CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche

Corso di Biotecnologie Cellulari 2026-27

Lezione 7

Realizzazione di un progetto sperimentale

SVILUPPO DI UN PROGETTO DI RICERCA SPERIMENTALE

1) Problema biologico
2) Stato dell'arte
3) Domande aperte
4) Ipotesi
5) Obiettivi
6) Approccio sperimentale
7) Risultati attesi
8) Rischi e possibili soluzioni

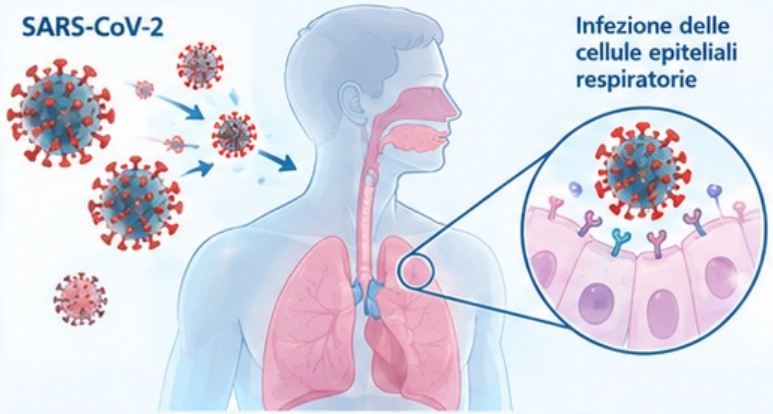
CONTESTO

Il decorso tipico (*non complicato*) dell'infezione da SARS-CoV-2

Nella maggior parte dei pazienti, l'infezione è controllata efficacemente dal sistema immunitario e si risolve senza complicanze gravi.

1 Infezione iniziale

SARS-CoV-2 entra nell'organismo principalmente attraverso le vie respiratorie e infetta le cellule delle vie aeree.

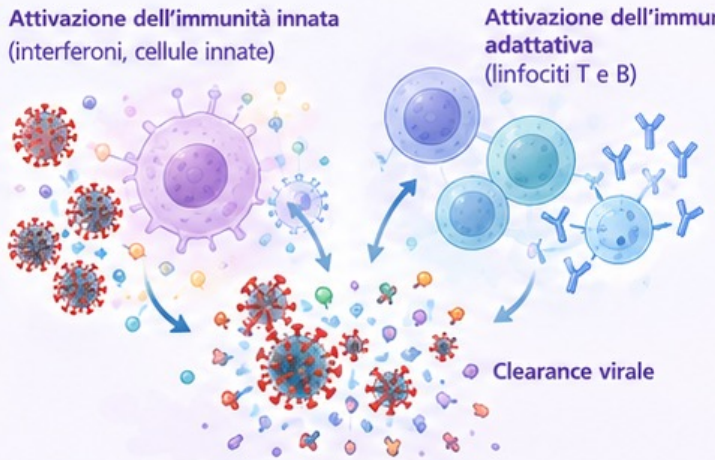


Sintomi lievi o moderati



2 Risposta immunitaria efficace

L'attivazione della risposta immunitaria innata e adattativa limita la replicazione virale e promuove la clearance dell'infezione.



La risposta immunitaria controlla l'infezione e limita il danno tissutale.

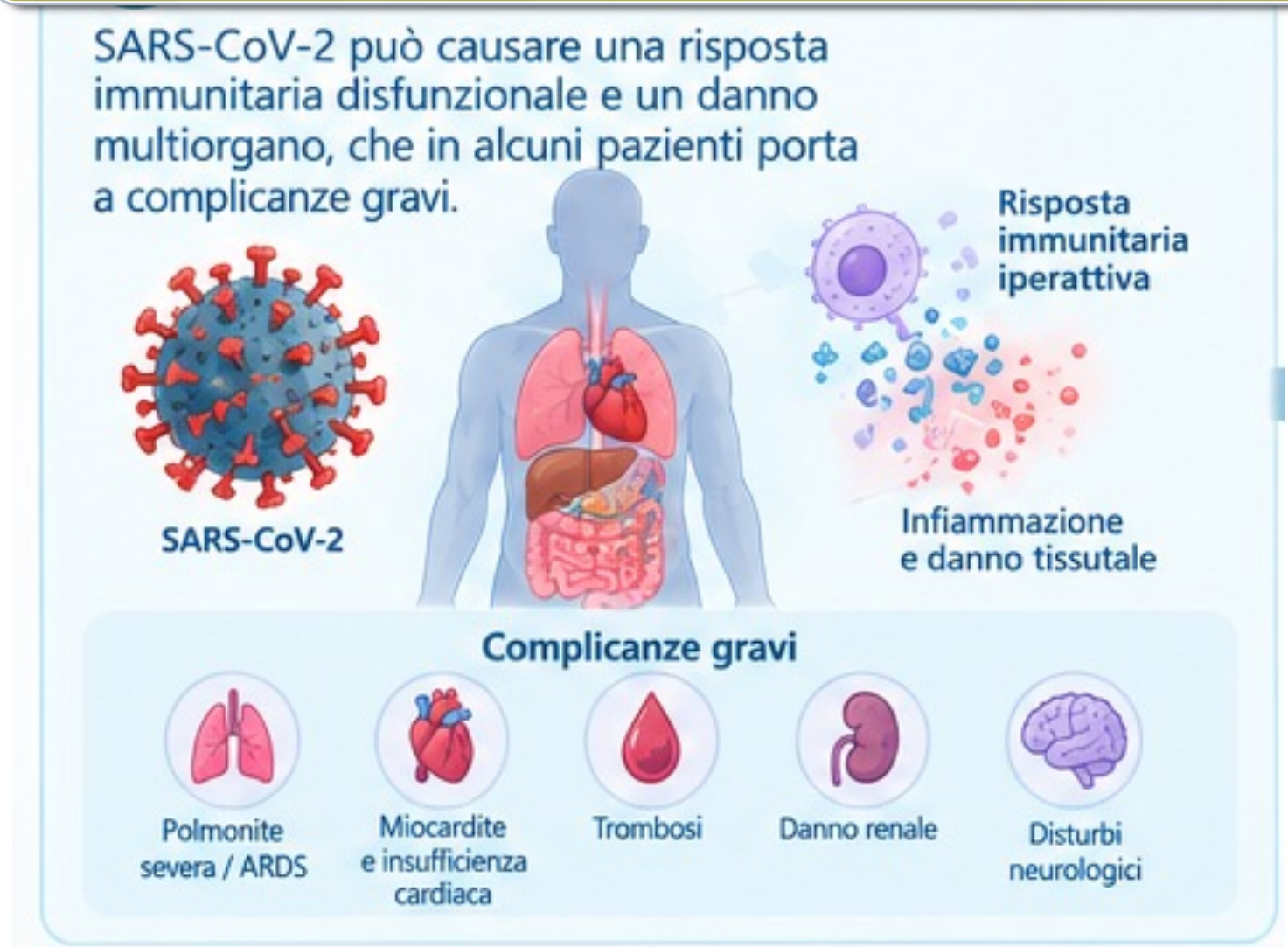
3 Risultato

Il paziente si riprende gradualmente, con il ritorno alle normali funzioni respiratorie e generali.



Infografica generata con ChatGPT

PROBLEMA BIOLOGICO E STATO DELL'ARTE



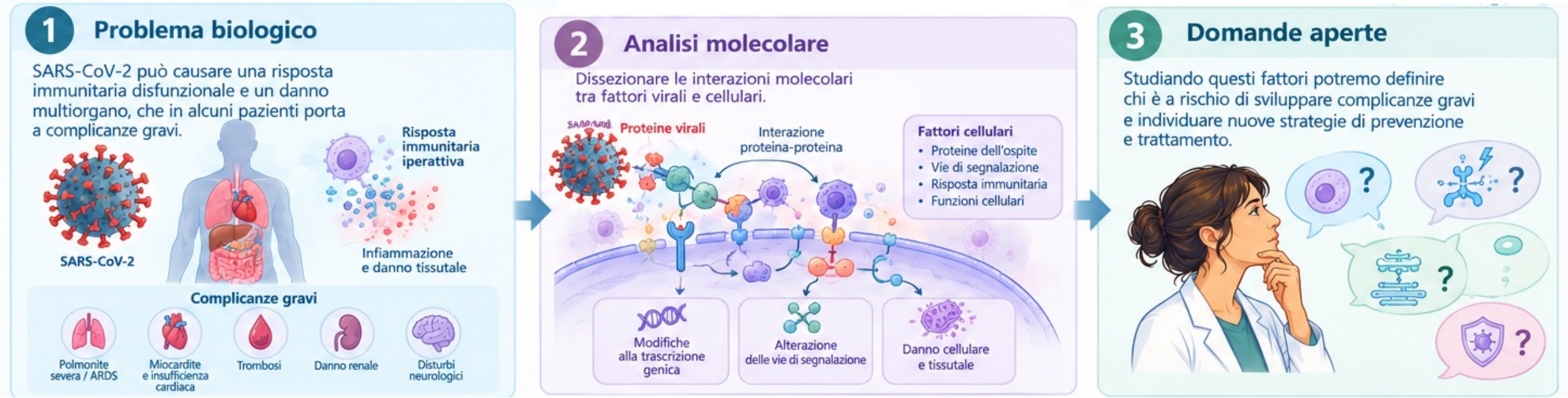
Infografica generata con ChatGPT

DOMANDA :
Quali fattori determinano le complicanze gravi dell'infezione da SARS-CoV-2?



Possiamo affrontare il problema biologico da punti di vista diversi
(tanti possibili fattori in gioco)

Quali meccanismi cellulari/molecolari scatenano la risposta infiammatoria forte/cronica all'infezione causando la COVID grave ?



OBIETTIVO Identificare fattori virali e meccanismi cellulari implicati nell'induzione dell'infiammazione cronica

APPROCCIO SPERIMENTALE Analizzare interazioni molecolari tra fattori virali e component/meccanismi cellulari

APPROCCIO SPERIMENTALE:
Analizzare l'interattoma delle ORFs VIRALI

Article

A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing

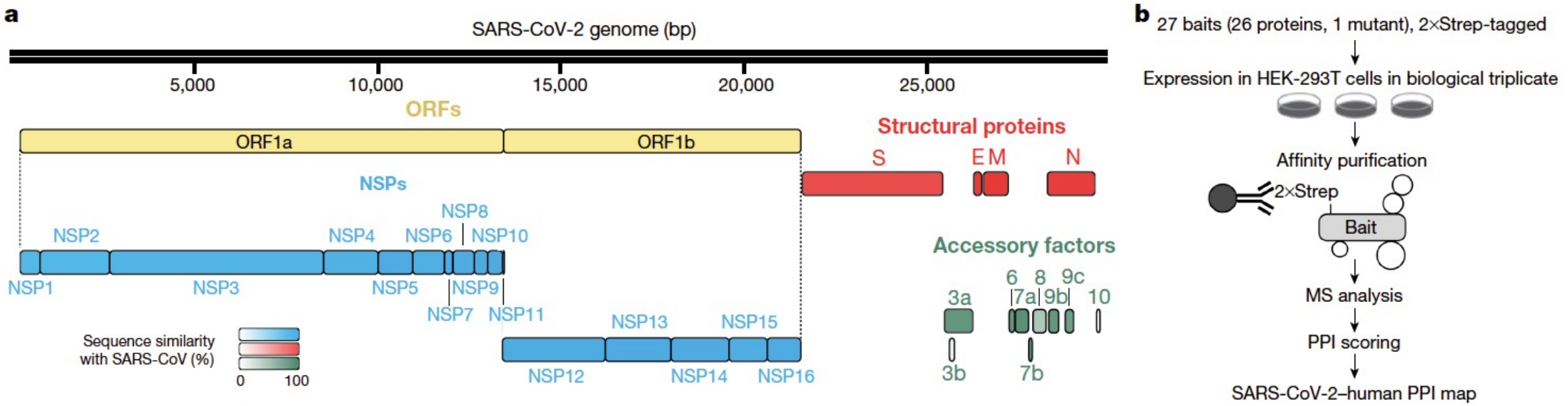
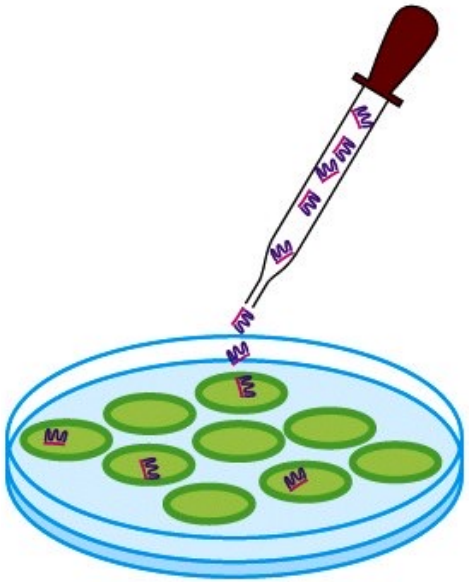


Fig. 1 | AP-MS workflow for the identification of SARS-CoV-2–host protein–protein interactions. a, SARS-CoV-2 genome annotation. The colour intensity is proportional to the protein sequence similarity with SARS-CoV homologues (when homologues exist). $n = 4$ structural proteins; $n = 16$ NSPs; $n = 9$ accessory factors. **b**, Experimental workflow for AP-MS studies. MS, mass spectrometry; PPI, protein–protein interaction.

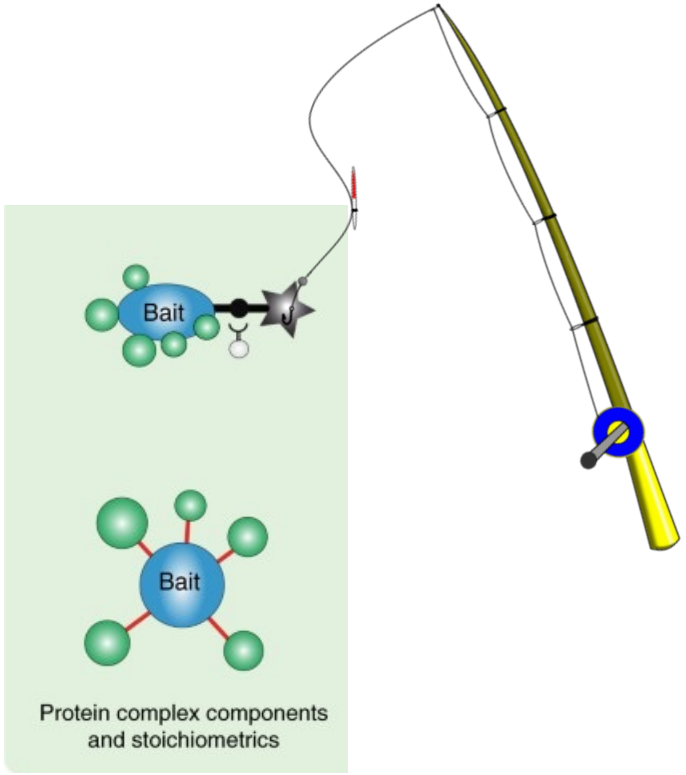
DISEGNO DELL'ESPERIMENTO

1) Sovraespressione
di singole proteine esca virali
in cellule umane





2) recuperare ciascuna proteina esca dalle cellule ed analizzare le proteine cellulari ad essa legate (interattoma)

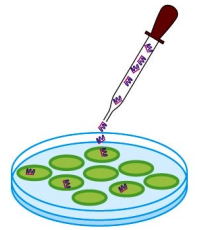


FATTORI DA CONSIDERARE per la SCELTA DEL MODELLO CELLULARE

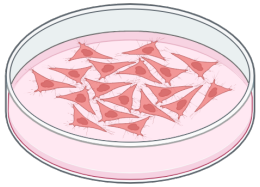
- esperimenti **high-throughput**: è richiesto un modello con facilità di mantenimento in coltura e rapidità di amplificazione

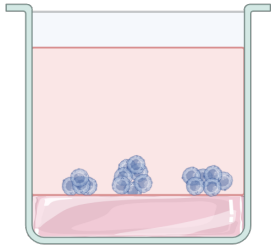


- espressione delle proteine virali: è richiesta facilità di **trasfezione** con DNA esogeno



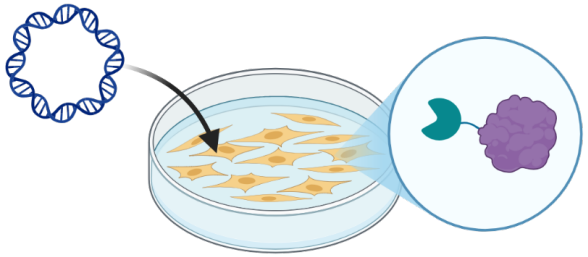
- **Coltura 2D o 3D ? ORIGINE?**





- SCELTA: cellule HEK293T (human epithelial – kidney trasformate in vitro):
  adatte perchè facili da amplificare e trasfettare, esprimono il recettore ACE, …

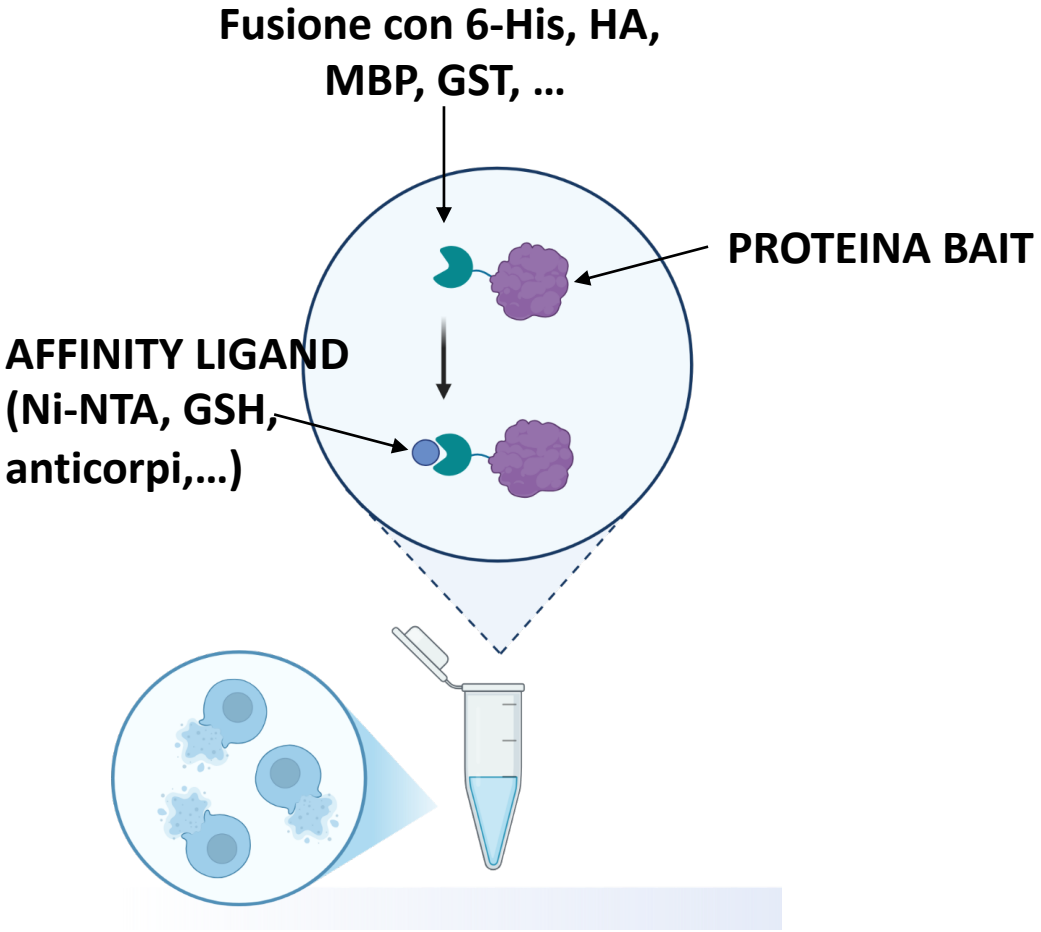
Espressione e purificazione di proteine ESCA (bait)



Produzione della bait in cellule

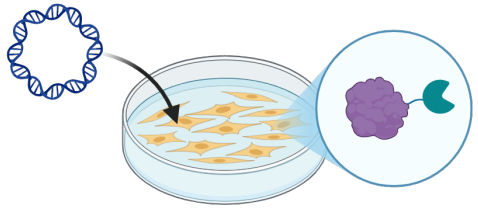
Le BAIT sono solitamente PROTEINE sovraespresse in fusione o TAG-gate prodotte in cellule eucariotiche *oppure in batteri;*

vengono purificate mediante un LIGANDO ad alta affinità coniugato ad una fase solida



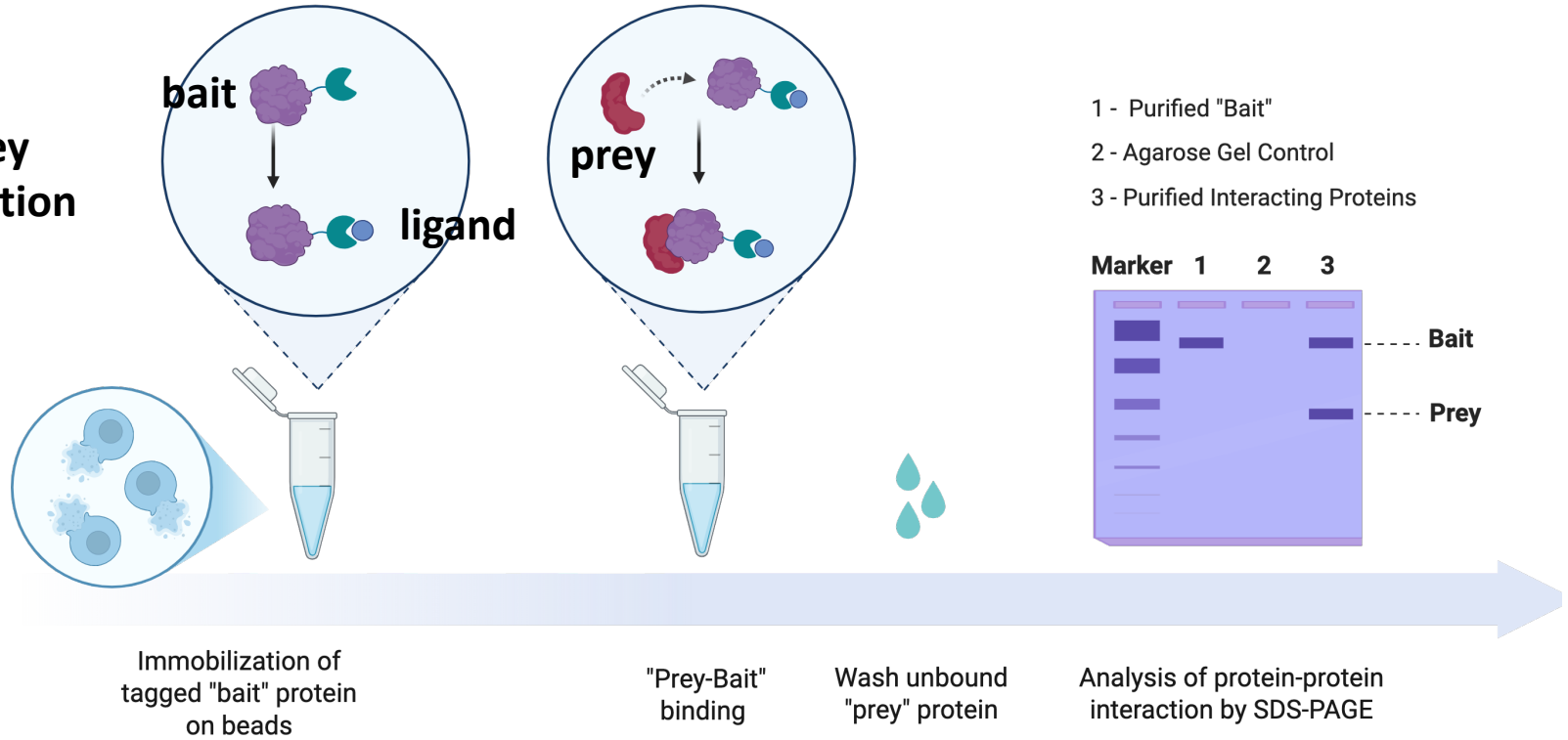
Lisi cellulare e immobilizzazione su fase solida (beads di agarosio, sefarosio, magnetiche, …) mediante ligando

Purificazione di proteine «BAIT» x affinità e delle componenti endogene «PREY» ad esse associate

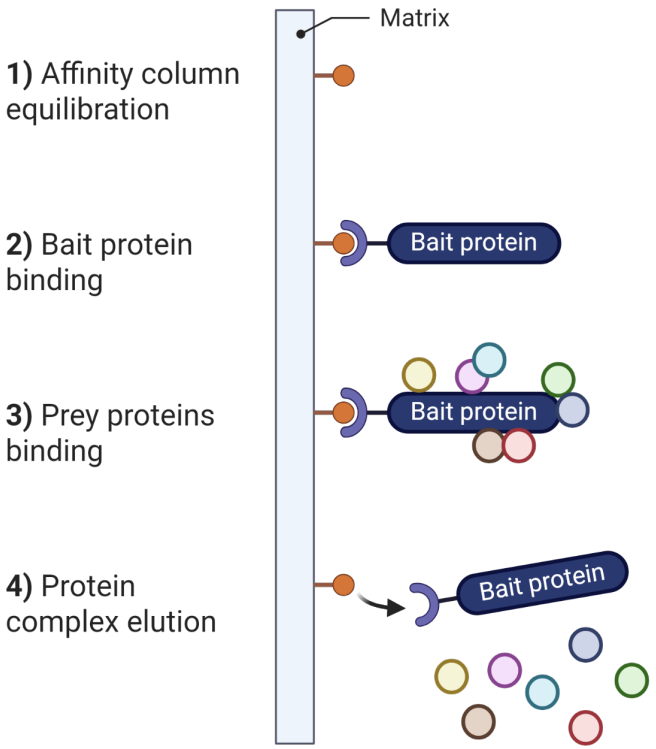


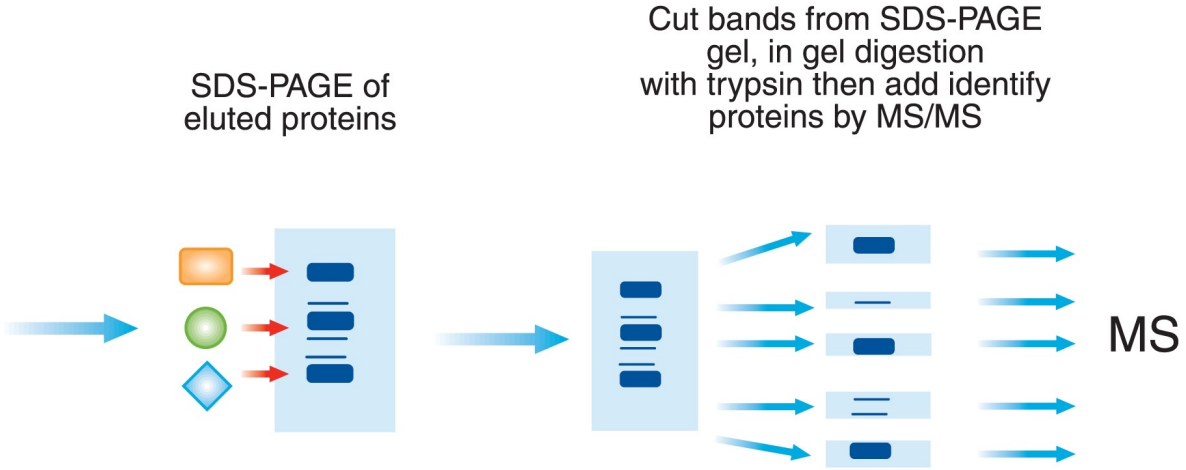
Bait expression

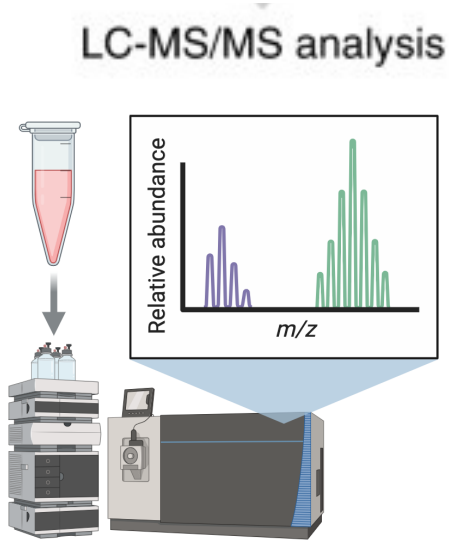
Bait-prey purification



ANALISI DELL'INTERATTOMA

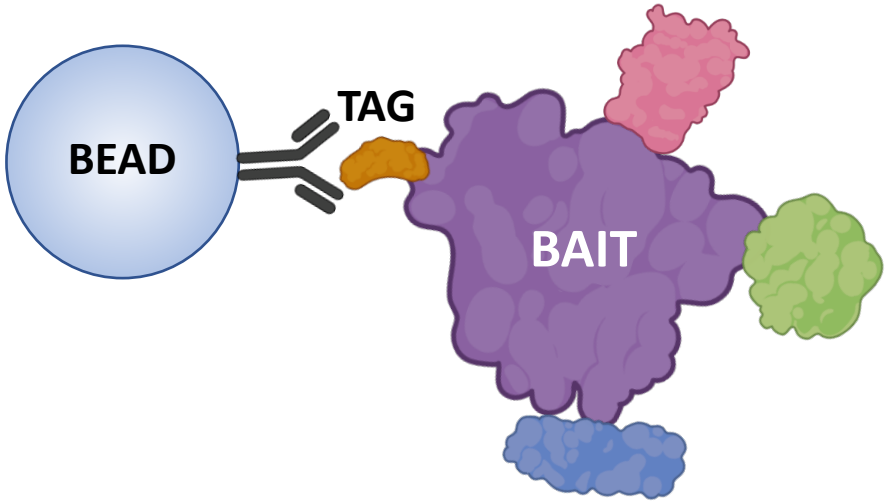






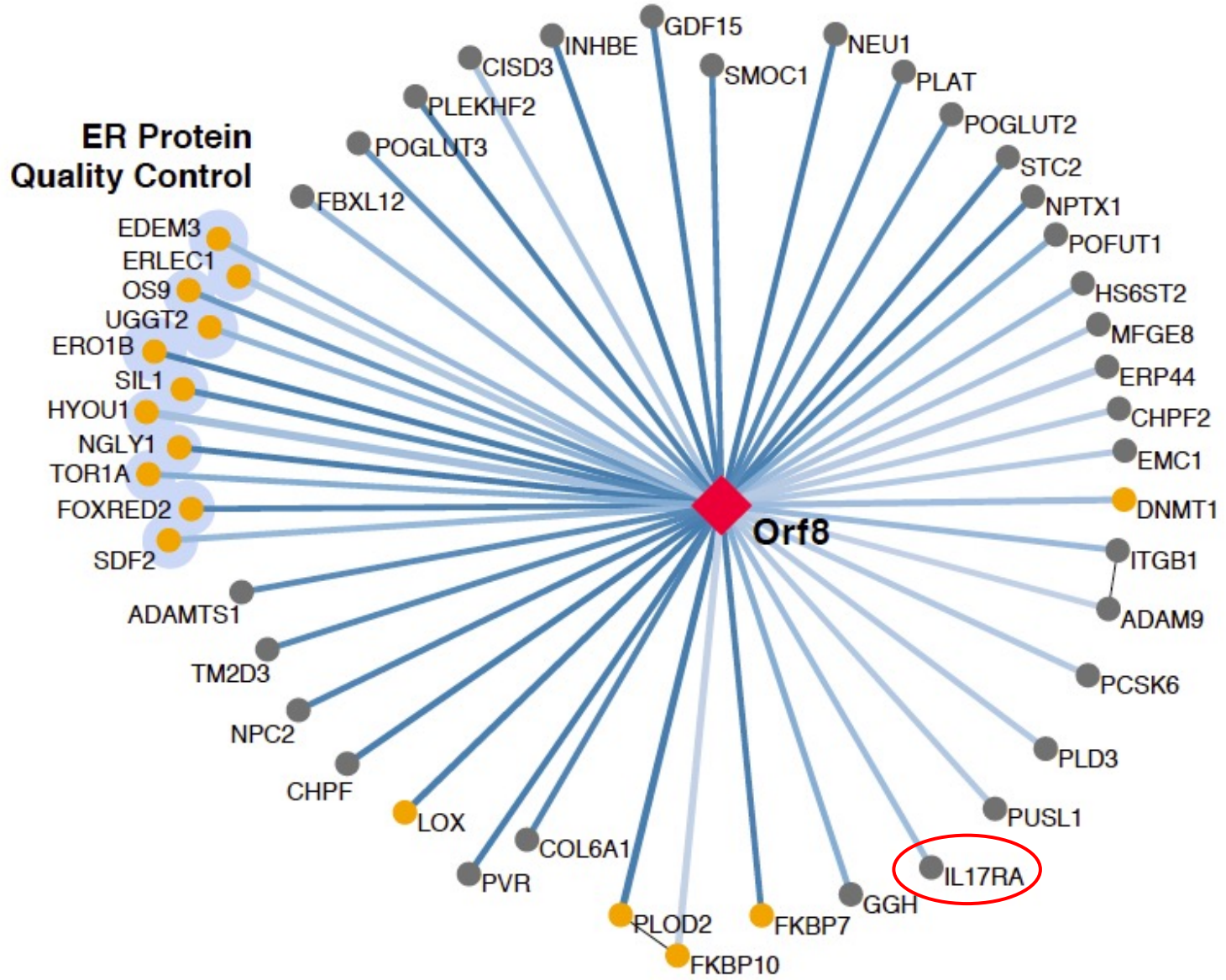
Se le proteine partner NON sono note, si sottopongono le bande proteiche dell'interattoma a digestione e analisi mediante spettrometria di massa.

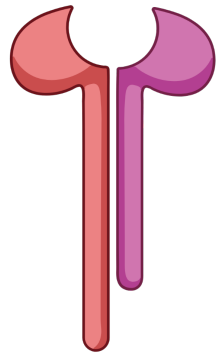
Purificazione di proteine mediante anticorpi specifici: (co)-immunoprecipitazione (co-IP)





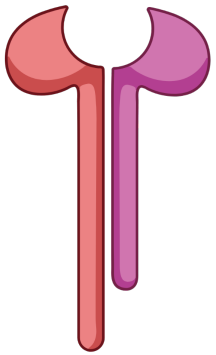
ANALISI DELL'INTERATTOMA di ORF8 IN CELLULE UMANE



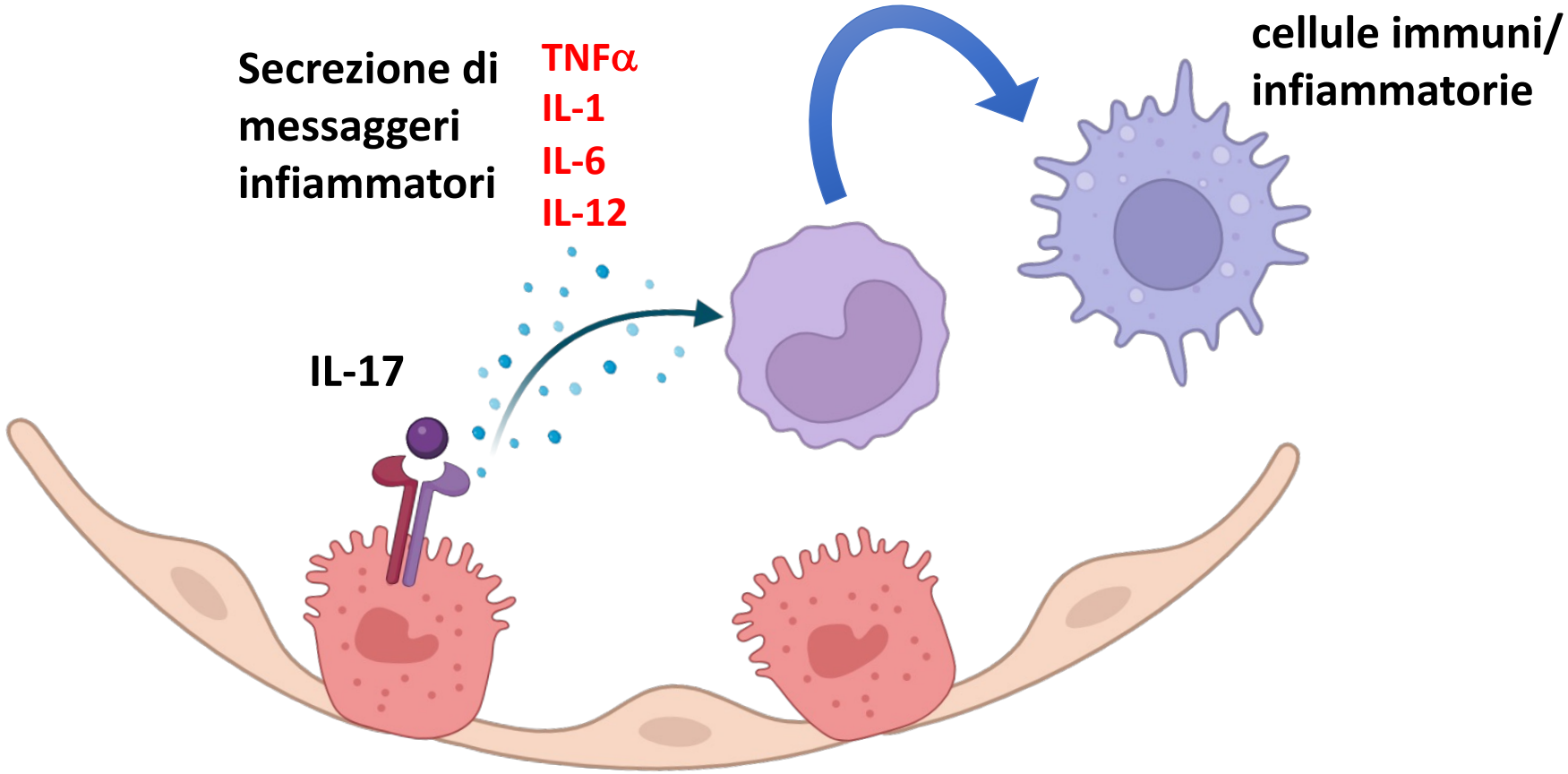


IL17 RA

IL-17 RA è un recettore coinvolto nell'infiammazione



IL17 RA



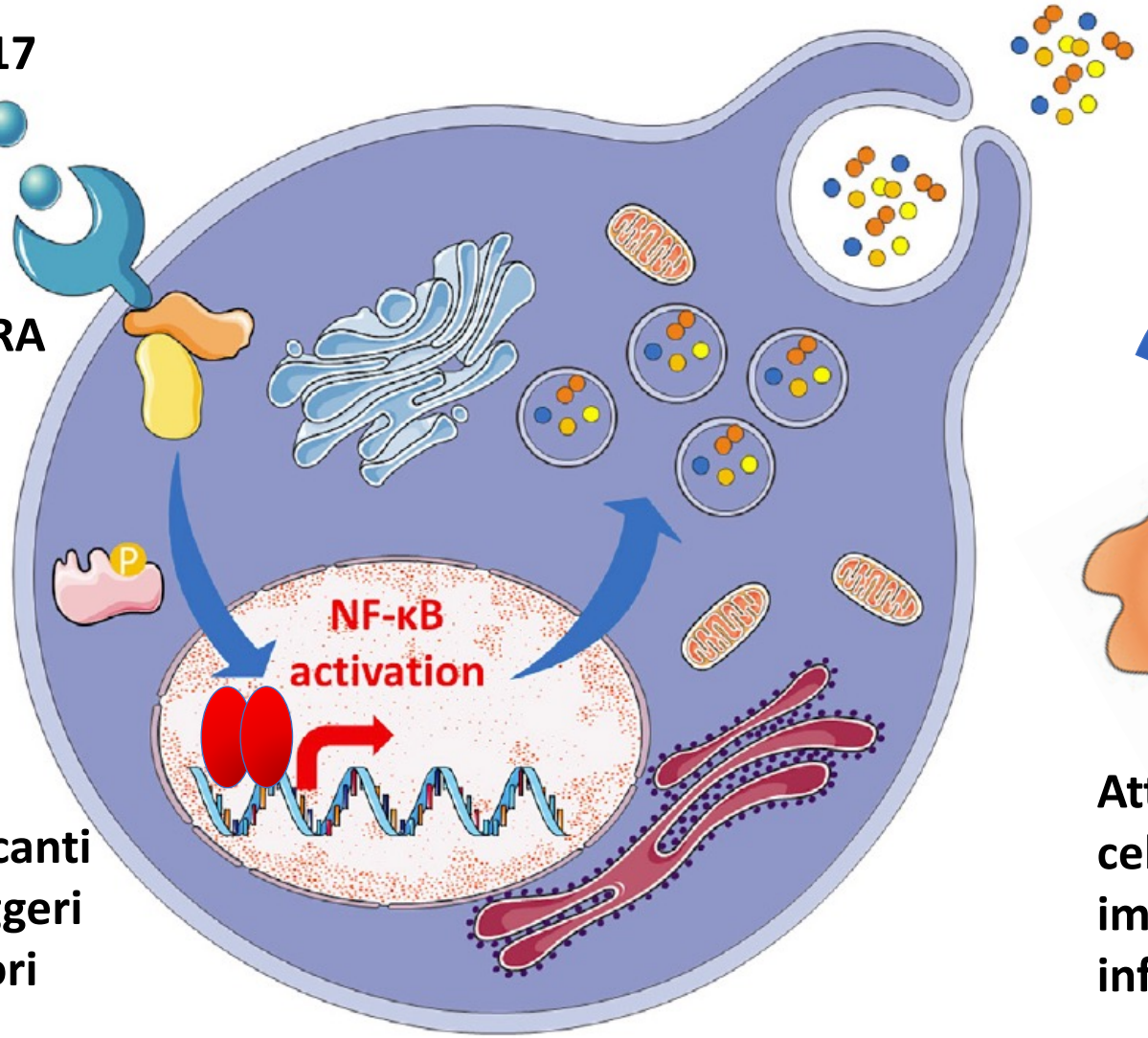
IL-17 RA è un recettore coinvolto nell'infiammazione

Secrezione di messaggeri infiammatori

IL-17

IL-17RA

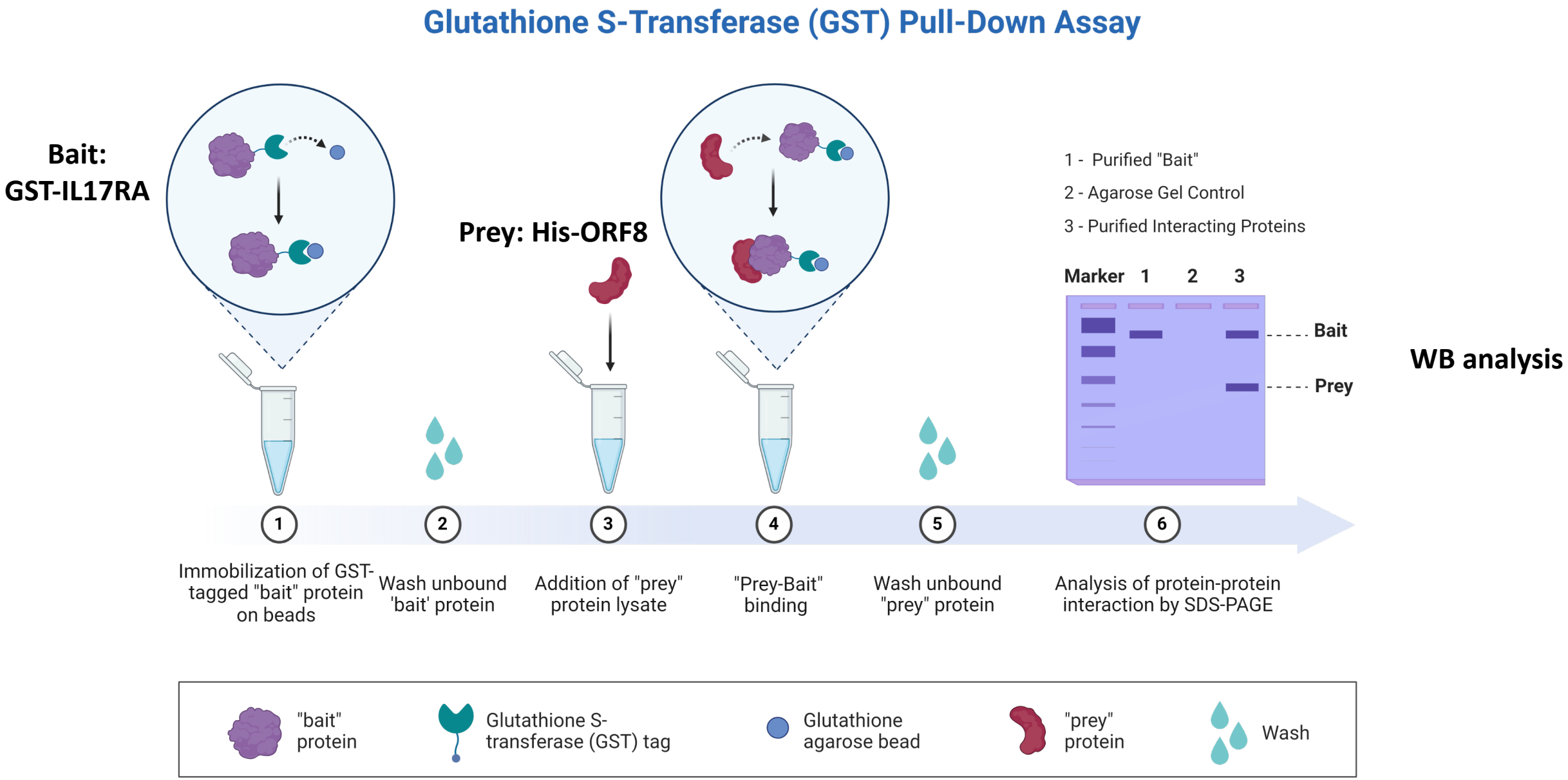
TNFα
IL-1
IL-6
IL-12



Geni codificanti per messaggeri infiammatori

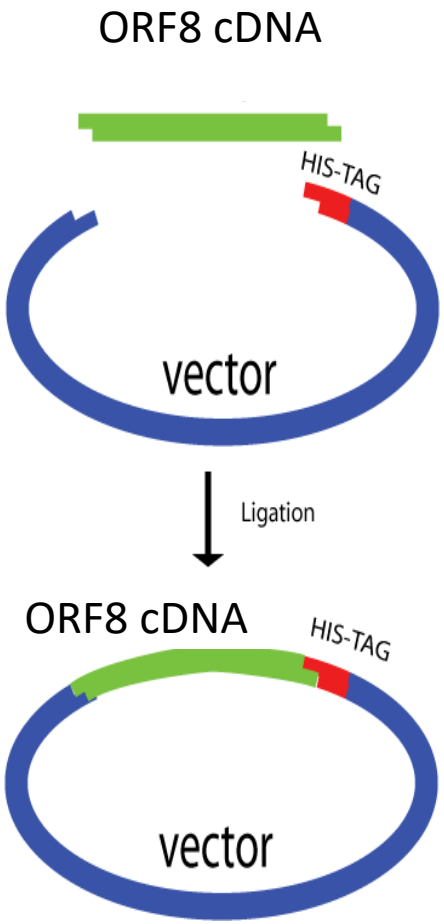
Attivazione di cellule immuni/ infiammatorie

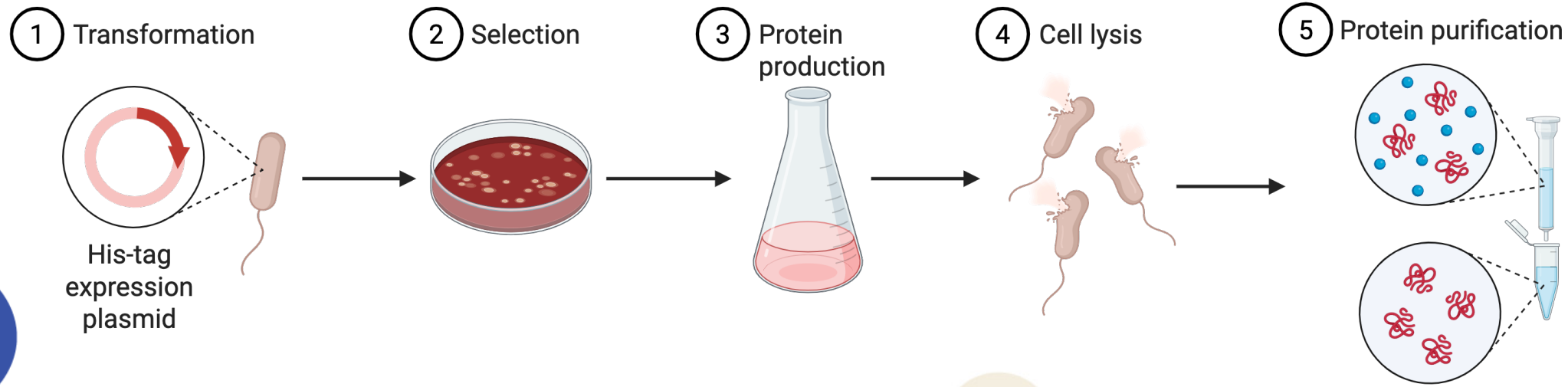
Validazione delle interazioni proteiche:

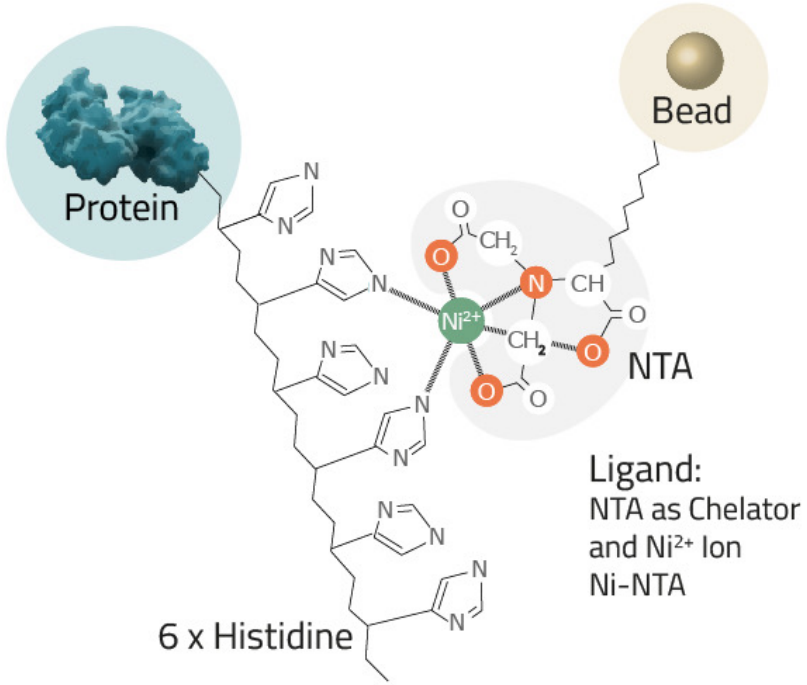


Produzione e purificazione della proteina ORF8-His

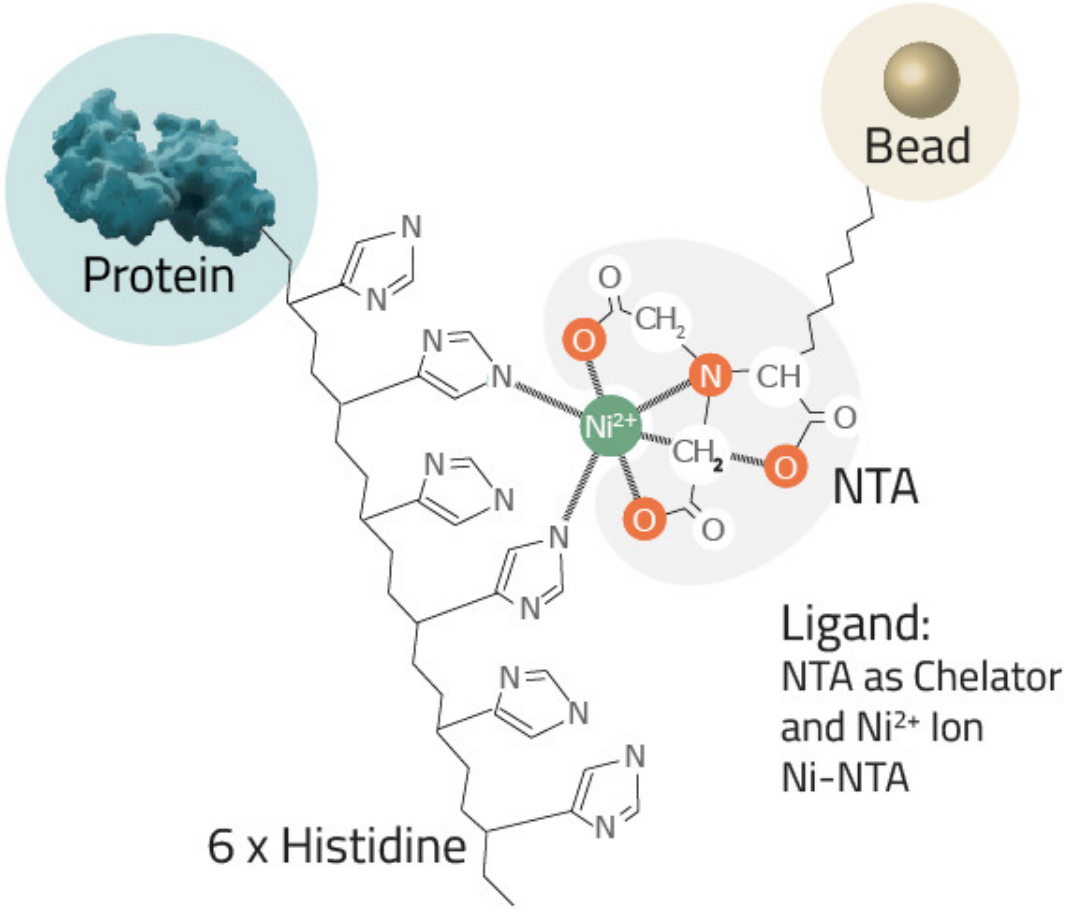
Clonaggio



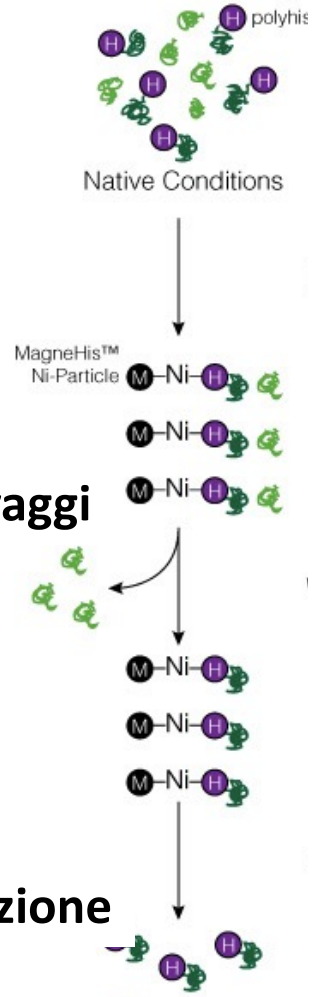




Produzione batterica e purificazione della proteina ORF8-His

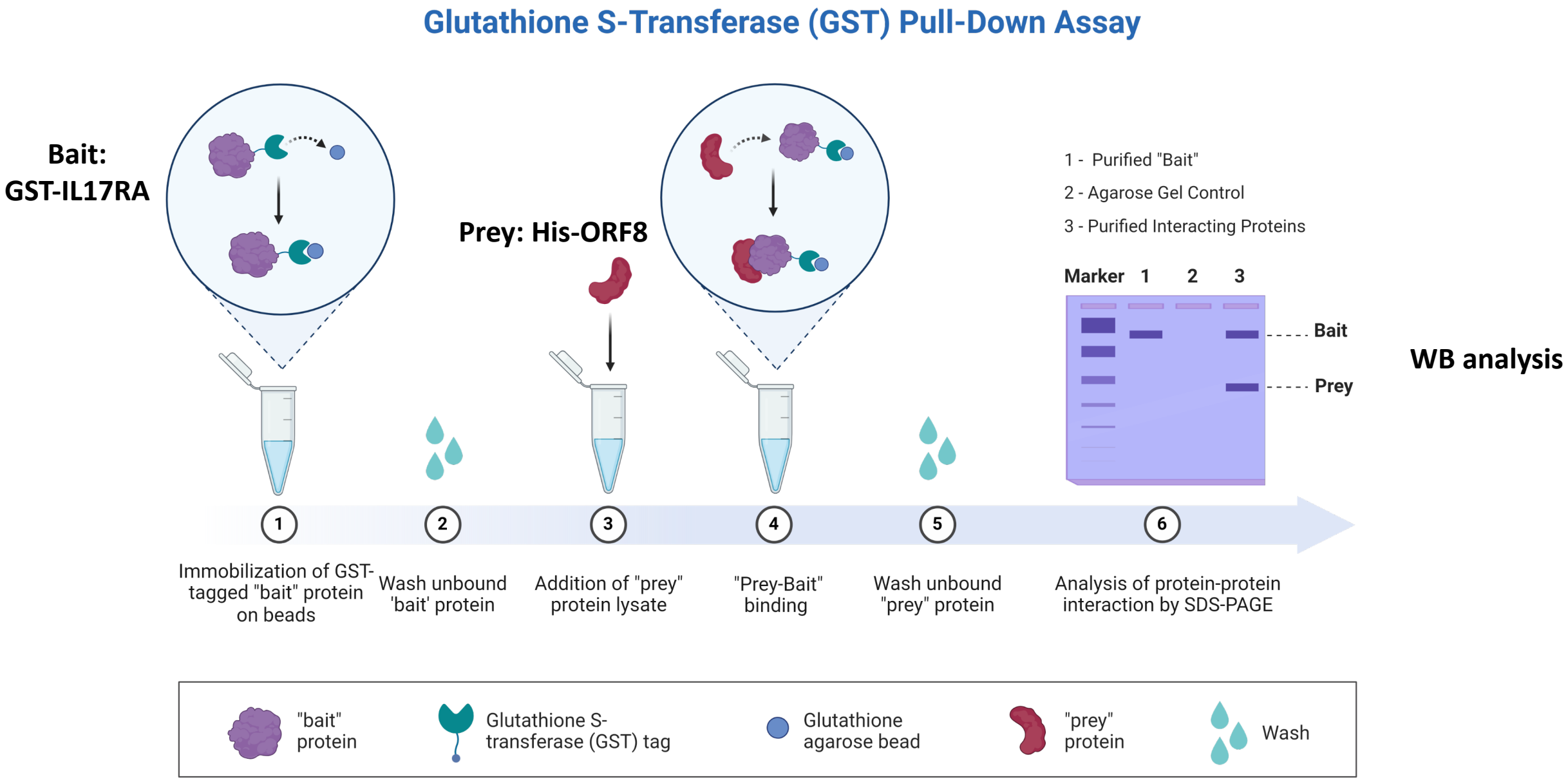


- **Legame alla resina**

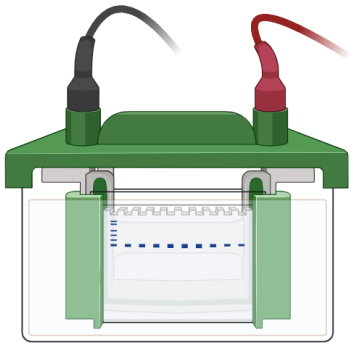


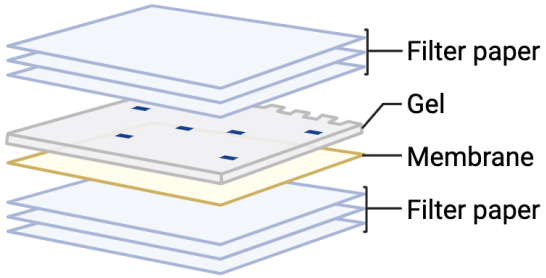
- **Lavaggi**
- **Eluizione**

Validazione delle interazioni proteiche:

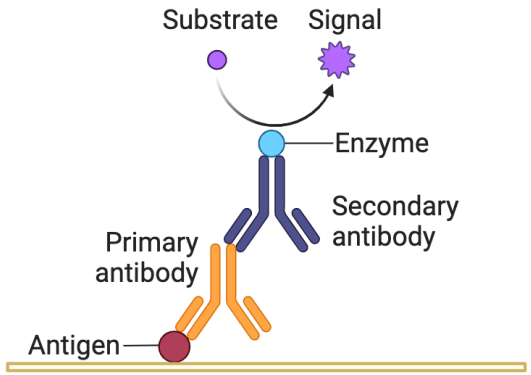


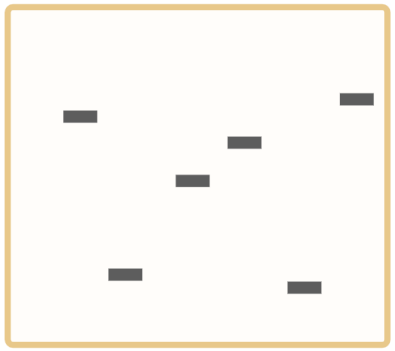
Western blotting (WB)





Tecnica che prevede il **riconoscimento mediante anticorpi specifici** di proteine previamente sottoposte ad **elettroforesi e trasferite su un supporto solido = MEMBRANA**



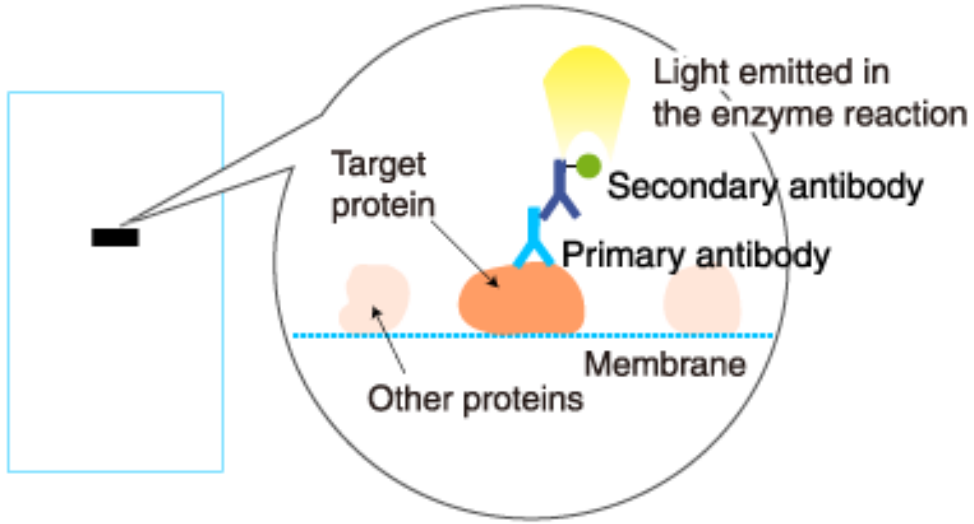


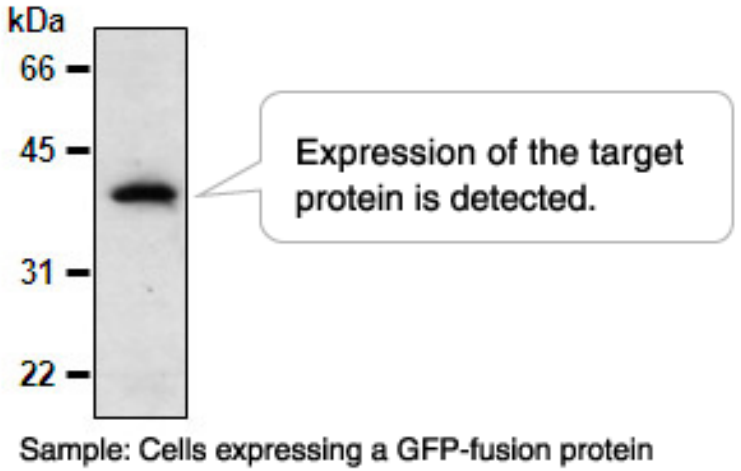
Permette di ottenere informazioni su:

- Massa molecolare
- Livelli di espressione
- Modificazioni post-traduzionali



Enzyme name	Chromogenic substrate	Chemiluminescence substrate
HRP (Horseradish peroxidase)	DAB and TMB	Luminol-based (ECL)
AP (Alkaline phosphatase)	BCIP/NBT and pPNPP	Dioxetane-based (CDP-star®)





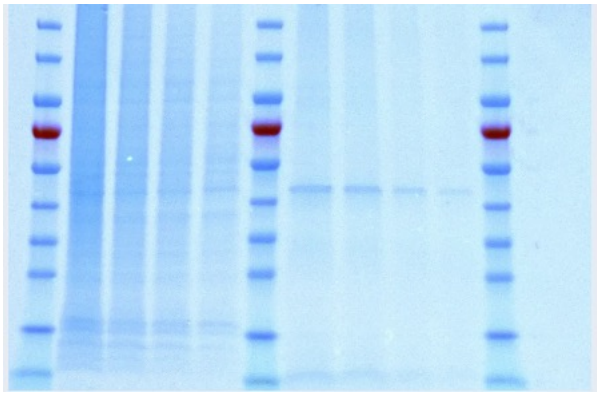
Sample: Cells expressing a GFP-fusion protein

RILEVAZIONE mediante IMAGER

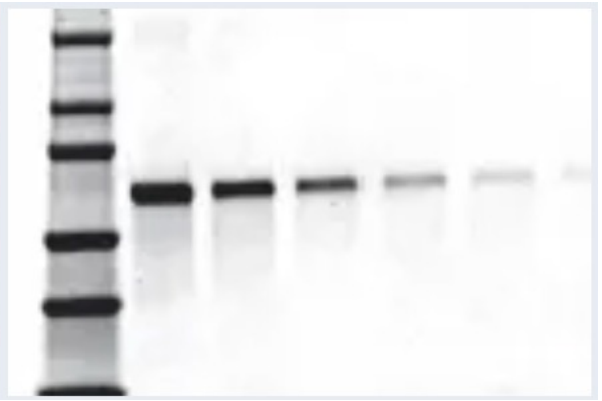
GEL IMAGER

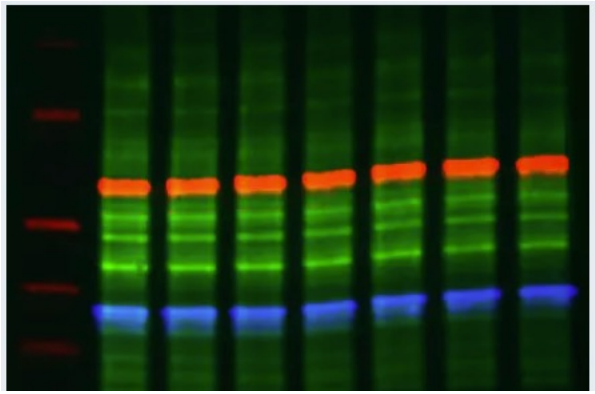


visibile

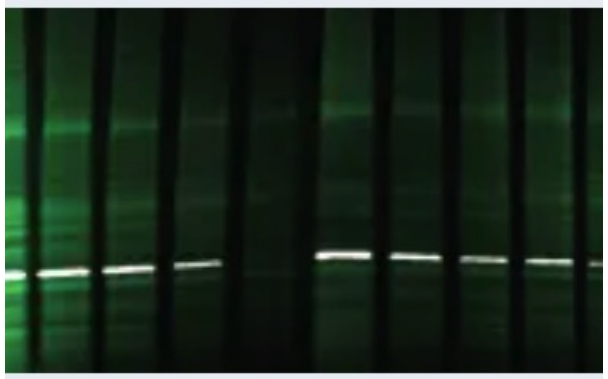


chemiluminescenza





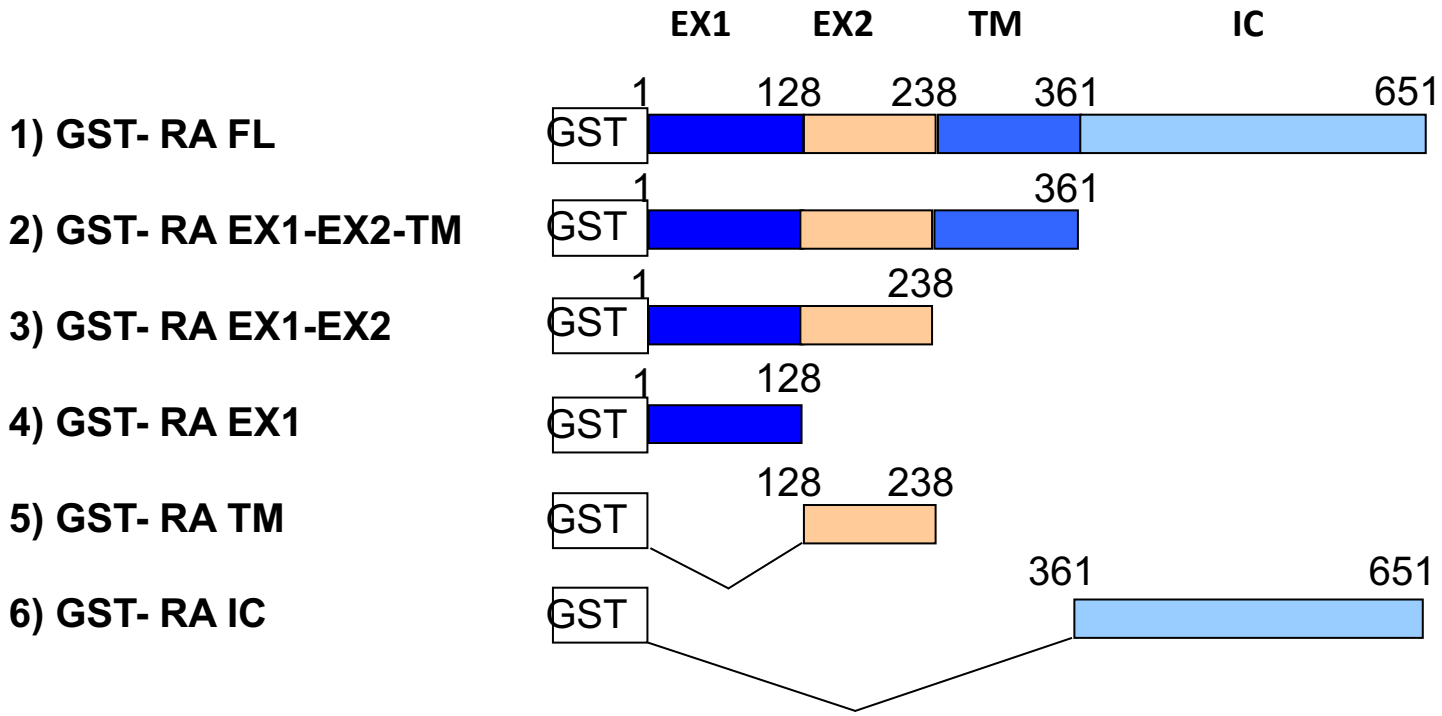
UV



fluorescenza

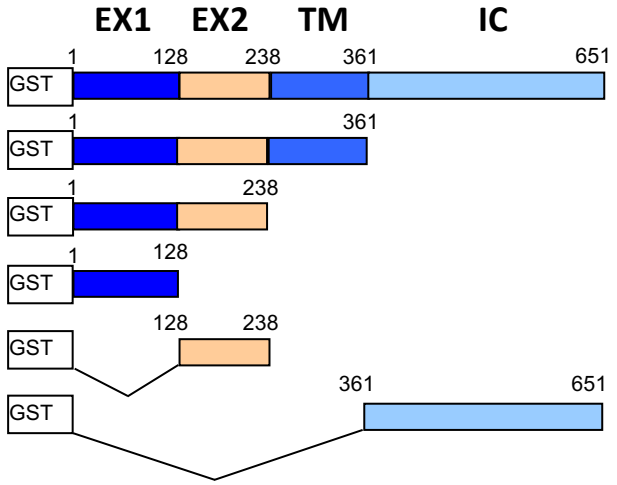
MAPPATURA DELLE INTERAZIONI

Mediante GST-PULLDOWN con PORZIONI (mutanti di delezione) della proteina GST-IL17RA e His-ORF8 prodotte in batteri

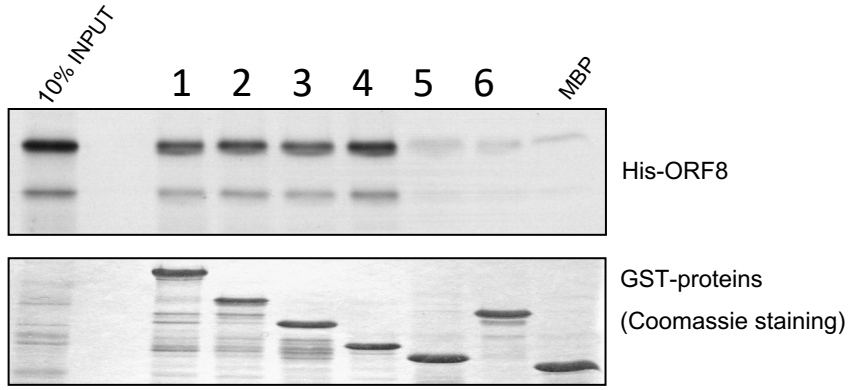


RISULTATO:
ORF8 lega la porzione extracellulare del recettore IL-17

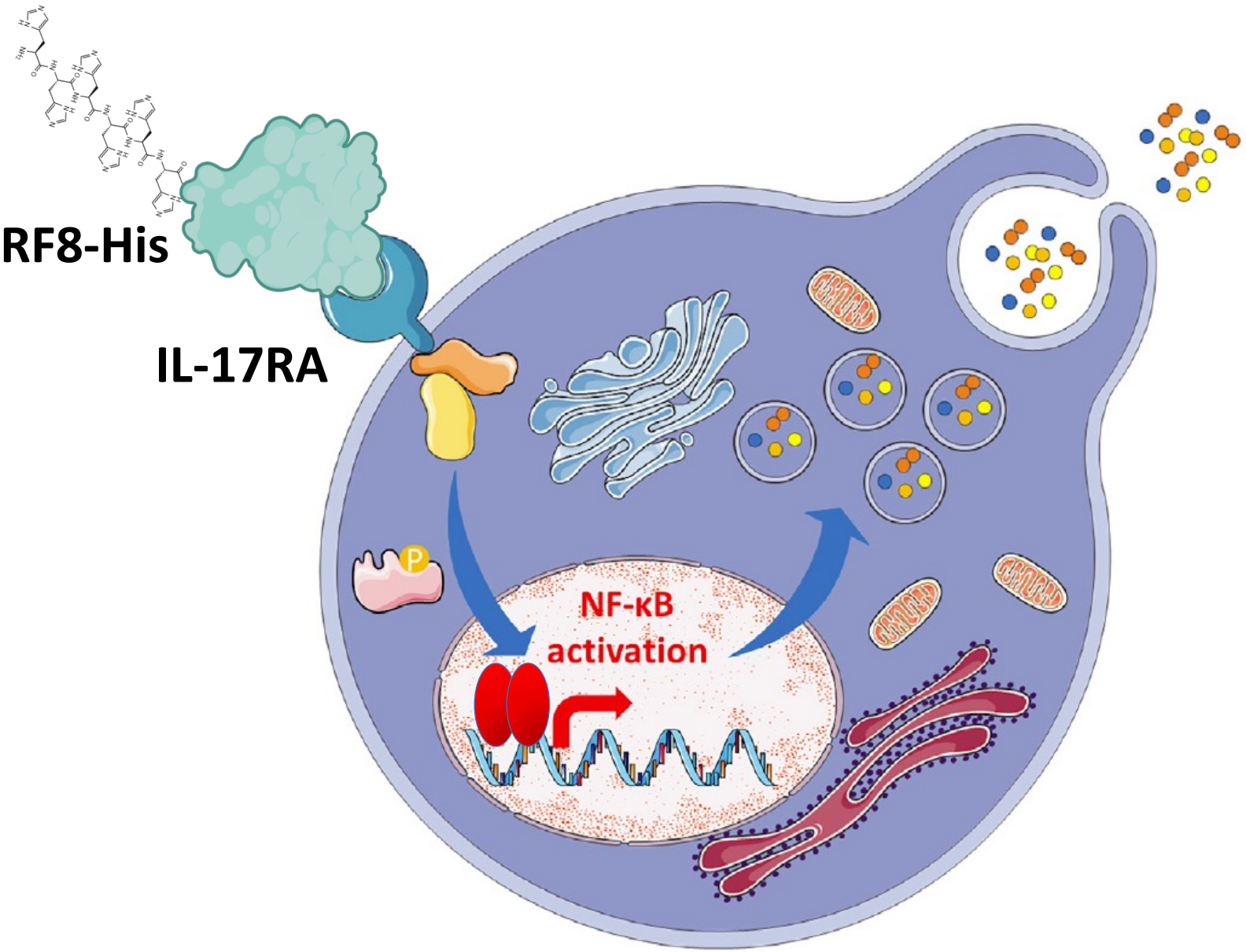
1) GST- RA FL
2) GST- RA EX1-EX2-TM
3) GST- RA EX1-EX2
4) GST- RA EX1
5) GST- RA TM
6) GST- RA IC



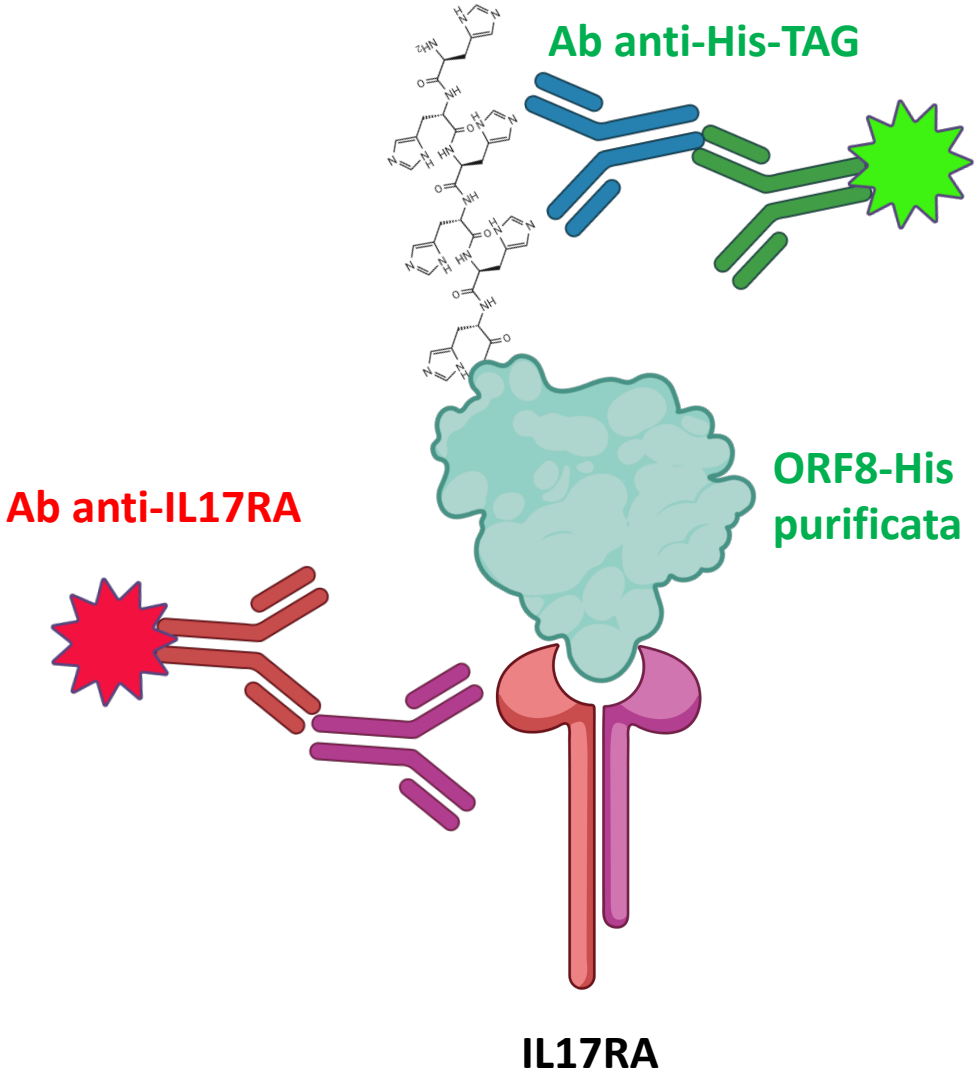
Pulldown of GST-RA deletion proteins with His-ORF8



ORF8-His lega la porzione extracellulare di IL-17 RA



VALIDAZIONE DELLE INTERAZIONI:
doppia immunofluorescenza e microscopia confocale

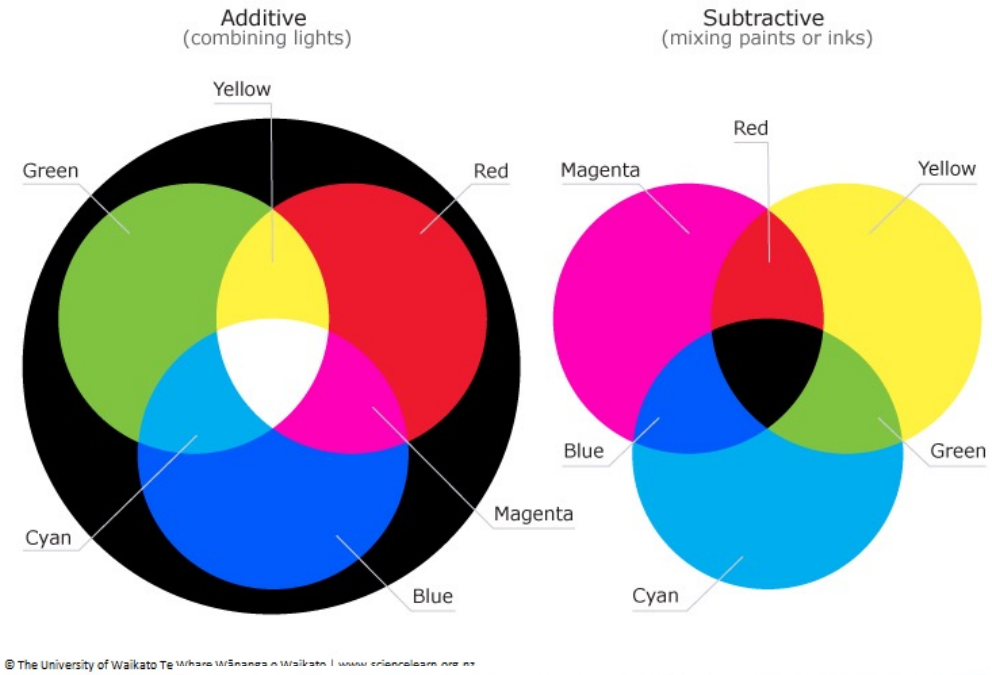


Aggiunta di proteina purificata ORF8-His
a una coltura di cellule epiteliali H1299 (polmone)
doppia IF con Ab1 anti-IL17RA e Ab2 anti-His TAG

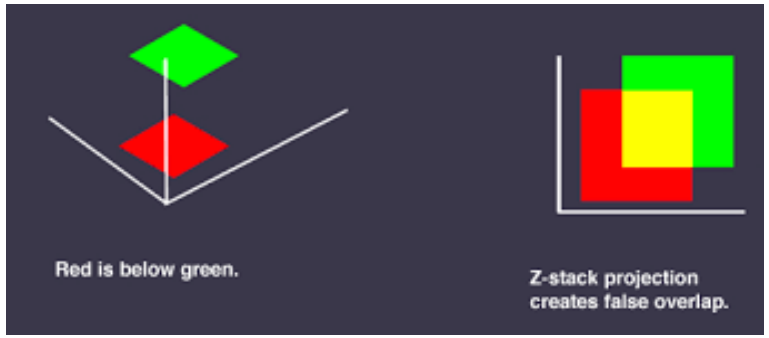




Analisi della colocalizzazione dei segnali nella cellula mediante microscopia confocale

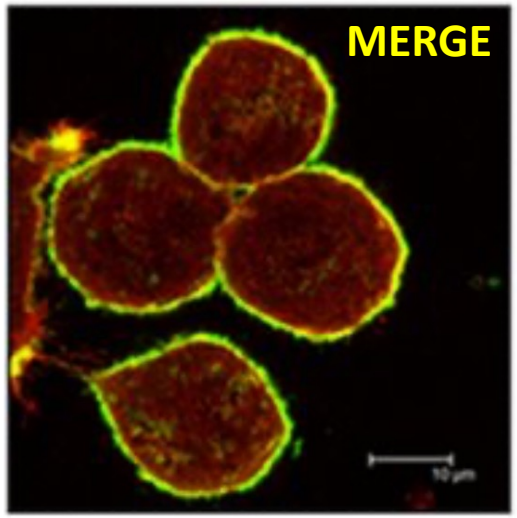


© The University of Waikato Te Whare Wānanga o Waikato | www.sciencelearn.org.nz





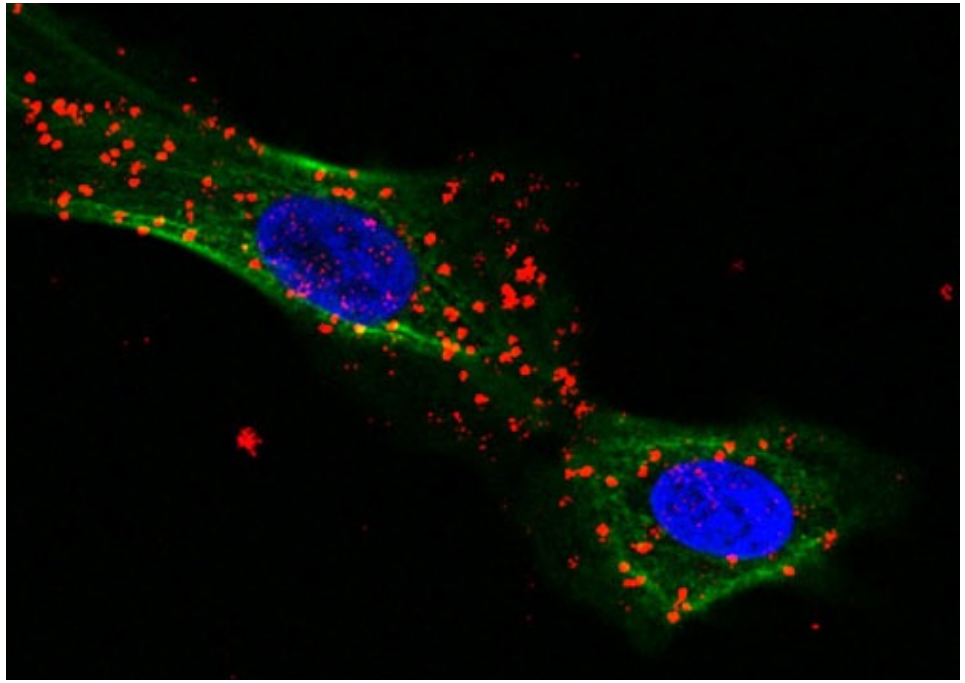




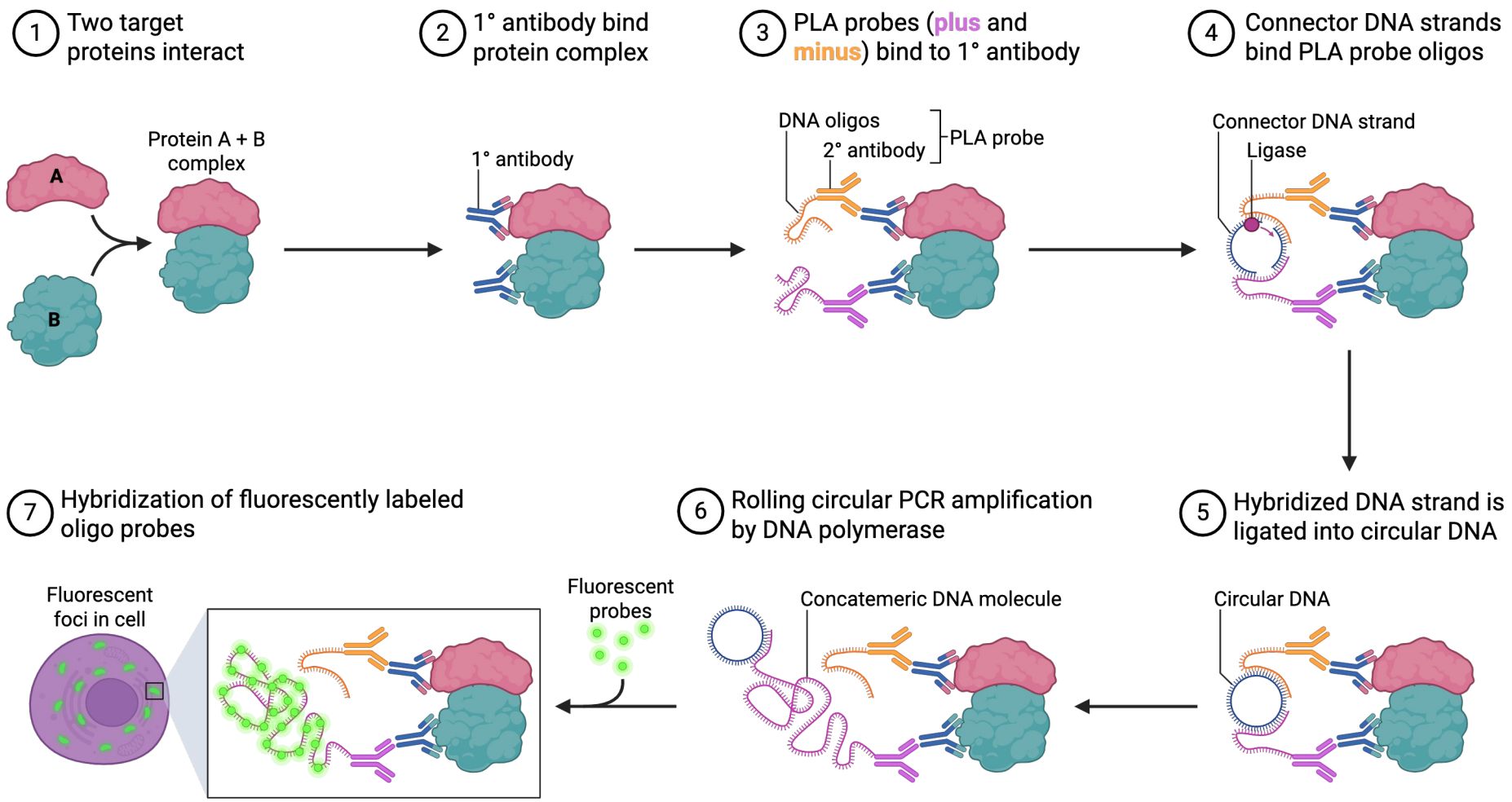
VALIDAZIONE DELLE INTERAZIONI

Analisi dell'interazione diretta proteina-proteina
IN SITU:

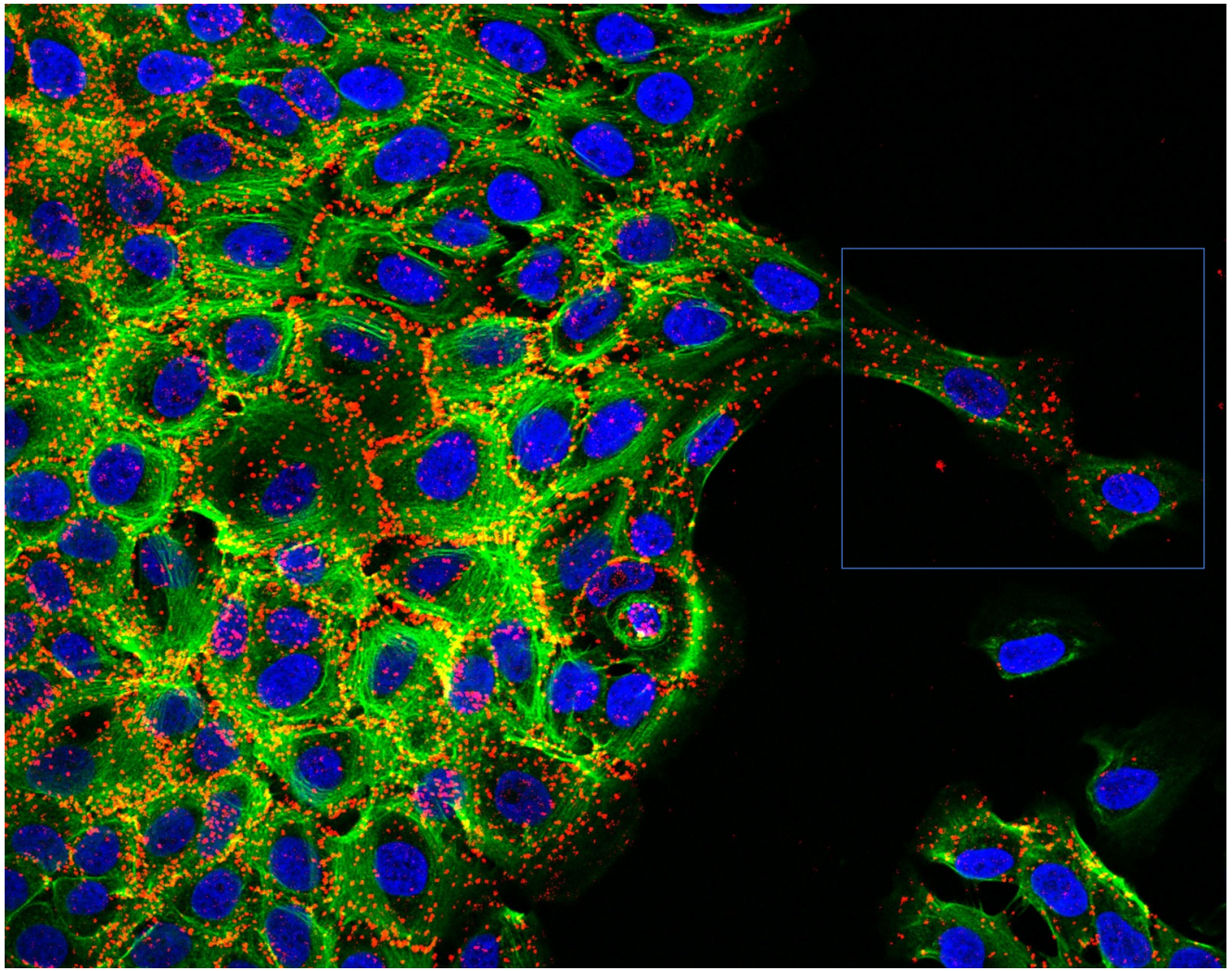
Proximity Ligation Assay PLA

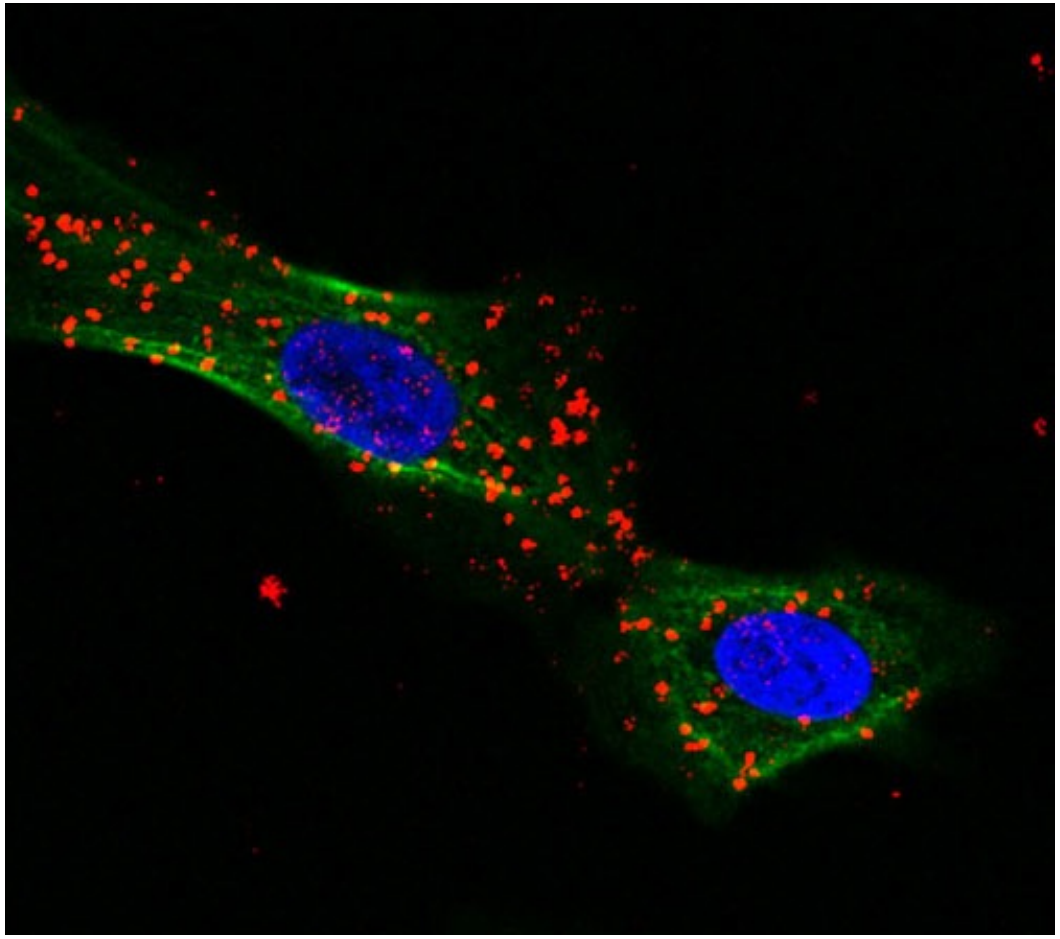


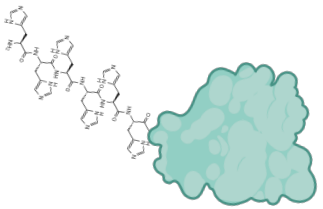
IN SITU Proximity Ligation Assay PLA

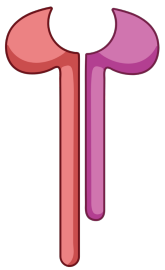


NB il saggio evidenzia la PROSSIMITA': le proteine devono essere distanti meno di 40 nm







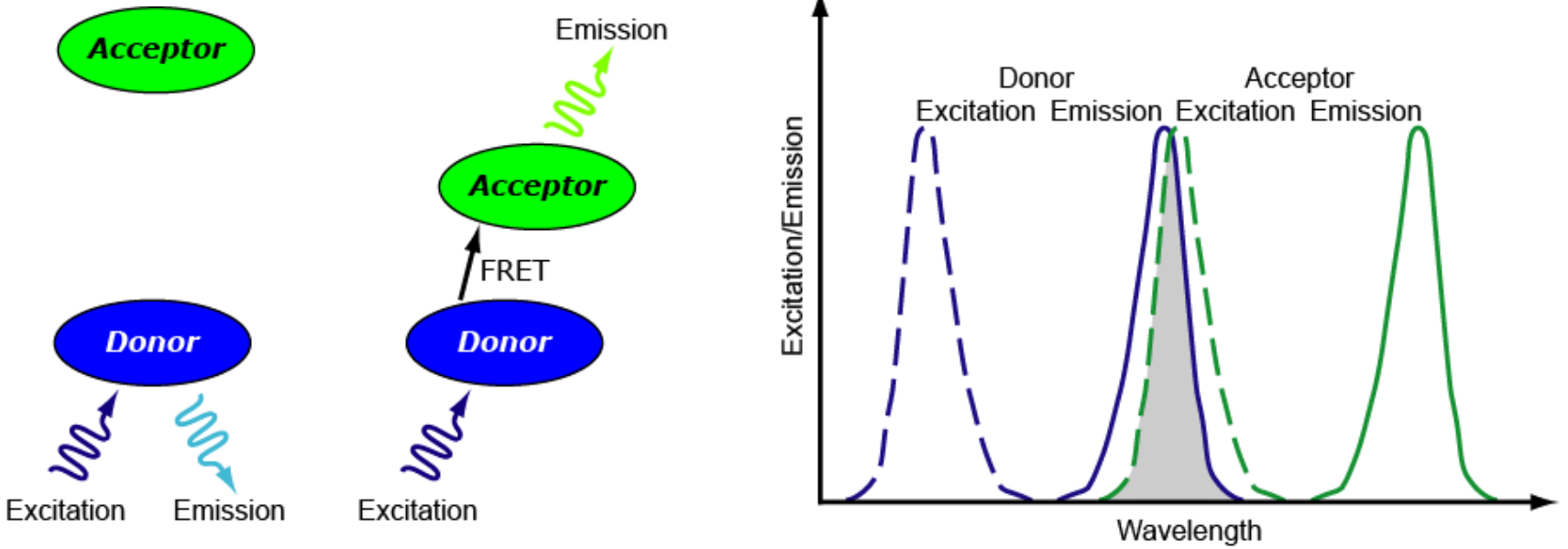


Red: PLA His-ORF8/IL17RA
Green: Phalloidin to mark actin filaments
Blue: nuclei (DAPI)

VALIDAZIONE DELLE INTERAZIONI

Analisi dell'interazione proteina-proteina IN SITU mediante FRET
Fluorescence (Förster) Resonance Energy Transfer

Förster Resonance Energy Transfer



Emission (donor) and excitation (acceptor) spectra must significantly overlap

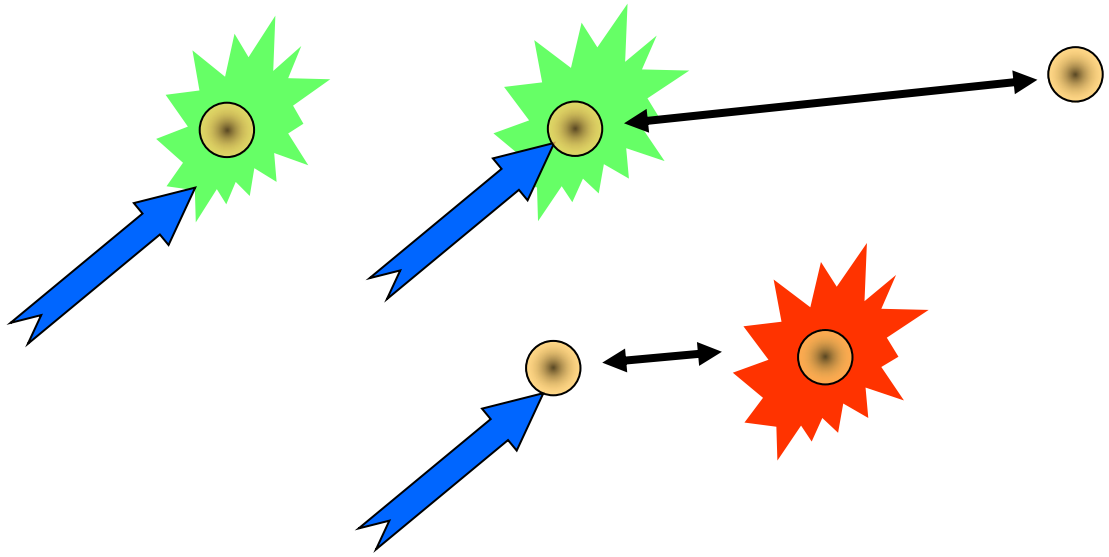
Es. CFP/YFP

Cy3/Cy5

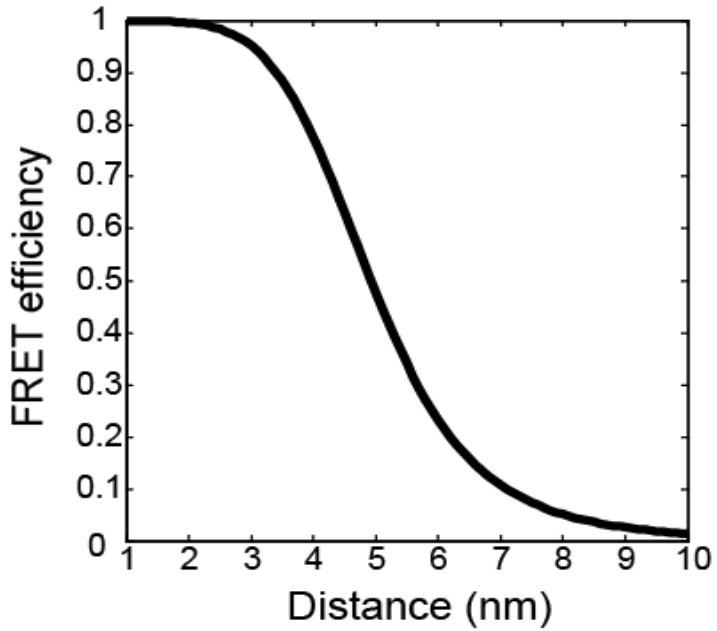
La FRET è efficiente su piccole distanze

Isolated donor

Donor distance too great



Donor distance correct

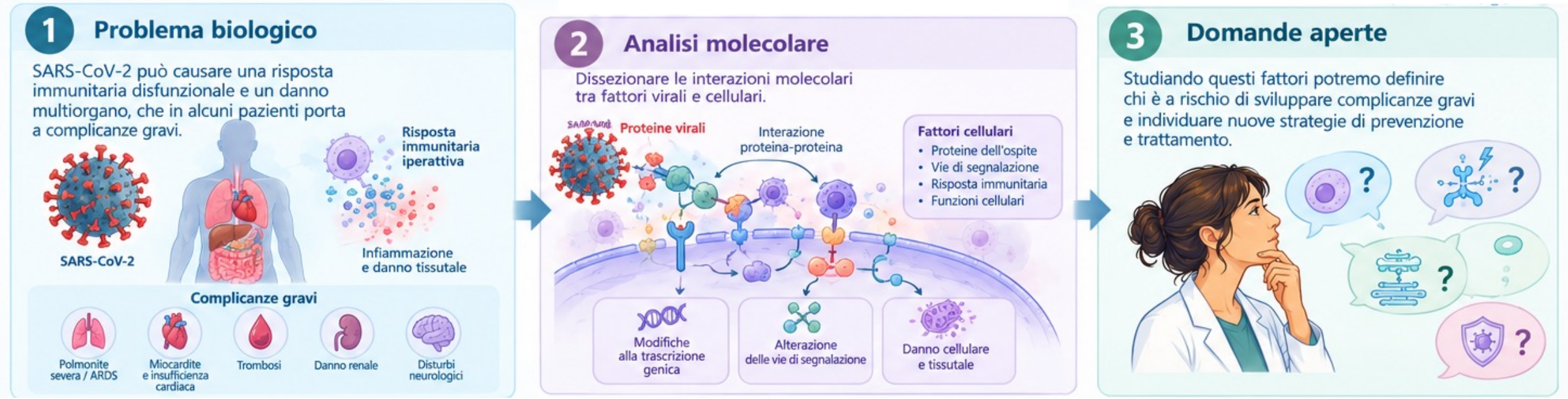


For CFP-YFP,
50% transfer at R_0 = 4.9 nm

È efficiente per distanze inferiori a 10 nm
minore del limite di risoluzione del microscopio a fluorescenza!

FORMULAZIONE dell'IPOTESI DI LAVORO

La patologia COVID severa è causata da una risposta infiammatoria forte/cronica scatenata dall'interazione tra fattori virali e cellulari



OBIETTIVO Identificare fattori virali e meccanismi cellulari implicati nell'induzione dell'infiammazione cronica

APPROCCIO SPERIMENTALE Analizzare interazioni molecolari tra fattori virali e component/meccanismi cellulari

DATI PRELIMINARI

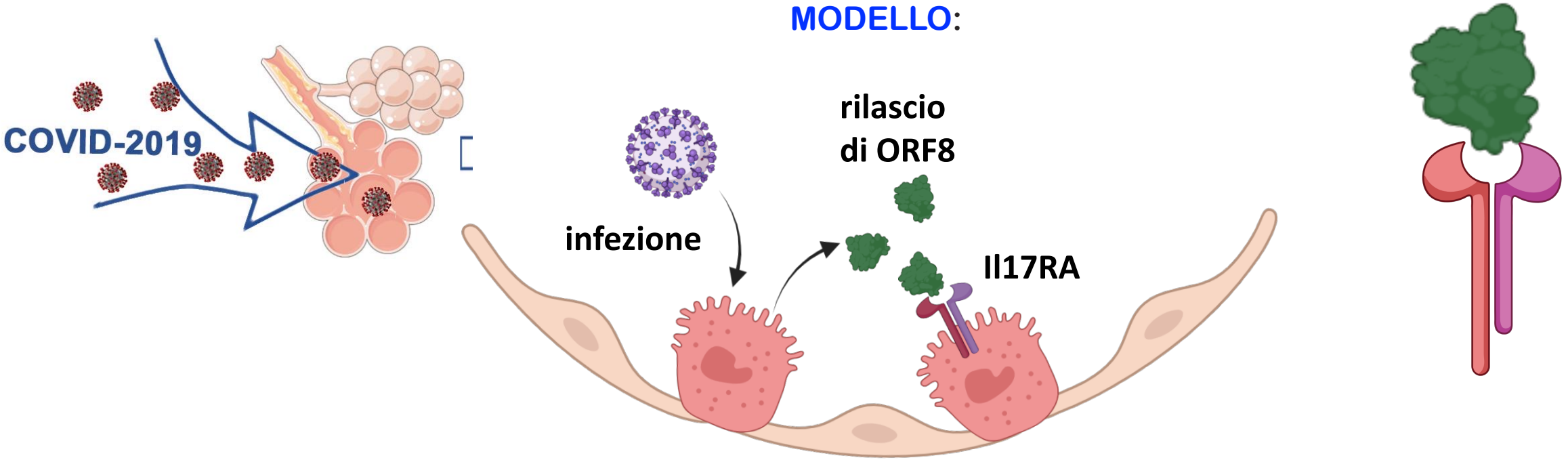
ESPERIMENTO:

analisi dell'interattoma delle proteine virali in un modello cellulare epiteliale.

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

MODELLO:



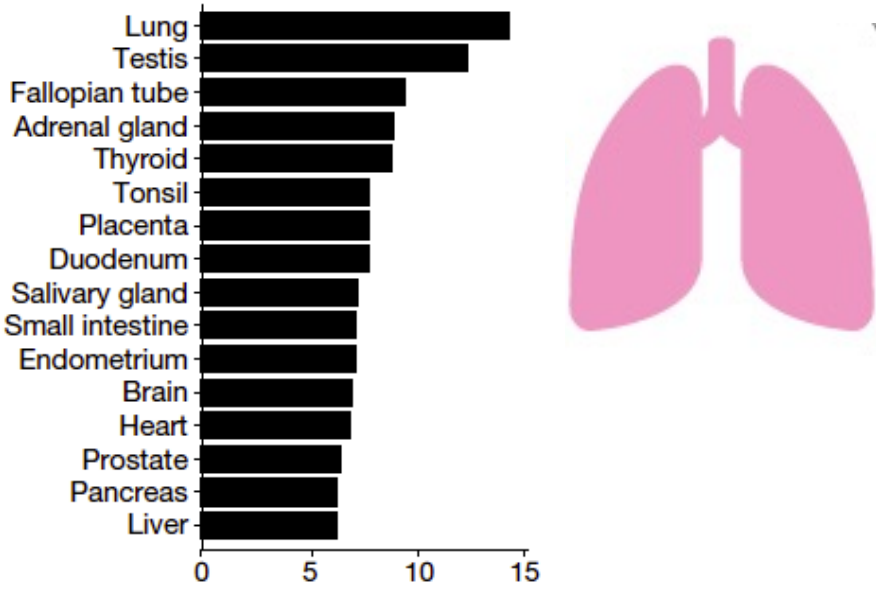
ORF8 come citochina virale

- ORF8 è presente nell'ambiente extracellulare e nel siero dei pazienti di CoVID19
- I livelli plasmatici di ORF8 correlano con un decorso più grave della patologia.

SARS-CoV-2 ORF8 is a viral cytokine regulating immune responses
Int Immunol
. 2023 Jan 21;35(1):43-52.
doi: 10.1093/intimm/dxac044.

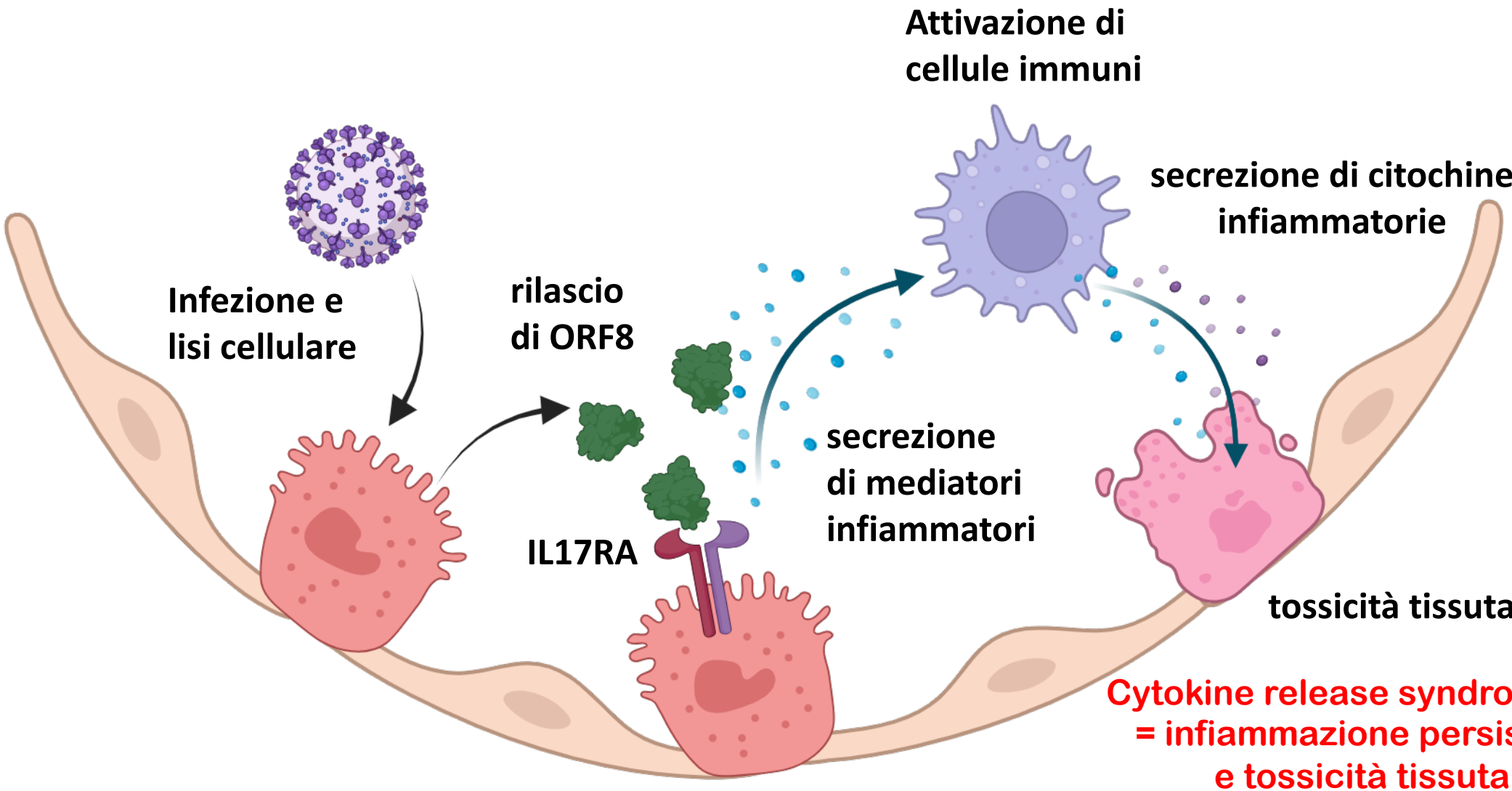
IL-17 RA è espresso nel polmone

Analisi dell'espressione di IL-17 RA (mRNA e proteina) in diversi tessuti



È quindi plausibile che l'interazione ORF8-IL17RA sia implicata nell'infiammazione indotta da SARS-COV2

IPOTESI di lavoro:
ORF8 extracellulare attiva il recettore IL-17RA delle cellule epiteliali e innesca una risposta infiammatoria che causa dannno tissutale



Cytokine release syndrome CRS
= infiammazione persistente
e tossicità tissutale