

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2025-2026

Corso di Biotecnologie Cellulari

Lezione 12

**Come rispondere a una domanda che pone un
problema sperimentale:**

Dato un problema sperimentale:

- 1) Formulare la **DOMANDA SCIENTIFICA** (o più di una)
- 2) Pianificare una **STRATEGIA SPERIMENTALE**
 - a) stabilire i **PUNTI SPERIMENTALI**
 - b) prevedere opportuni esperimenti di **CONTROLLO**
 - c) scegliere il sistema **MODELLO**
 - d) scegliere il **SAGGIO** più opportuno
 - e) scegliere lo **STRUMENTO/METODICA** di analisi
- 3) Discutere i **RISULTATI**, trarre **CONCLUSIONI**
e (eventualmente) formulare un'**IPOTESI**
- 4) Stabilire un piano sperimentale per verificare l'**IPOTESI**

ESEMPIO 1

Problema sperimentale:

**Analisi dell'effetto di un gene X sulla proliferazione
cellulare**

Problema sperimentale:

Analisi dell'effetto di un gene X sulla proliferazione cellulare

Domanda scientifica:

il gene X ha un effetto sulla proliferazione cellulare?

Domanda scientifica:

il gene X ha un effetto sulla proliferazione cellulare?

Strategia sperimentale

- a) stabilire I PUNTI SPERIMENTALI (compresi i controlli)**
- b) scegliere un sistema (cellulare) modello**

STRATEGIA SPERIMENTALE

1. modulare l'espressione del gene X nel sistema scelto

STRATEGIA SPERIMENTALE

1. modulare l'espressione del gene X nel sistema scelto

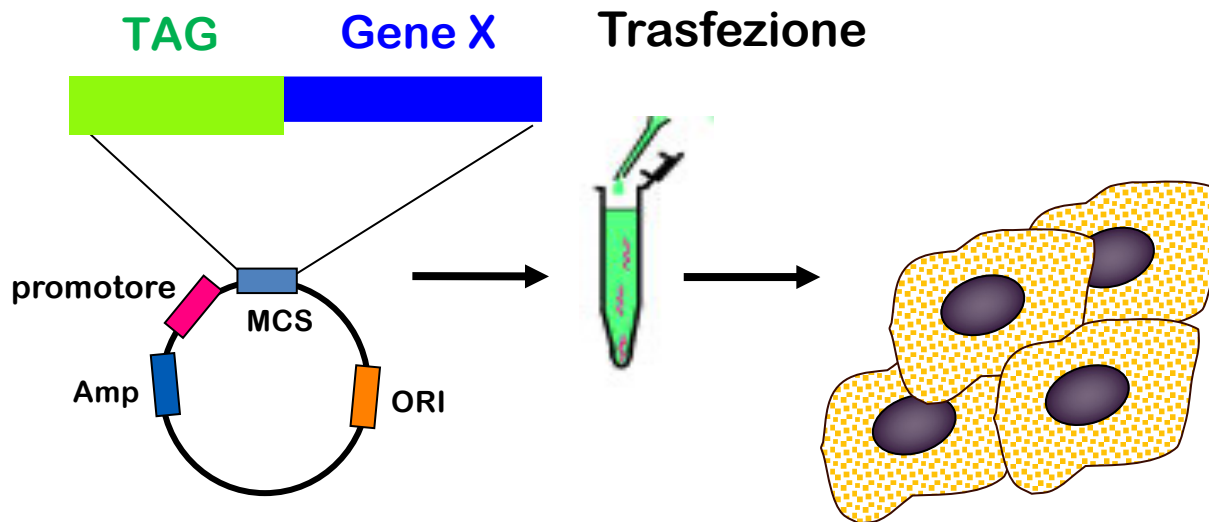
– es. SOVRA-ESPRIMERE il gene X nelle cellule scelte

- oppure SILENZIARE “ “

STRATEGIA SPERIMENTALE

Step 1

Clonaggio del cDNA X in un vettore di espressione (evtl. in frame con un TAG)



Step 2

progettazione dell'esperimento (inclusendo gli opportuni controlli) e trasfezione delle cellule (transiente o stabile) con il vettore generato

STRATEGIA SPERIMENTALE

Strategia sperimentale

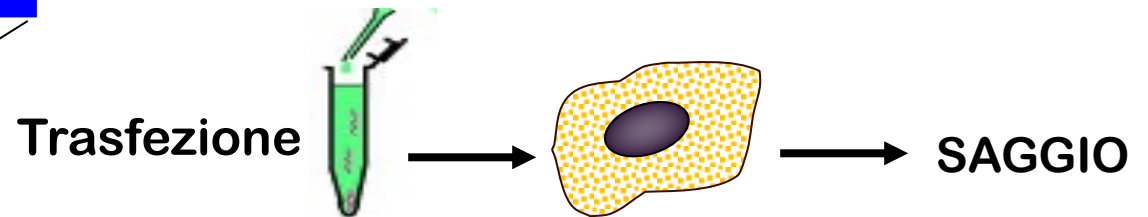
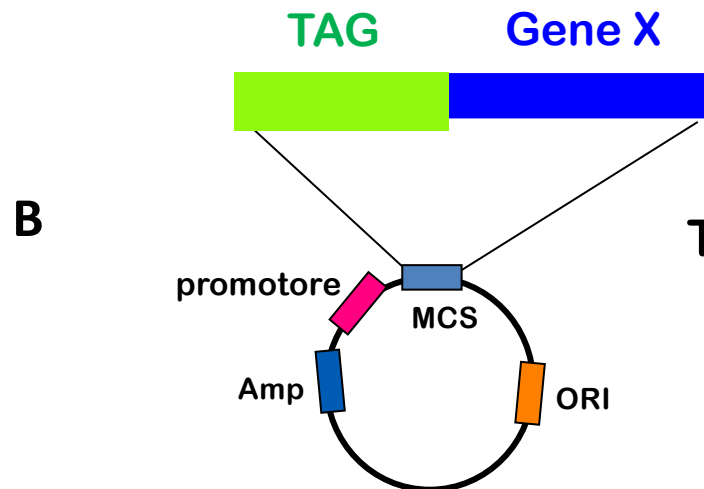
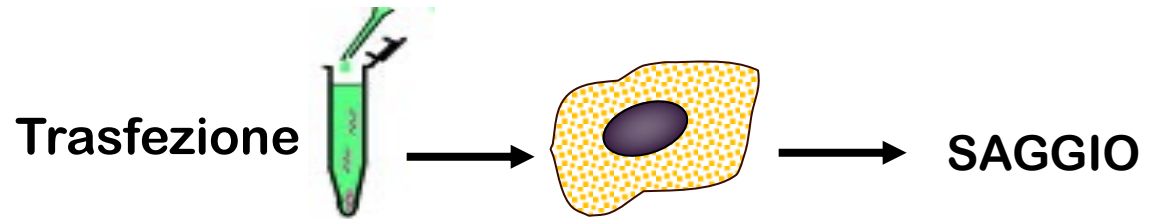
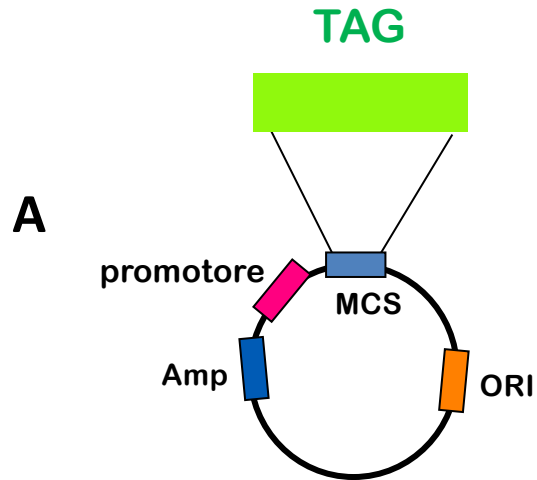
1. È necessario scegliere un sistema cellulare modello
2. È necessario modulare l'espressione di X – es SOVRA-ESPRIMERE nelle cellule scelte
3. È necessario predisporre un esperimento di CONTROLLO

Progettazione dell'esperimento

A- CONTROLLO

vettore vuoto pcDNA3-TAG

B- SOVRAESPRESSIONE cDNA X vettore pcDNA3-X-TAG

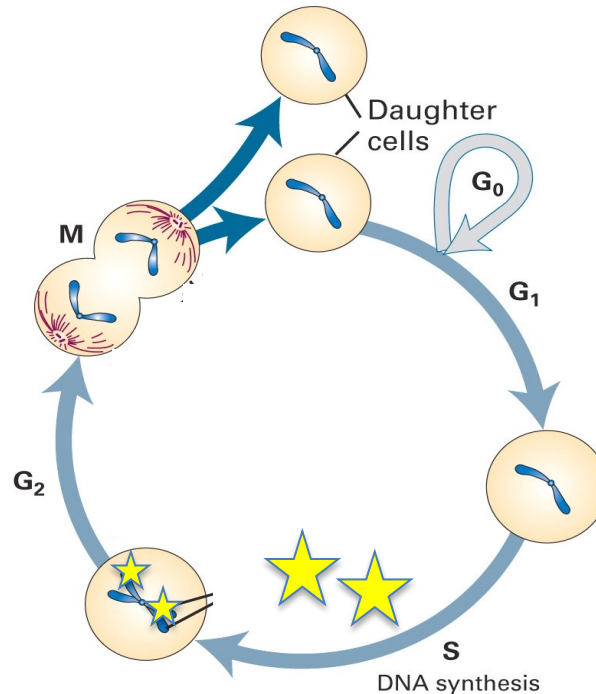


STRATEGIA SPERIMENTALE

1. È necessario scegliere un Sistema cellulare modello
2. È necessario modulare l'espressione di X – es SOVRA-ESPRIMERE nelle cellule scelte
3. È necessario predisporre un esperimento di CONTROLLO
4. Analizzare la differenza tra le due popolazioni cellulari in termini di proliferazione mediante un opportuno SAGGIO

STRATEGIA SPERIMENTALE

SAGGIO DI PROLIFERAZIONE: visualizzazione della neosintesi di DNA

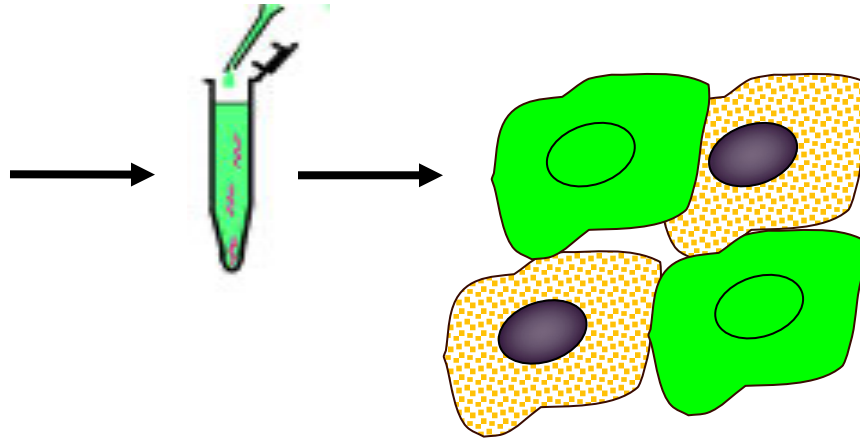


Le cellule in FASE S possono essere MARCATE aggiungendo al mezzo di coltura un **analogo della timidina**: es. **BrdU = 5-bromo desossiuridina**

Le cellule che hanno incorporato la BrdU (in fase S) possono essere poi IDENTIFICATE con un **anticorpo anti-BrdU**

STRATEGIA SPERIMENTALE

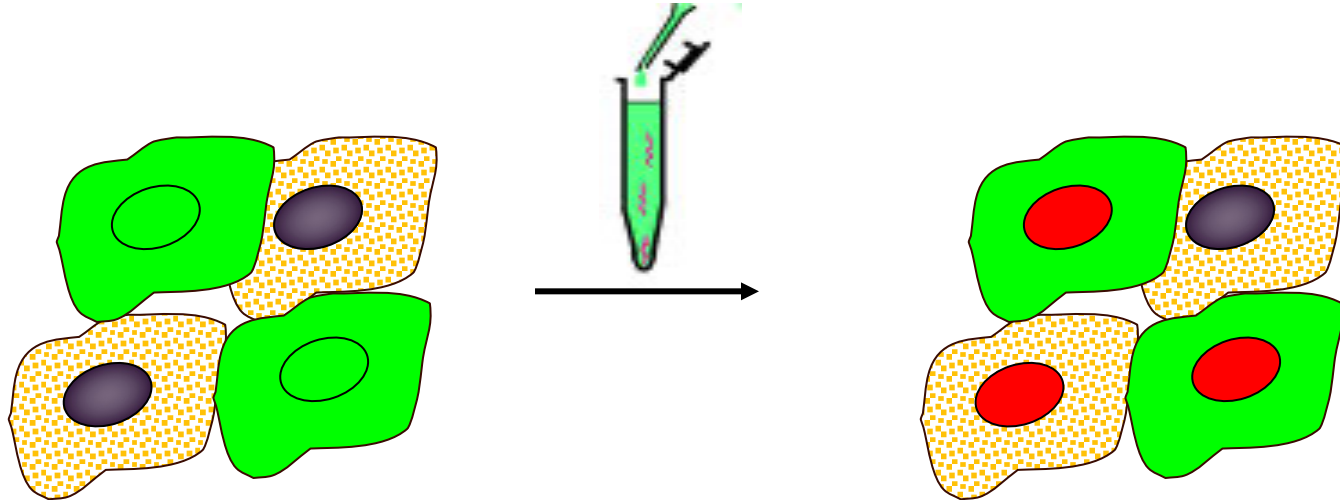
Trasfezione



Il TAG GFP permette di identificare (e quantificare facilmente il numero di) cellule trasfettate

Incubazione di tutte le cellule con BrdU

Riconoscimento
(ANTICORPO anti-BrdU)



% cellule
che sovra-esprimono X = $\frac{\text{n° cellule verdi positive a BrdU (nuclei rossi)}}{\text{n° cellule che esprimono X (cellule verdi)}} \times 100$
in FASE S:

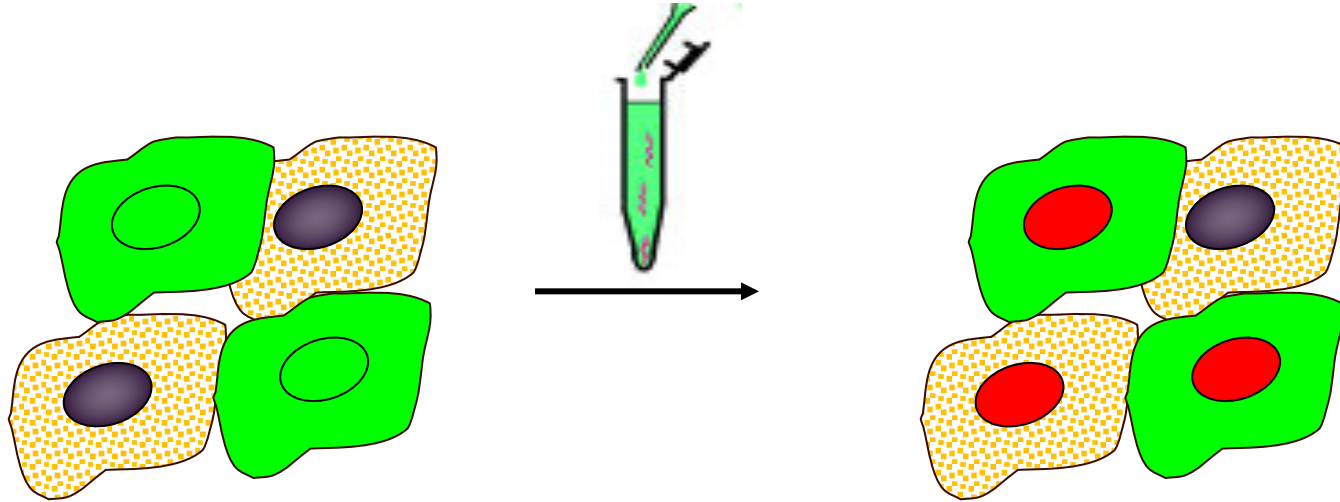
Confronto con le cellule di controllo (che NON sovra-esprimono X)

STRATEGIA SPERIMENTALE

1. È necessario scegliere un Sistema cellulare modello
2. È necessario modulare l'espressione di X – es SOVRA-ESPRIMERE nelle cellule scelte
3. È necessario DISTINGUERE le cellule trasfettate
4. È necessario predisporre un esperimento di CONTROLLO
5. Analizzare la differenza tra le due popolazioni cellulari in termini di proliferazione mediante un opportuno SAGGIO
6. scegliere lo STRUMENTO/METODICA di ANALISI

Incubazione di tutte le cellule con BrdU

Riconoscimento BrdU
(Immunofluorescenza anti-BrdU)



IDENTIFICAZIONE IN SITU MEDIANTE MICROSCOPIA A EPIFLUORESCENZA

OPPURE CONTA MEDIANTE FACS

Quali altri approcci avreste potuto scegliere?

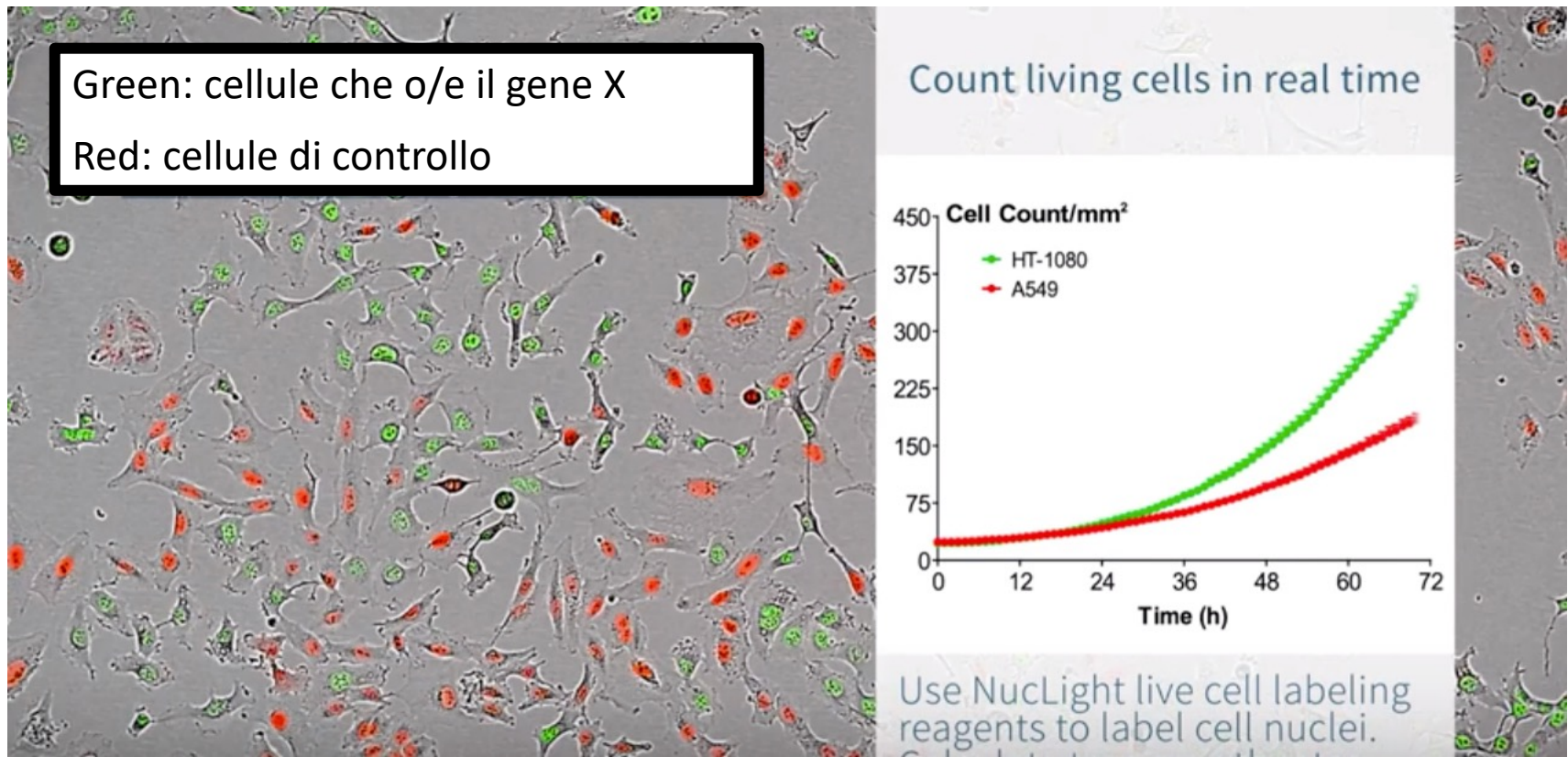
Analisi dell' effetto di un gene X sulla proliferazione cellulare

Strategia sperimentale #2

- 1. Generare una linea cellulare che sovraesprime stabilmente il gene X (oppure nella quale il gene è inibito) e una linea di controllo**
- 2. Analizzare la differenza tra le due popolazioni cellulari in termini di proliferazione mediante curve di crescita (metodo 3T3) oppure realtime oppure....**

Valutazione quantitativa di proliferazione mediante lettore realtime

Le 2 linee cellulari in esame sono colorate con 2 coloranti nucleari diversi e cresciute in cocoltura, quindi ne viene misurata la proliferazione in realtime (conta del numero di cellule nel tempo).



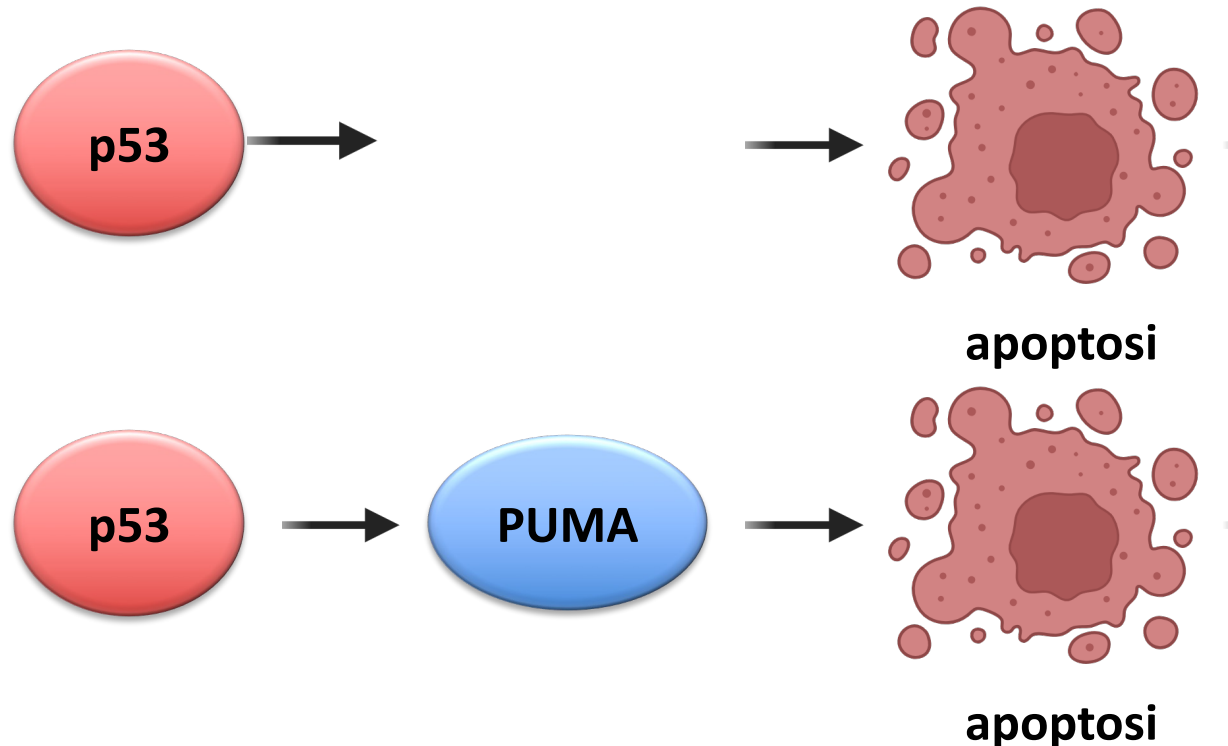
Problema sperimentale:

**Analisi dell' effetto di un fattore di trascrizione sulla
morte cellulare**

Problema sperimentale:
Stiamo studiando il fattore di trascrizione p53 e le funzioni dei suoi geni bersaglio nel contesto della morte cellulare

Domanda scientifica:

Qual è il ruolo del gene PUMA nell'induzione di apoptosi da parte di p53?



STRATEGIA SPERIMENTALE

1. È necessario creare un sistema sperimentale in cui l'espressione/attività di p53 induce la morte cellulare
2. in tale sistema, verificare che p53 induca l'espressione del gene PUMA
3. In tale sistema ...

STRATEGIA SPERIMENTALE

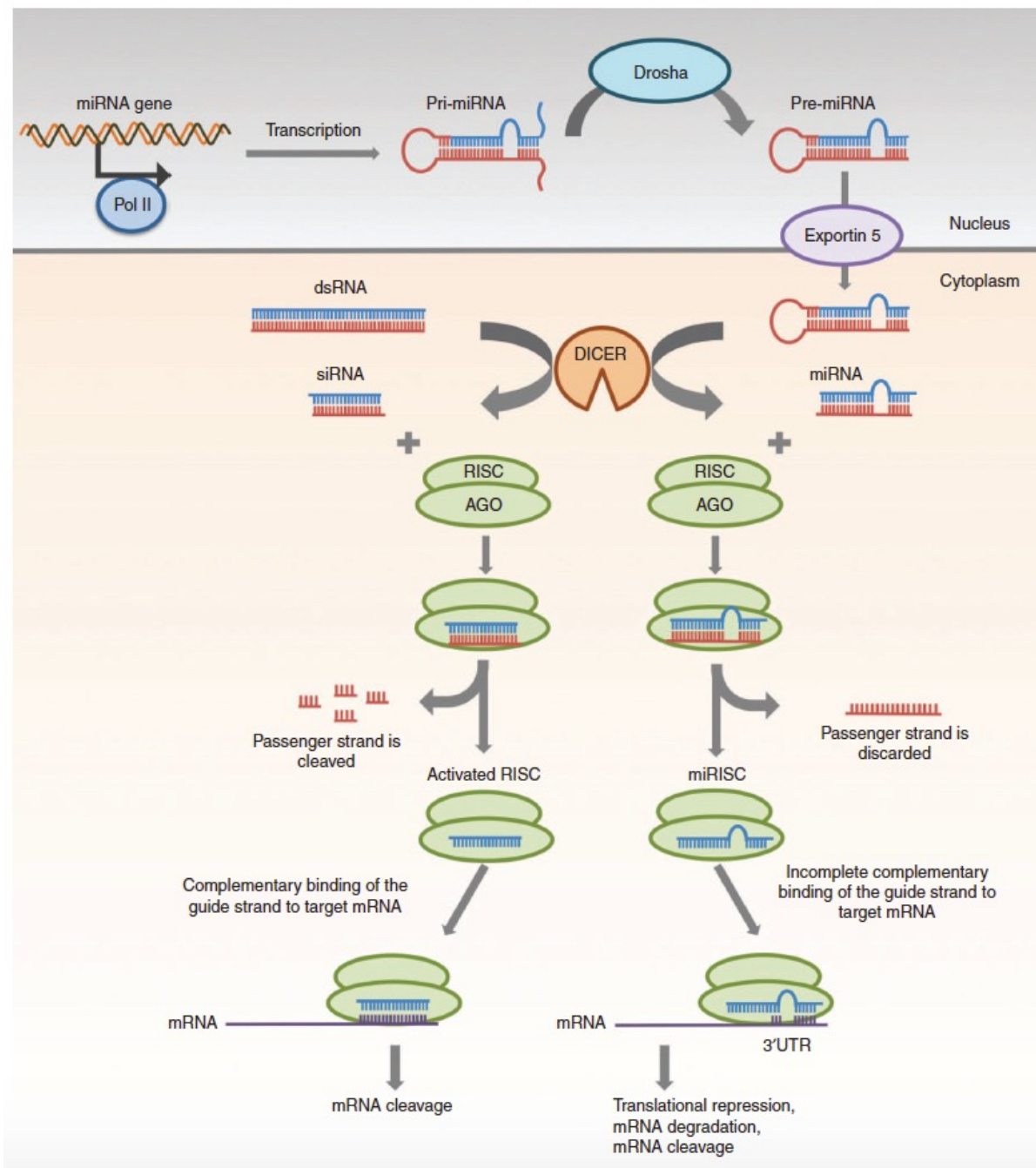
1. È necessario creare un sistema sperimentale in cui la morte cellulare è indotta dall'espressione/attività di p53 (in tale sistema, p53 induce l'espressione del gene PUMA)
2. In tale sistema possiamo **inibire l'espressione del gene bersaglio PUMA** (es. siRNA)
3. Predisporre gli opportuni CONTROLLI
4. Analizzare l'effetto in termini di induzione di apoptosi mediante un opportuno SAGGIO

Problema:
ridurre l'espressione di una proteina endogena

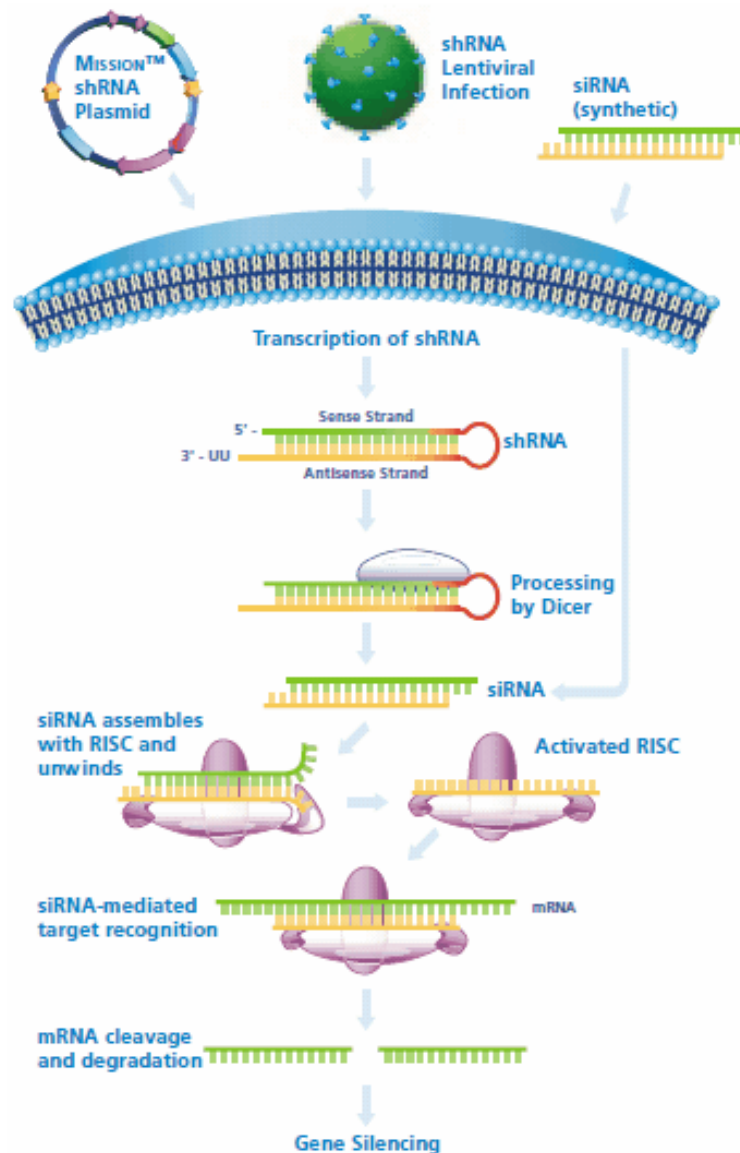
Soluzione 1:
RNA INTERFERENCE = indurre la degradazione di un mRNA in maniera sequenza-specifica

- **vettori di espressione per shRNA (short interfering RNA)**
- **siRNA (oligonucleotidi RNA ds)**

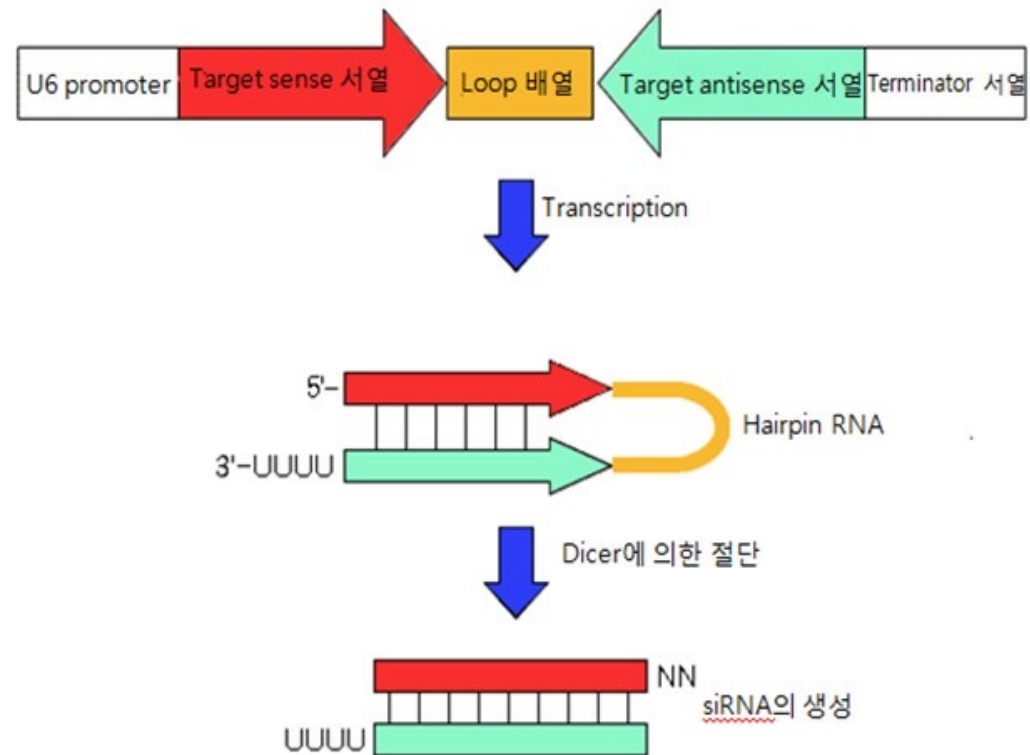
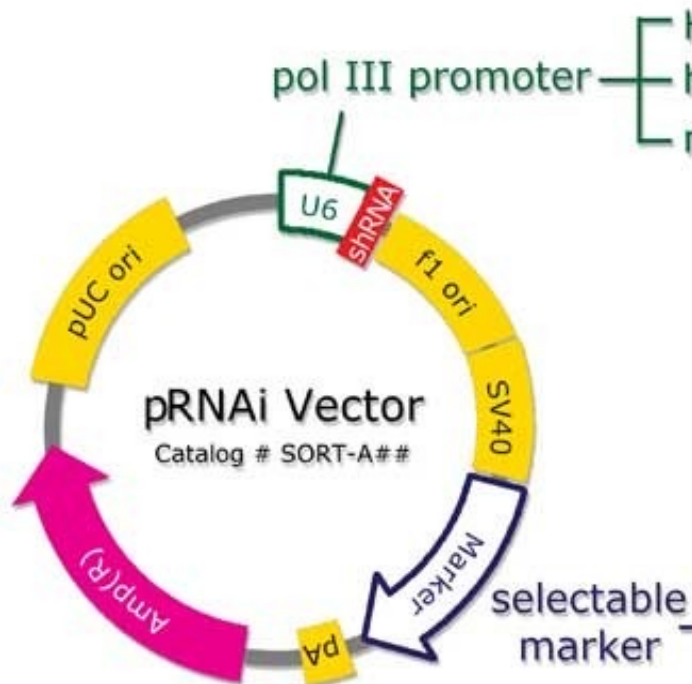
Soluzione 2: gene editing mediante CRISPR-Cas9



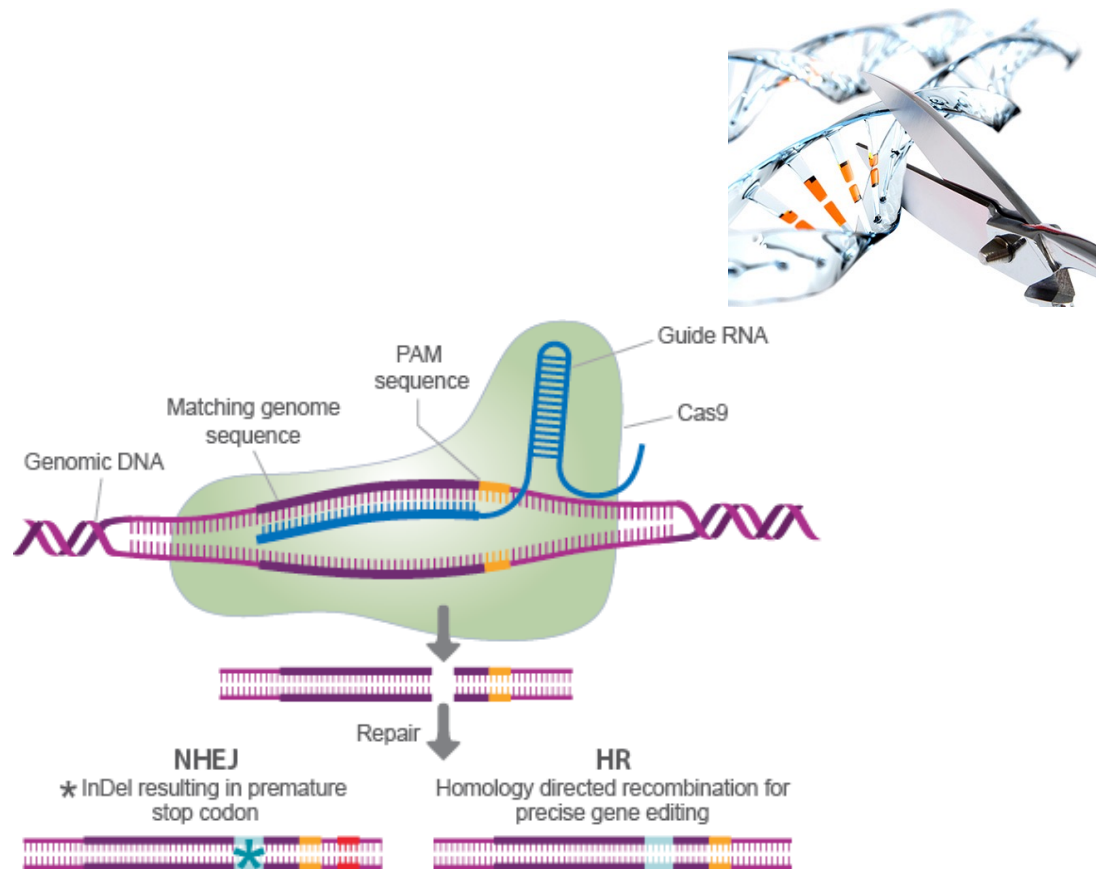
Approcci per il silenziamento genico mediante RNA interference



Vettori per espressione di shRNA



Gene KO mediante CRISPR-Cas9



Progettazione dell'esperimento

A- CONTROLLO

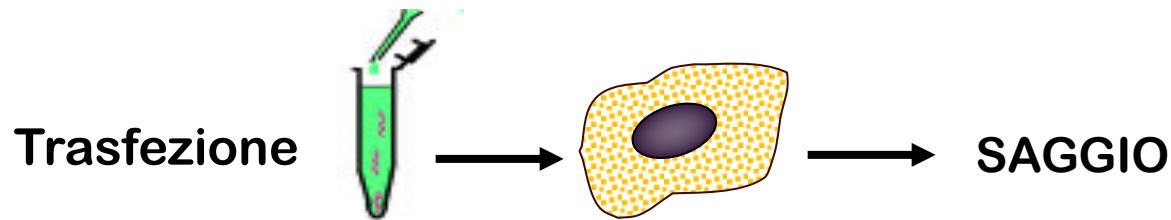
vettore vuoto pcDNA3-GFP

B- SOVRAESPRESSIONE cDNA p53

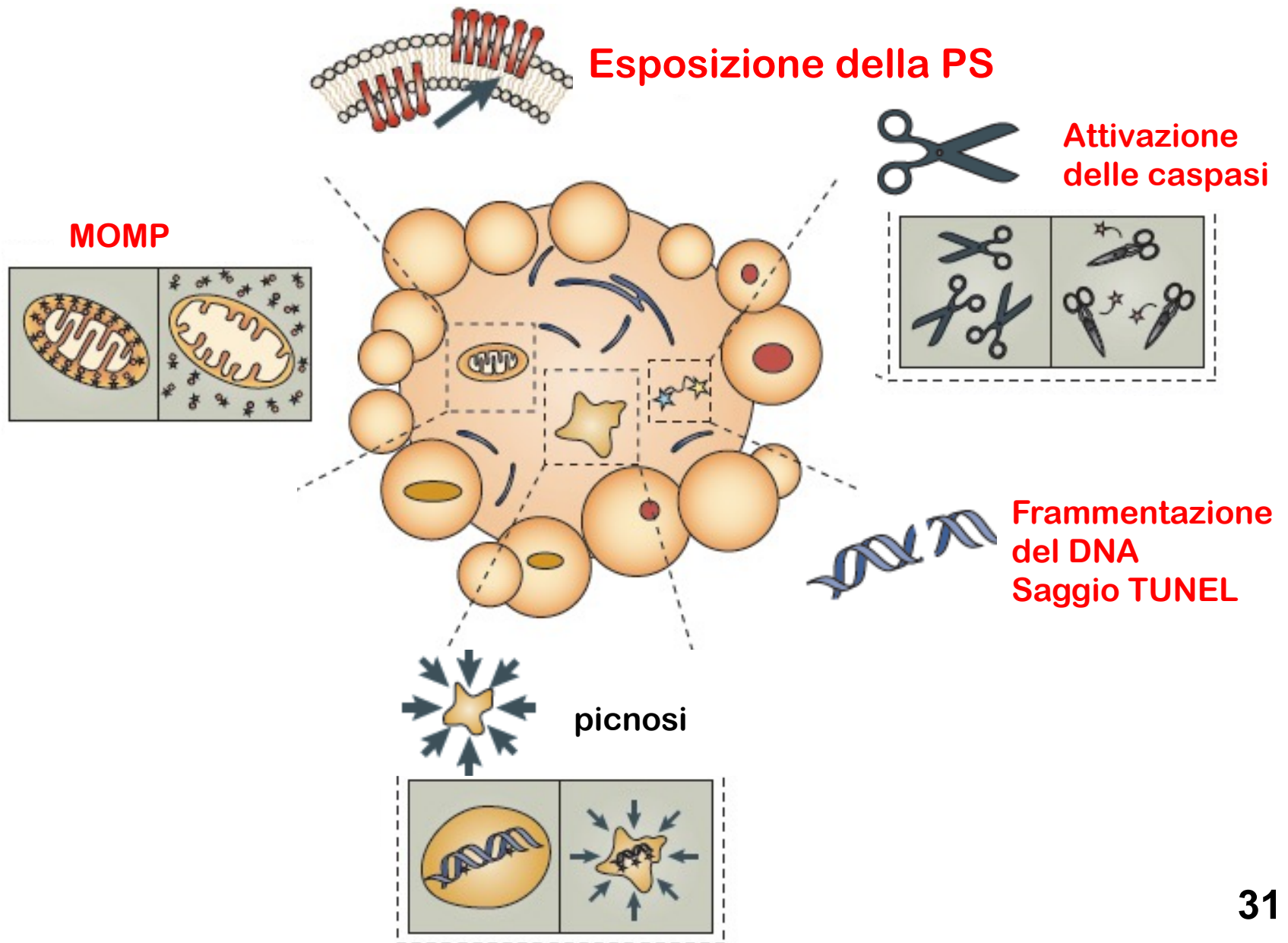
vettore pcDNA3-GFP- p53

C- SOVRAESPRESSIONE cDNA p53
+ inibizione di PUMA

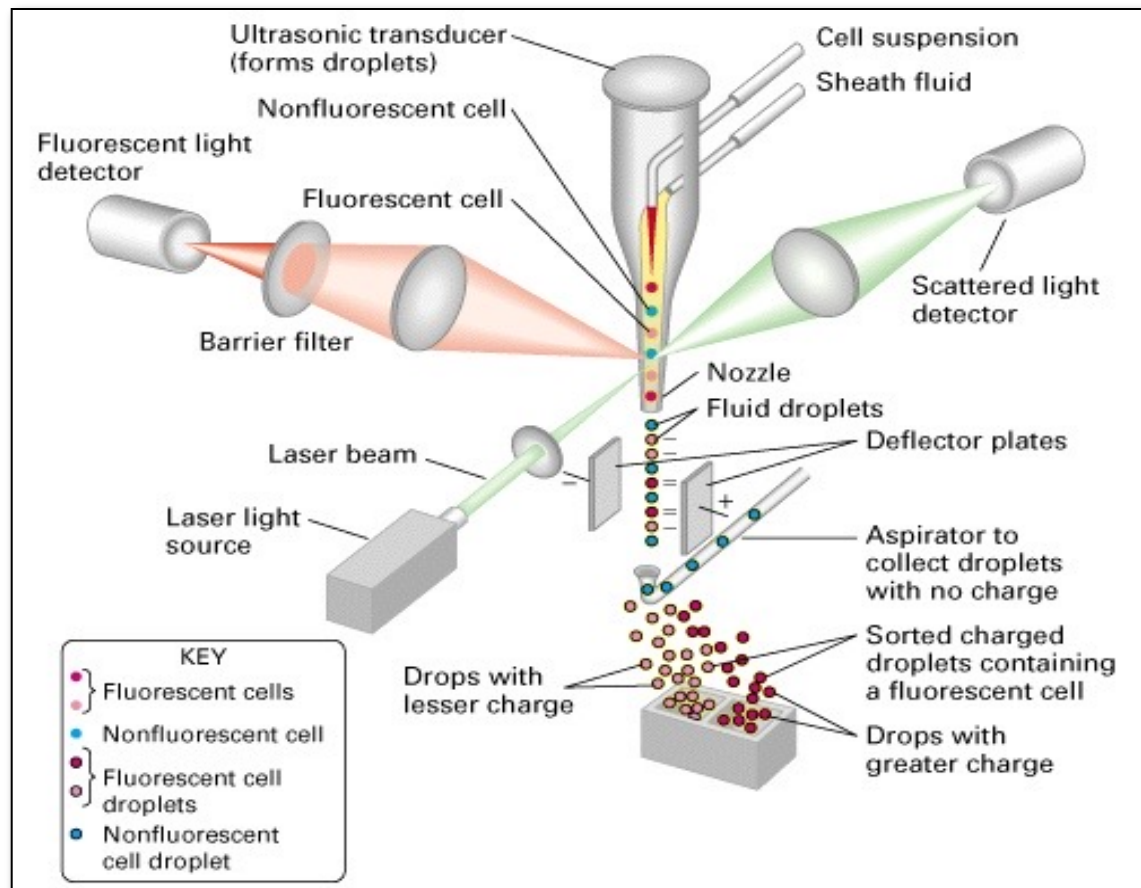
vettore pcDNA3-GFP- p53 + siRNA PUMA



SAGGI DI APOPTOSI IN CELLULE



Valutazione quantitativa di apoptosi mediante citofluorimetria

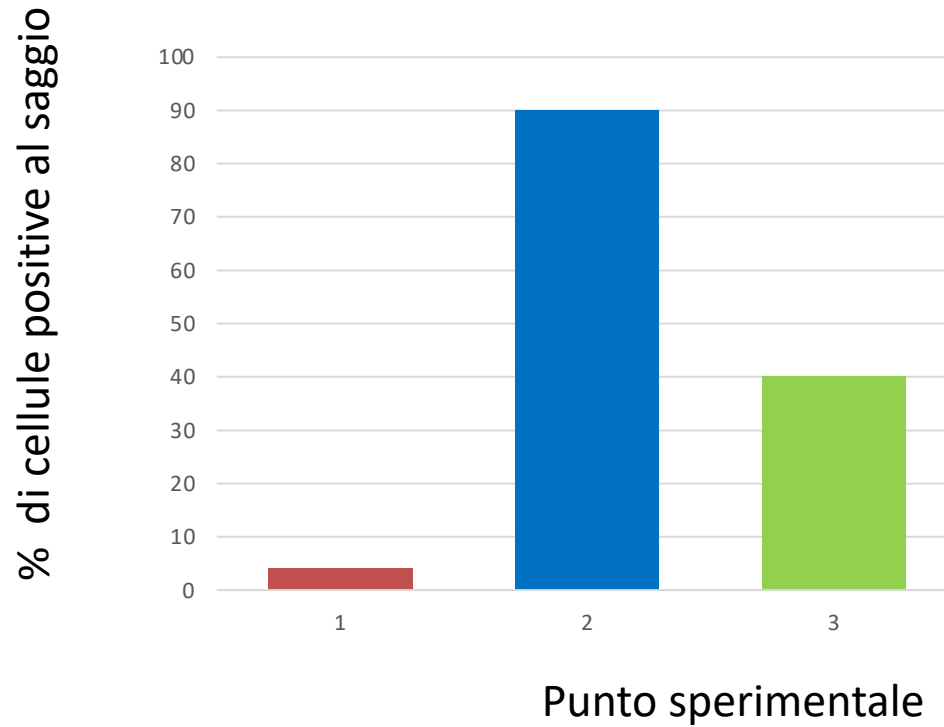


Sorting delle cellule trasfettate (GFP)

colorazione con :

Annexina V – RITC

Analisi dei risultati e conclusione



Quali altri approcci avreste potuto scegliere?

Problema sperimentale:

**IDENTIFICAZIONE DI FARMACI CHE INIBISCONO LA
MIGRAZIONE DI CELLULE TUMORALI**

STRATEGIA SPERIMENTALE:

**Volete effettuare uno screening in vitro di molecole bioattive
per identificare farmaci che inibiscono la migrazione di cellule tumorali.**

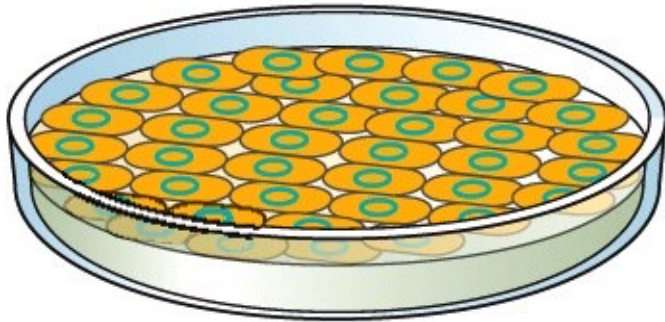
STRATEGIA SPERIMENTALE:

- 1. È necessario scegliere un opportuno sistema cellulare: es. Linea cellulare tumorale dotata di capacità di migrazione**

STRATEGIA SPERIMENTALE:

1. È necessario scegliere un opportuno sistema cellulare: es. Linea cellulare tumorale dotata di capacità di migrazione
2. In tale sistema possiamo effettuare uno screening di una libreria di molecole bioattive

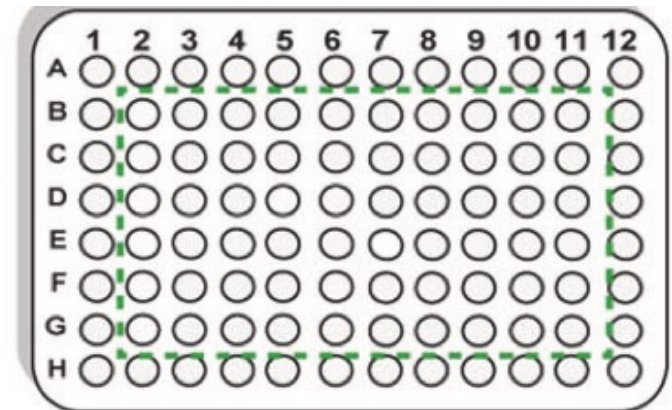
Screening funzionali per il riposizionamento di farmaci



Modello cellulare della patologia



**Libreria di composti
FDA-approved**



**Saggio morfologico/funzionale
Es. saggio per cytokine storm**

Screening funzionali per farmaci

**Modello cellulare
della patologia**

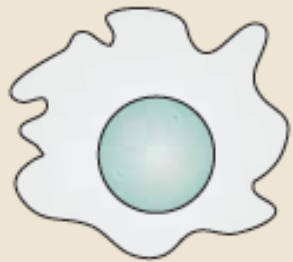
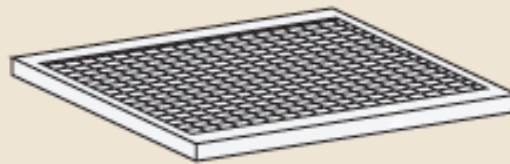
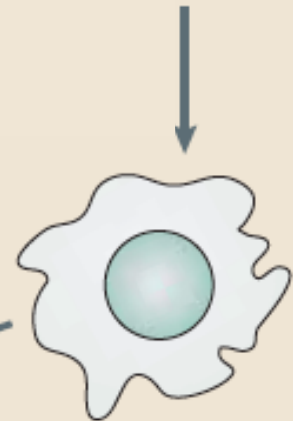
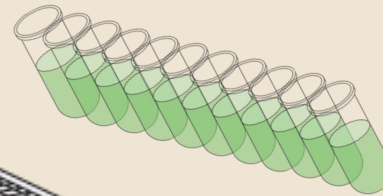


Plate cells onto
clear bottom
384-well plate



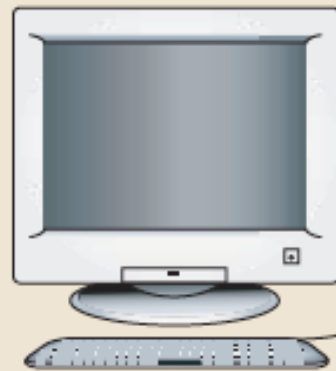
Libreria di molecole



**Cambiamento
fenotipico**



or hits



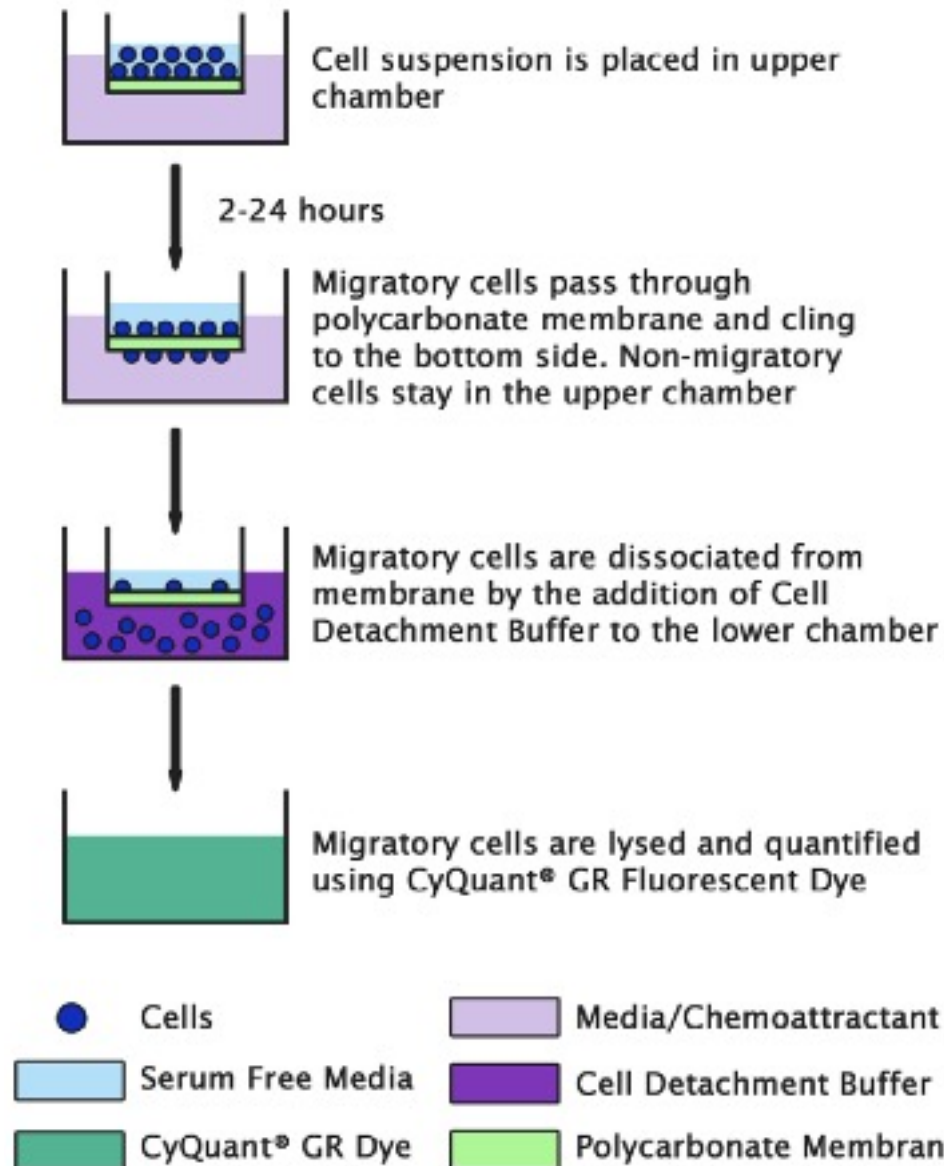
**Analisi del fenotipo mediante
opportuno saggio**

**Identificazione
della molecola**

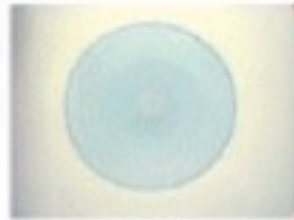
STRATEGIA SPERIMENTALE:

1. È necessario scegliere un opportuno sistema cellulare: es. Linea cellulare tumorale dotata di capacità di migrazione
2. In tale sistema possiamo effettuare uno screening di una libreria di molecole bioattive
3. Predisporre gli opportuni CONTROLLI
4. È necessario scegliere un opportuno saggio di migrazione che permetta la valutazione high-throughput
5. Scegliere lo strumento opportuno per analizzare l'effetto delle molecole in termini di riduzione della capacità di migrazione

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



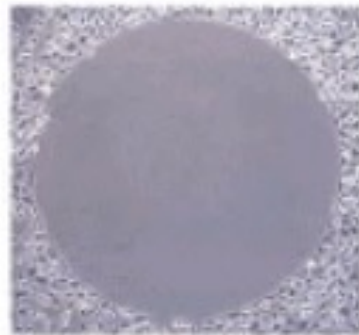
Saggi di migrazione in piastra multipozzetto con lettura automatizzata al microscopio ottico/plate reader



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 vengono
colorate (Giemsa) e
fotografate al
microscopio ottico

