

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

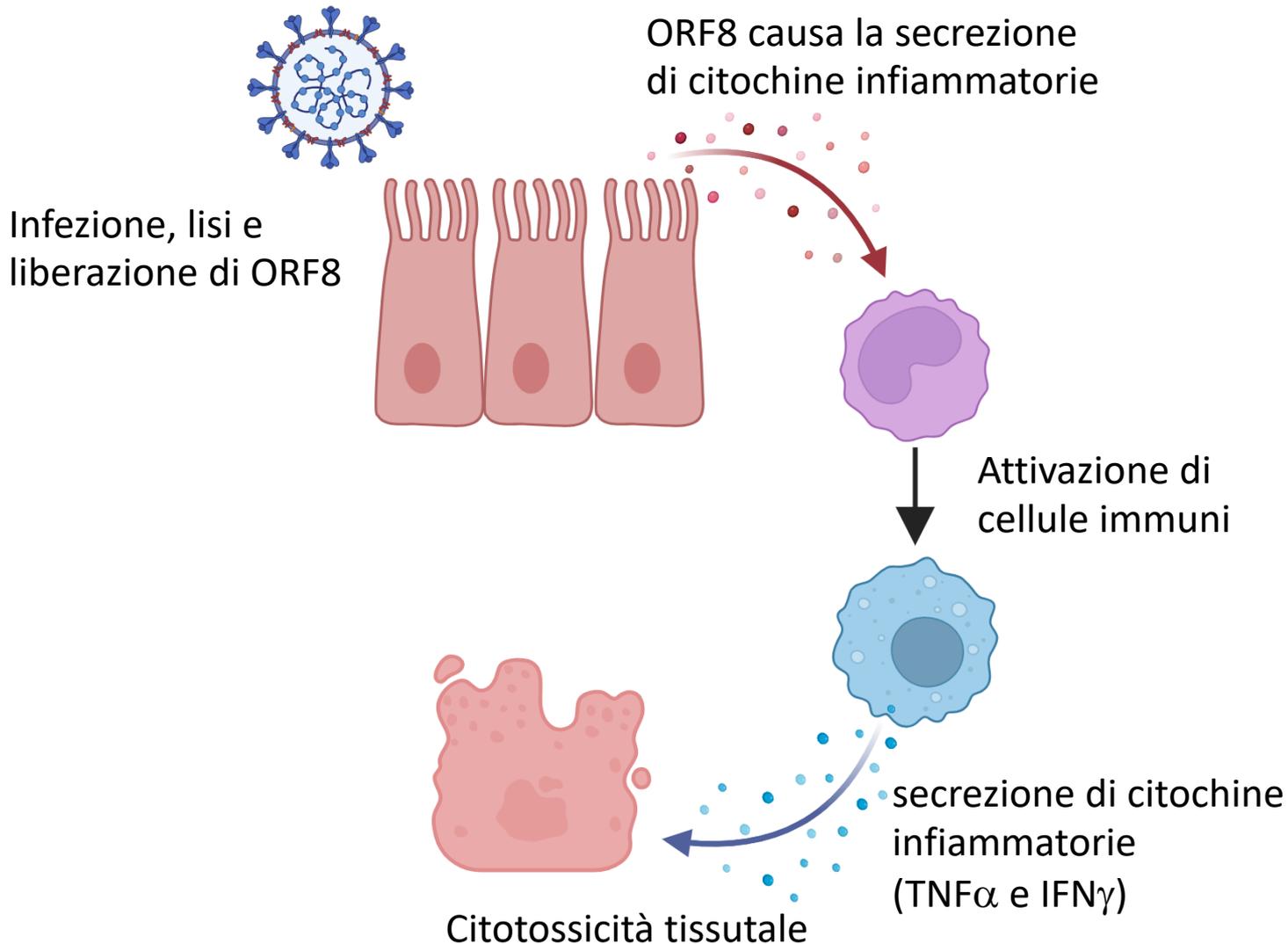
AA 2024-2025

Corso di Biotecnologie Cellulari

Lezione 8

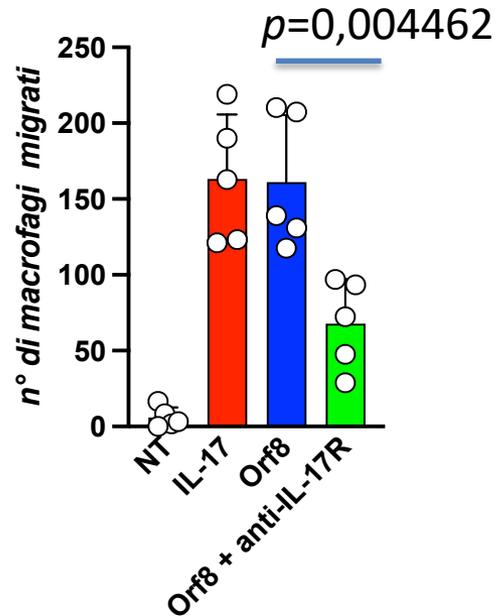
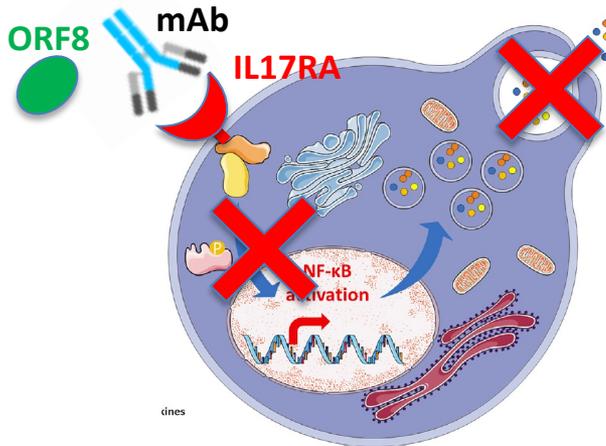
ESPERIMENTO #5:

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

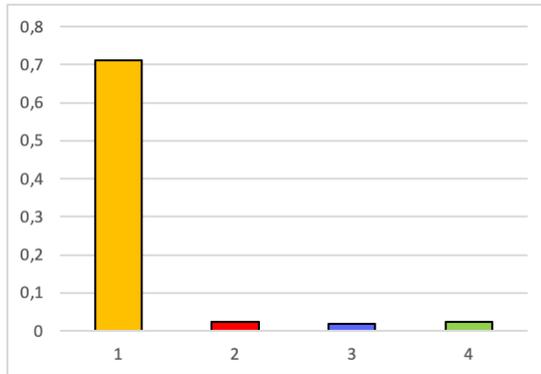


RISULTATI E DISCUSSIONE:

- 1) Il trattamento di cellule epiteliali H1299 con la proteina ORF8 causa la secrezione di molecole che attivano cellule immuni (monociti)
- 2) Tali eventi sono mediati – in parte - dall'interazione di ORF8 con il recettore IL-17RA

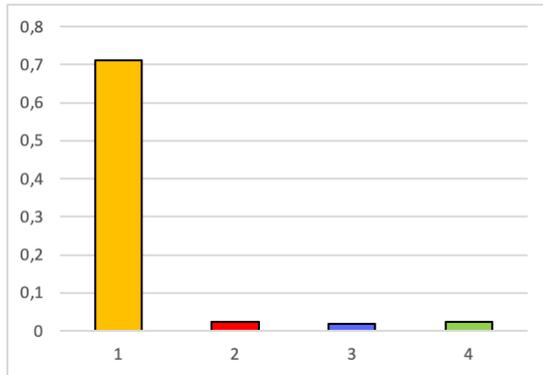


Esperimento Gruppo 1

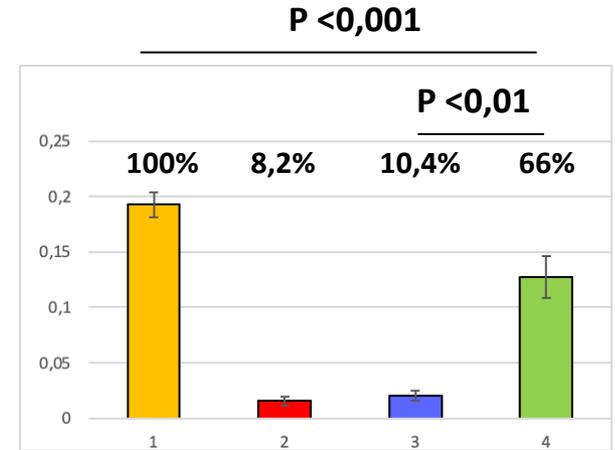
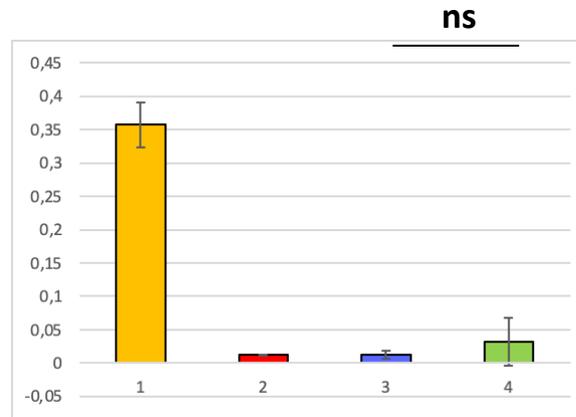


- 3) **Le cellule immuni attivate secernono mediatori citotossici che inducono la morte di cellule epiteliali**
- 4) **Interferire con il legame di ORF8 a IL17RA ...**

Esperimento Gruppo 1



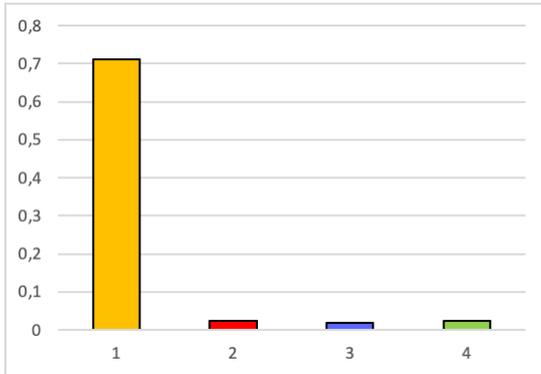
Esperimento Gruppo 2 (diluizione 1:5)



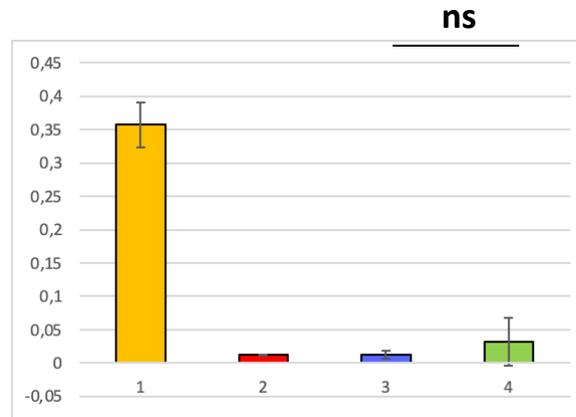
3) Le cellule immuni attivate secernono mediatori citotossici che inducono la morte di cellule epiteliali

4) Interferire con il legame di ORF8 a IL17RA ...

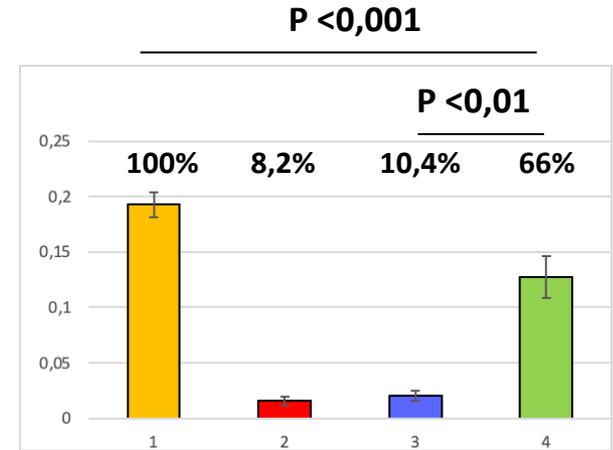
Esperimento Gruppo 1



Esperimento Gruppo 2 (diluizione 1:5)



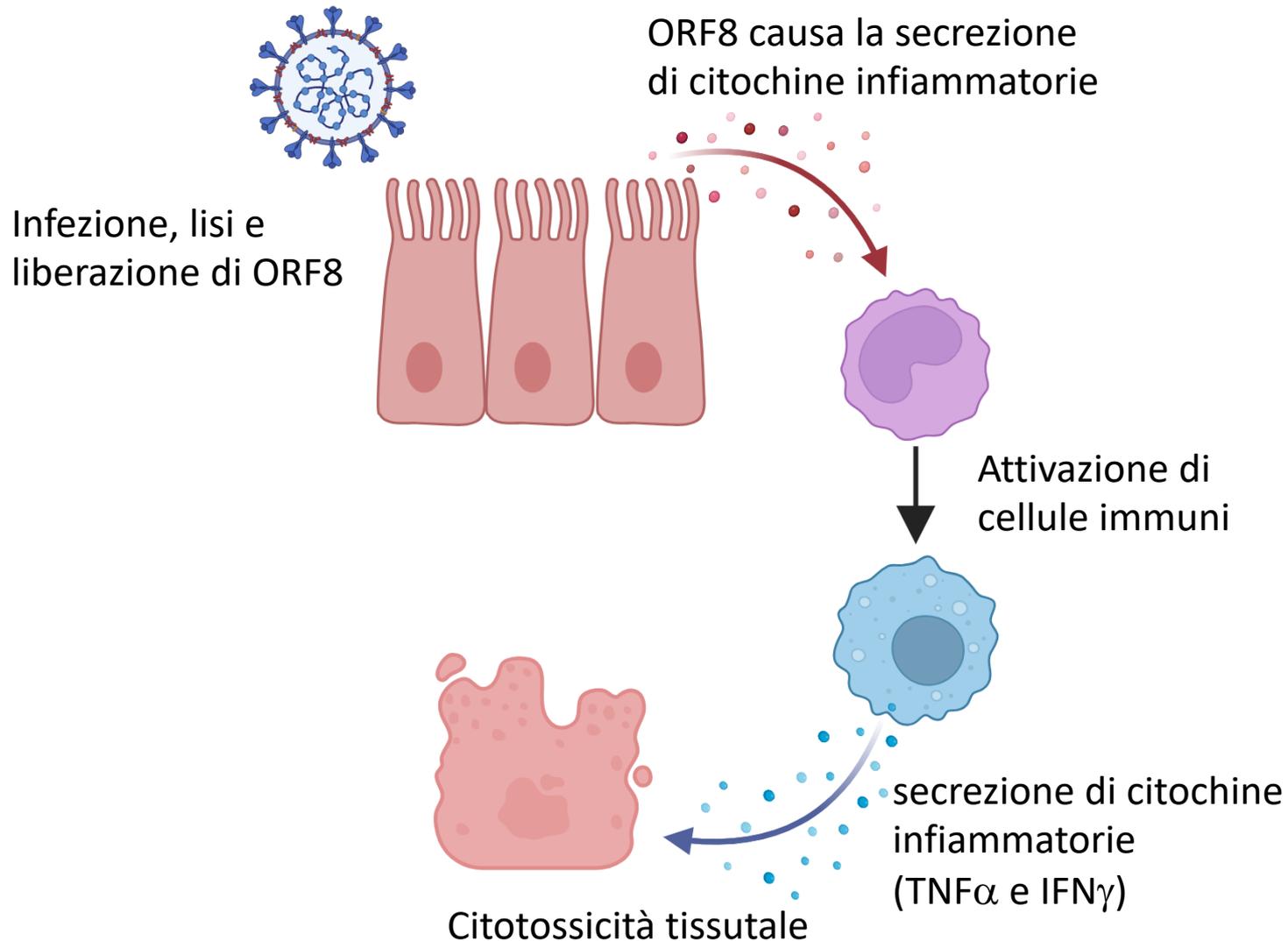
Esperimento Gruppo 2 (diluizione 1:10)



3) Le cellule immuni attivate secernono mediatori citotossici che inducono la morte di cellule epiteliali

4) Interferire con il legame di ORF8 a IL17RA riduce significativamente gli effetti citotossici

L'attivazione dell'asse IL-17RA/ NF κ B/ citochine nelle cellule epiteliali innesca CRS (infiammazione persistente) e danno ai tessuti



IN CONCLUSIONE:

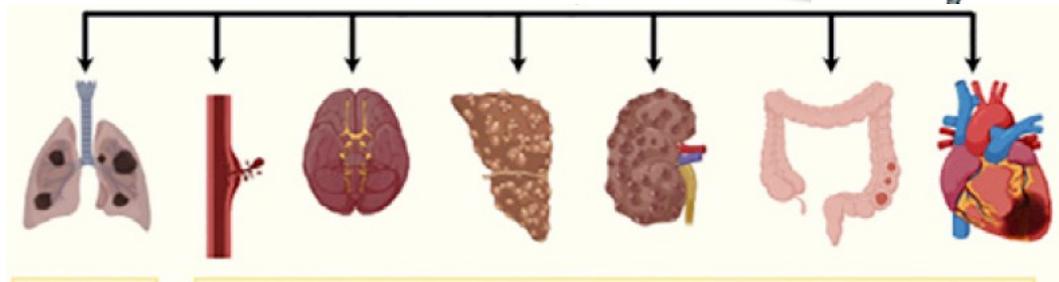
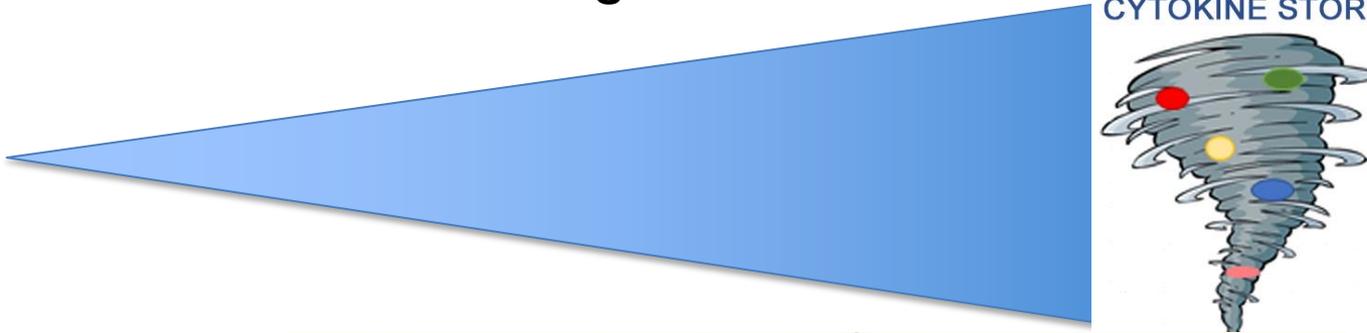
Abbiamo identificato un meccanismo di tossicità tissutale innescata dall'infezione da SARS-COV2 e che coinvolge l'attivazione inappropriata di cellule infiammatorie;

Tale meccanismo potrebbe causare sia gli **effetti acuti gravi** della Covid (multi-organ failure) che la sintomatologia cronica nota come "**long Covid**" (es. sindrome cognitiva);

Tale meccanismo potrebbe spiegare la variabilità inter-paziente nella sintomatologia (ARDS, multi-organ failure, long covid);

CRS grades 1-4

CYTOKINE STORM



Systemic symptoms

Long COVID symptoms
fever, fatigue
pain
immunothrombosis, ischemia
neuroinflammation- brain fog...

Multi-organ failure
Shock, hypoxia
ARDS
Disseminated coagulation

iScience

 CellPress
OPEN ACCESS

Article

ORF8 contributes to cytokine storm during SARS-CoV-2 infection by activating IL-17 pathway

Cell

Article

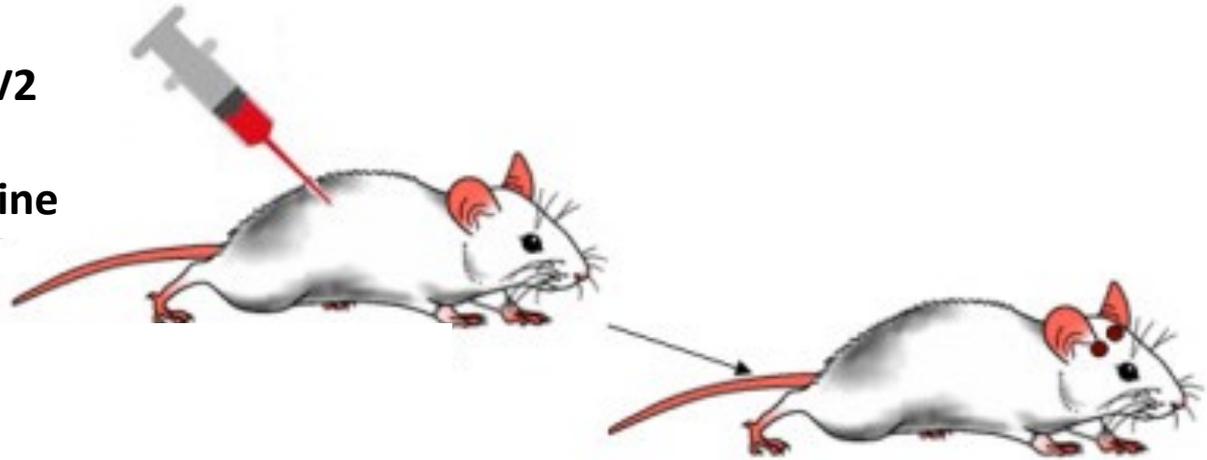
Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes

DOMANDE APERTE E SVILUPPI FUTURI:

- 1) **Verificare** se il meccanismo evidenziato possa causare effetti acuti gravi oppure “long Covid” **in modelli preclinici**
- 2) Investigare **possibili approcci terapeutici** basati sull’inibizione della cytokine storm

Utilizzo di MODELLI animali per studiare i meccanismi patologici della LONG COVID

Infezione con SARS-COV2
Iniezione di ORF8
Trattamento con citochine

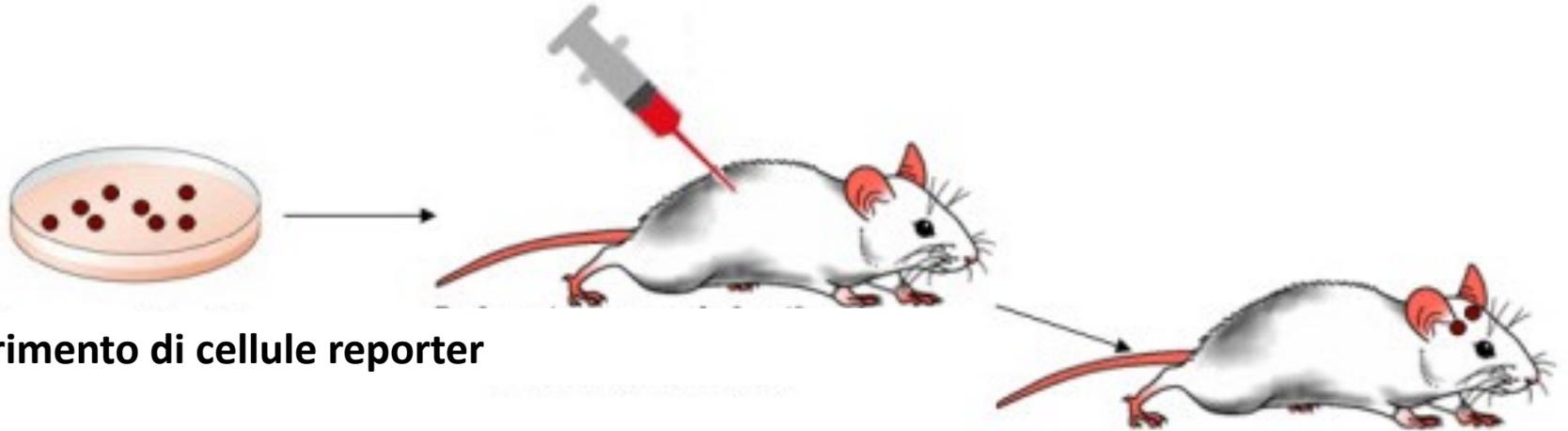


Valutazione dei sintomi:

- analisi tissutali (diversi organi)
- analisi delle funzioni motorie/cognitive

Domanda: cellule immuni attivate da ORF8 (o con TC) al polmone migrano in tessuti diversi causando tossicità tissutale?

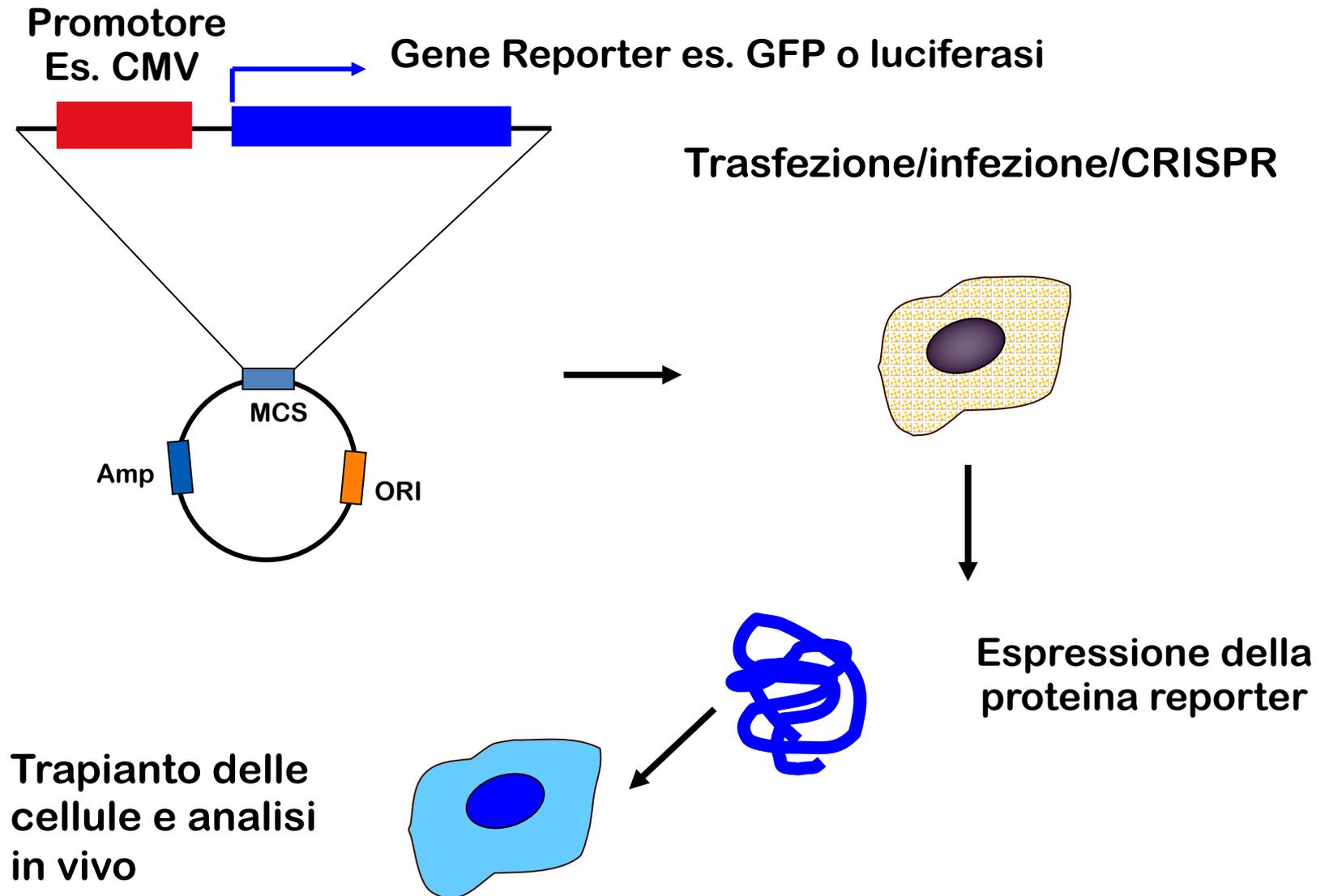
**Approccio sperimentale:
generazione di linee cellulari reporter per trasferimento (trapianto) in vivo**



Trasferimento di cellule reporter

Analisi mediante imaging in vivo

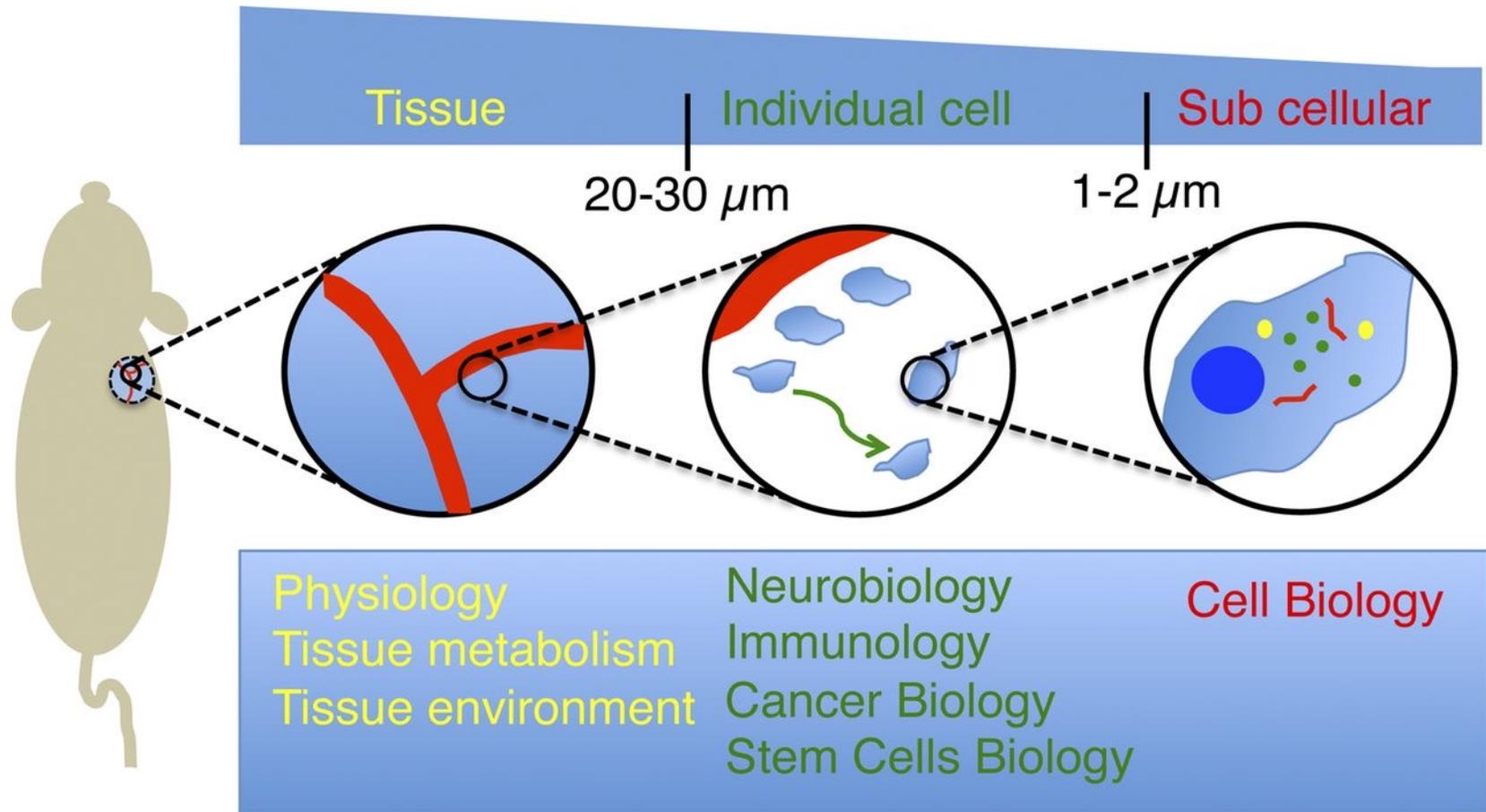
Generazione di linee cellulari reporter per analisi in vitro/in vivo



Analisi mediante IMAGING IN VIVO

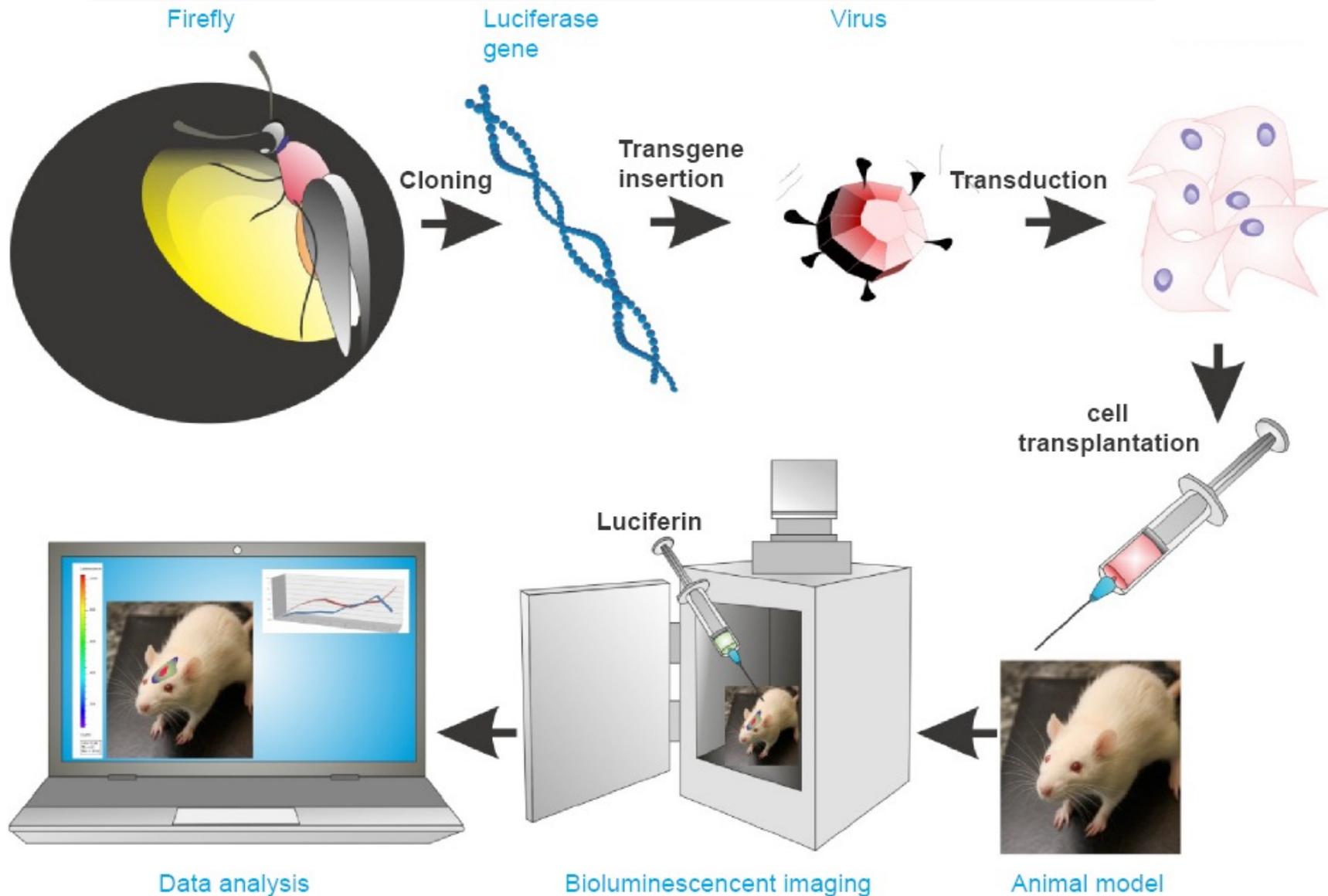
- ✓ **Imaging di fluorescenza mediante reporter fluorescenti (es. GFP)**
- ✓ **imaging di bioluminescenza (BMI) mediante reporter LUCIFERASI**

Imaging in vivo mediante microscopia a fluorescenza intravitale



Roberto Weigert et al. J Cell Biol 2013;201:969-979

Imaging di bioluminescenza (BMI)



Iniezione del substrato, inserimento in dark box e misurazione della luce emessa mediante BMI (CCD camera)

DOMANDE APERTE E SVILUPPI FUTURI:

- 1) **Verificare se il meccanismo evidenziato possa causare effetti acuti gravi oppure “long Covid” in modelli preclinici**

- 2) **Investigare possibili approcci terapeutici basati sull’inibizione della cytokine storm**
 - **Approccio sperimentale:**
 - a) **studi in vitro per comprendere il meccanismo di induzione della cytokine storm**
 - b) **Identificazione di farmaci (es. Molecole FDA-approved) per inibire il meccanismo**

**Come rispondere a una domanda che pone un
problema sperimentale:**

Dato un problema sperimentale:

- 1) Formulare la **DOMANDA SCIENTIFICA** (o più di una)
- 2) Pianificare una **STRATEGIA SPERIMENTALE**
 - a) scegliere un sistema MODELLO
 - b) stabilire i PUNTI SPERIMENTALI
 - c) prevedere opportuni esperimenti di CONTROLLO
 - d) scegliere il SAGGIO più opportuno
 - e) scegliere lo STRUMENTO/METODICA di analisi
- 3) Discutere i **RISULTATI**, trarre **CONCLUSIONI**
e (eventualmente) formulare un'**IPOTESI**

ESEMPIO 1

Problema sperimentale:

**Analisi dell'effetto di un gene X sulla proliferazione
cellulare**

Problema sperimentale:

Analisi dell'effetto di un gene X sulla proliferazione cellulare

Domanda scientifica:

il gene X ha un effetto sulla proliferazione cellulare?

Domanda scientifica:

il gene X ha un effetto sulla proliferazione cellulare?

Strategia sperimentale

a) scegliere un sistema (cellulare) modello

b) stabilire I PUNTI SPERIMENTALI

STRATEGIA SPERIMENTALE

1. **Sistema cellulare modello scelto:**
2. **modulare l'espressione del gene X nel sistema scelto**

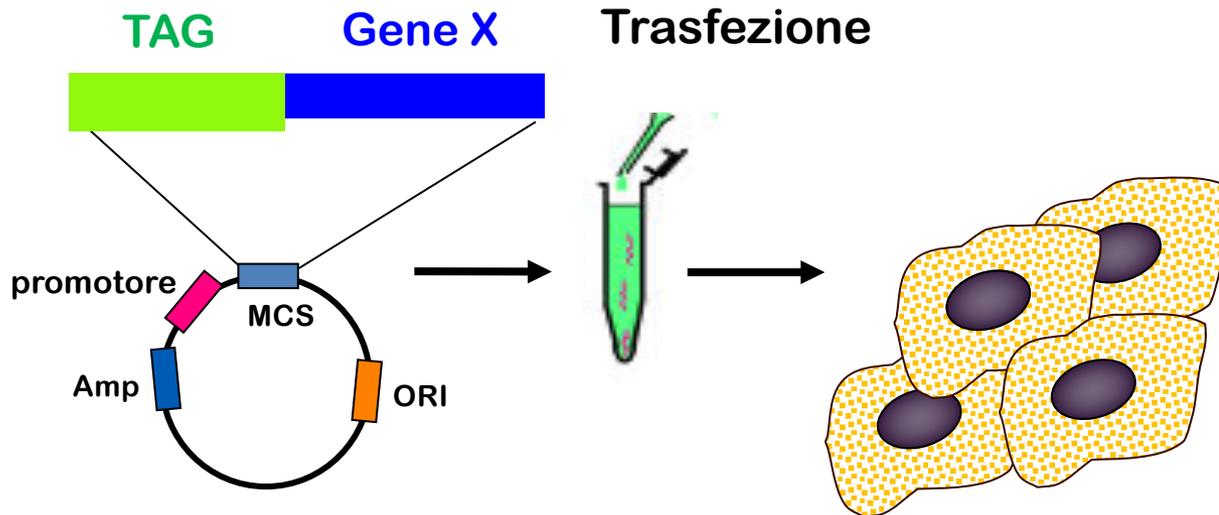
STRATEGIA SPERIMENTALE

1. Sistema cellulare modello scelto:
2. **modulare l'espressione del gene X nel sistema scelto**
 - es. SOVRA-ESPRIMERE il gene X nelle cellule scelte
 - oppure SILENZIARE “ “

STRATEGIA SPERIMENTALE

Step 1

Clonaggio del cDNA X in un vettore di espressione (evtl. in frame con un TAG)



Step 2

progettazione dell'esperimento (includendo gli opportuni controlli) e trasfezione delle cellule (transiente o stabile) con il vettore generato

STRATEGIA SPERIMENTALE

Strategia sperimentale

1. È necessario scegliere un sistema cellulare modello
2. È necessario modulare l'espressione di X – es SOVRA-ESPRIMERE nelle cellule scelte
3. È necessario predisporre un esperimento di CONTROLLO

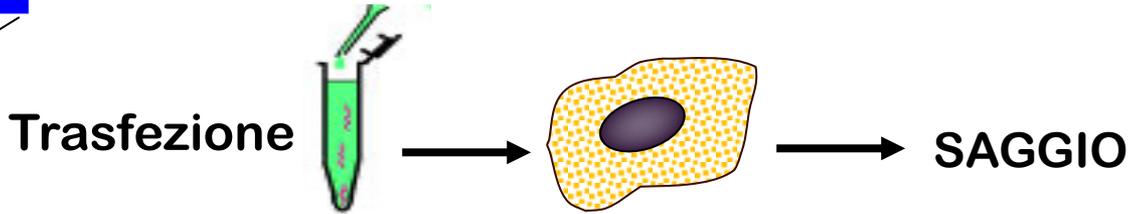
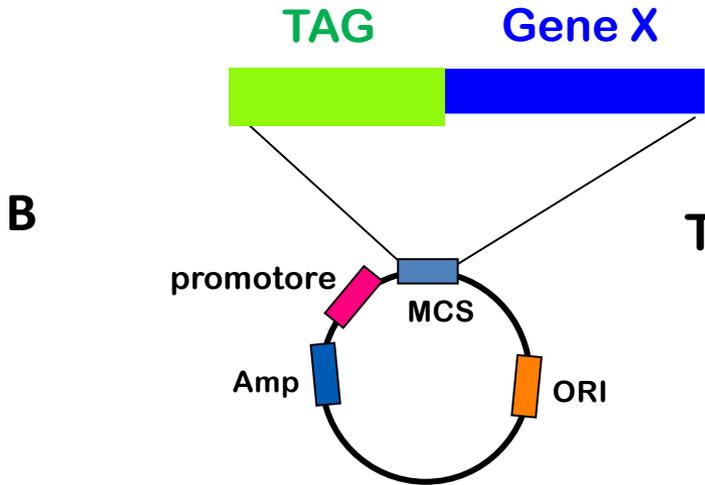
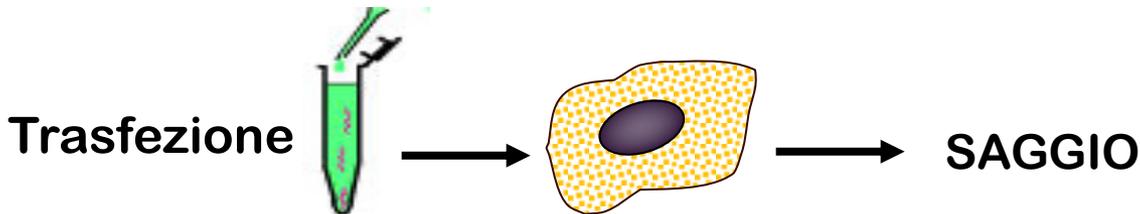
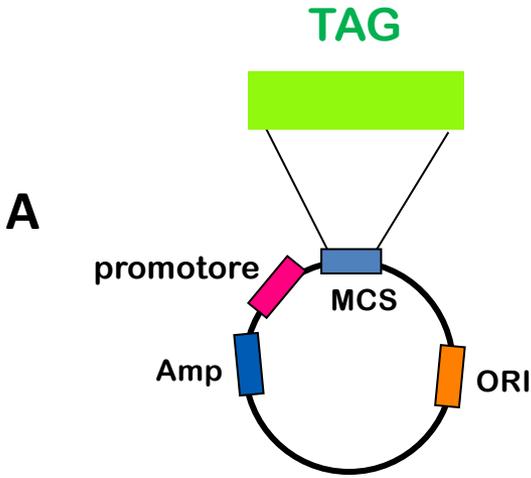
Progettazione dell'esperimento

A- CONTROLLO

vettore vuoto pcDNA3-TAG

B- SOVRAESPRESSIONE cDNA X

vettore pcDNA3-X-TAG

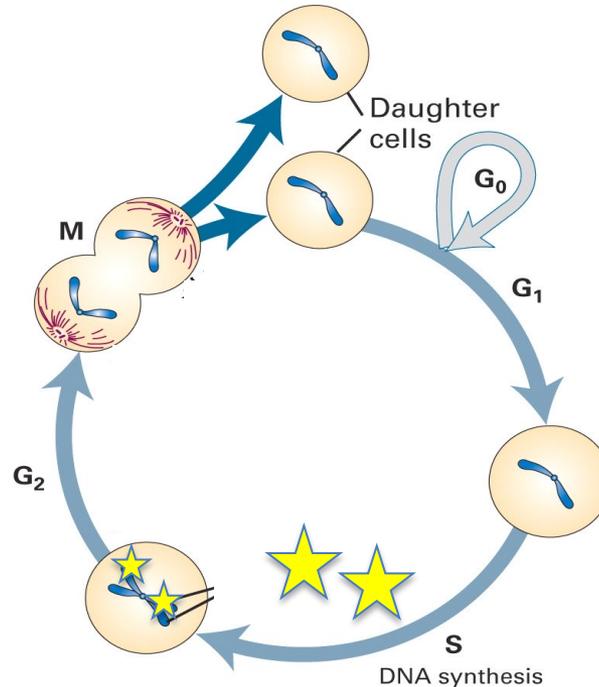


STRATEGIA SPERIMENTALE

1. È necessario scegliere un Sistema cellulare modello
2. È necessario modulare l'espressione di X – es SOVRA-ESPRIMERE nelle cellule scelte
3. È necessario predisporre un esperimento di CONTROLLO
4. **Analizzare la differenza tra le due popolazioni cellulari in termini di proliferazione mediante un opportuno SAGGIO**

STRATEGIA SPERIMENTALE

SAGGIO DI PROLIFERAZIONE: visualizzazione della neosintesi di DNA

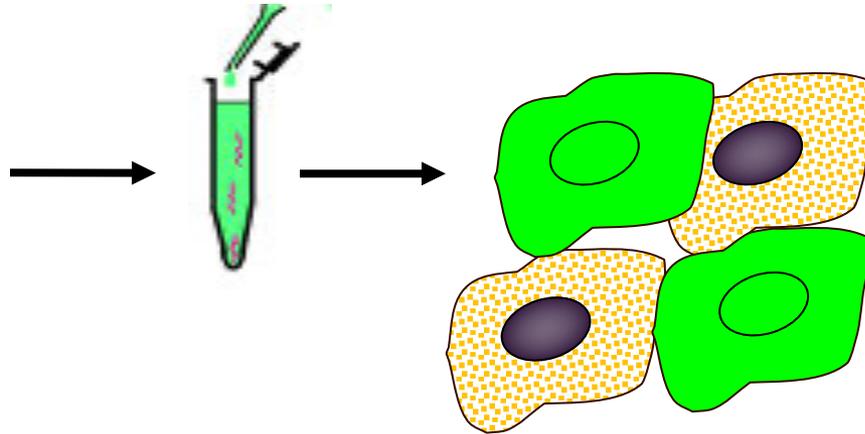


Le cellule in FASE S possono essere **MARCA**TATE aggiungendo al mezzo di coltura un **analogo della timidina**: es. **BrdU = 5-bromo desossiuridina**

Le cellule che hanno incorporato la BrdU (in fase S) possono essere poi **IDENTIFICATE** con un **anticorpo anti-BrdU**

STRATEGIA SPERIMENTALE

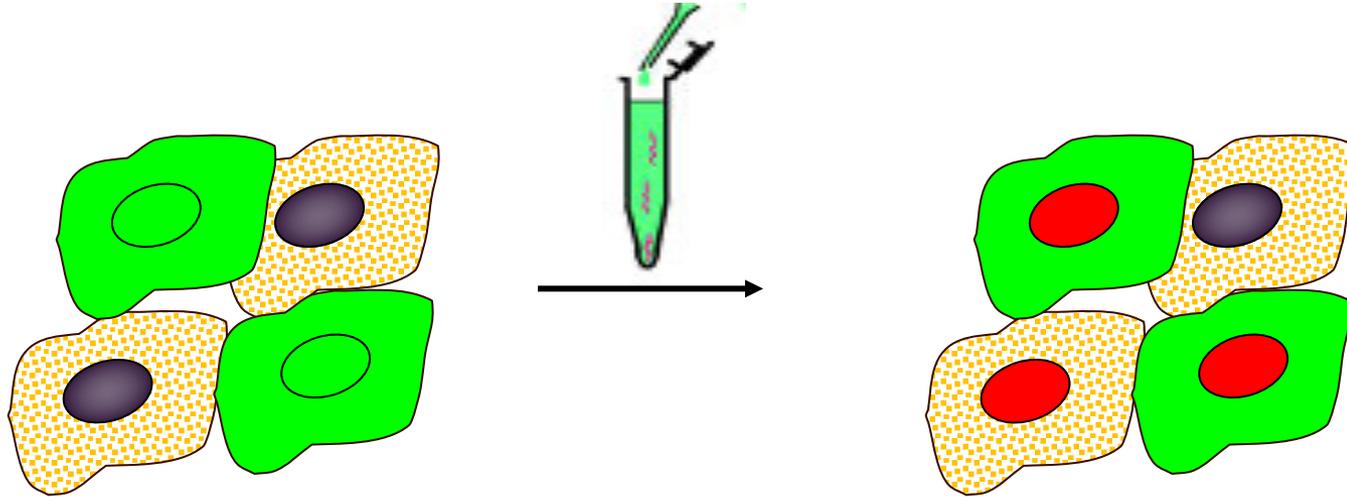
Trasfezione



Il TAG GFP permette di identificare (e quantificare facilmente il numero di) cellule trasfettate

Incubazione di tutte le cellule con BrdU

Riconoscimento
(ANTICORPO anti-BrdU)



% cellule
che sovra-esprimono X =
in FASE S:

$\frac{\text{n}^\circ \text{ cellule verdi positive a BrdU (nuclei rossi)}}{\text{n}^\circ \text{ cellule che esprimono X (cellule verdi)}} \times 100$

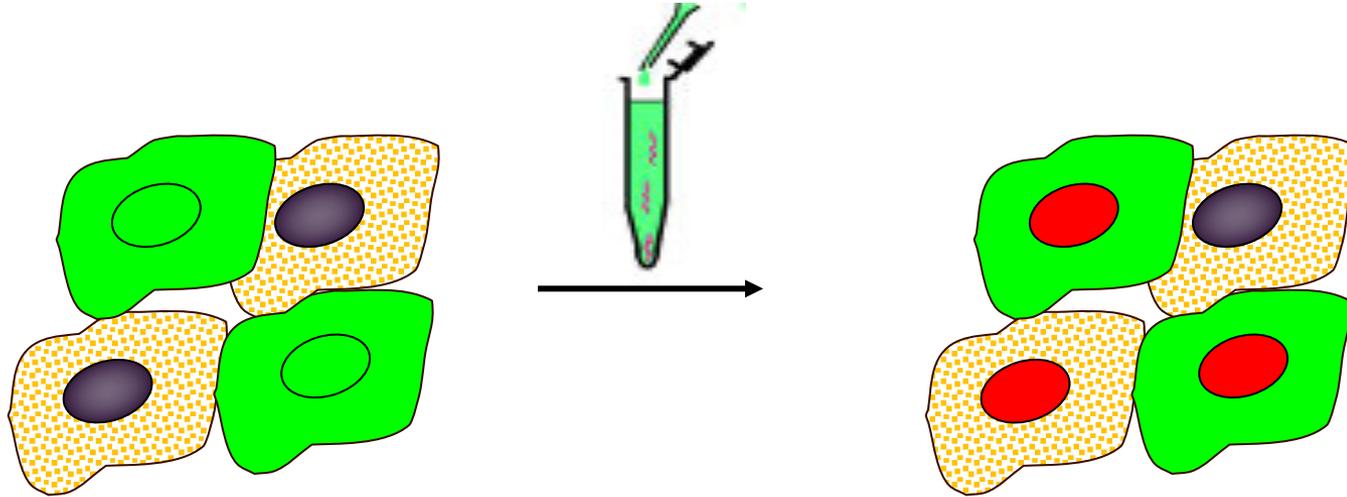
Confronto con le cellule di controllo (che NON sovra-esprimono X)

STRATEGIA SPERIMENTALE

1. È necessario scegliere un Sistema cellulare modello
2. È necessario modulare l'espressione di X – es SOVRA-ESPRIMERE nelle cellule scelte
3. È necessario DISTINGUERE le cellule trasfettate
4. È necessario predisporre un esperimento di CONTROLLO
5. Analizzare la differenza tra le due popolazioni cellulari in termini di proliferazione mediante un opportuno SAGGIO
6. scegliere lo STRUMENTO/METODICA di ANALISI

Incubazione di tutte le cellule con BrdU

Riconoscimento BrdU
(Immunofluorescenza anti-BrdU)



IDENTIFICAZIONE IN SITU MEDIANTE MICROSCOPIA A EPIFLUORESCENZA

OPPURE CONTA MEDIANTE FACS

Quali altri approcci avreste potuto scegliere?

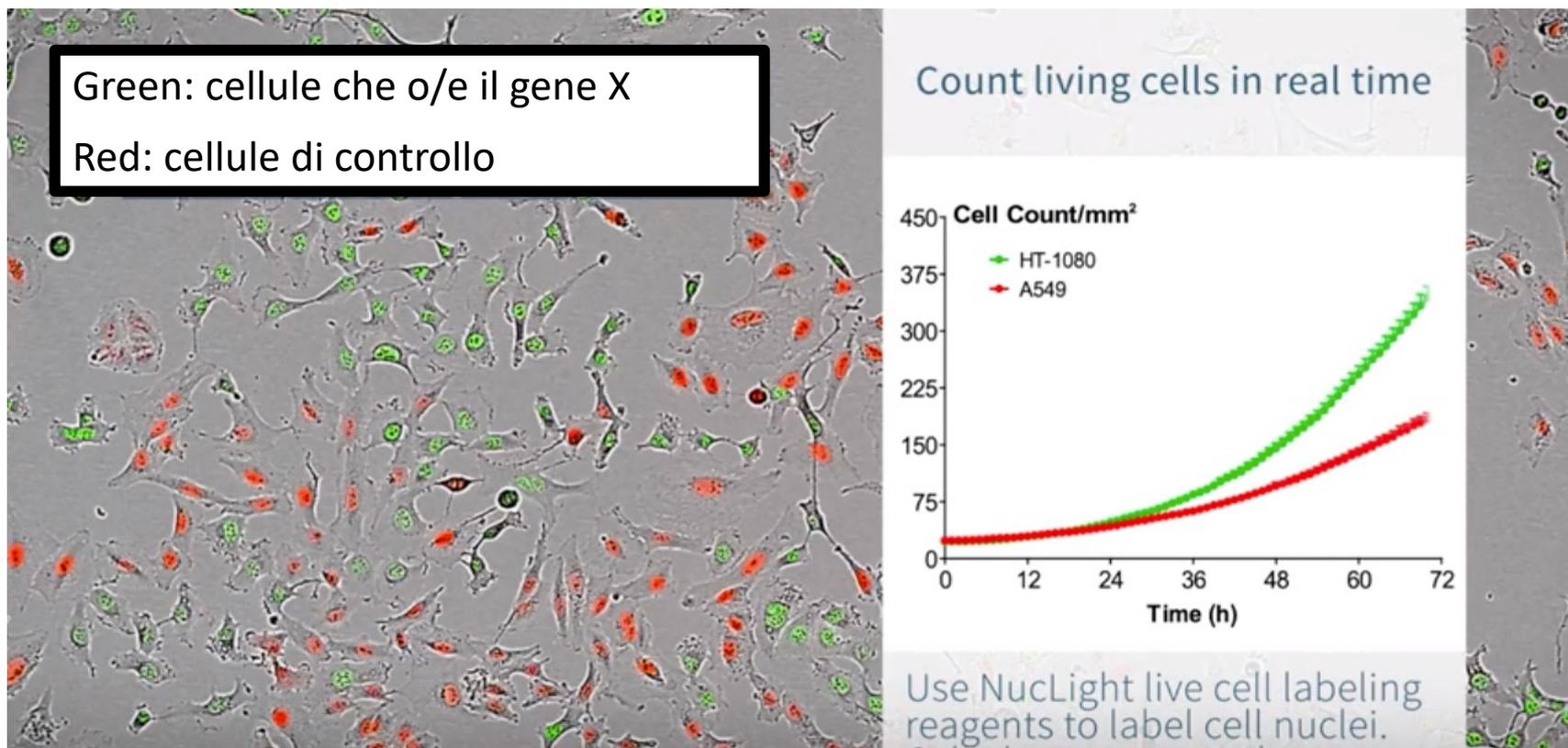
Analisi dell' effetto di un gene X sulla proliferazione cellulare

Strategia sperimentale #2

1. **Generare una linea cellulare che sovraesprime stabilmente il gene X (oppure nella quale il gene è inibito) e una linea di controllo**
2. **Analizzare la differenza tra le due popolazioni cellulari in termini di proliferazione mediante curve di crescita (metodo 3T3) oppure realtime oppure....**

Valutazione quantitativa di proliferazione mediante lettore realtime

Le 2 linee cellulari in esame sono colorate con 2 coloranti nucleari diversi e cresciute in cocoltura, quindi ne viene misurata la proliferazione in realtime (conta del numero di cellule nel tempo).



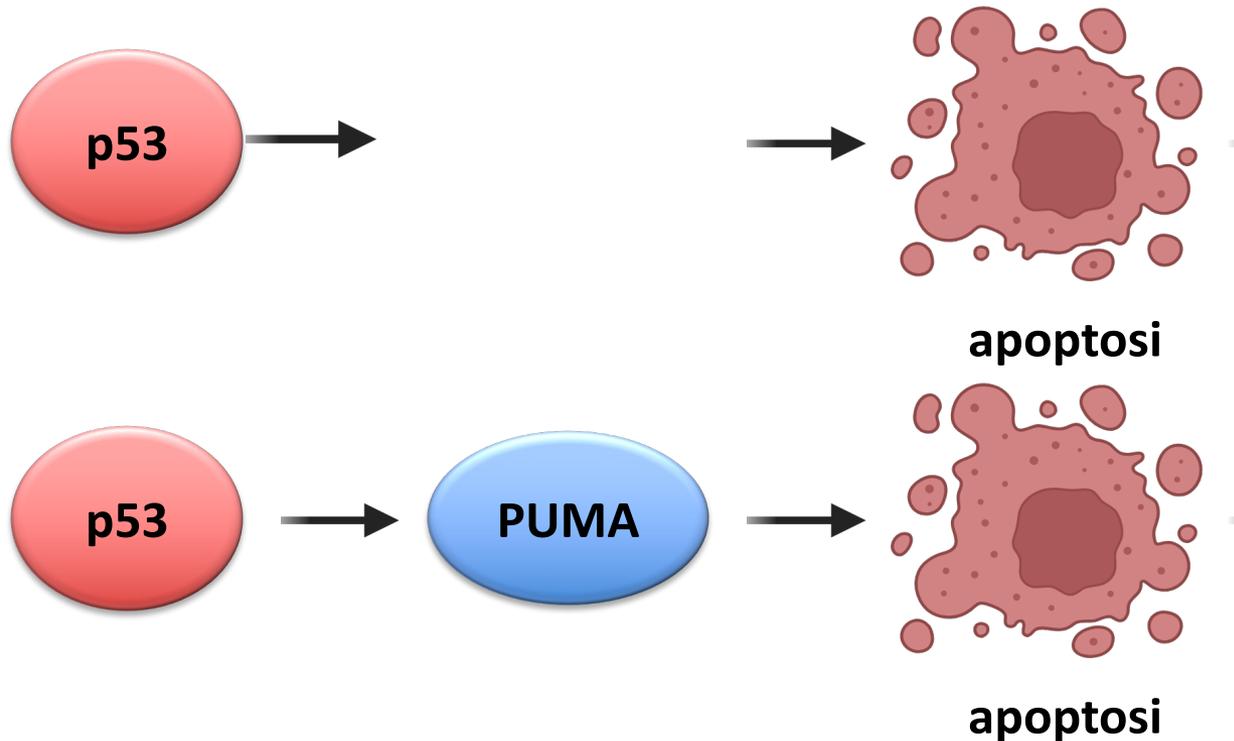
Problema sperimentale:

Analisi dell' effetto di un fattore di trascrizione sulla morte cellulare

**Problema sperimentale:
Stiamo studiando il fattore di trascrizione p53 e le
funzioni dei suoi geni bersaglio nel contesto della morte
cellulare**

Domanda scientifica:

Qual è il ruolo del gene PUMA nell'induzione di apoptosi da parte di p53?



STRATEGIA SPERIMENTALE

1. È necessario creare un sistema sperimentale in cui l'espressione/attività di p53 induce la morte cellulare
2. in tale sistema, verificare che p53 induca l'espressione del gene PUMA
3. In tale sistema ...

STRATEGIA SPERIMENTALE

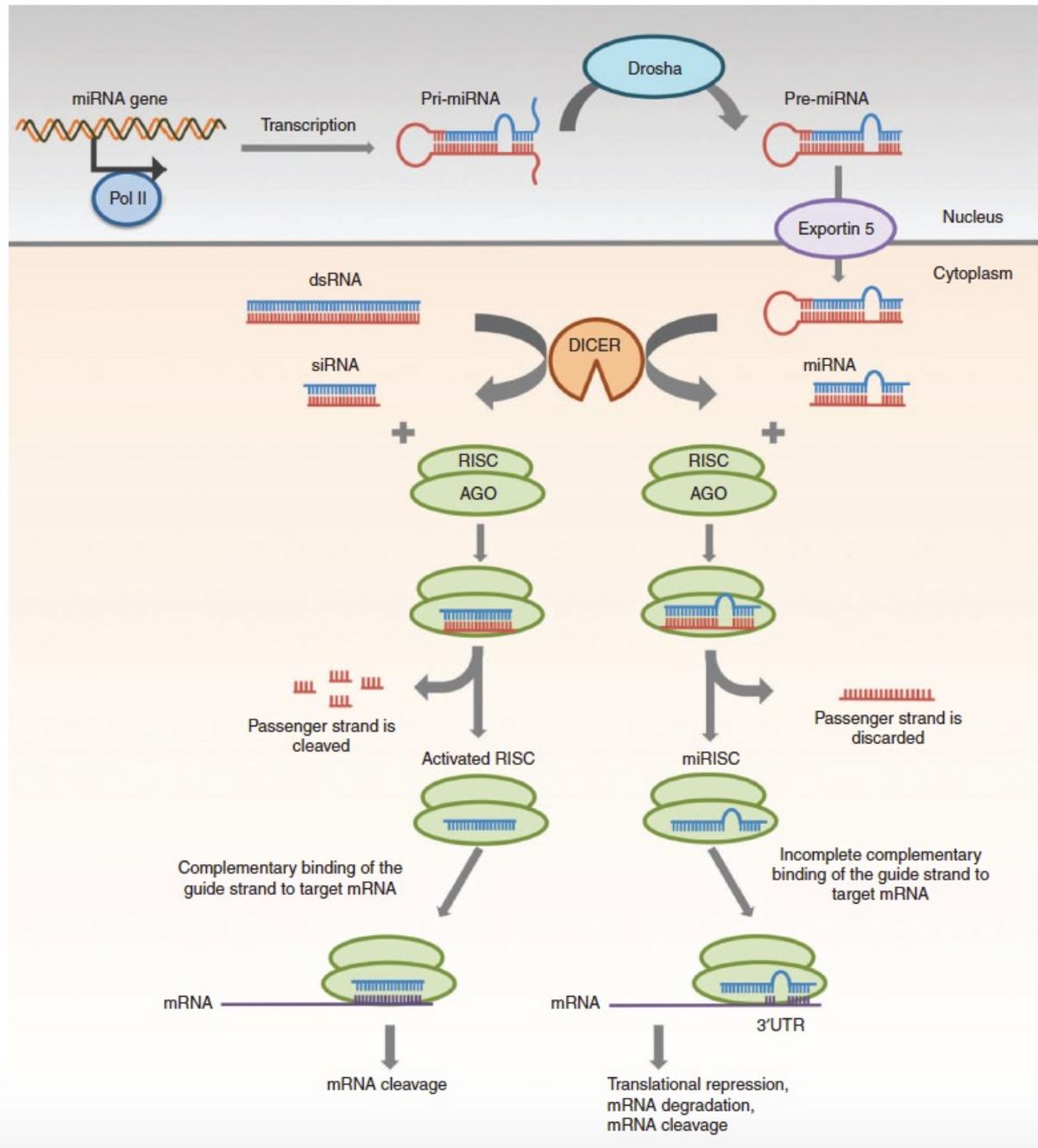
1. È necessario creare un sistema sperimentale in cui la morte cellulare è indotta dall'espressione/attività di p53 (in tale sistema, p53 induce l'espressione del gene PUMA)
2. In tale sistema possiamo **inibire l'espressione del gene bersaglio PUMA** (es. siRNA)
3. Predisporre gli opportuni **CONTROLLI**
4. Analizzare l'effetto in termini di induzione di apoptosi mediante un opportuno **SAGGIO**

Problema:
ridurre l'espressione di una proteina endogena

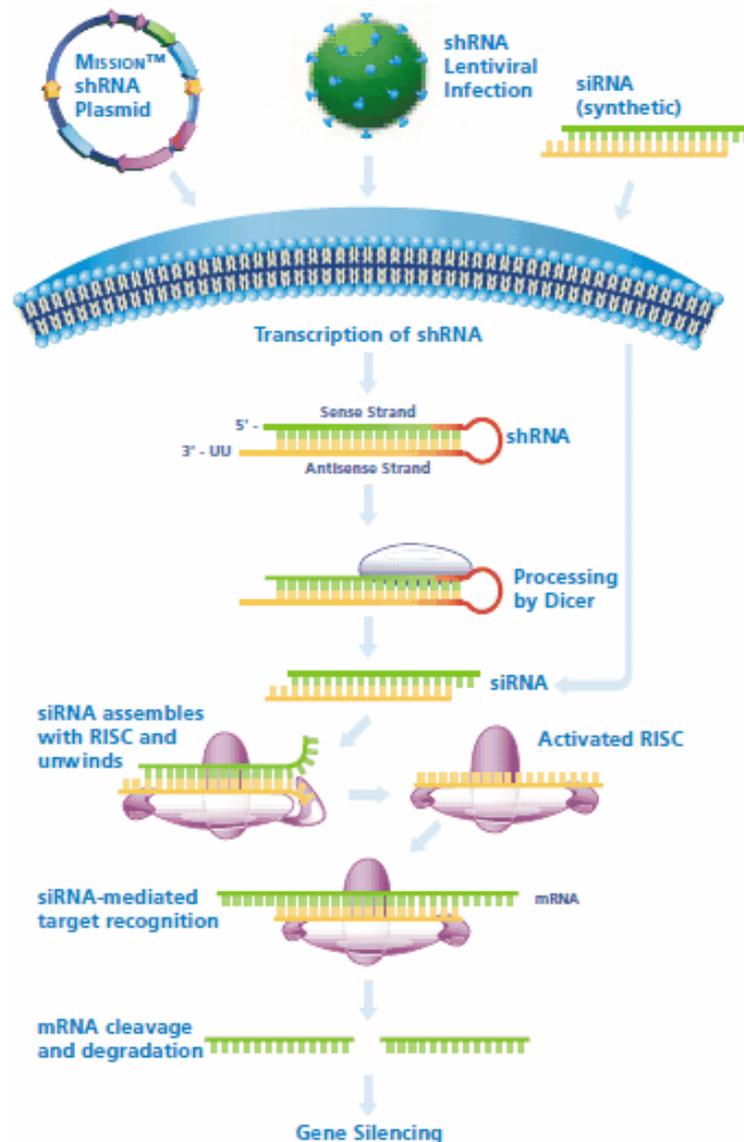
Soluzione 1:
RNA INTERFERENCE = indurre la degradazione di un mRNA in maniera sequenza-specifica

- **vettori di espressione per shRNA (short interfering RNA)**
- **siRNA (oligonucleotidi RNA ds)**

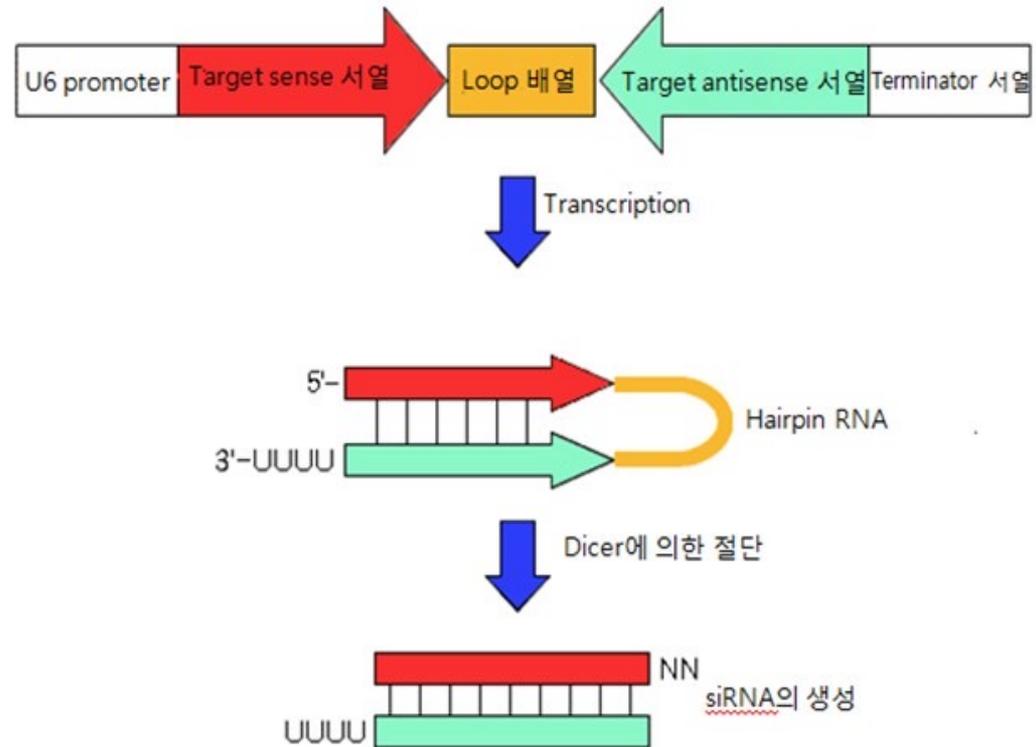
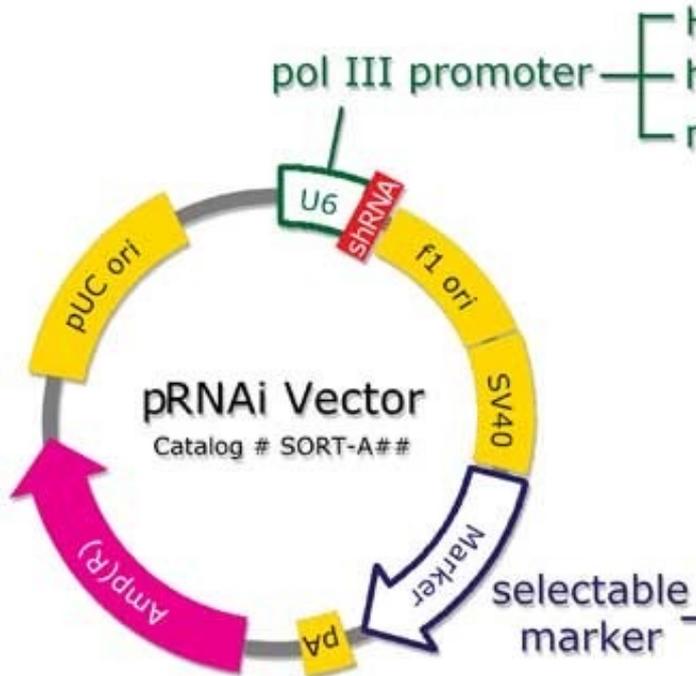
Soluzione 2: gene editing mediante CRISPR-Cas9



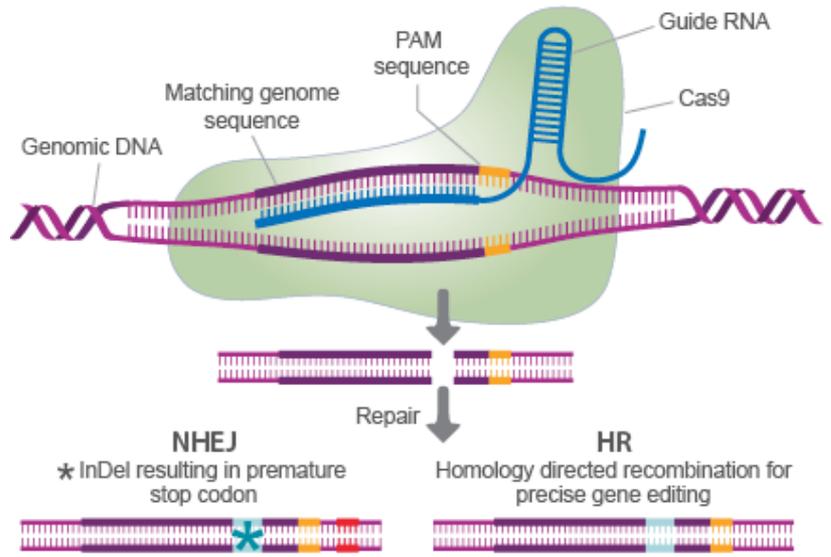
Approcci per il silenziamento genico mediante RNA interference



Vettori per espressione di shRNA



Gene KO mediante CRISPR-Cas9



Progettazione dell'esperimento

A- CONTROLLO

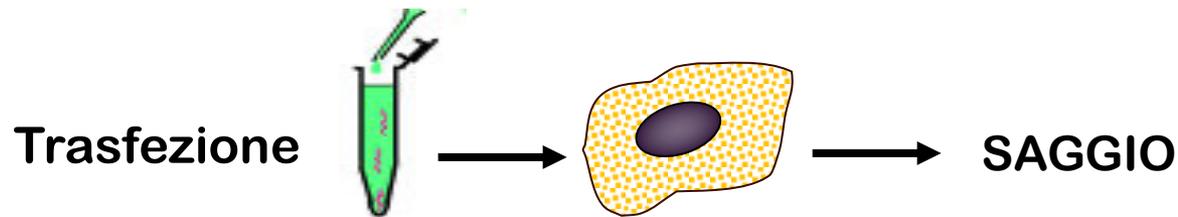
vettore vuoto pcDNA3-GFP

B- SOVRAESPRESSIONE cDNA p53

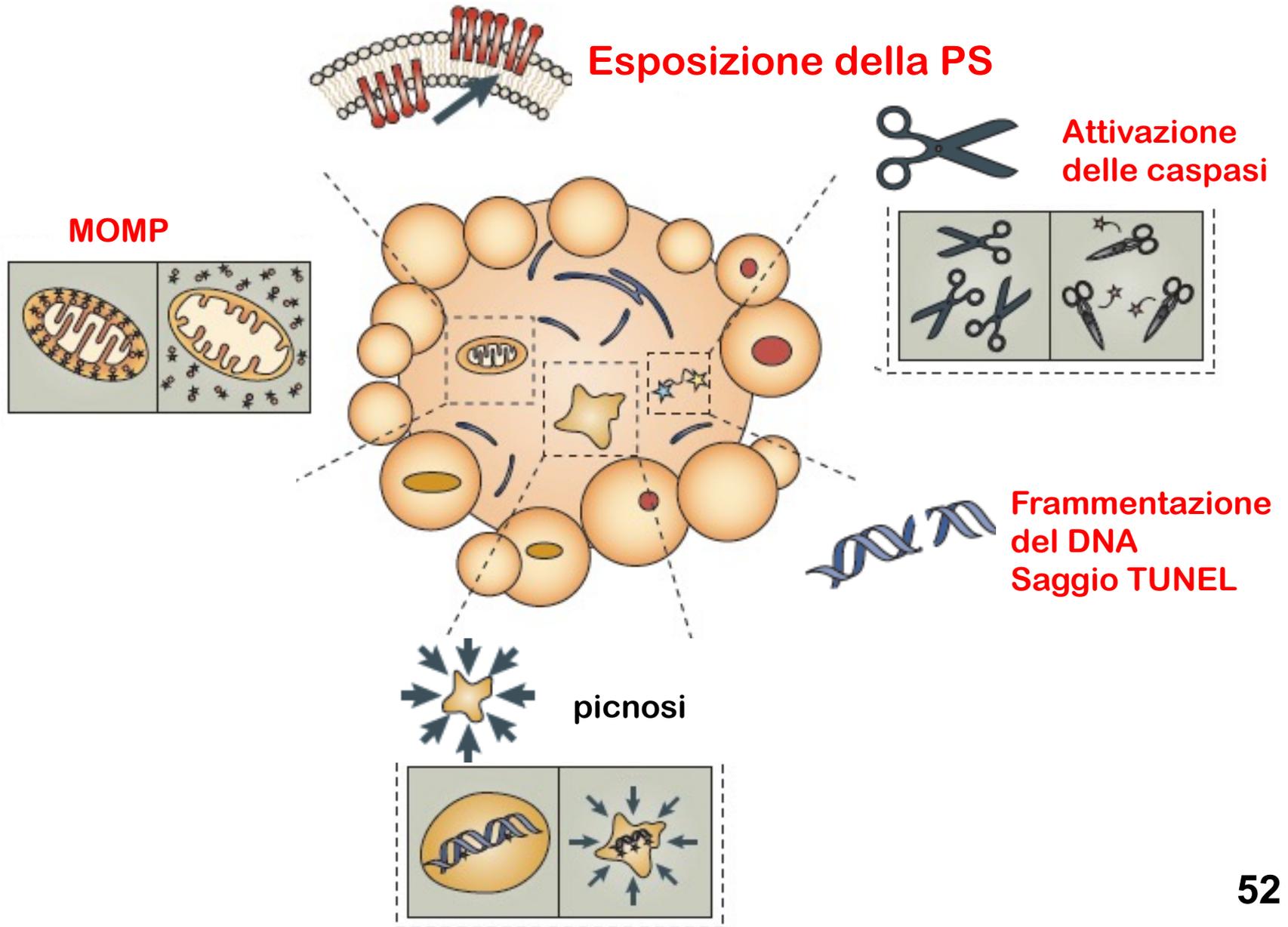
vettore pcDNA3-GFP- p53

C- SOVRAESPRESSIONE cDNA p53
+ inibizione di PUMA

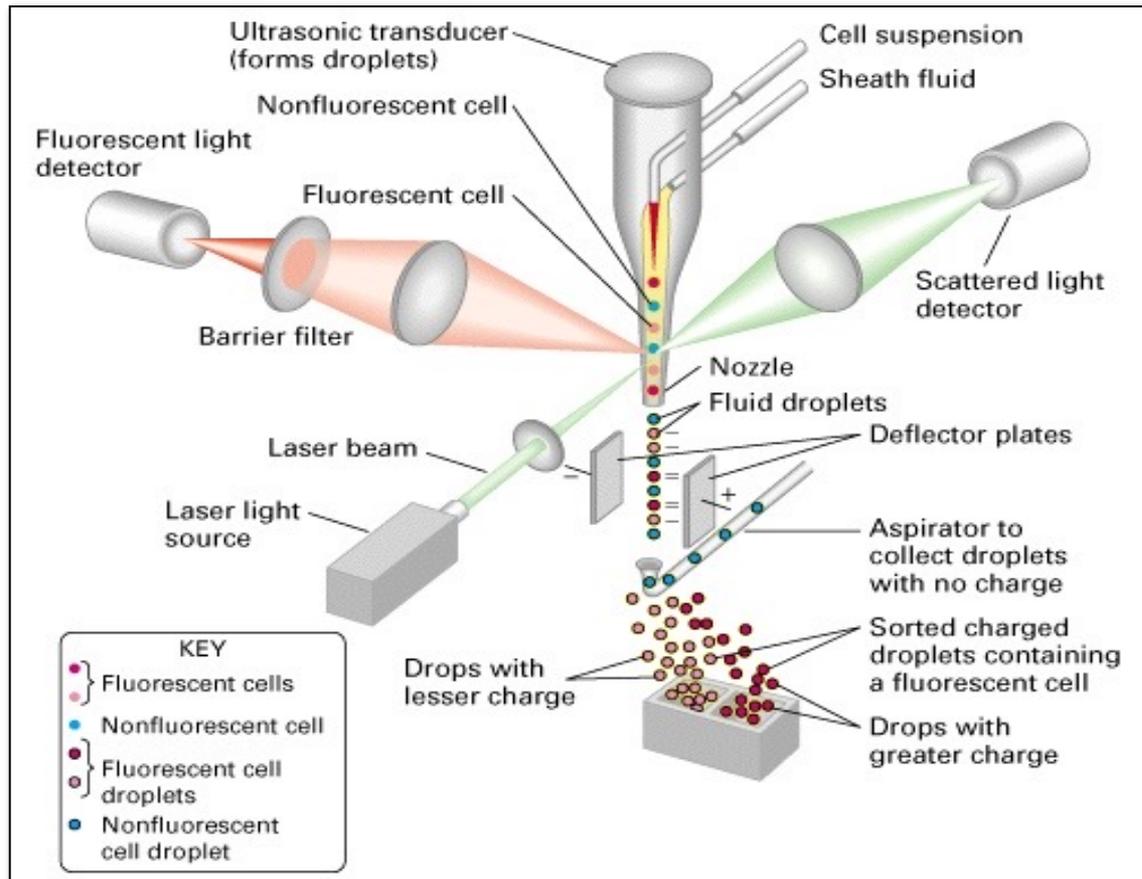
vettore pcDNA3-GFP- p53 + siRNA PUMA



SAGGI DI APOPTOSI IN CELLULE



Valutazione quantitativa di apoptosi mediante citofluorimetria

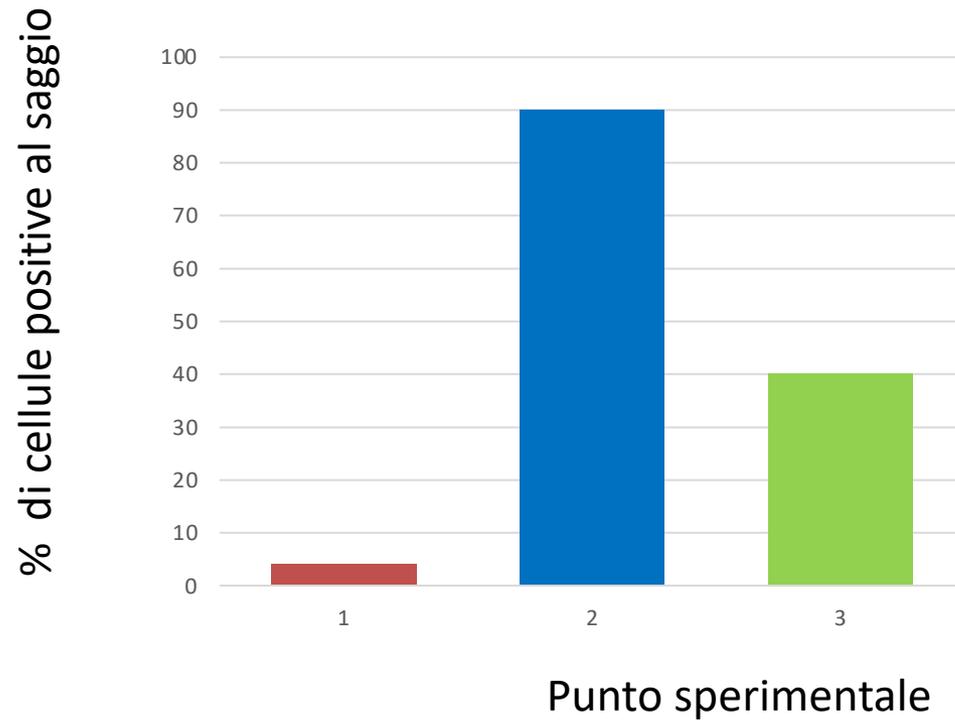


Sorting delle cellule trasfettate (GFP)

colorazione con :

Annexina V – RITC

Analisi dei risultati e conclusione



Quali altri approcci avreste potuto scegliere?

Problema sperimentale:

**IDENTIFICAZIONE DI FARMACI CHE INIBISCONO LA
MIGRAZIONE DI CELLULE TUMORALI**

STRATEGIA SPERIMENTALE:

**Volete effettuare uno screening in vitro di molecole bioattive
per identificare farmaci che inibiscono la migrazione di cellule tumorali.**

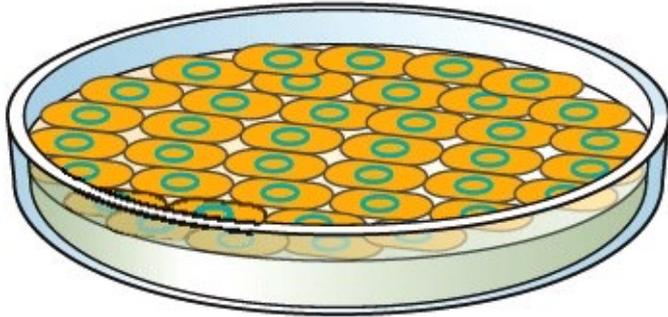
STRATEGIA SPERIMENTALE:

1. È necessario scegliere un opportuno sistema cellulare: es. Linea cellulare tumorale dotata di capacità di migrazione

STRATEGIA SPERIMENTALE:

1. È necessario scegliere un opportuno sistema cellulare: es. Linea cellulare tumorale dotata di capacità di migrazione
2. In tale sistema possiamo effettuare uno screening di una libreria di molecole bioattive

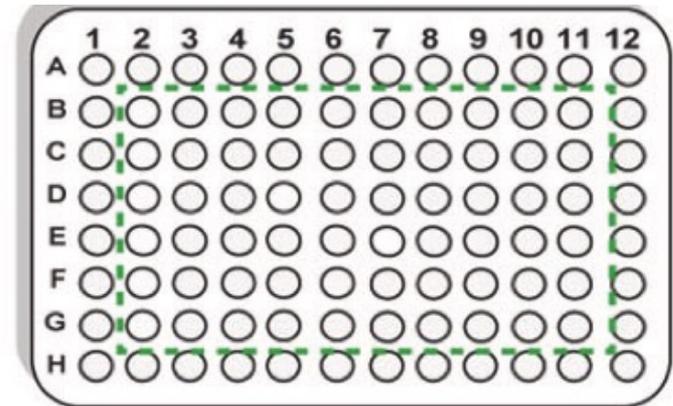
Screening funzionali per il riposizionamento di farmaci



Modello cellulare della patologia



Libreria di composti
FDA-approved



Saggio morfologico/funzionale
Es. saggio per cytokine storm

Screening funzionali per farmaci

Modello cellulare
della patologia

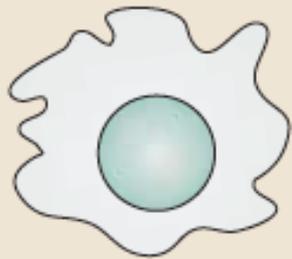
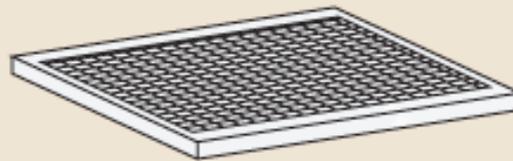
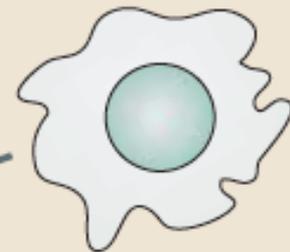
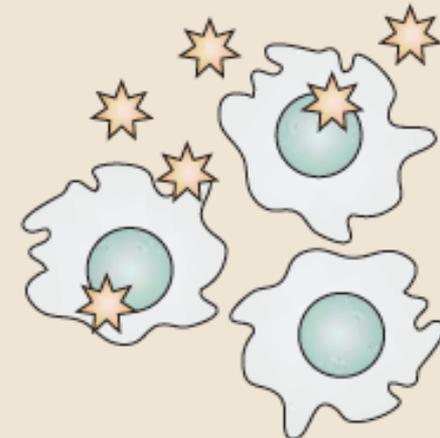
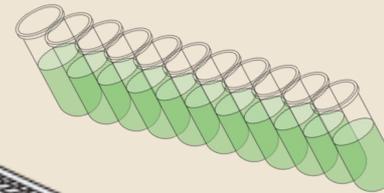


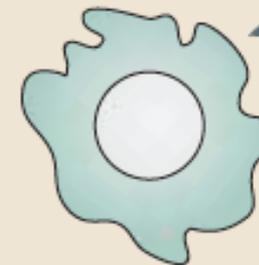
Plate cells onto
clear bottom
384-well plate



Libreria di molecole



Cambiamento
fenotipico



or hits



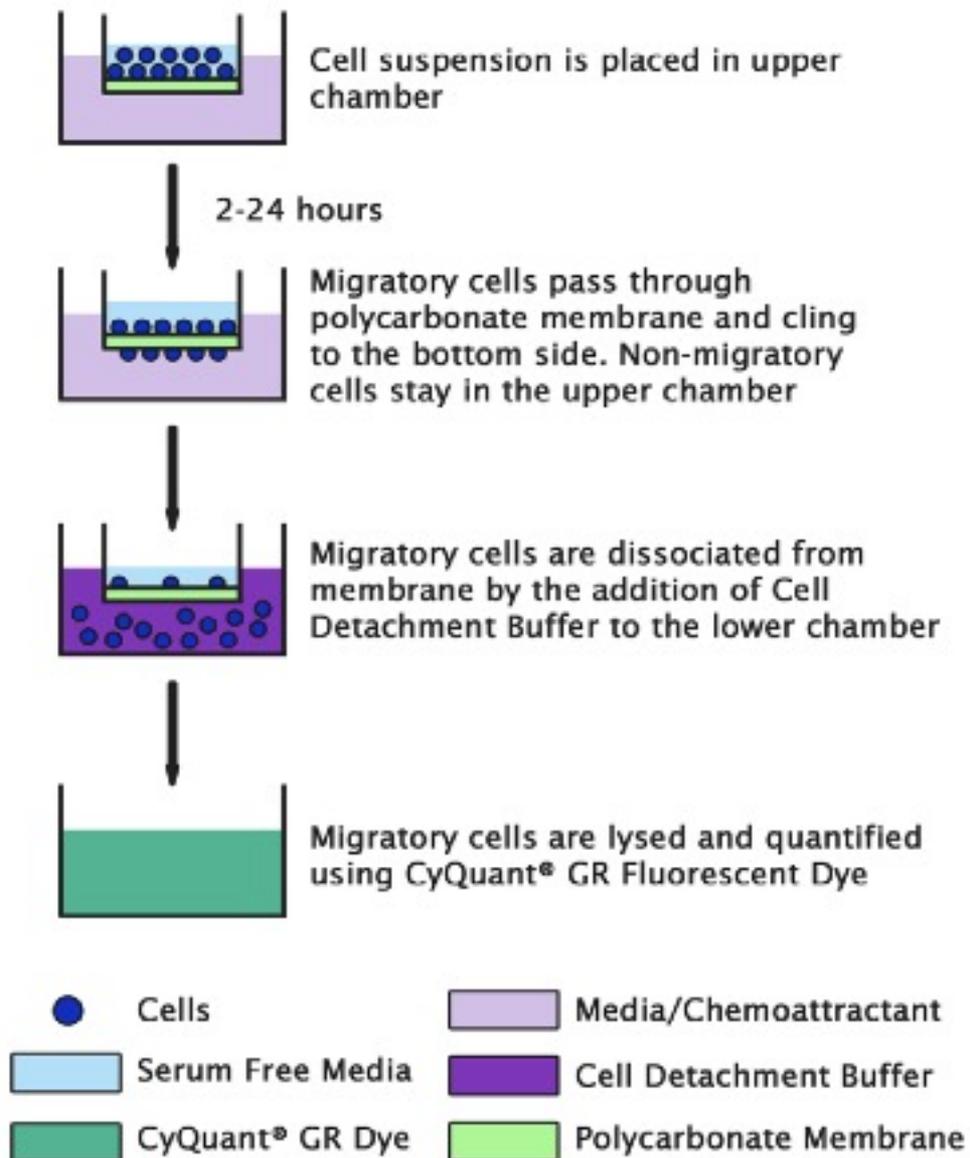
Analisi del fenotipo mediante
opportuno saggio

Identificazione
della molecola

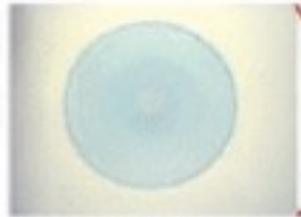
STRATEGIA SPERIMENTALE:

1. È necessario scegliere un opportuno sistema cellulare: es. Linea cellulare tumorale dotata di capacità di migrazione
2. In tale sistema possiamo effettuare uno screening di una libreria di molecole bioattive
3. Predisporre gli opportuni CONTROLLI
4. È necessario scegliere un opportuno saggio di migrazione che permetta la valutazione high-throughput
5. Scegliere lo strumento opportuno per analizzare l'effetto delle molecole in termini di riduzione della capacità di migrazione

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



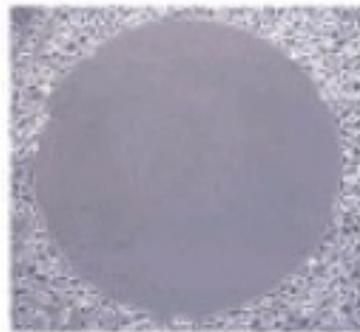
Saggi di migrazione in piastra multipozzetto con lettura automatizzata al microscopio ottico/plate reader



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



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

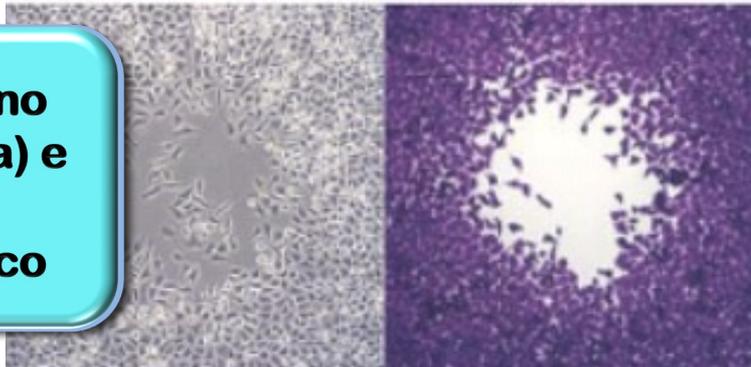


Pretreat desired
wells with Radius™
Gel Pretreatment
Solution

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 (Giemsa) e fotografate al microscopio ottico



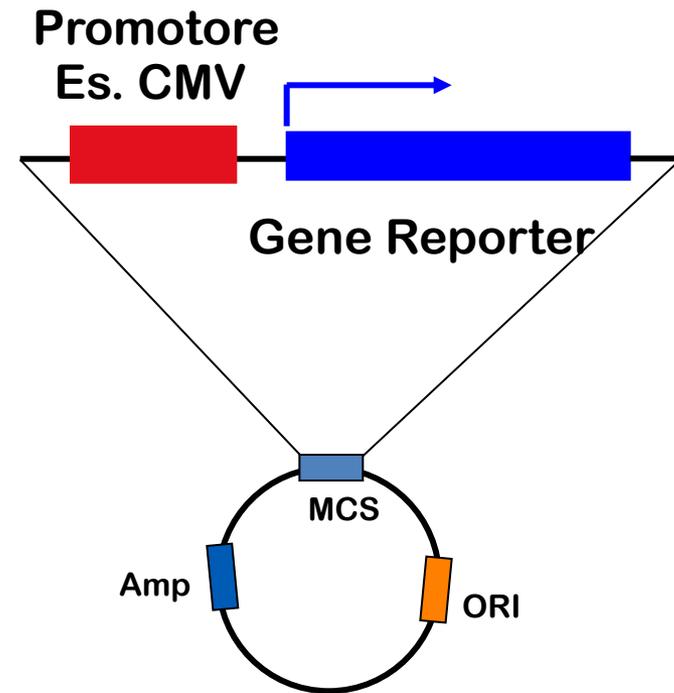
Problema sperimentale:

**VALIDAZIONE DELLA CAPACITA' DI UN FARMACO
DI INIBIRE LA MIGRAZIONE DI CELLULE TUMORALI E
DEI FENOTIPI TUMORALI AD ESSA ASSOCIATI**

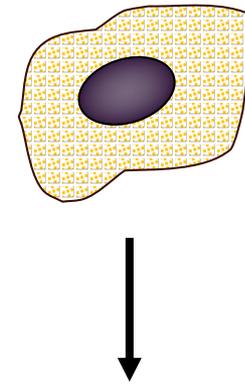
Analisi NON INVASIVA di trapianti
Es. sviluppo e progressione tumorale
mediante IMAGING IN VIVO

- ✓ **Imaging di fluorescenza mediante reporter fluorescenti (es. GFP) e microscopia intravitale**
- ✓ **imaging di bioluminescenza (BMI) mediante reporter LUCIFERASI**

Gene reporter clonato a valle di un promotore COSTITUTIVO

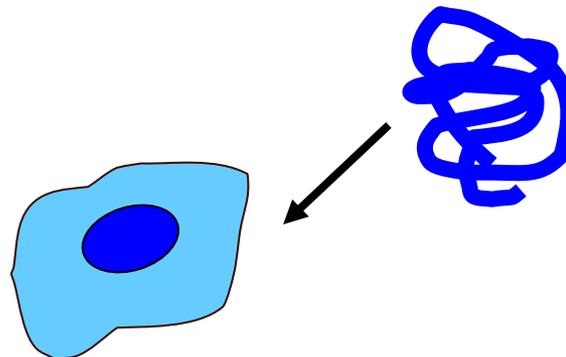


Trasfezione/infezione/CRISPR

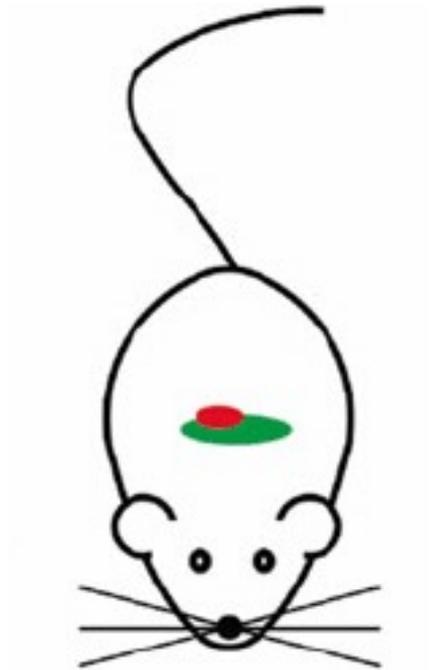


Espressione della
proteina nelle cellule
in cui è inserito il
costrutto reporter

Trapianto delle
cellule e analisi
in vivo



Saggi di metastaticità in vivo mediante trapianto di cellule-REPORTER

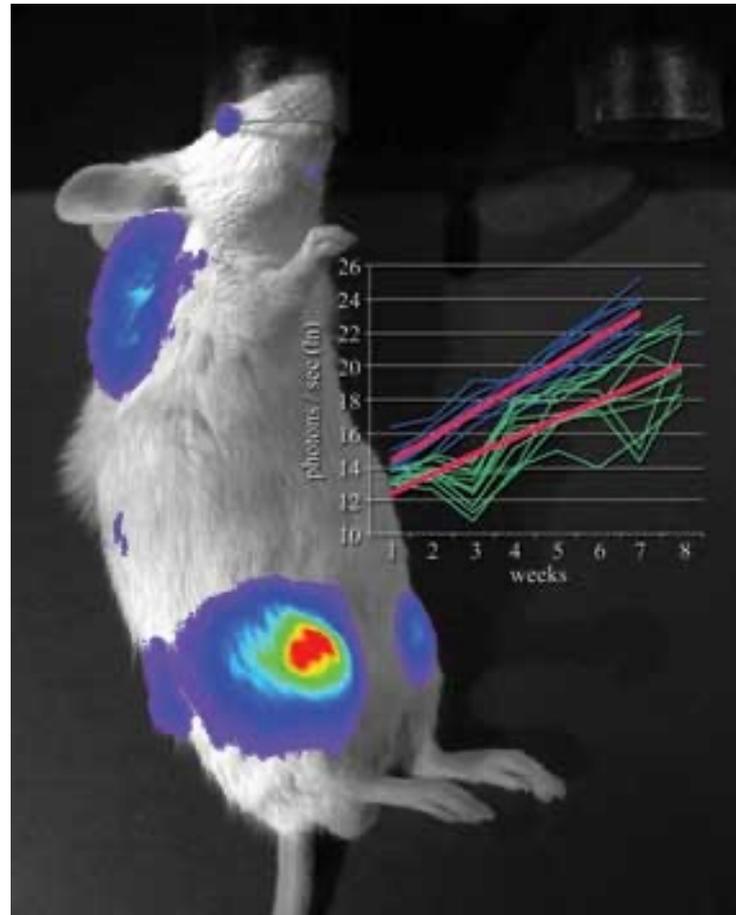


Trapianto di cellule tumorali



Iniezione iv

In vivo imaging di bioluminescenza prodotta da reporter LUC



Problema sperimentale:

Sei interessato a identificare GENI coinvolti nel fenomeno della migrazione cellulare.

Proponi una strategia sperimentale per rispondere a questa domanda.

