

ESPERIMENTO: SAGGIO DI CHEMOTASSI**STRATEGIA SPERIMENTALE:**

Si vuole valutare l'effetto della proteina **Cov-2-ORF8** sulla produzione di mediatori pro-infiammatori da parte di cellule epiteliali (**H1299**: linea cellulare di carcinoma polmonare umano) attraverso il legame di ORF8 al recettore per IL-17 (IL-17RA). In risposta a stimolazione da citochine le cellule **THP-1** (linea monocitica umana) differenziano a macrofagi e acquisiscono capacità migratoria. Mediante il **saggio di chemotassi** si valuterà la migrazione di cellule THP-1 attraverso un supporto permeabile (**camera di Boyden**) in risposta a citochine rilasciate da cellule H1299 stimulate con ORF8. Come controllo positivo, le cellule H1299 saranno trattate con IL-17. Il ruolo del recettore IL-17RA e del TF **NFκB** sarà valutato mediante inibizione specifica trattando preventivamente le cellule con un anticorpo monoclonale e con un inibitore della chinasi IκK.

MATERIALE:

Incubatore per colture cellulari, centrifuga, microscopio rovesciato, PBS, DMEM completo, cameretta contacellule, Piastra multi-well da 24 pozzetti, inserti, plasticheria sterile.

PUNTI SPERIMENTALI:

Ciascun gruppo (4 o 5 studenti) esaminerà la **migrazione** di cellule **THP-1** dopo esposizione a:

1. terreno condizionato da cellule **H1299 non trattate**.
2. terreno condizionato da cellule **H1299** trattate con **IL-17** (50 ng/ml) per 16 ore.
3. terreno condizionato da cellule **H1299** trattate con proteina **His-ORF8** (1 µg/ml) per 16 ore.
4. terreno condizionato 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.
5. terreno condizionato da cellule **H1299** trattate con His-ORF8 e con **inibitore di NFκB (IκK)**.

PROCEDIMENTO:**Giorno 1 (per ciascun gruppo)**

1. Osservare le **cellule H1299 che hanno subito i diversi trattamenti** al microscopio e riportarle nell'incubatore; osservare le **cellule THP-1 (cresciute in sospensione)**. **Sul banco**, trasferire la sospensione di **cellule THP-1** in provetta Falcon da 15 ml e centrifugare 5 minuti a 1000 rpm per recuperare le cellule.
2. Aspirare il surnatante e risospendere delicatamente il pellet di **cellule THP-1**. Aggiungere 5 ml di terreno fresco e risospendere spipettando.
3. **CONTARE LE CELLULE THP-1**. Trasferire una goccia della sospensione cellulare nell'emocitometro e procedere alla conta al microscopio ottico. Contare 4 campi e fare la media.
4. **DILUIRE LE CELLULE THP-1**: preparare **6 ml** di sospensione cellulare di cellule THP-1 alla concentrazione di **150.000 cell/ml**.
5. **SEMINARE LE CELLULE NELL'INSERTO**.
 - a) in una piastra multi-well collocare **5 inserti** e aggiungere in ciascuno **1 ml** della sospensione cellulare preparata al punto precedente, utilizzando una pipetta P1000 e un puntale sterile. **Scrivere** le proprie iniziali e il numero della condizione sperimentale sul pozzetto e sull'inserto.
6. **Aggiungere il TERRENO CONDIZIONATO alla camera di Boyden**. Utilizzando una pipetta P1000 e un puntale sterile, prelevare **750 µl** dei **terreni condizionati dalle colture di cellule H1299 1, 2, 3, 4 e 5** ed aggiungerli all'interno dei rispettivi pozzetti, facendo attenzione a non introdurre bolle.
7. **RIPORRE LE PIASTRE MULTI-WELL NELL'INCUBATORE**.

Giorno 2**MATERIALE:**

Piastre Multi-well da 24 pozzetti, PBS, H₂O distillata, PFA 4% (**CAPPA CHIMICA**), Crystal Violet 0,5%, cotton-fioc, vetrino porta-oggetto e vetrino copri-oggetto, bisturi, pinzette e smalto.

PROCEDIMENTO:

1. Prelevare le cellule dall'incubatore. **Ogni studente** preparerà sul banco, in una piastra multi-well, due pozzetti con 1 ml di PBS **per ogni inserto**, che serviranno per i lavaggi.
2. **ELIMINARE LE CELLULE NON MIGRATE.** Estrarre l'inserto (facendo attenzione a non toccare il lato della membrana dove si trovano le cellule migrate); con la pipetta P1000 eliminare il terreno all'interno dell'inserto e, utilizzando un cotton-fioc imbevuto di PBS, rimuovere le cellule non migrate dal alto interno della membrana; ripetere l'operazione.
3. Eseguire due **lavaggi**: utilizzando una pinzetta, immergere l'inserto nei due pozzetti precedentemente riempiti di PBS per un paio di secondi ciascuno.
4. **FISSAZIONE.** Rimuovere con la P1000 eventuali residui di PBS all'interno dell'inserto. Sotto la cappa chimica, immergere l'inserto in un pozzetto (multiwell già presente sotto cappa) contenente PFA 4%. Incubare per **15-20 minuti** a RT. Nel frattempo preparare il **punto 6**.
5. Nel frattempo nella propria Multi-well aggiungere 1 ml di PBS in 2 pozzetti (per ogni inserto). Al termine dei 20 minuti, recuperare il proprio inserto, eliminare l'eccesso di PFA 4% e eseguire due lavaggi in PBS (come al punto 3).
6. **COLORAZIONE DELLE CELLULE:** Diluire il Crystal Violet 0,5% alla concentrazione finale di 0,1% (diluire in 10 ml finali di H₂O ml dello stock). In un pozzetto preparare 1 ml di Crystal Violet 0,1%, aggiungerci l'inserto dopo aver rimosso con la P1000 l'eccesso di PBS e lasciare in incubazione **30 minuti** a RT.
7. Nel frattempo rimuovere dai pozzetti precedentemente utilizzati il PBS usato per i lavaggi. Riempire con 1 ml di H₂O 2 nuovi pozzetti per ogni inserto. Al termine dei 30 minuti prelevare l'inserto, rimuovere l'eccesso di Crystal Violet ed eseguire 2 lavaggi immergendo l'inserto in un pozzetto contenente 1 ml di H₂O.
8. Terminato l'ultimo lavaggio, con la P200 aspirare accuratamente l'eventuale liquido rimasto, tamponare con della carta assorbente e porre l'inserto in un pozzetto asciutto. Lasciare gli inserti ad asciugare per qualche minuto.
9. **RIMOZIONE DELLA MEMBRANA. Seguire la dimostrazione del docente.** Prelevare l'inserto con le mani e porlo capovolto sul banco. Tenendo fermo l'inserto con una mano, utilizzare un bisturi per separare la membrana dal supporto.
10. **PREPARAZIONE DEL VETRINO.** Con una pinzetta trasferire la membrana su un vetrino porta-oggetto, coprirlo con un vetrino copri-oggetto e fissarne i lati con poco smalto. Lasciar asciugare per un paio di minuti, quindi analizzare la membrana al microscopio.
11. **CONTA DELLE CELLULE.** Con l'obiettivo 40X, contare il numero di cellule migrate (colorate in viola) in almeno 5 campi, avendo cura di escludere dall'analisi i bordi delle membrane e le regioni dove le cellule sono distribuite in maniera meno omogenea.
12. VALUTARE IL **RISULTATO DELL'ESPERIMENTO** confrontando i diversi punti sperimentali.