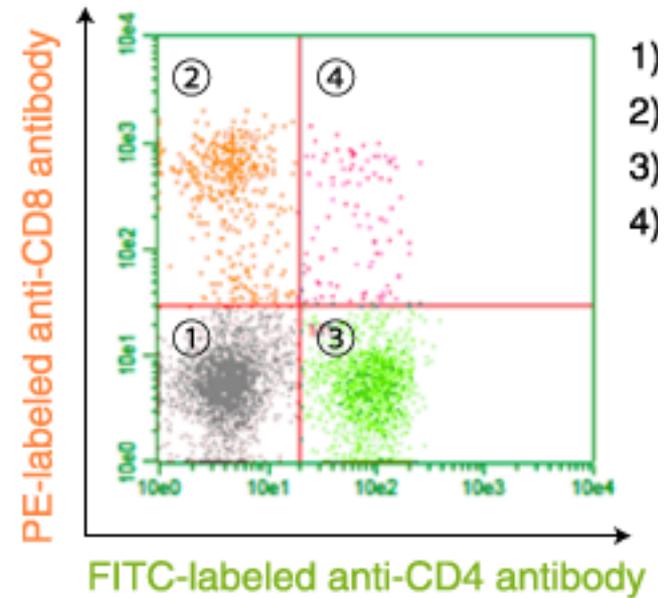
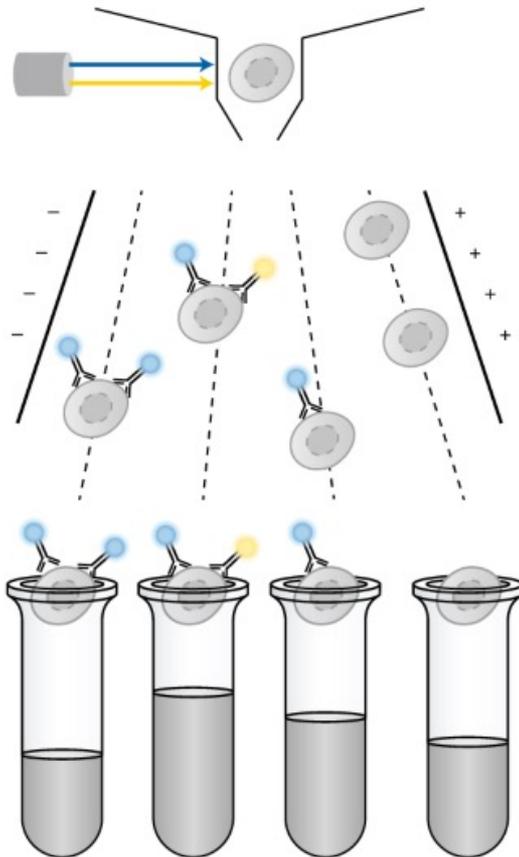
FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTER – FACS
per l'immunopurificazione di popolazioni cellulari
mediante anticorpi specifici per antigeni di superficie.

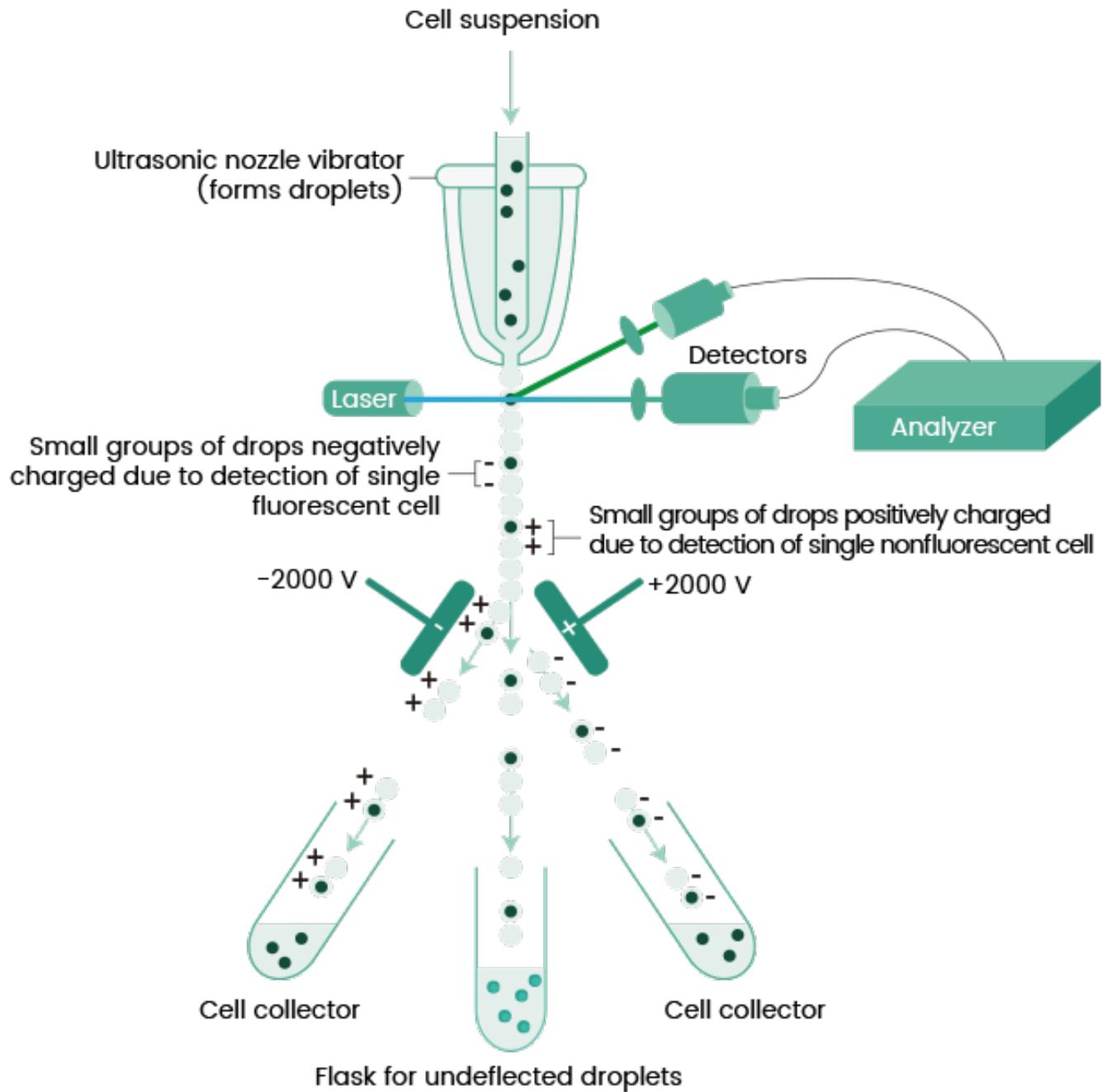


Popolazione cellulare eterogenea



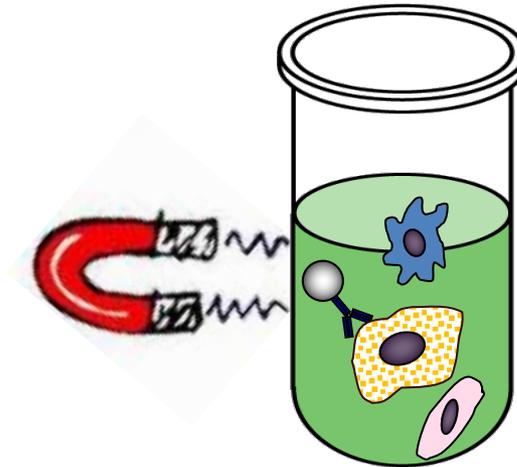
Marcatura con anticorpi per antigeni di membrana





Alternativa: immunopurificazione magnetica

Uso di anticorpi specifici per antigeni di superficie coniugati a microbeads magnetiche.



Magnetic labeling



Magnetic separation



Elution of the labeled cells



Altri metodi e saggi per l'analisi della proliferazione cellulare

Identificazione/quantificazione di cellule in fase S mediante analisi della neo sintesi del DNA

Nucleic Acid Labeling

"Pulse" by adding the 5-ethynyl-2'-deoxyuridine nucleotide to the media while cells are growing

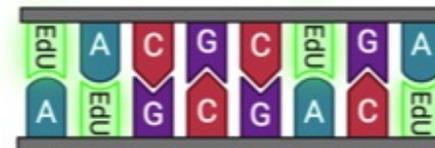


"Click-iT™" Reaction

Fluorophor-Azide

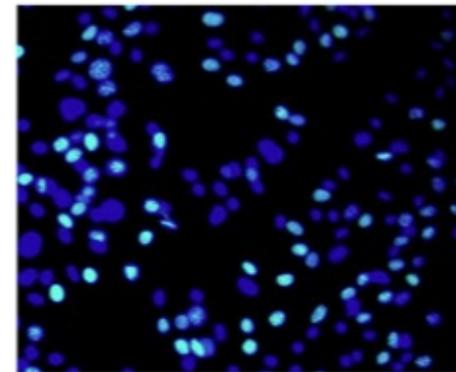
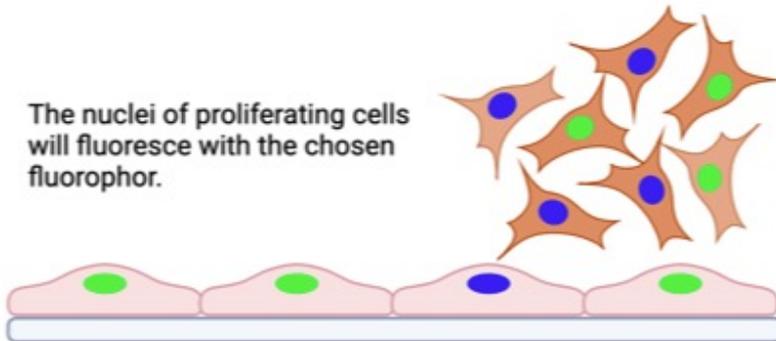
Cu(I)

Fluorescently labeled EdU



Cell Nuclei Labeling

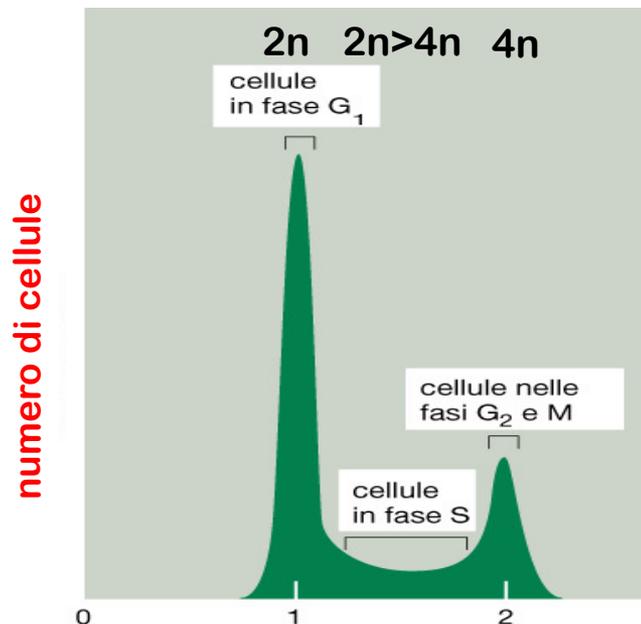
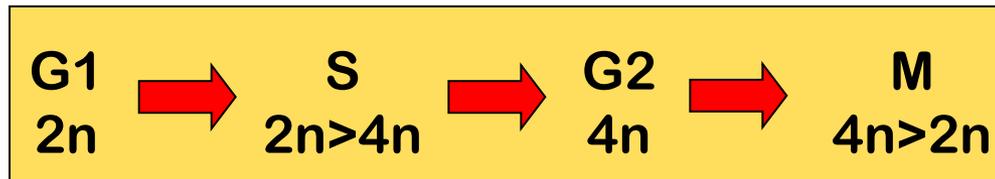
The nuclei of proliferating cells will fluoresce with the chosen fluorophor.



Le cellule in FASE S possono essere MARCATE aggiungendo al mezzo di coltura un **analogo della timidina**: es. **BrdU = 5-bromo desossiuridina** oppure **EdU = 5-ethynyl desossiuridina** che possono essere coniugati a un fluoroforo (EdU) oppure riconosciuti con anticorpo (BrdU)

ANALISI del CICLO CELLULARE al CITOFLUORIMETRO

Il **CONTENUTO** di DNA di ciascuna cellula varia durante la progressione del ciclo cellulare: mediante citofluorimetria è possibile analizzare singole cellule di una popolazione valutandone il contenuto di DNA

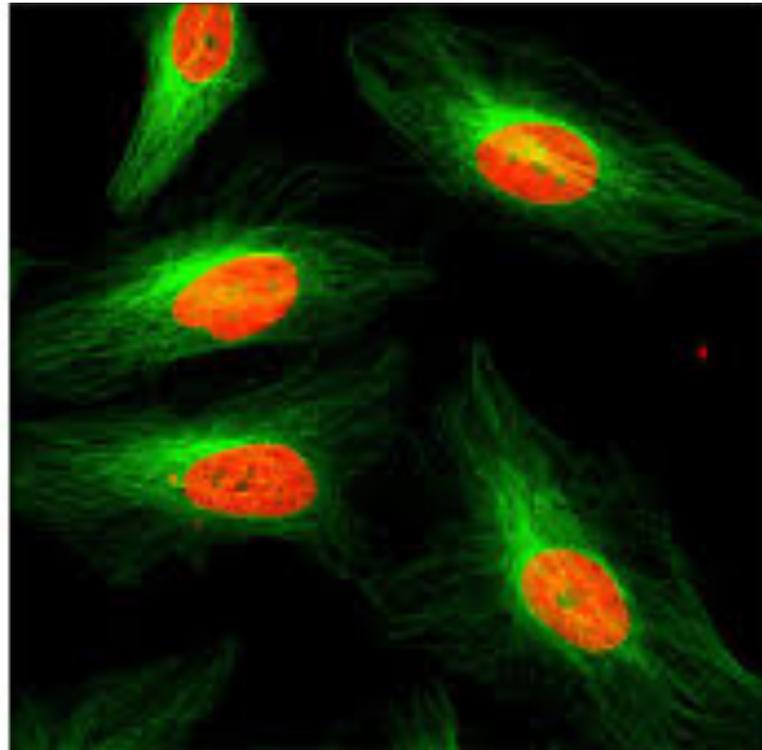


G₀/G₁ $2n$ S $2n > 4n$ G₂/M $4n > 2n$

COME POSSIAMO MISURARE IL CONTENUTO DI DNA?

Si fissano e permeabilizzano le cellule e quindi si incubano con **propidio ioduro** (intercalante del DNA).

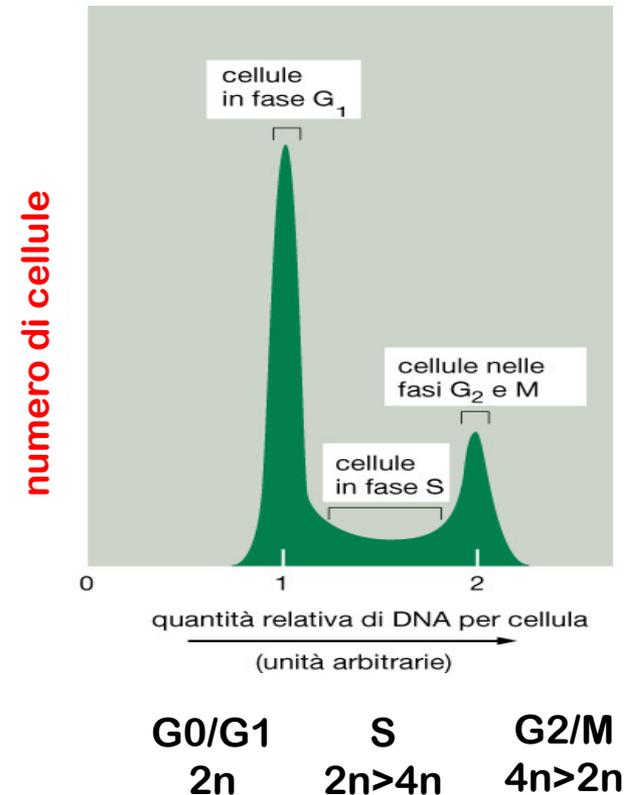
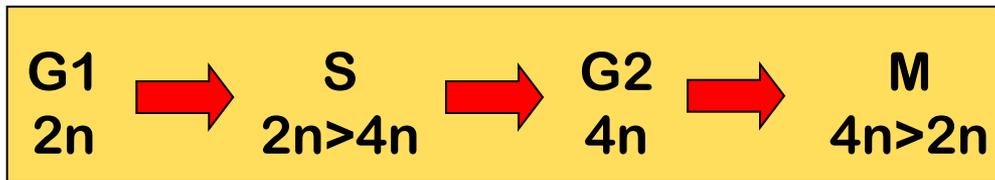
La quantità di fluorescenza emessa da una singola cellula è direttamente proporzionale al suo contenuto di DNA.



ANALISI del CICLO CELLULARE al CITOFLUORIMETRO: ANALISI del CONTENUTO DI DNA CELLULARE

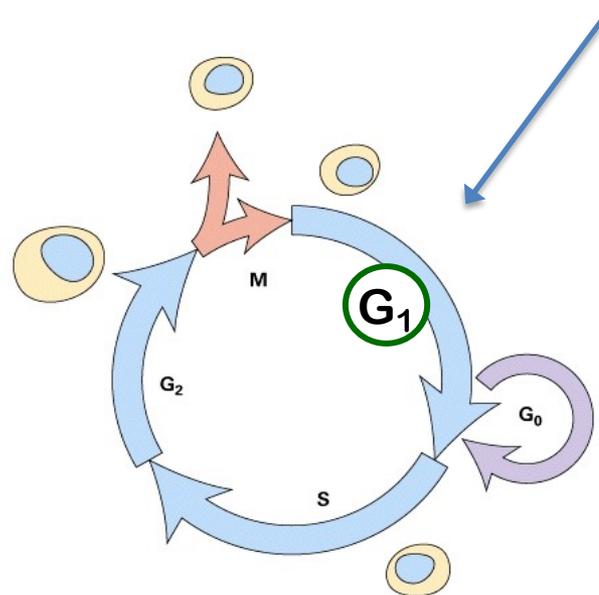
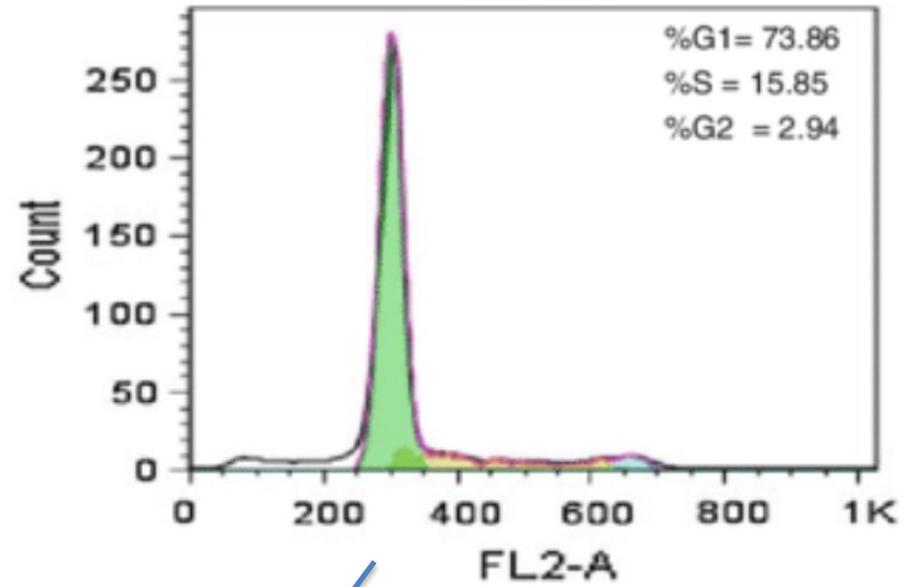
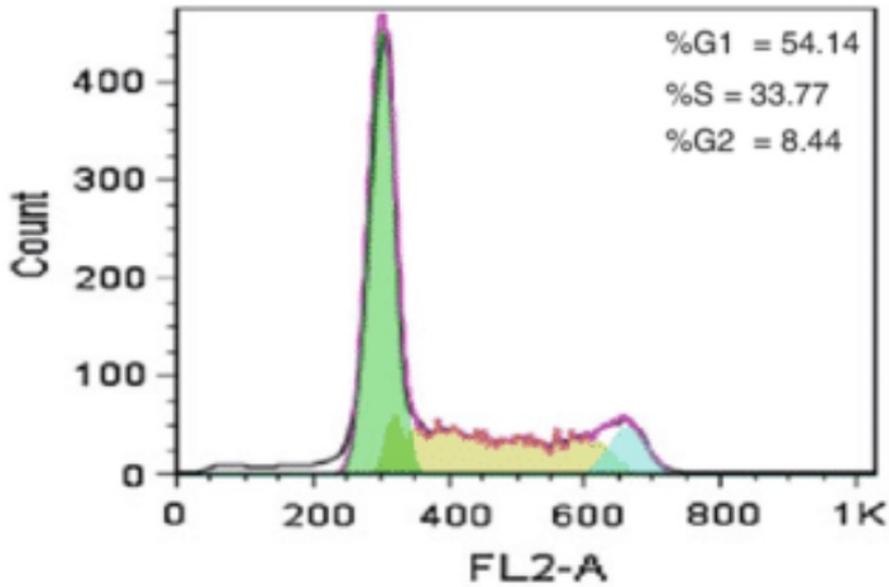
Le cellule vengono tripsinizzate, risospese, permeabilizzate e poi incubate con **PROPIDIO IODURO** per colorare il DNA (**fluorescenza rossa**):

in ciascuna cellula **l'intensità** di fluorescenza è proporzionale alla **quantità** di DNA



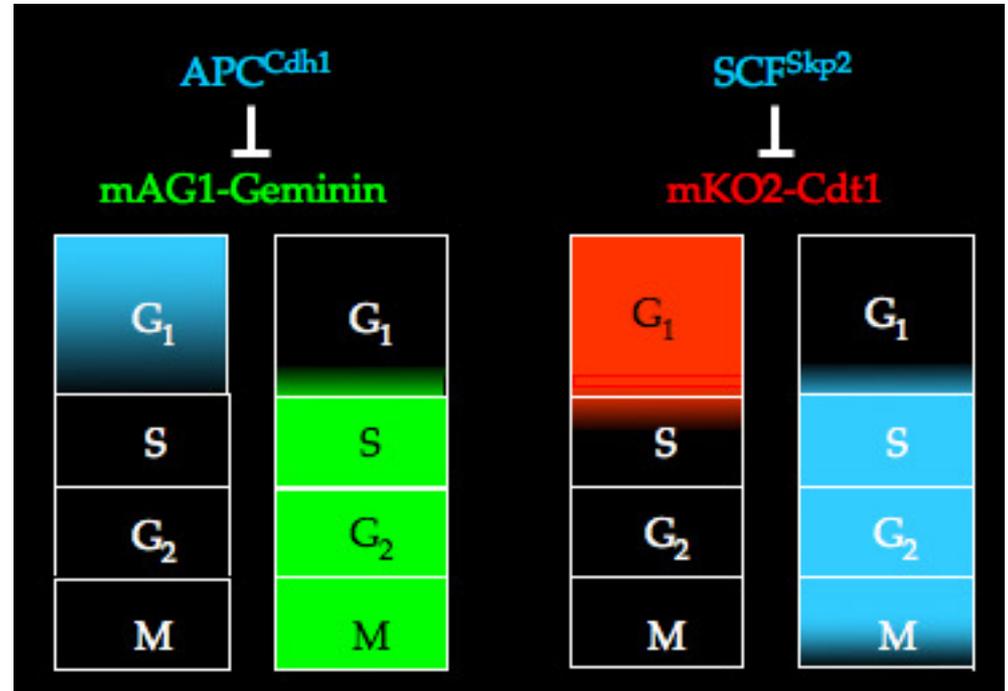
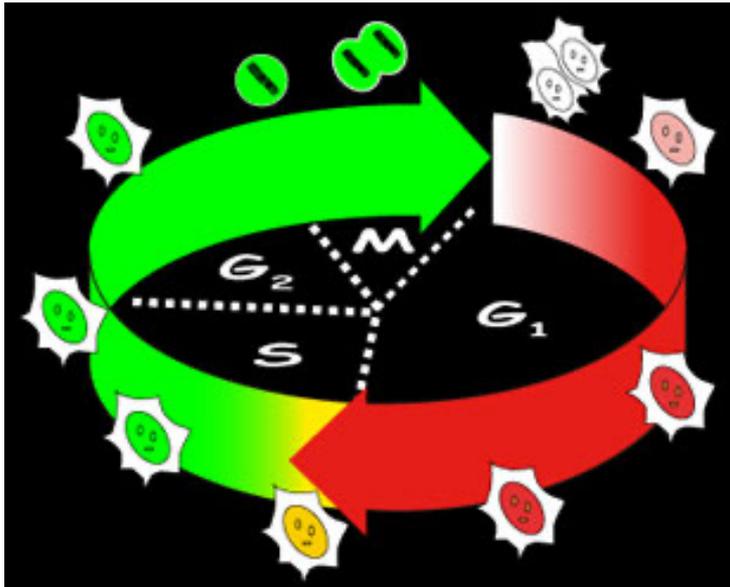
intensità di fluorescenza

Es. ARRESTO PROLIFERATIVO DI CELLULE IN CULTURA

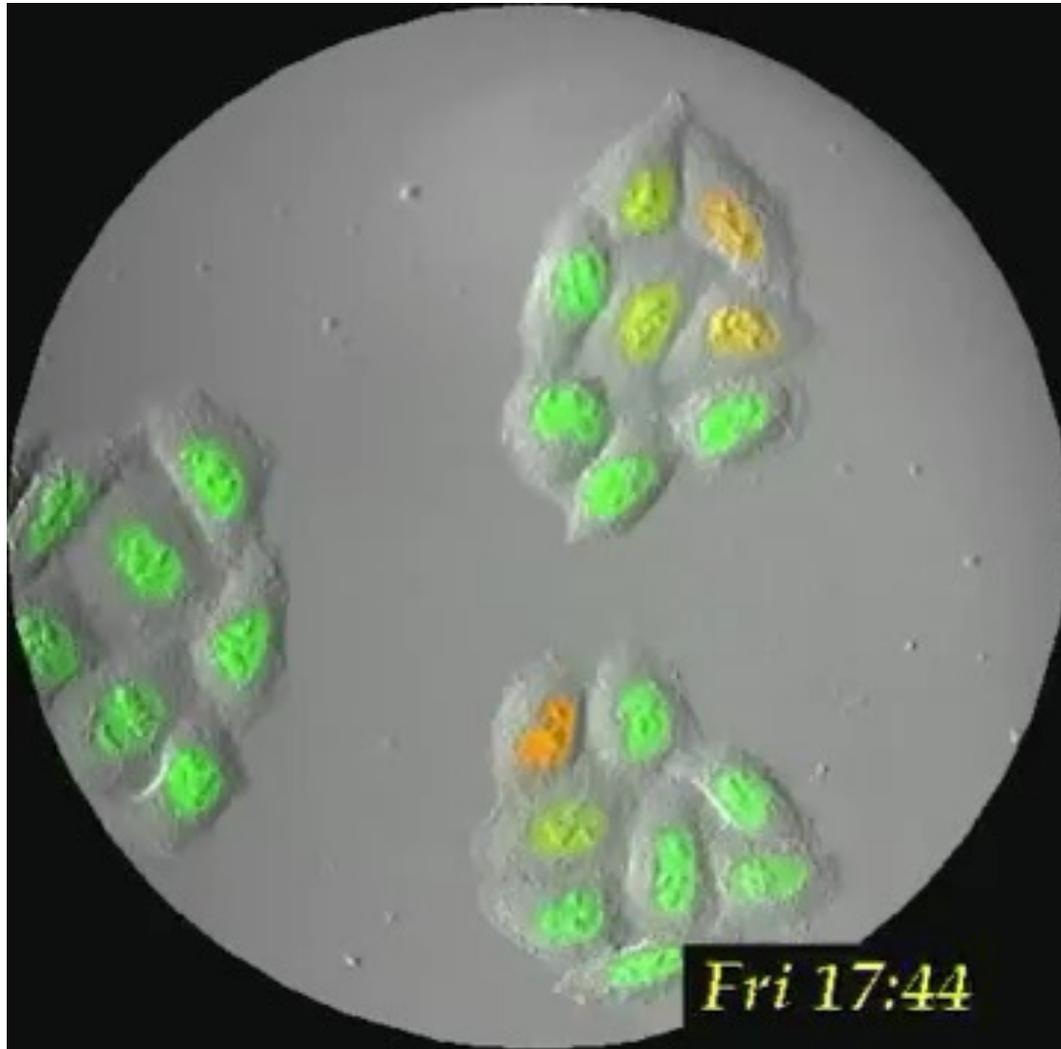


Analisi REALTIME del ciclo cellulare – Sistema FUCCI

FUCCI: Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator



Cdt1: DNA replication licensing factor
Geminin: inhibitor of Cdt1



Fri 17:44