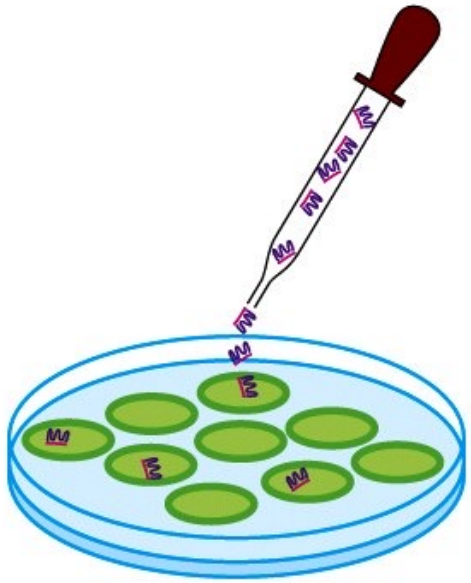
CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche

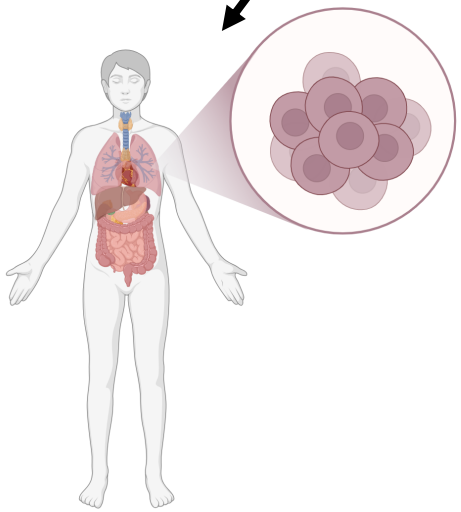
Corso di Biotecnologie Cellulari 2026-27

Lezione 4

Trasferimento di acidi nucleici in cellule di mammifero



Le BIOTECNOLOGIE CELLULARI consentono di identificare, studiare dal punto di vista funzionale e modificare geni, proteine e pathways responsabili di processi fisiologici e patologici



fisiopatologia



diagnostica



terapia

Applicazioni delle colture cellulari nella ricerca

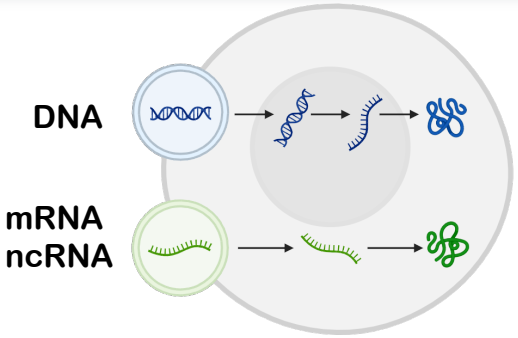
https://www.facellitate.com/it/7-key-applications-of-cell-culture-in-research/

Modificare le cellule in vitro/in vivo mediante introduzione di acidi nucleici

Studiare un gene

Sovraesprimere la proteina, o una sua forma mutata, e osservarne la localizzazione o l'effetto

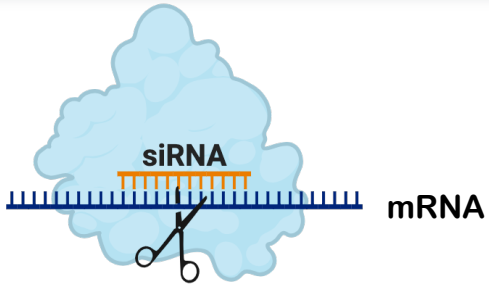
cDNA in un plasmide, mRNA



Spegnere un gene

RNA interference: piccoli RNA guidano la degradazione dell'mRNA bersaglio (knockdown)

siRNA, shRNA



Modificare il genoma

Eliminare un gene (knockout), inserire una sequenza (knock-in), correggere una mutazione

CRISPR-Cas9



Rendere visibile un gene/cellula

Marcare una proteina, misurare l'attività di un promotore, seguire segnali con biosensori

GFP, luciferasi

Produrre

Usare le cellule come fabbriche di proteine ricombinanti e di vettori virali

HEK293, CHO

Cambiare identità

Introdurre fattori di trascrizione che riprogrammano le cellule

iPSC

In clinica: vaccini a mRNA , terapia genica, cellule CAR-T…

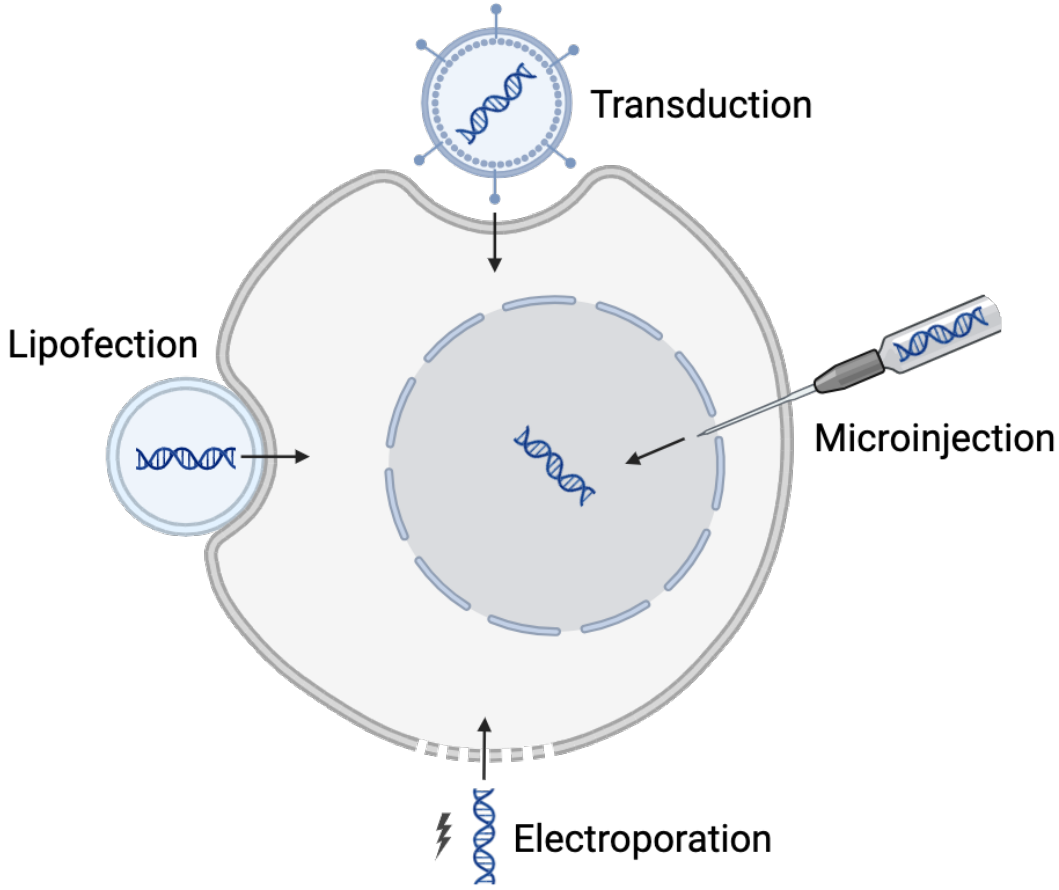
TRASFEZIONE: Trasferimento di acidi nucleici (DNA o RNA) in cellule eucariotiche (in coltura o in vivo) mediante metodi fisici o chimici

TRASDUZIONE: trasferimento di acidi nucleici mediante infezione di cellule (in coltura o in vivo) con particelle virali contenenti vettori basati su genomi virali modificati

VETTORE:
molecola di DNA utilizzata per trasferire acidi nucleici esogeni nelle cellule:
può essere plasmidico, virale, etc.

Transiente:
il DNA resta fuori dal genoma e si diluisce a ogni divisione; espressione per pochi giorni.

Stabile:
rara integrazione nel genoma, o mantenimento come episoma stabile può essere selezionata con un antibiotico (G418, puromicina).

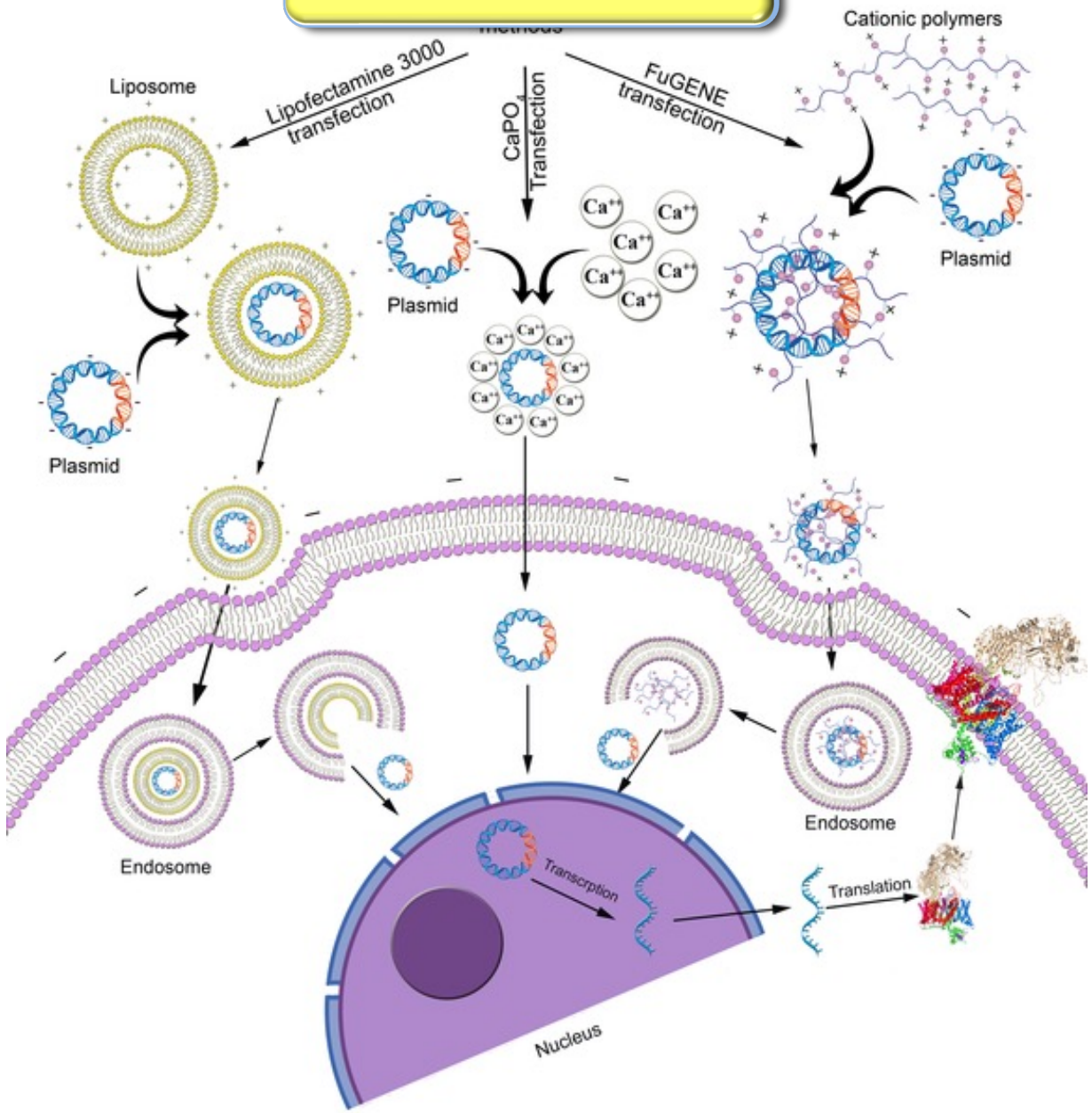


METODI DI TRASFEZIONE

Introdurre DNA, mRNA o siRNA superando la membrana plasmatica: Metodi chimici Metodi fisici

Metodo	Principio	Vantaggi	Limiti
Calcio fosfato	Il DNA co-precipita con il fosfato di calcio e viene endocitato	Economico; molto efficace in HEK293T	Sensibile al pH; poco riproducibile
Lipofezione	Lipidi cationici formano complessi con il DNA, che entrano per endocitosi	Versatile (DNA, mRNA, siRNA); semplice	Costosa; tossica per alcune cellule
Polimeri cationici (PEI)	Il polimero compatta il DNA in complessi che entrano per endocitosi	Economico; adatto a grandi volumi	Tossicità a dosi elevate
Elettroporazione e nucleofezione	Impulsi elettrici aprono pori transitori nella membrana	Cellule difficili (primarie, staminali)	Mortalità elevata; strumento dedicato
Microiniezione	Un microago inietta direttamente nel citoplasma o nel nucleo	Precisa; adatta a oociti ed embrioni	Una cellula alla volta; bassa resa
Biolistica (gene gun)	Microparticelle d'oro rivestite di DNA sparate nelle cellule	Tessuti e cellule vegetali	Danneggia le cellule; poco usata in coltura

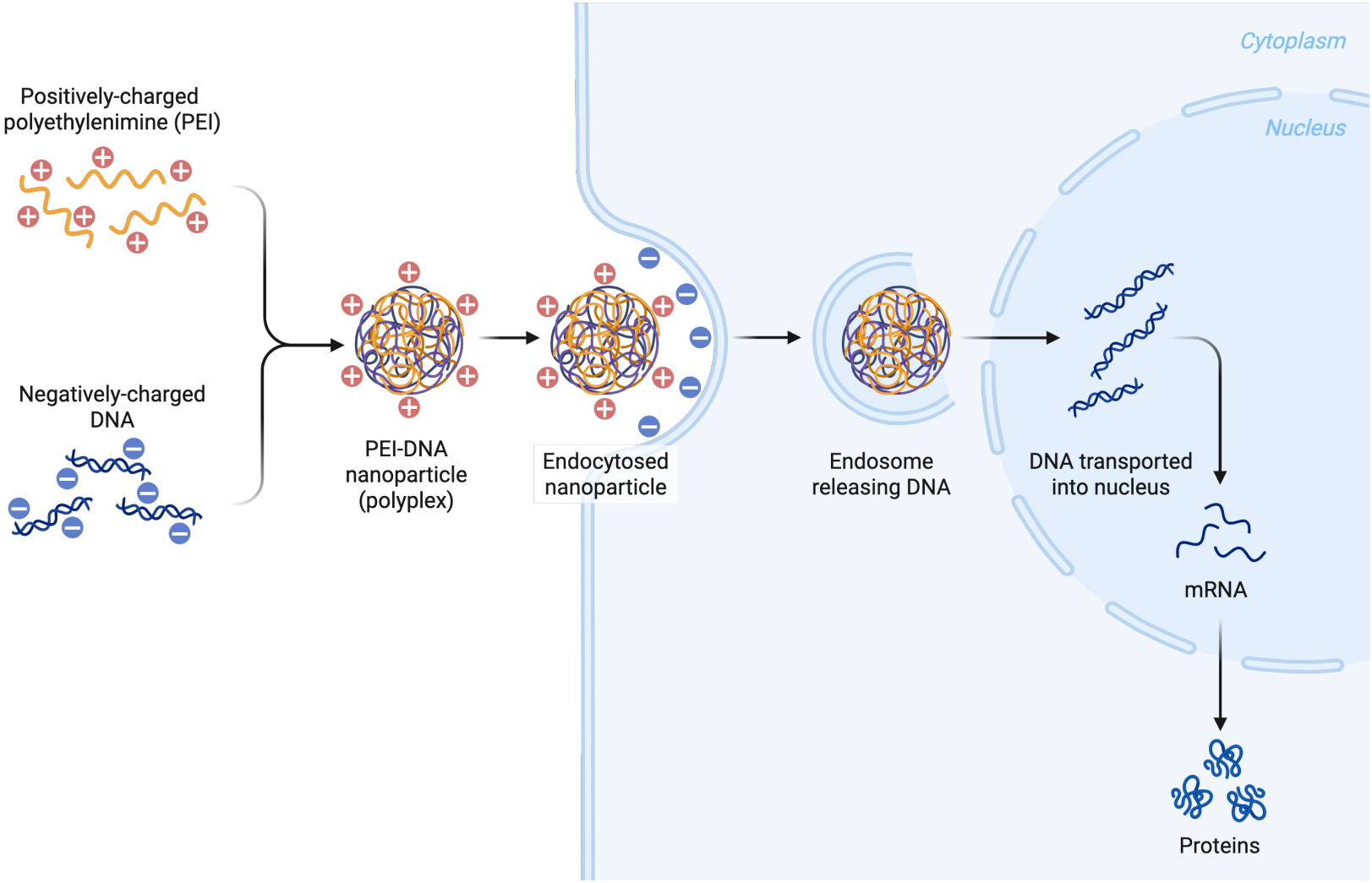
METODI CHIMICI



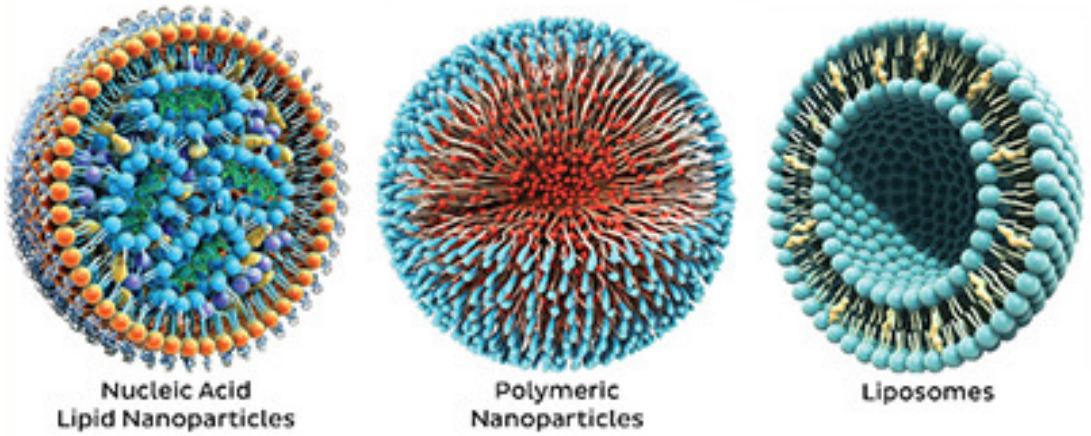
Metodo	Principio
Calcio fosfato	Il DNA co-precipita con il fosfato di calcio e viene endocitato
Lipofezione	Lipidi cationici formano complessi con il DNA, che entrano per endocitosi
Polimeri cationici (PEI)	Il polimero compatta il DNA in complessi che entrano per endocitosi

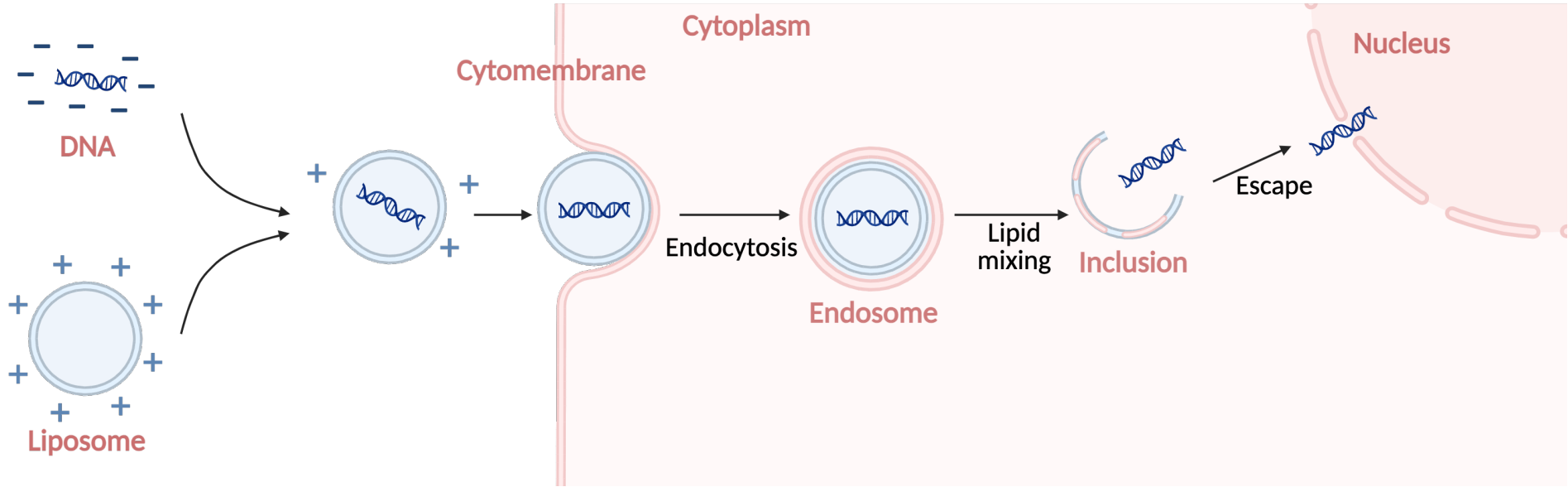
Trasfezione con PEI (polietilenimmina)

Il DNA viene mescolato al PEI (cationico), si formano dei complessi che vengono poi aggiunti al mezzo di coltura e entrano nelle cellule mediante endocitosi.



Trasfezione mediante LIPOSOMI o NANOPARTICLES





Metodi fisici

Elettroporazione e nucleofezione	Impulsi elettrici aprono pori transitori nella membrana	Cellule difficili (primarie, staminali)	Mortalità elevata; strumento dedicato
Microiniezione	Un microago inietta direttamente nel citoplasma o nel nucleo	Precisa; adatta a oociti ed embrioni	Una cellula alla volta; bassa resa
Biolistica (gene gun)	Microparticelle d'oro rivestite di DNA sparate nelle cellule	Tessuti e cellule vegetali	Danneggia le cellule; poco usata in coltura

Elettroporazione / nucleofezione

La membrana cellulare e quella nucleare sono permeabilizzate mediante l'applicazione di un campo elettrico: si formano dei pori del diametro di alcuni nm, attraverso i quali può passare il DNA.



Tipo di cellule: in adesione e in sospensione

Efficienza: alta

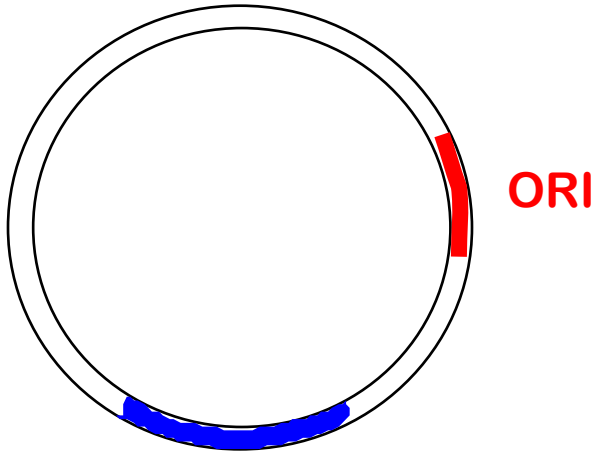
Tossicità : dipende dallo strumento e dal tipo cellulare

Caratteristiche dei vettori plasmidici

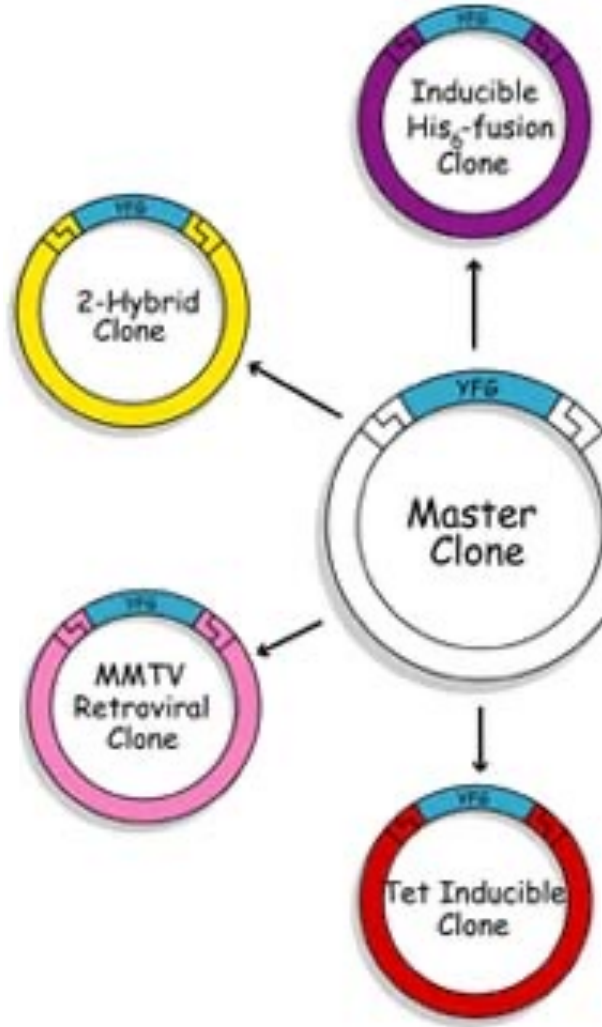
molecole di DNA batteriche extracromosomiche, solitamente circolari,
in grado di replicarsi autonomamente nei batteri,
spesso contengono geni che conferiscono antibiotico-resistenza

1) Sequenze necessarie per il mantenimento e l'amplificazione in batteri

- Origine di replicazione batterica (ColE1 ori)
- Marker per la selezione dei batteri trasformati:
  di solito un gene per la resistenza ad un antibiotico (antibatterico)



Categorie di vettori di espressione



Espressione in batteri

Espressione in lievito

Espressione transiente in cellule di mammifero

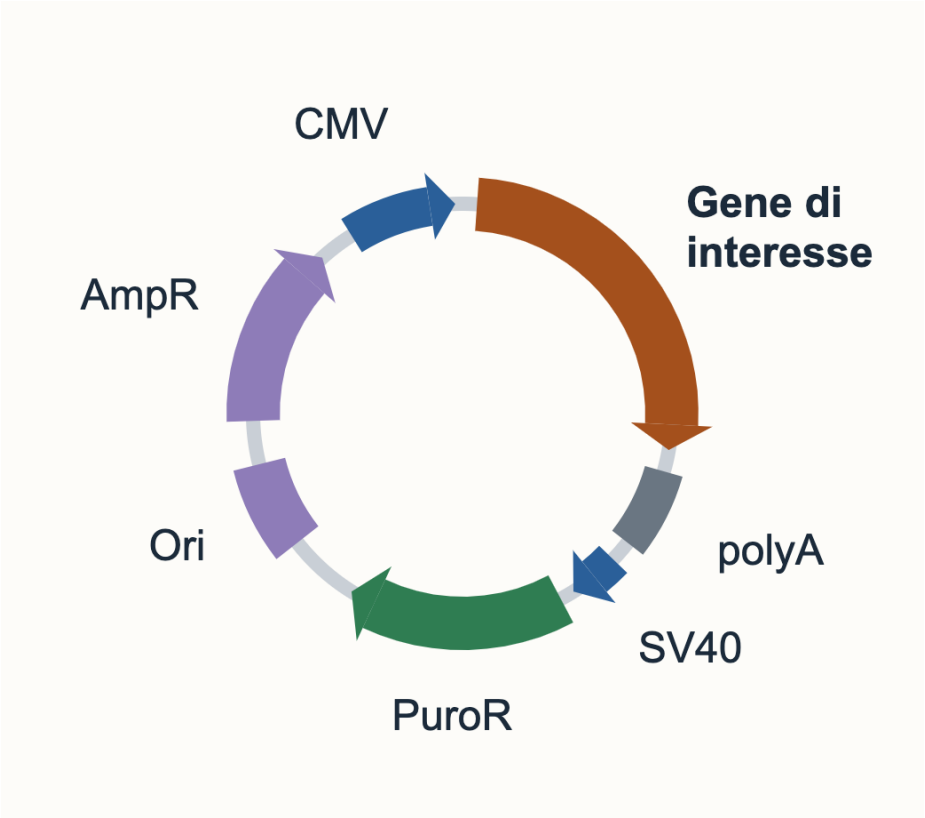
Espressione in vivo in mammifero

Espressione in cellule di insetto

Espressione inducibile in cellule di mammifero

Caratteristiche dei vettori di espressione per cellule di mammifero

Sequenze necessarie al clonaggio del gene e alla sua espressione in cellule di mammifero:



- **MCS** (sito di clonaggio multiplo)
- **promotore** costitutivo di origine virale (CMV, SV40…)
- segnale di poliadenilazione

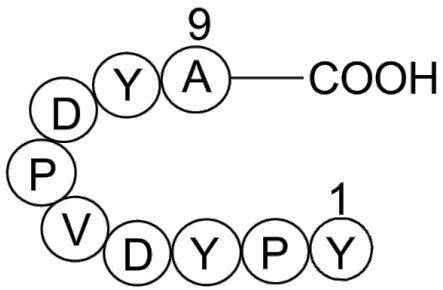
Espressione di proteine di fusione e TAGs

allo scopo di VISUALIZZARE o PURIFICARE una proteina sovraespressa
è possibile sovraesprimere la proteina in fusione

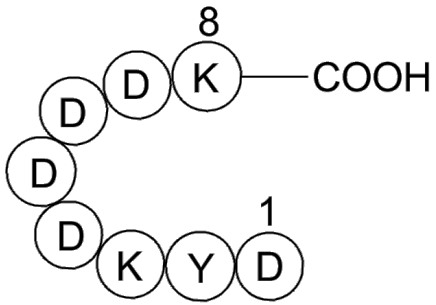
- con un corto peptide detto TAG (es. HA, FLAG, 6-His, Myc tag)

- con un polipeptide come GFP o altre fotoproteine, MBP etc.

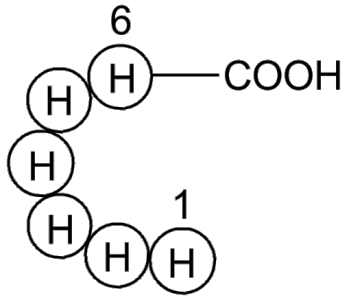
La sequenza codificante il TAG/polipeptide viene clonata in un vettore di espressione nella stessa cornice di lettura (in frame) al cDNA codificante la proteina, a monte o a valle.
Quindi il TAG può essere fuso all'N- o al C-terminale della proteina:



Human Influenza hemagglutinin (HA)



FLAG



Espressione transiente

- Il plasmide trasfettato rimane in forma di episoma ma non può essere replicato, e viene perso dopo qualche divisione cellulare
- n° di copie del plasmide nella cellula trasfettata: elevato e variabile
- Eterogeneità di espressione in diverse cellule
- Esperimenti brevi (24-72 ore)

Espressione stabile

- Il DNA trasfettato può venir integrato nel genoma della cellula ed essere replicato con esso (VETTORI A INTEGRAZIONE),

➢ oppure può essere mantenuto come episoma stabile (se il vettore ha un'ORIGINE VIRALE per la replicazione autonoma in cellule eucariotiche (VETTORI EPISOMIALI)

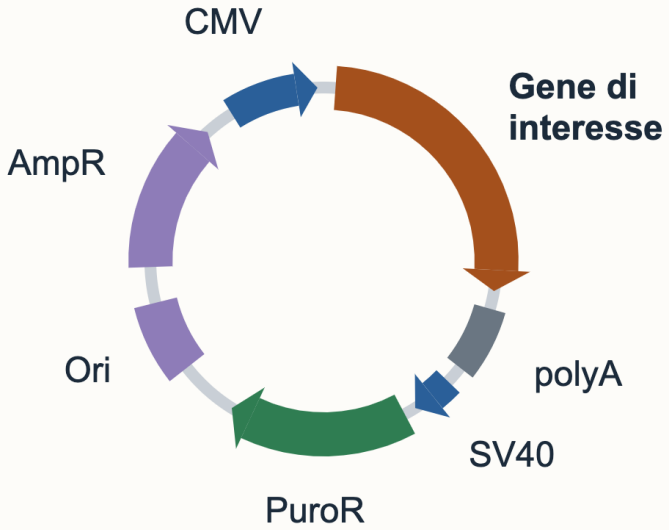
- L'efficienza di integrazione varia a seconda del vettore e del tipo cellulare.

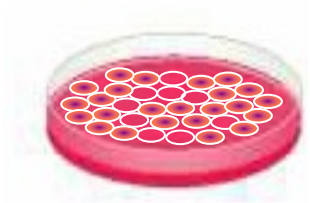
- Omogeneità di espressione (ottenimento di cloni stabili)

- Possibilità di effettuare saggi a lungo termine.

Ottenimento di trasfettanti stabili

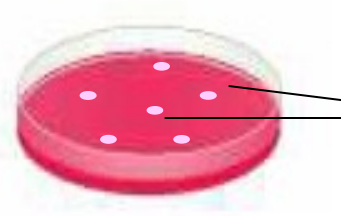
Per ottenere cellule trasfettate stabilmente è necessario subclonare il cDNA di interesse in un vettore di espressione per cellule eucariotiche che contenga un gene codificante per un marcatore selezionabile, ad es. resistenza ad un antibiotico (es. Puromicina, Neomicina,…).





1. Trasfezione

2. Selezione: le cellule non trasfettate moriranno

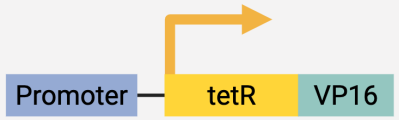


Dopo 2 o più settimane…

3. Isolamento di cloni di cellule che esprimono la proteina

Espressione Tet-inducibile:
TFs controllati da tetraciclina regolano il promotore tet-op

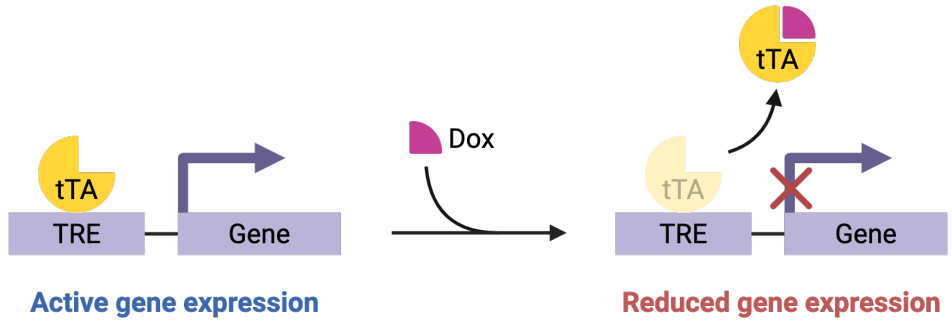
Tet-off



tTA cassette

tTA: Tetracycline-controlled transactivator
tetR: Tetracycline repressor
VP16: Viron protein 16 activation domain

Dox-inducible silencing of gene of interest

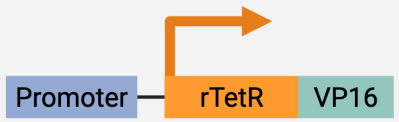


Active gene expression

Reduced gene expression

TRE: Tetracycline response element
Dox: Doxycycline

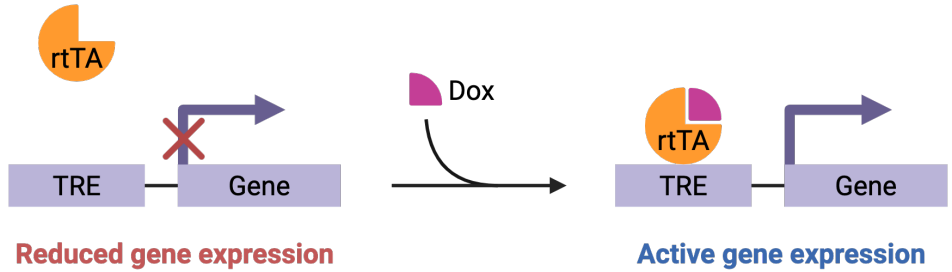
Tet-on



rtTA cassette

rtTA: Reverse tetracycline-controlled transactivator
rTetR: Reverse tetracycline repressor

Dox-inducible expression of gene of interest



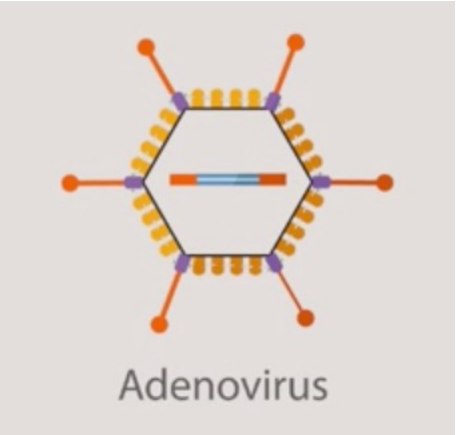
Reduced gene expression

Active gene expression

Trasduzione: trasferimento genico mediato da virus ricombinanti









Vettore	Genoma	Integrazione	Cellule infettate	Capienza	Uso tipico
Retrovirus	RNA	Sì, nel genoma	Solo in divisione	~8 kb	Linee stabili
Lentivirus	RNA	Sì, nel genoma	In divisione e quiescenti	~8–10 kb	Linee stabili, shRNA, CRISPR, CAR-T
Adenovirus	DNA	No, episomale	In divisione e quiescenti	~8 kb (fino a ~36 kb)	Espressione transitoria elevata, vaccini
AAV	DNA	Raramente; per lo più episomale	In divisione e quiescenti	~4,7 kb	Terapia genica in vivo

Preparazione di virus ricombinanti

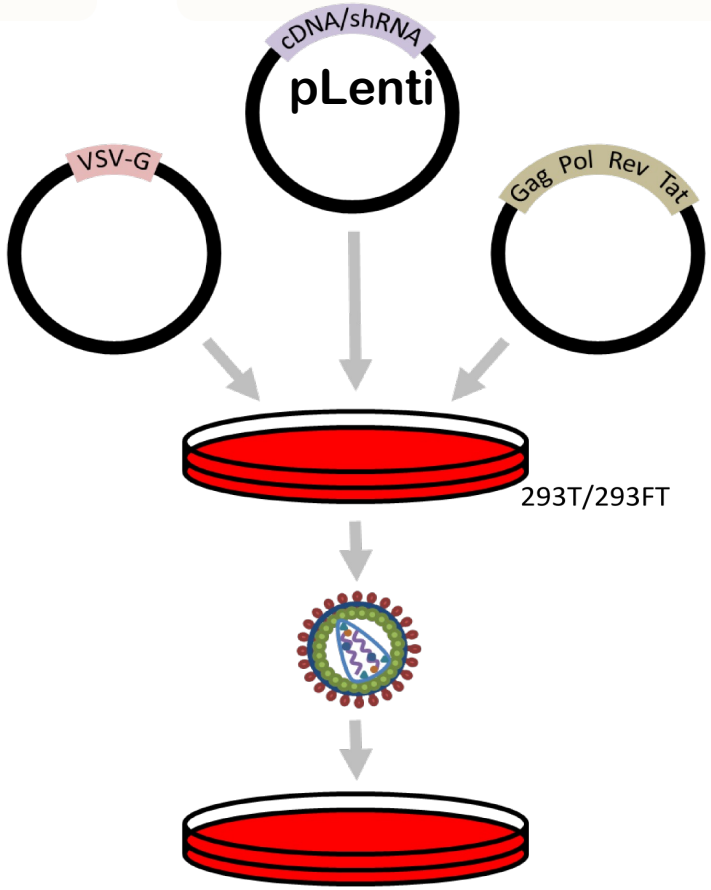
Plasmidi
Gene di interesse + geni virali di packaging e envelope su plasmidi diversi

Cellule produttrici
Trasfezione di HEK293T, che assemblano le particelle infettive

Surnatante
Raccolto, filtrato e titolato: contiene i virus

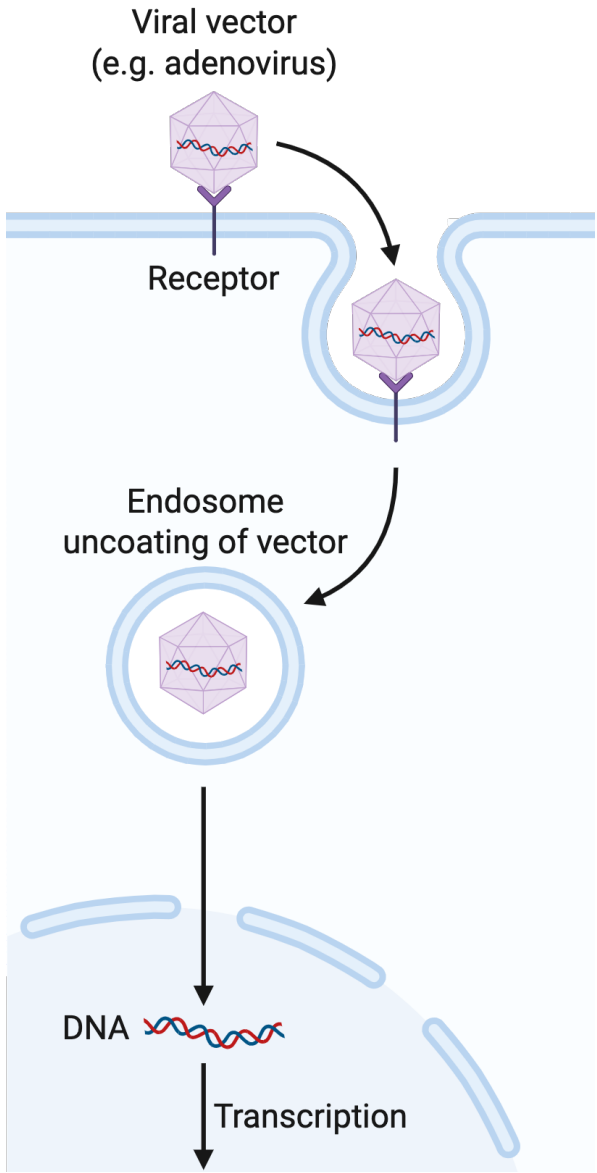
Cellule bersaglio
Infezione a una MOI scelta; il virus non si replica

I **virus ricombinanti** vengono **impaccati in particelle infettive** facendo esprimere a cellule "packaging" le proteine del capside virale e la componente enzimatica per la retrotrascrizione o usando *packaging cell lines stabili*.

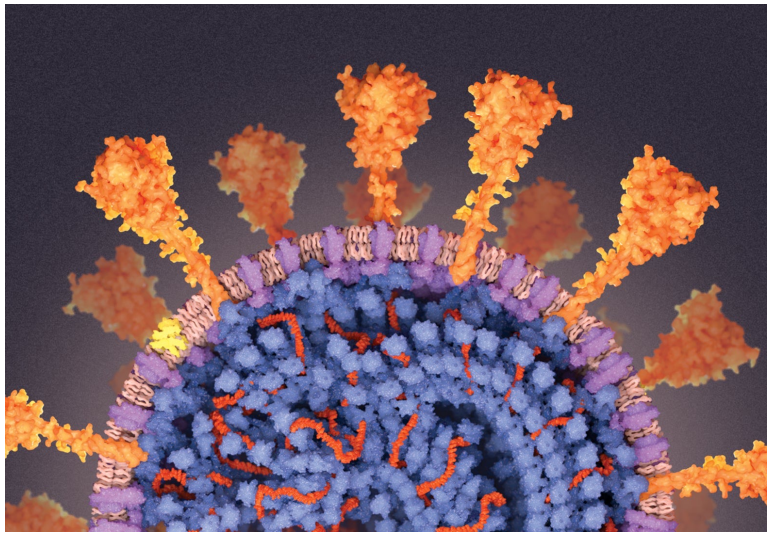


Sicurezza: i vettori sono incapaci di replicarsi perché i geni virali non entrano nella particella;
si lavora in BSL-2.

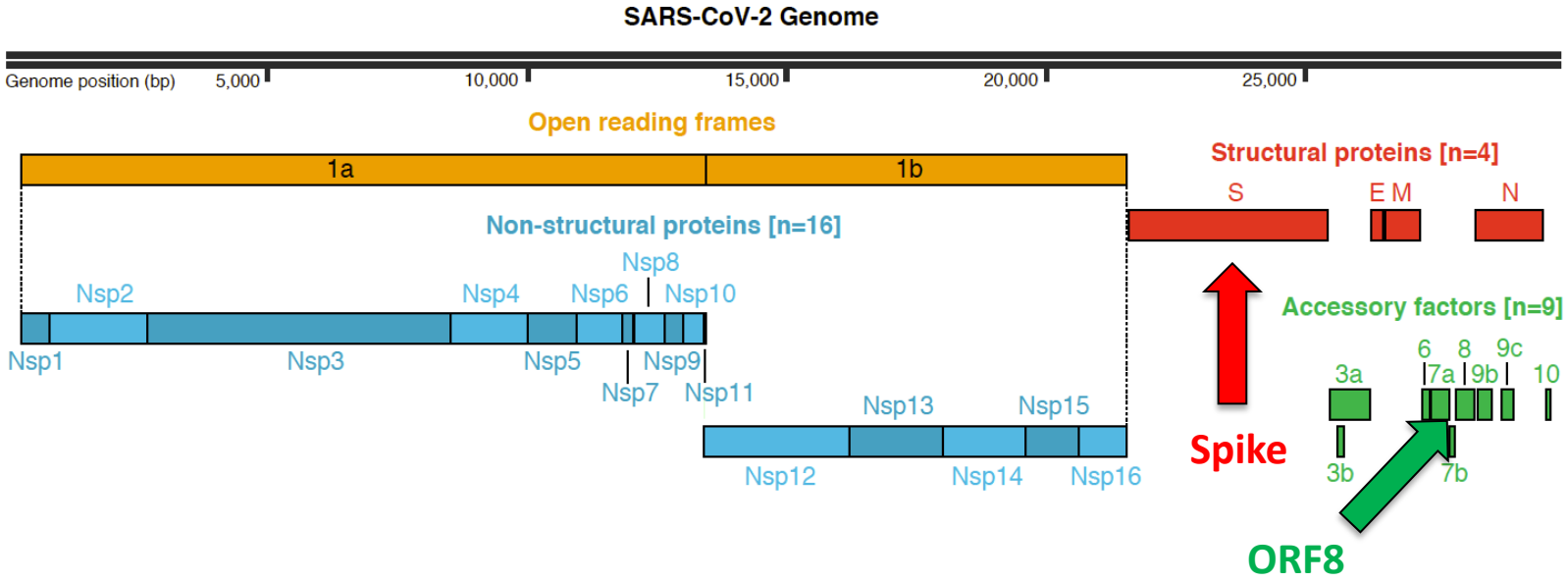
Trasduzione: trasferimento genico mediato da virus ricombinanti



Esperienza #4: sovraESPRESSIONE transiente di PROTEINE VIRALI in cellule umane allo scopo di analizzarne la localizzazione subcellulare



SARS-CoV-2

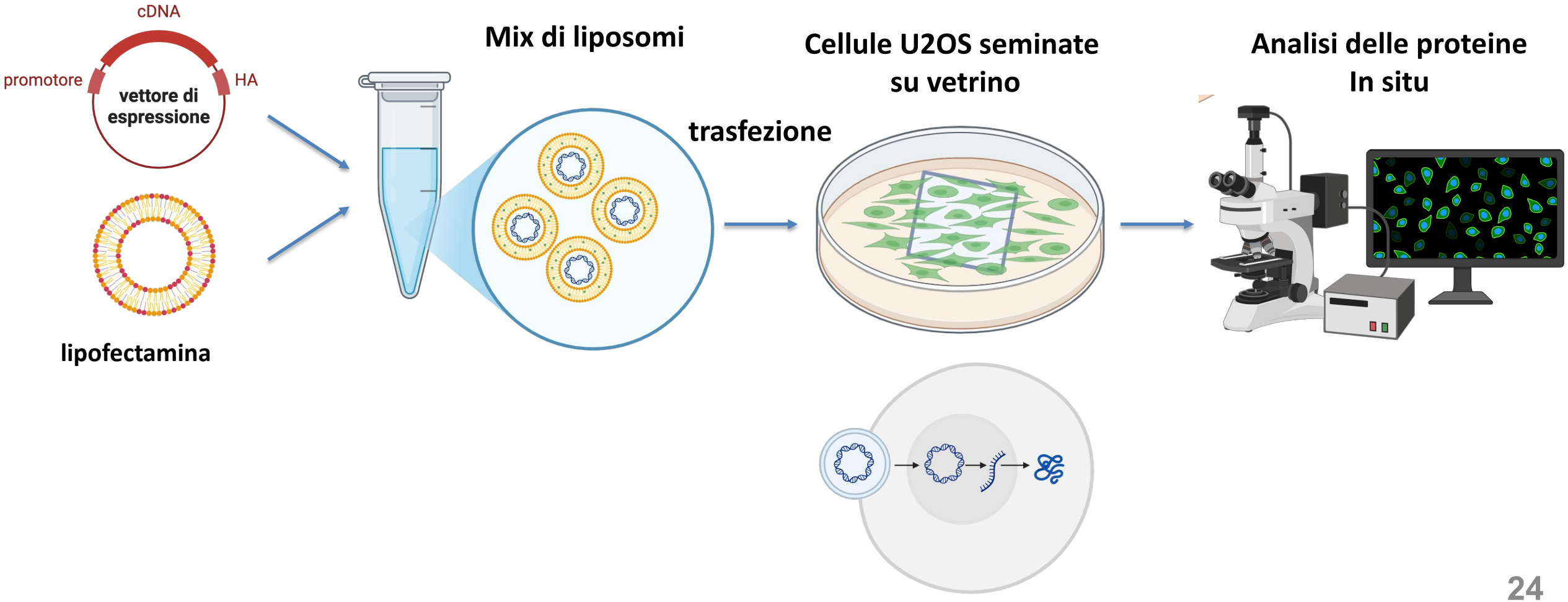


APPROCCIO SPERIMENTALE

1. DISEGNO DELL'ESPERIMENTO
2. SCELTA DEL MODELLO CELLULARE e DELLE TECNICHE
3. SCELTA DEGLI STRUMENTI per L'ANALISI
4. RISULTATI ATTESI

SCELTA del MODELLO e delle TECNICHE:

Trasfezione di cellule U2OS in coltura 2D mediante LIPOFEZIONE



PREPARAZIONE DEI REAGENTI (effettuato dal docente) PER L'ESPERIMENTO

1. Ottenere il cDNA

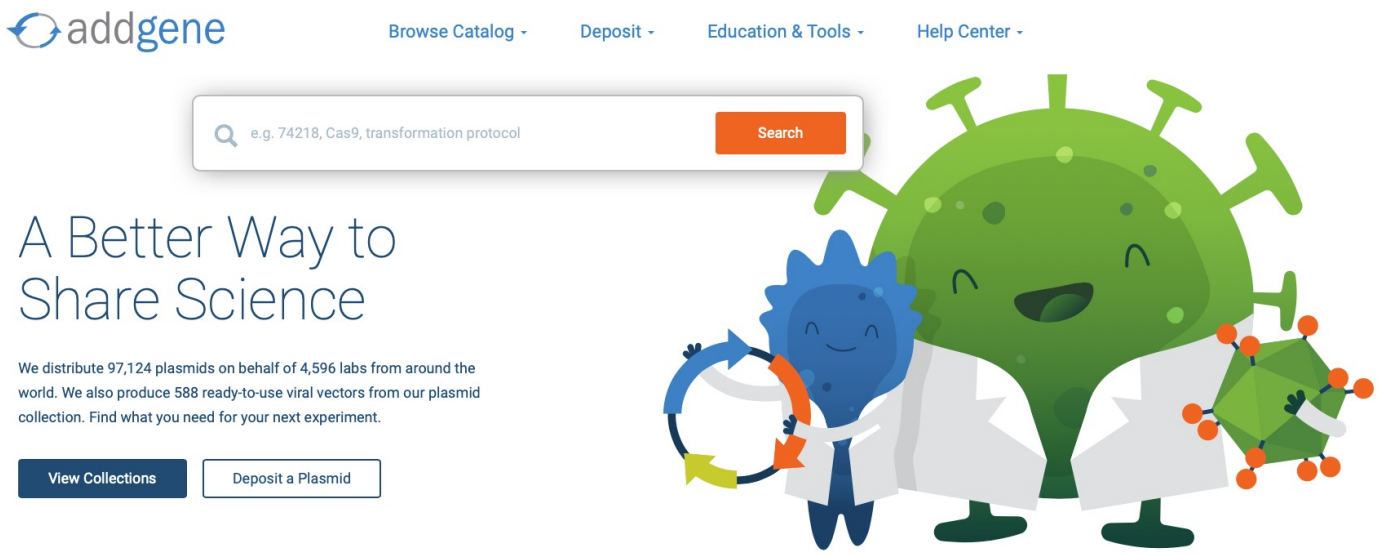
2. Procedere al subclonaggio in un vettore di espressione

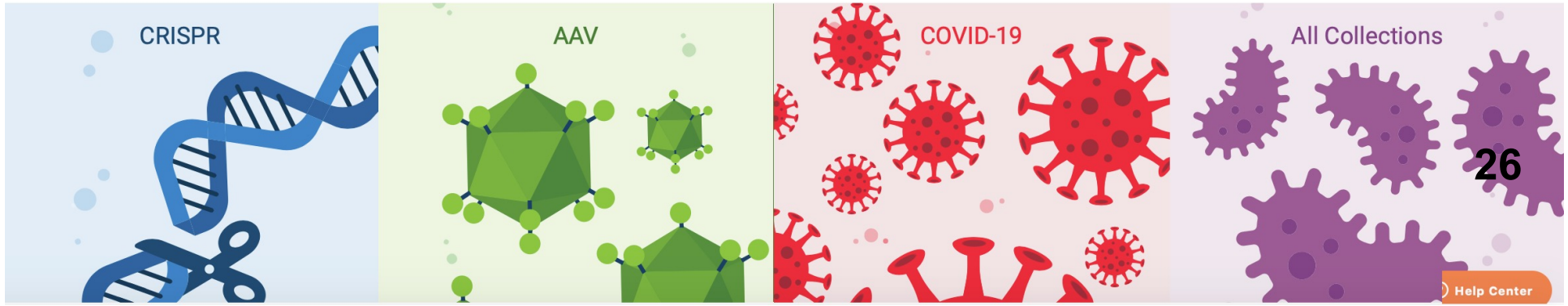
   (laboratorio di biologia molecolare)

Come ci procuriamo i DNA per l'esperimento?

a) Cerco il clone in una "banca"

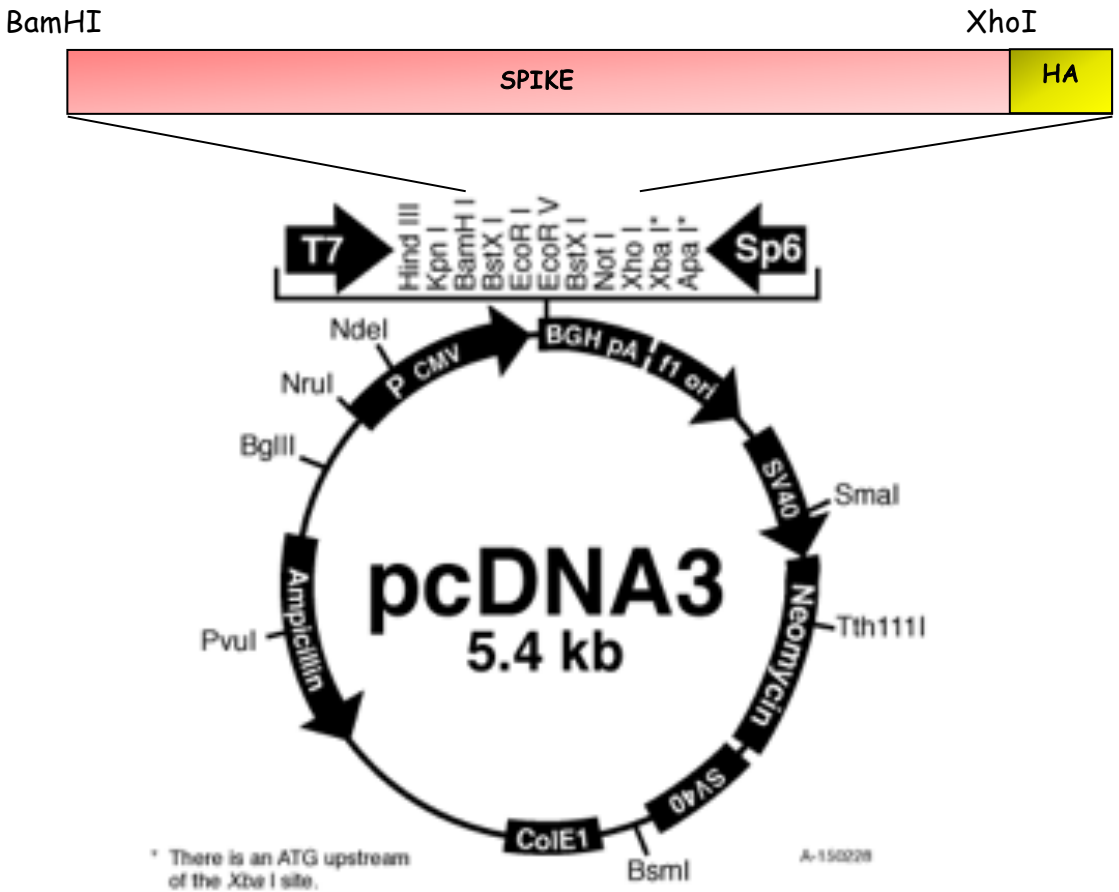
b) Invio una richiesta agli autori di pubblicazioni rilevanti





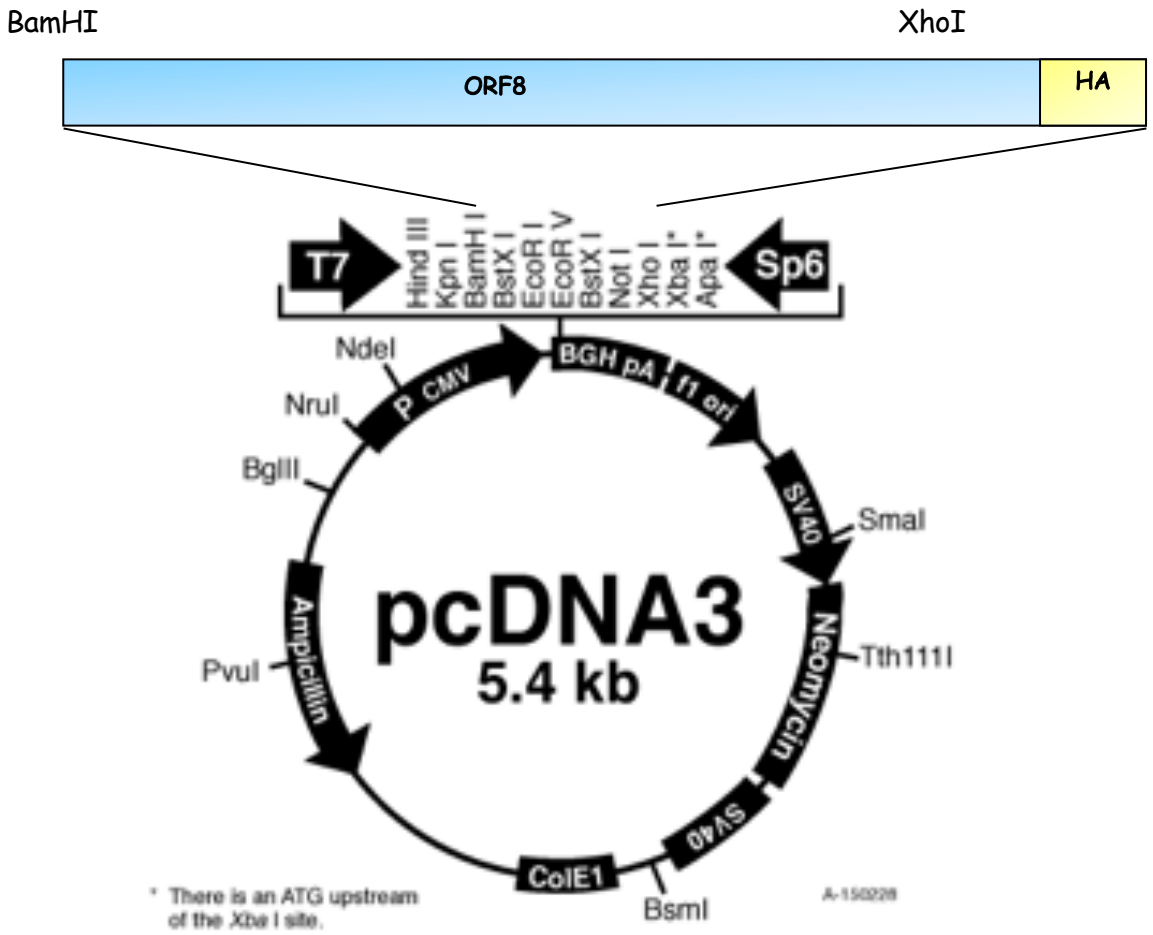
Step 1a (eseguito dai docenti):

clonaggio del cDNA di Spike nel vettore di espressione pcDNA3 *in fusione con il TAG HA* al C terminale

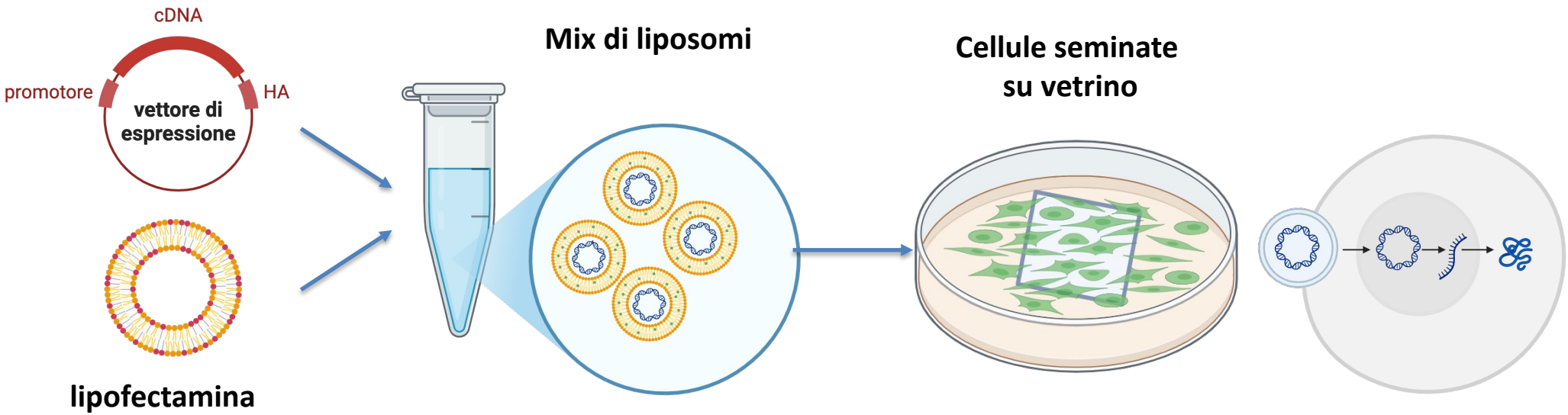


Step 1b: (eseguito dai docenti):

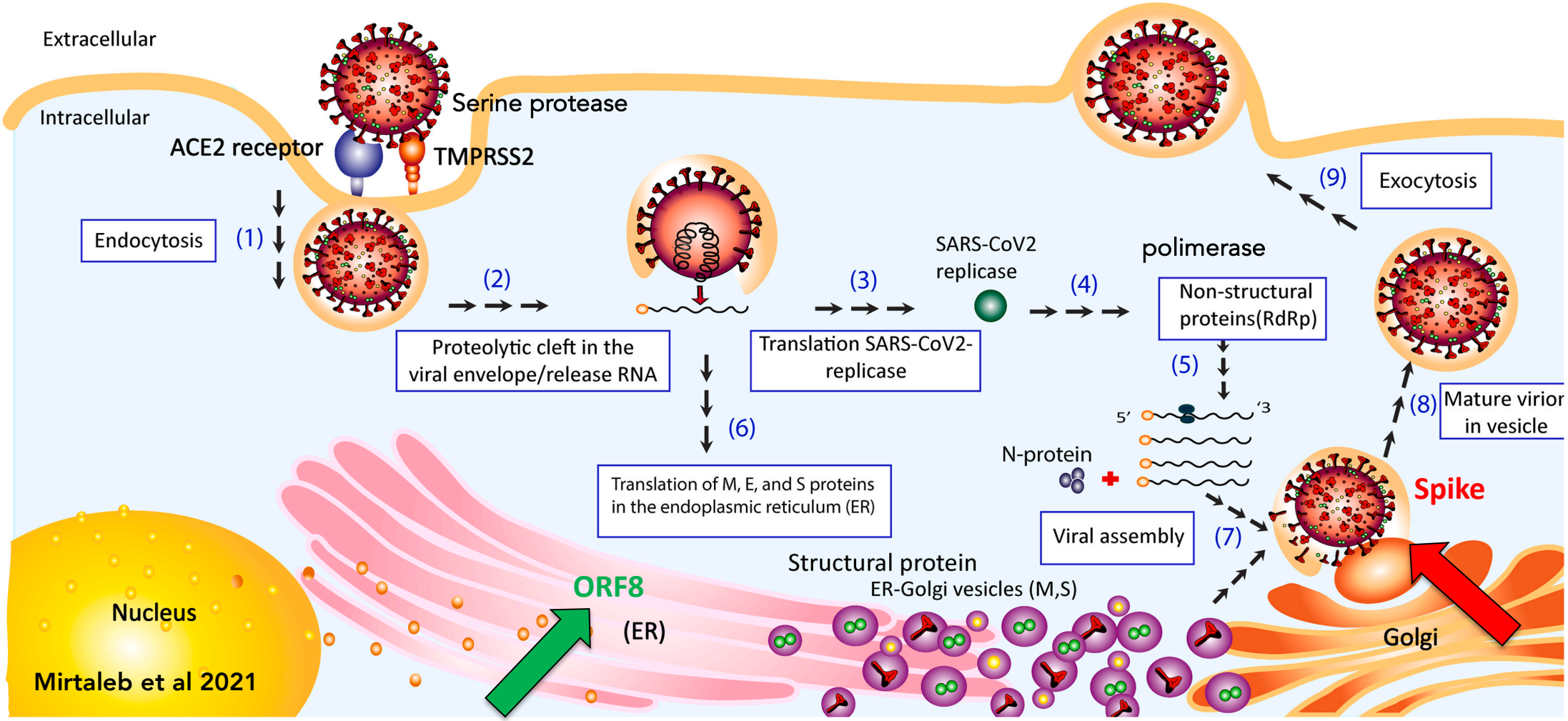
clonaggio del cDNA di ORF8 nel vettore di espressione pcDNA3 in fusione con il TAG HA al C terminale



Step 2: trasferimento dei vettori di espressione in cellule di mammifero (linea cellulare di origine mesenchimale U2OS)



RISULTATI ATTESI:
Localizzazione subcellulare attesa per le proteine ORF8 e SPIKE



DISEGNO DELL'ESPERIMENTO:
Modulazione sperimentale della localizzazione subcellulare delle proteine ORF8 e SPIKE

Step 1c:

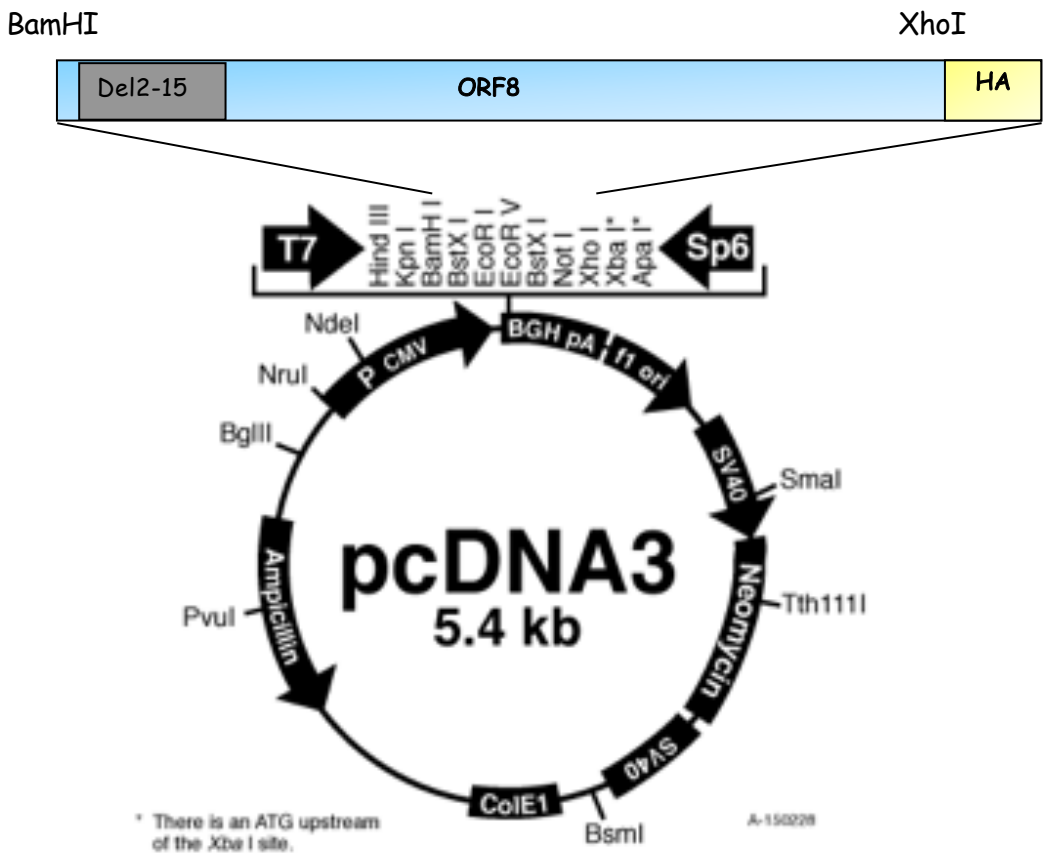
mutagenesi del vettore di espressione di ORF8:

generazione dei vettori di espressione

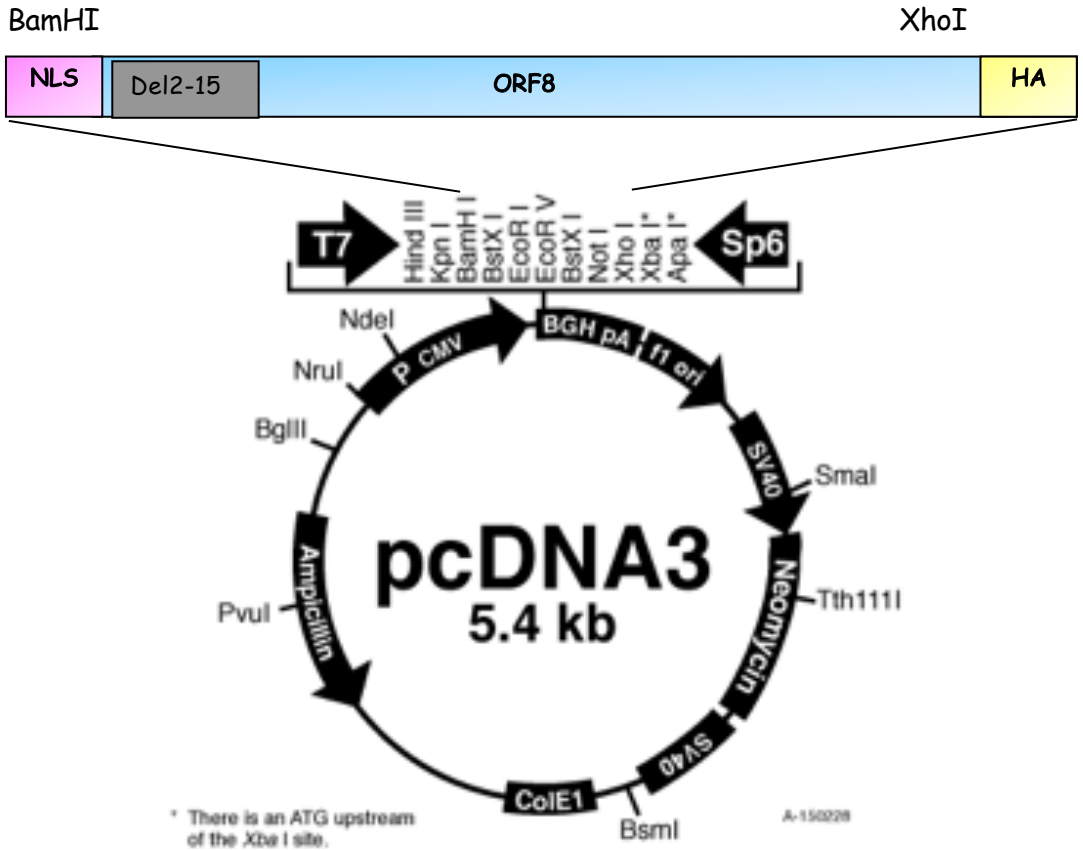
ORF8 ΔSS

ORF8 ΔSS-NLS

pcDNA3 ORF8 ΔSS-HA



pcDNA3 NLS ORF8 ΔSS-HA



Step 2b: trattamento del trasfettante SPIKE con inibitori del trasporto vescicolare ER-GOLGI (Brefeldin A)

