

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2025-2026

Corso di Biotecnologie Cellulari

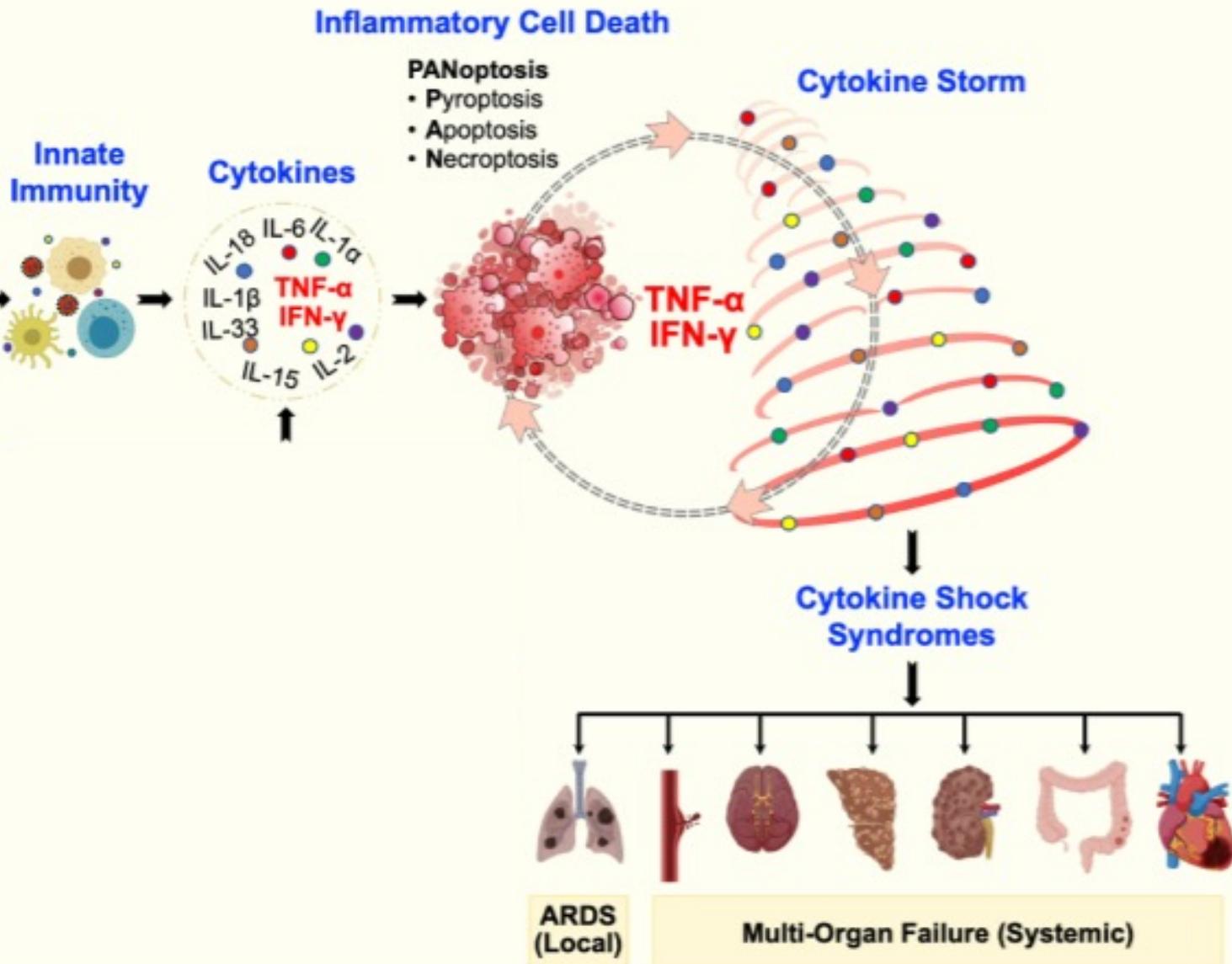
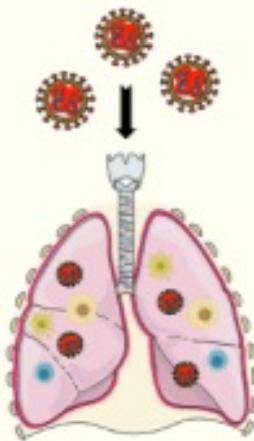
Lezione 9

PROSSIME LEZIONI

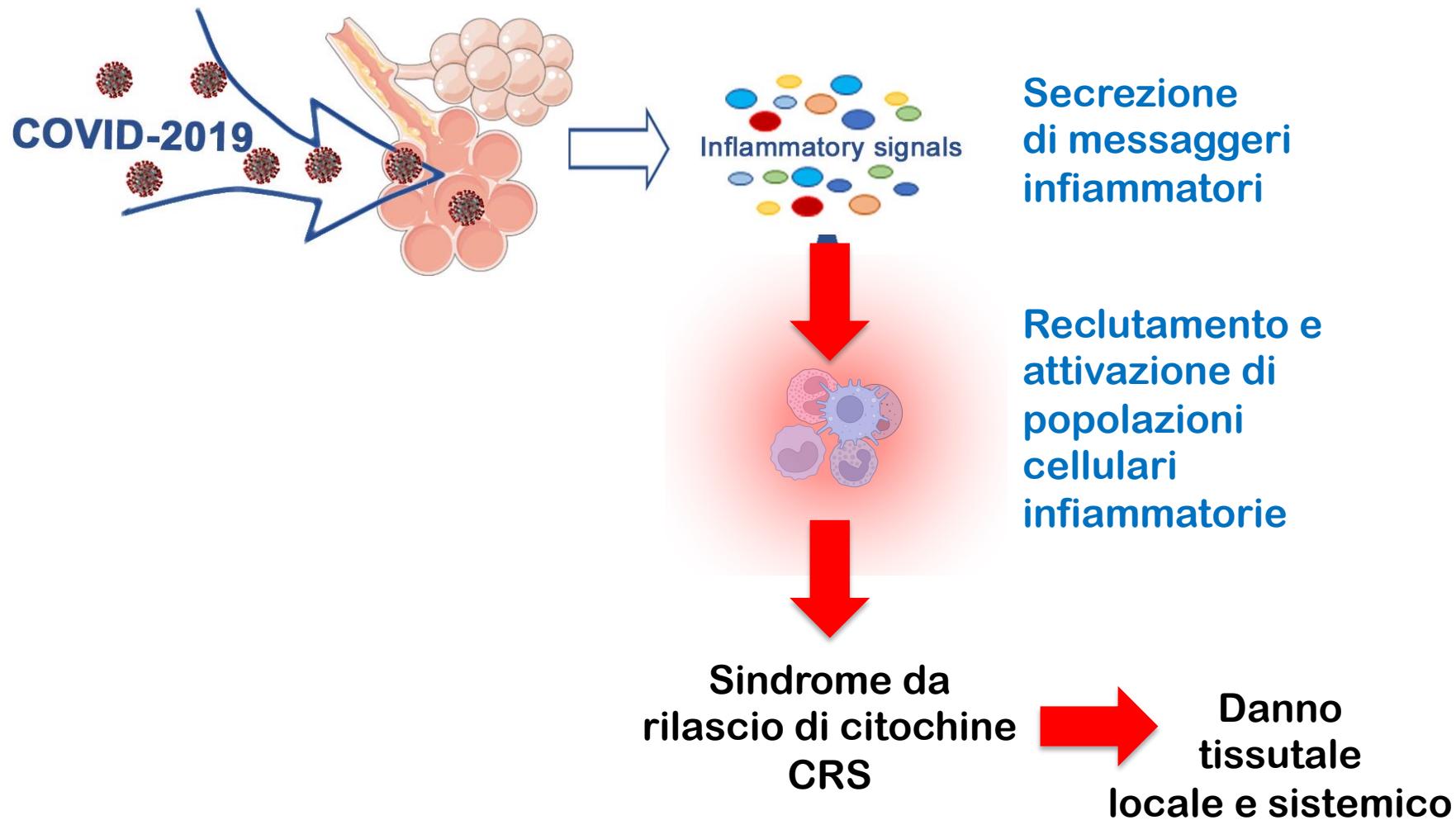
			
7	06/11		14-18 microscopia (1A)	14-18 trasfezione
	07/11	8-10 <u>Lez 9</u>	13-17 microscopia (1B)	13-17 IF
8	13/11		14-18 <u>chemotx</u>	14-18 microscopia (2A)
	14/11	8-10 <u>lez 10</u>	13-17 <u>chemotx</u>	13-17 microscopia (2B)
9	20/11			14-18 <u>chemotx</u>
	21/11	8-10 <u>Lez 11</u>		13-17 <u>chemotx</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

SARS-CoV-2 Infection



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****



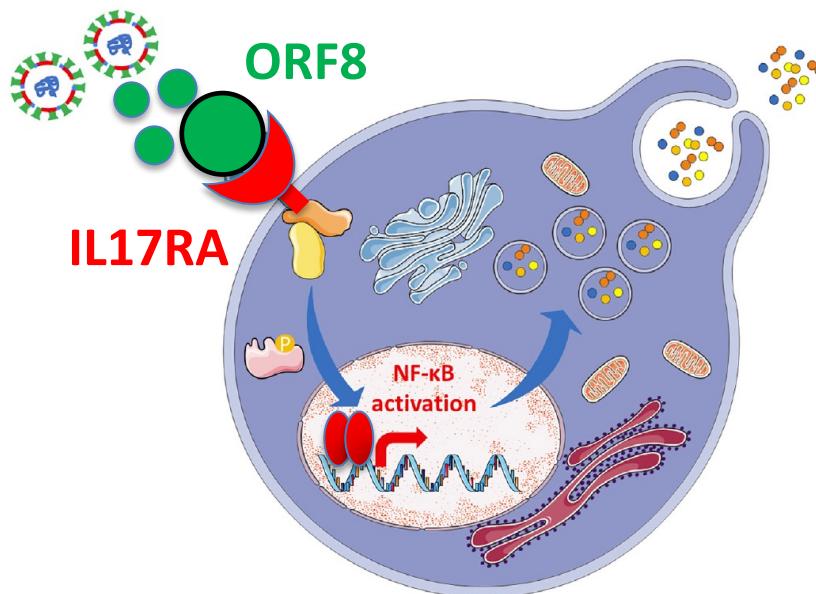
DATI PRELIMINARI

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:

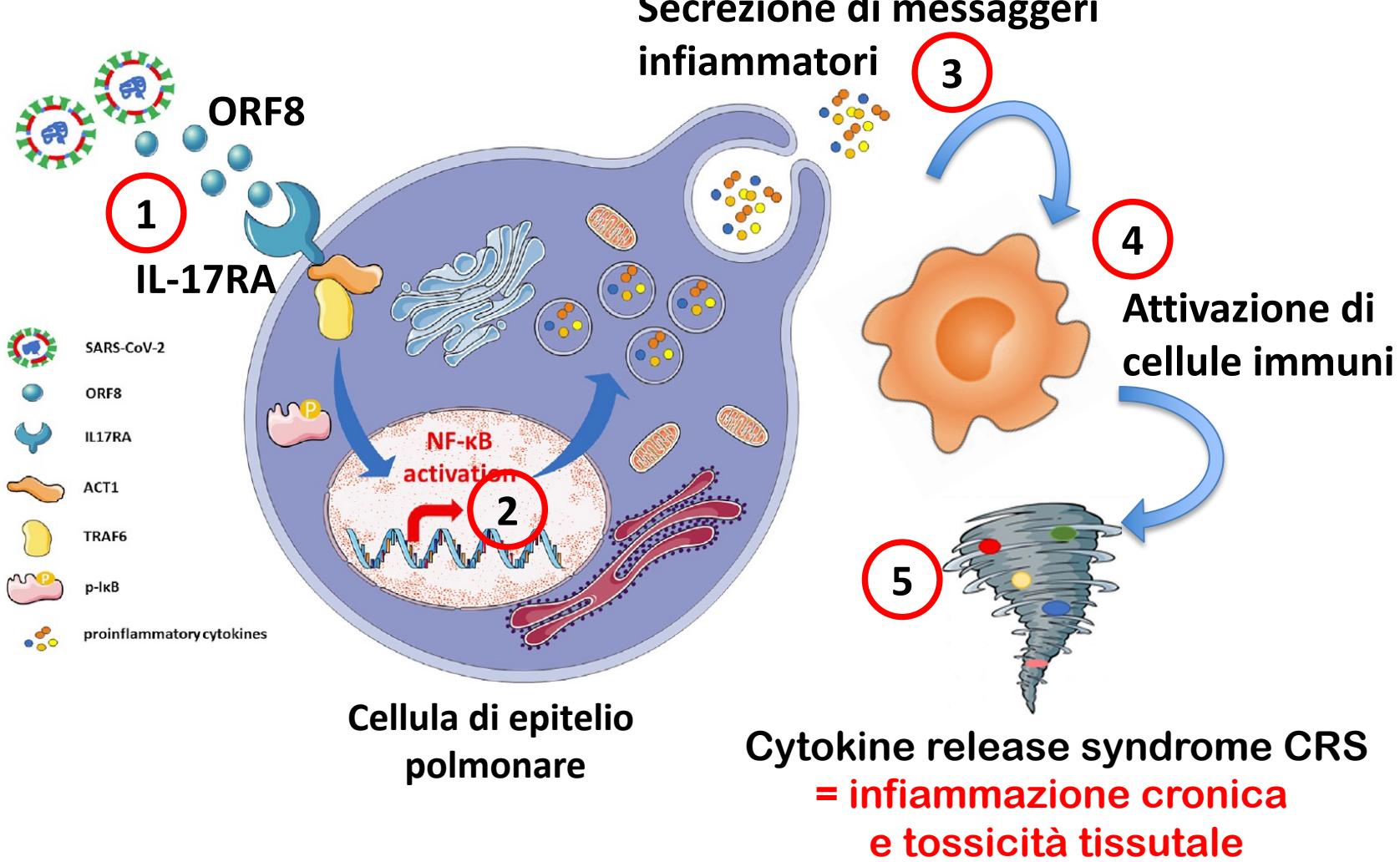
L'analisi ha evidenziato che la proteina ORF8 interagisce con la porzione extracellulare del recettore per IL-17 presente sulla superficie delle cellule di polmone



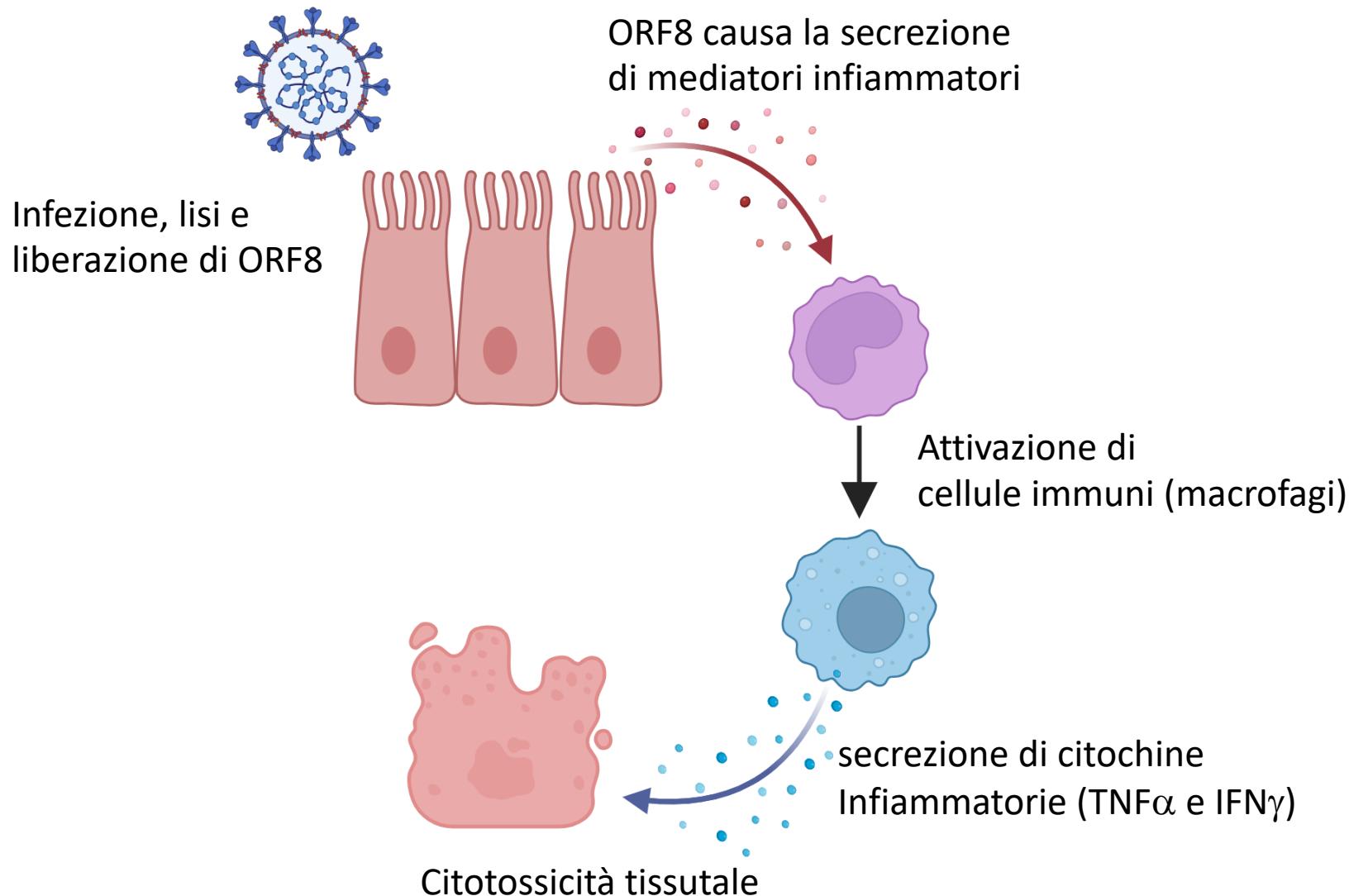
IPOTESI:

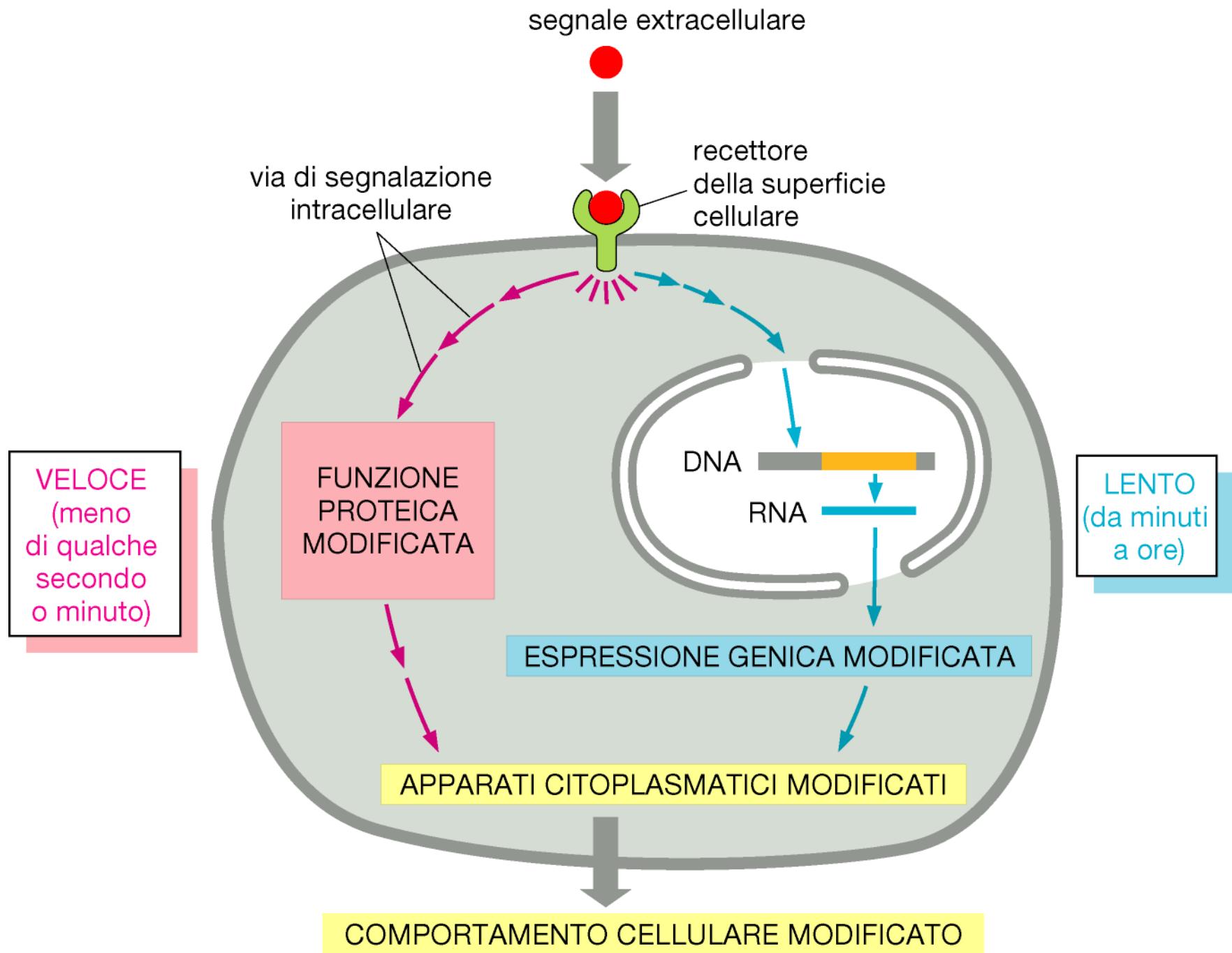
**la proteina ORF8 presente nell'ambiente extracellulare lega il
recettore IL-17RA sulle cellule di epitelio polmonare
innescando il rilascio di mediatori infiammatori
che causano attivazione di cellule immuni,
infiammazione cronica e conseguente danno tissutale**

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

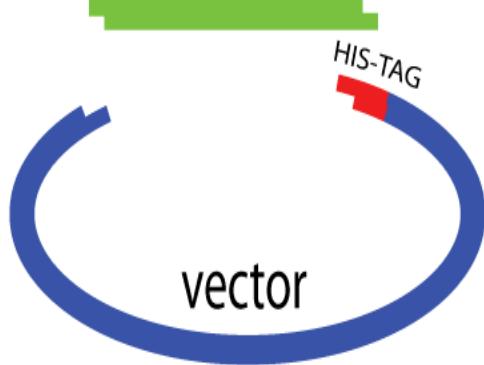
c) Analisi degli eventi a valle

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

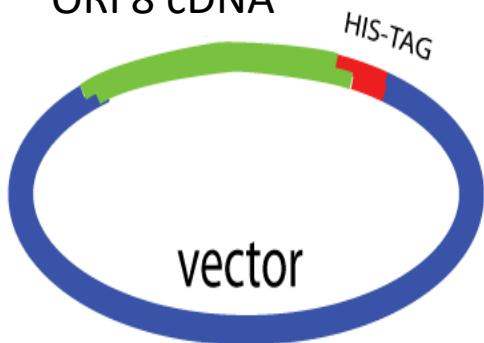
Produzione batterica e purificazione della proteina ORF8-His (eseguito dai docenti)

- Clonaggio

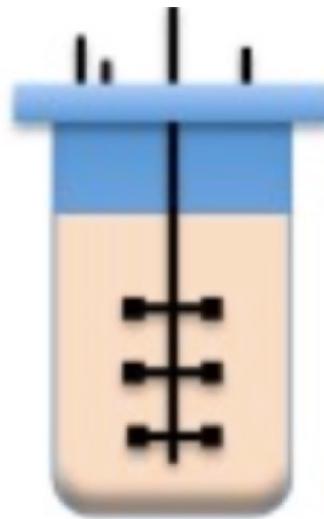
ORF8 cDNA



ORF8 cDNA

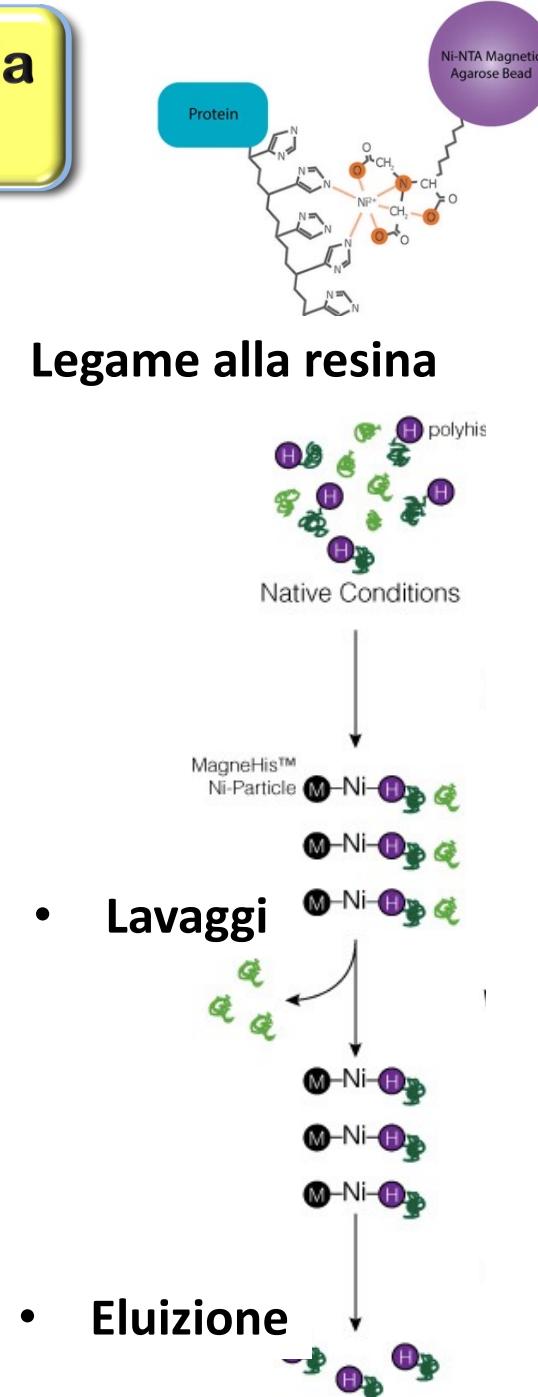


- Trasformazione batterica
- Selezione
- Coltura



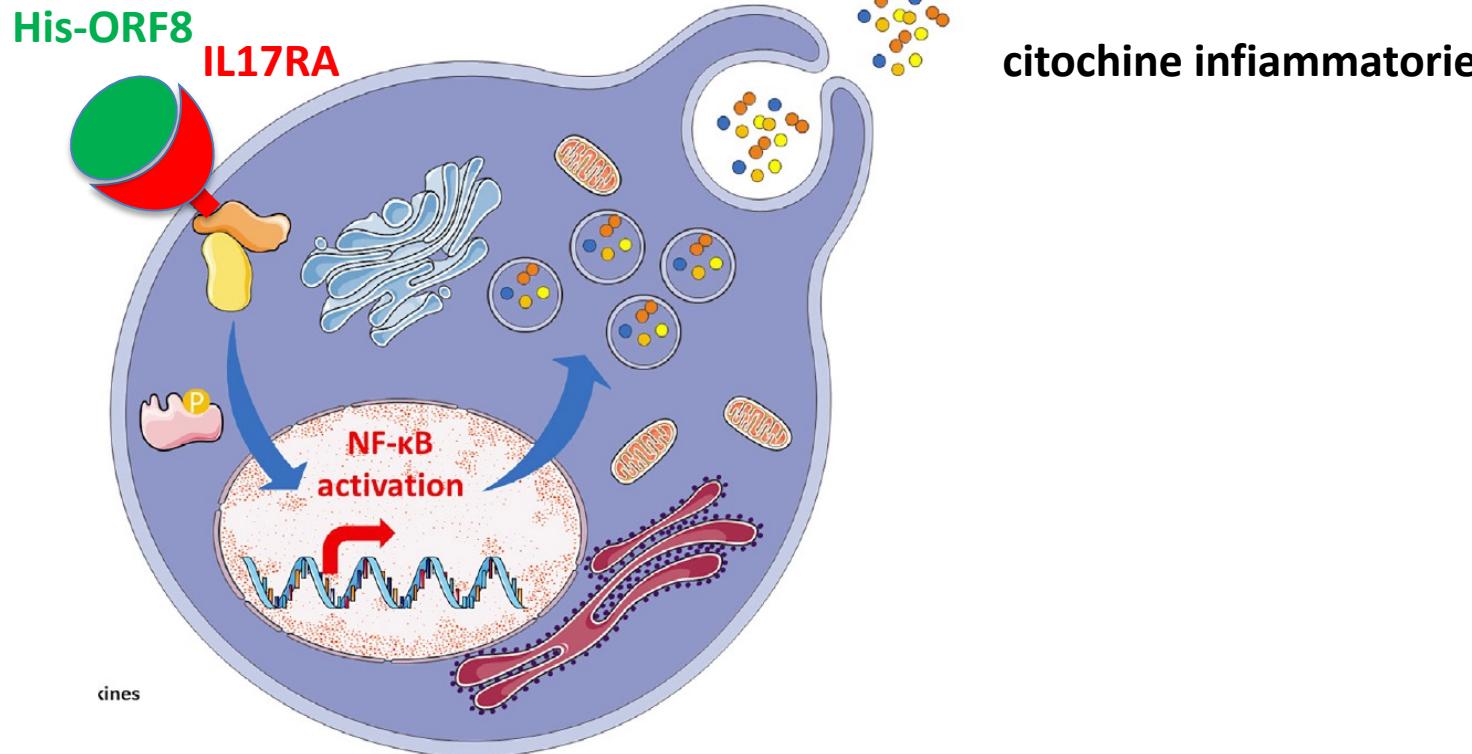
- Lisi dei batteri

- Legame alla resina



Trattamento di cellule polmonari con proteina ORF8-His

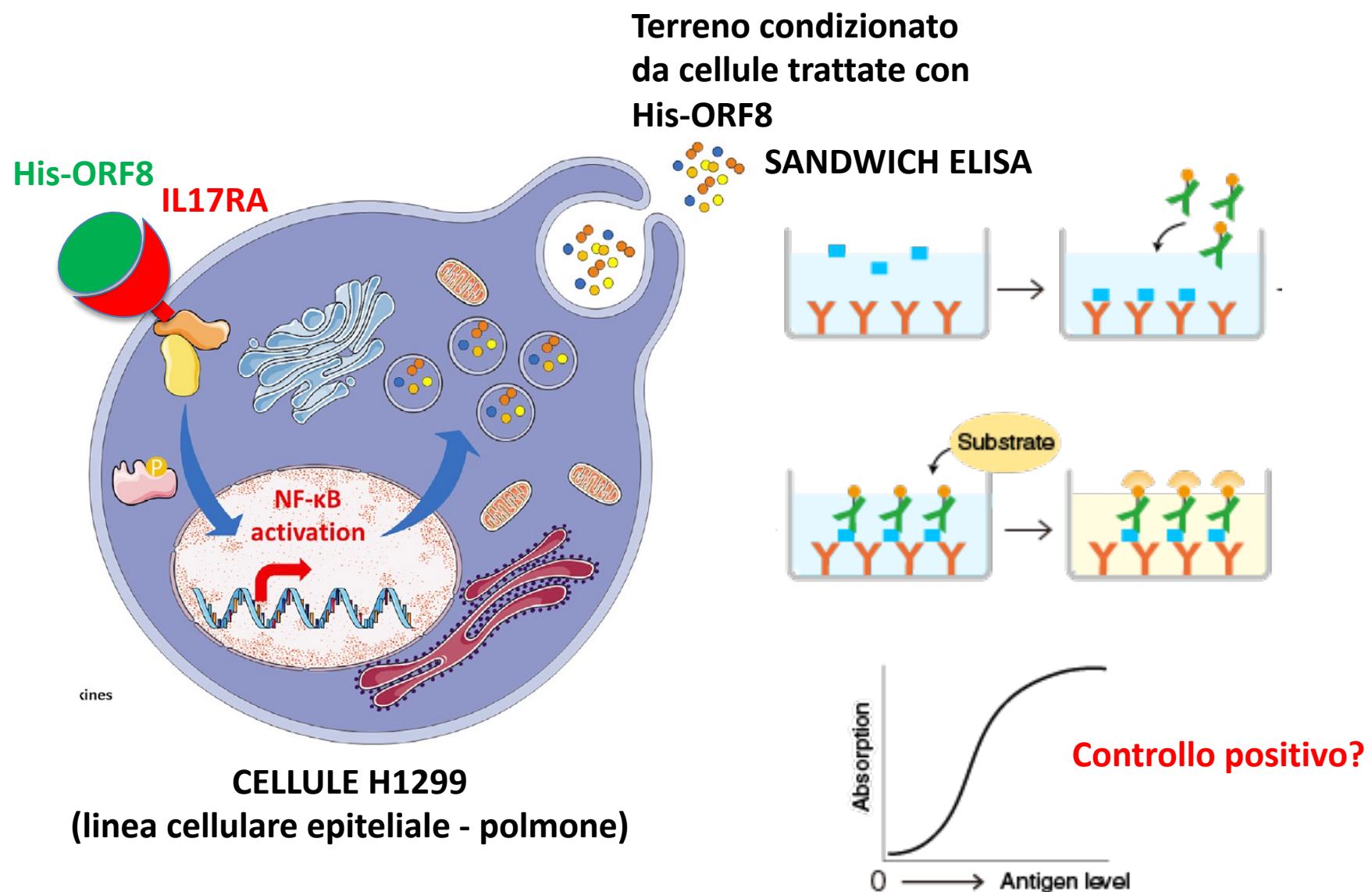
Terreno condizionato da
cellule trattate con ORF8-His



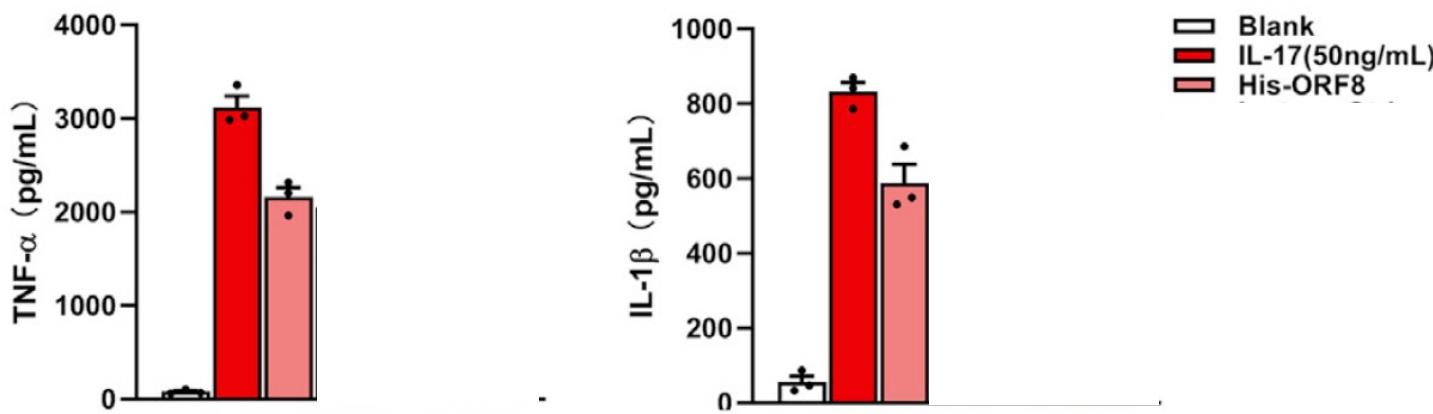
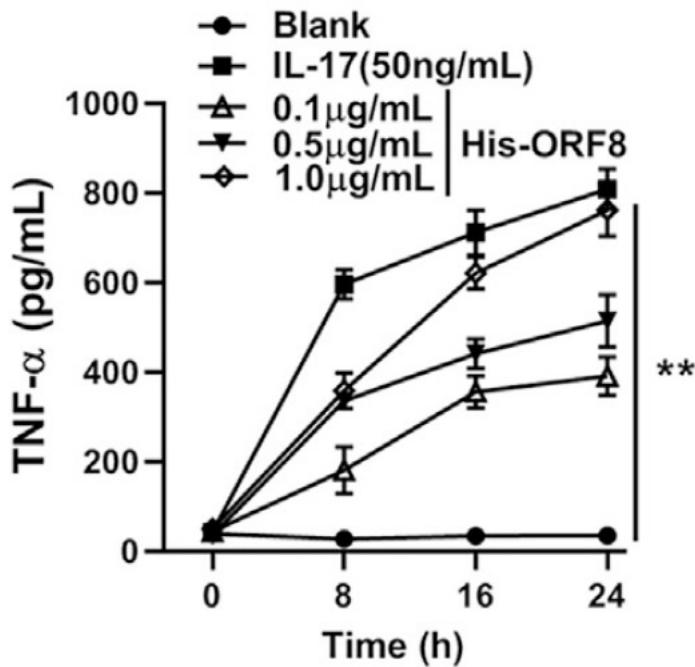
CELLULE H1299
(linea cellulare epiteliale - polmone)

Esperimento preliminare (docente)

Dosaggio delle citochine secrete in risposta al trattamento con ORF8

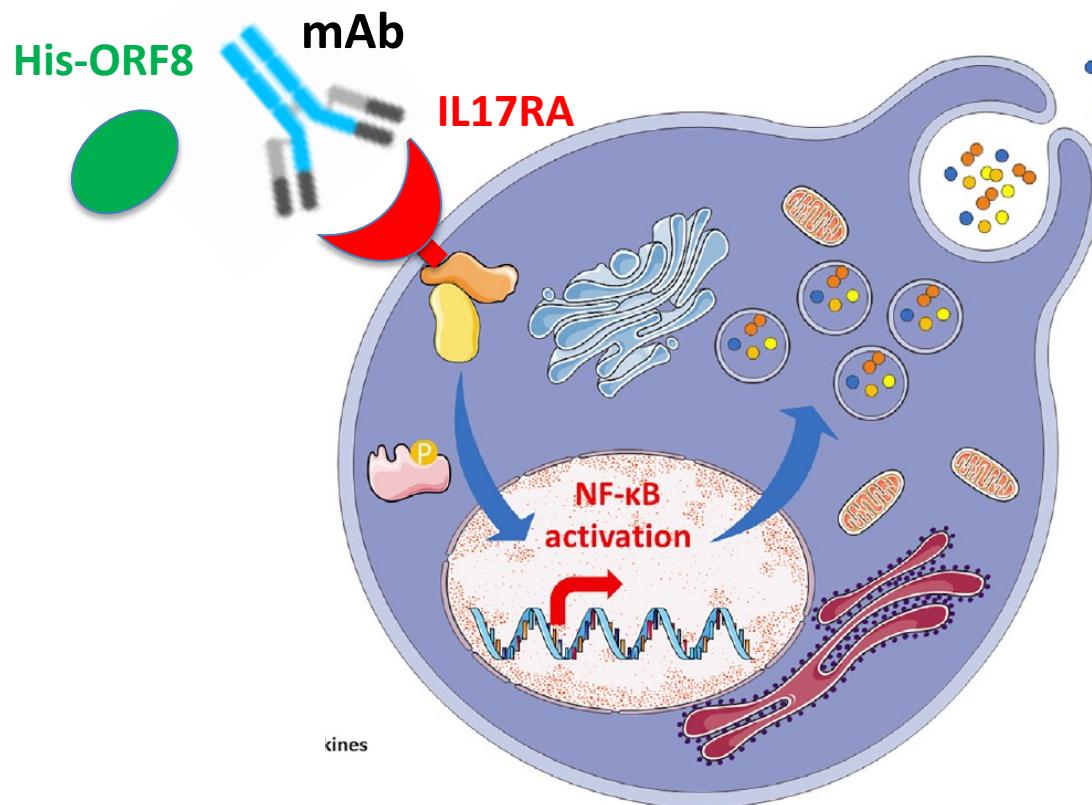


**Dosaggio di citochine secrete
dopo stimolazione con ORF8**
- controllo positivo: IL-17

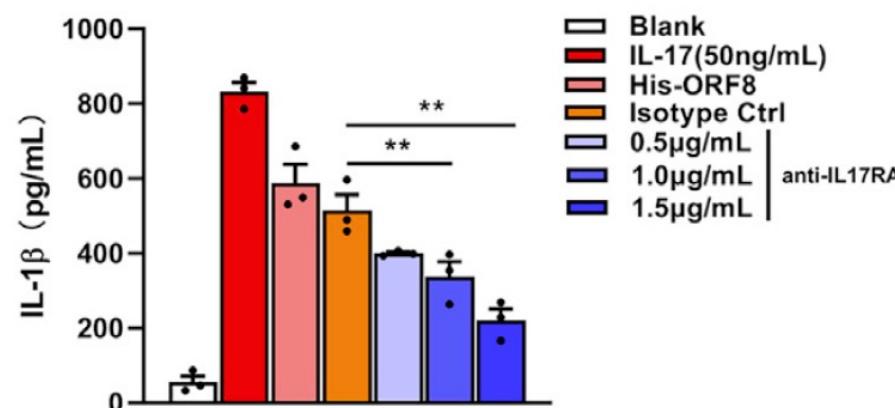
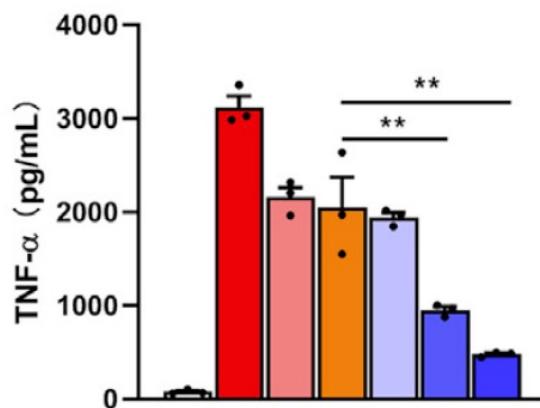
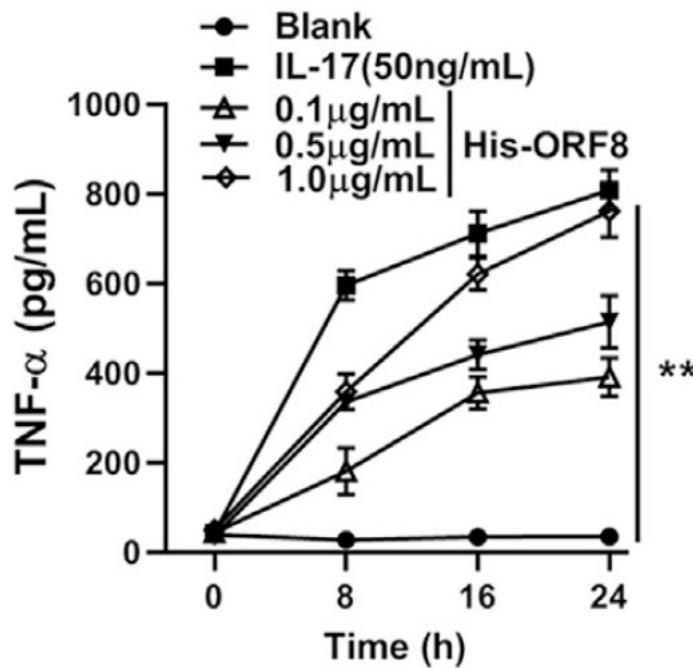


Analisi del ruolo dell'interazione di ORF8 con IL-17RA

- 1) cellule non trattate
- 2) cellule trattate con **His-ORF8** (1 µg/ml 24h)
- 3) cellule incubate con **anticorpo neutralizzante anti-IL17RA** (impedisce il legame di ORF8) e successivamente con His-ORF8 (1 µg/ml 24h)

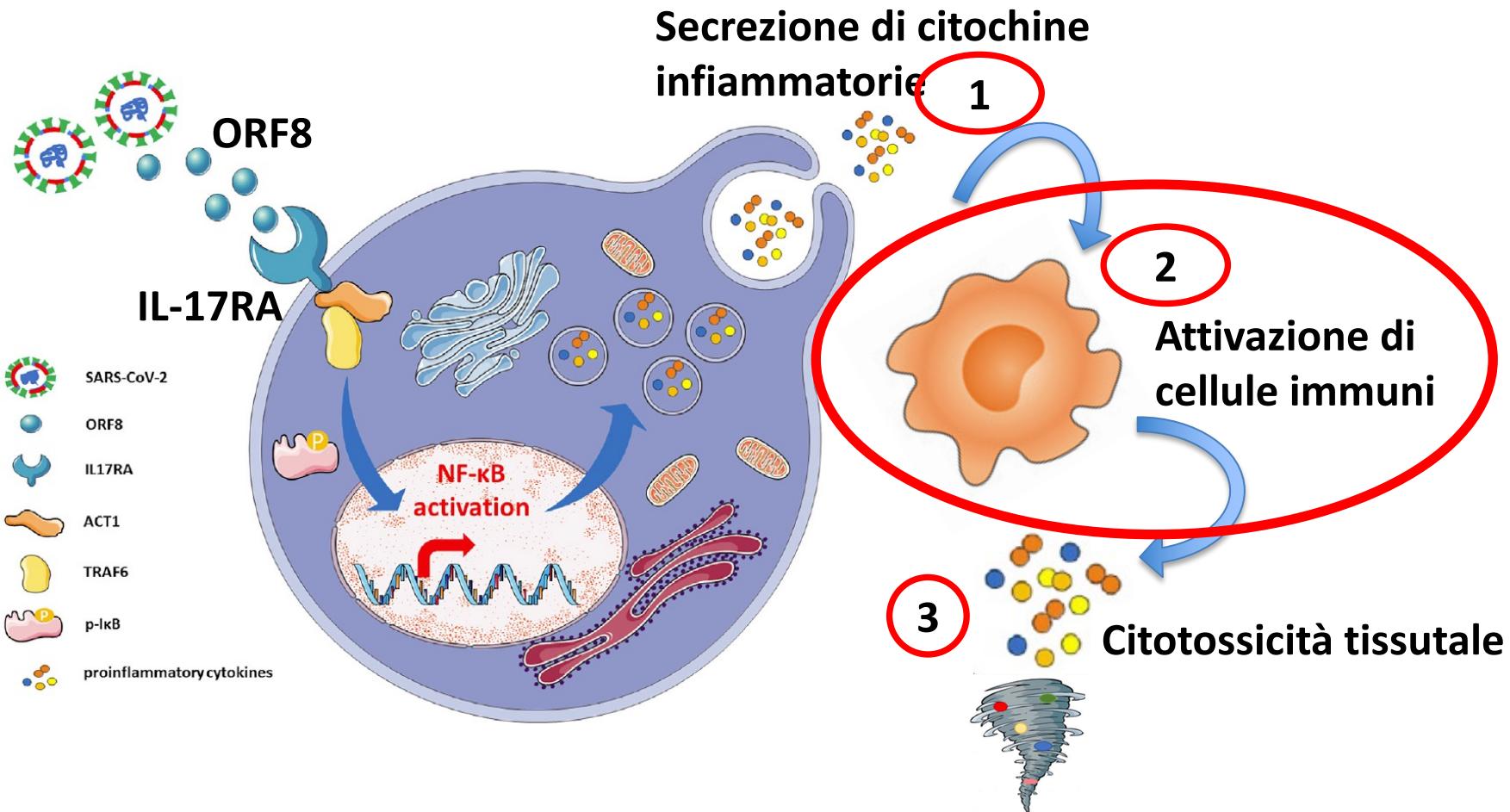


Controllo di specificità per IL-17RA: anticorpo neutralizzante



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

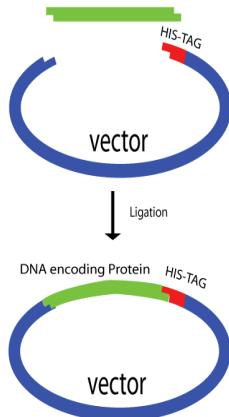
STRATEGIA Sperimentale:

1) Scelta dei modelli cellulari

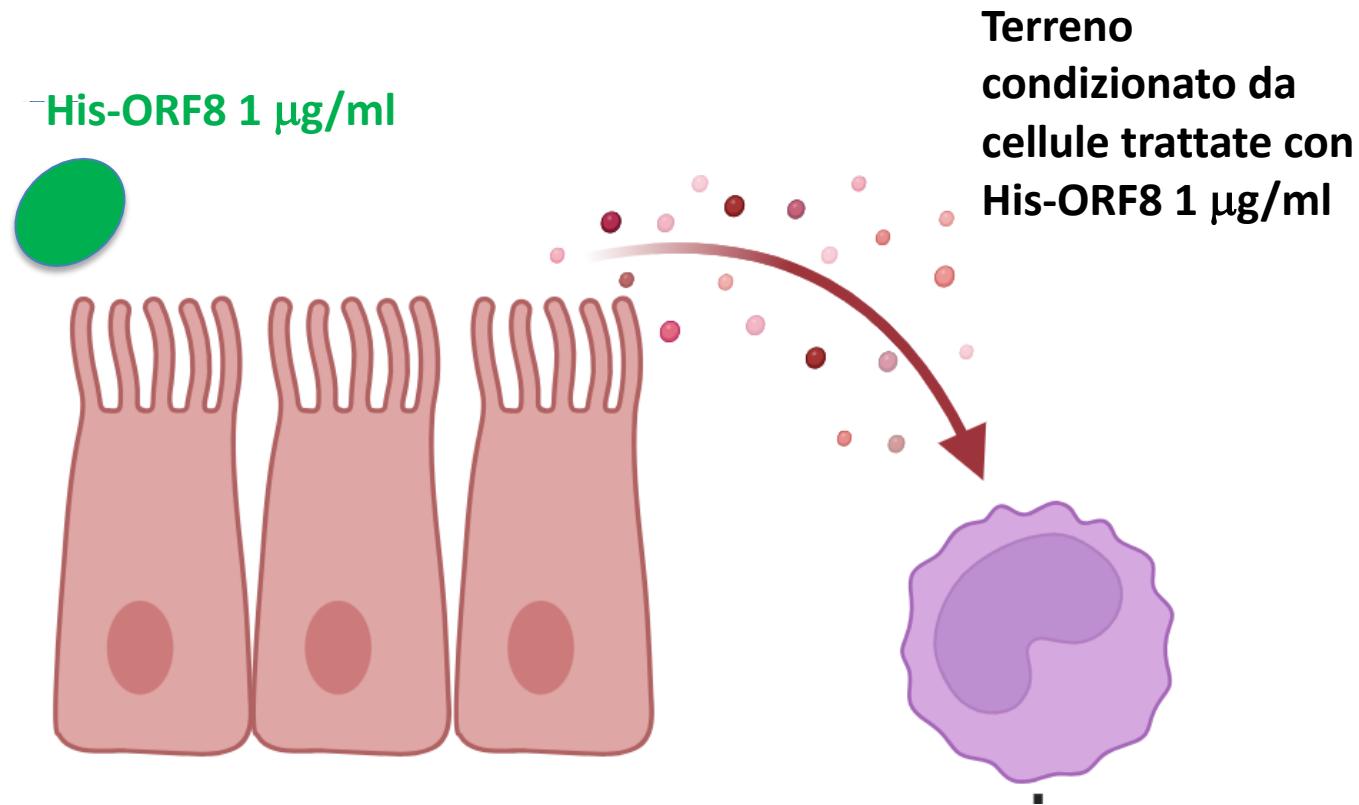
H1299 (linea di cellule epiteliali – origine polmone)
THP-1 (linea di cellule monocitiche)

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

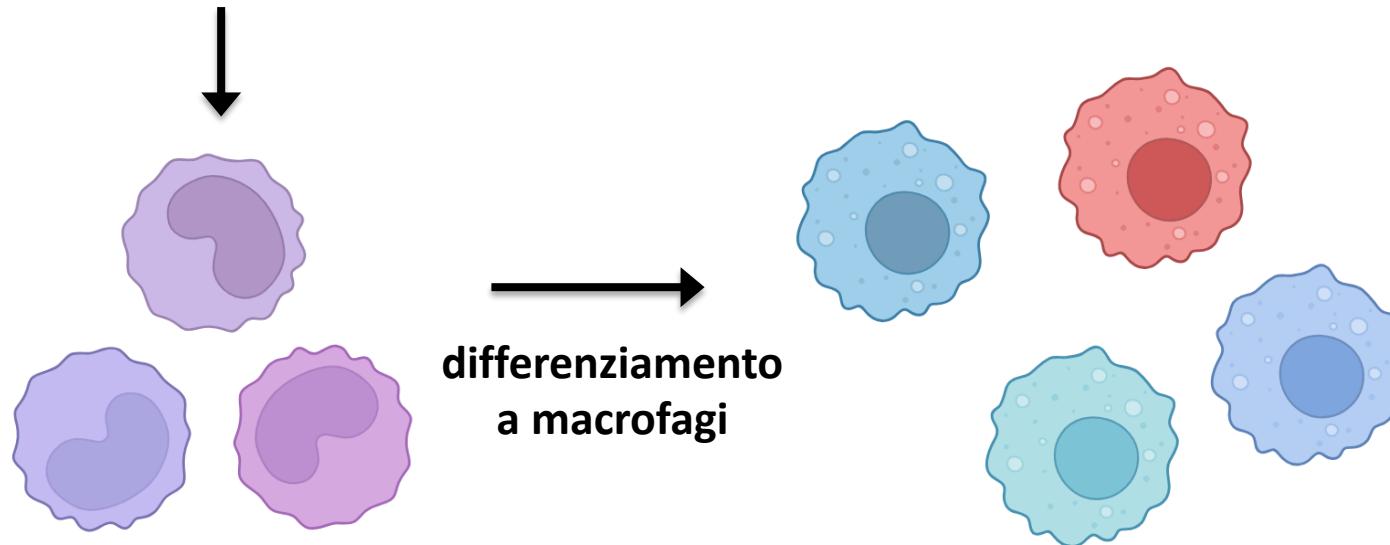


CELLULE H1299
(linea cellulare epiteliale - polmone)

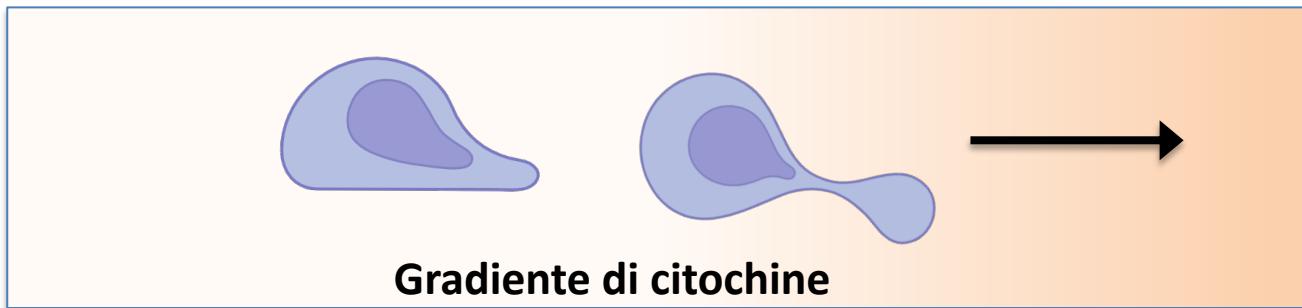
Incubazione di CELLULE THP-1
(linea cellulare monocitica)
con il terreno condizionato

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

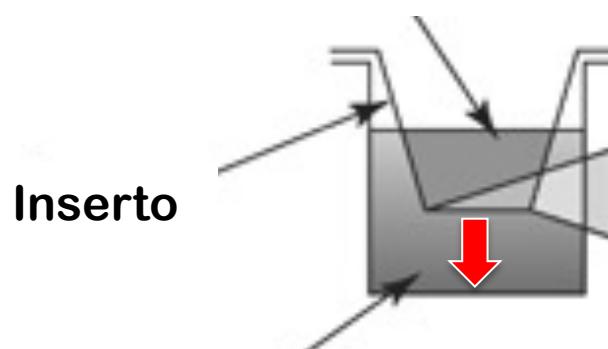
analisi dell'effetto del TC sull'attivazione di macrofagi mediante saggio di chemotassi (transwelling)

4) Scelta dello strumento

Analisi delle cellule migrate al microscopio ottico

SAGGIO di chemotassi con camera di Boyden (transwelling)

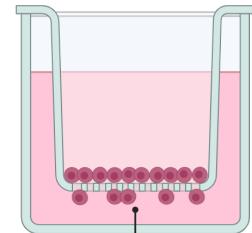
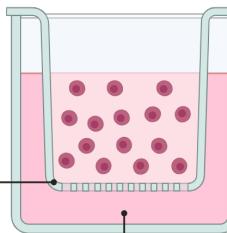
Pozzetto superiore con cellule THP-1



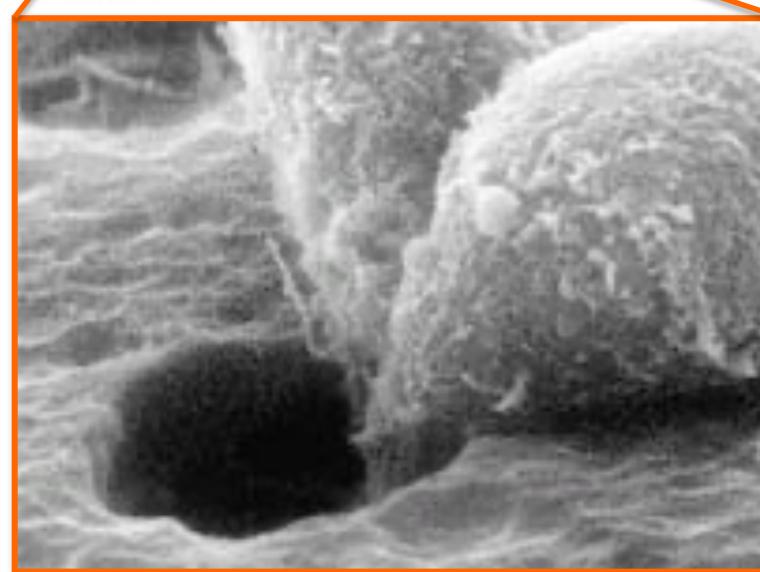
Pozzetto inferiore contenente terreno condizionato da cellule H1299 trattate o meno con His-ORF8

Membrana porosa

Transwell insert

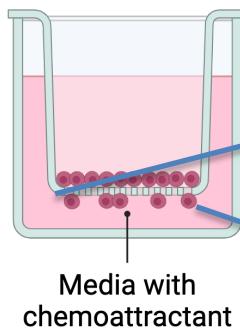
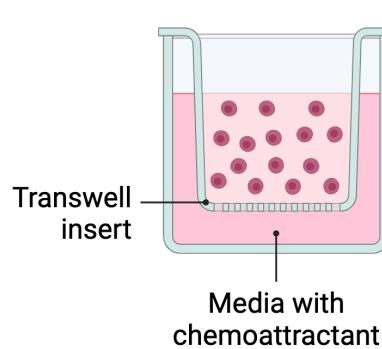


Media with chemoattractant



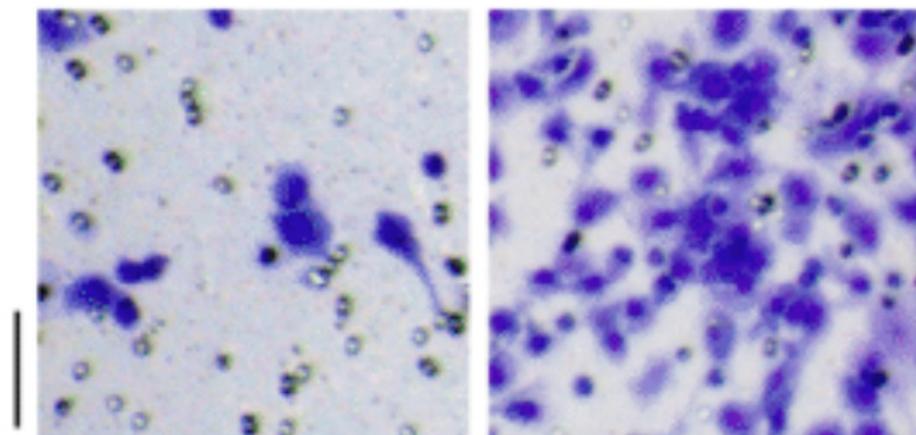
STRUMENTO: conta delle cellule al microscopio ottico dopo colorazione

Pozzetto superiore
con cellule THP-1



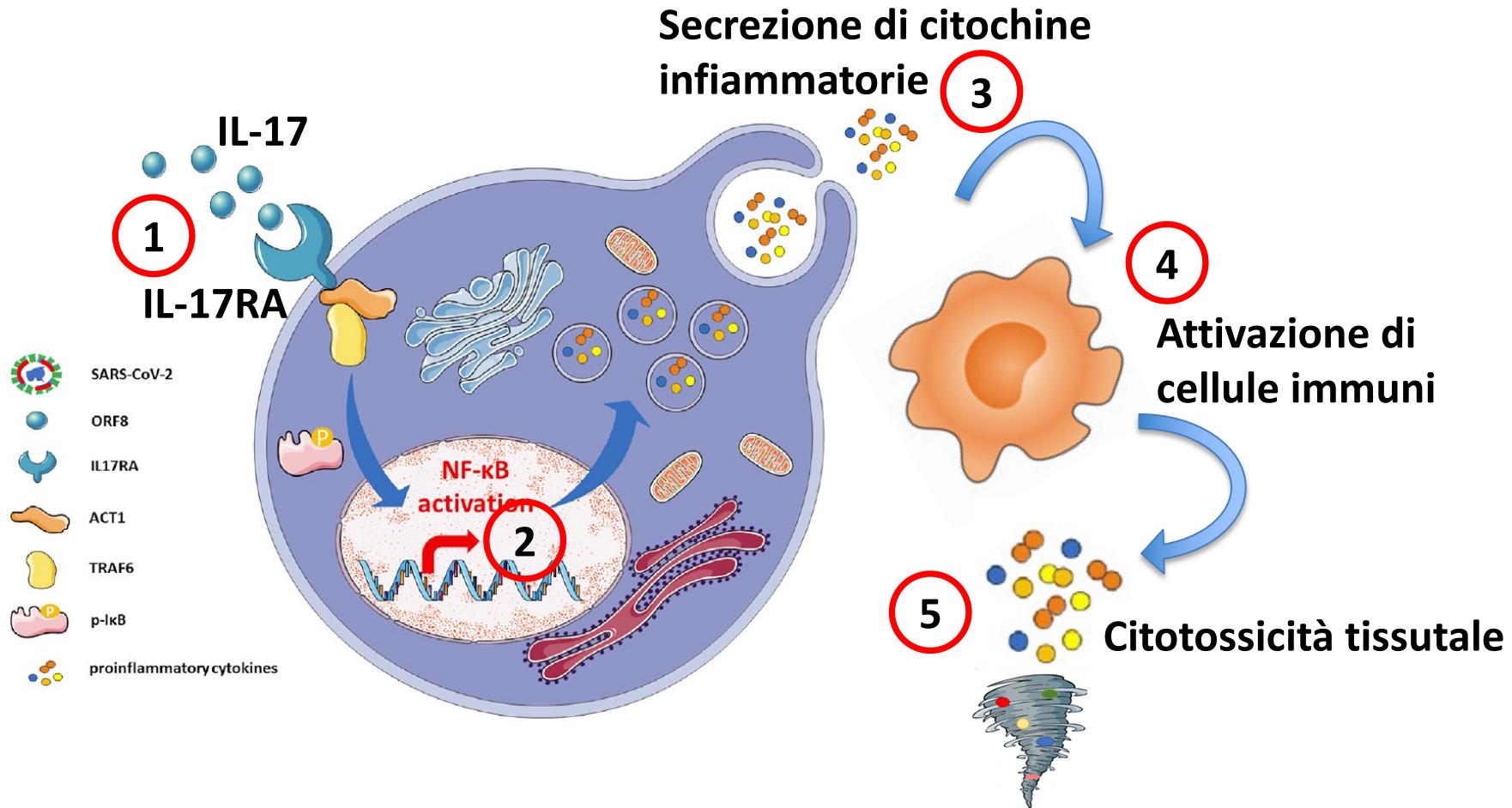
Membrana porosa

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

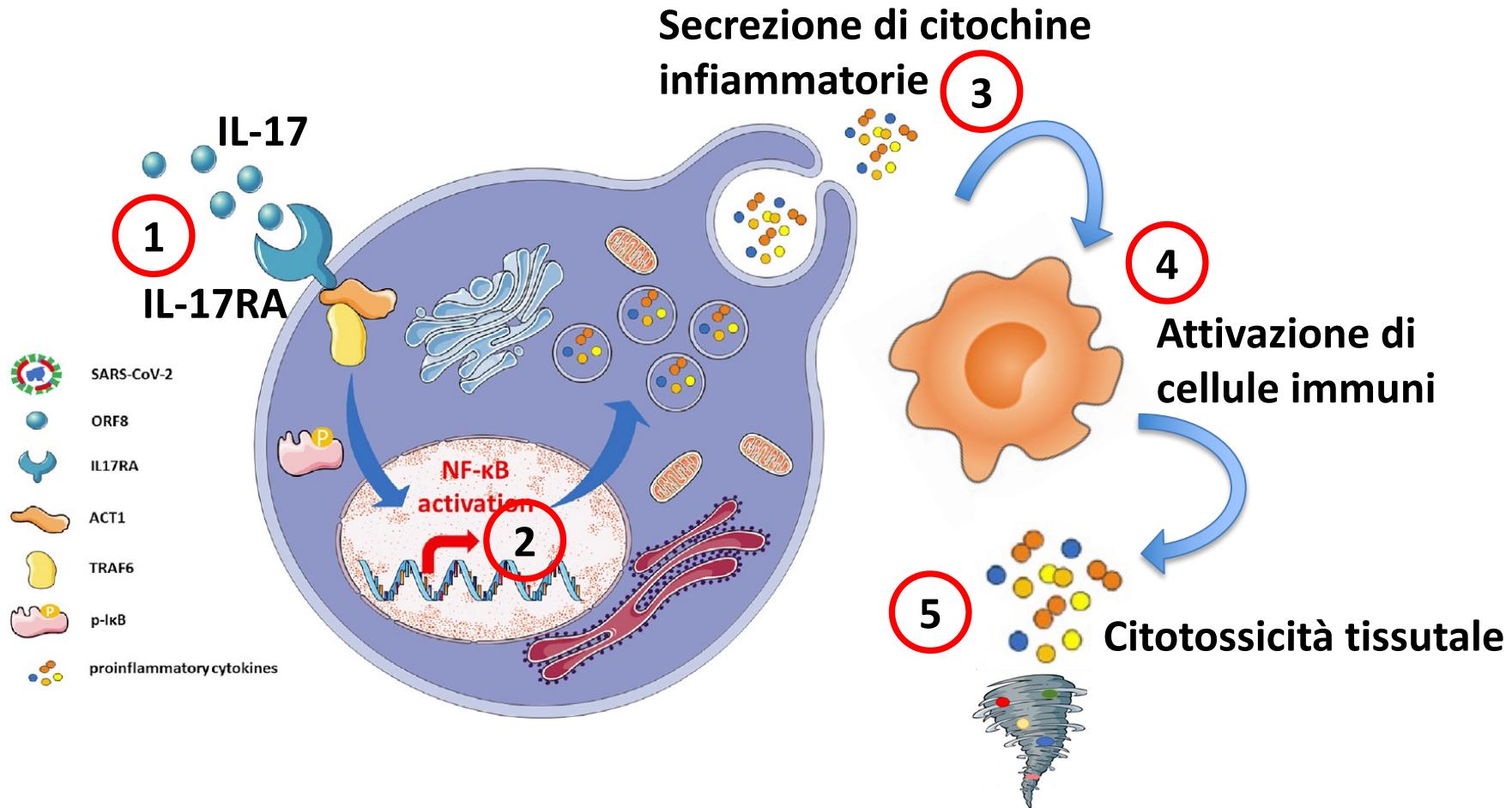


Colorazione con crystal violet
e conta delle cellule migrate

CONTROLLI Sperimentali

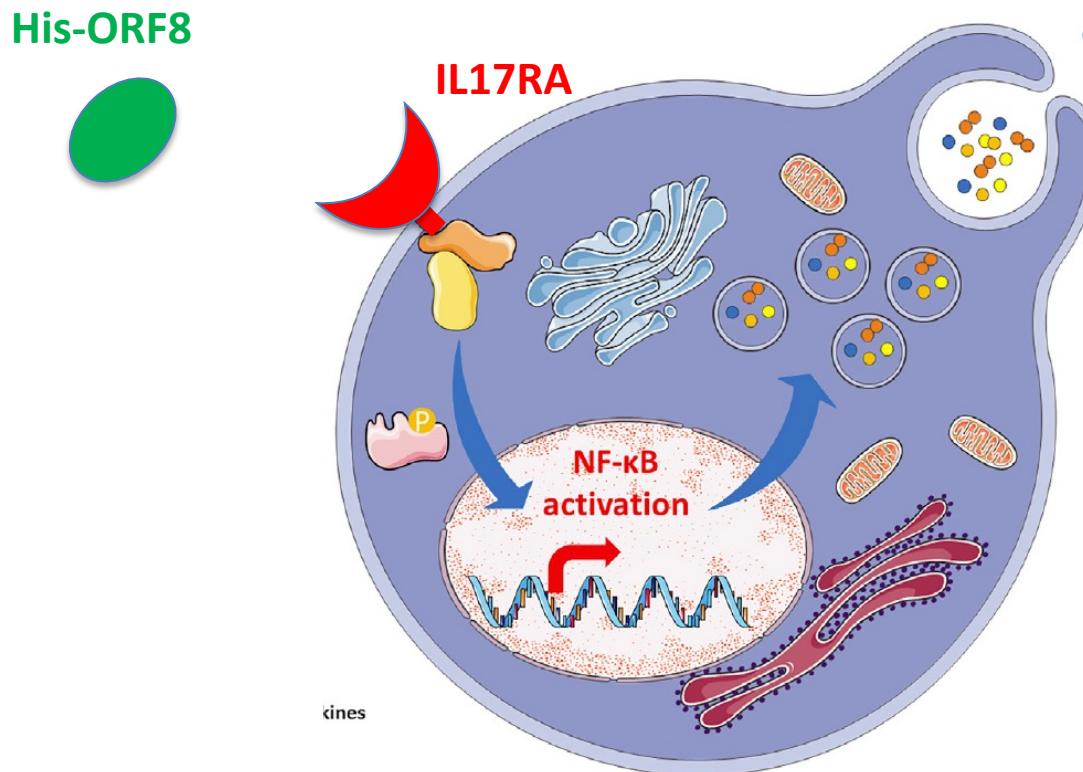


CONTROLLO POSITIVO: analisi dell'effetto di IL-17



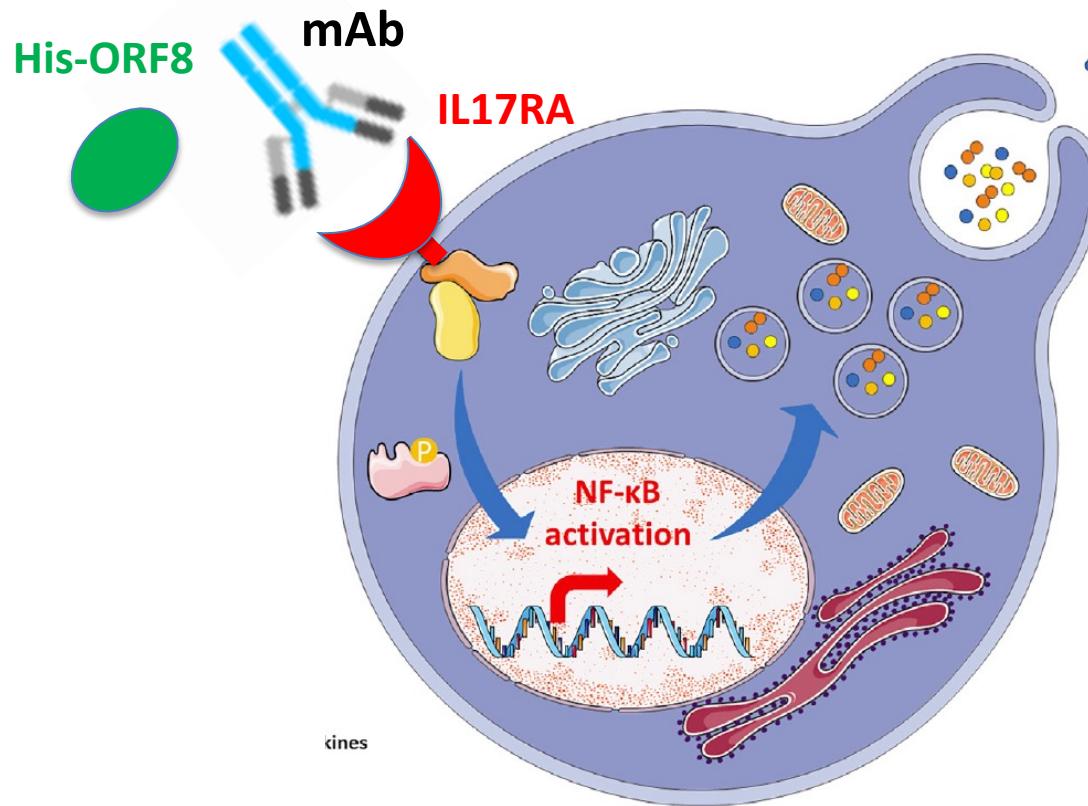
CONTROLLO DI SPECIFICITA': Analisi del ruolo di IL-17RA

- 1) cellule non trattate
- 2) cellule trattate con **His-ORF8** (1 µg/ml 24h)
- 3) controllo per dimostrare il **ruolo** di IL-17RA =

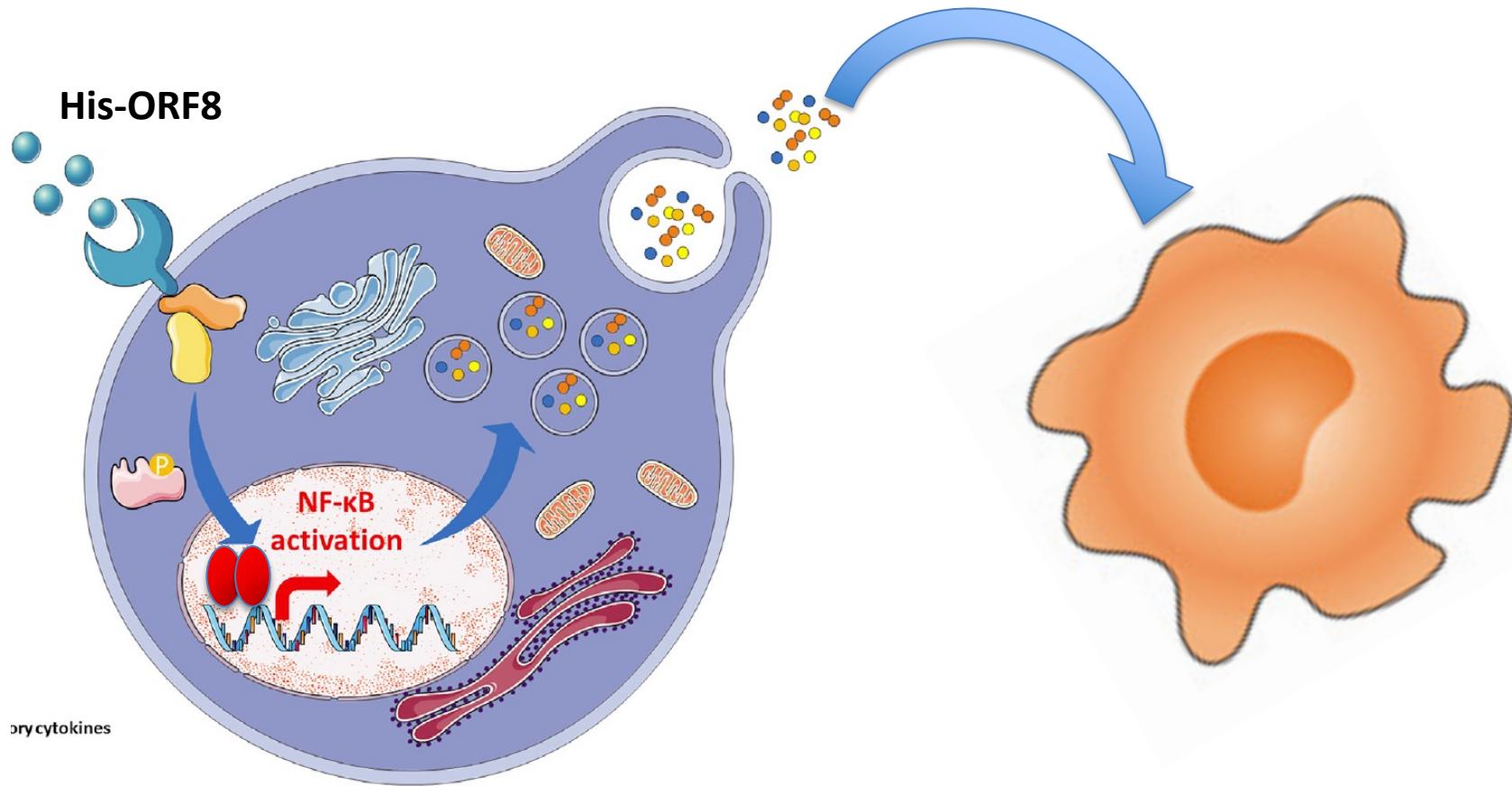


Analisi del ruolo di IL-17RA

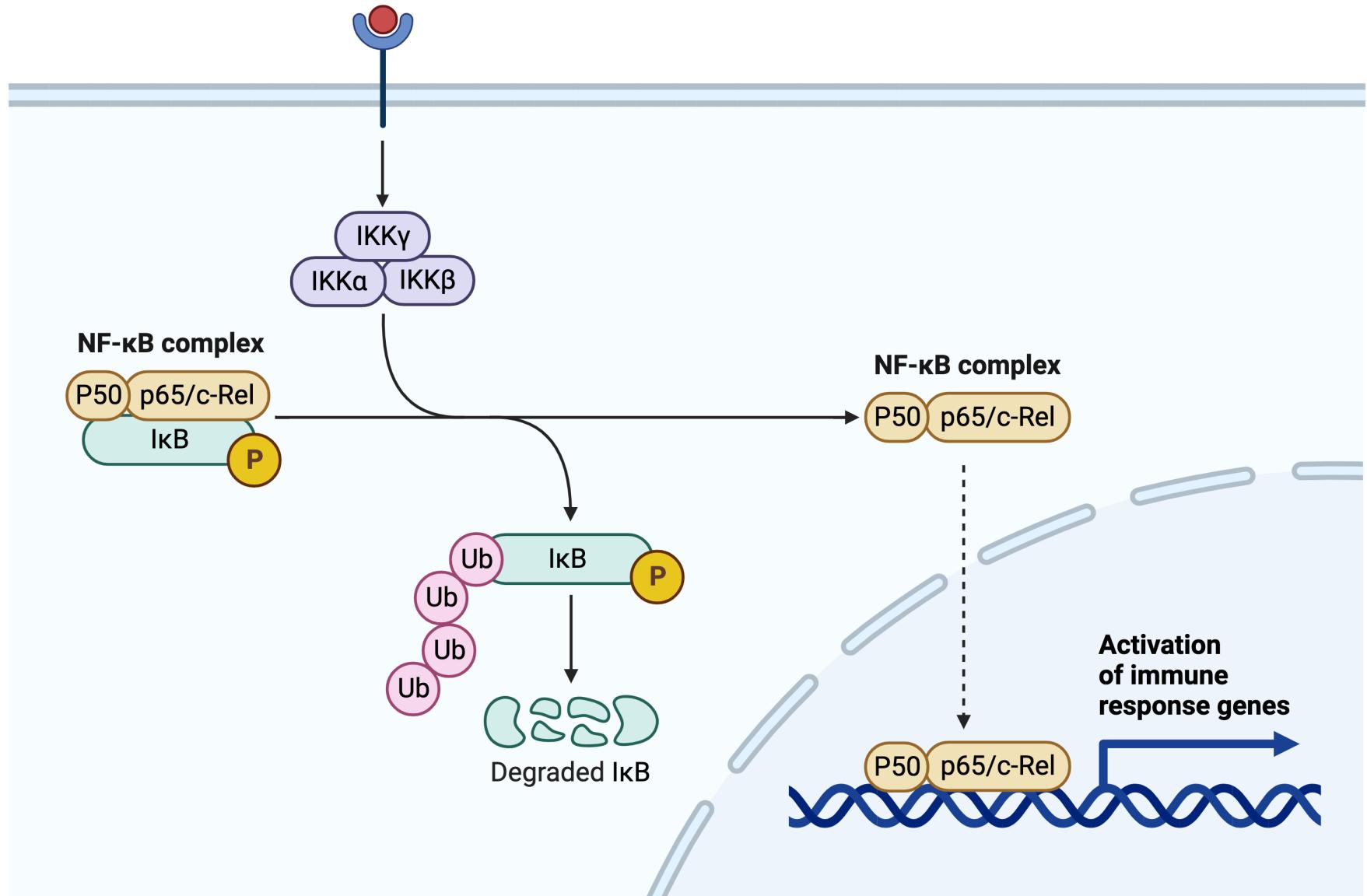
- 1) cellule non trattate
- 2) cellule trattate con **His-ORF8** (1 µg/ml 24h)
- 3) cellule incubate con **anticorpo neutralizzante anti-IL17RA** (1.5 µg/ml 12h)
e successivamente con His-ORF8 (1 µg/ml 24h)



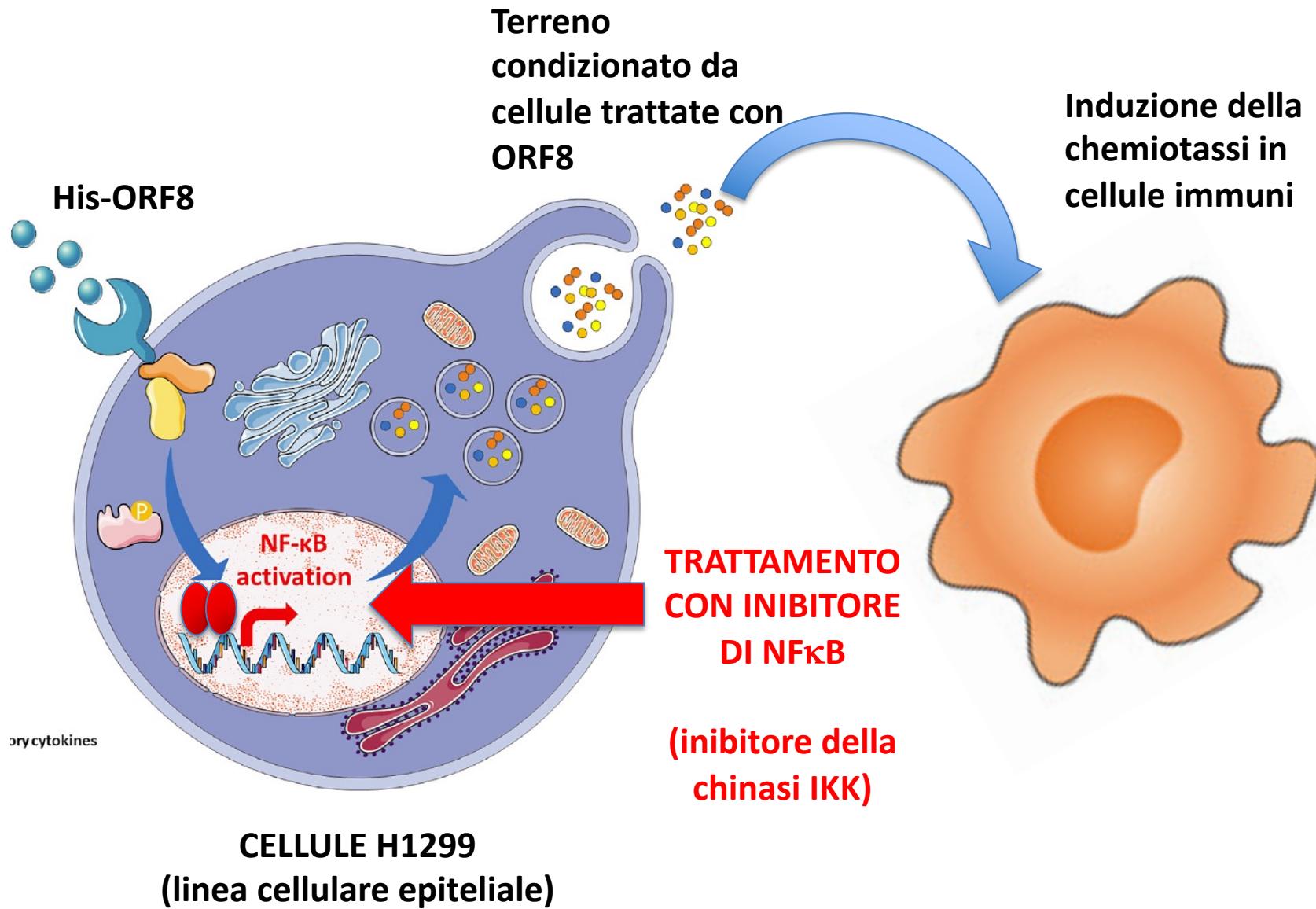
STUDIO DEL MECCANISMO: Analisi del ruolo di NF-κB



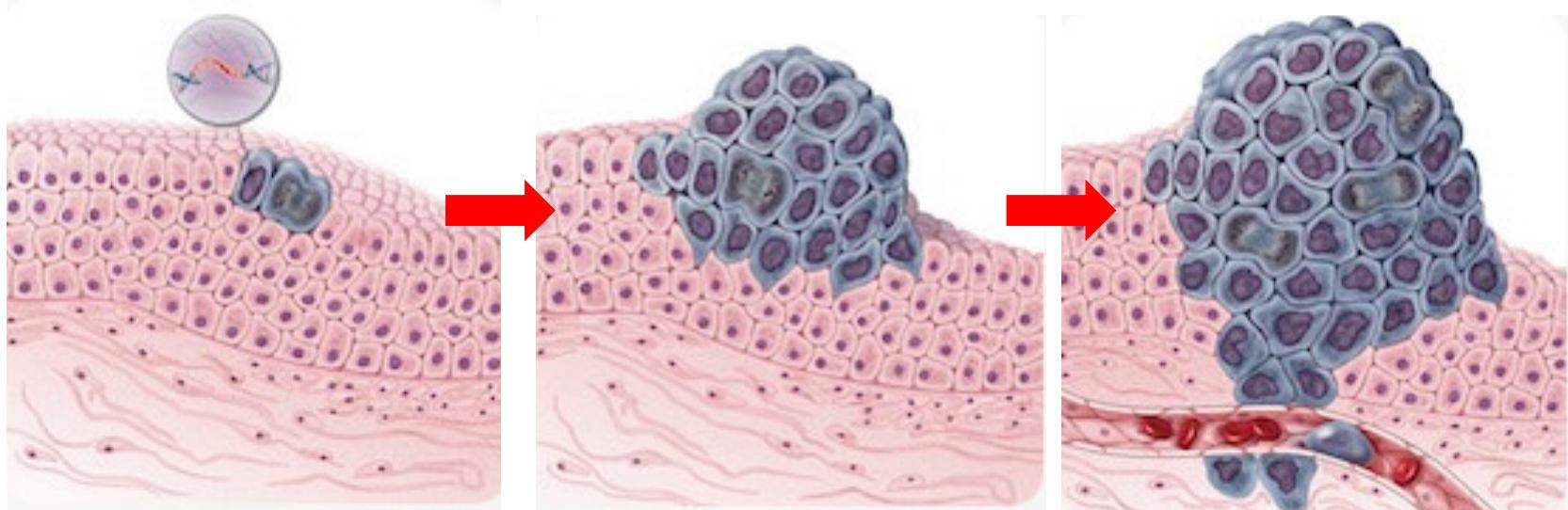
La via di trasduzione (pathway) di NF-κB



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

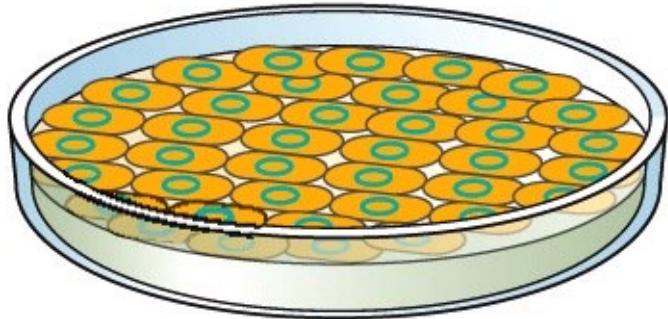


Migrazione e invasione sono fenotipi tumorali



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

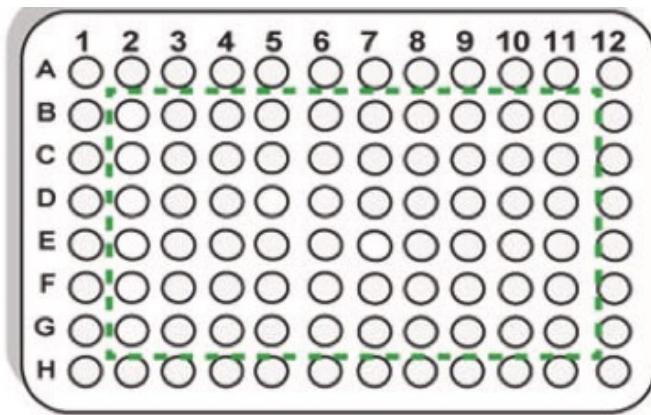
Screening funzionali per farmaci/geni che regolano la migrazione



Modello cellulare della patologia



Libreria di farmaci



Saggio morfologico/funzionale

Screening FUNZIONALI per farmaci

Modello cellulare della patologia

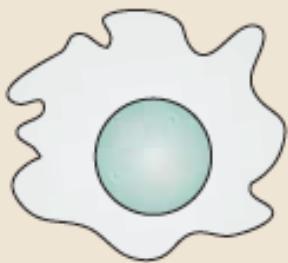
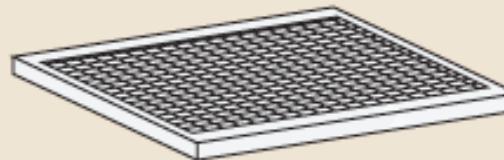
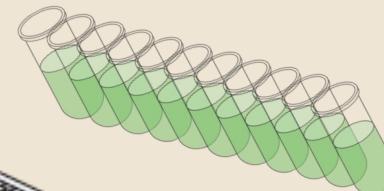


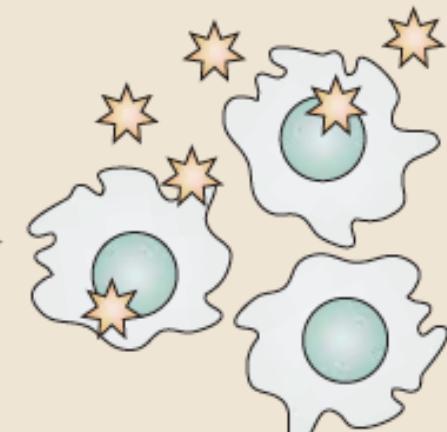
Plate cells onto
clear bottom
384-well plate



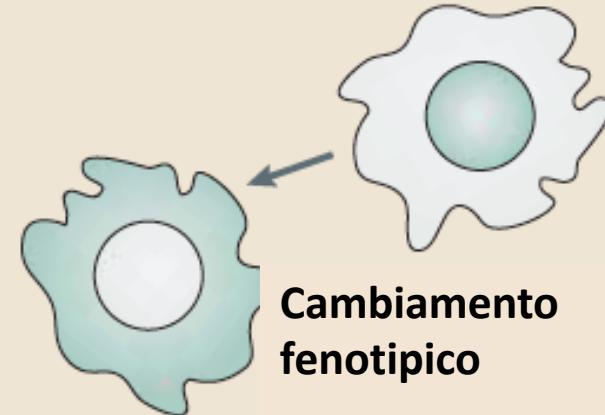
Libreria di farmaci



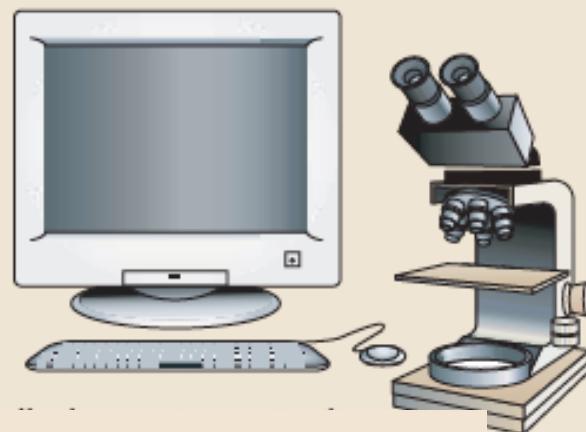
Transfer
compounds
onto cells



Compound
treatment

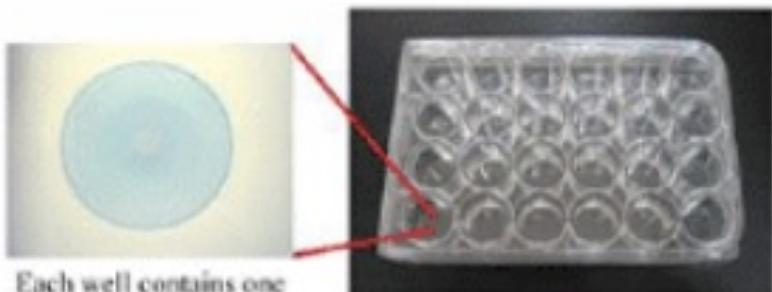


Identificazione del farmaco



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

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



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

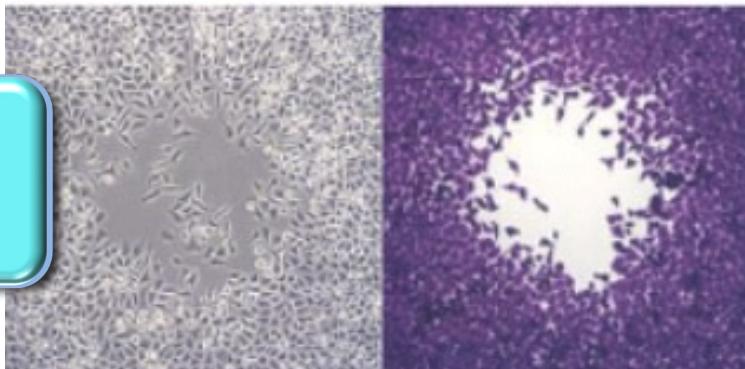
Cells don't attach
in the Radius™
Biocompatible Gel
Layer area

Pretreat desired
wells with Radius™
Gel Pretreatment
Solution

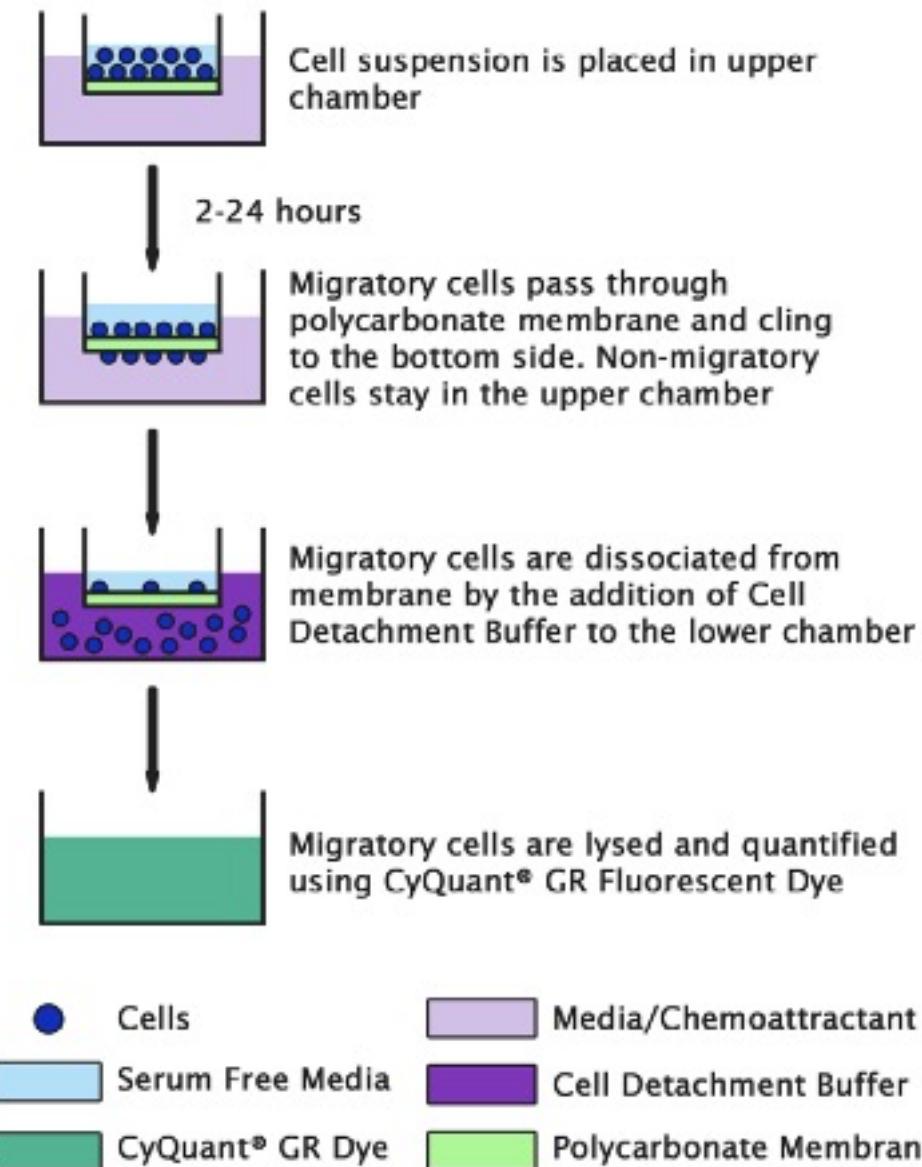
Add cell suspension
to the wells and
allow 4-24 hours for
firm attachment/
spreading

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

Le cellule possono
essere colorate



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

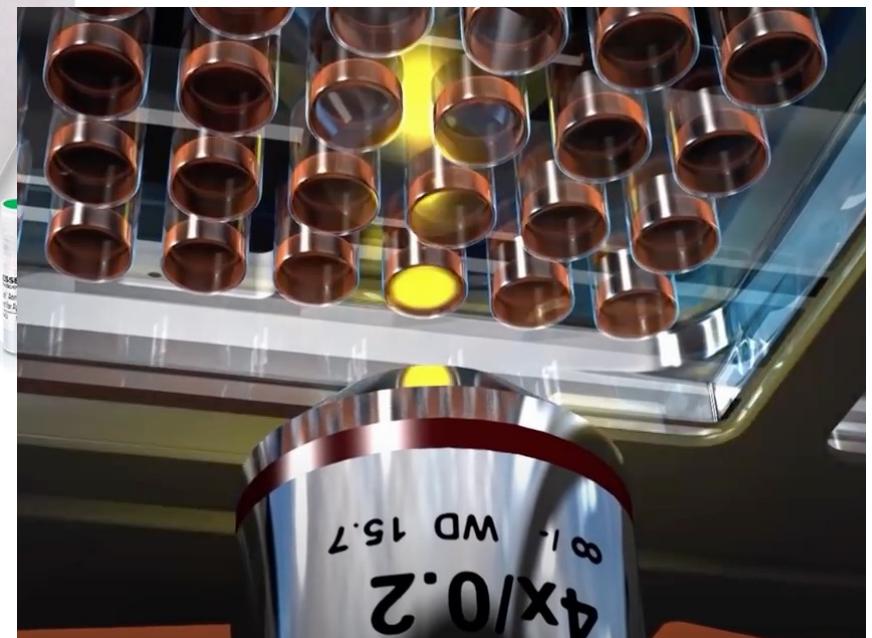


Saggi di chemotassi mediante live imaging

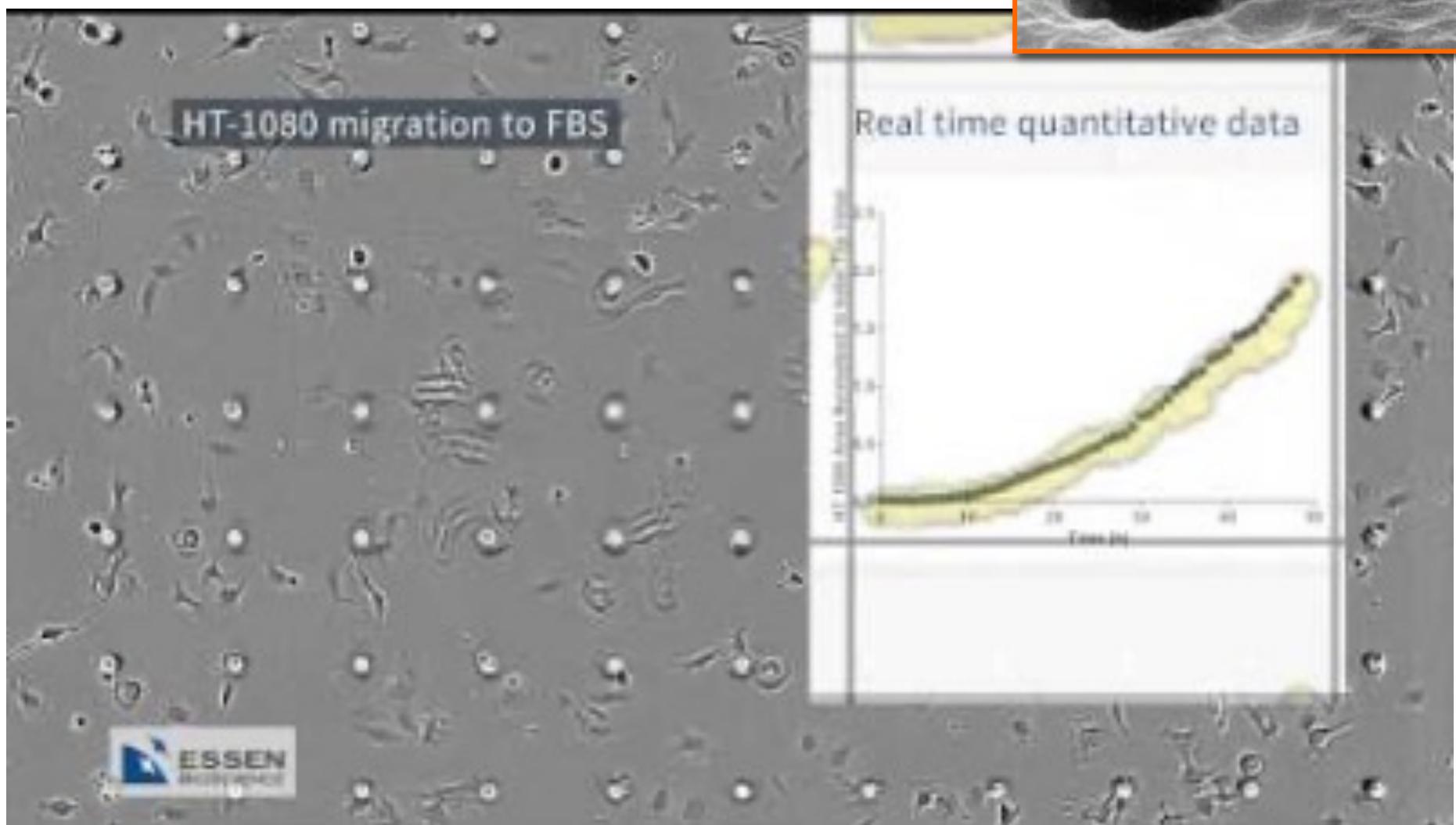


Incucyte® live-cell analysis system

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



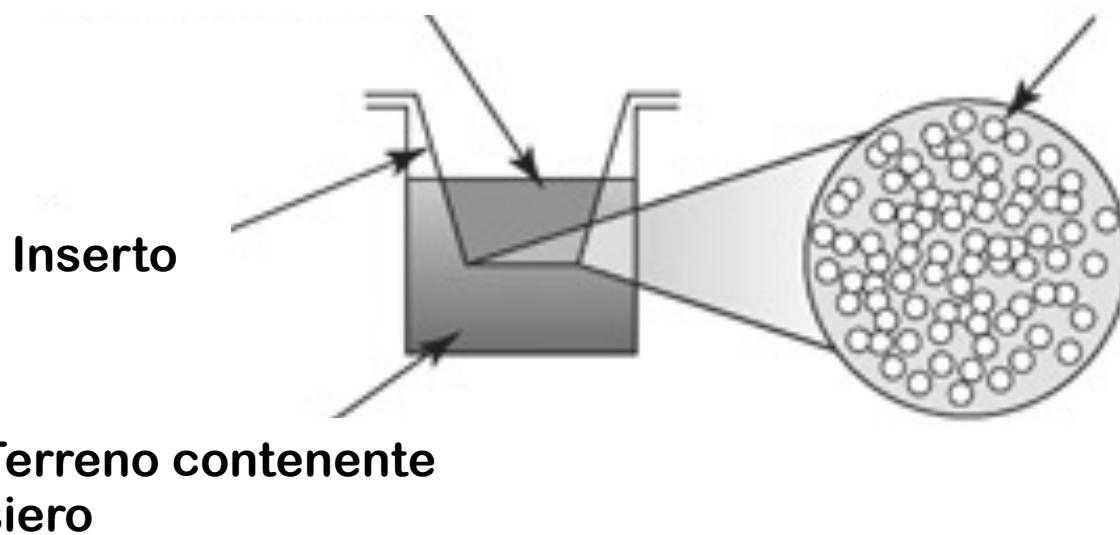
Live imaging per saggi di transwelling



Saggi di invasione

Pozetto superiore:
cellule seminate in
matrice 3D

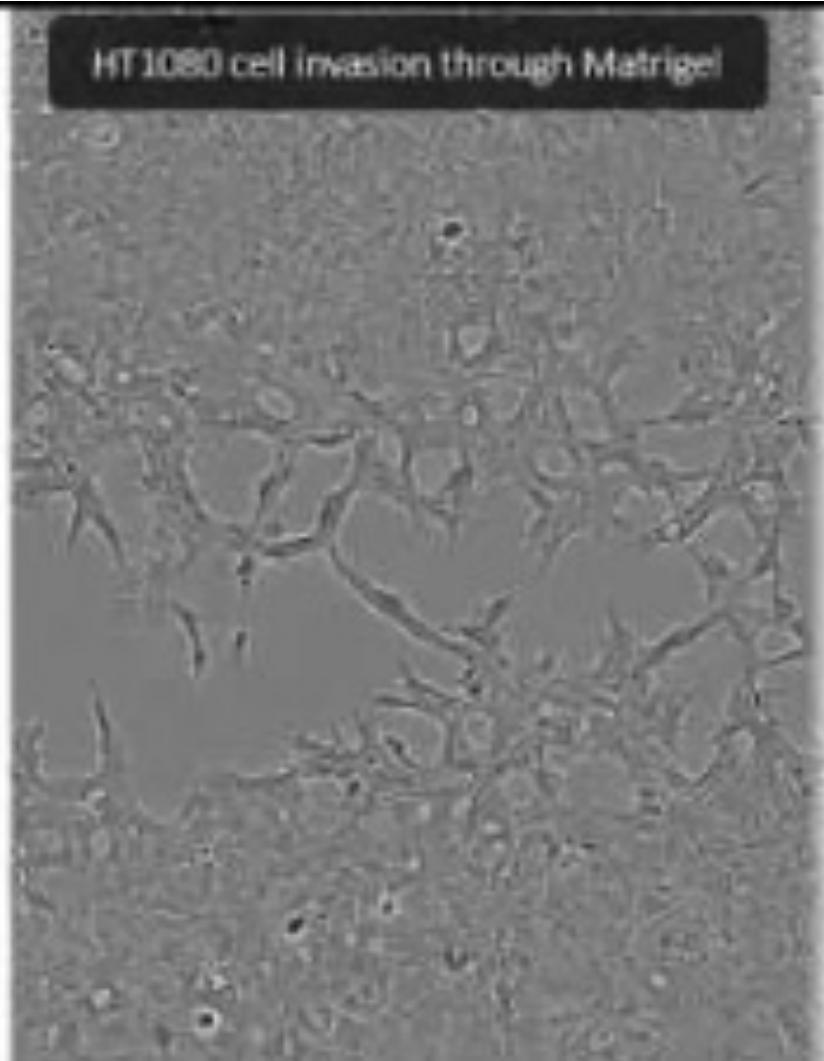
membrana
porosa



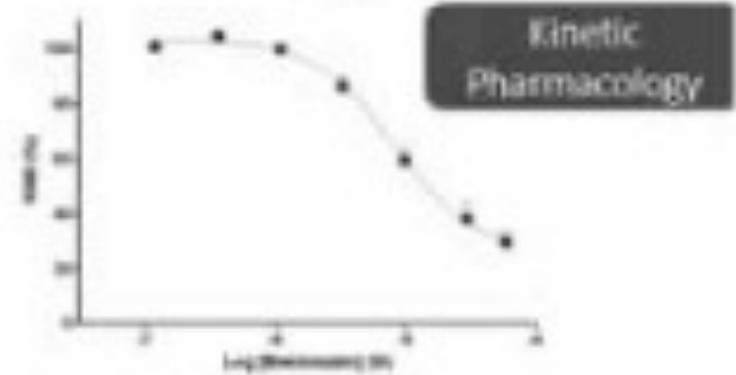
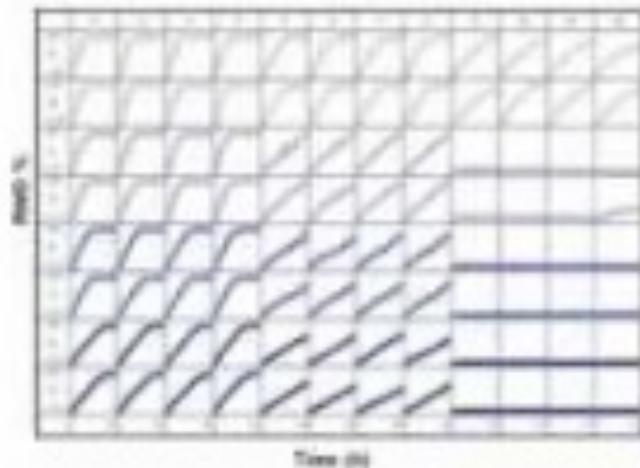
Si misura la capacità delle cellule di migrare attraverso una matrice polimerizzata su un filtro poroso

Live imaging per saggi di invasione

HT1080 cell invasion through Matrigel



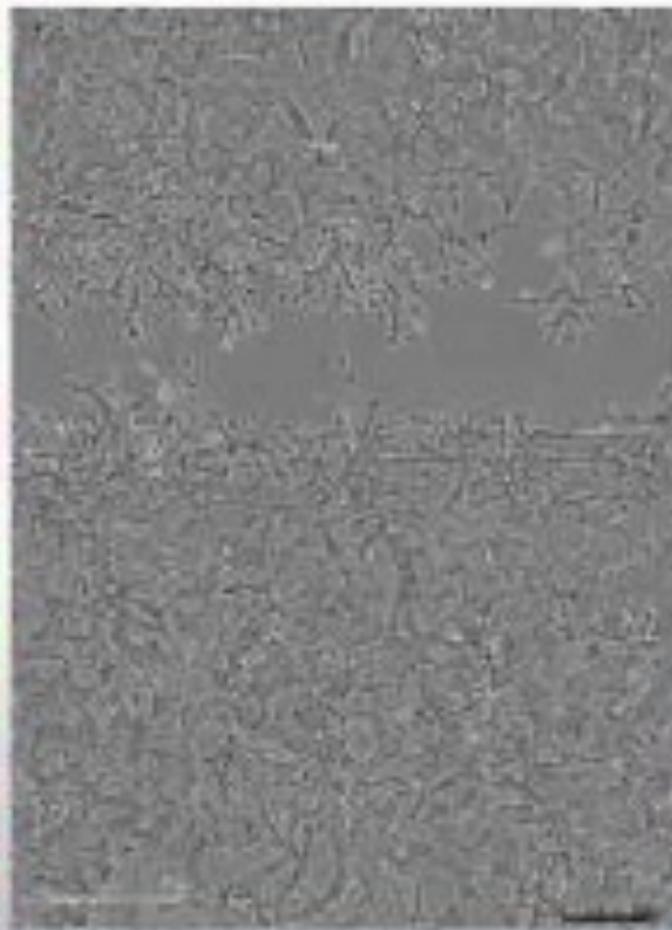
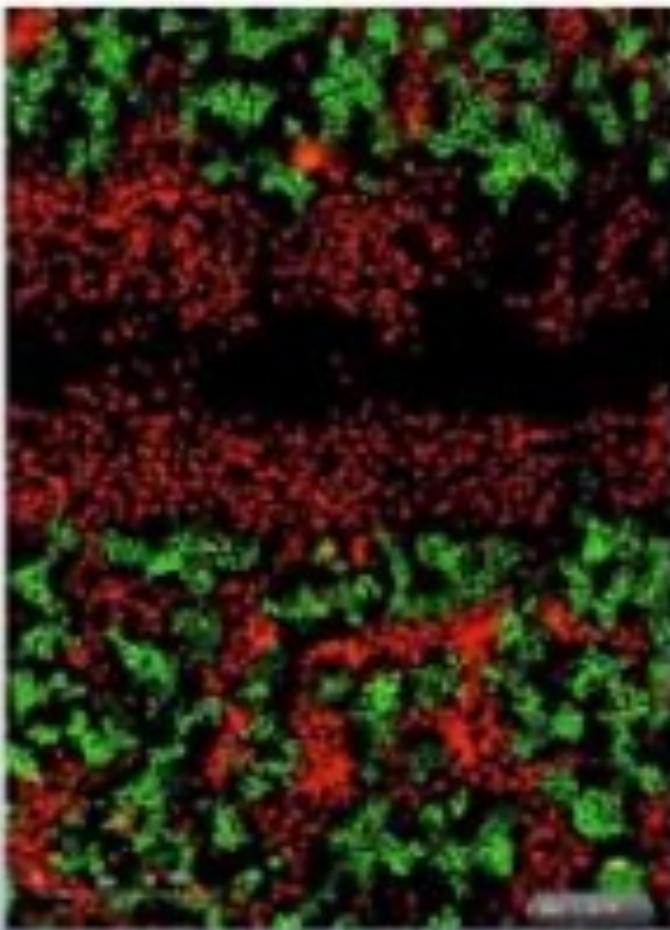
96 & 384-well kinetic plate views



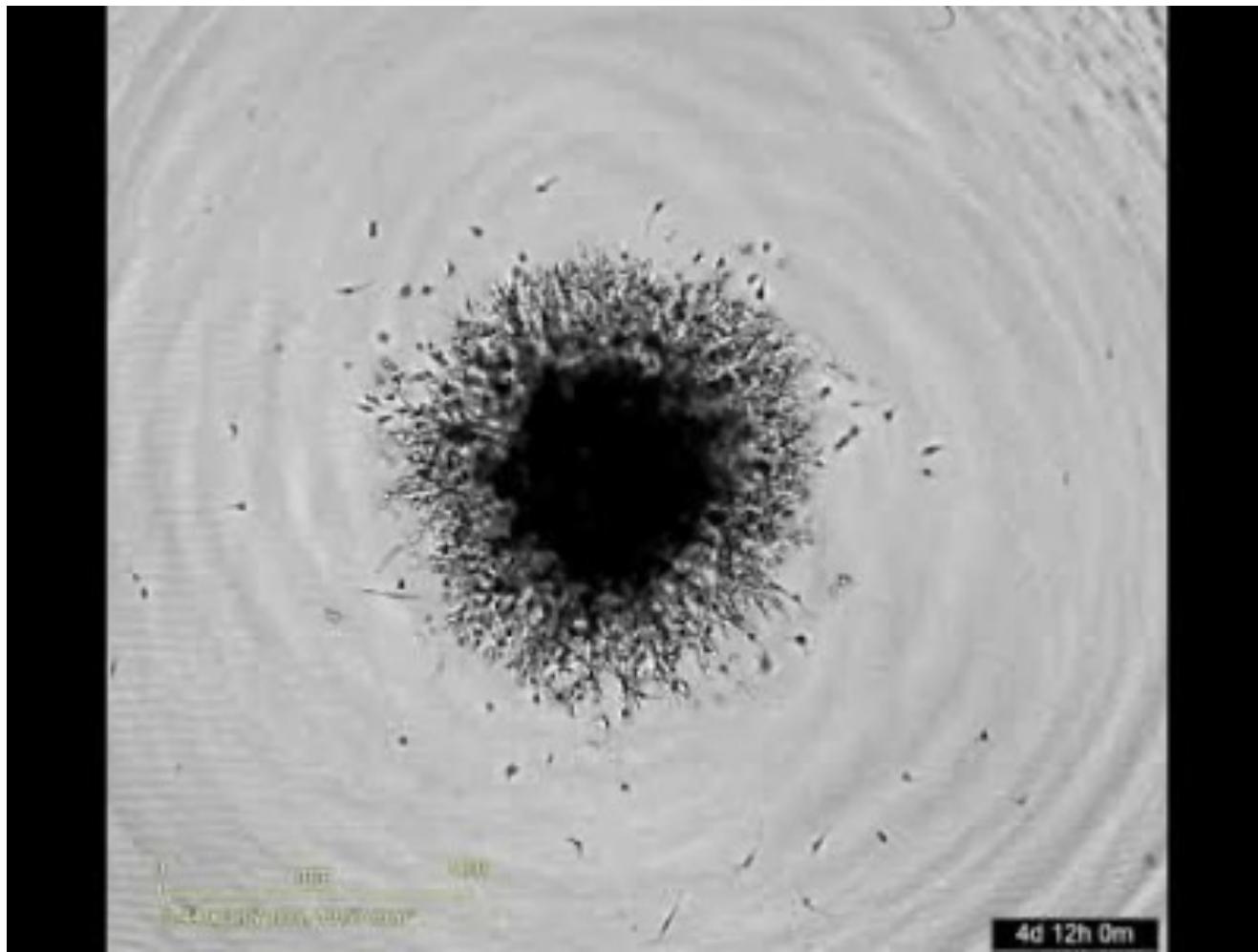
Investigate Migration & Invasion Behavior in Mixed Cultures

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)

