

**Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche**

**AA 2025-2026**

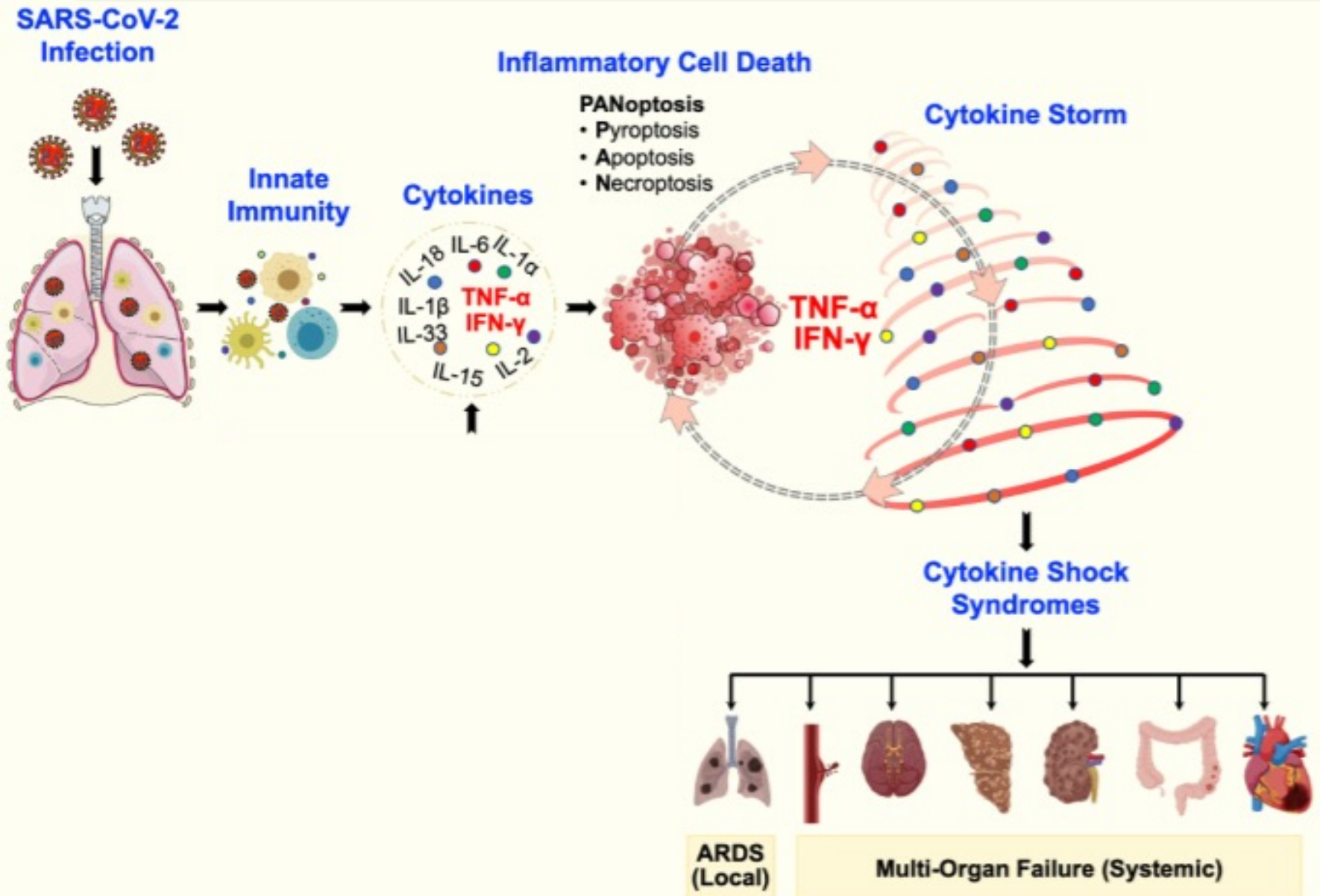
## **Corso di Biotecnologie Cellulari**

### **Lezione 9**

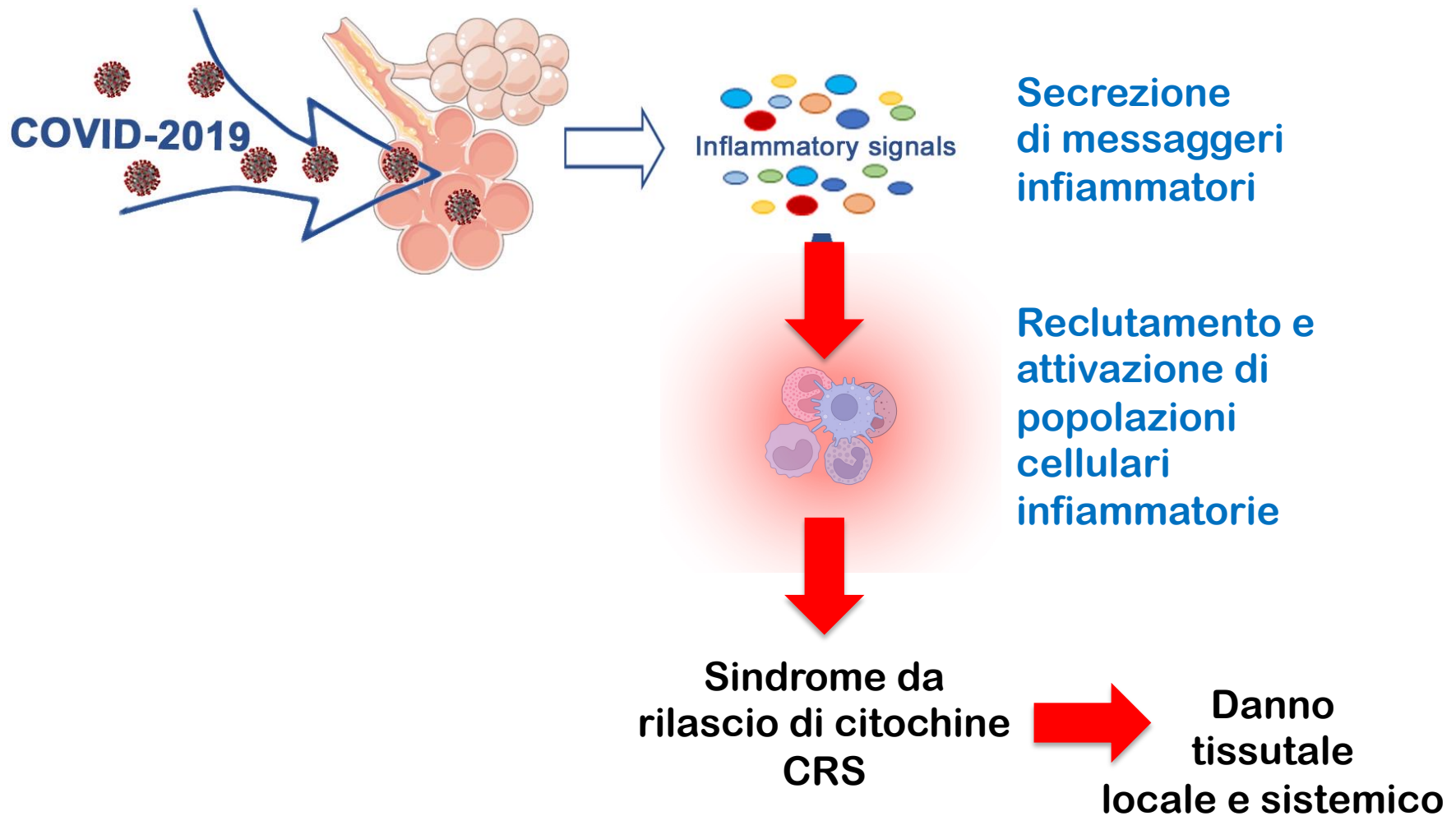
## PROSSIME LEZIONI

7	06/11		14-18 microscopia (1A)	14-18 trasfezione
	07/11	8-10 <u>Lez 9</u>	13-17 microscopia (1B)	13-17 IF
8	13/11		14-18 <u>chemotx</u>	14-18 microscopia (2A)
	14/11	8-10 <u>lez 10</u>	13-17 <u>chemotx</u>	13-17 microscopia (2B)
9	20/11			14-18 <u>chemotx</u>
	21/11	8-10 <u>Lez 11</u>		13-17 <u>chemotx</u>
10	27/11		14-15.30 morte <u>cell</u>	
	28/11		13-17 morte <u>cell</u>	
11	04/12			14-15.30 morte <u>cell</u>
	05/12			13-17 morte <u>cell</u>
12	12/12	8-10 <u>Lez 12</u> conclusioni e ripasso		

# PROBLEMA BIOLOGICO E STATO DELL'ARTE



La patologia COVID severa è causata una **risposta infiammatoria forte/cronica** che è scatenata nell'ospite dall'interazione tra **fattori virali e fattori cellulari NON NOTI**





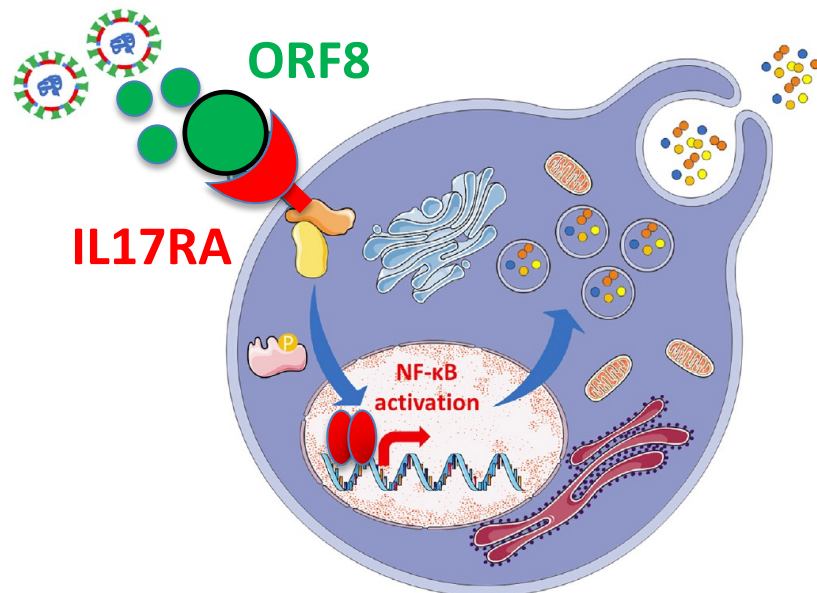
# DATI PRELIMINARI

## ESPERIMENTO:

Abbiamo effettuato un'analisi dell'interattoma delle proteine virali Spike e ORF8 (in fusione con TAG HA) in un modello cellulare di epitelio polmonare.

## RISULTATO:

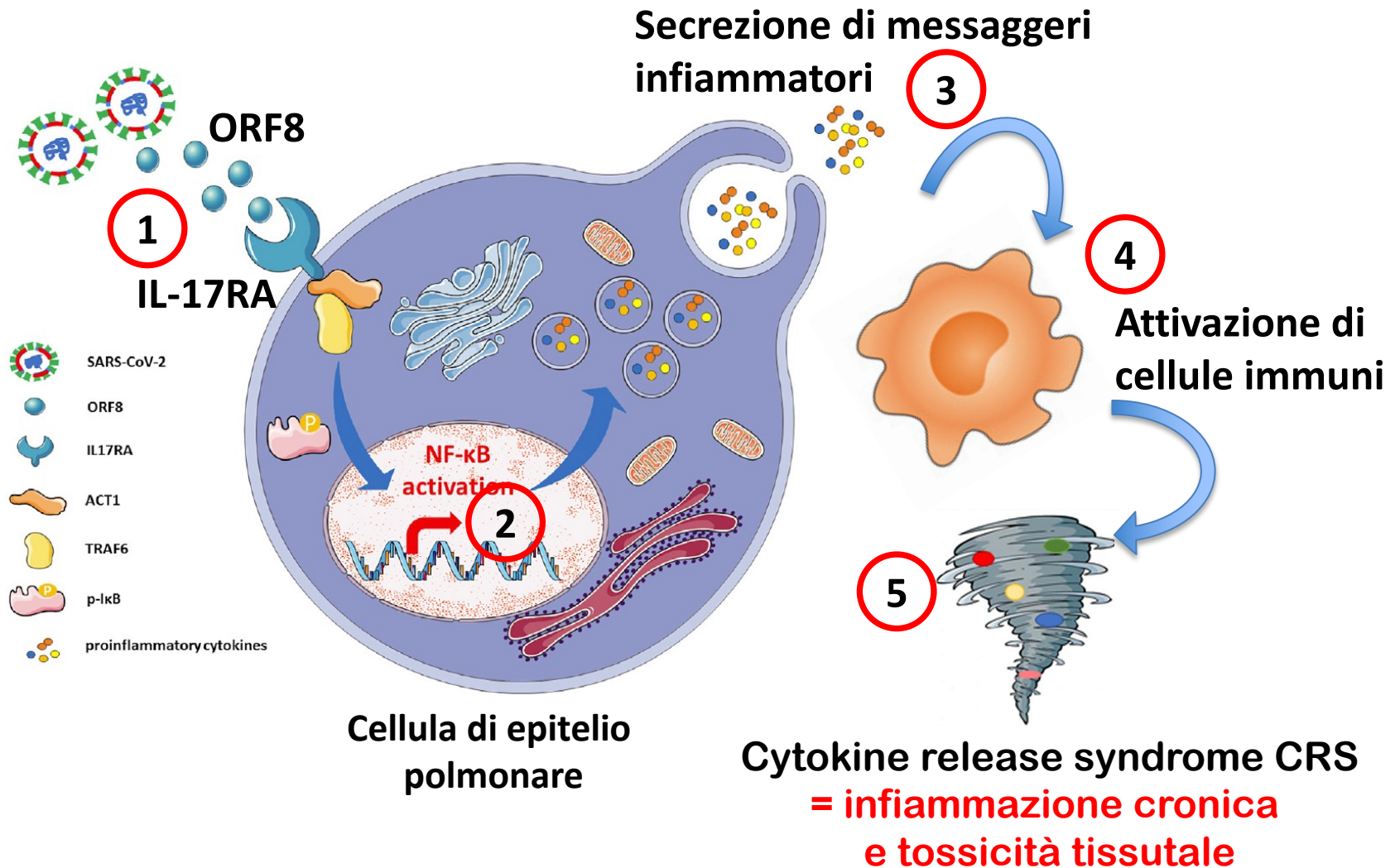
L'analisi ha evidenziato che la proteina ORF8 interagisce con la porzione extracellulare del recettore per IL-17 presente sulla superficie delle cellule di polmone



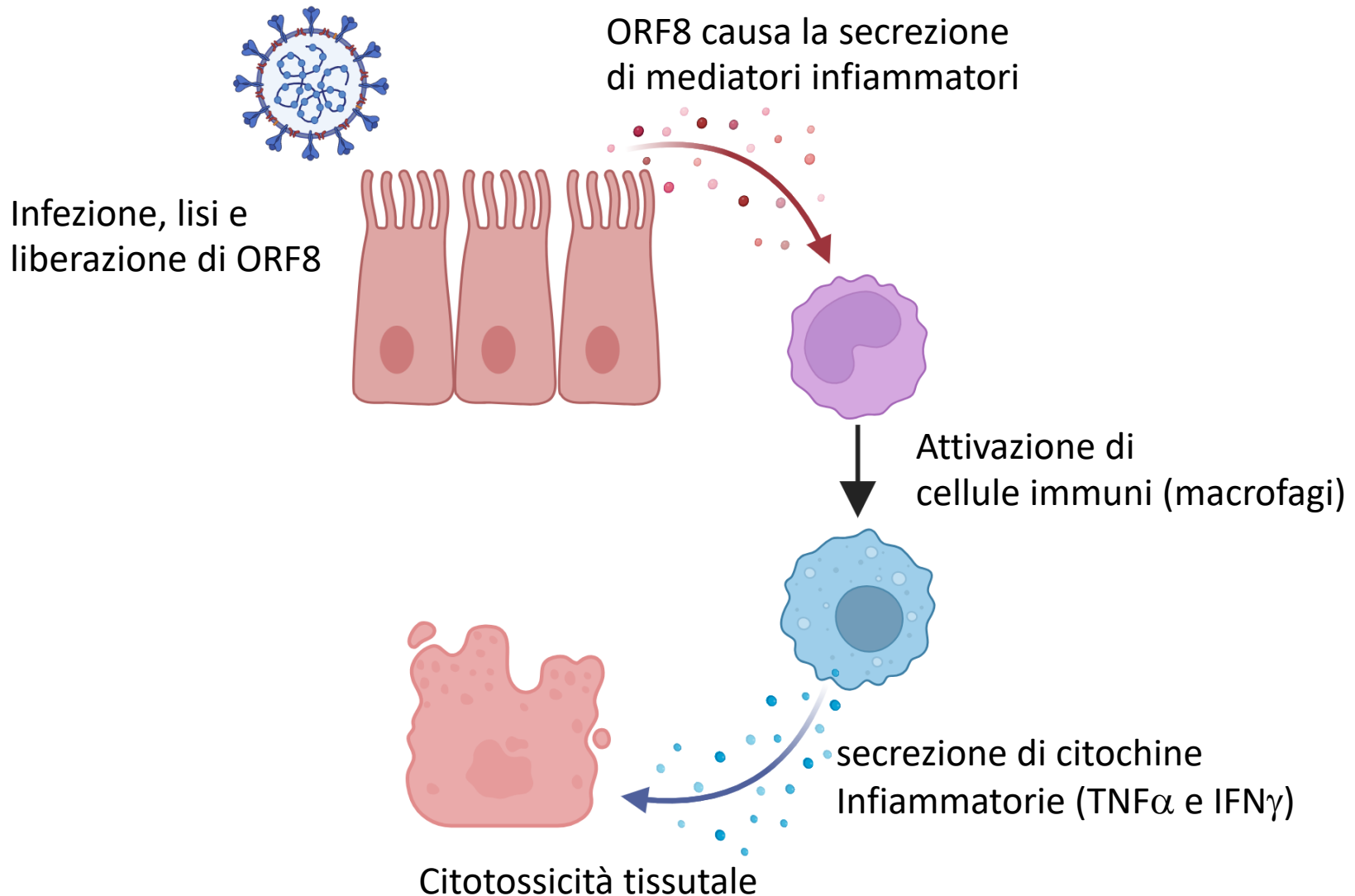
### **IPOTESI:**

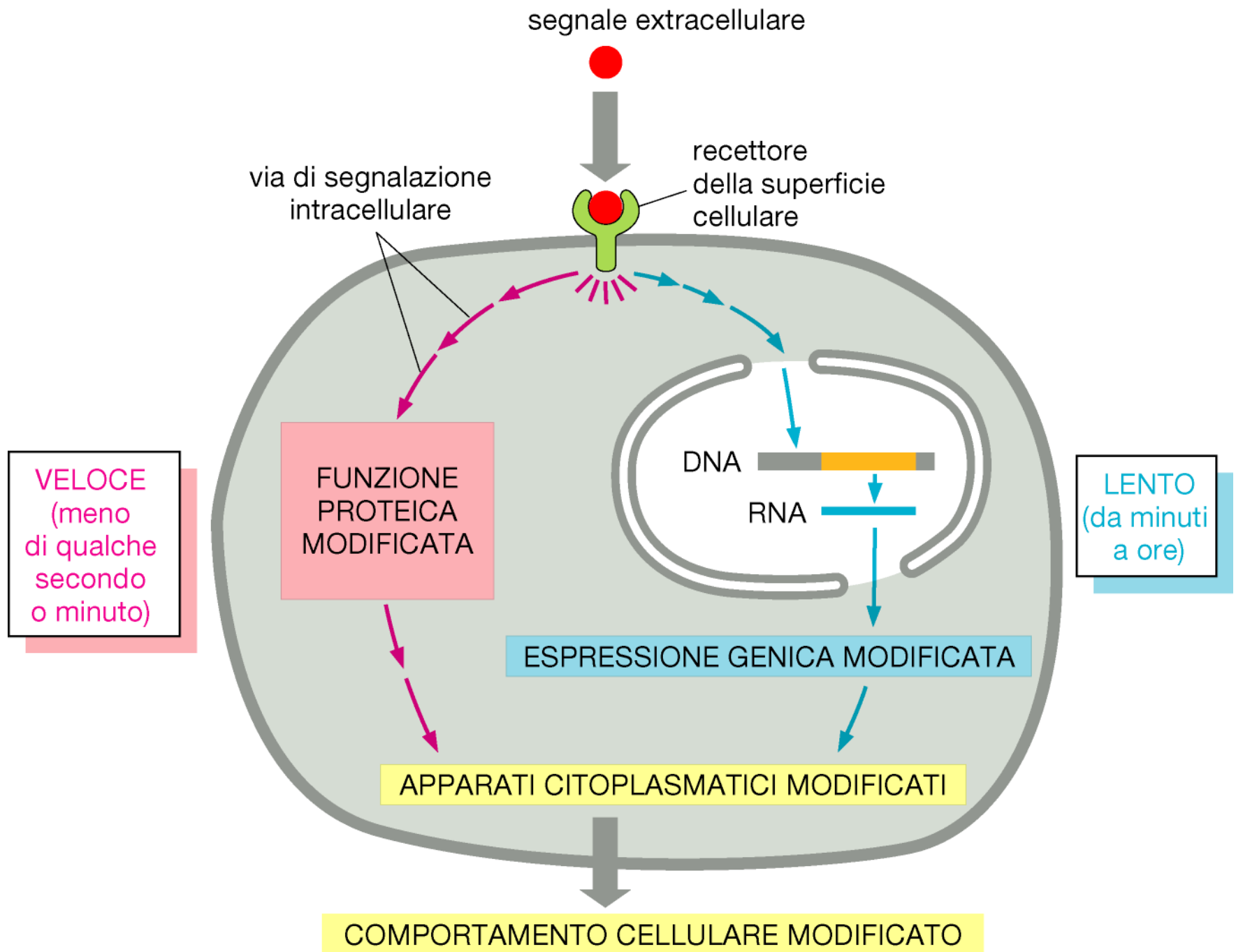
**la proteina ORF8 presente nell'ambiente extracellulare lega il recettore IL-17RA sulle cellule di epitelio polmonare innescando il rilascio di mediatori infiammatori che causano attivazione di cellule immuni, infiammazione cronica e conseguente danno tissutale**

## IPOTESI (rappresentazione grafica)



**IPOTESI: ORF8 attiva il recettore IL-17RA nelle cellule epiteliali innescando una risposta infiammatoria che causa danno tissutale**





## **SCOPO del PROGETTO:**

**Verificare la capacità di ORF8 di innescare una reazione infiammatoria con conseguente danno tissutale mediante l'interazione con il recettore IL-17RA in cellule di epitelio polmonare**



## PIANO SPERIMENTALE:

### Dati preliminari

Analisi della capacità di ORF8 di indurre produzione e secrezione di **mediatori infiammatori** da parte di cellule del polmone via IL17RA

### Esperimento 1)

Analisi della capacità di ORF8 di indurre reclutamento e **attivazione di cellule infiammatorie** da parte di cellule del polmone attraverso l'interazione con IL17RA

### Esperimento 2)

Analisi della capacità delle cellule infiammatorie attivate dall'asse ORF8-IL17RA di indurre **tossicità** in cellule di polmone



## STRATEGIA SPERIMENTALE:

### a) Scelta dei modelli cellulari

a) H1299 (linea cellulare epiteliale – origine polmone)

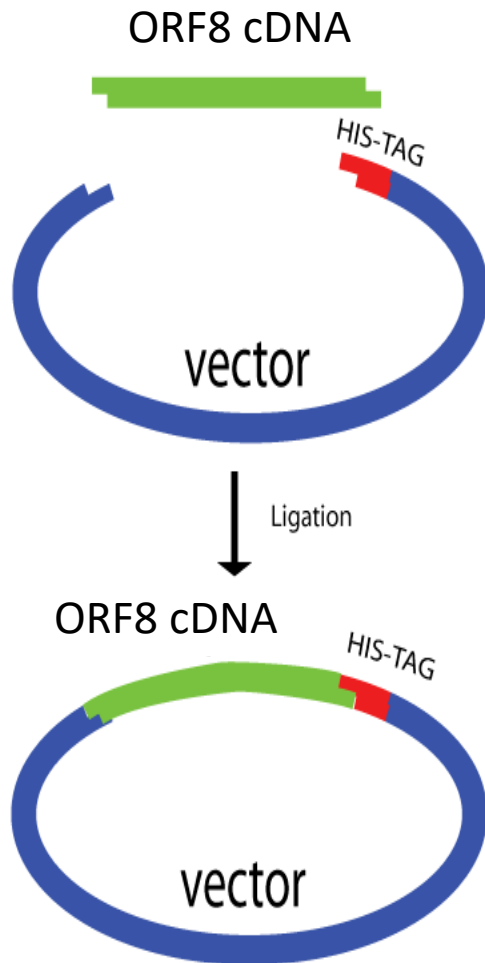
### b) Trattamento di cellule epiteliali H1299 con proteina ORF8 purificata

### c) Analisi degli eventi a valle

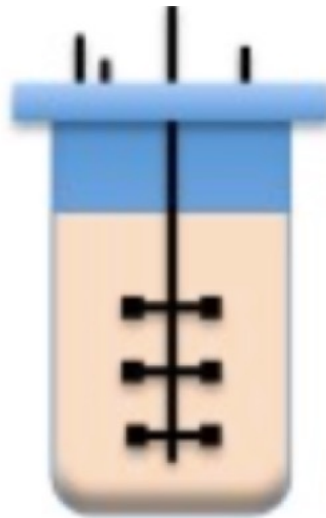
- secrezione di citochine infiammatorie
- attivazione di cellule immuni (macrofagi)
- induzione di morte in cellule epiteliali di polmone

# Produzione batterica e purificazione della proteina ORF8-His (eseguito dai docenti)

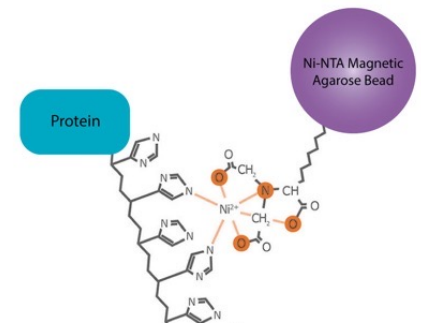
- **Clonaggio**



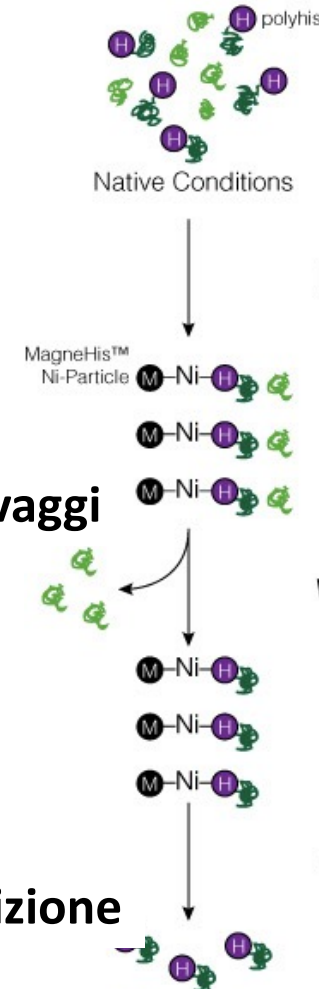
- **Trasformazione batterica**
- **Selezione**
- **Coltura**



- **Lisi dei batteri**



- **Legame alla resina**

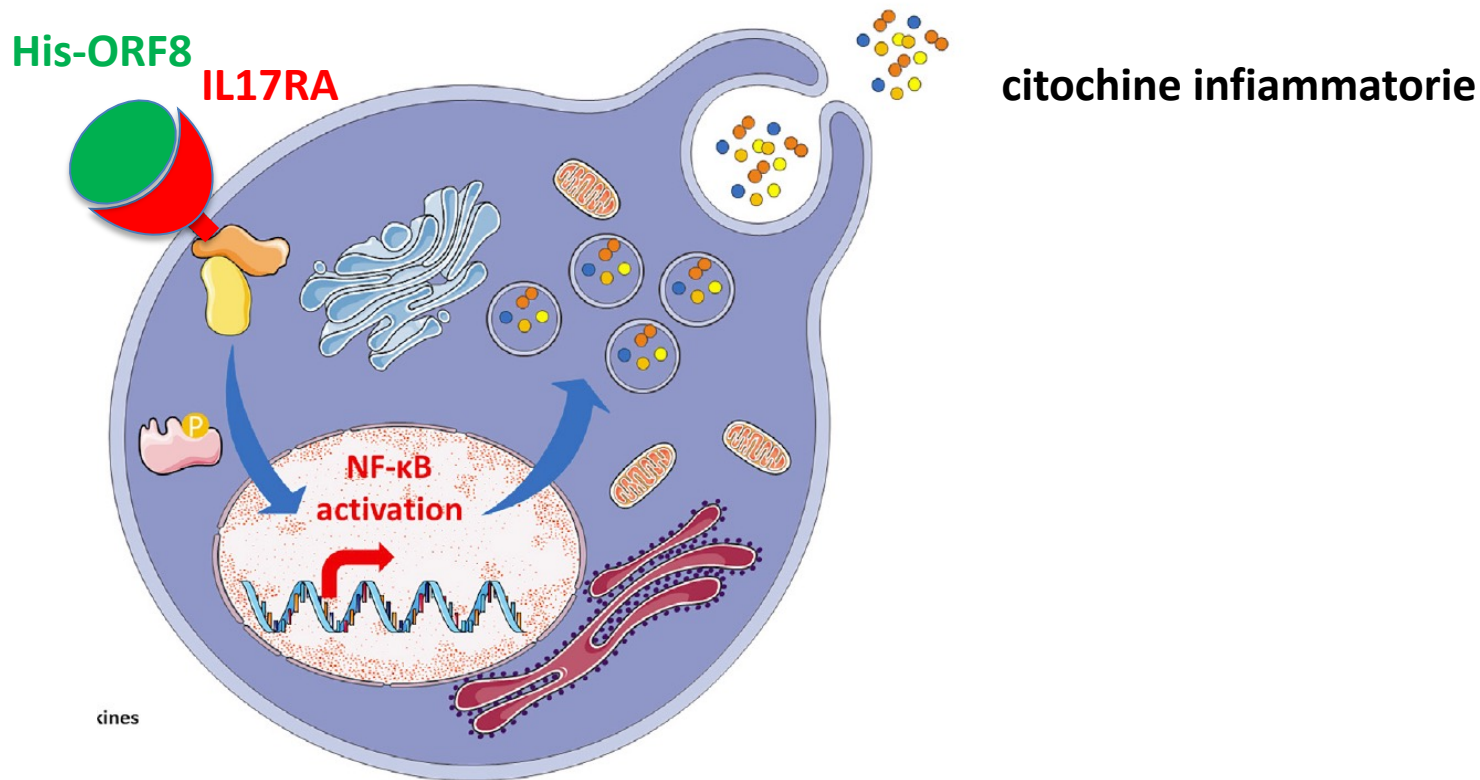


- **Lavaggi**

- **Eluizione**

# Trattamento di cellule polmonari con proteina ORF8-His

Terreno condizionato da  
cellule trattate con ORF8-His



**CELLULE H1299**  
(linea cellulare epiteliale - polmone)

# Esperimento preliminare (docente)

## Dosaggio delle citochine secrete in risposta al trattamento con ORF8

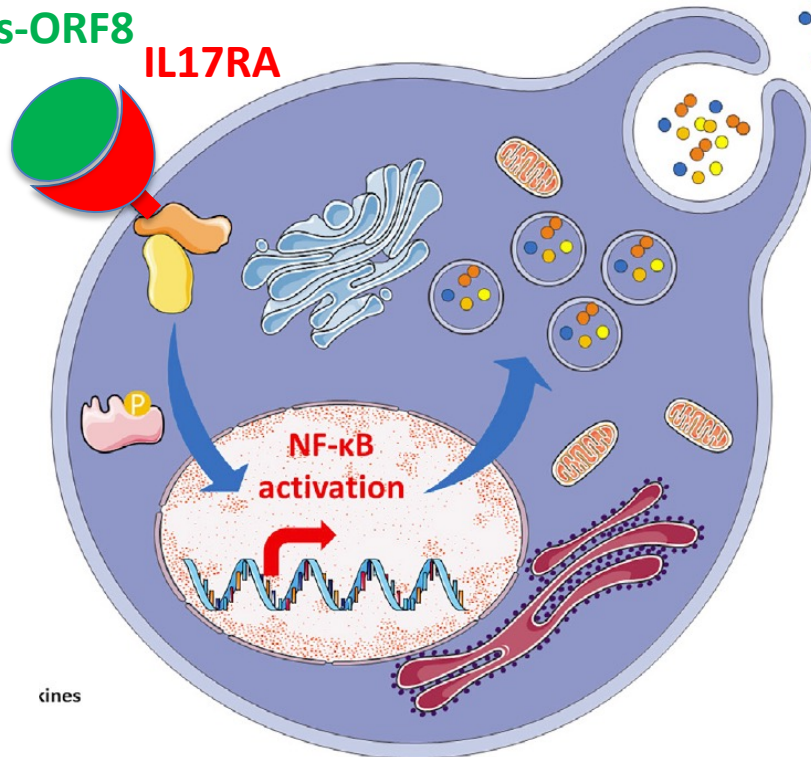
Terreno condizionato  
da cellule trattate con  
His-ORF8



SANDWICH ELISA

His-ORF8

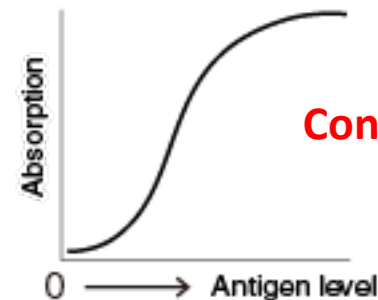
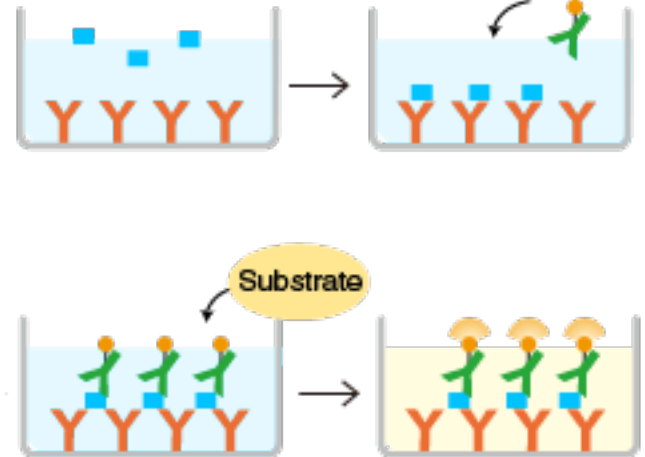
IL17RA



cines

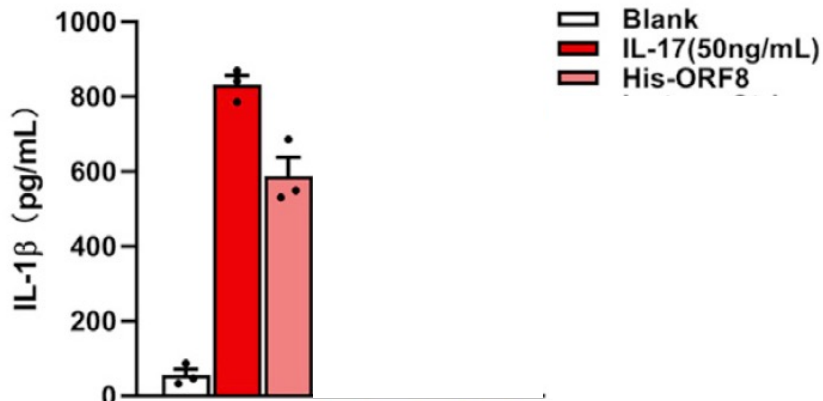
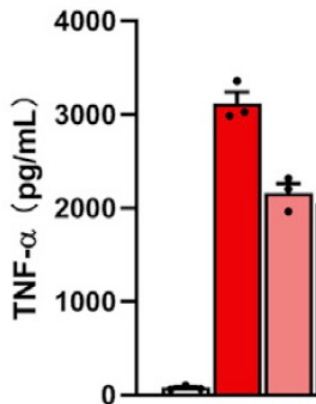
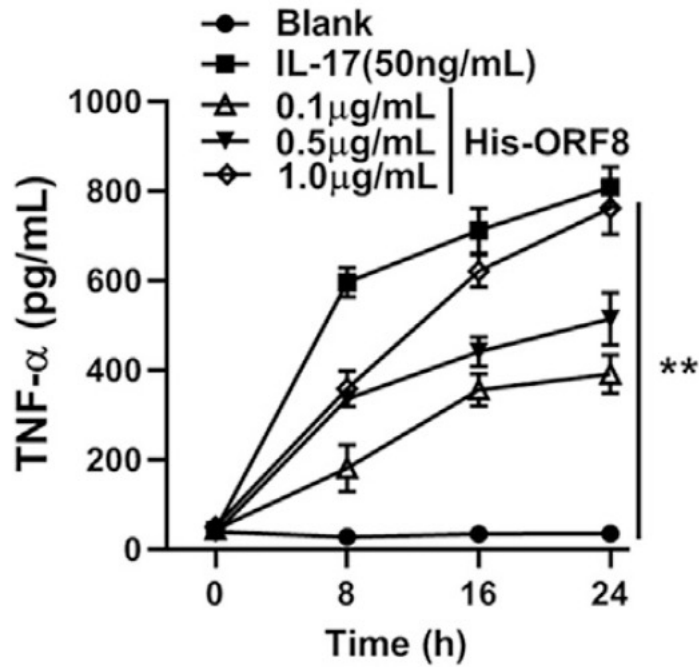
CELLULE H1299

(linea cellulare epiteliale - polmone)



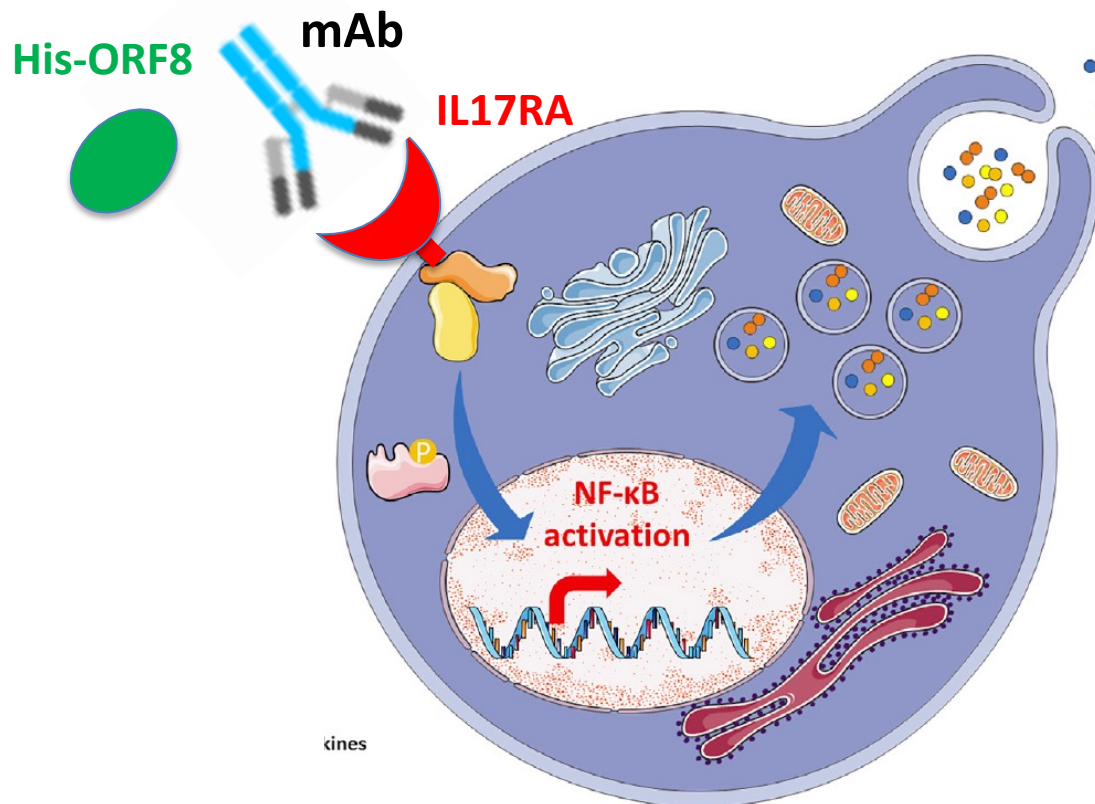
Controllo positivo?

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



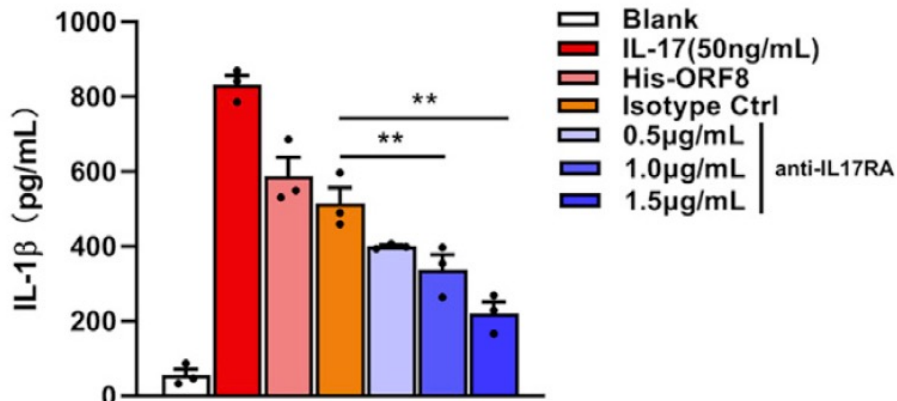
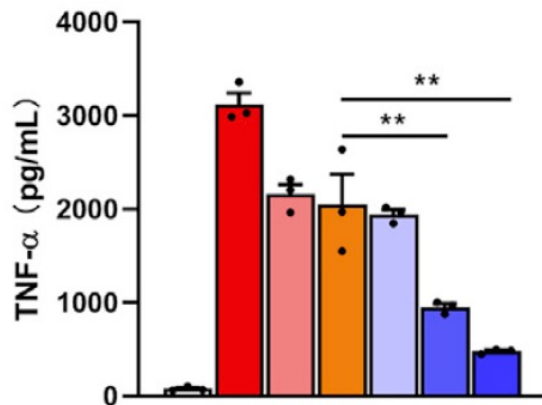
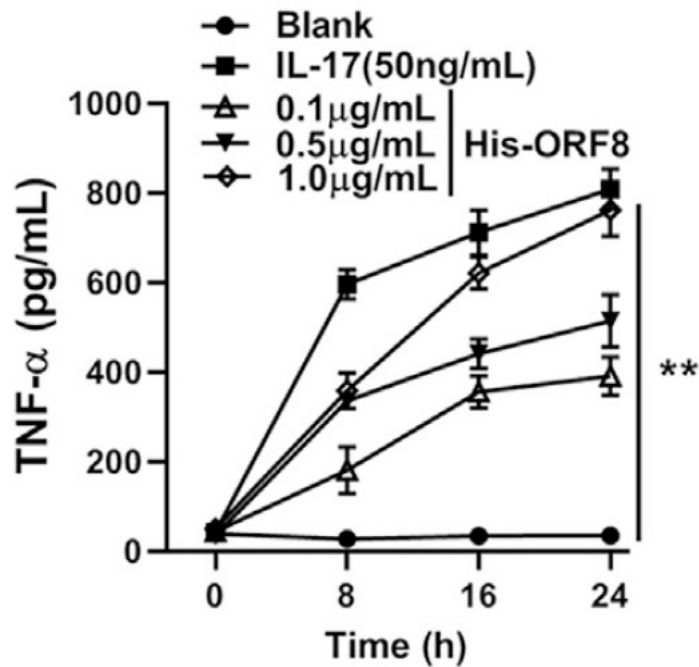
# Analisi del ruolo dell'interazione di ORF8 con IL-17RA

- 1) cellule non trattate
- 2) cellule trattate con **His-ORF8** (1  $\mu\text{g/ml}$  24h)
- 3) cellule incubate con **anticorpo neutralizzante anti-IL17RA** (impedisce il legame di ORF8) e successivamente con His-ORF8 (1  $\mu\text{g/ml}$  24h)





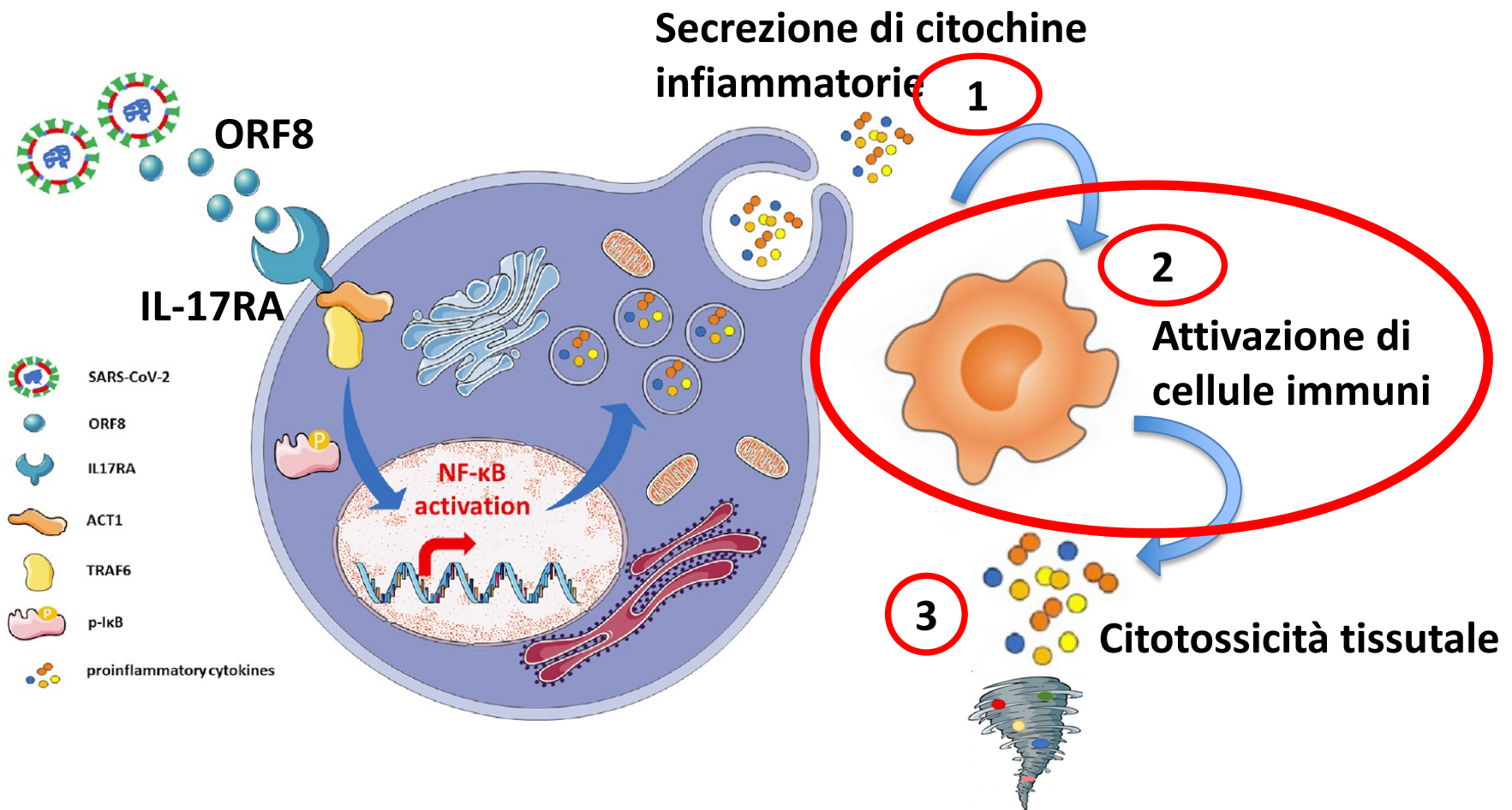
## Controllo di specificità per IL-17RA: anticorpo neutralizzante





## ESPERIMENTO 1) - SVOLTO IN LAB DIDATTICO:

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



## **ESPERIMENTO 1)- SVOLTO IN LAB DIDATTICO:**

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

### **STRATEGIA SPERIMENTALE:**

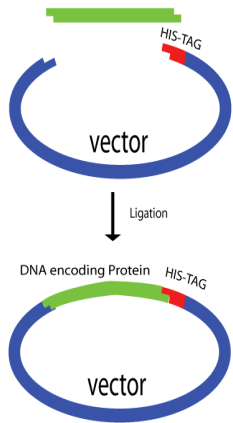
#### **1) Scelta dei modelli cellulari**

H1299 (linea di cellule epiteliali – origine polmone)

THP-1 (linea di cellule monocitiche)

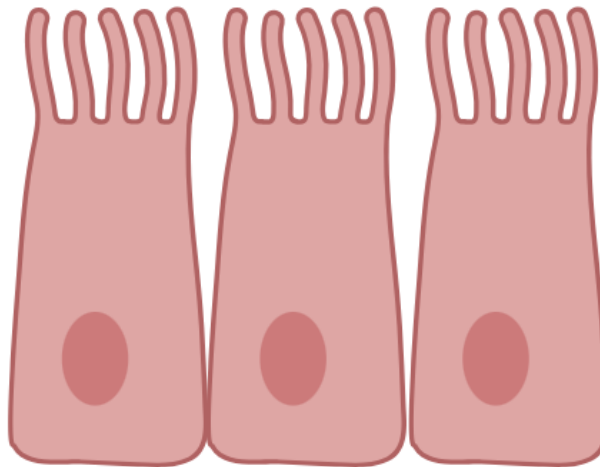
#### **2) Trattamento di cellule epiteliali H1299 con proteina ORF8 purificata**

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

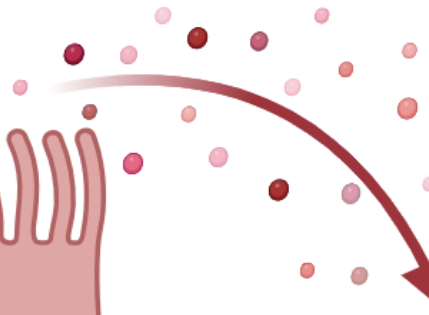


## Trattamento di cellule epiteliali H1299 (polmone) con proteina ORF8 purificata e raccolta del terreno condizionato

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



**CELLULE H1299**  
(linea cellulare epiteliale - polmone)



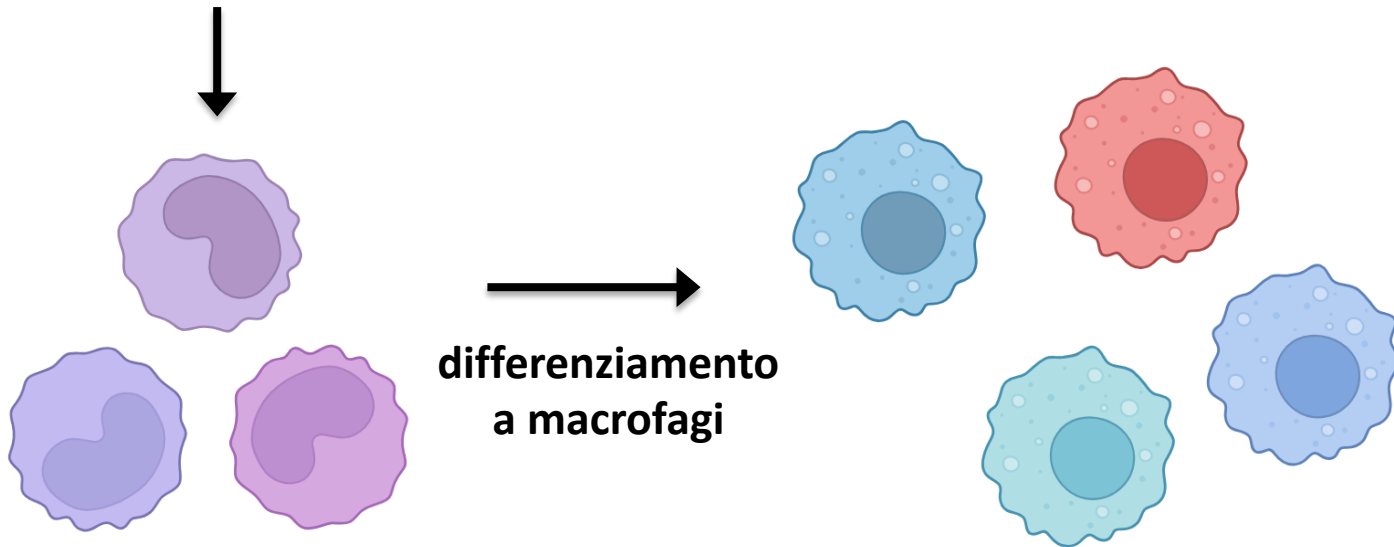
Terreno  
condizionato da  
cellule trattate con  
His-ORF8 1  $\mu\text{g/ml}$



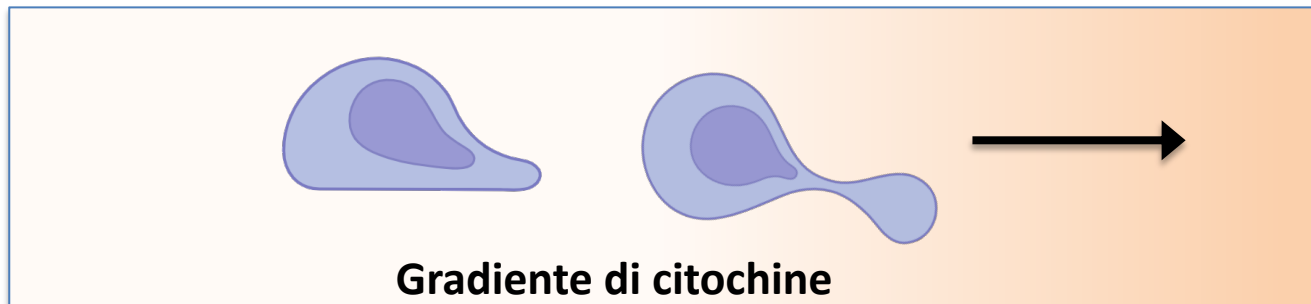
**Incubazione di CELLULE THP-1**  
(linea cellulare monocitica)  
con il terreno condizionato

# 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: saggio di chemotassi



## **ESPERIMENTO 1):**

**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)

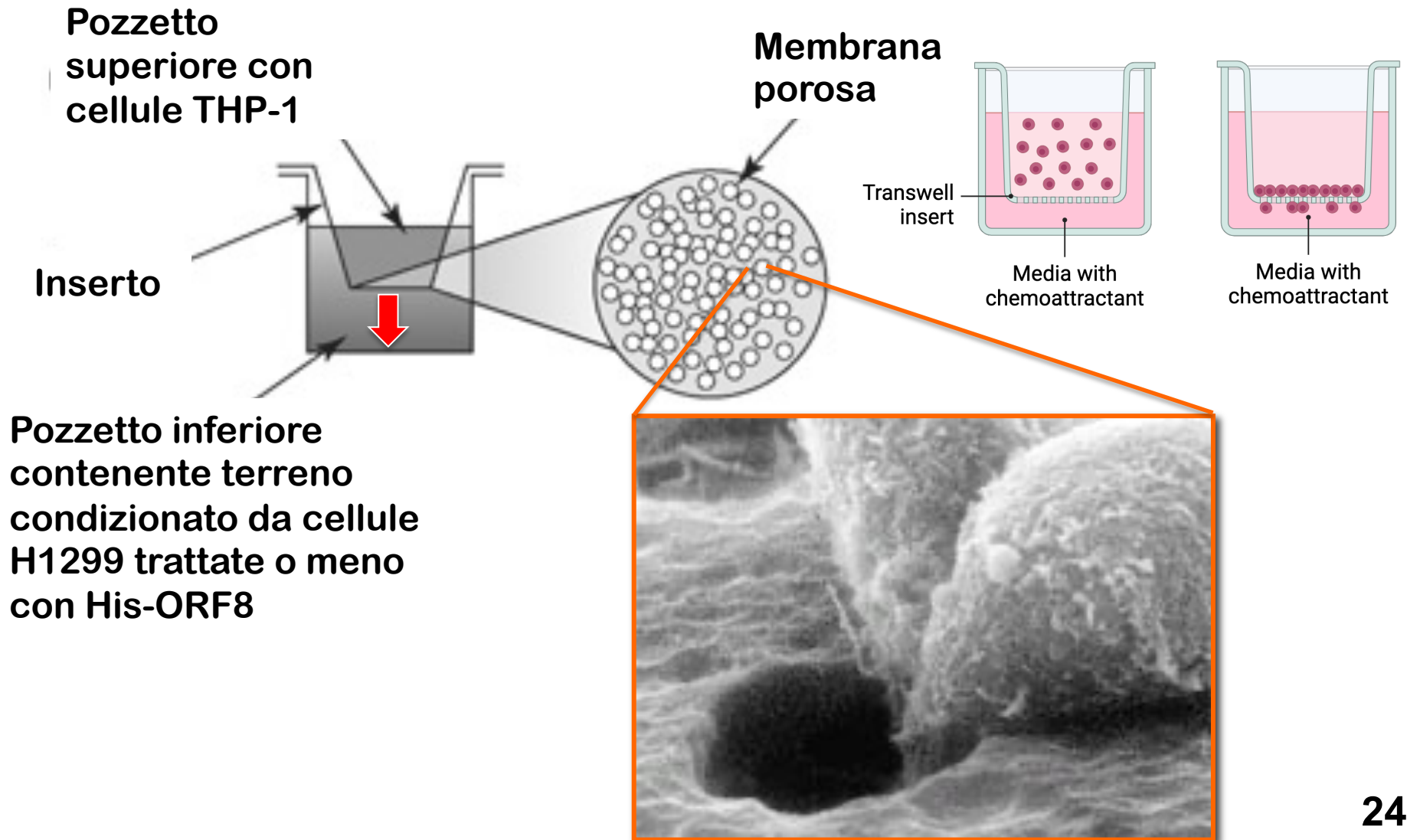
#### **3) Scelta del saggio**

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

#### **4) Scelta dello strumento**

Analisi delle cellule migrate al microscopio ottico

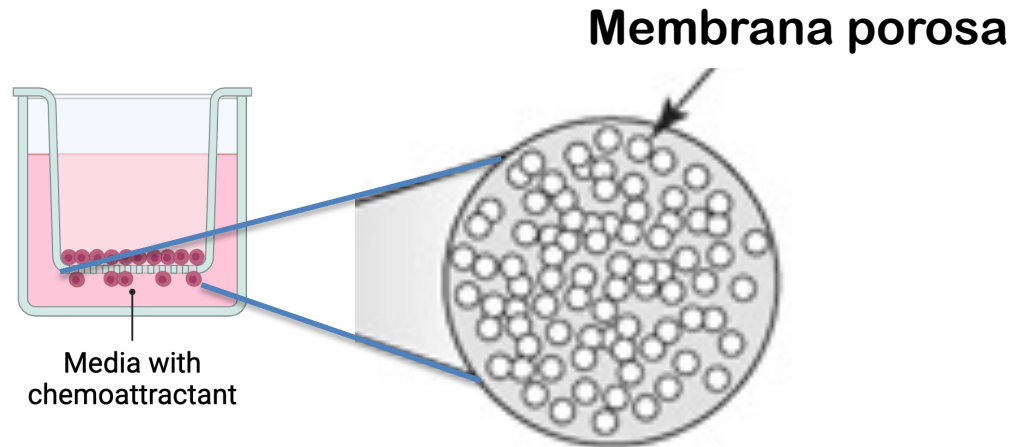
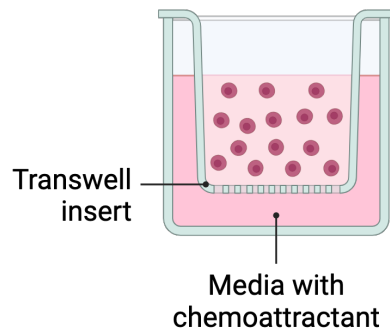
# SAGGIO di chemotassi con camera di Boyden (transwelling)



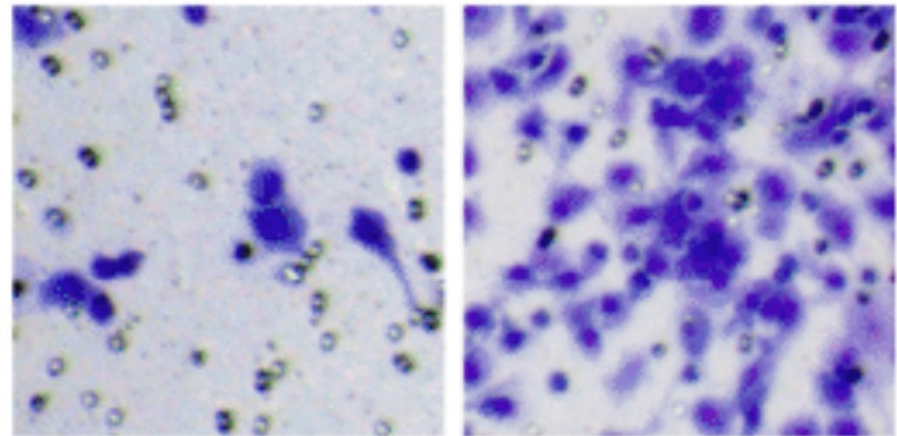


# STRUMENTO: conta delle cellule al microscopio ottico dopo colorazione

**Pozzetto superiore  
con cellule THP-1**



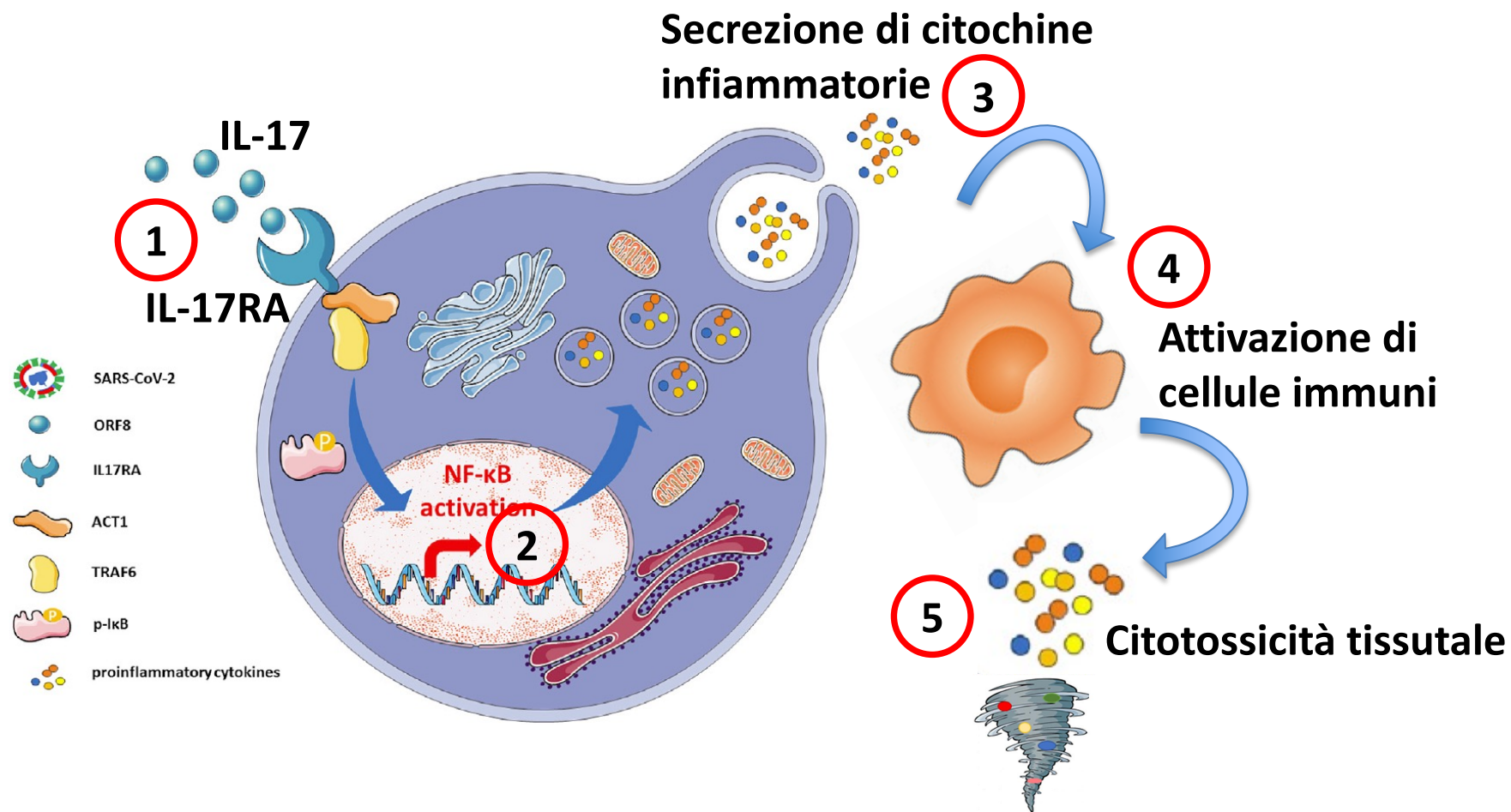
**Pozzetto inferiore con  
terreno condizionato da  
cellule H1299 trattate  
con His-ORF8**



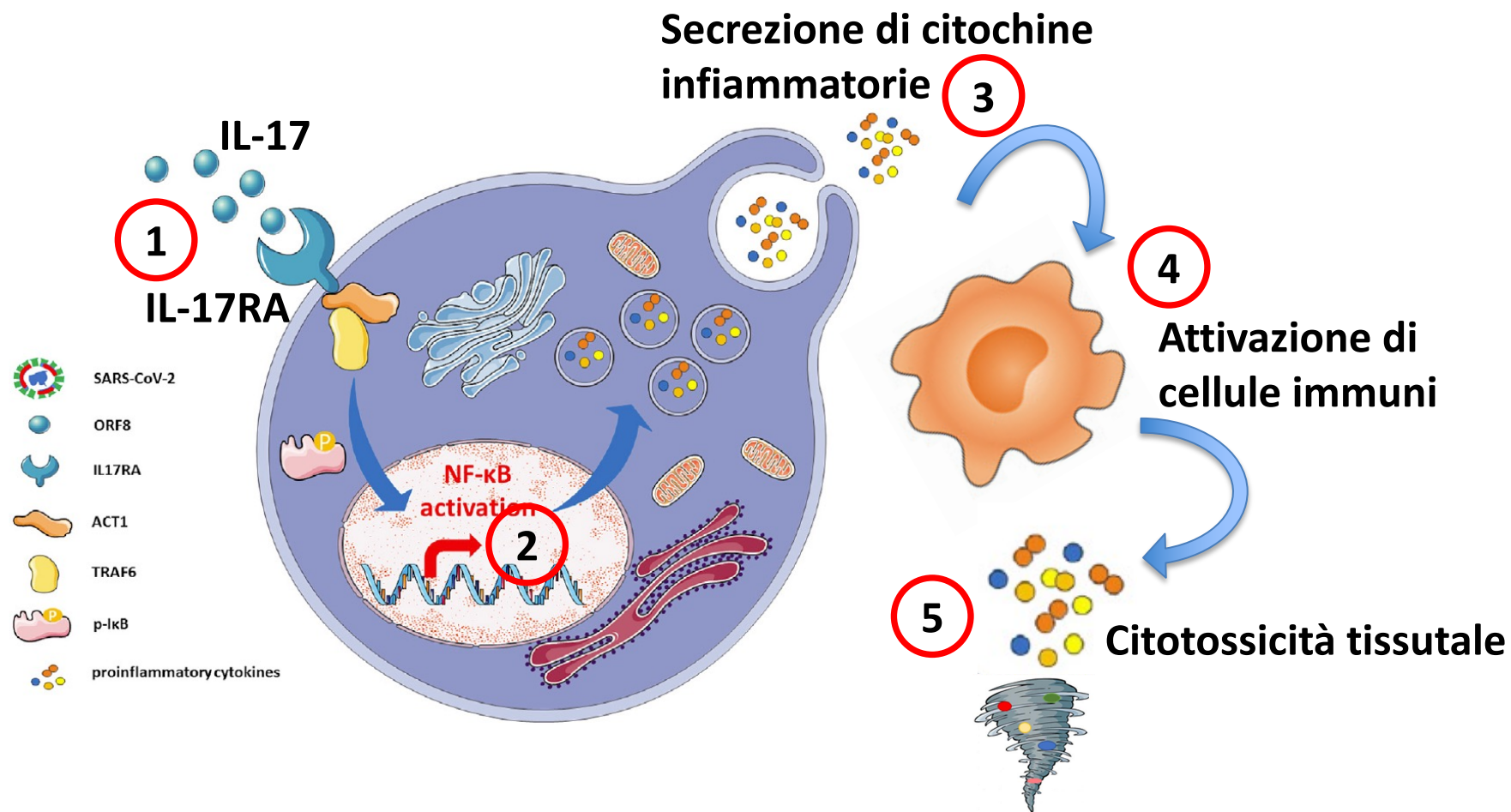
**Colorazione con crystal violet  
e conta delle cellule migrate**



# CONTROLLI SPERIMENTALI



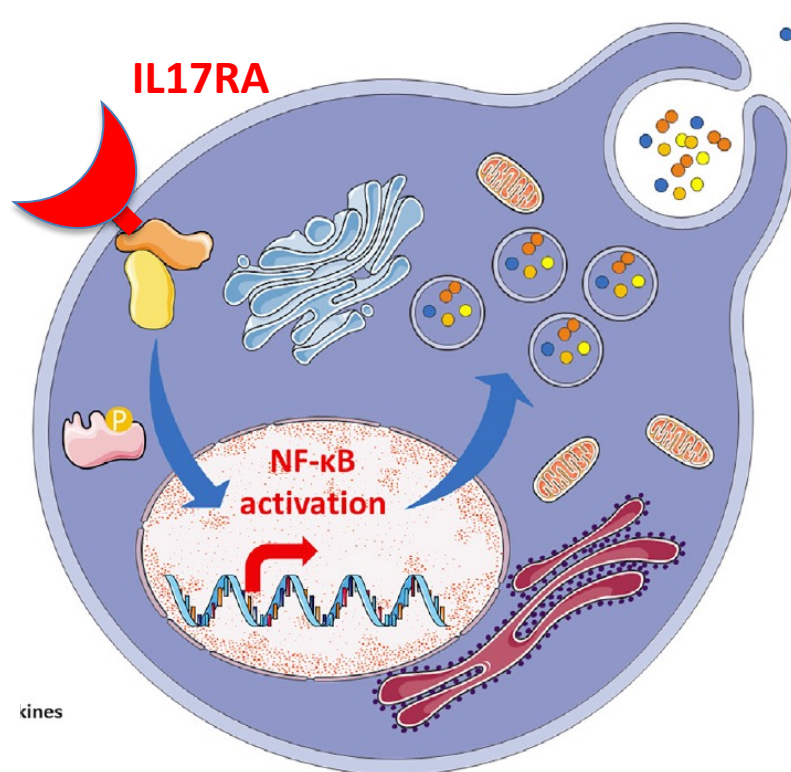
## CONTROLLO POSITIVO: analisi dell'effetto di IL-17



# CONTROLLO DI SPECIFICITA': Analisi del ruolo di IL-17RA

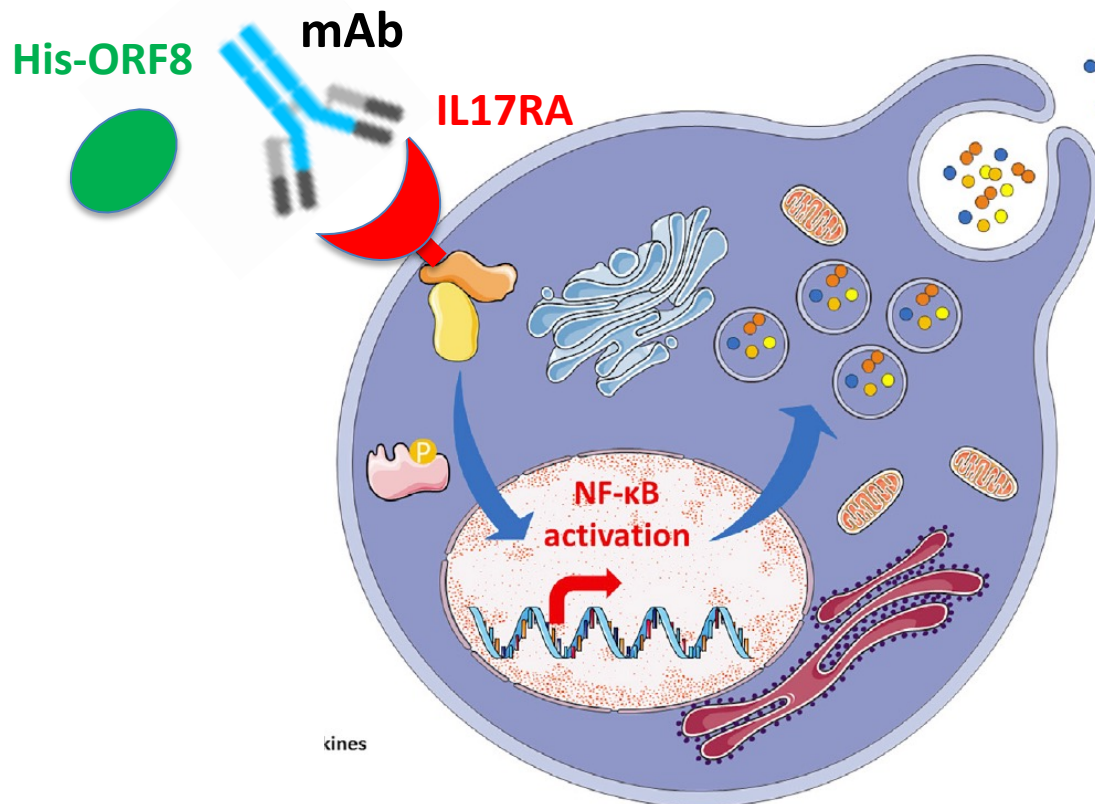
- 1) cellule non trattate
- 2) cellule trattate con **His-ORF8** (1  $\mu\text{g/ml}$  24h)
- 3) controllo per dimostrare il **ruolo** di IL-17RA =

His-ORF8



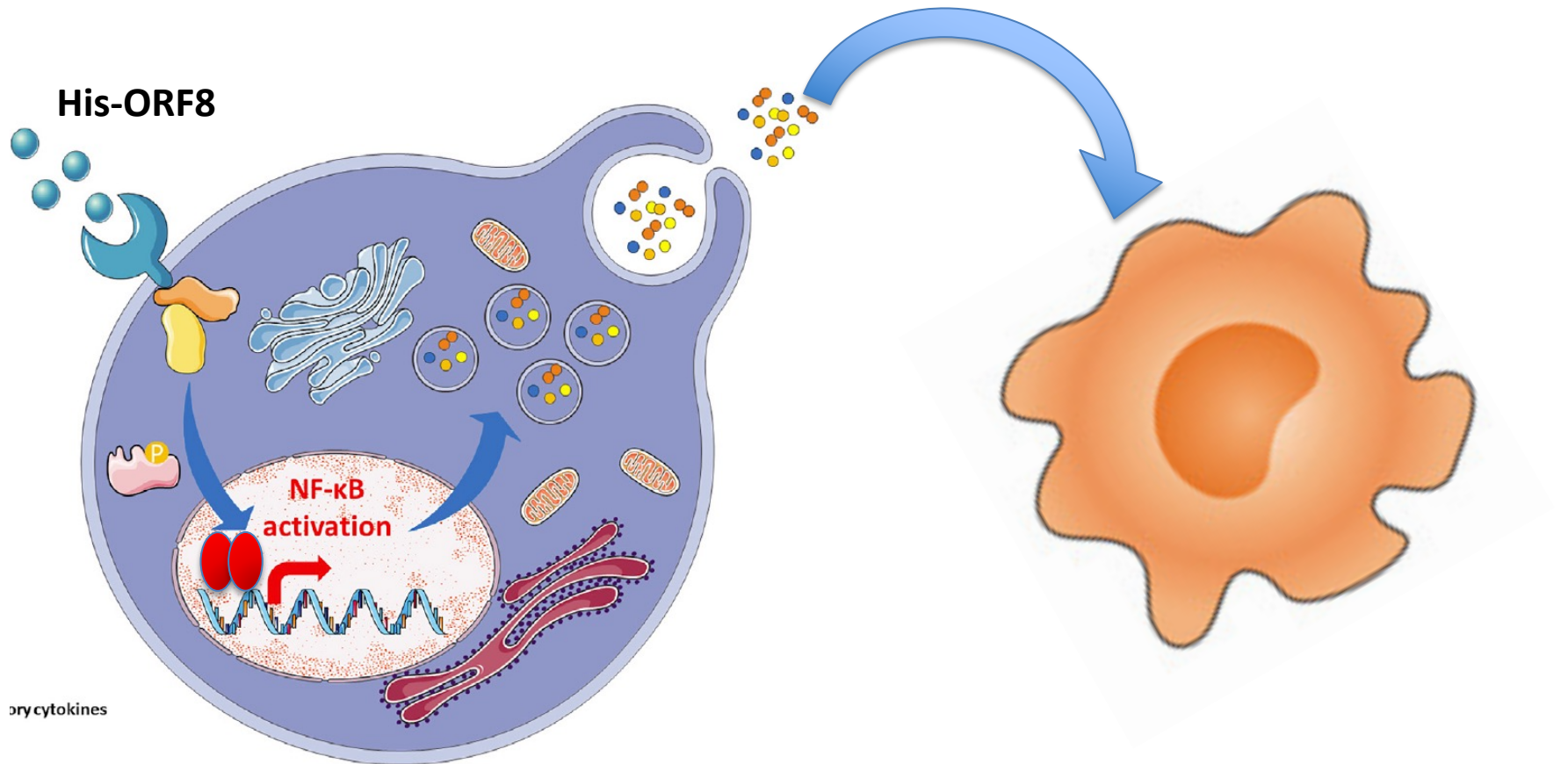
## Analisi del ruolo di IL-17RA

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

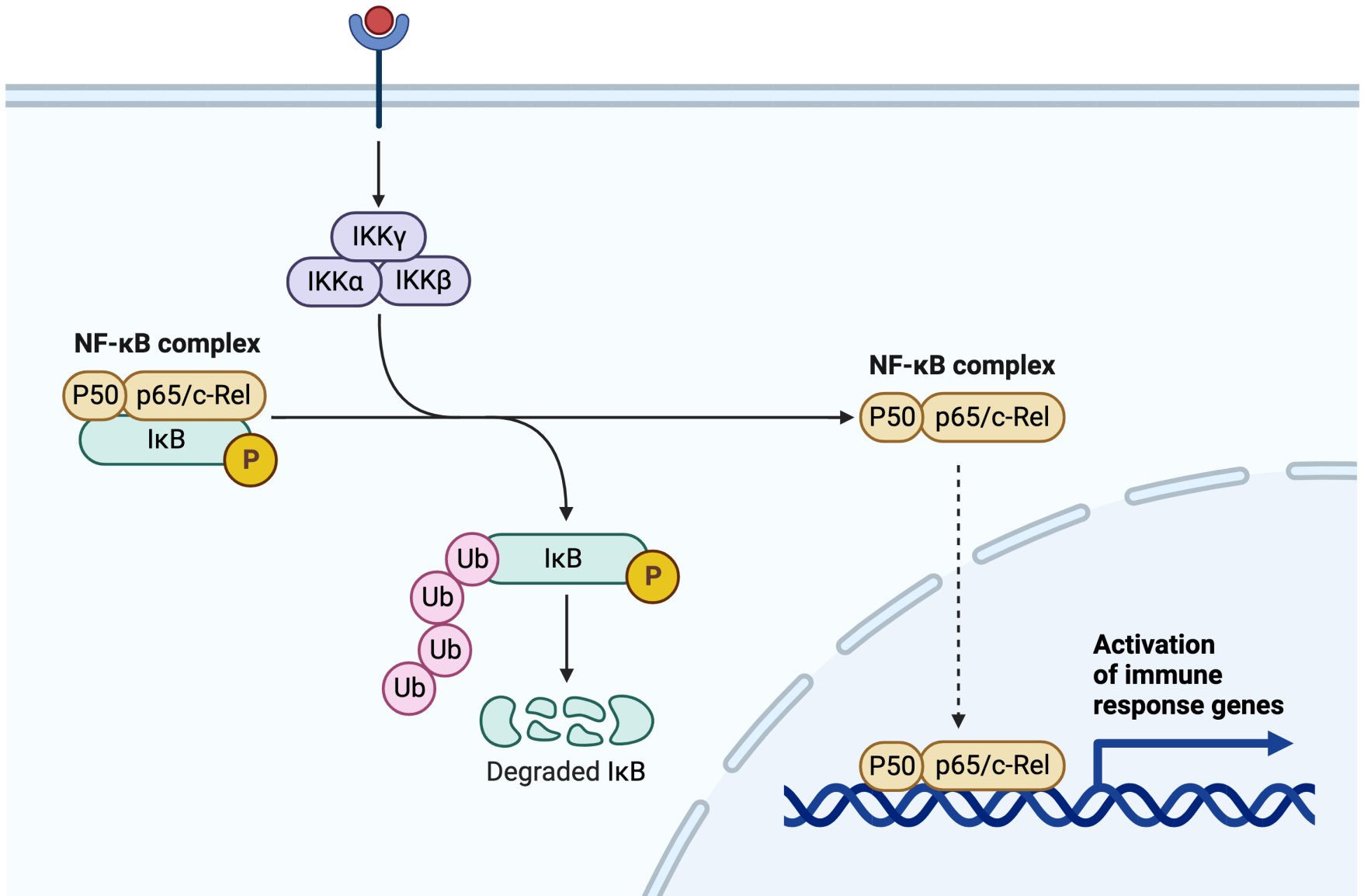




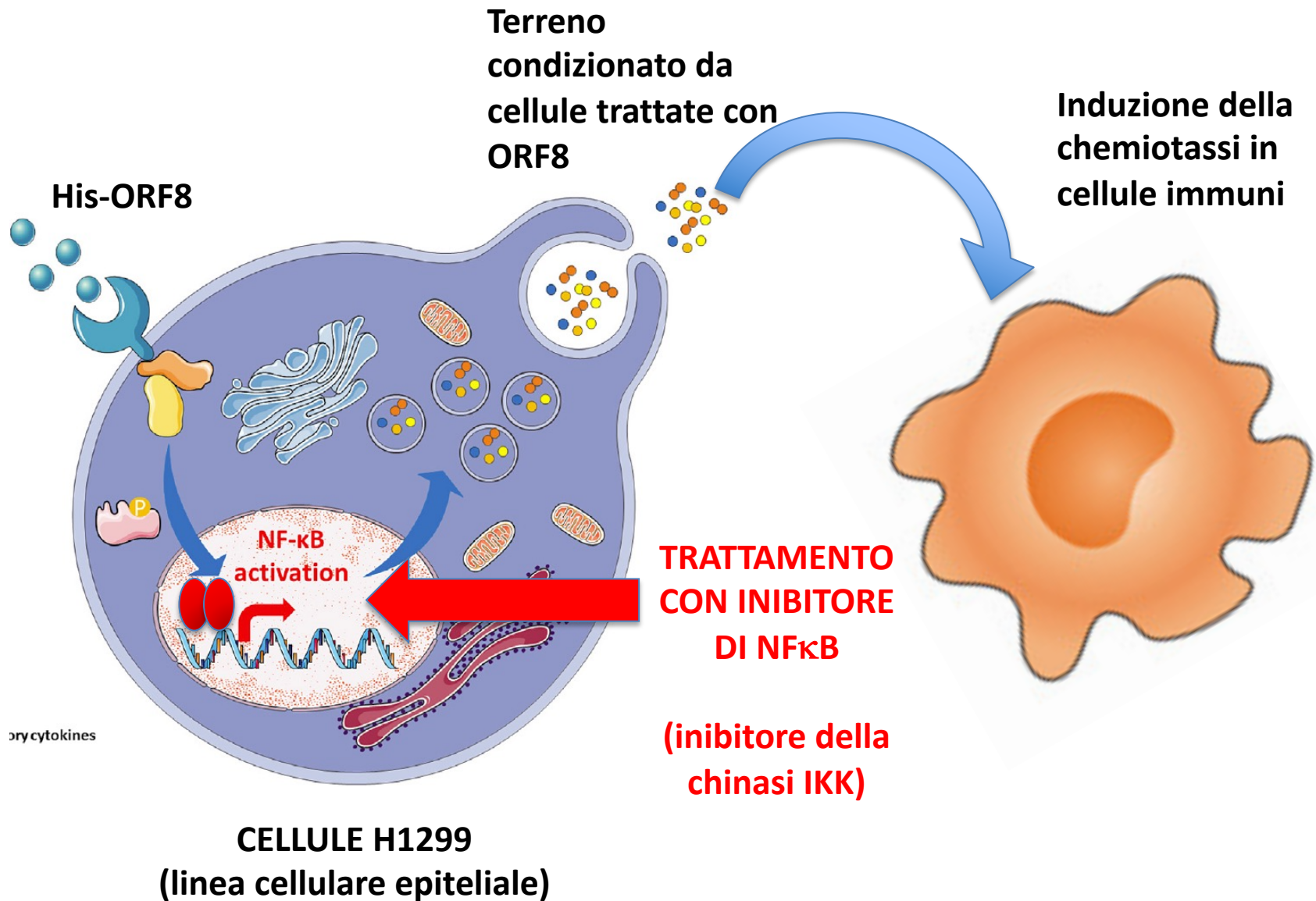
# STUDIO DEL MECCANISMO: Analisi del ruolo di NF- $\kappa$ B



# La via di trasduzione (pathway) di NF- $\kappa$ B

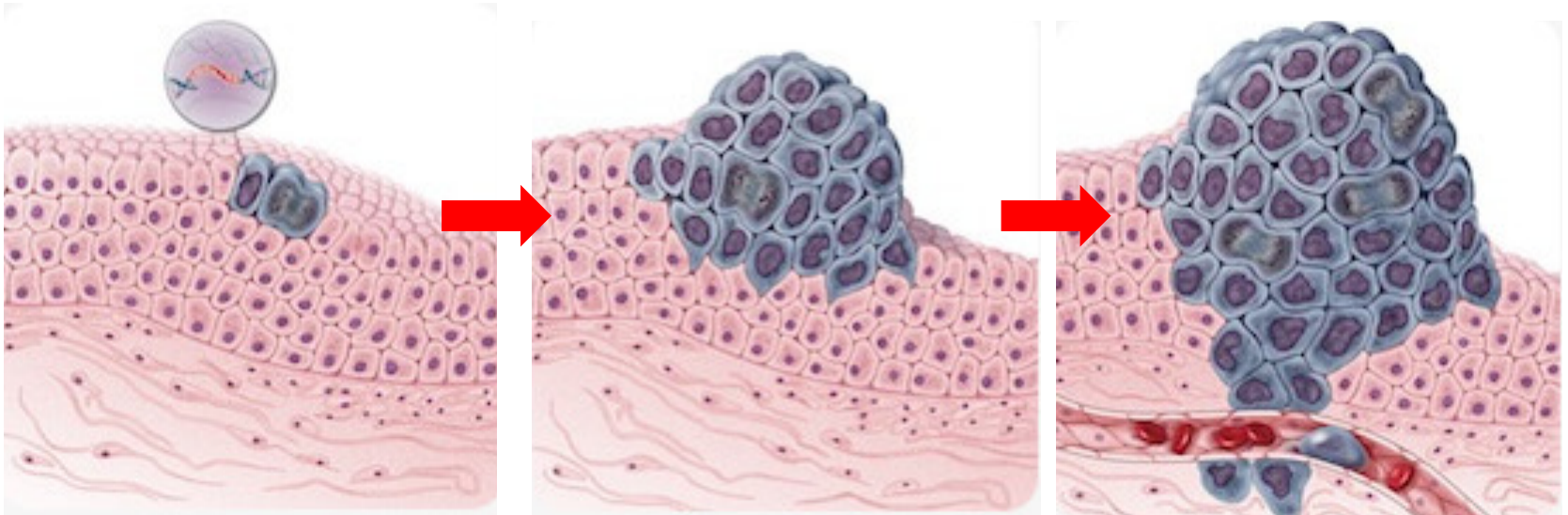


# Analisi del ruolo di NF- $\kappa$ B nel'attivazione delle cellule immuni



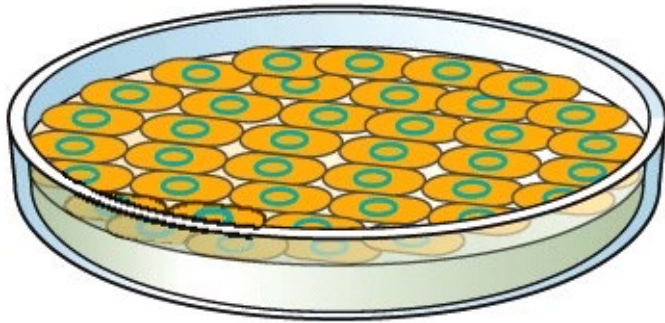


## Migrazione e invasione sono fenotipi tumorali



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

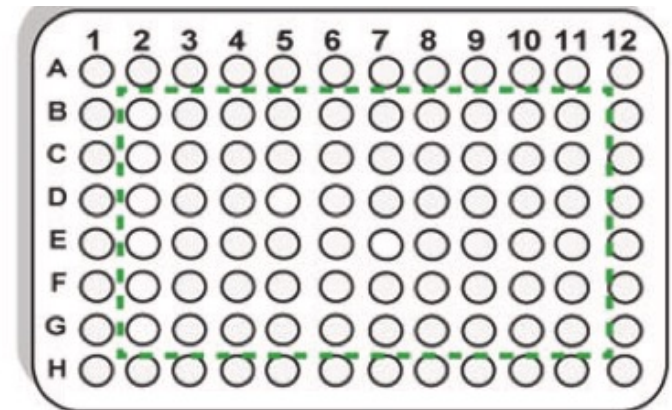
# Screening funzionali per farmaci/geni che regolano la migrazione



**Modello cellulare della patologia**



**Libreria di farmaci**



**Saggio morfologico/funzionale**

# Screening FUNZIONALI per farmaci

**Modello cellulare  
della patologia**

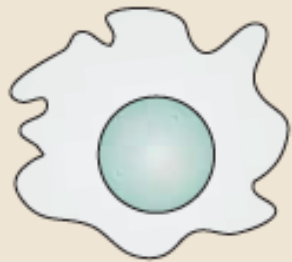
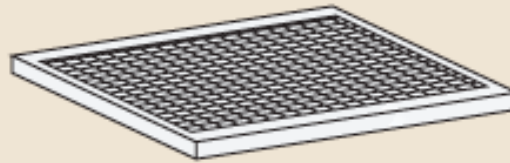
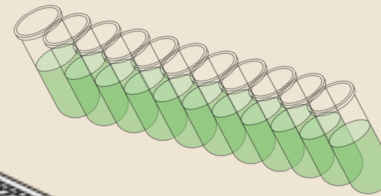


Plate cells onto  
clear bottom  
384-well plate



**Libreria di farmaci**



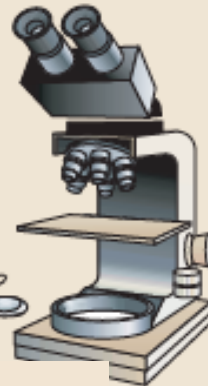
Transfer  
compounds  
onto cells



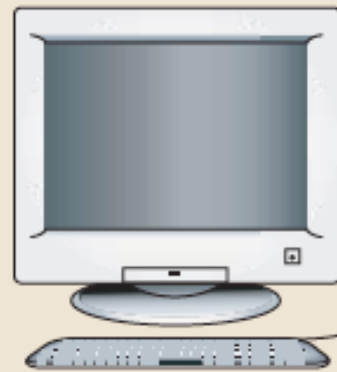
Compound  
treatment



**Cambiamento  
fenotipico**



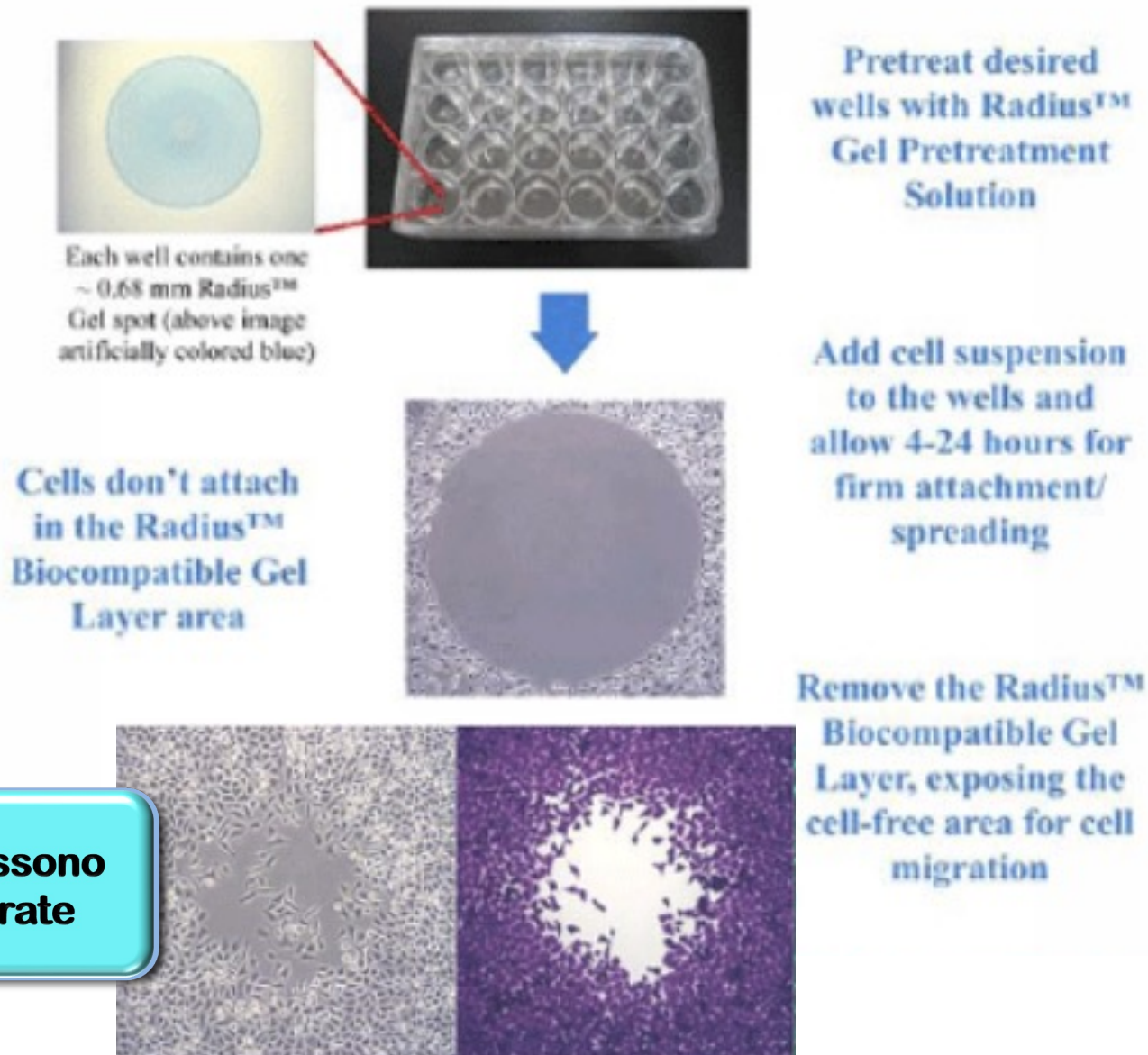
its



**Identificazione  
del farmaco**

**Analisi del fenotipo mediante Sistema  
high-content, high-throughput**

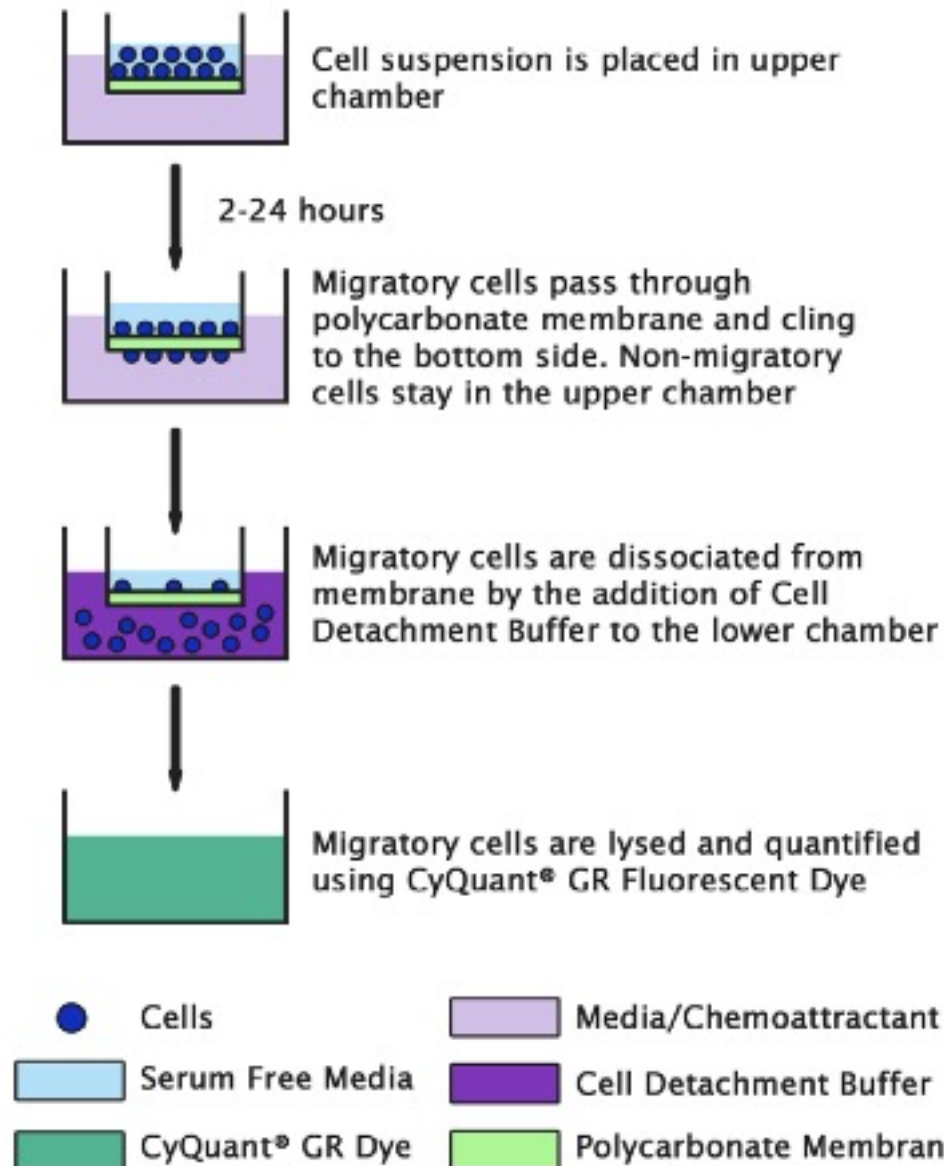
# Saggi di migrazione in piastra multipozzetto con lettura automatizzata al microscopio ottico/ reader



**Le cellule possono  
essere colorate**



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

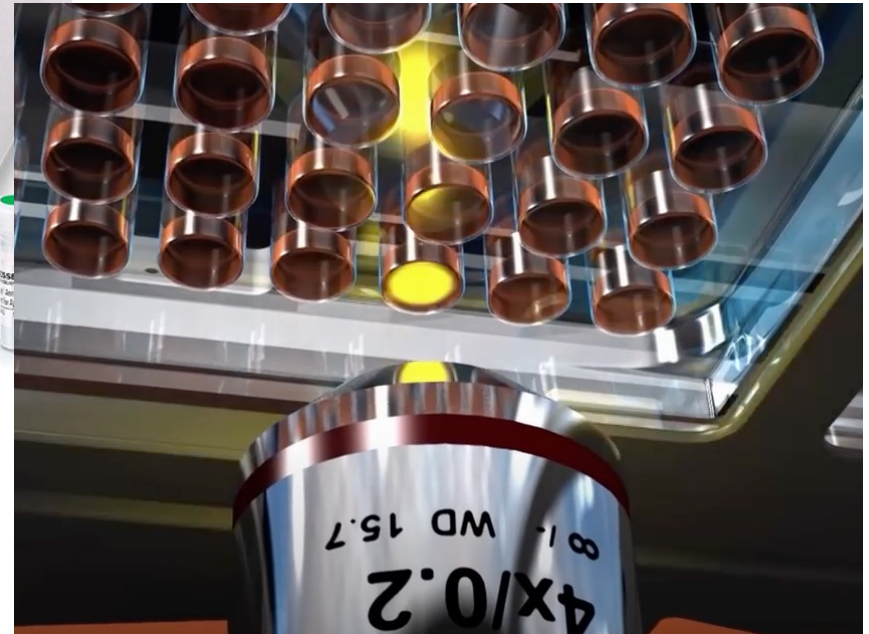


## Saggi di chemotassi mediante live imaging



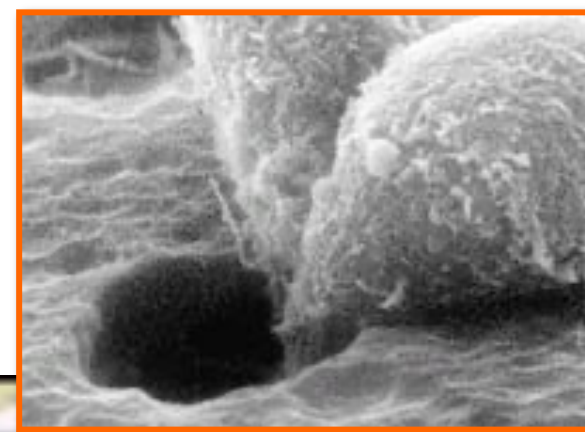
IncuCyte® live-cell analysis system

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



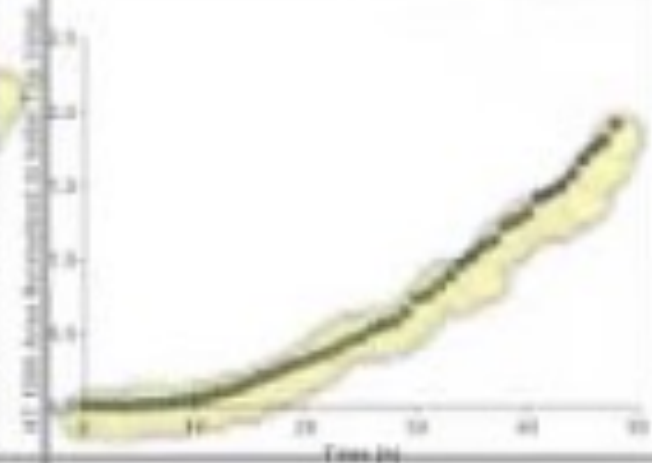


## Live imaging per saggi di transwelling



HT-1080 migration to FBS

Real time quantitative data



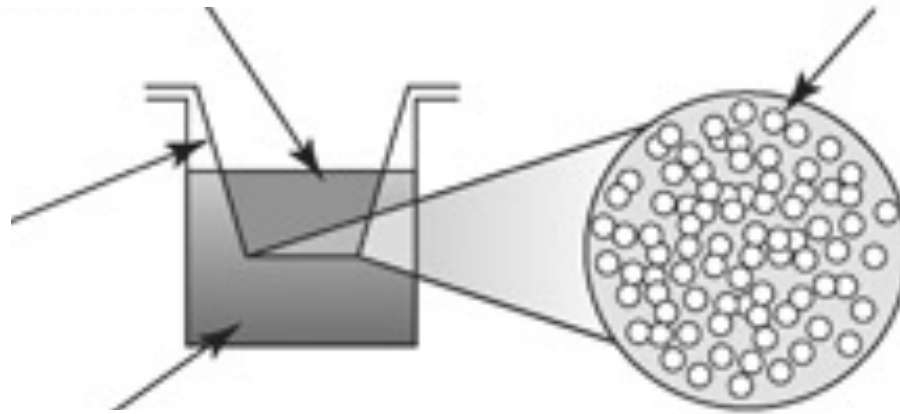
## Saggi di invasione

Pozzetto superiore:  
cellule seminate in  
matrice 3D

membrana  
porosa

Inserto

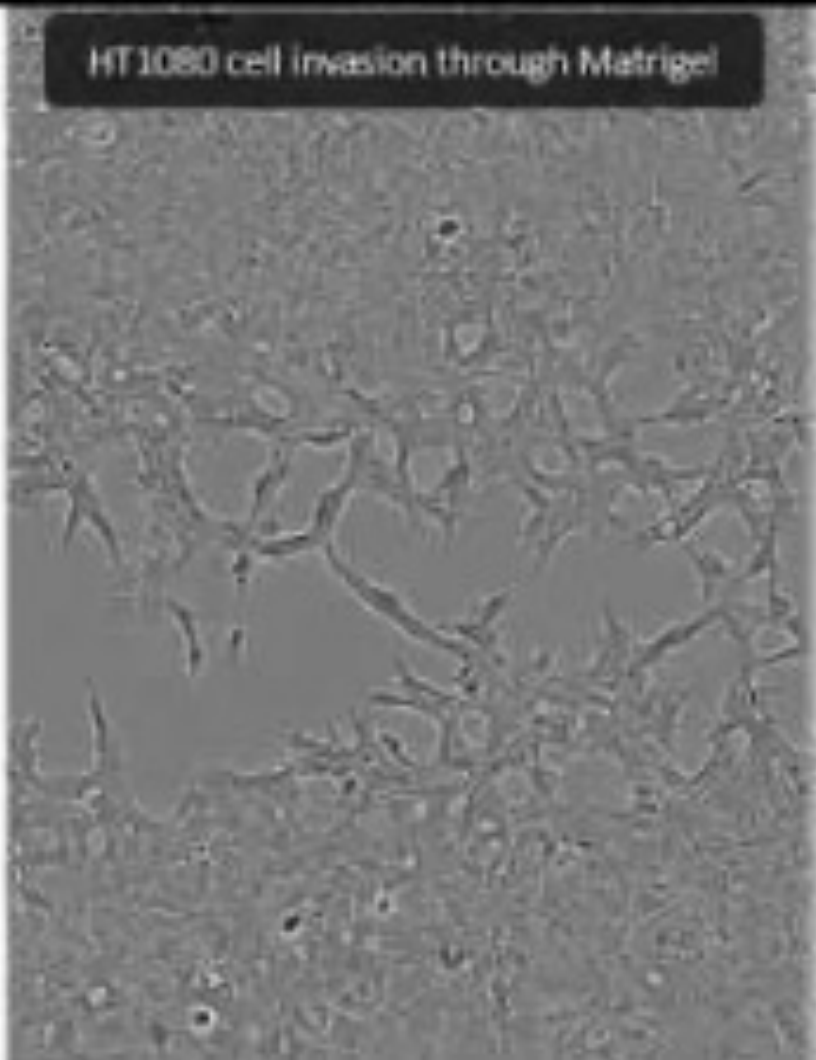
Terreno contenente  
siero



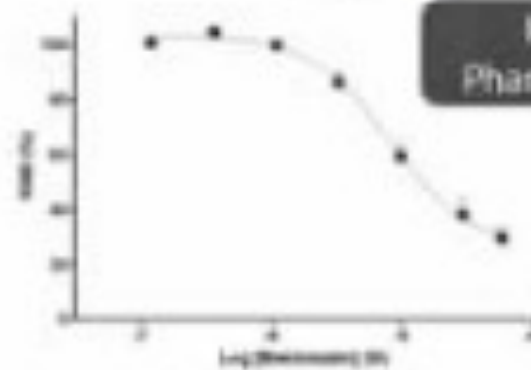
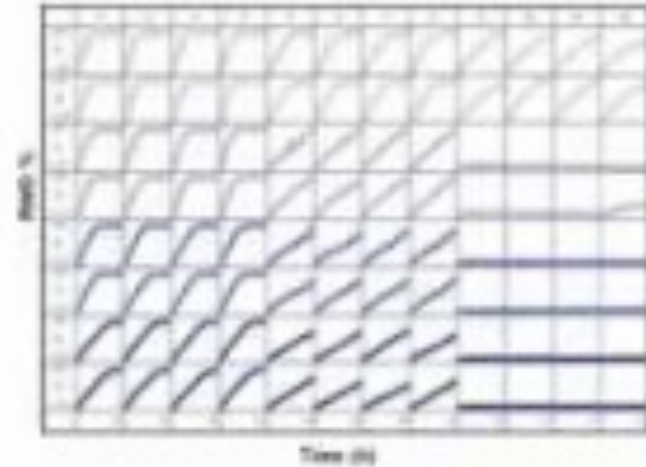
Si misura la capacità delle cellule di migrare attraverso una matrice polimerizzata su un filtro poroso

# Live imaging per saggi di invasione

HT1080 cell invasion through Matrigel



96 & 384-well kinetic plate views

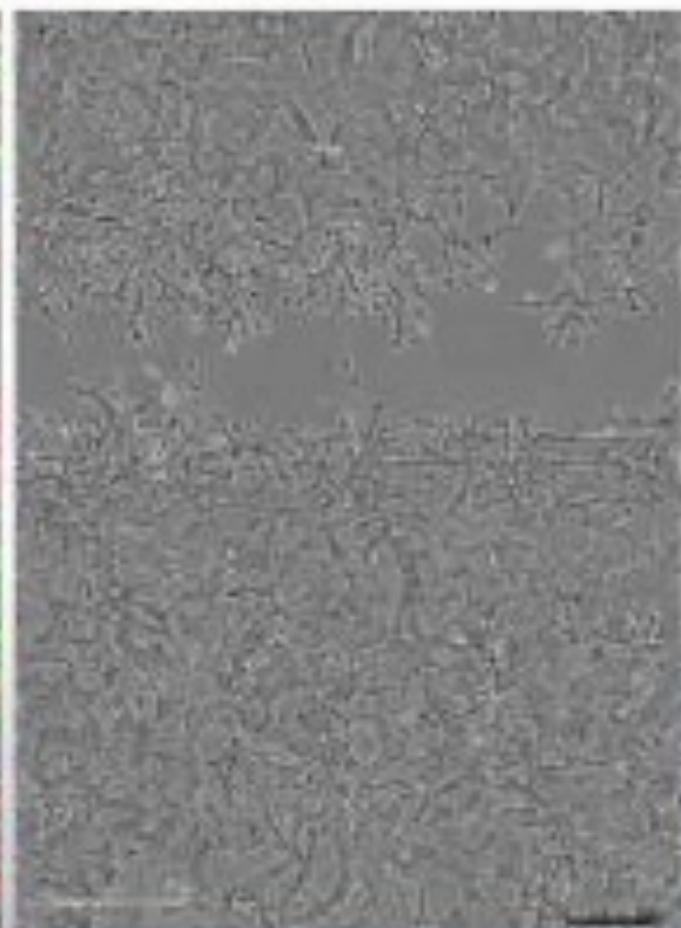
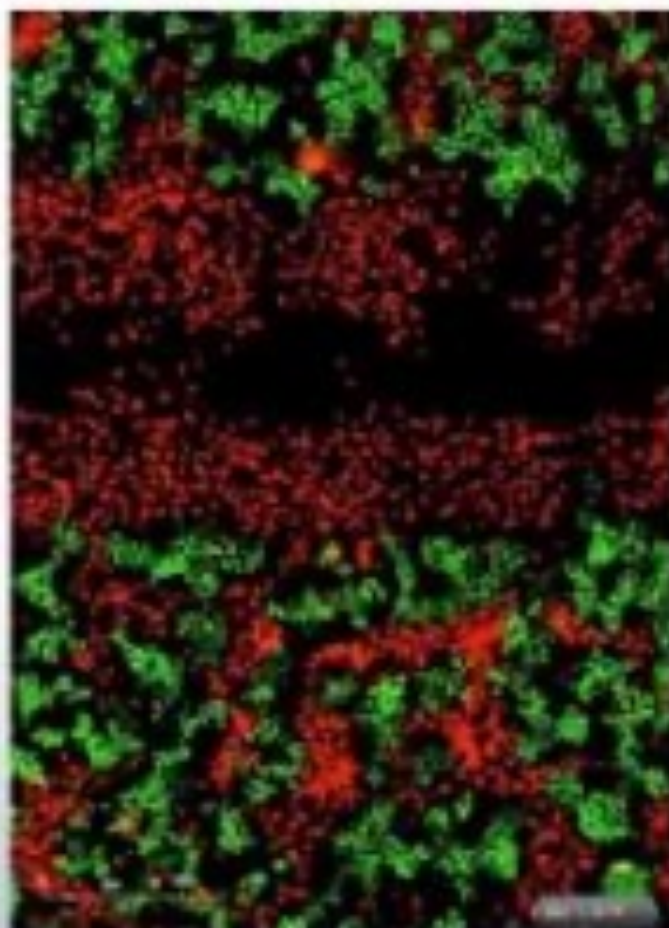
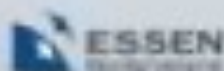


Kinetic Pharmacology

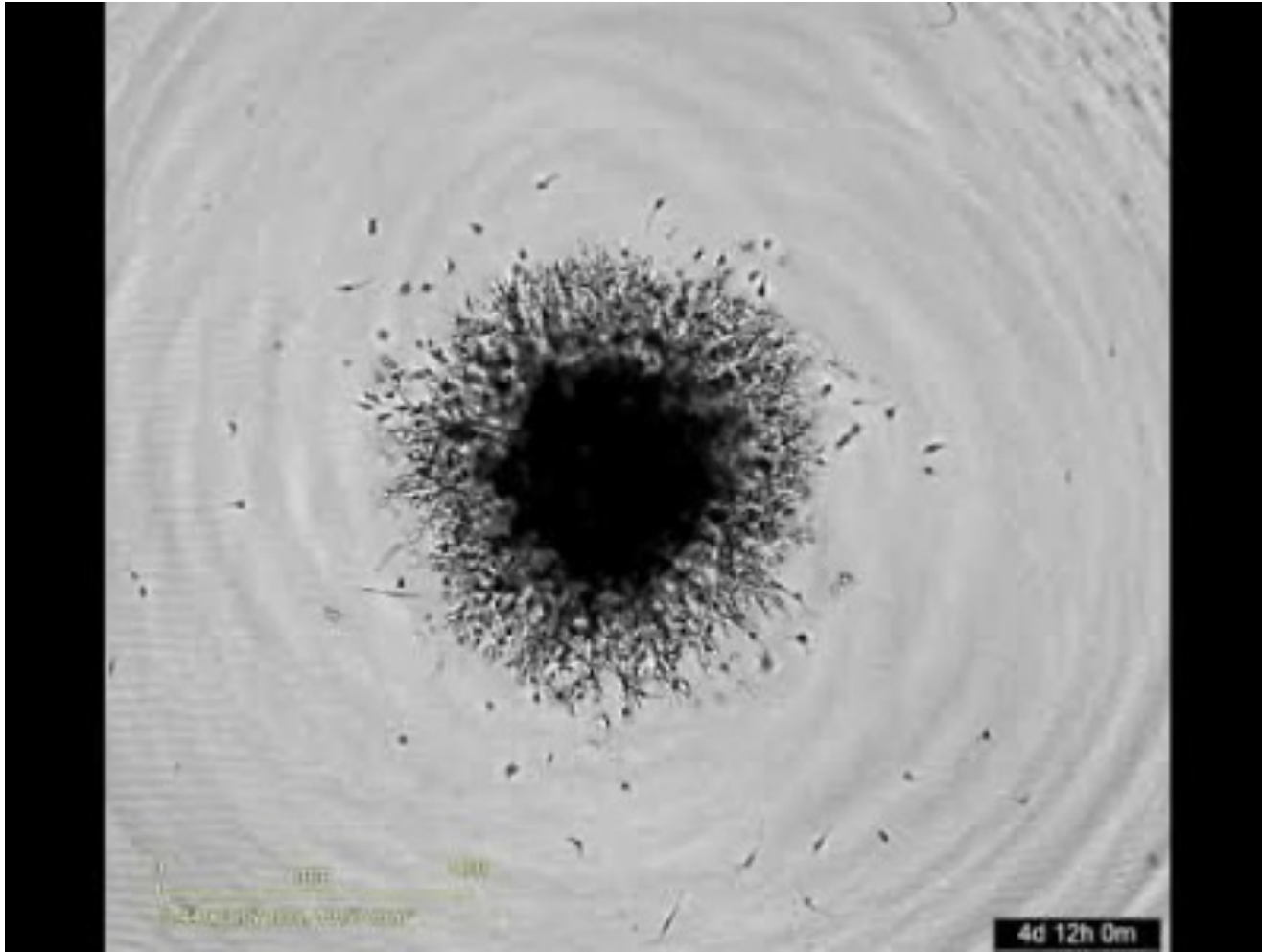
## Investigate Migration & Invasion Behavior in Mixed Cultures

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





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

(a)

