

**Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche**

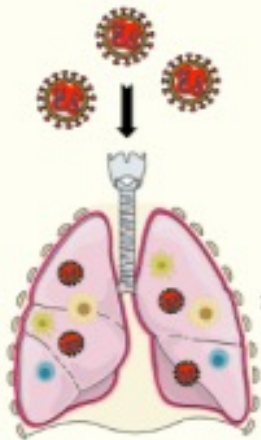
**AA 2025-2026**

**Corso di Biotecnologie Cellulari**

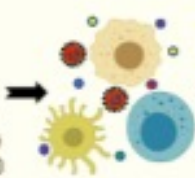
**Lezione 10**

# PROBLEMA BIOLOGICO E STATO DELL'ARTE

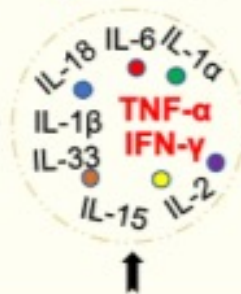
## SARS-CoV-2 Infection



## Innate Immunity

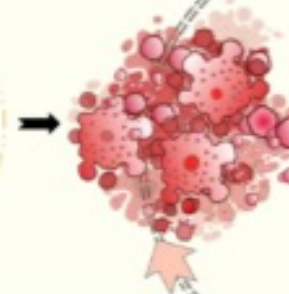


## Cytokines

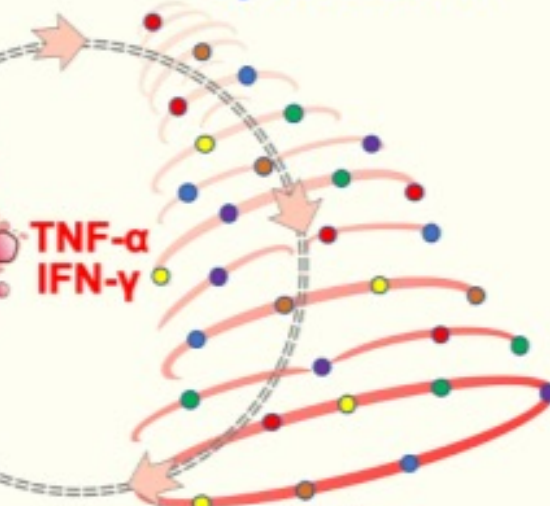


## Inflammatory Cell Death

- PANoptosis
- Pyroptosis
  - Apoptosis
  - Necroptosis



## Cytokine Storm



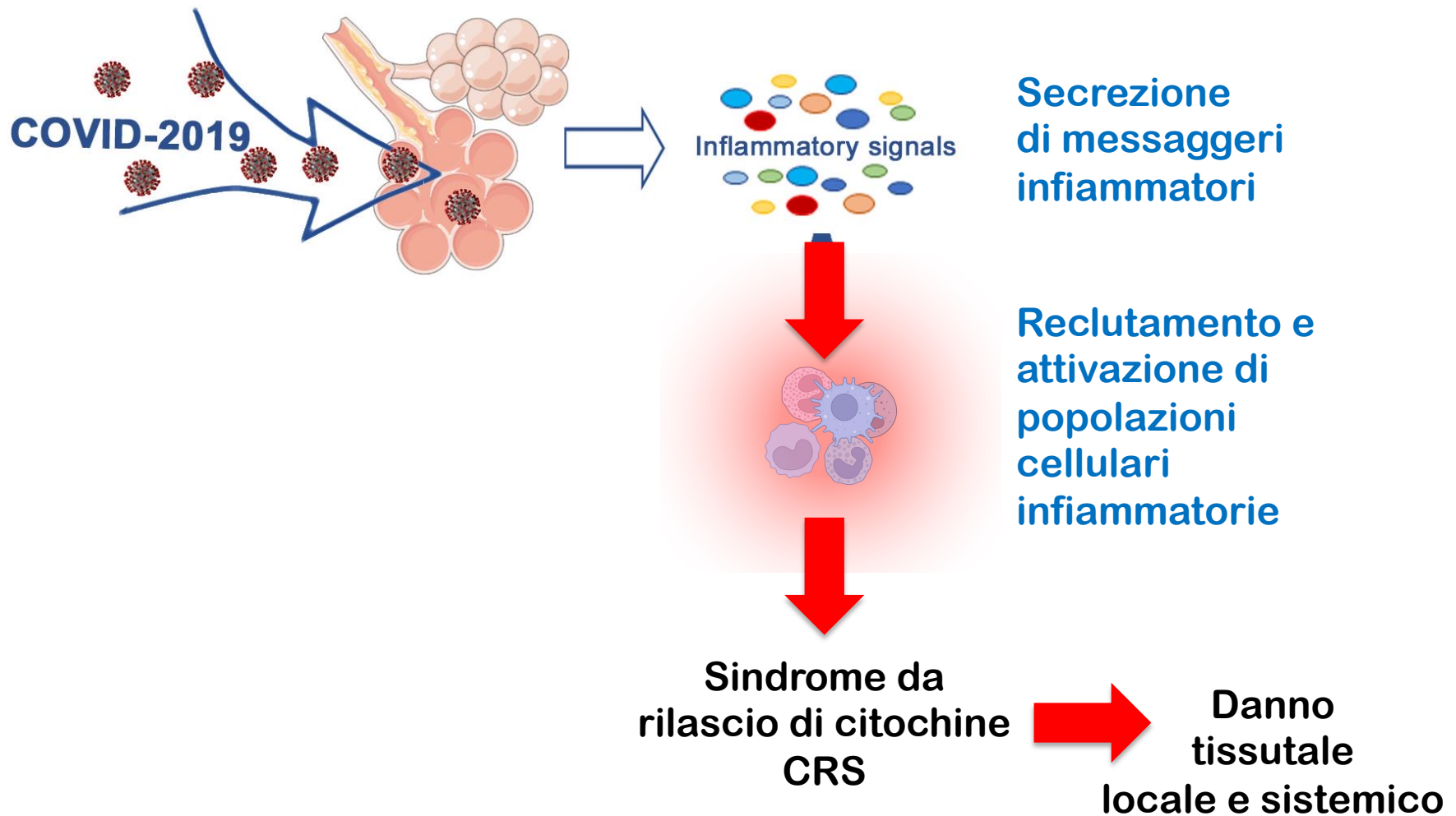
## Cytokine Shock Syndromes



ARDS  
(Local)

Multi-Organ Failure (Systemic)

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.**

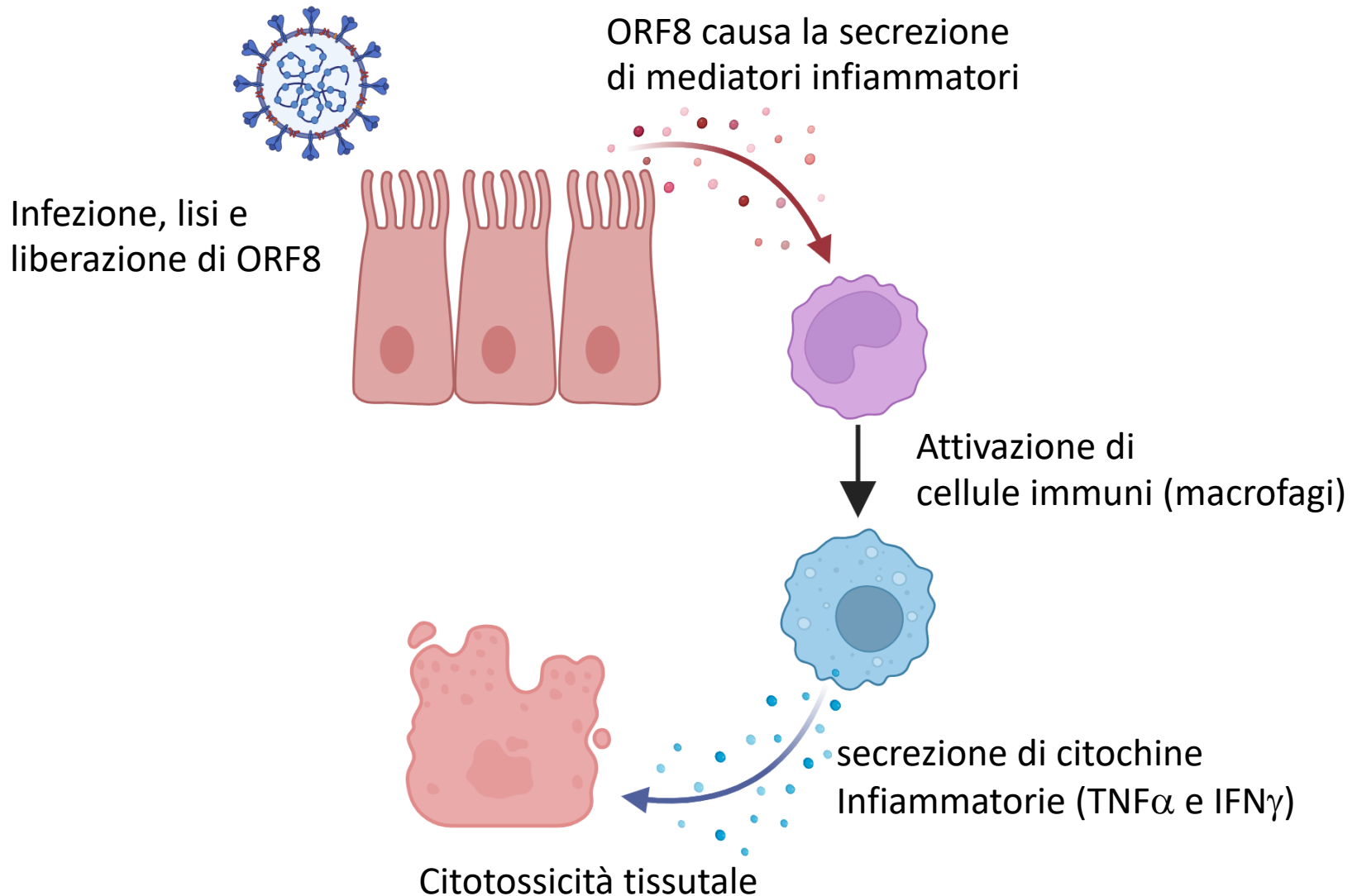
### **RISULTATO:**

**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)

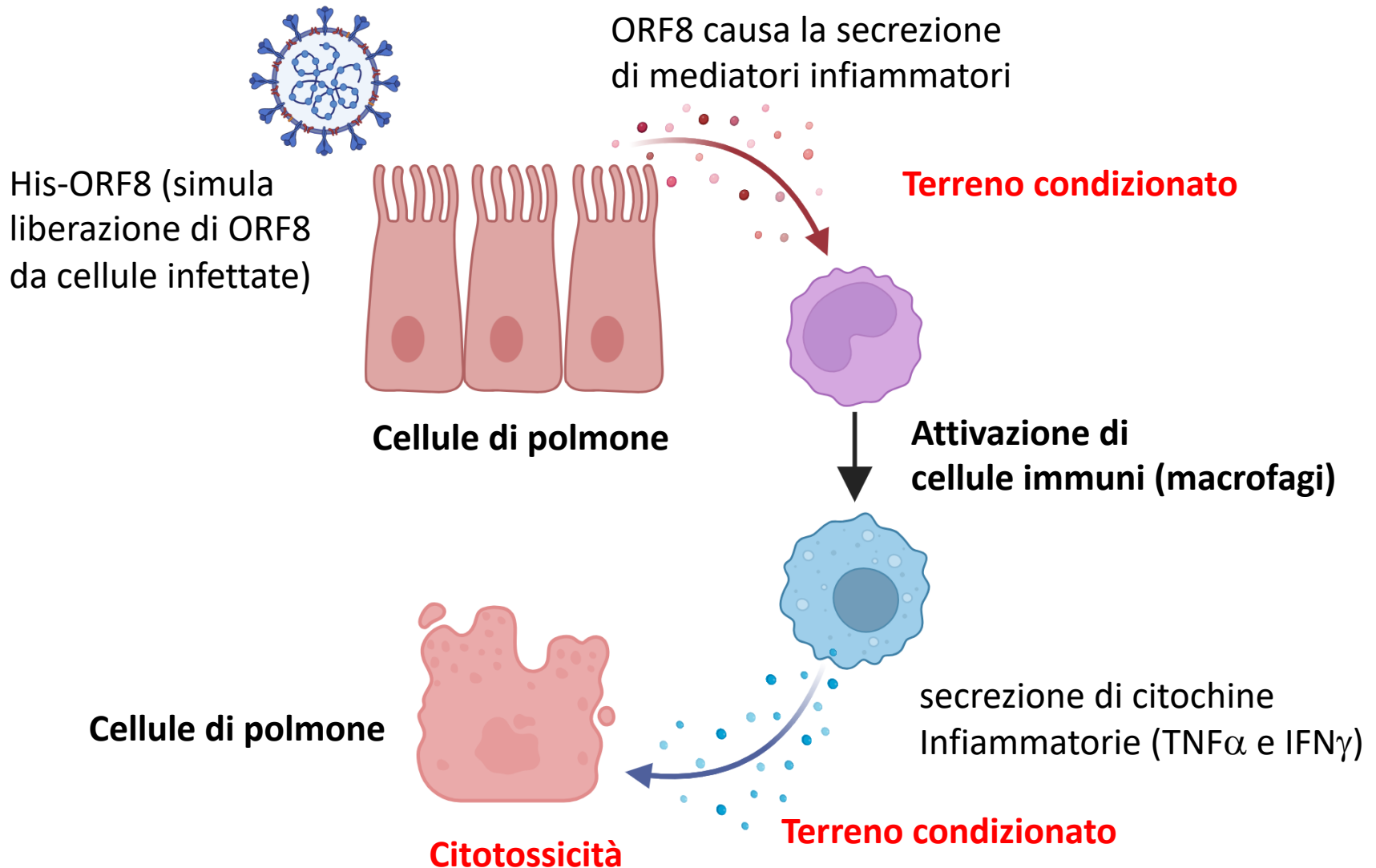
Analisi della capacità di ORF8 di indurre reclutamento e **attivazione di cellule infiammatorie** da parte di cellule del polmone attraverso l'interazione con IL17RA

### Esperimento 2)

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

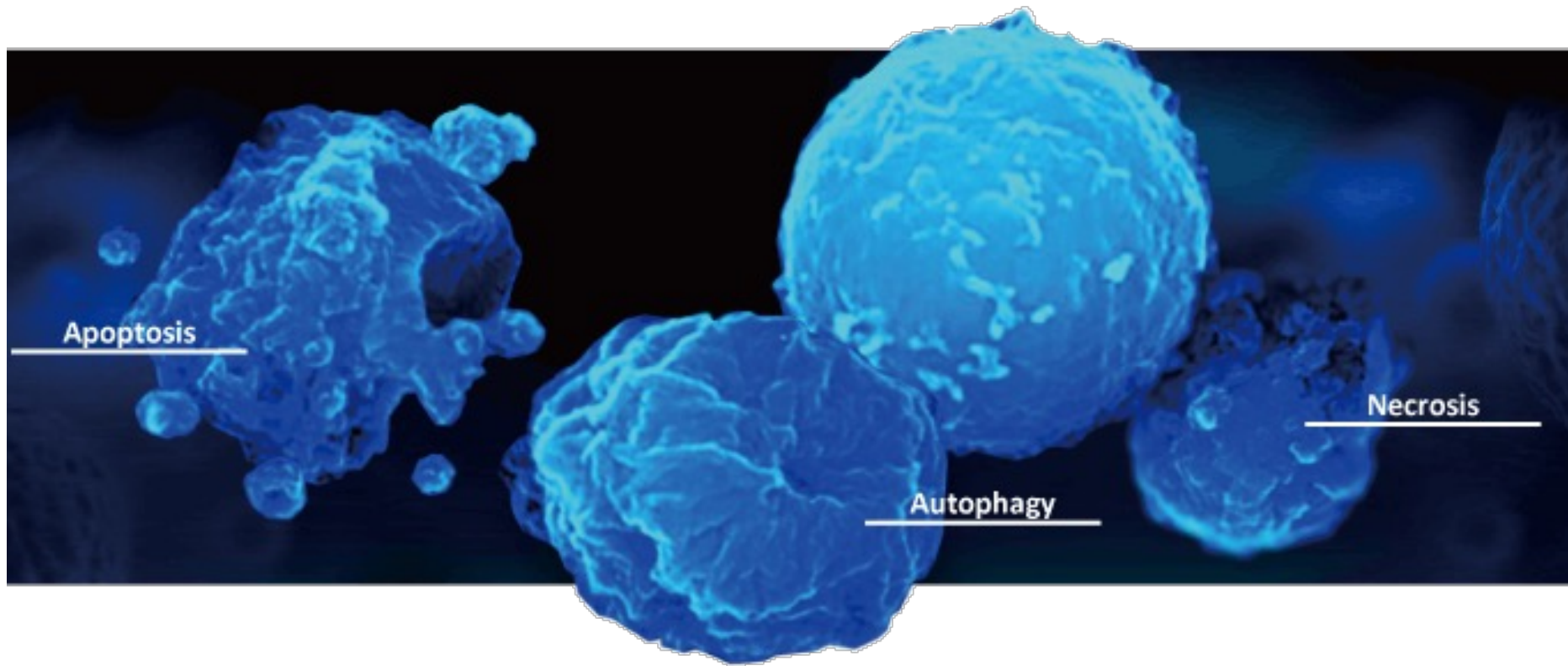


## ESPERIMENTO 2)



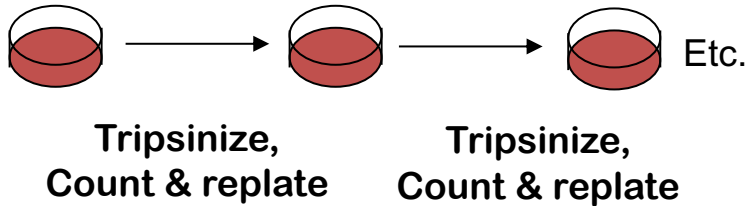
**SAGGI di VITALITA' CELLULARE e**

**SAGGI di MORTE CELLULARE**



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

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

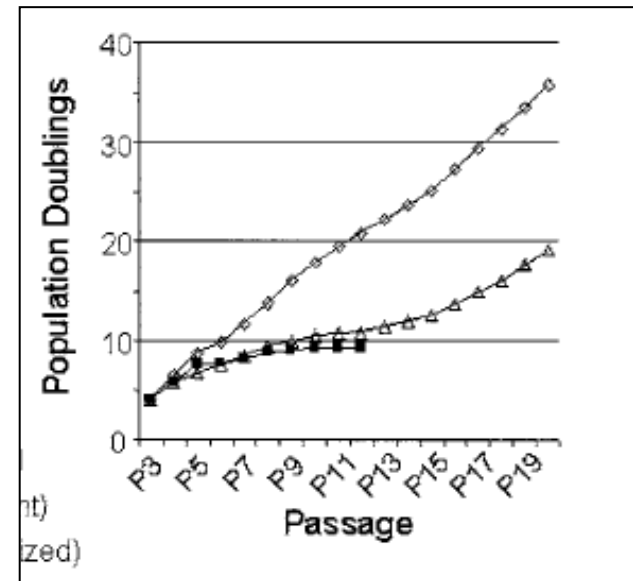


Ad ogni passaggio si semina un numero costante di cellule ( $9 \times 10^5$ )

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

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

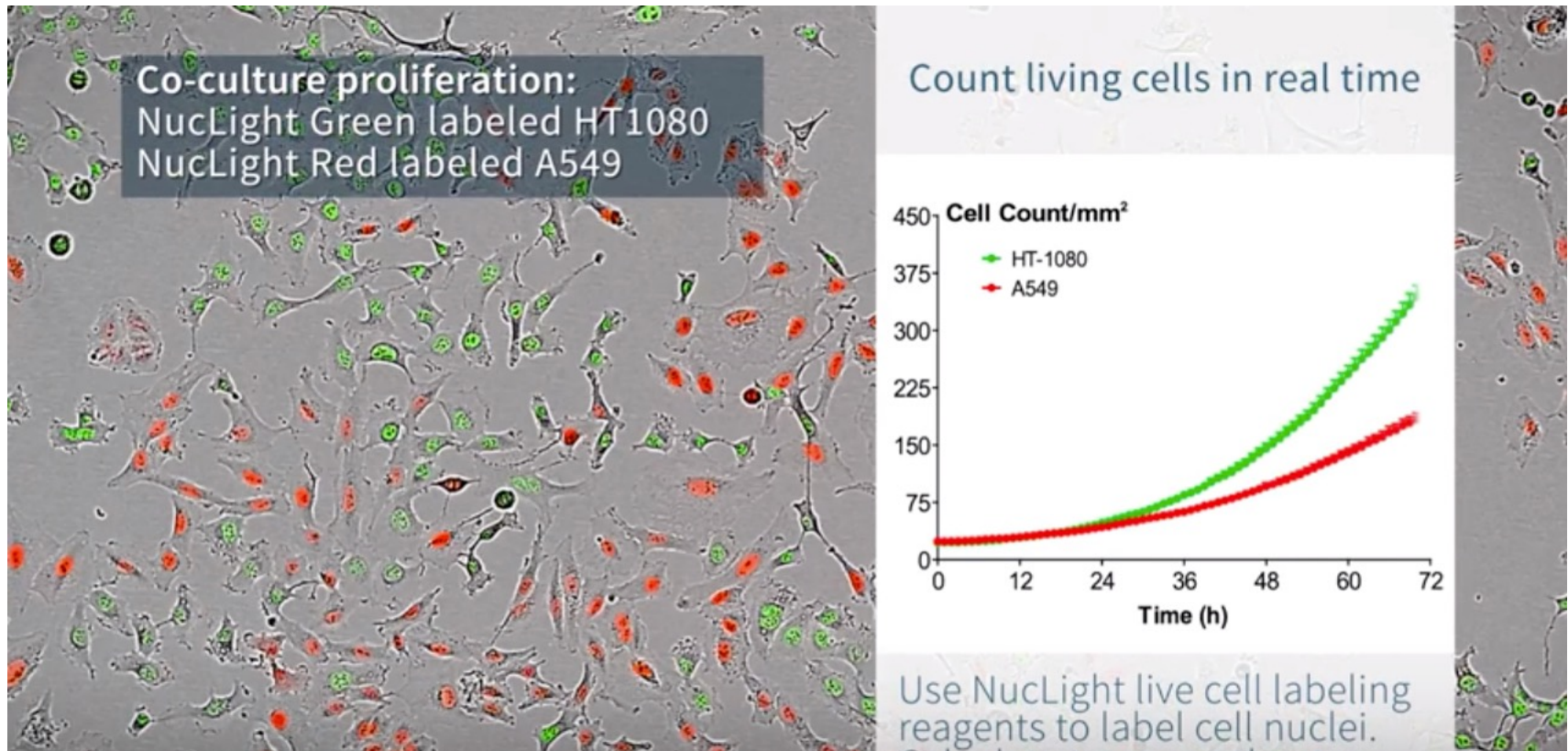
$PD = \log_2 (N_f/N_0)$



## 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<sup>®</sup>  
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

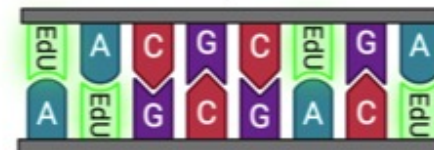


"Click-iT™" Reaction

Fluorophor-Azide

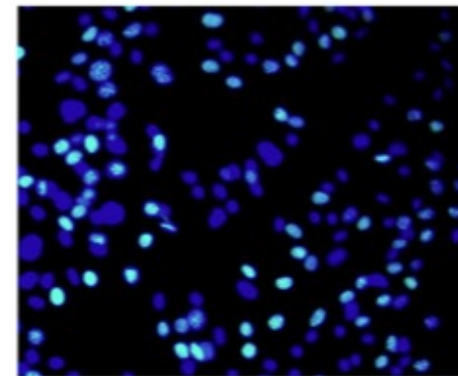
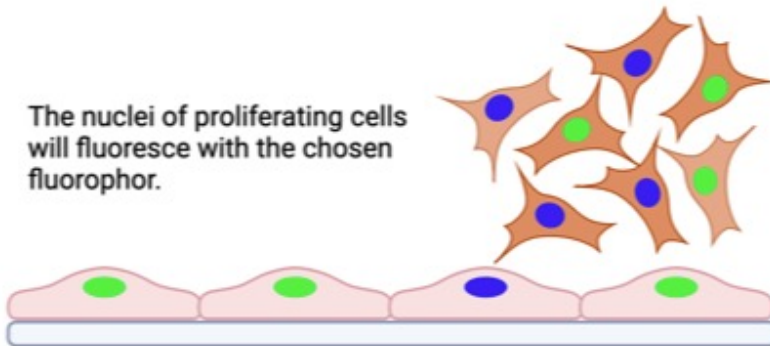
Cu(I)

Fluorescently labeled EdU



### Cell Nuclei Labeling

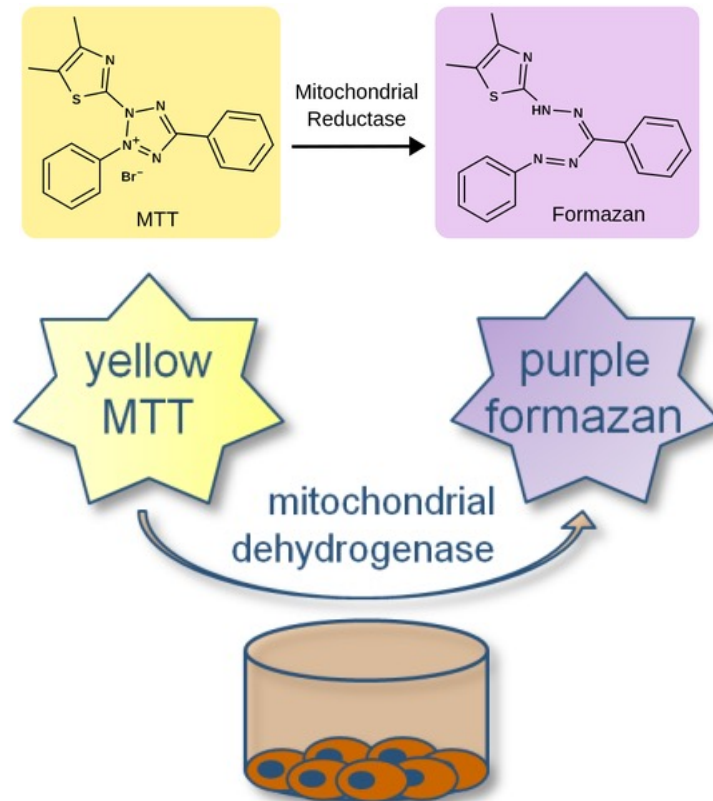
The nuclei of proliferating cells will fluoresce with the chosen fluorophor.



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

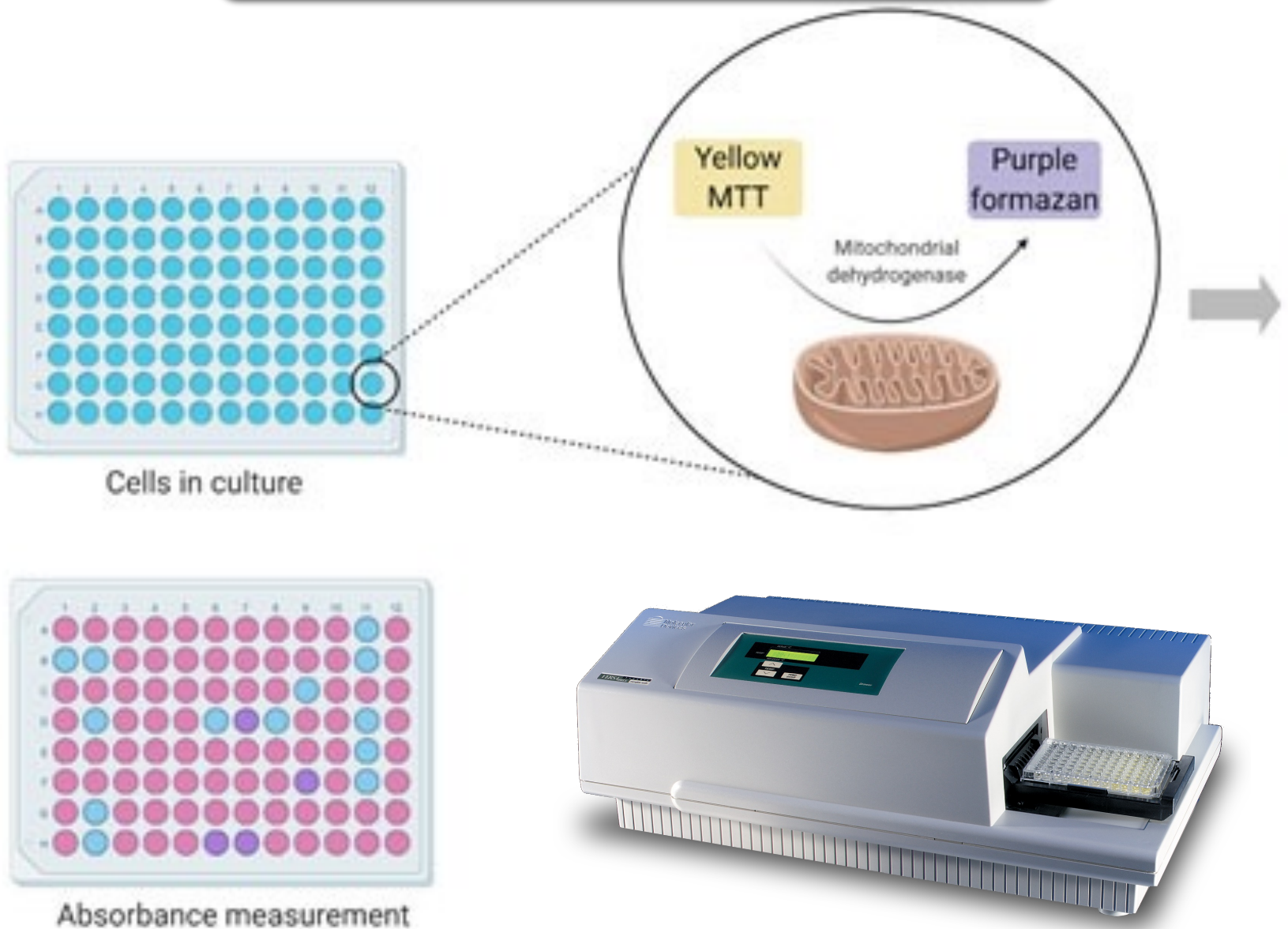
La vitalità cellulare può essere stimata valutando l'attività metabolica



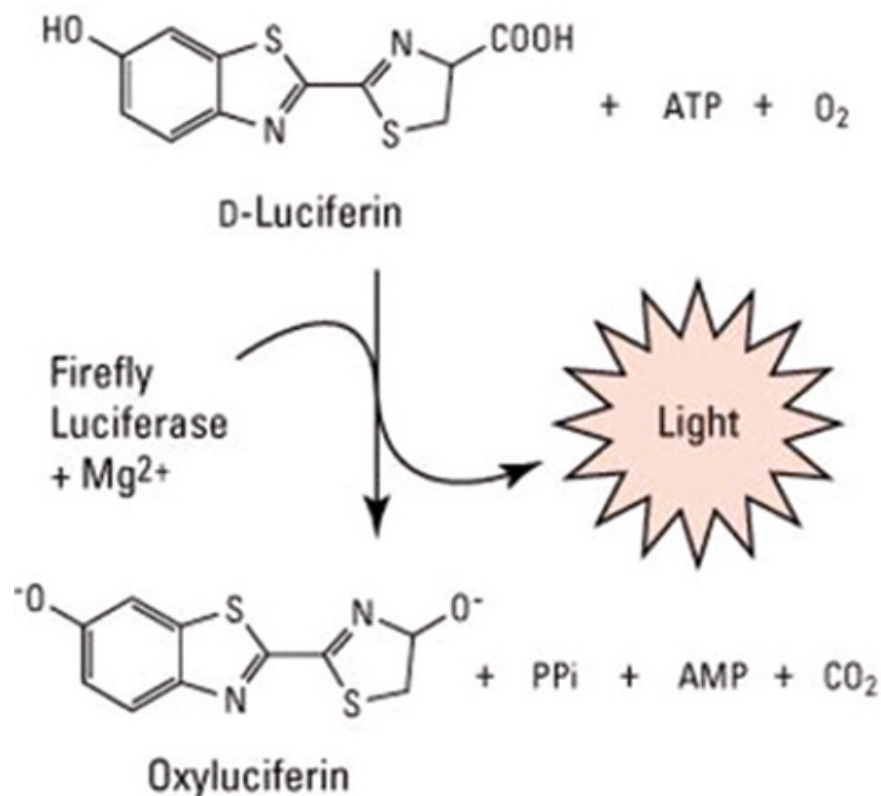
Un substrato solubile (sale di tetrazolio - giallo) viene convertito in un prodotto insolubile (formazan - viola) a seguito del trasferimento di elettroni da parte di riduttasi mitocondriali.



# Saggio MTT: procedura



## 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

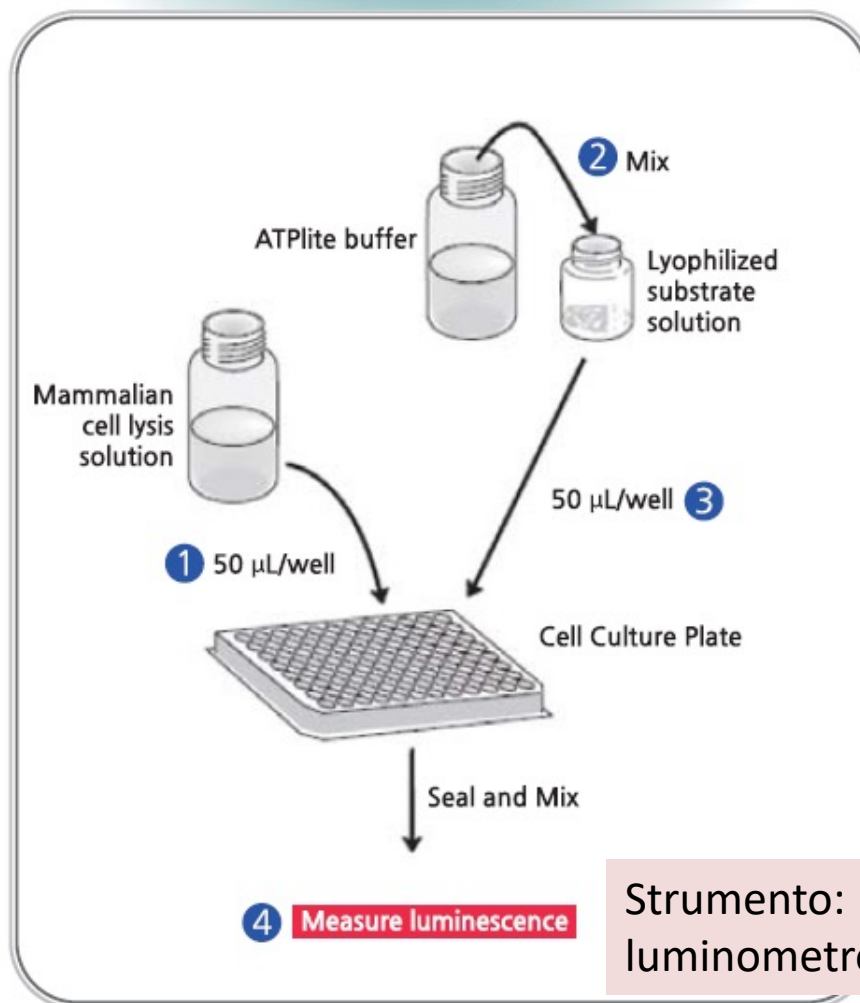
### **Vantaggi:**

ampio range di **linearità**

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

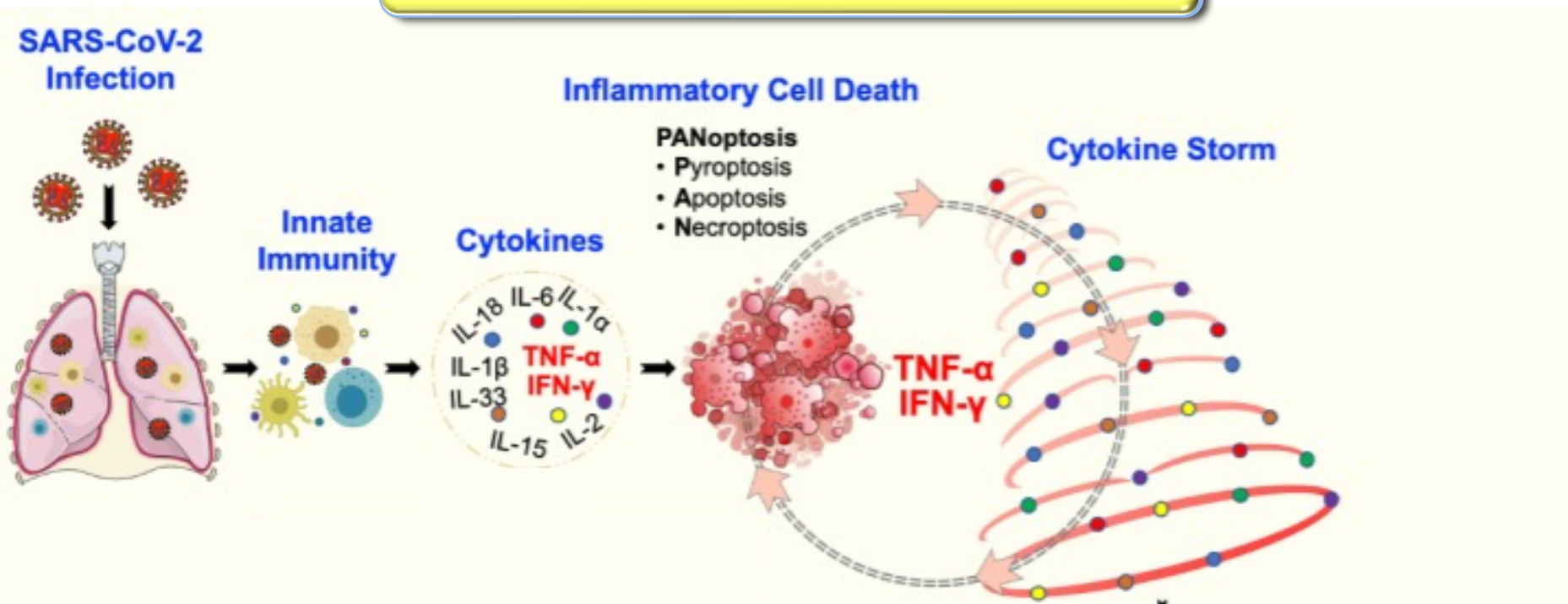
**ridotto background**: le cellule e i tessuti di mammifero hanno bassa luminescenza intrinseca.

# Saggi di vitalità cellulare che misurano l'ATP cellulare

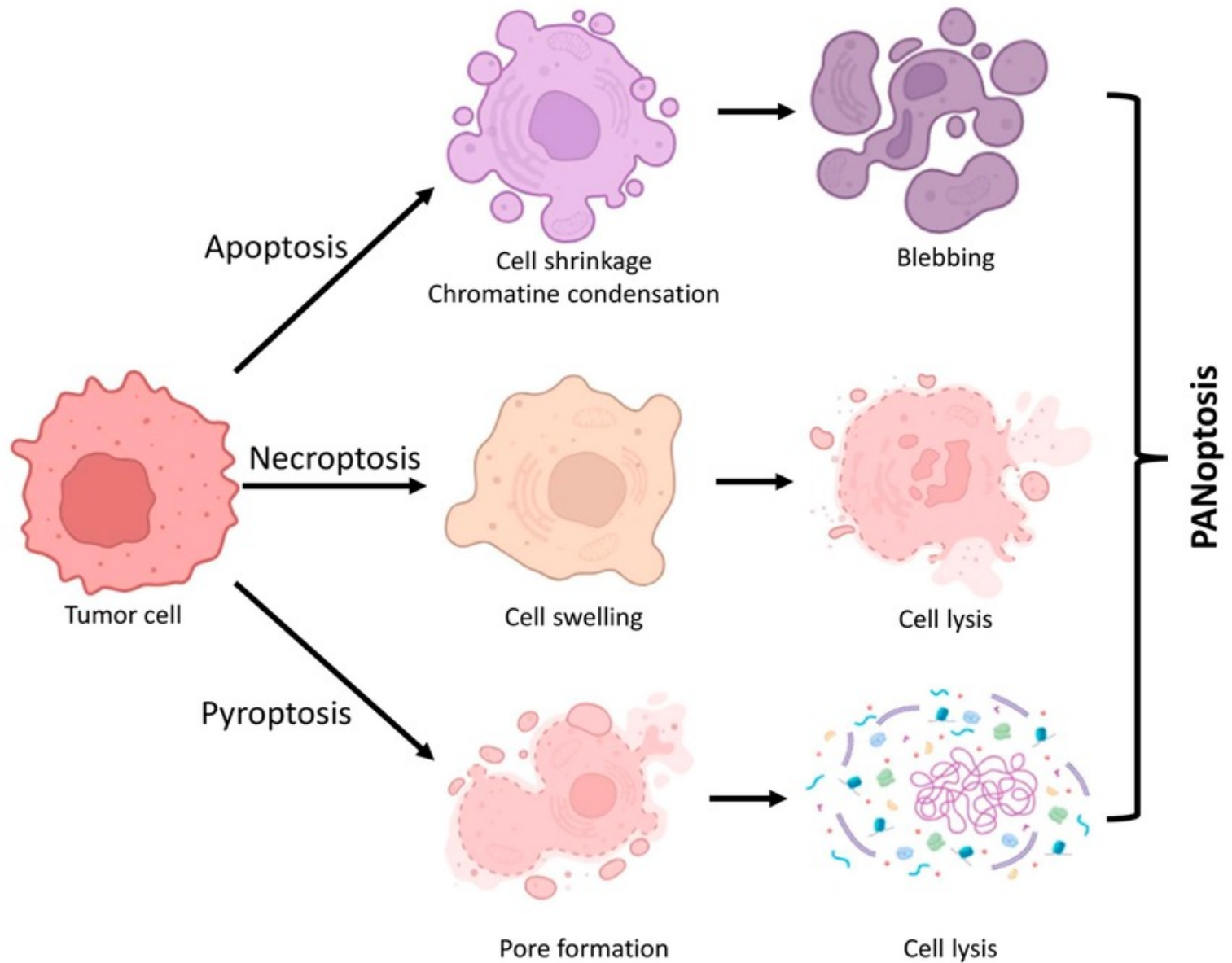


Verificata una diminuzione della vitalità, rimane da stabilire se questa sia associata a un **AUMENTO DELLA MORTE CELLULARE**

**morte cellulare “infiammatoria”**

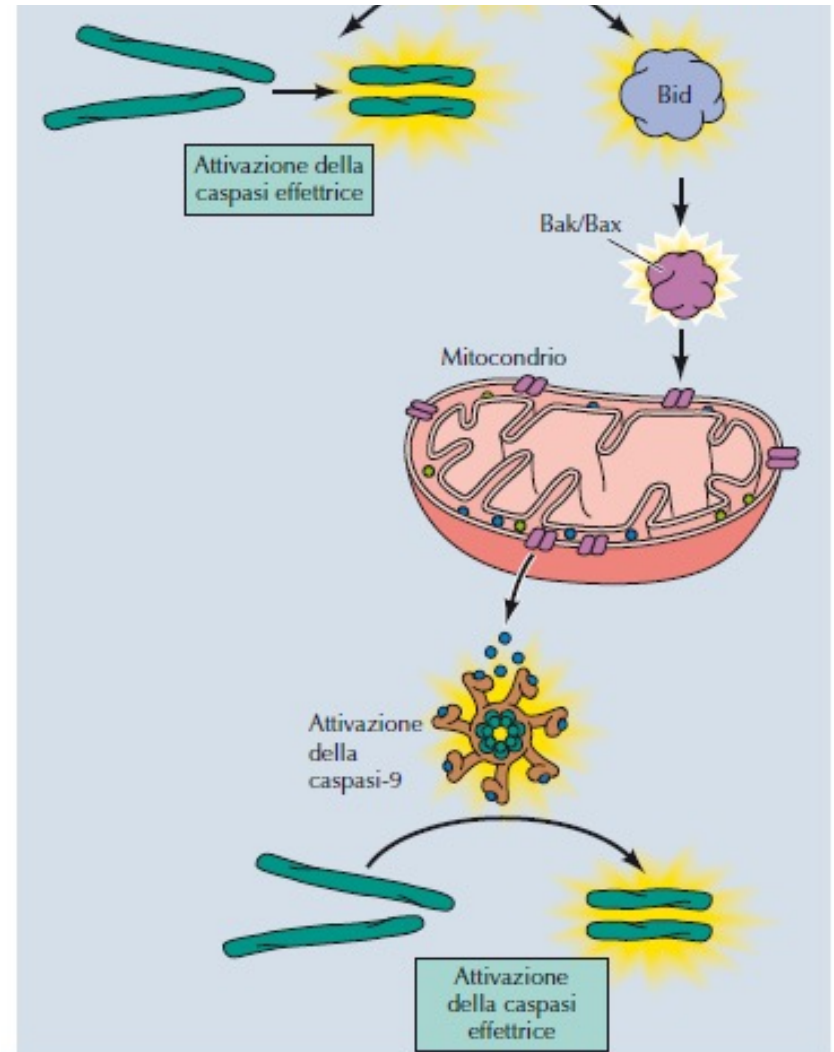
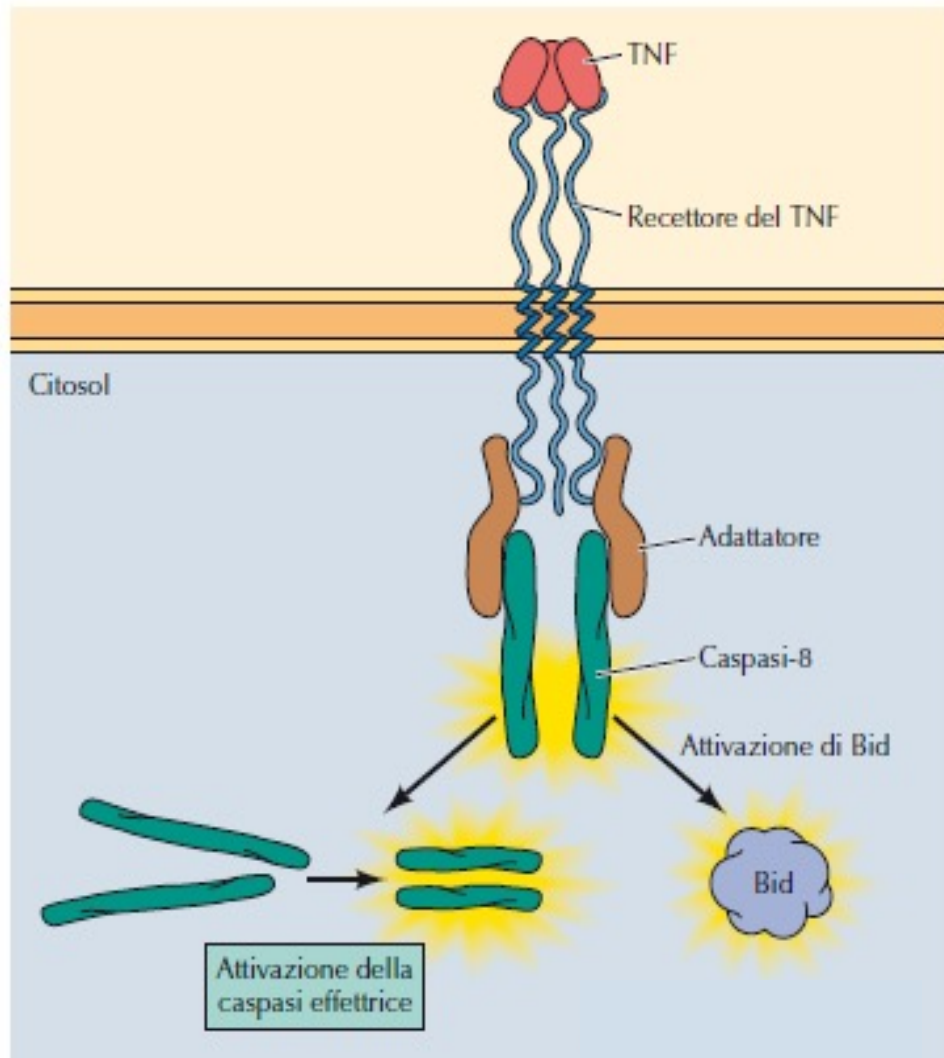


## morte cellulare “infiammatoria”



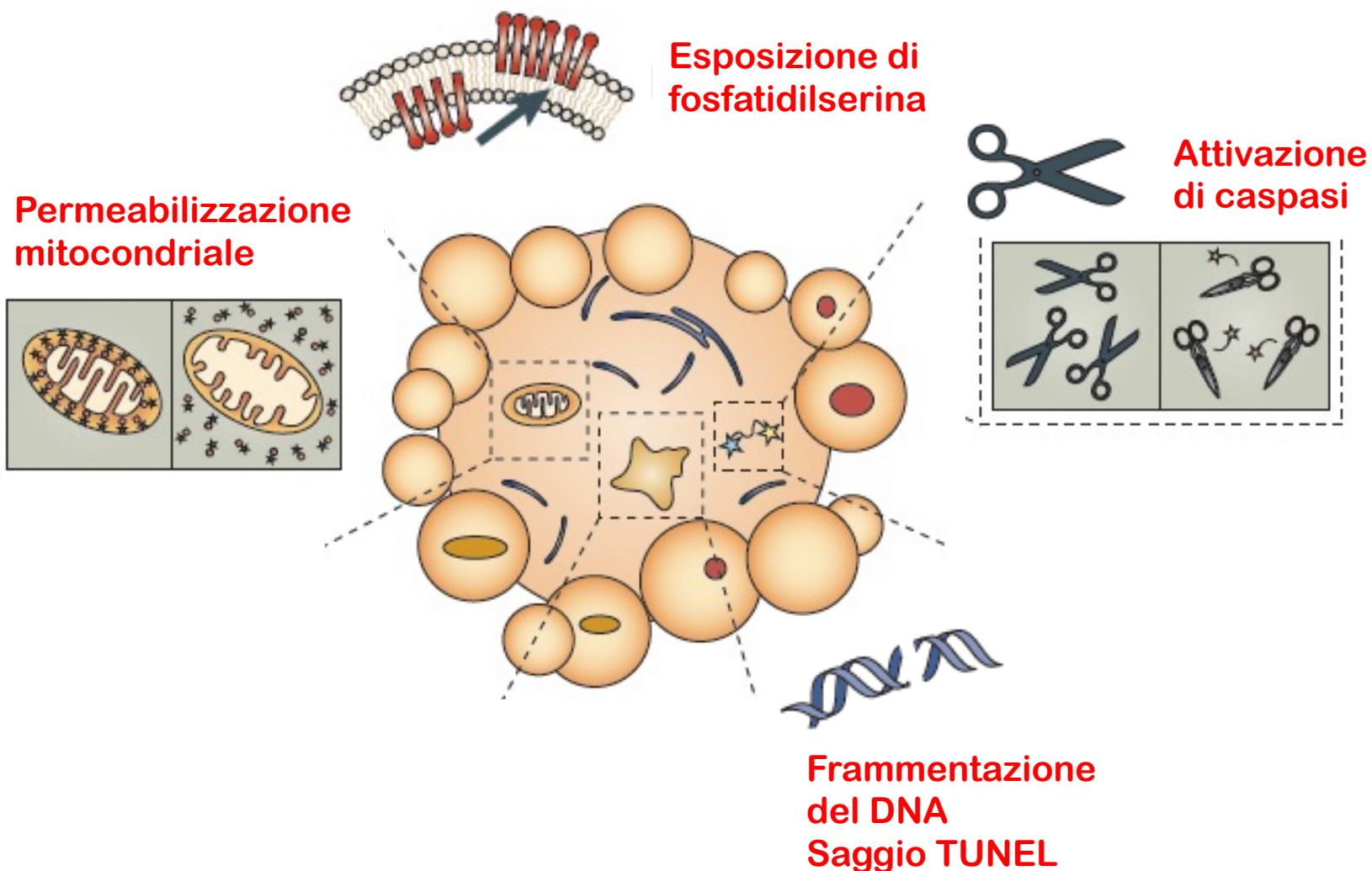


# TNF $\alpha$ innesca la via estrinseca dell'apoptosi



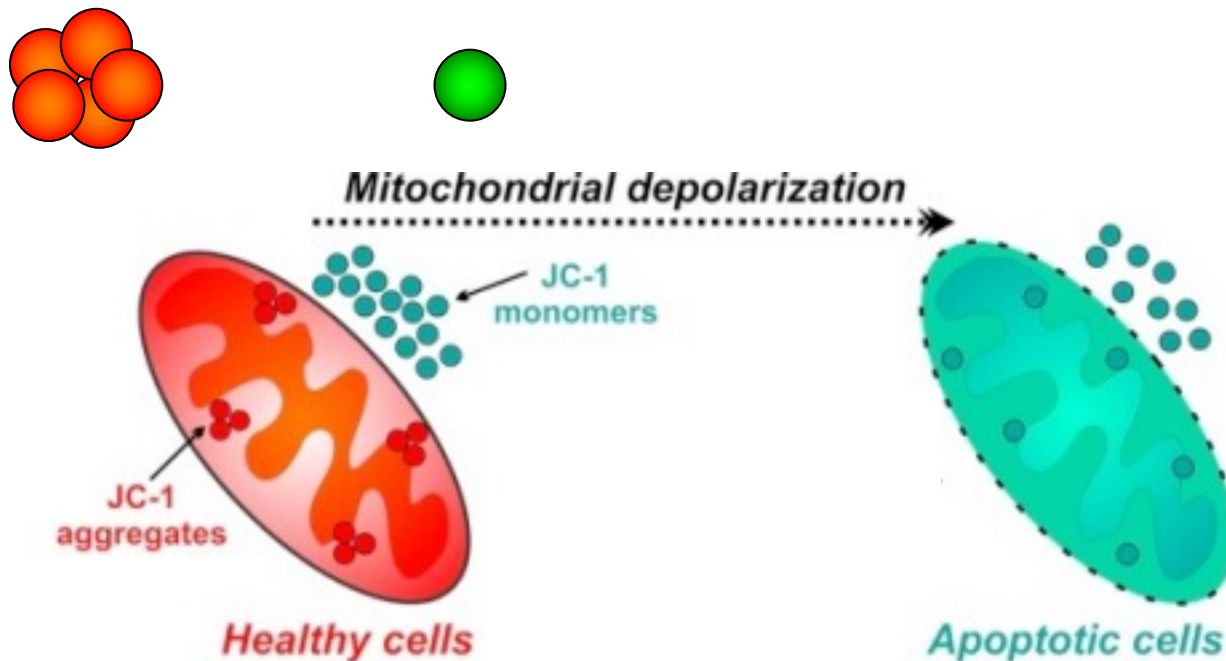


# APOPTOSI: SAGGI per valutare diversi EVENTI



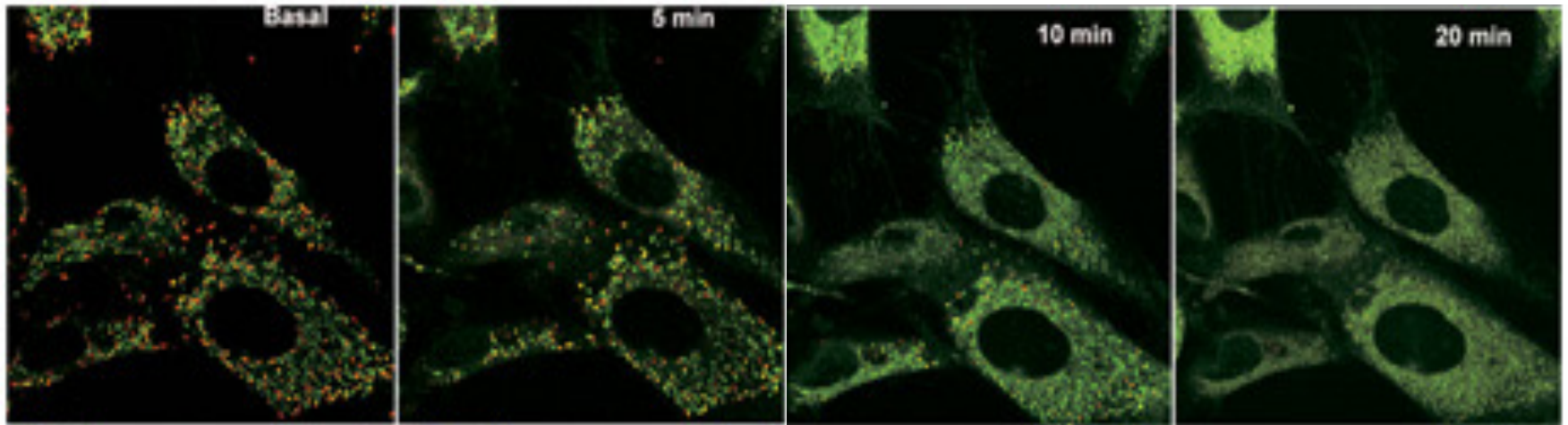
## Saggi di permeabilizzazione mitocondriale (anche live)

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

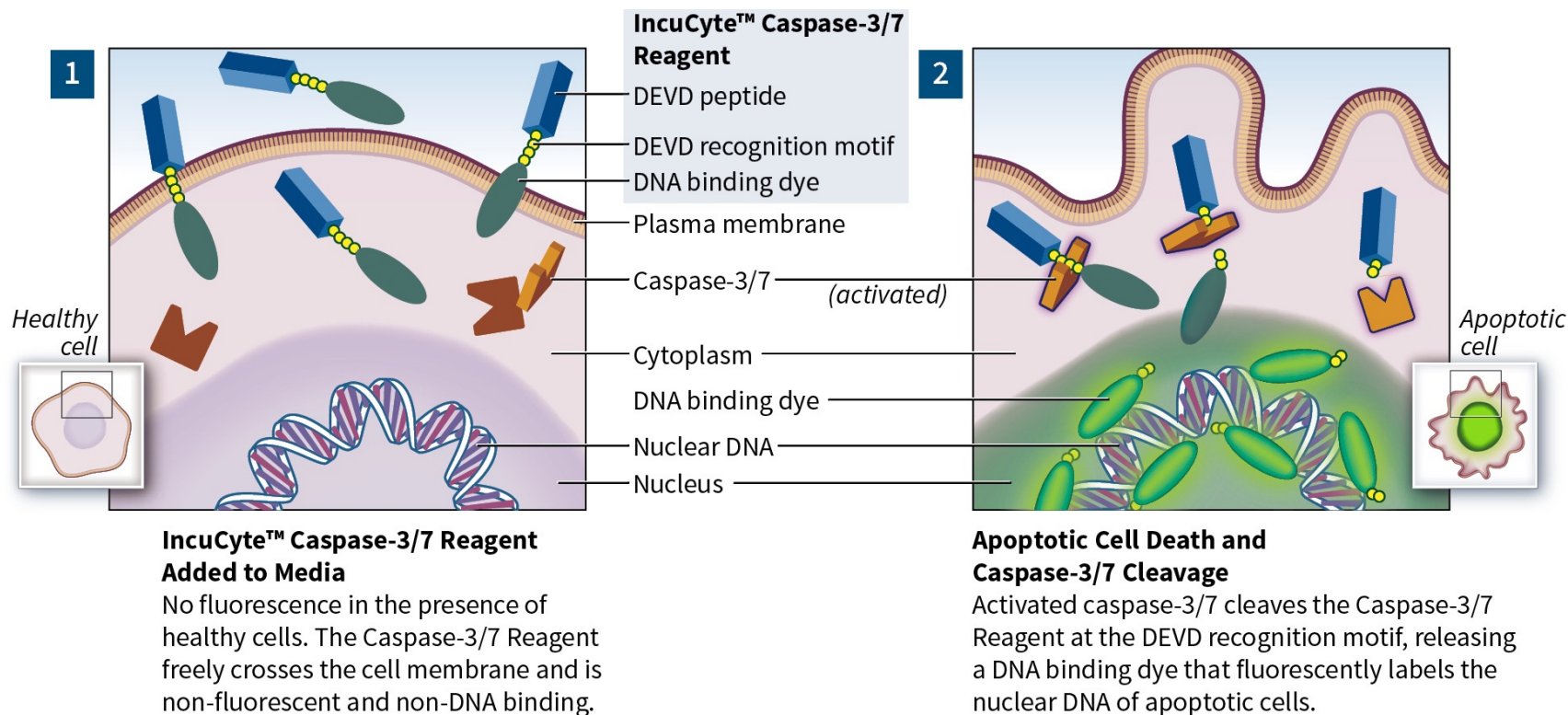


## Saggi di permeabilizzazione mitocondriale (anche live)

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



# Saggi di attivazione di caspasi (anche live)



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>

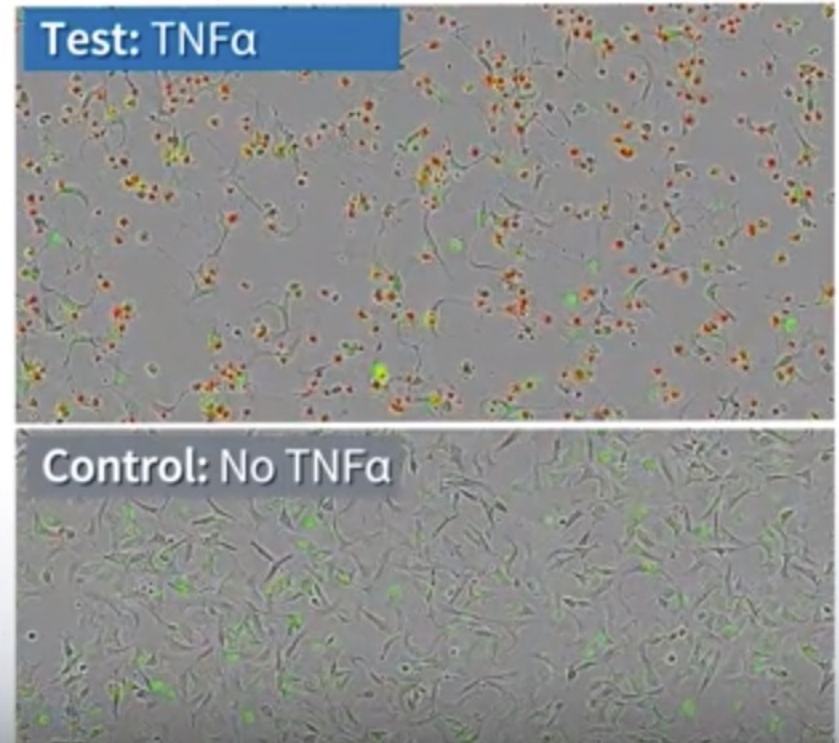
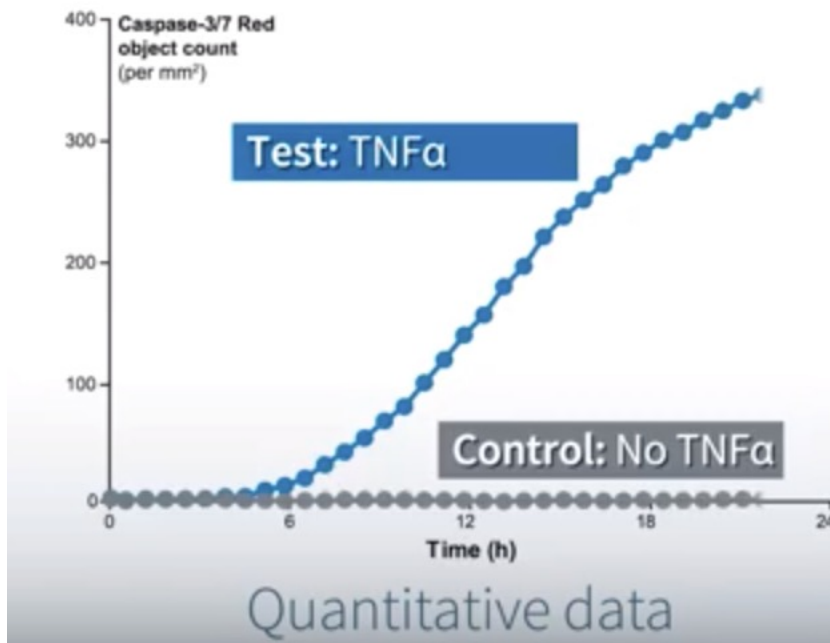


# Valutazione realtime di apoptosi mediante live labeling

<https://www.youtube.com/watch?v=FidPF2EJb0I>

## Automatically measure the time course of caspase-3/7 mediated apoptosis

Images and data generated with the IncuCyte® live-cell analysis system.



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

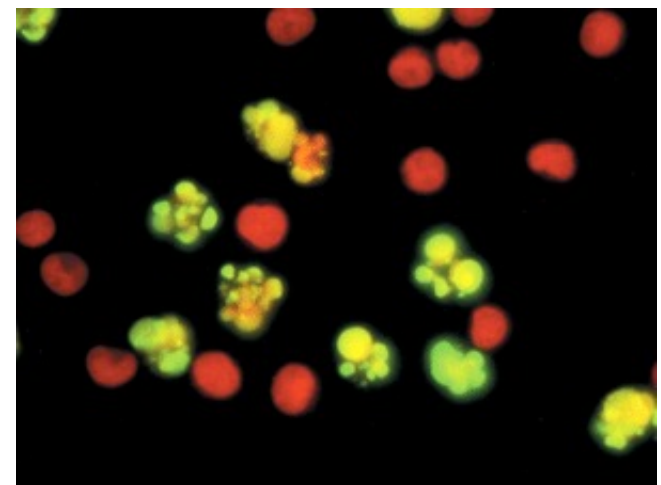
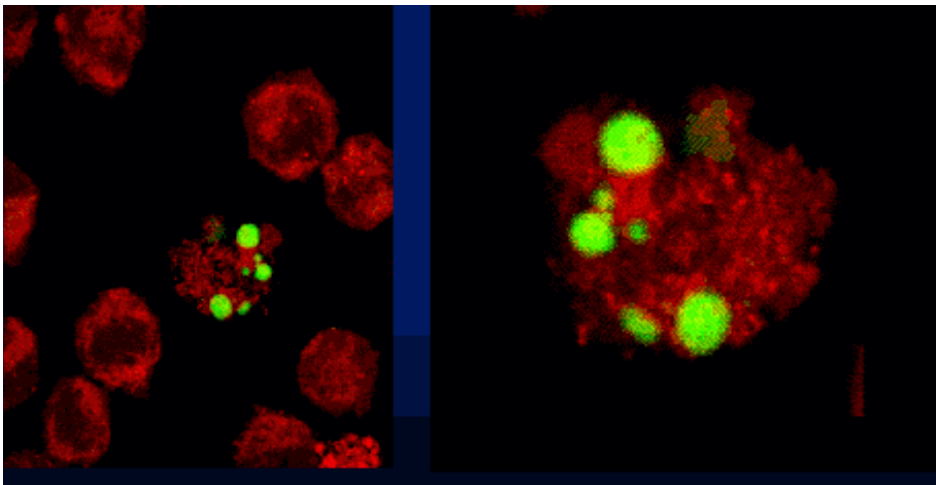
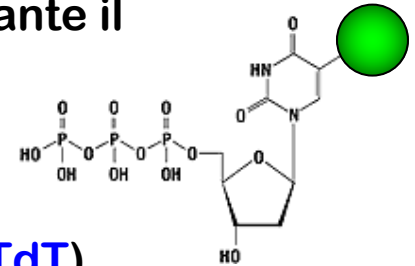
Apoptotic cells are **labeled red using Caspase-3/7 Red Reagent**. Apoptotic cells are **quantified in real time** using the IncuCyte Live-Cell Analysis System.

# Frammentazione del DNA = SAGGIO **TUNEL** TdT-mediated d**U**TP Nick **E**nd **L**abelling (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



Il **DNA** è contro-colorato con **Propidio Ioduro (rosso)** per visualizzare tutti i nuclei 30



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

