

**Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche**

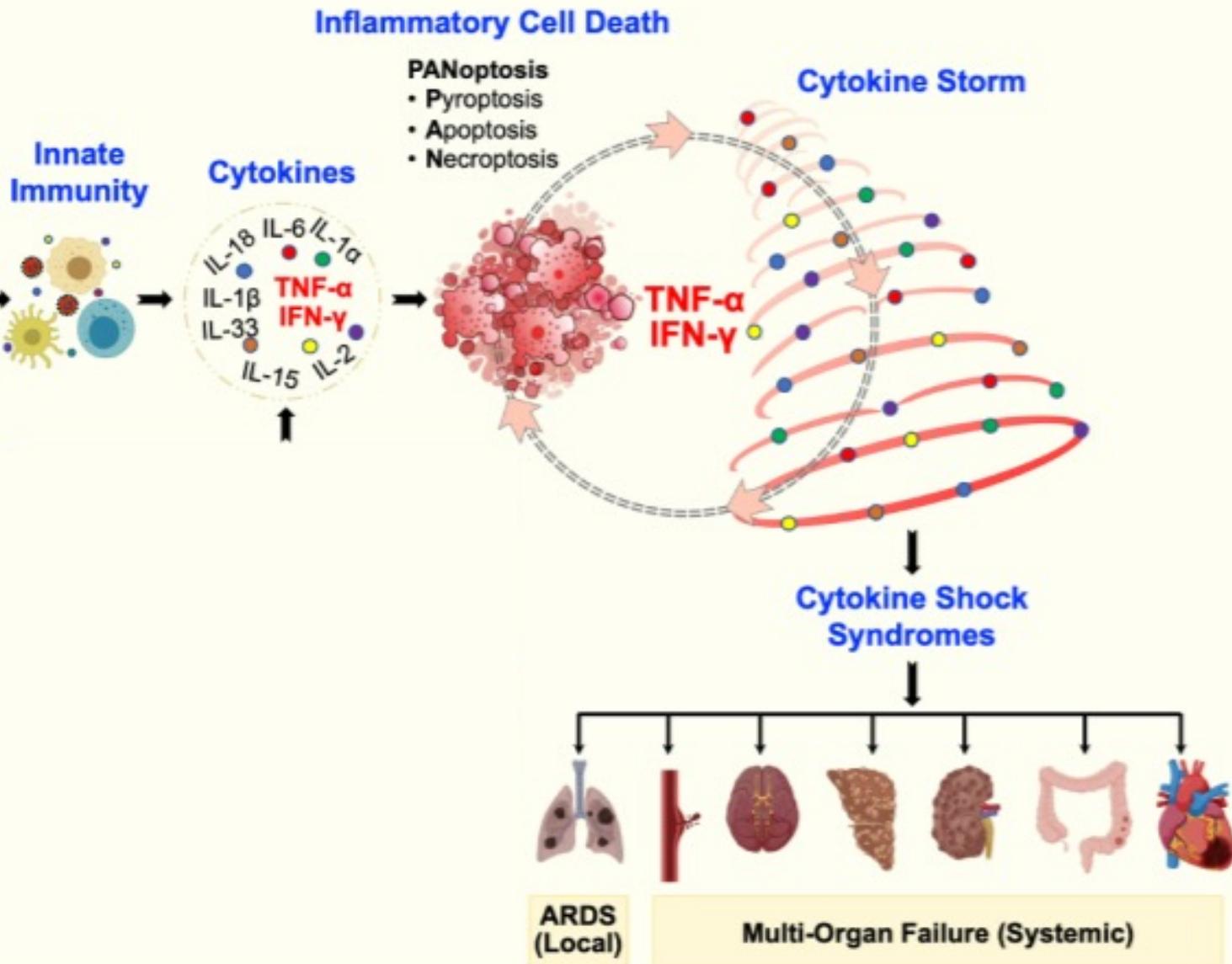
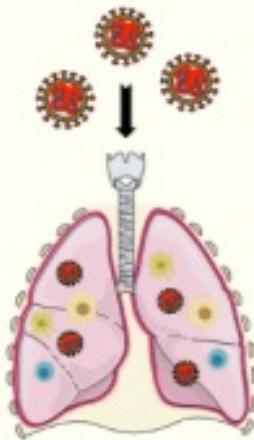
**AA 2025-2026**

# **Corso di Biotecnologie Cellulari**

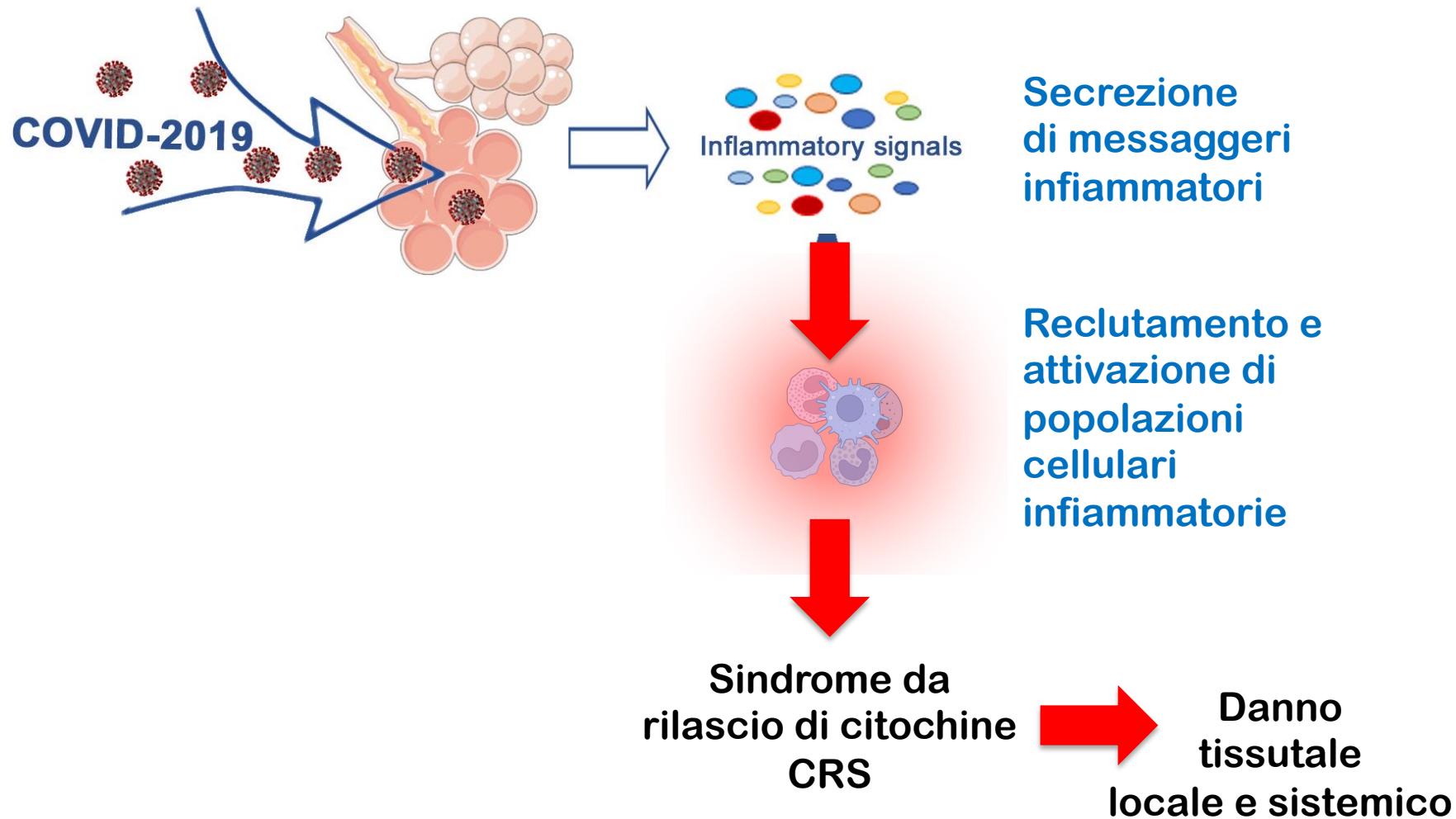
**Lezione 10**

# 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.

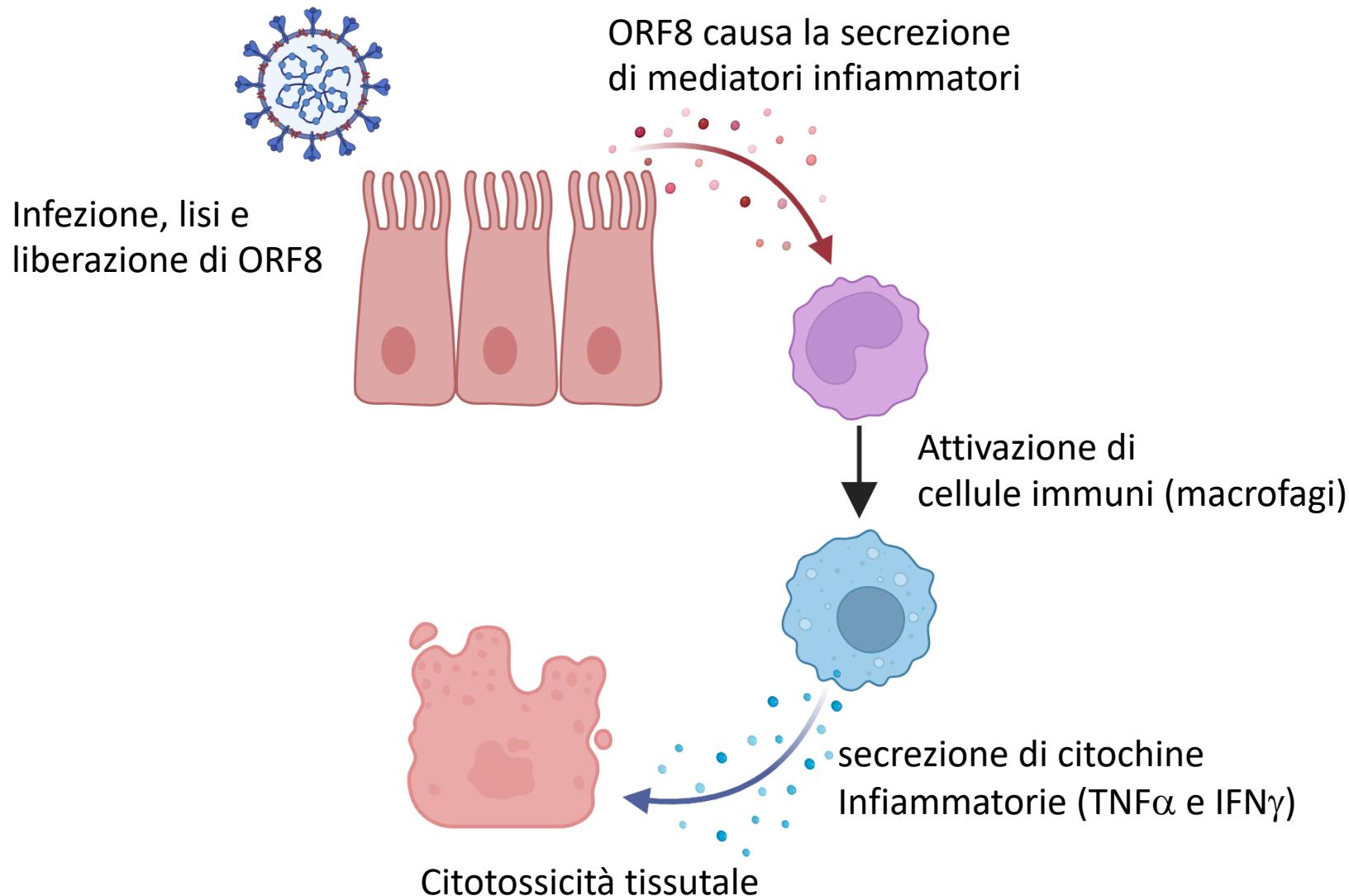
### **RISULTATO:**

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



## **SCOPO:**

**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**

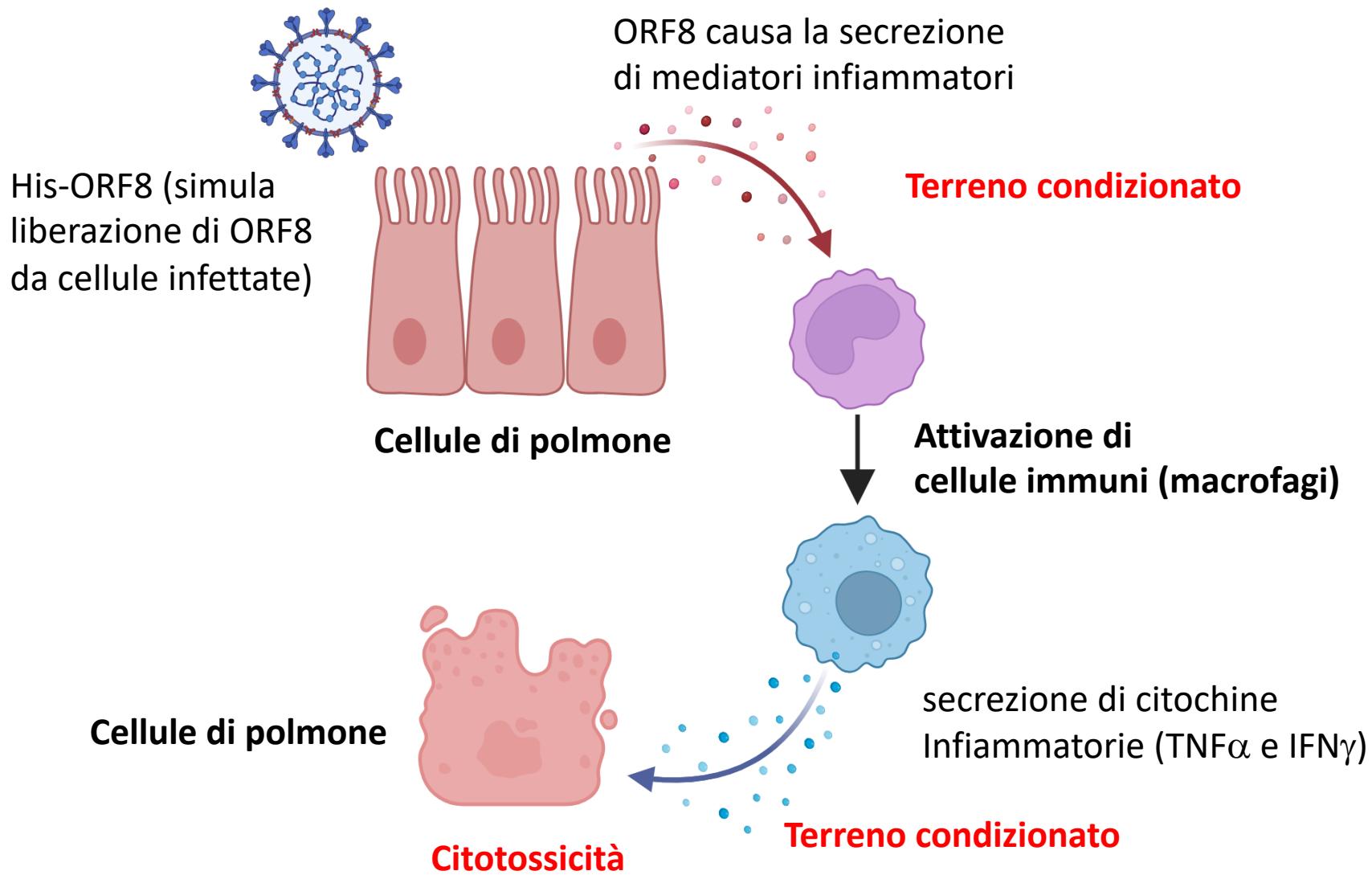
### **Esperimento 1)**

**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)**

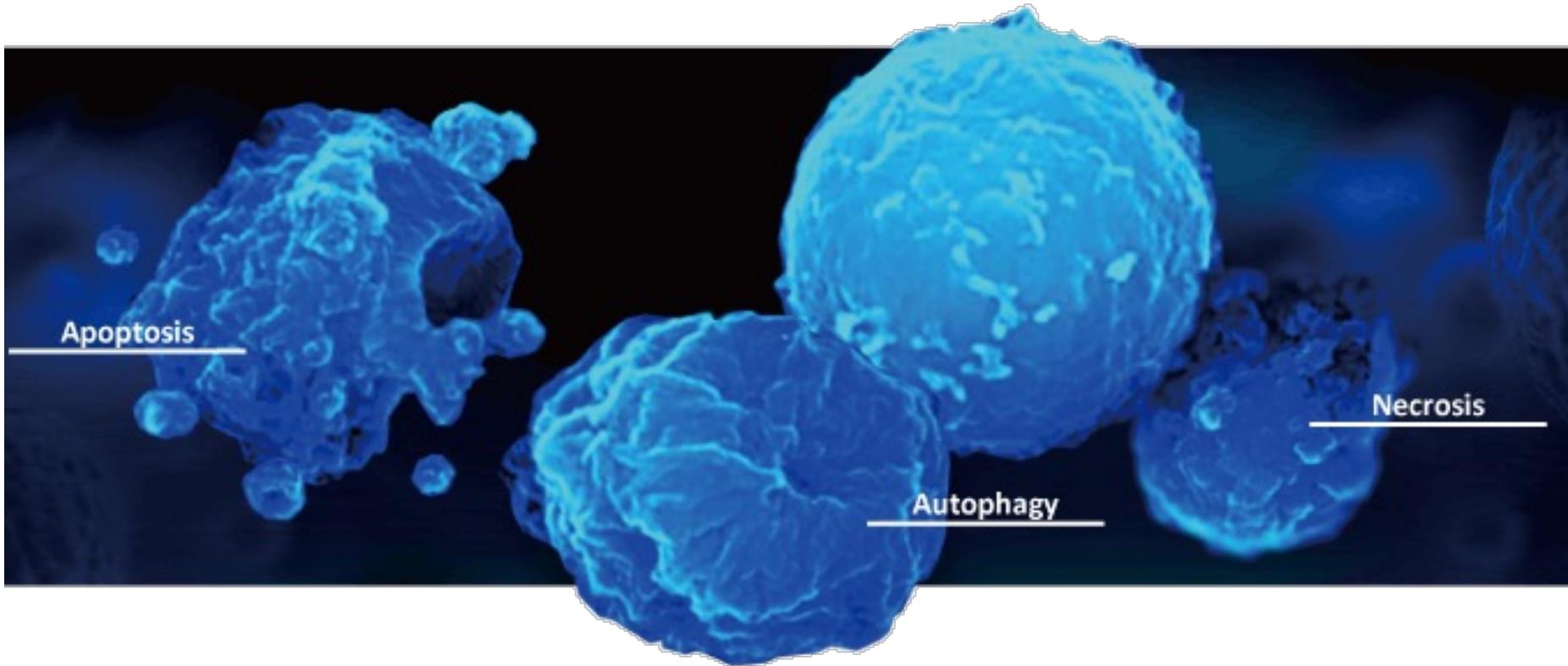
**Analisi della capacità delle cellule infiammatorie attivate dall'asse ORF8-IL17RA di indurre **tossicità** in cellule di polmone**

## ESPERIMENTO 2)



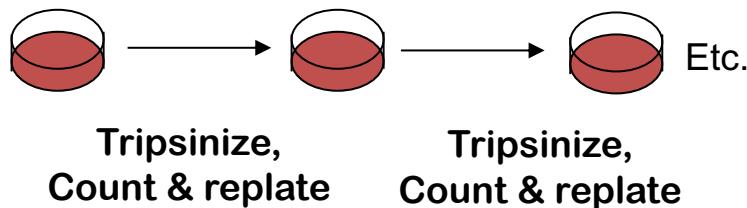
**SAGGI di VITALITA' CELLULARE e**

**SAGGI di MORTE CELLULARE**



## Variazioni della vitalità cellulare si possono stimare analizzando cambiamenti del numero di cellule

### CURVE DI CRESCITA con Metodo 3T3/3T9

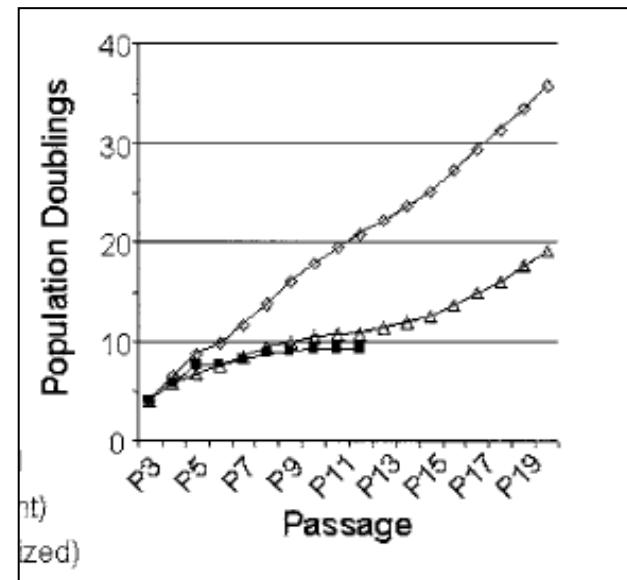


Ad ogni passaggio si semina un numero costante di cellule ( $9 \times 10^5$ )

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

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

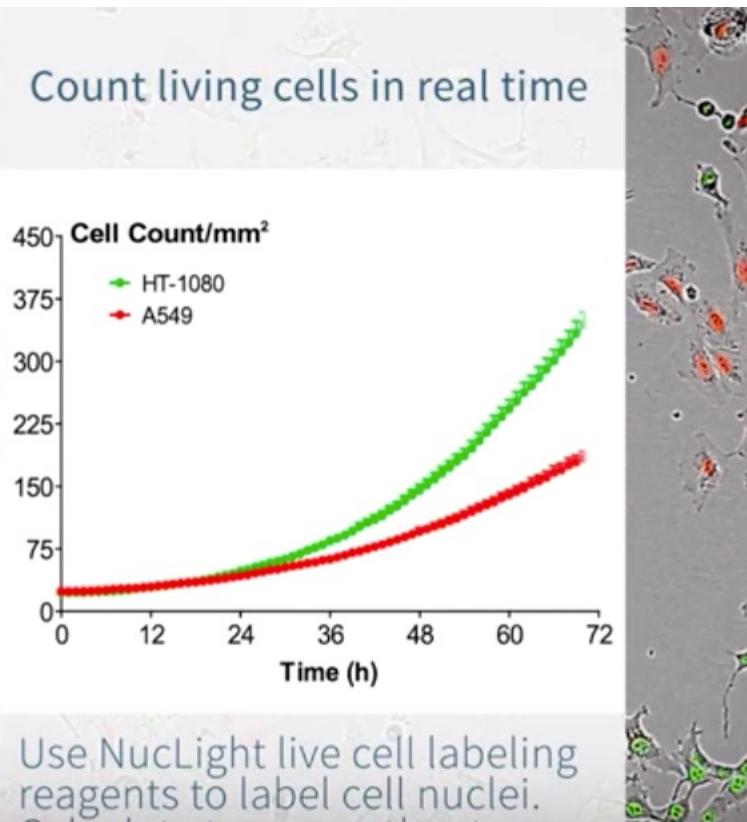
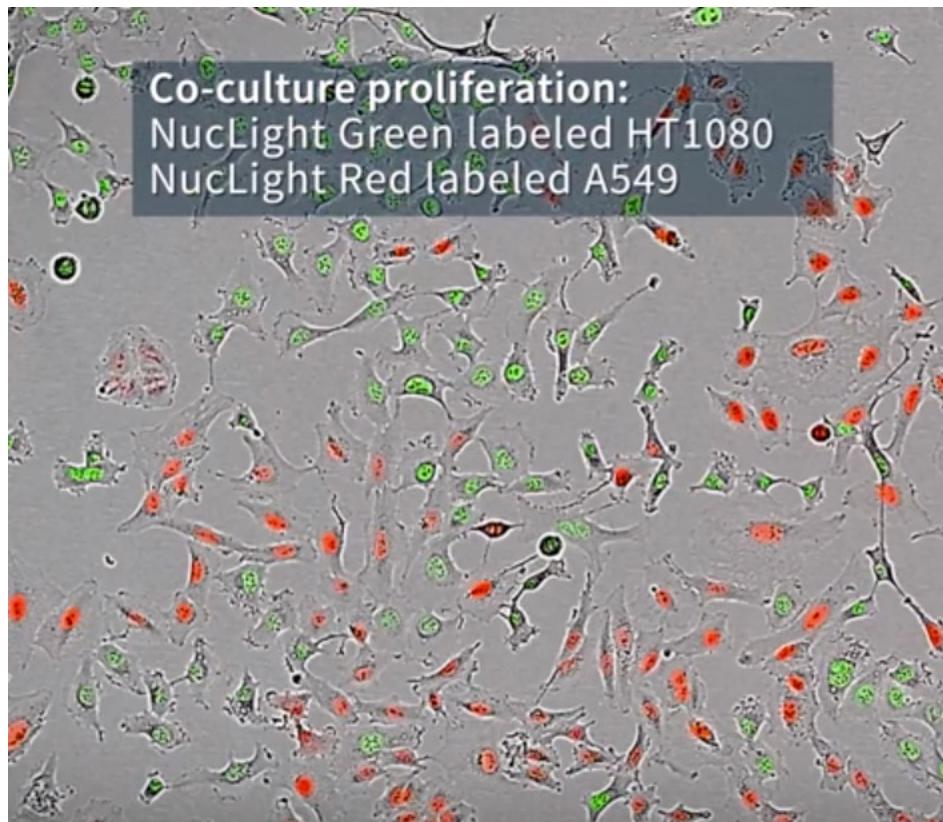
$$PD = \log_2 (N_f/N_0)$$



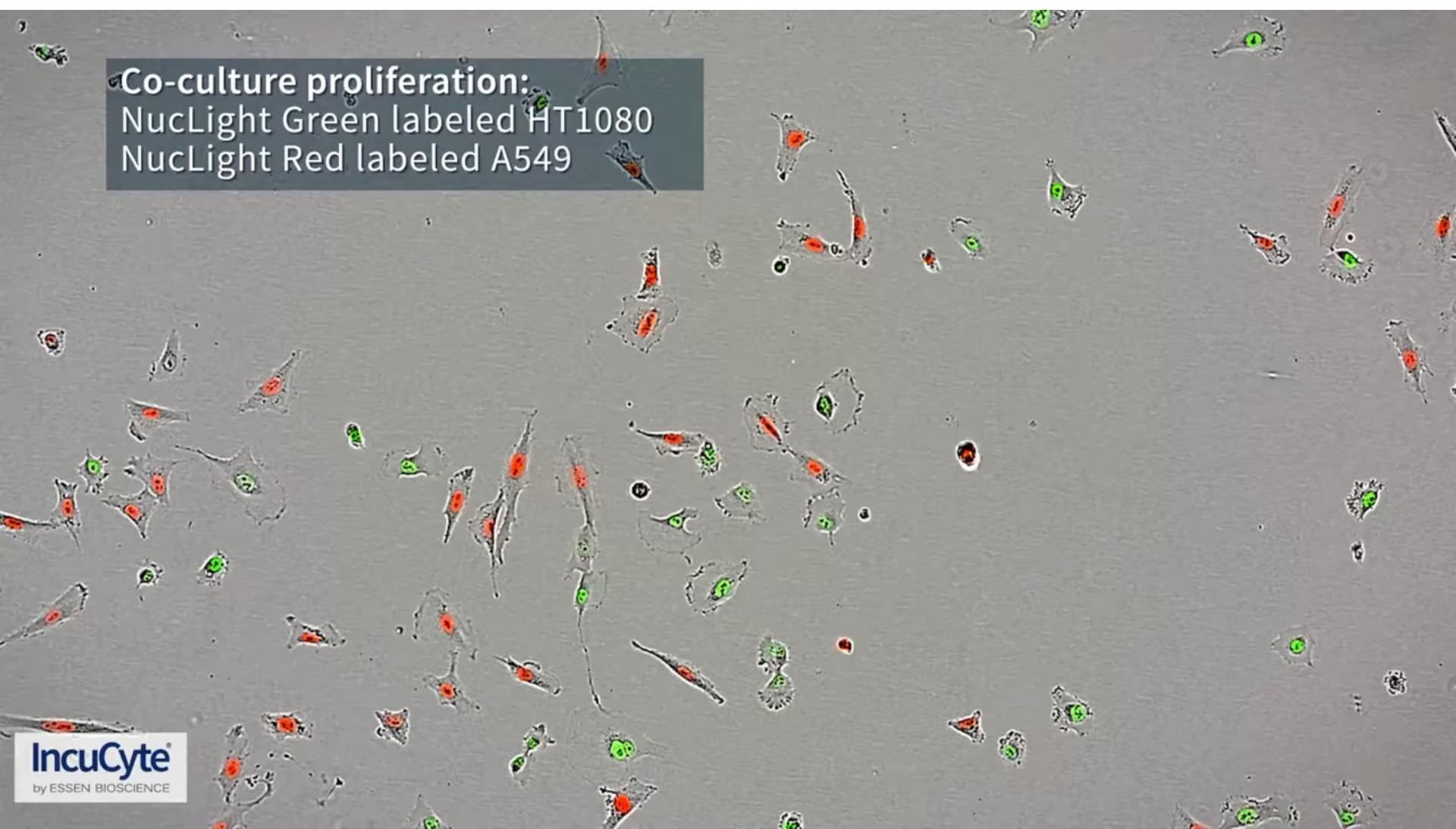
## Curve di crescita real-time

[https://www.youtube.com/watch?v=WaFp5\\_cArdk](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 PROLIFERAZIONE

## quantificazione di cellule in fase S (analisi della neosintesi del DNA)

### Nucleic Acid Labeling

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

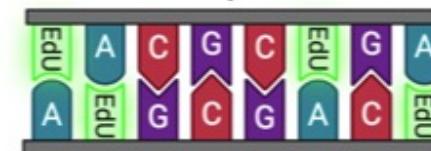


"Click-iT™ Reaction"

Fluorophor-Azide

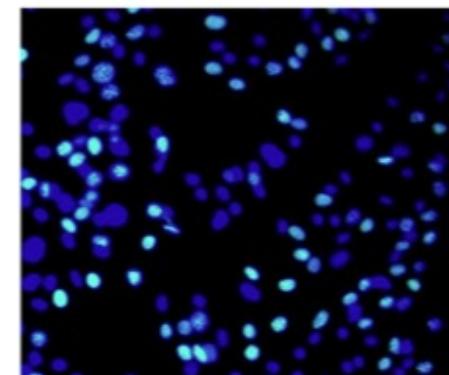
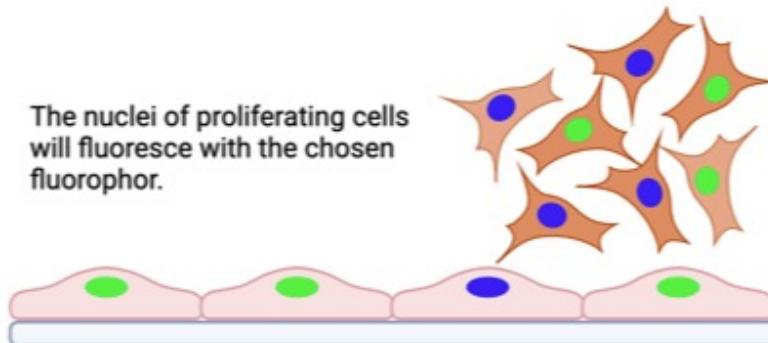
Cu(I)

Fluorescently labeled EdU



### Cell Nuclei Labeling

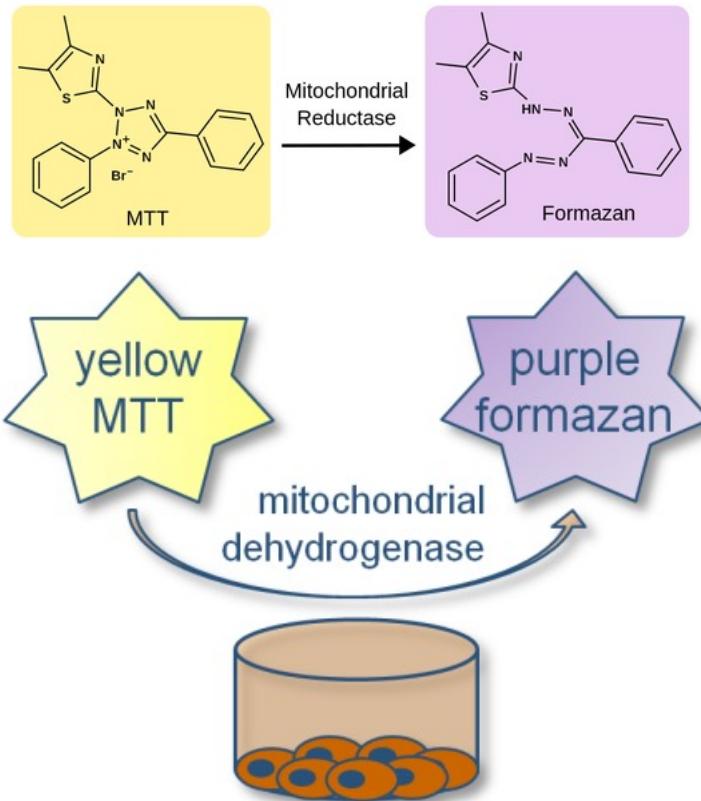
The nuclei of proliferating cells will fluoresce with the chosen fluorophor.



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)

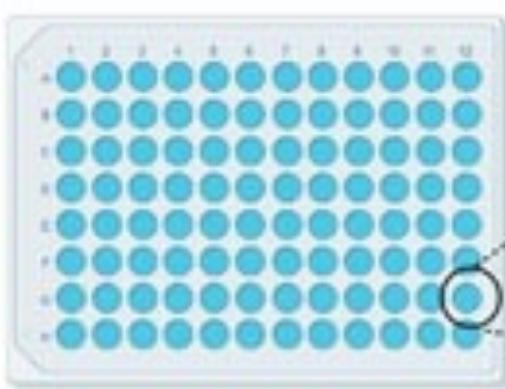
# Saggi di vitalità cellulare che misurano l'attività metabolica

La vitalità cellulare può essere stimata valutando l'attività metabolica

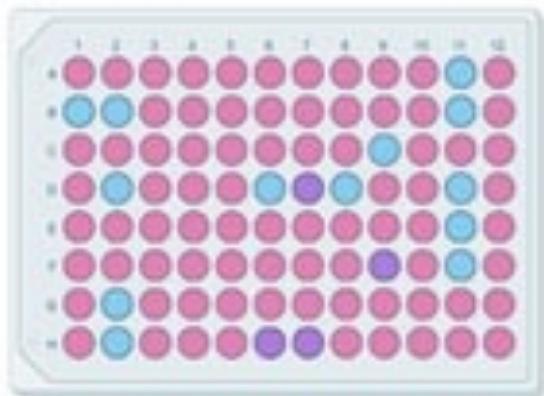
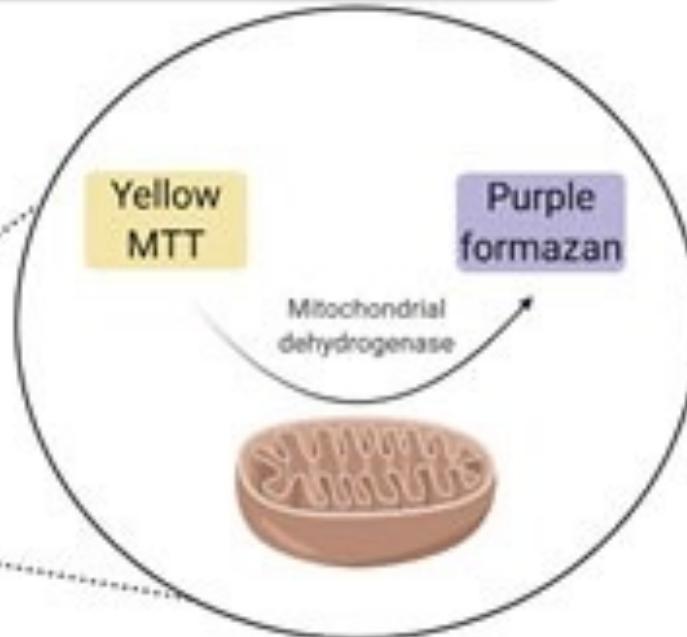


Un substrato solubile (sale di tetrazolio - giallo) viene convertito in un prodotto insolubile (formazan - viola) a seguito del trasferimento di elettroni da parte di riduttasi mitocondriali.

## Saggio MTT: procedura



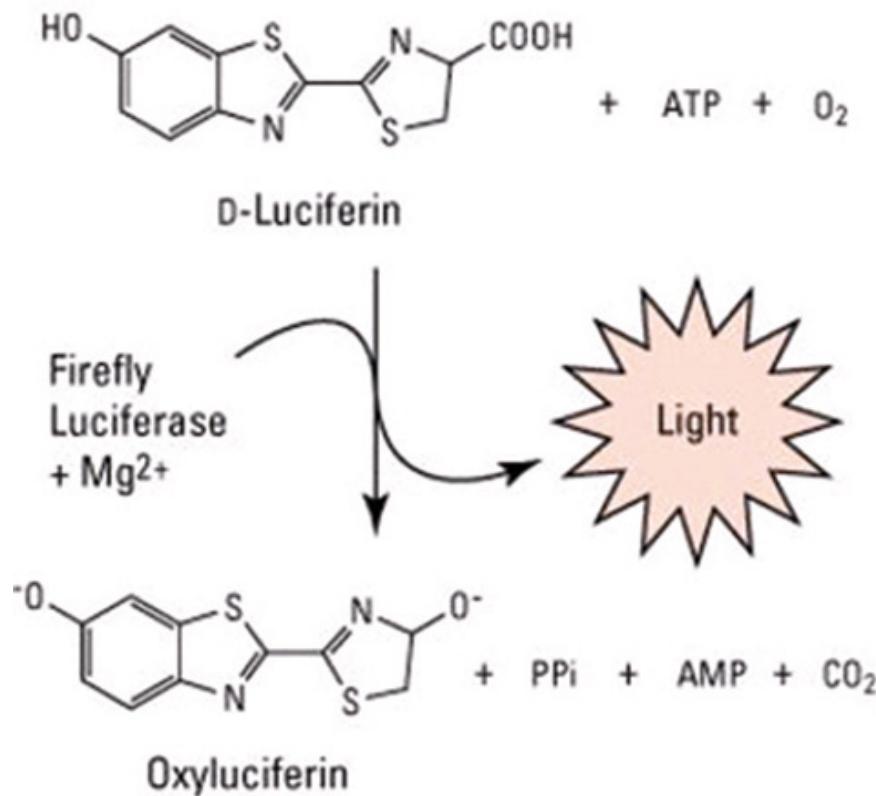
Cells in culture



Absorbance measurement



## Saggi di vitalità cellulare che misurano l'ATP



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**.

la luce emessa è direttamente proporzionale alla concentrazione di ATP e di enzima

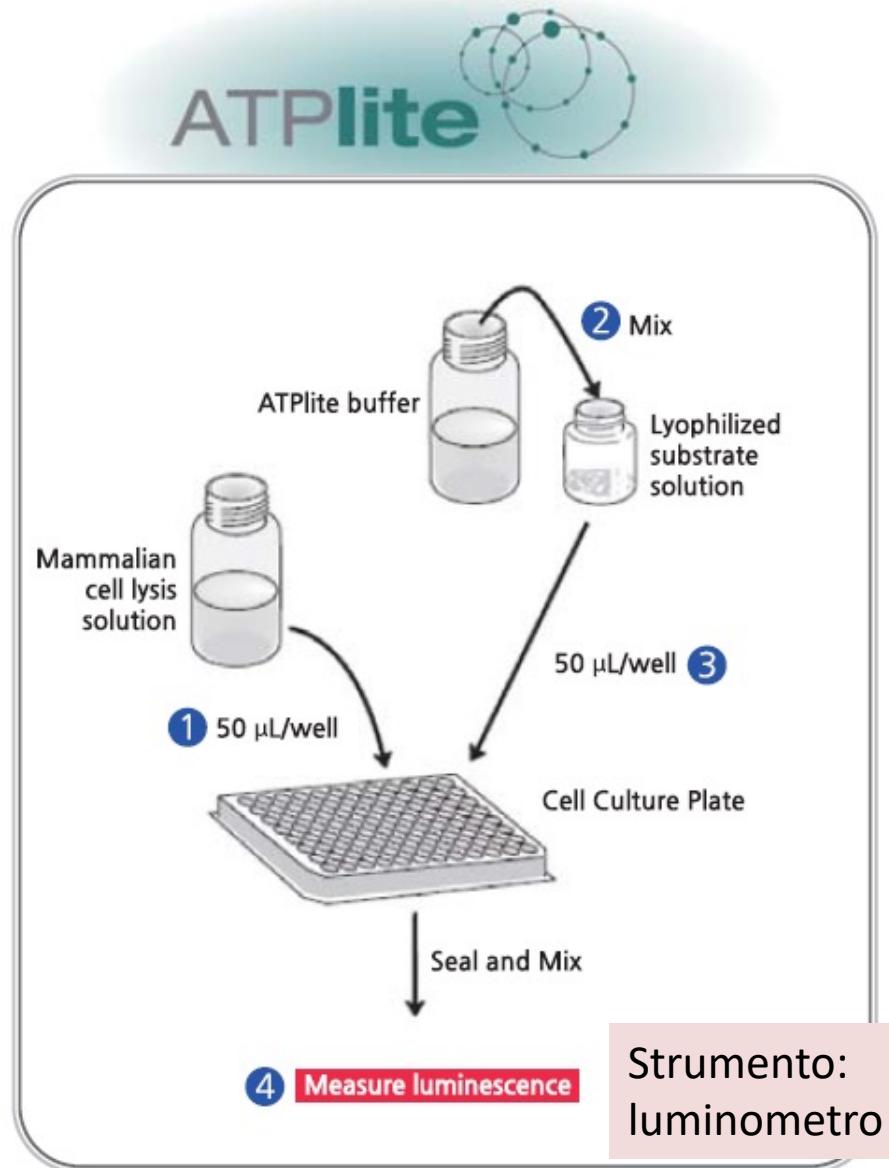
Vantaggi:

ampio range di linearità

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

ridotto background: le cellule e i tessuti di mammifero hanno bassa luminescenza intrinseca.

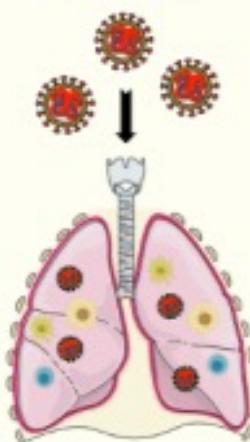
# Saggi di vitalità cellulare che misurano l'ATP cellulare



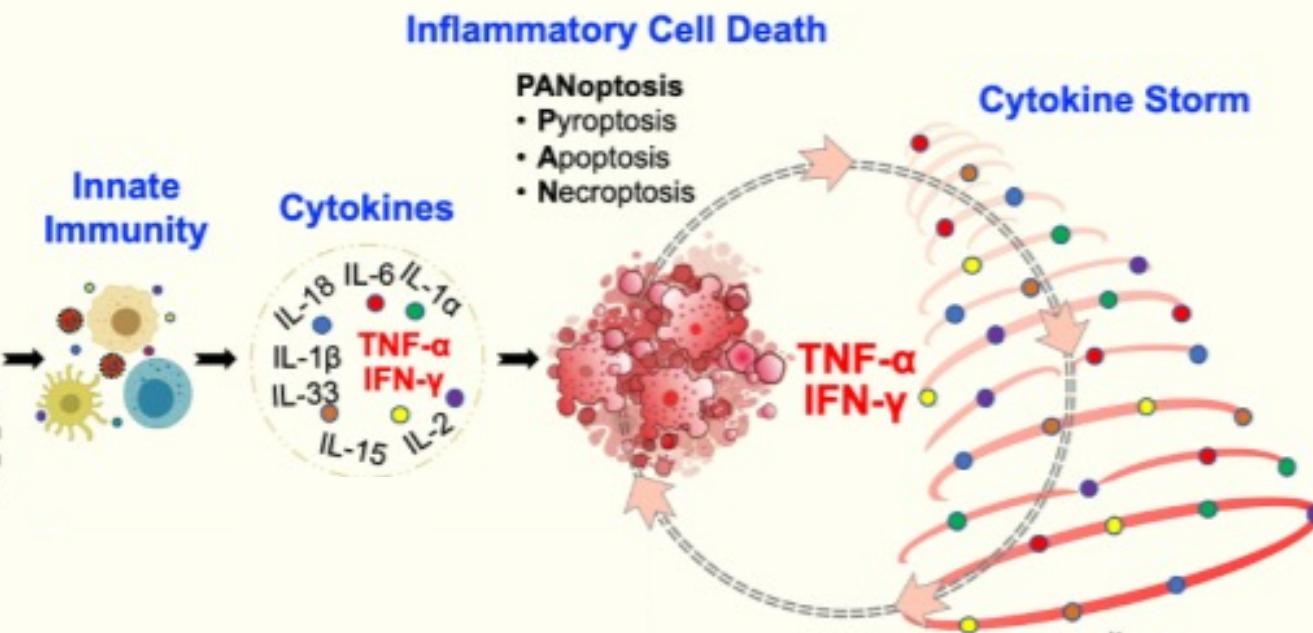
Verificata una diminuzione della vitalità, rimane da stabilire se questa sia associata a un AUMENTO DELLA MORTE CELLULARE

### morte cellulare “infiammatoria”

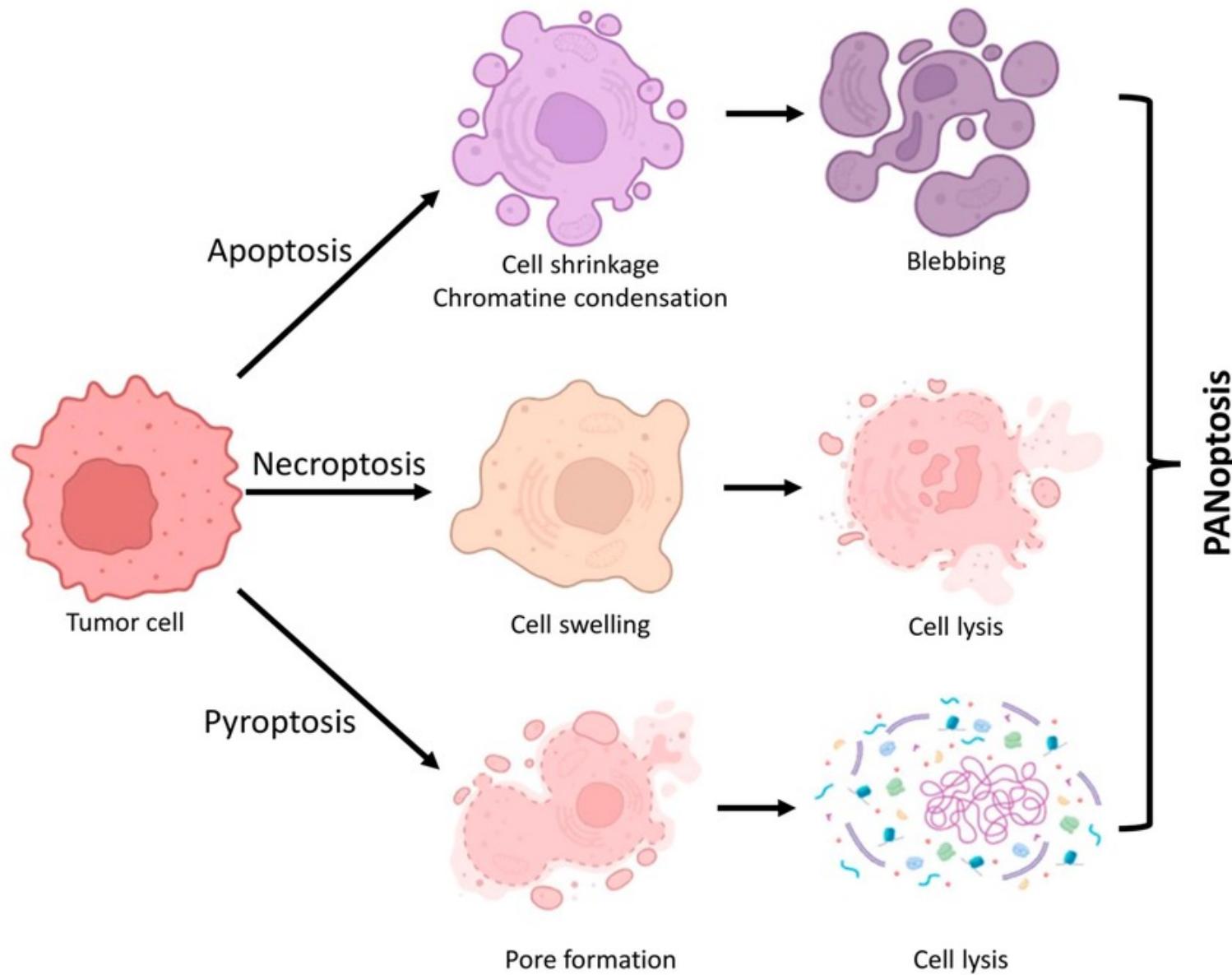
SARS-CoV-2  
Infection



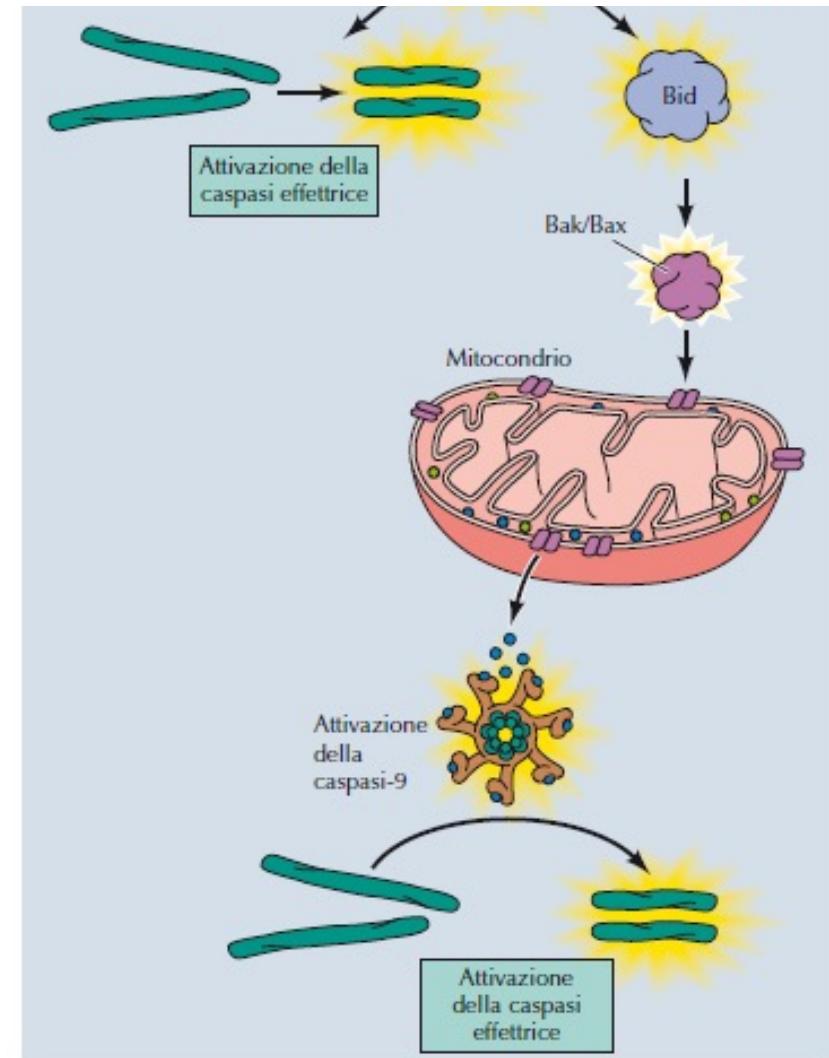
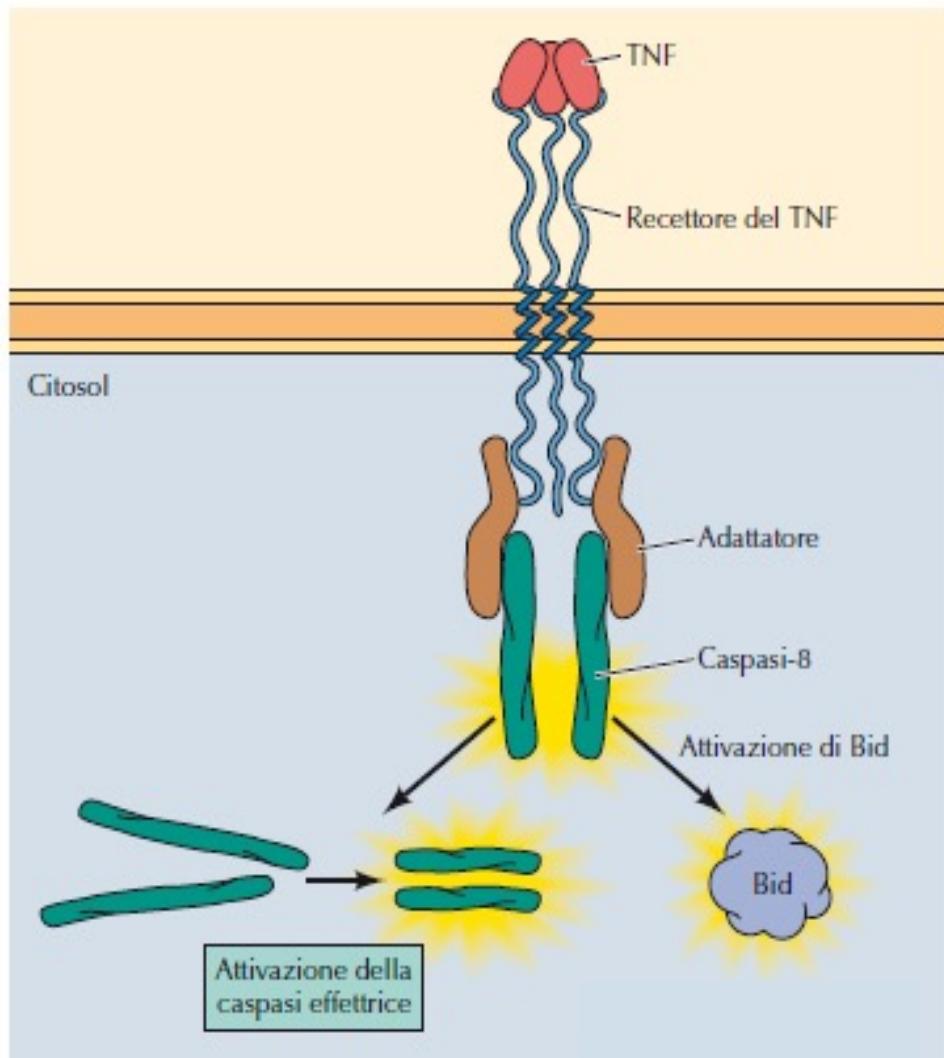
Innate  
Immunity



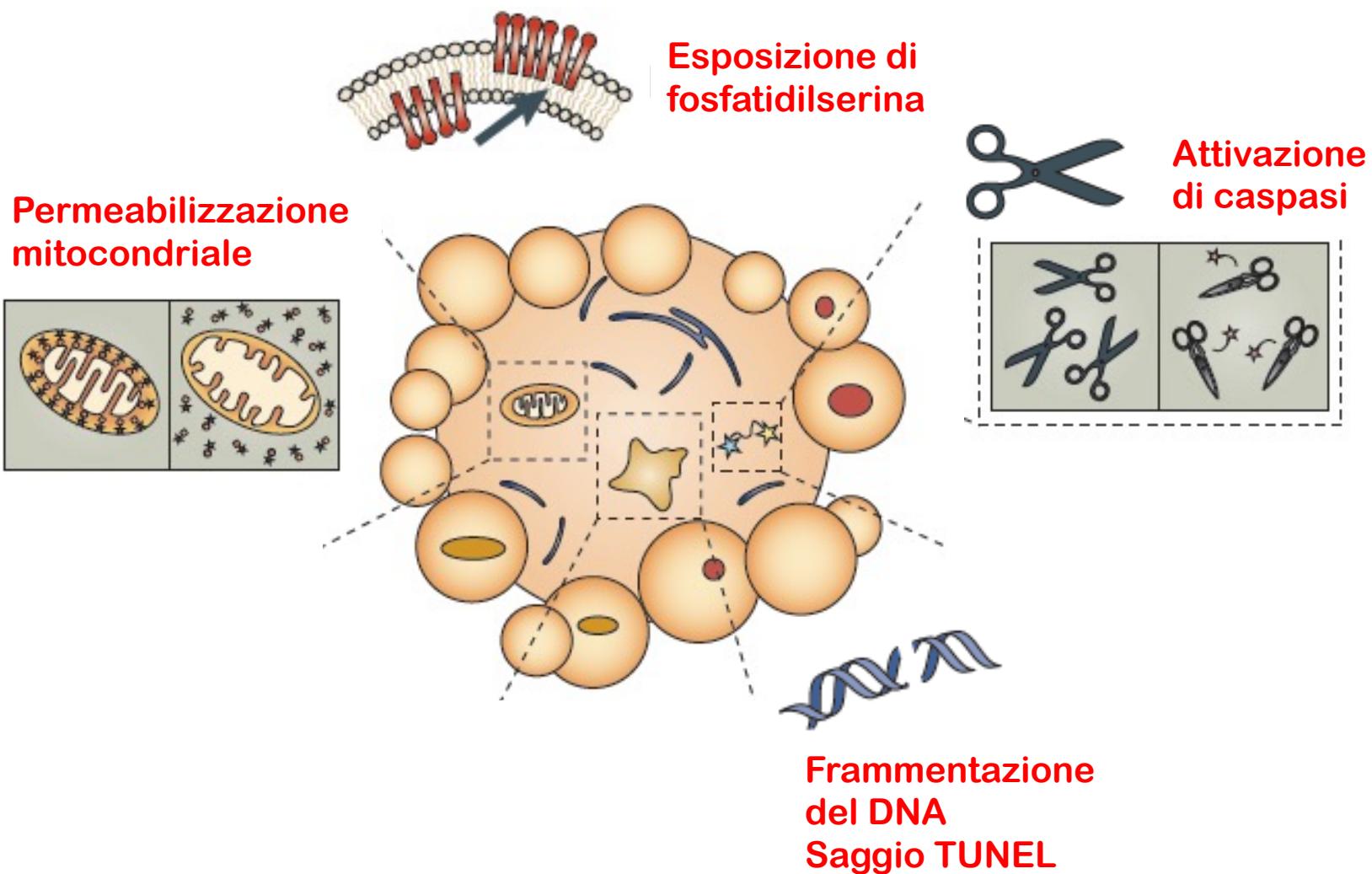
## morte cellulare “infiammatoria”



# TNF $\alpha$ innesca la via estrinseca dell'apoptosi

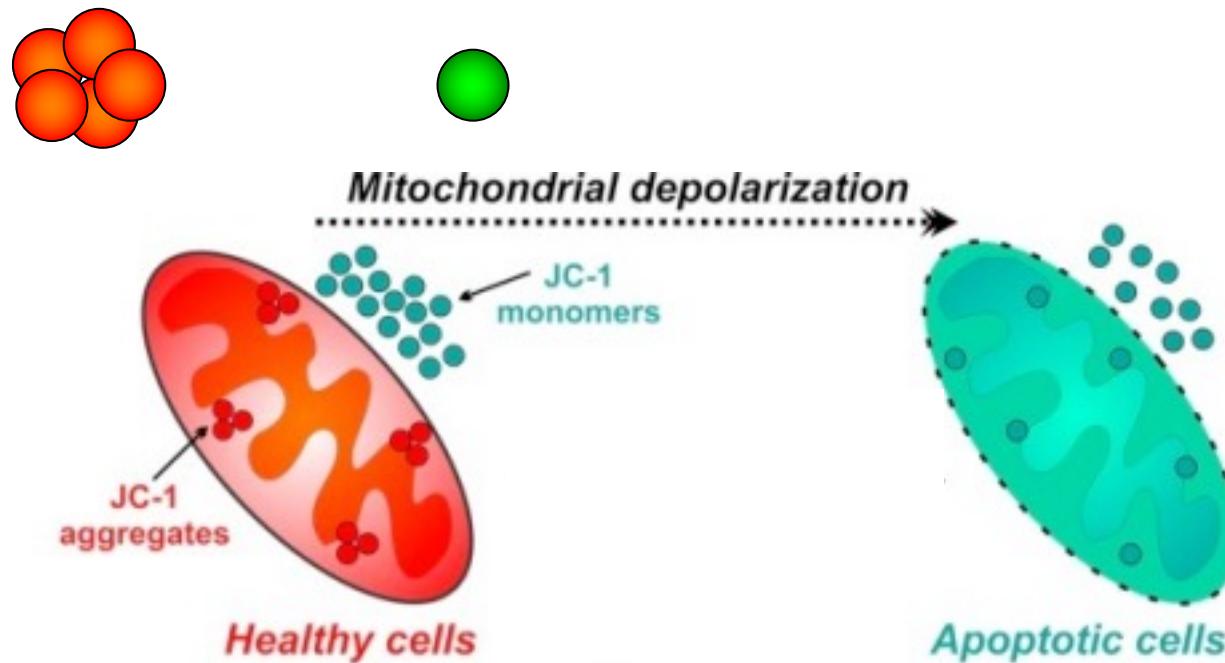


# APOPTOSI: SAGGI per valutare diversi EVENTI



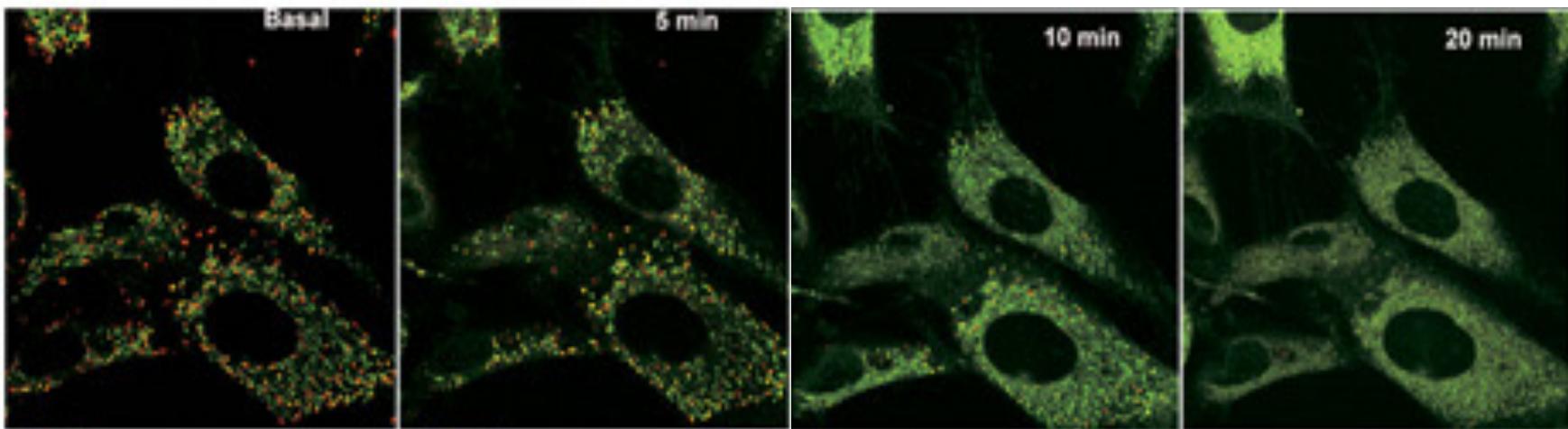
## Saggi di permeabilizzazione mitocondriale (anche live)

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

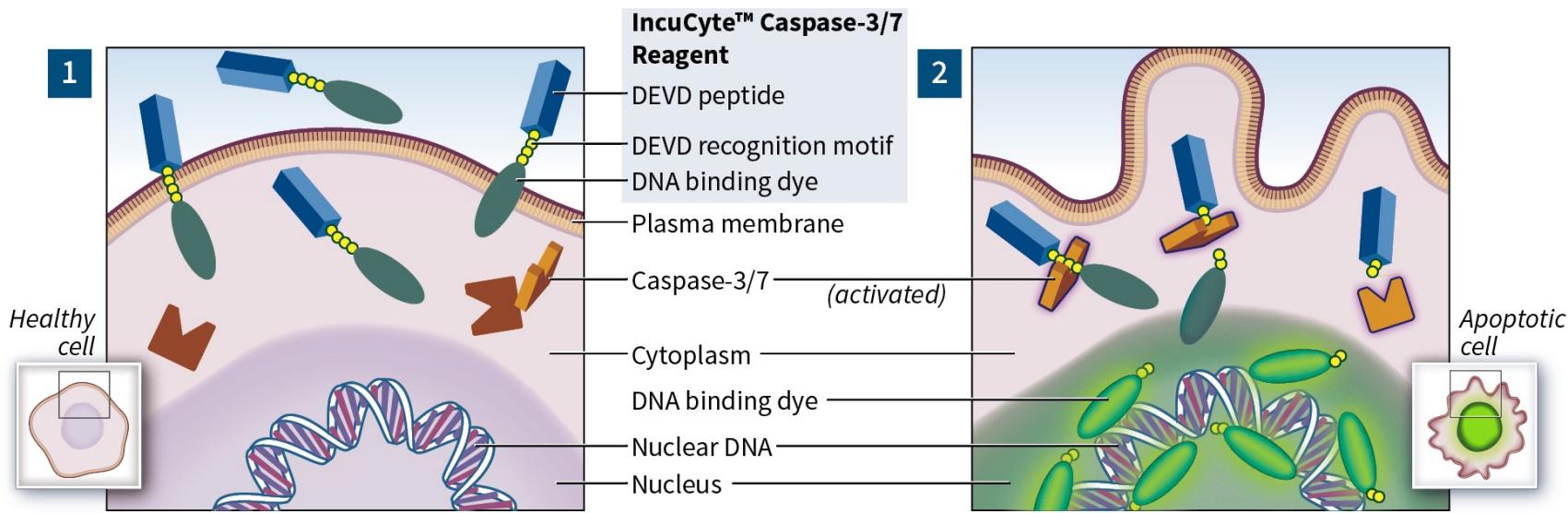


## Saggi di permeabilizzazione mitocondriale (anche live)

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



# Saggi di attivazione di caspasi (anche live)



## Incucyte™ Caspase-3/7 Reagent Added to Media

No fluorescence in the presence of healthy cells. The Caspase-3/7 Reagent freely crosses the cell membrane and is non-fluorescent and non-DNA binding.

## Apoptotic Cell Death and Caspase-3/7 Cleavage

Activated caspase-3/7 cleaves the Caspase-3/7 Reagent at the DEVD recognition motif, releasing a DNA binding dye that fluorescently labels the nuclear DNA of apoptotic cells.

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

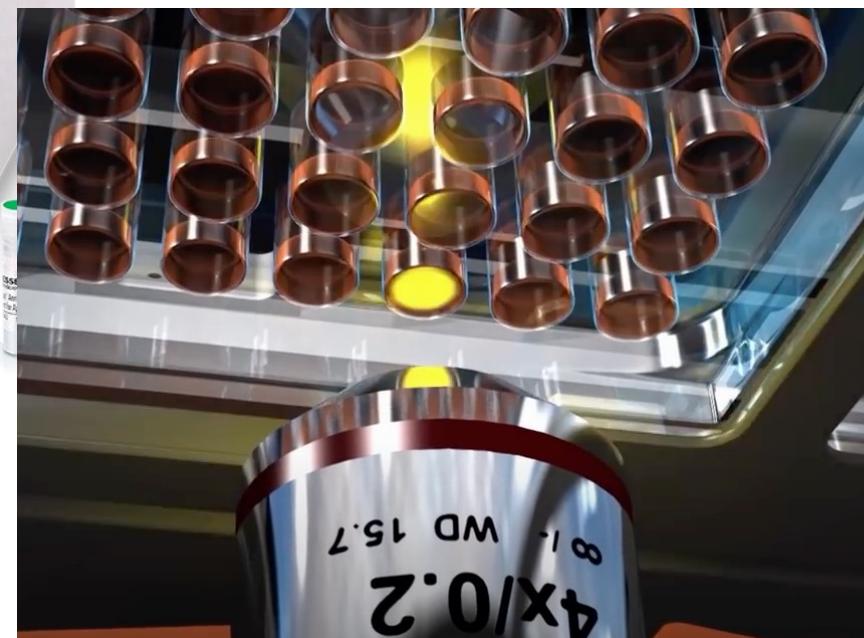
- un colorante fluorescente che si intercala al DNA, oppure
- una molecola chemoluminescente
- ...

# Valutazione di apoptosi realtime mediante live cell labeling



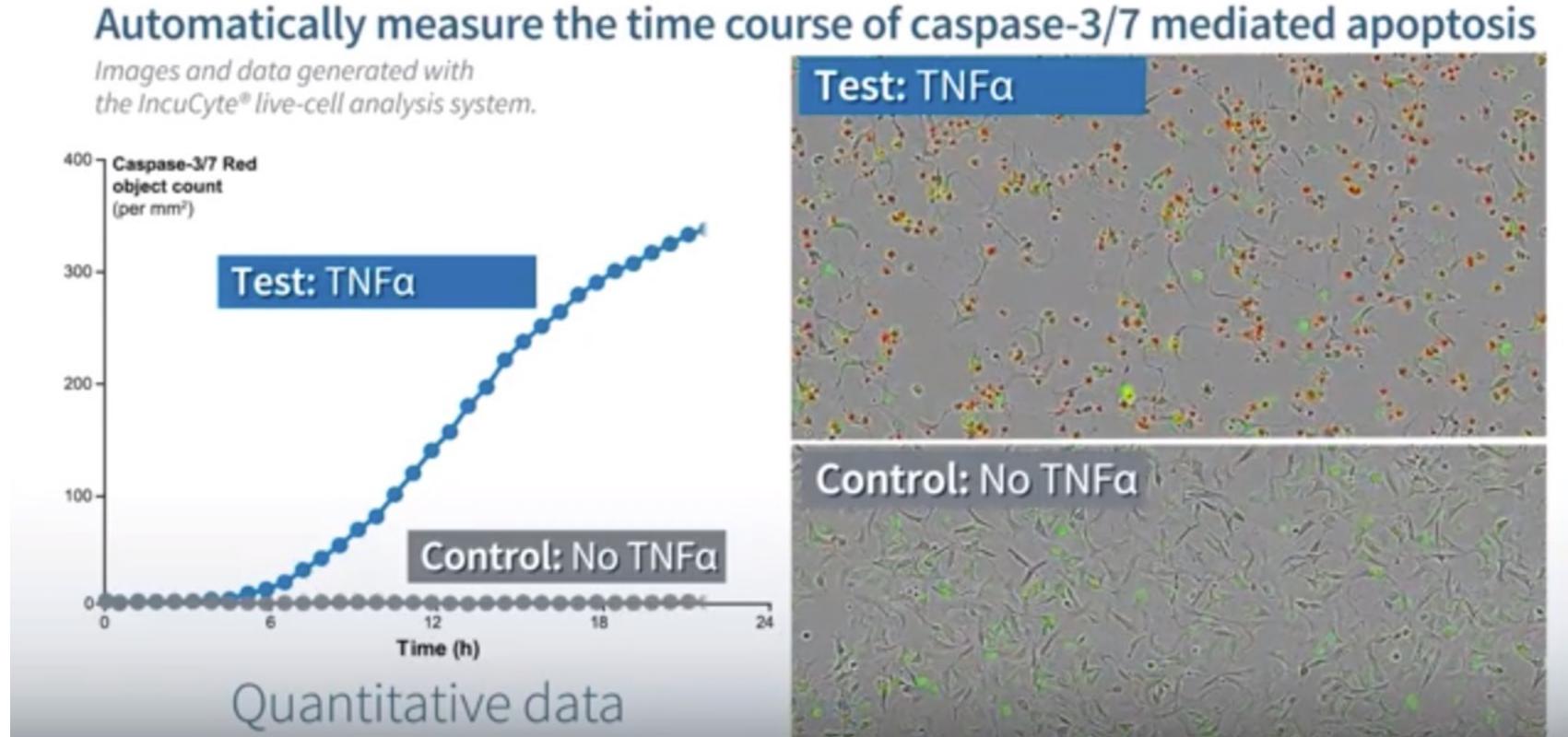
Incucyte® live-cell analysis system

<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>



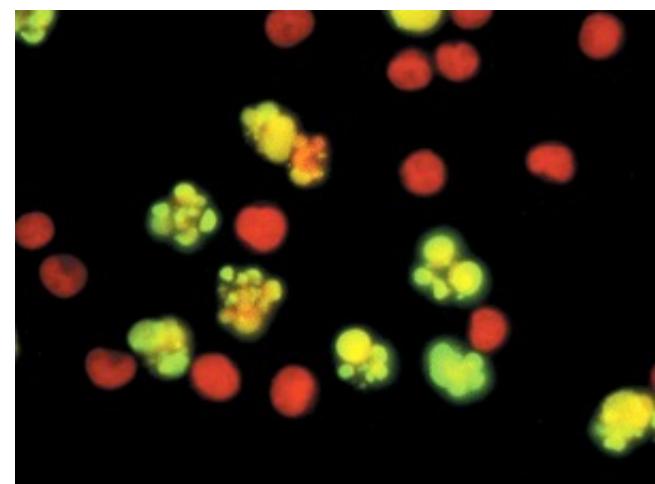
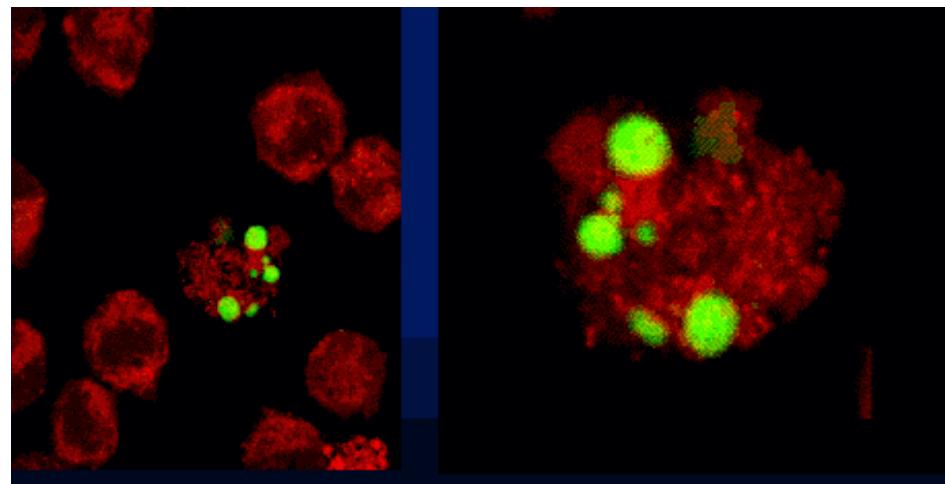
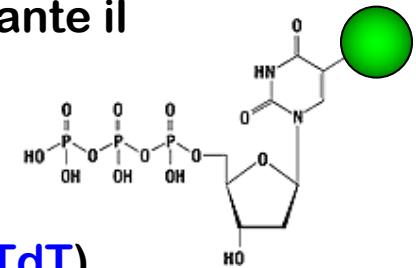
Real-time detection of apoptosis in Green labeled MDA-MB-231 human breast adenocarcinoma cells treated with **TNF $\alpha$**  and cycloheximide.

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.

# Frammentazione del DNA = 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**



## 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 (Annixin-RITC rosso) e vescicolazione
- 3) Frammentazione del nucleo:  
DNA colorato con DAPI blu

