

ESPERIMENTO: Saggi di VITALITA' CELLULARE**STRATEGIA SPERIMENTALE:**

Si vuole analizzare la capacità dell'asse ORF8-IL17RA di indurre citotossicità nei confronti delle cellule del tessuto polmonare come conseguenza dell'attivazione di cellule infiammatorie.

Abbiamo dimostrato che i monociti umani THP-1 si attivano in risposta a stimolazione con terreno condizionato da cellule H1299 trattate con la proteina His-ORF-8 (vedi esperimento 1).

Si valuterà quindi l'effetto delle citochine pro-infiammatorie **rilasciate dai macrofagi THP-1** (dopo attivazione con terreno condizionato) sulla vitalità delle **cellule epiteliali H1299 (polmone)**.

PUNTI SPERIMENTALI:

Ciascun gruppo (4 o 5 studenti) esaminerà la vitalità delle cellule **H1299** (linea cellulare epiteliale di origine umana -lung adenocarcinoma) a seguito di:

1. Esposizione a terreno condizionato di cellule **THP1** attivate da cellule **H1299** non trattate.
2. Esposizione a terreno di **THP1** attivate da cellule **H1299** trattate con **IL-17 purificata** (50 ng/ml) per 16 ore.
3. Esposizione a terreno di **THP1** attivate da cellule **H1299** trattate con proteina **His-ORF8** (1 µg/ml) per 16 ore.
4. Esposizione a terreno di **THP1** attivate 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. Esposizione a terreno di **THP1** attivate da cellule **H1299** trattate con His-ORF8 e con **inibitore di NFκB (IkK)**.

Giorno 1**MATERIALE:**

Cellule H1299 in piastra multi-well da 96 pozzetti, PBS, terreni condizionati dai punti sperimentali 1, 2, 3, 4, 5.

PROCEDIMENTO: (ciascuno studente effettuerà tutti i passaggi di seguito)

1. Prelevare dall'incubatore le cellule **H1299** e scrivere sulla piastra il numero del gruppo e del punto sperimentale.
 2. **LAVARE LE CELLULE CON PBS.** Aspirare molto delicatamente il terreno dai pozzetti con la P200 senza staccare le cellule. Lavare molto delicatamente i pozzetti con 0.1 ml di PBS.
 3. **TRATTARE LE CELLULE CON IL TERRENO CONDIZIONATO.** Aspirare molto delicatamente il PBS dai pozzetti con la P200 senza staccare le cellule. Aggiungere 0.1 ml di terreno condizionato ad ogni pozzetto.
 4. **RIPORRE LE PIASTRE MULTI-WELL NELL'INCUBATORE.**
-

Giorno 2**MATERIALE:**

Incubatore per colture cellulari, bagno termostato, microscopio rovesciato, PBS, DMEM, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT), Dimethyl sulfoxide (DMSO), lettore di piastre.

PROCEDIMENTO:**1. LAVARE LE CELLULE H1299 CON PBS.**

Prelevare le cellule dall'incubatore e osservarle al microscopio. Aspirare molto delicatamente il terreno dai pozzetti con la P200 senza staccare le cellule. Lavare molto delicatamente le cellule con 0.1 ml di PBS.

2. INCUBARE LE CELLULE CON L'MTT.

Trasferire **0.1 ml di terreno con MTT (preparato dal docente)** in ognuno dei pozzetti. Riporre le cellule in incubatore. Incubare per 1 ora.

3. DISSOLVERE I CRISTALLI DI MTT.

Prelevare la piastra dall'incubatore e verificare al microscopio che si siano formati cristalli di MTT nelle cellule. Rimuovere completamente il terreno dai pozzetti.

Aggiungere **0.1 ml di DMSO** ad ogni pozzetto e spipettare cercando di non creare bolle.

4. LETTURA DELL'ASSORBANZA AL PLATE READER.

Verificare che i cristalli si siano completamente dissolti e che la soluzione di DMSO appaia colorata in modo omogeneo. Inserire la piastra nel plate reader e misurare l'assorbanza a **562 nm**.

5. Analizzare i dati ottenuti e trarre le conclusioni in merito all'effetto delle citochine sulla vitalità cellulare.