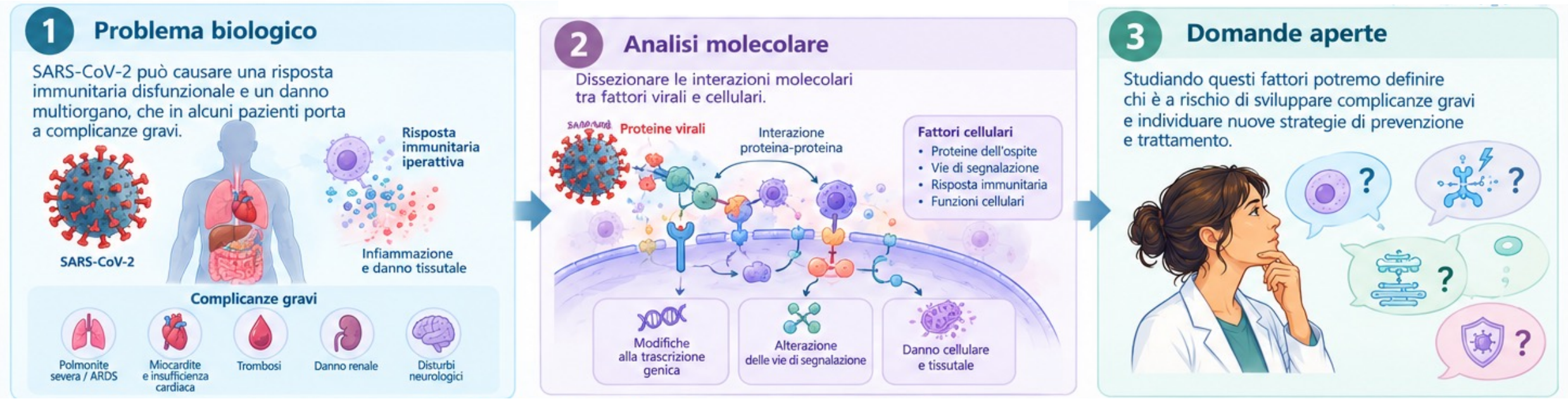
CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche

Corso di Biotecnologie Cellulari 2026-27

Lezione 8

Realizzazione di un progetto sperimentale

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

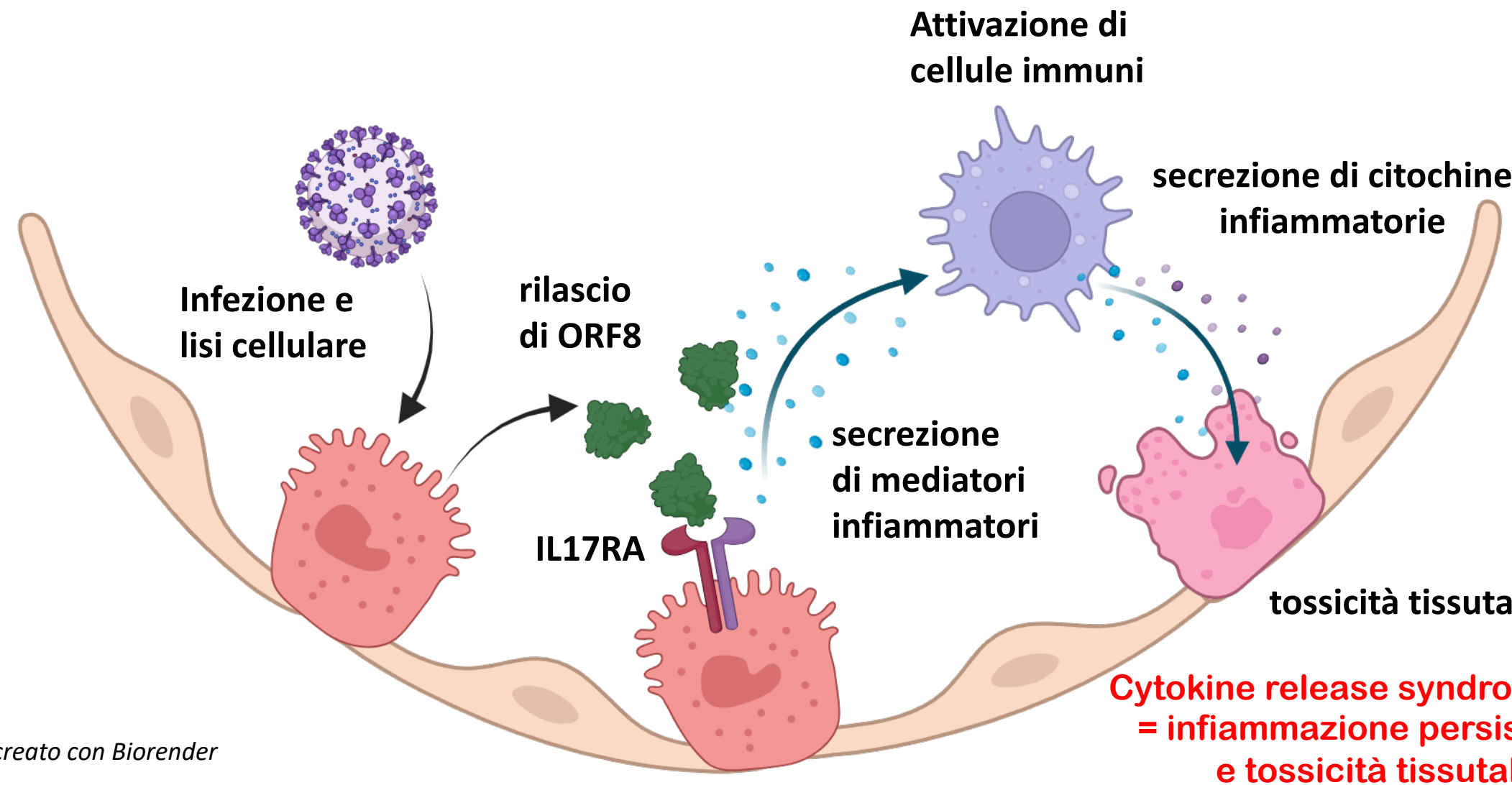


Infografica generata con ChatGPT

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

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



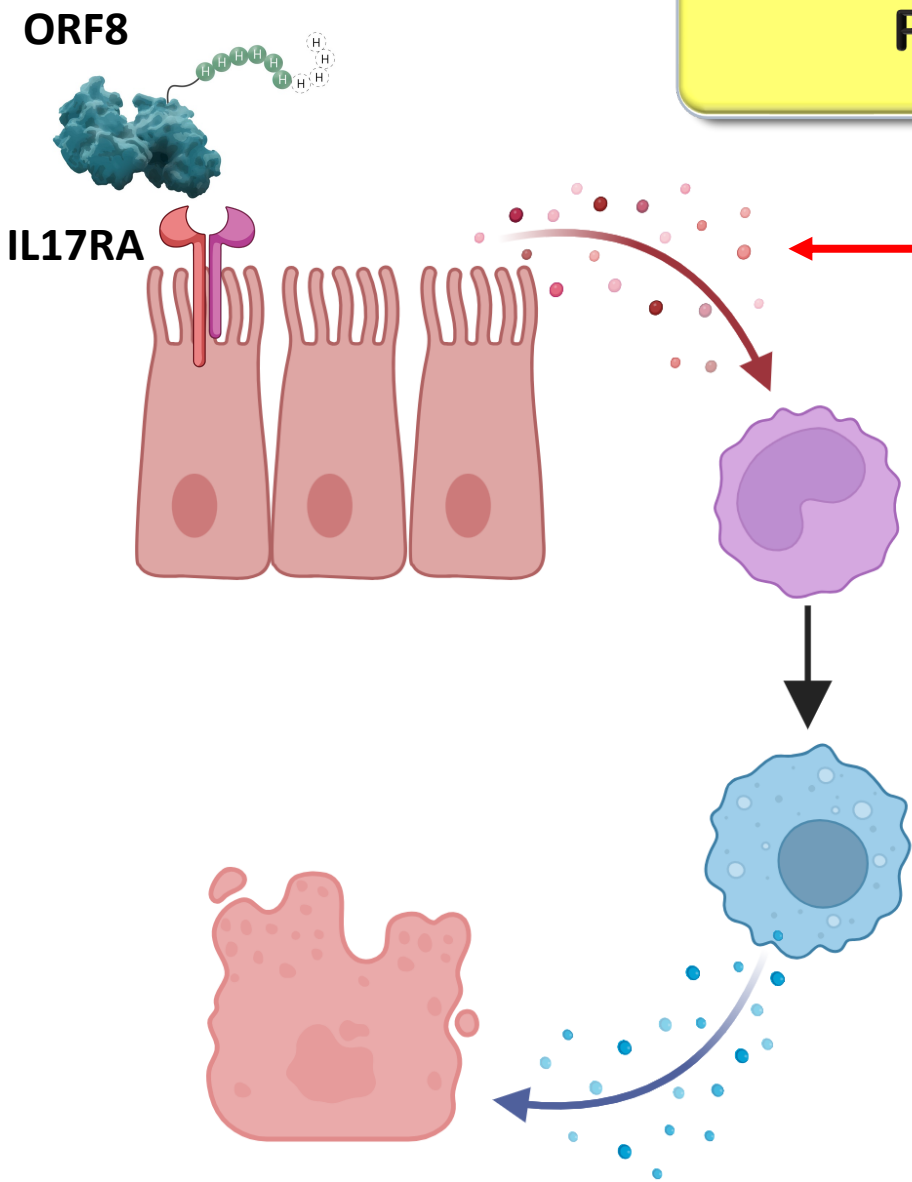
Schema creato con Biorender

Cytokine release syndrome CRS
= infiammazione persistente
e tossicità tissutale

SCOPO del PROGETTO:

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



Esperimento preliminare:
Analisi della capacità di ORF8 di indurre la produzione e secrezione di **mediatori infiammatori** da parte di cellule del polmone mediante legame a 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**

Schema creato con Biorender

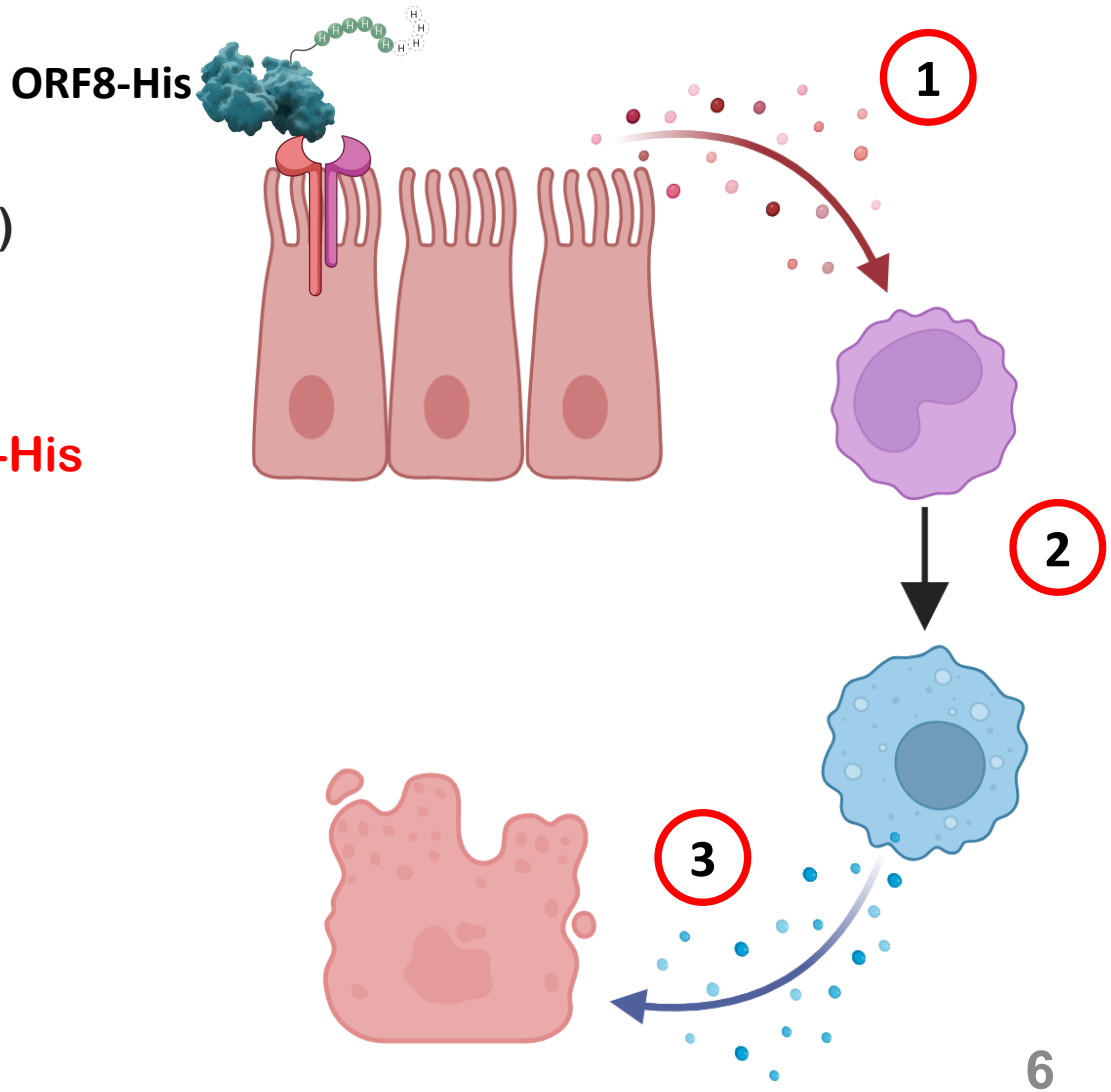
STRATEGIA SPERIMENTALE

a) **Scelta dei modelli cellulari**

- Cellule **epiteliali-** origine polmone = H1299 (linea cellulare derivata da carcinoma polmonare umano)
- Cellule **immuni** –THP1 (linea cellulare di monociti)
- **Trattamento** di cellule epiteliali **con proteina ORF8-His purificata**

c) Analisi degli eventi a valle

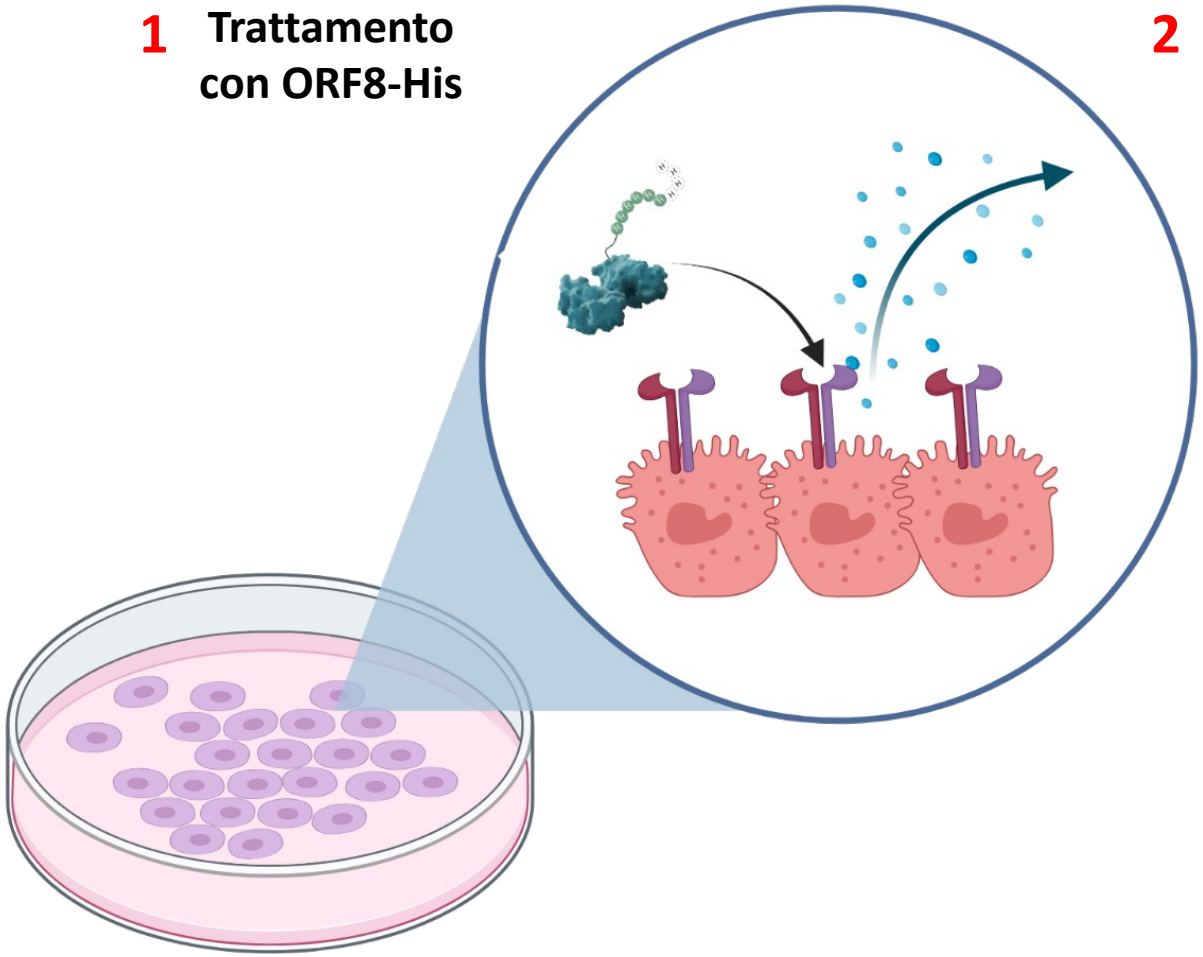
1. **secrezione** di citochine infiammatorie
2. **attivazione di cellule immuni (monociti)**
3. **Riduzione della vitalità di cellule epiteliali**



Schema creato con Biorender

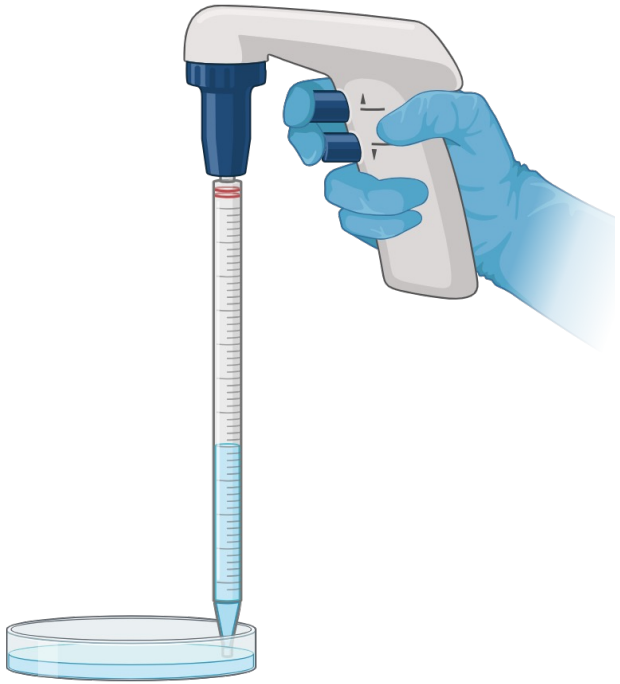
Esperimento preliminare (eseguito dai docenti)

1 **Trattamento con ORF8-His**



CELLULE H1299
(linea cellulare epiteliale - polmone)

2 **Prelevare il terreno condizionato da cellule trattate con ORF8-His**

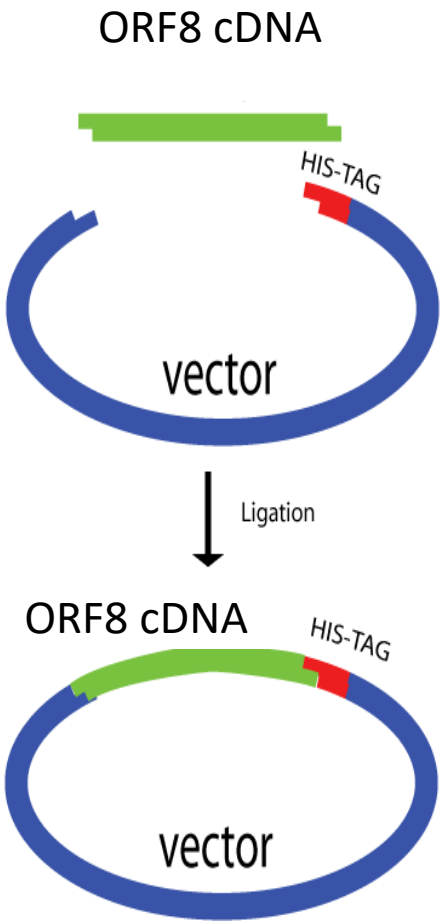


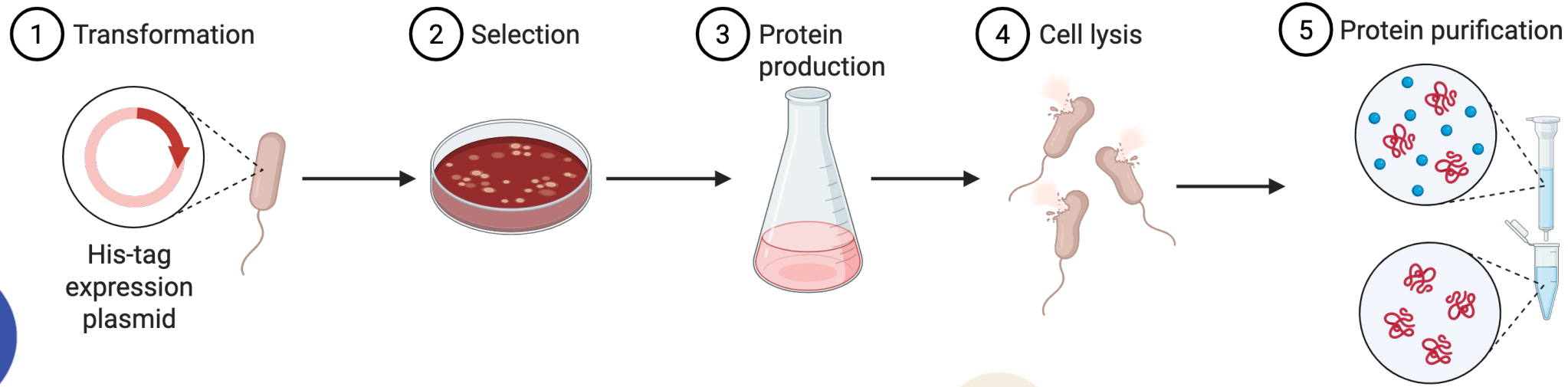
3 **Analizzare la presenza di citochine/chemochine secrete nel terreno**

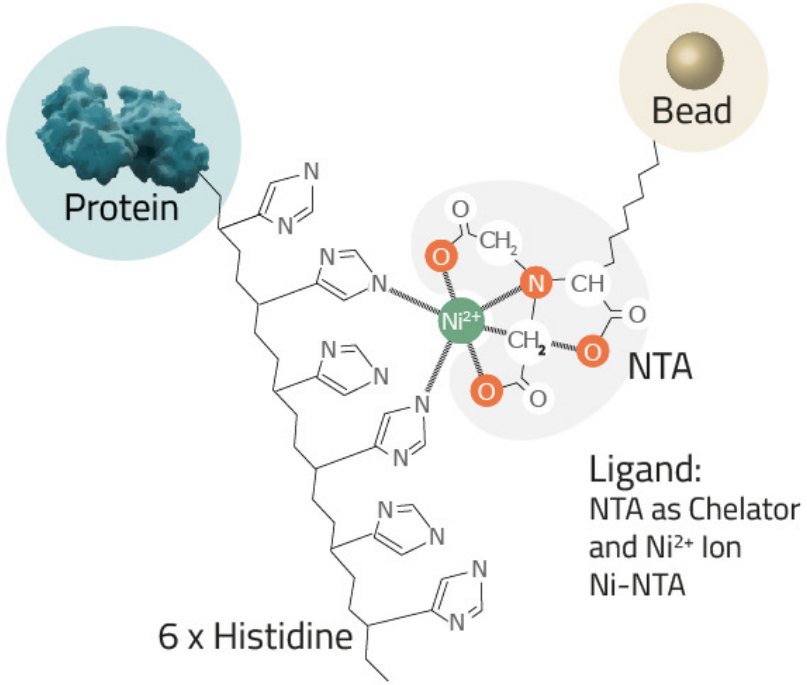
Schema creato con Biorender

Produzione e purificazione della proteina ORF8-His

Clonaggio

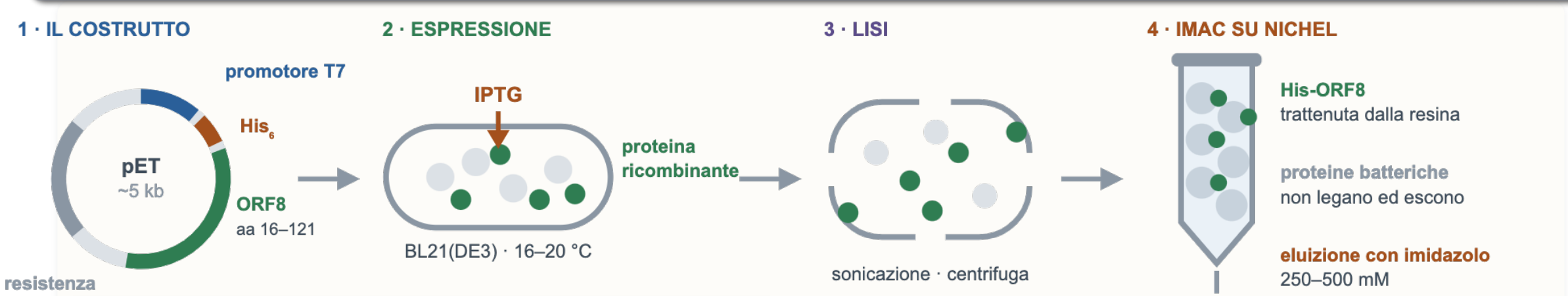




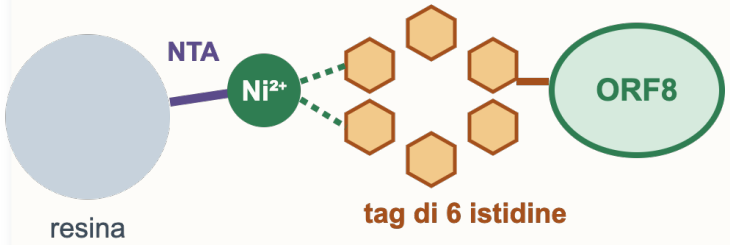


Schema creato con Biorender

Collegamento con Lab Biol Mol: produzione e purificazione della proteina ORF8-His in batteri

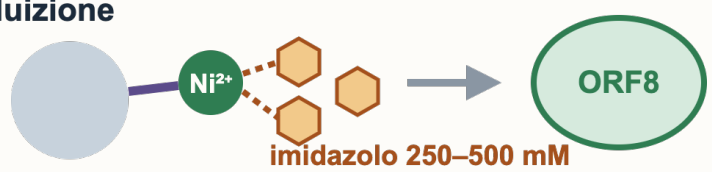


Legame



gli anelli imidazolici delle istidine occupano le posizioni di coordinazione libere dello ione nichel

Eluizione



l'imidazolo in eccesso prende il posto delle istidine: **la proteina esce pura**

Il promotore T7

È riconosciuto solo dalla RNA polimerasi del fago T7, che BL21(DE3) produce dopo l'aggiunta di IPTG: l'espressione resta spenta finché non la si accende.

Senza peptide segnale

Nel virus i primi 15 amminoacidi indirizzano ORF8 al reticolo endoplasmatico. Nel batterio non servono: si clona il frammento 16–121.

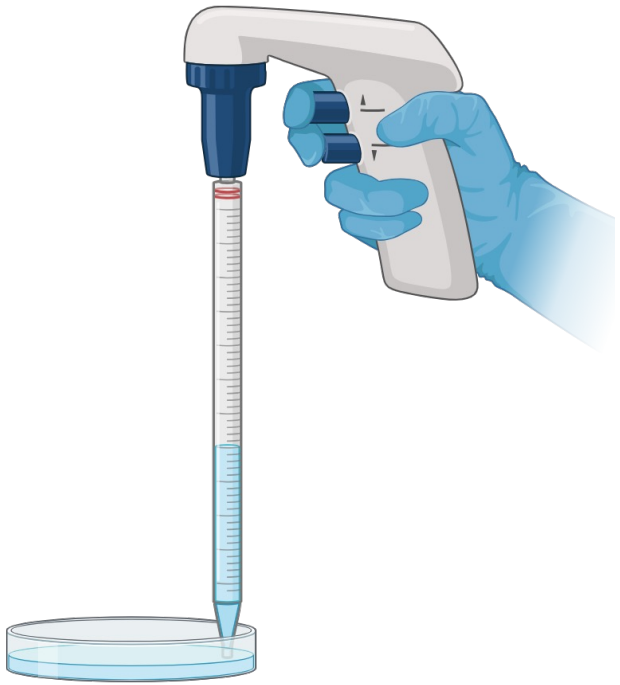
Il tag si può togliere

Tra tag e proteina si mette un sito per la proteasi TEV: dopo il taglio si ripassa sul nichel e la proteina esce libera nel flow-through.

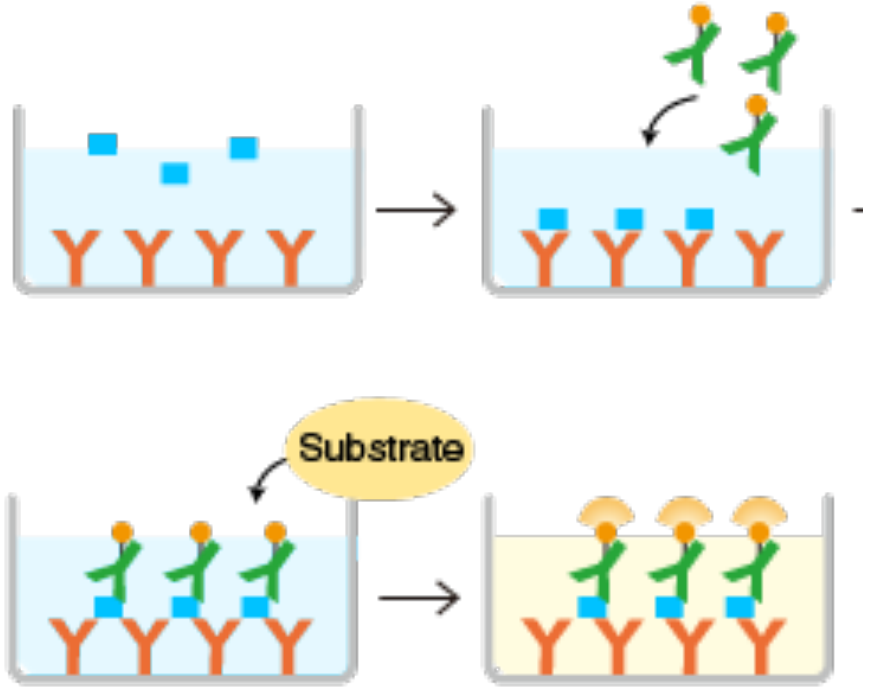
Il limite: nel virus ORF8 è una **glicoproteina**, ma *E. coli* non glicosila. Se si sospetta che lo zucchero conti, la proteina va prodotta in cellule di insetto o di mammifero.

Esperimento preliminare (docente)
Dosaggio delle citochine secrete in risposta al trattamento con ORF8

Terreno condizionato da cellule trattate con ORF8-His



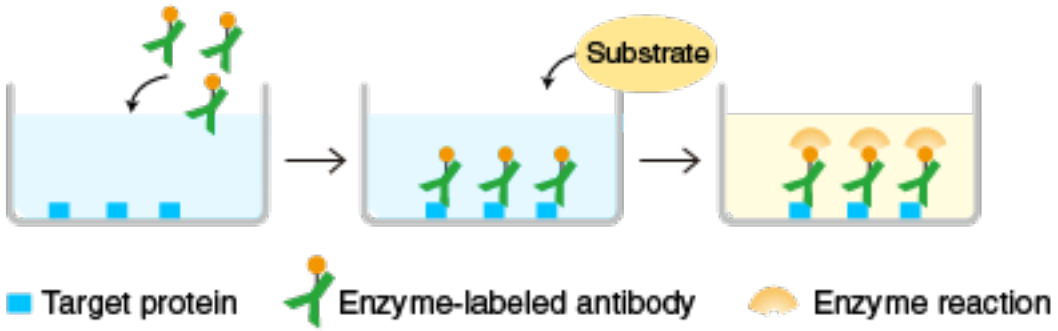
Dosaggio di citochine nel terreno mediante SANDWICH ELISA

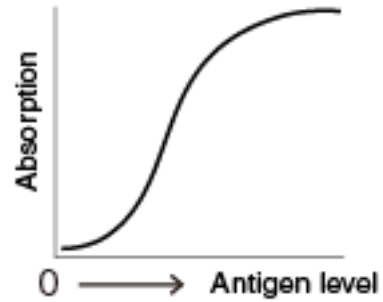


Schema creato con Biorender

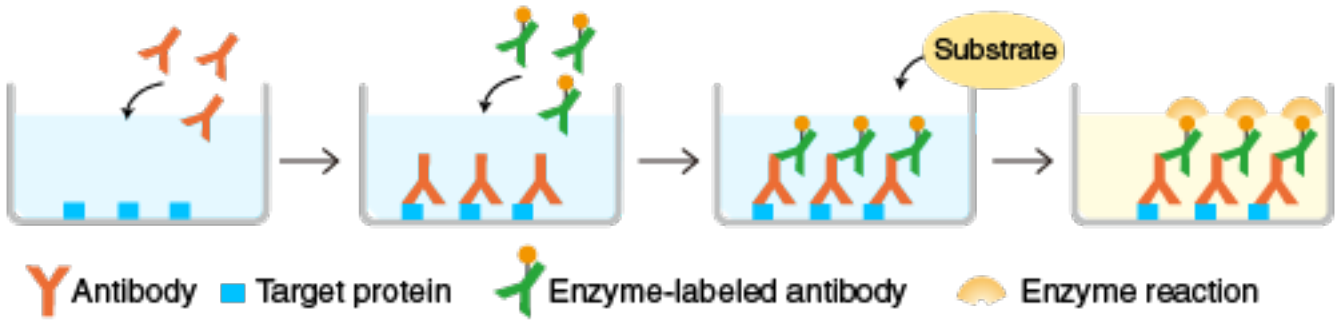
Rilevazione/DOSAGGIO di antigeni in fase liquida mediante ELISA Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

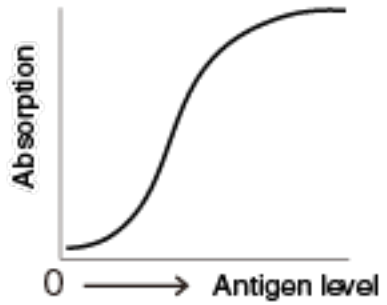
DIRECT ELISA



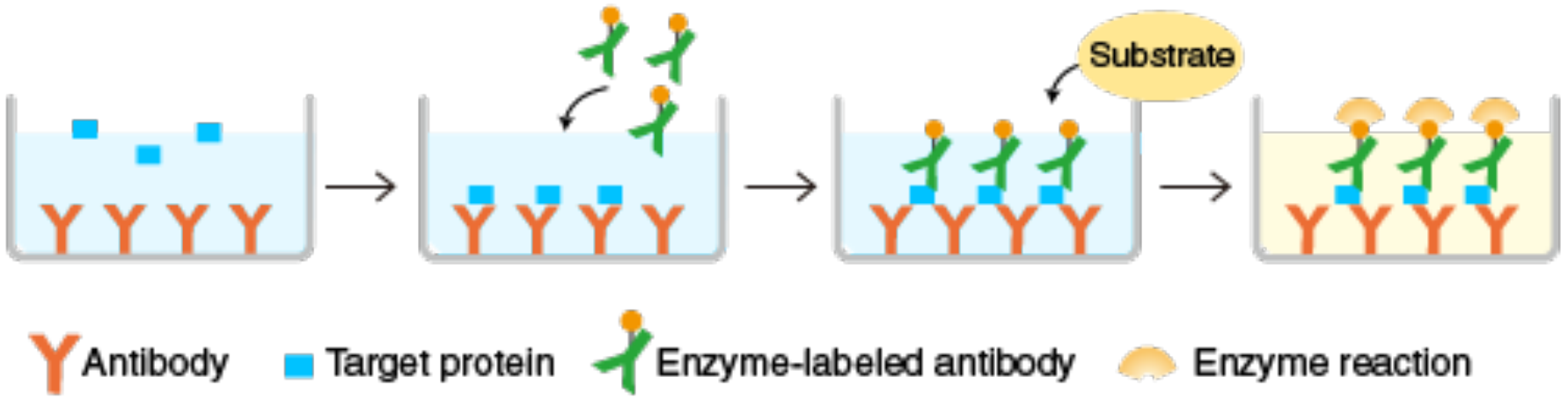


INDIRECT ELISA





SANDWICH ELISA combines antibodies to two different epitopes on the target protein



Retta di taratura

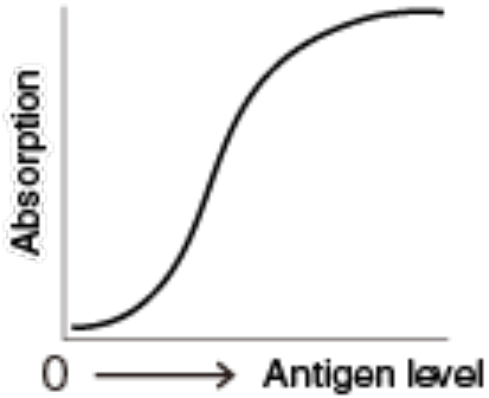


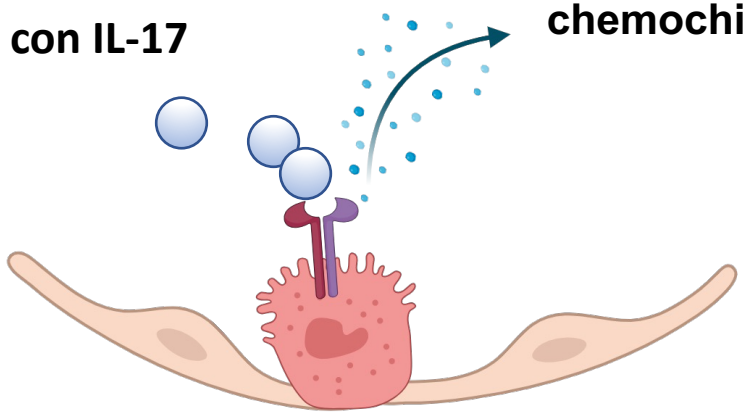


PLATE READER = LETTORE DI PIASTRE

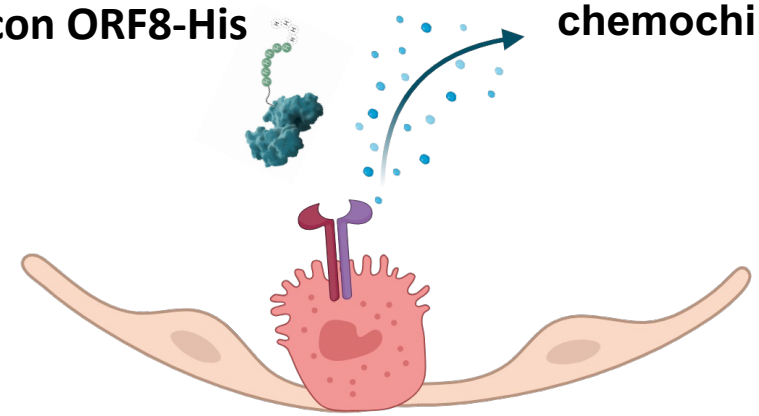
Misura Assorbanza, Luminescenza, Fluorescenza

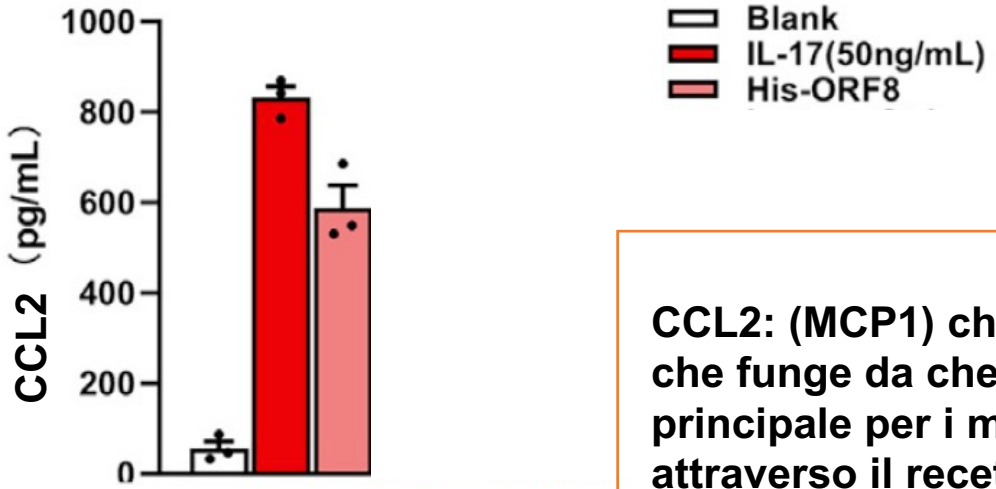
CONTROLLO POSITIVO per la secrezione di chemochine: stimolazione con IL-17

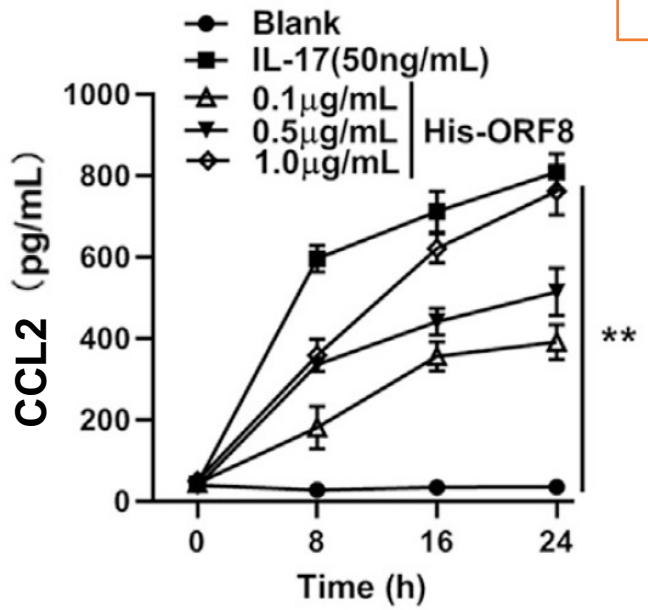
Trattamento con IL-17



Trattamento con ORF8-His







CCL2: (MCP1) chemochina che funge da chemoattrattante principale per i monociti attraverso il recettore CCR2

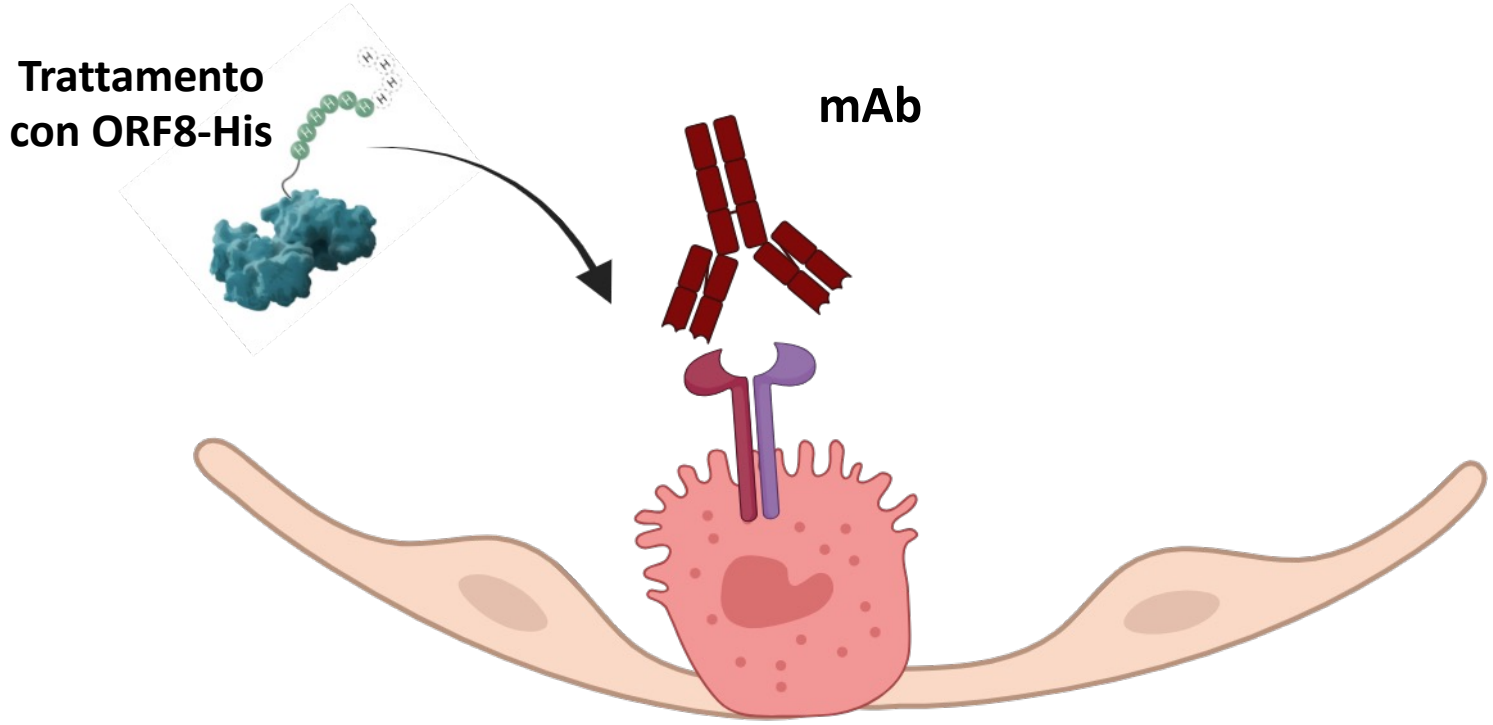
Schema creato con Biorender

CONTROLLO di SPECIFICITA': ruolo dell'interazione di ORF8 con IL-17RA

1) cellule non trattate

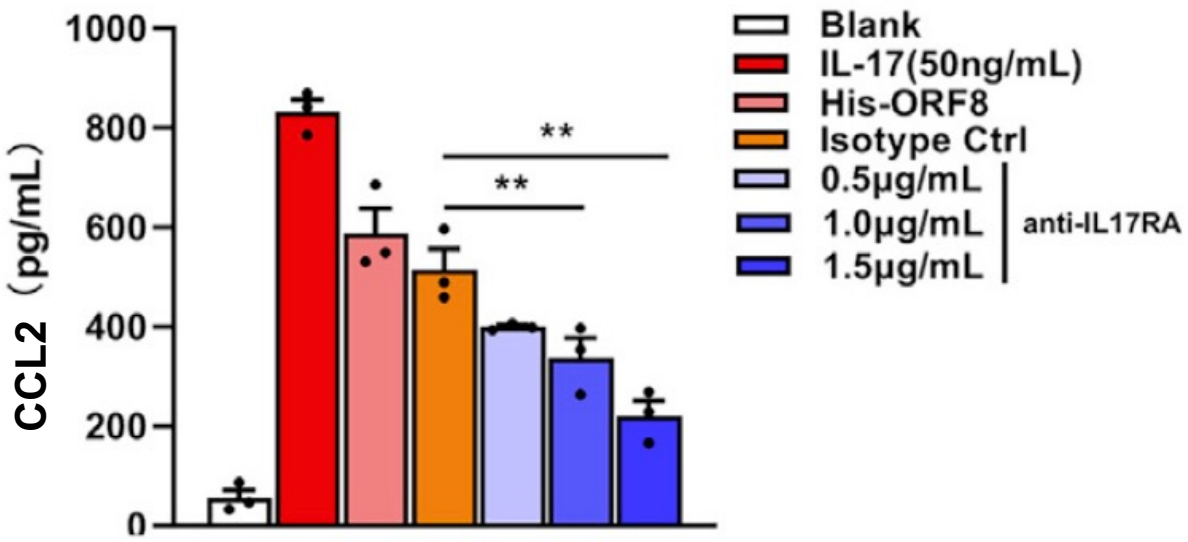
2) cellule trattate con **His-ORF8** (1 μg/ml per 24h)

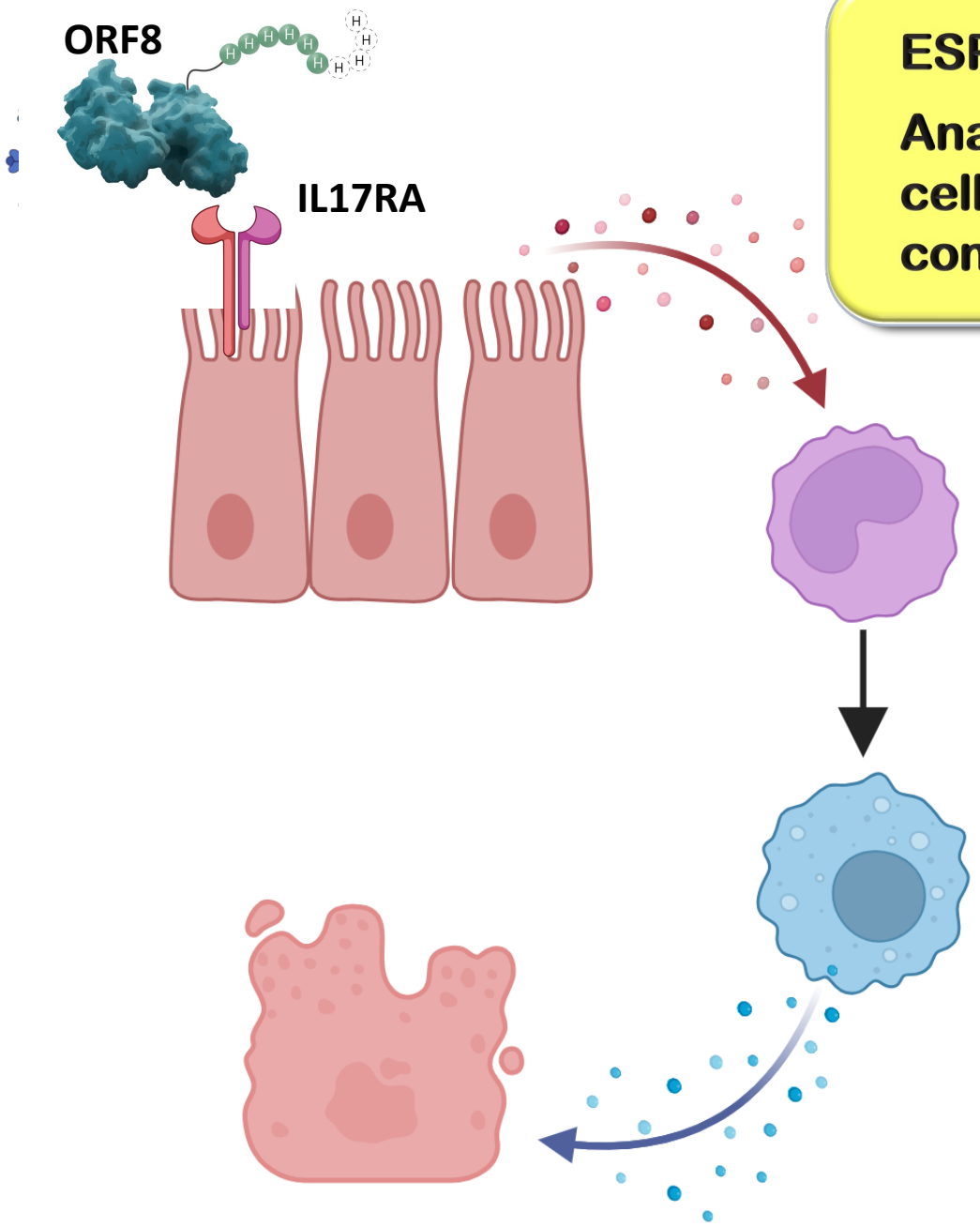
3) cellule pre-incubate con **anticorpo neutralizzante anti-IL17RA** (impedisce il legame di ORF8) e successivamente con His-ORF8 (1 μg/ml per 24h)



Schema creato con Biorender

Controllo di specificità per IL-17RA: anticorpo neutralizzante





ESPERIMENTO 1) SVOLTO IN LAB DIDATTICO:

Analisi della capacità di ORF8 di indurre reclutamento di cellule infiammatorie (monociti) attraverso l' interazione con IL17RA in cellule epiteliali

STRATEGIA SPERIMENTALE:

1) **Scelta dei modelli cellulari**
   H1299 (linea di cellule epiteliali – origine polmone)
   THP-1 (linea di monociti)

2) **Trattamento** di cellule epiteliali H1299 **con proteina ORF8 purificata**

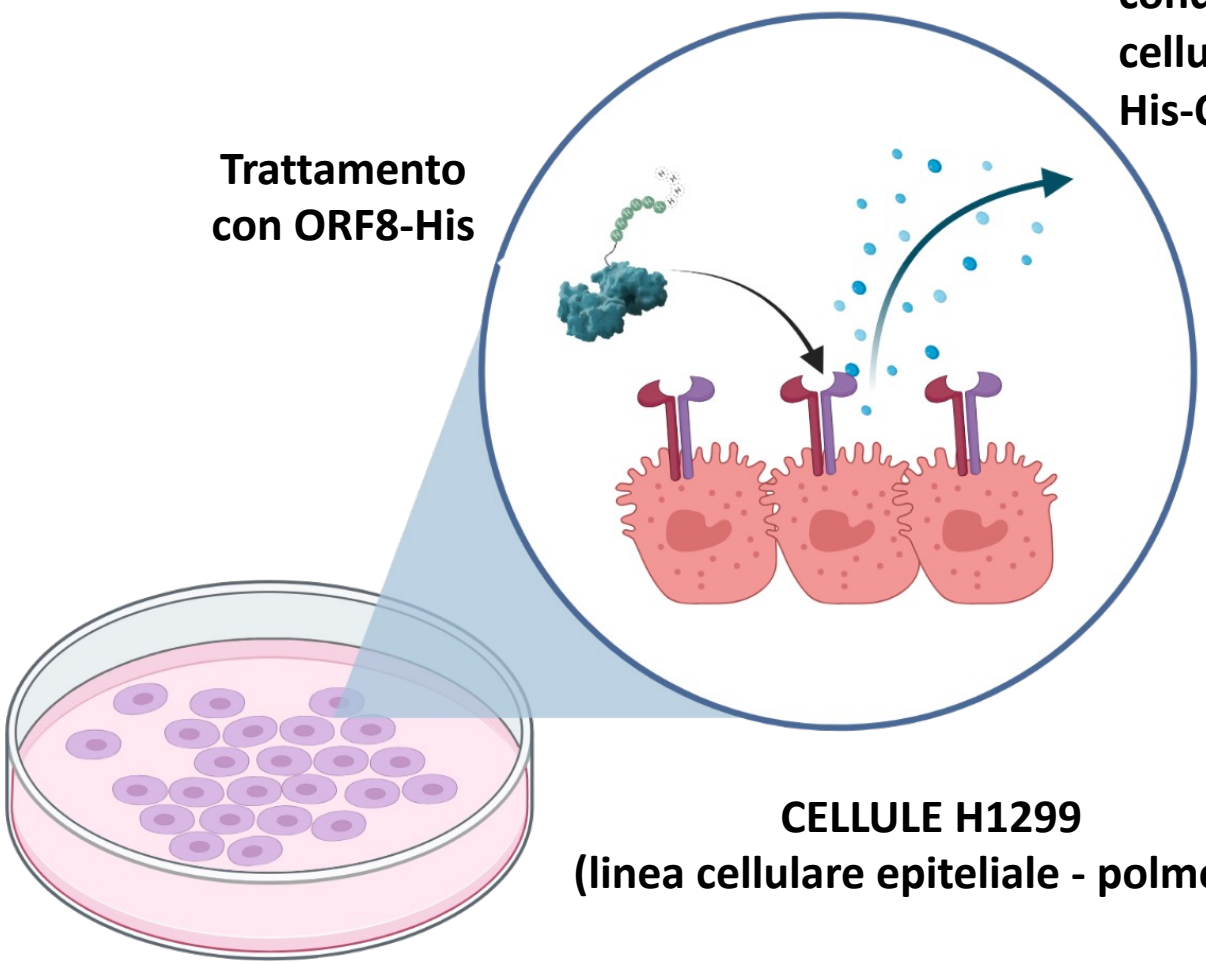
3) Analisi degli eventi a valle (**attivazione di monociti**)

Schema creato con Biorender

ESPERIMENTO 1) SVOLTO IN LAB DIDATTICO:

Analisi della capacità di ORF8 di indurre reclutamento di monociti attraverso interazione con IL17RA

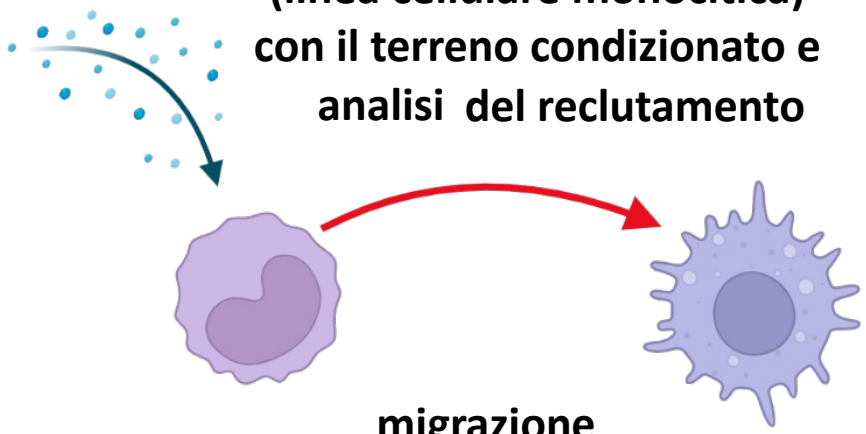
Trattamento con ORF8-His



CELLULE H1299
(linea cellulare epiteliale - polmone)

Prelievo di terreno condizionato da cellule trattate con His-ORF8 1 μg/ml

Incubazione di CELLULE THP-1 (linea cellulare monocitica) con il terreno condizionato e analisi del reclutamento

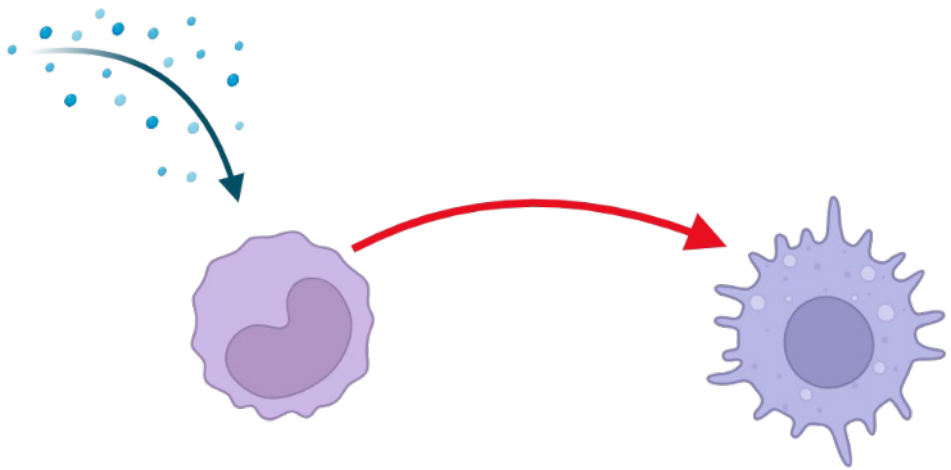


migrazione direzionale (chemotassi)

Schema creato con Biorender

STRATEGIA SPERIMENTALE

Incubazione di CELLULE THP-1 (linea cellulare di monociti) con il terreno condizionato da cellule H1299 trattate con His-ORF8



Analisi del reclutamento delle cellule THP-1

SCELTA DEI SAGGI:
saggio di CHEMOTASSI



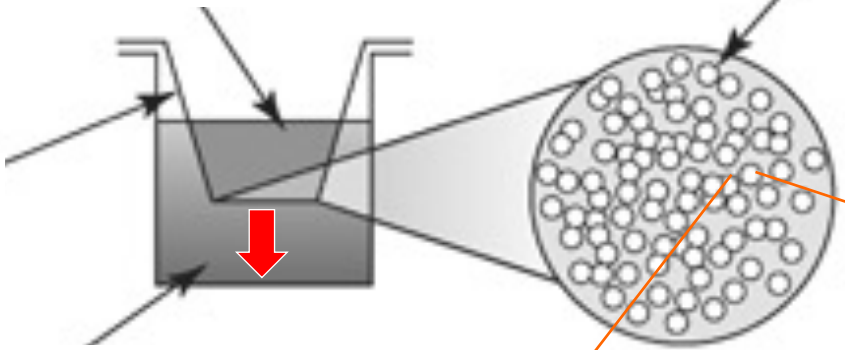
Migrazione lungo un gradiente di citochine

Schema creato con Biorender

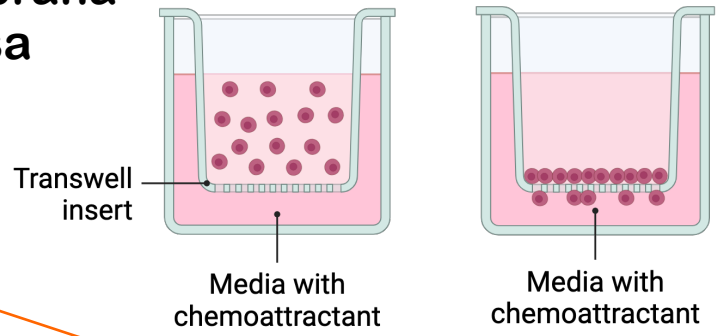
SAGGIO di chemotassi con camera di Boyden (transwelling)

Pozzetto superiore con cellule THP-1

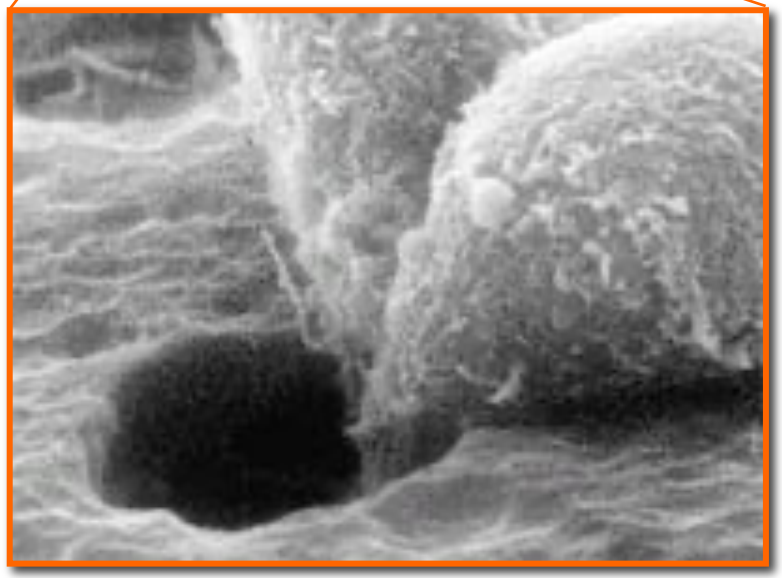
Membrana porosa



Inserto



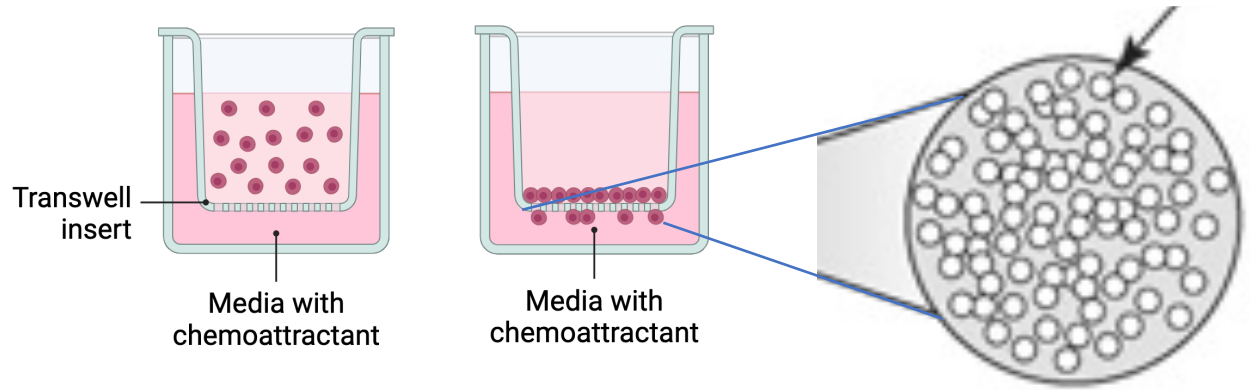
Pozzetto inferiore contenente terreno condizionato da cellule H1299 trattate o meno con His-ORF8



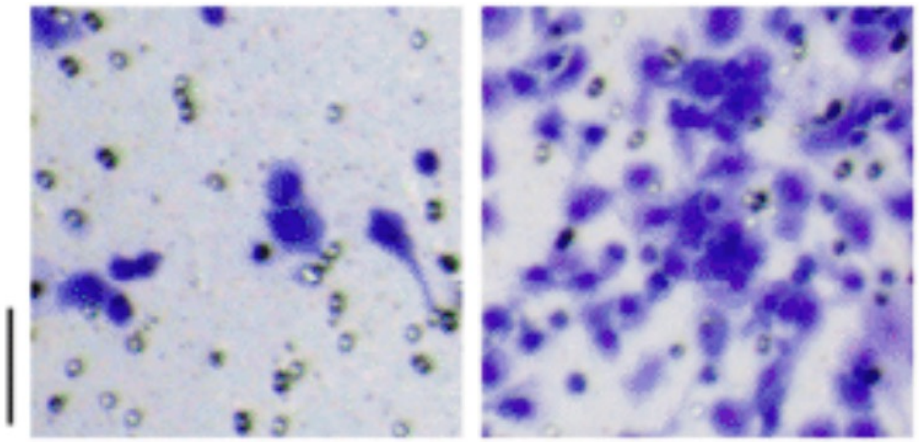
STRUMENTO: conta delle cellule al microscopio ottico dopo colorazione

Pozzetto superiore
con cellule THP-1

Membrana porosa

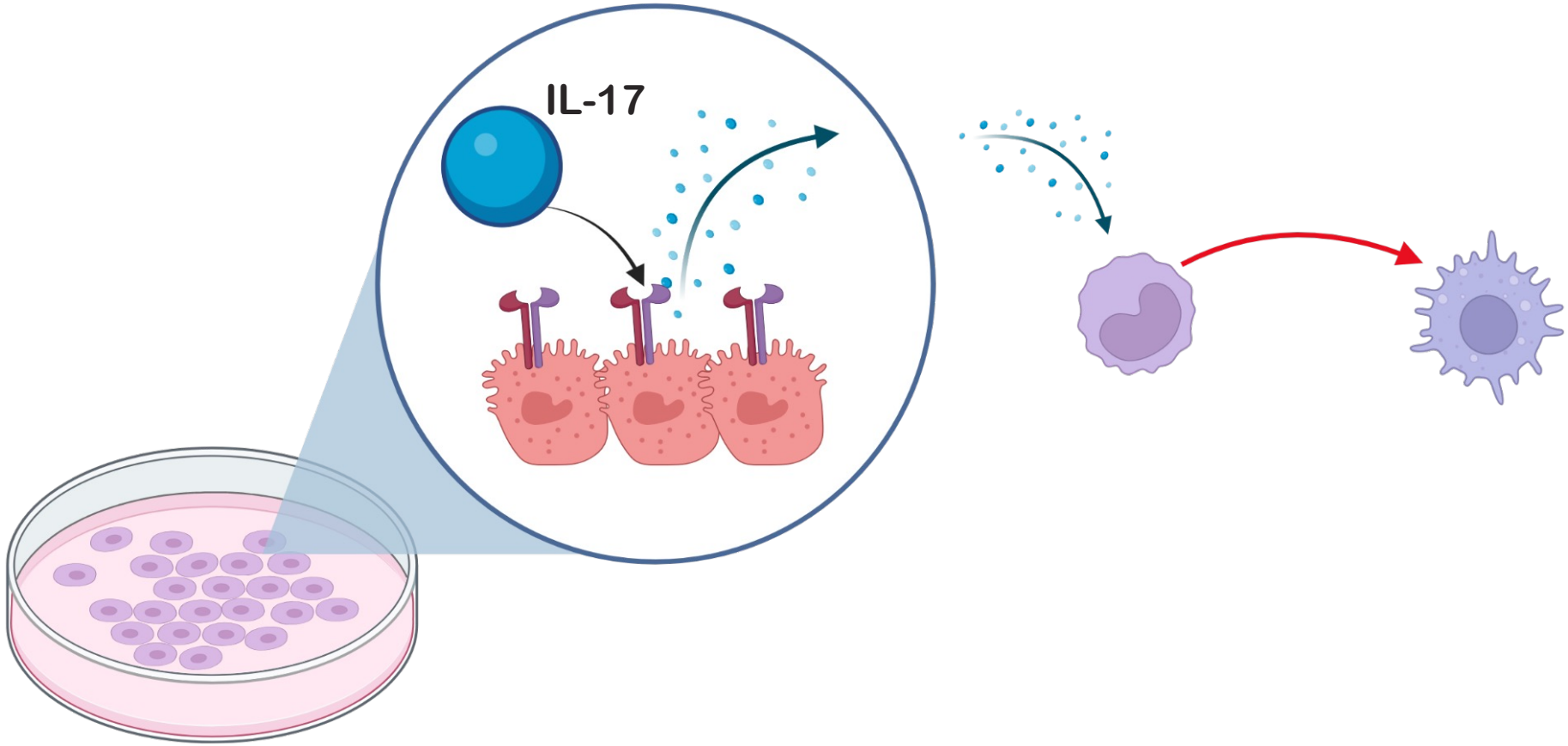


Pozzetto inferiore con
terreno condizionato da
cellule H1299 trattate
con His-ORF8



Colorazione con crystal violet
e conta delle cellule migrate

CONTROLLO POSITIVO: analisi dell'effetto di IL-17



Schema creato con Biorender

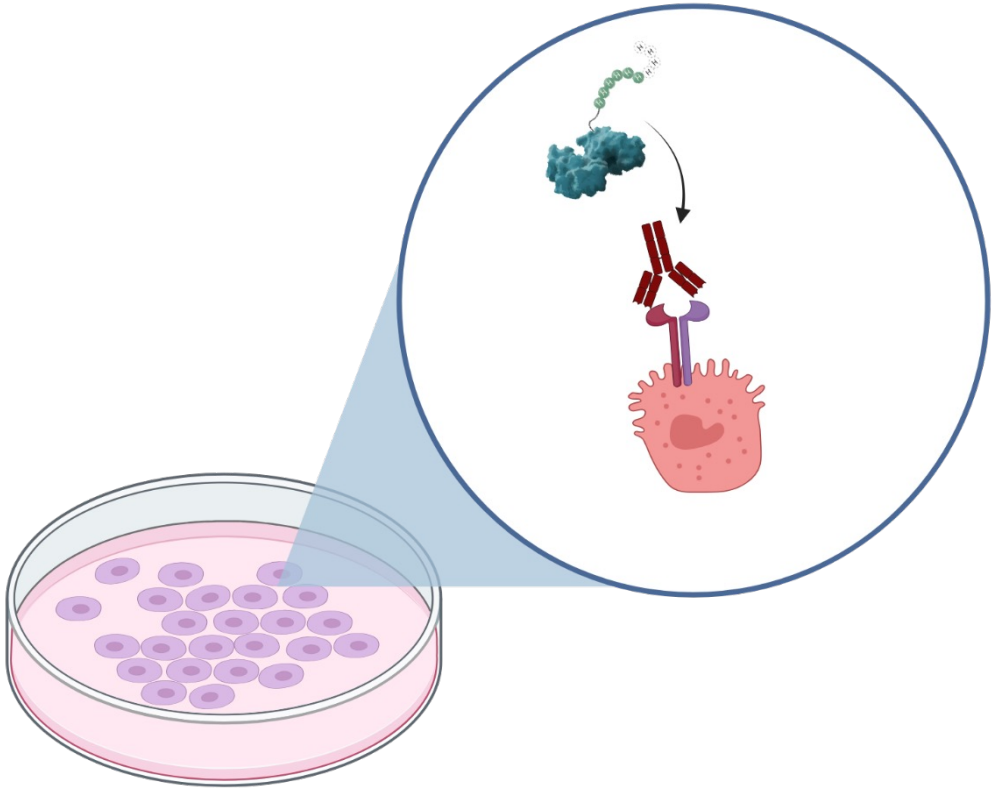
CONTROLLO DI SPECIFICITA': Analisi del ruolo di IL-17RA

1) cellule non trattate

2) cellule trattate con **His-ORF8** (1 μg/ml 24h)

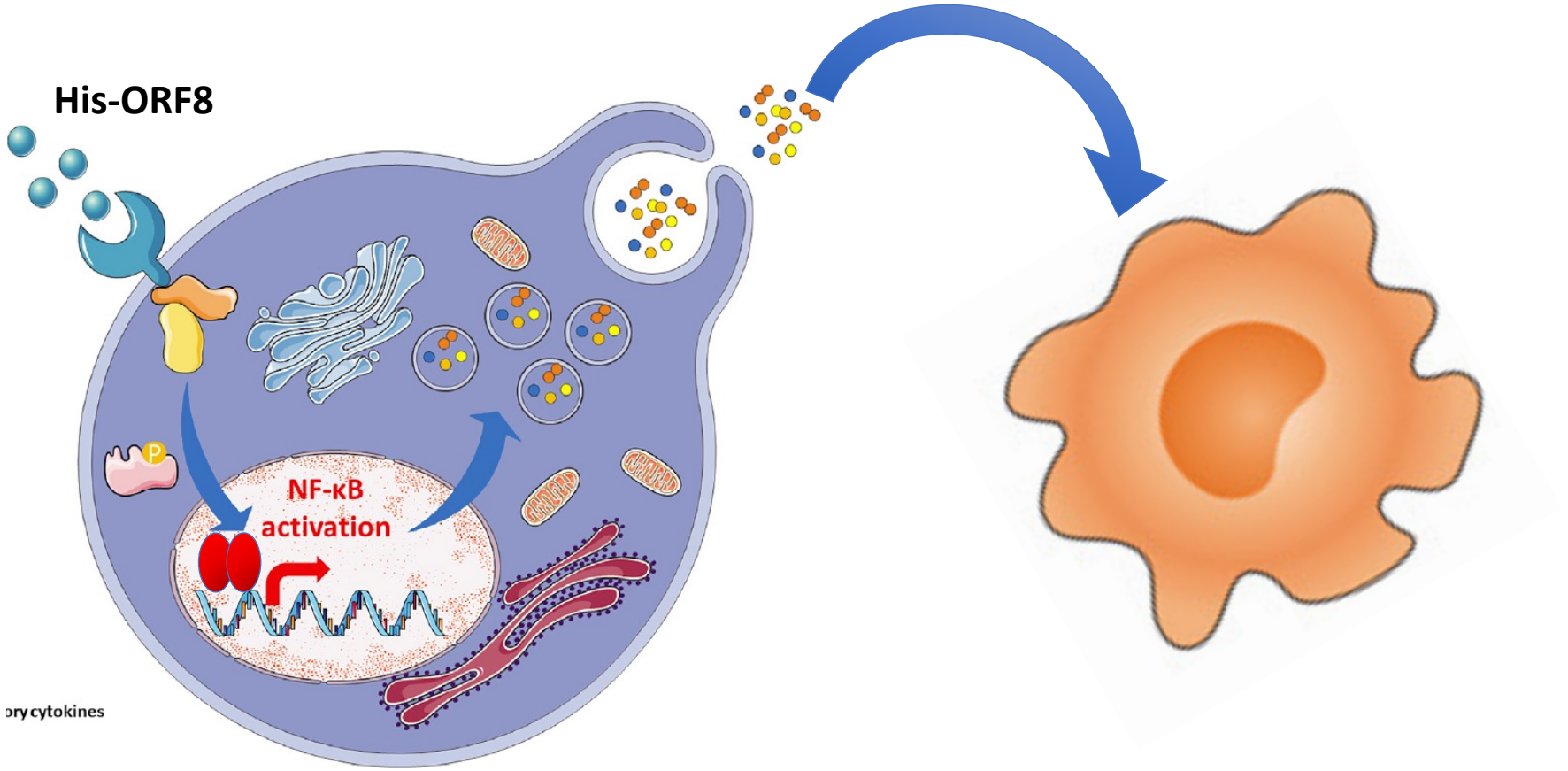
3) cellule incubate con **anticorpo neutralizzante anti-IL17RA** (1.5 μg/ml 12h)

e successivamente con His-ORF8 (1 μg/ml 24h)

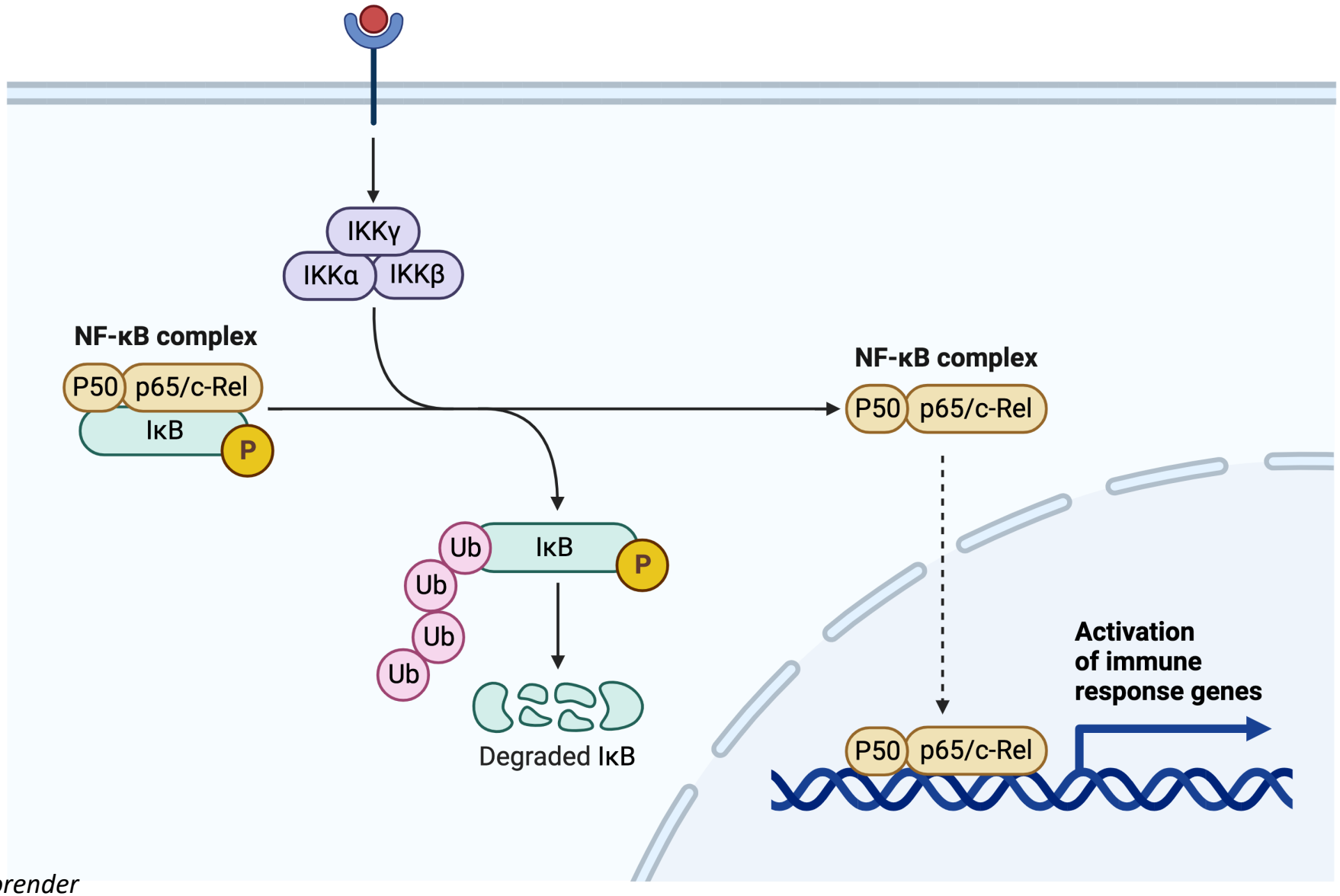


Schema creato con Biorender

STUDIO DEL MECCANISMO:
Analisi del ruolo di NF-κB



La via di trasduzione (pathway) di NF-κB



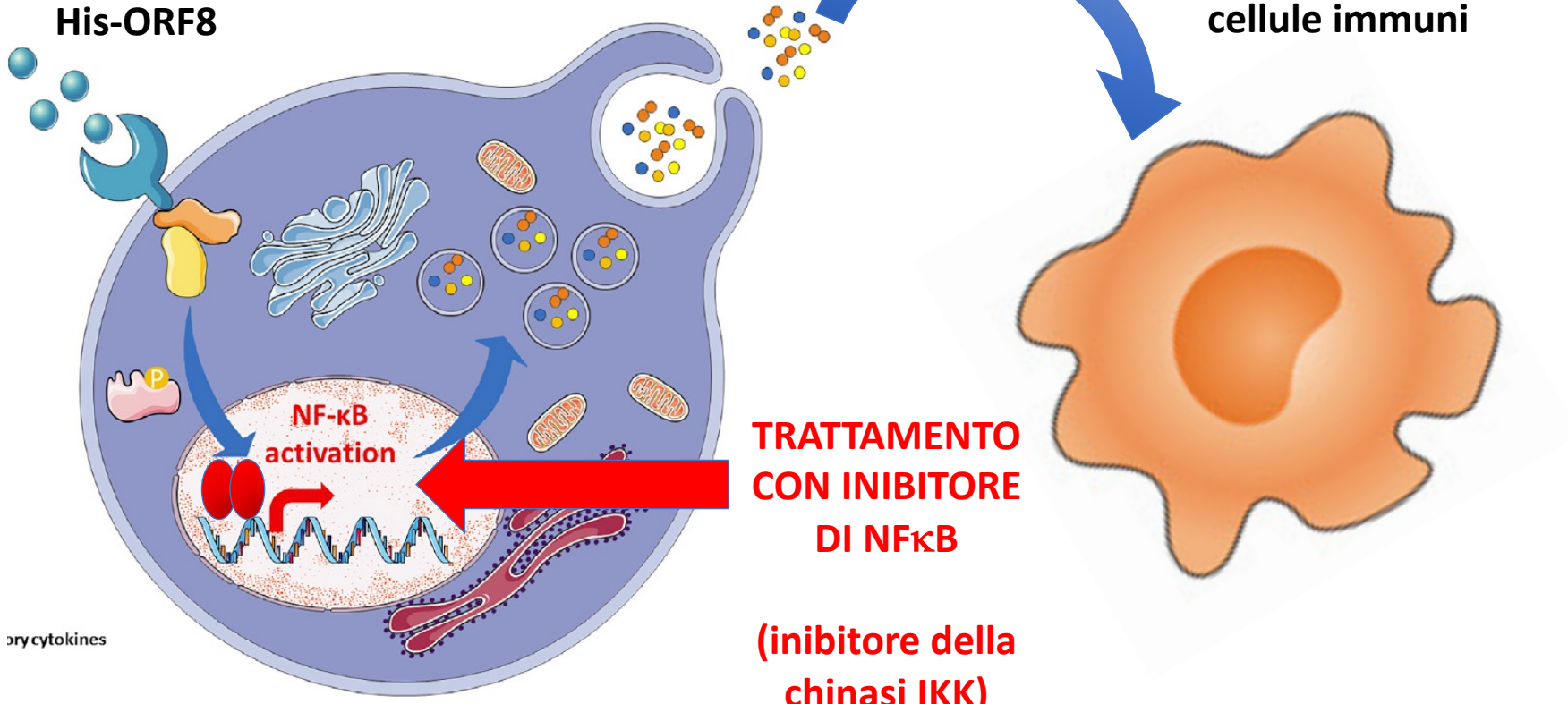
Schema creato con Biorender

Analisi del ruolo di NF-κB nell'attivazione delle cellule immuni

Terreno condizionato da cellule trattate con ORF8

Induzione della chemotassi in cellule immuni

His-ORF8



TRATTAMENTO CON INIBITORE DI NFκB

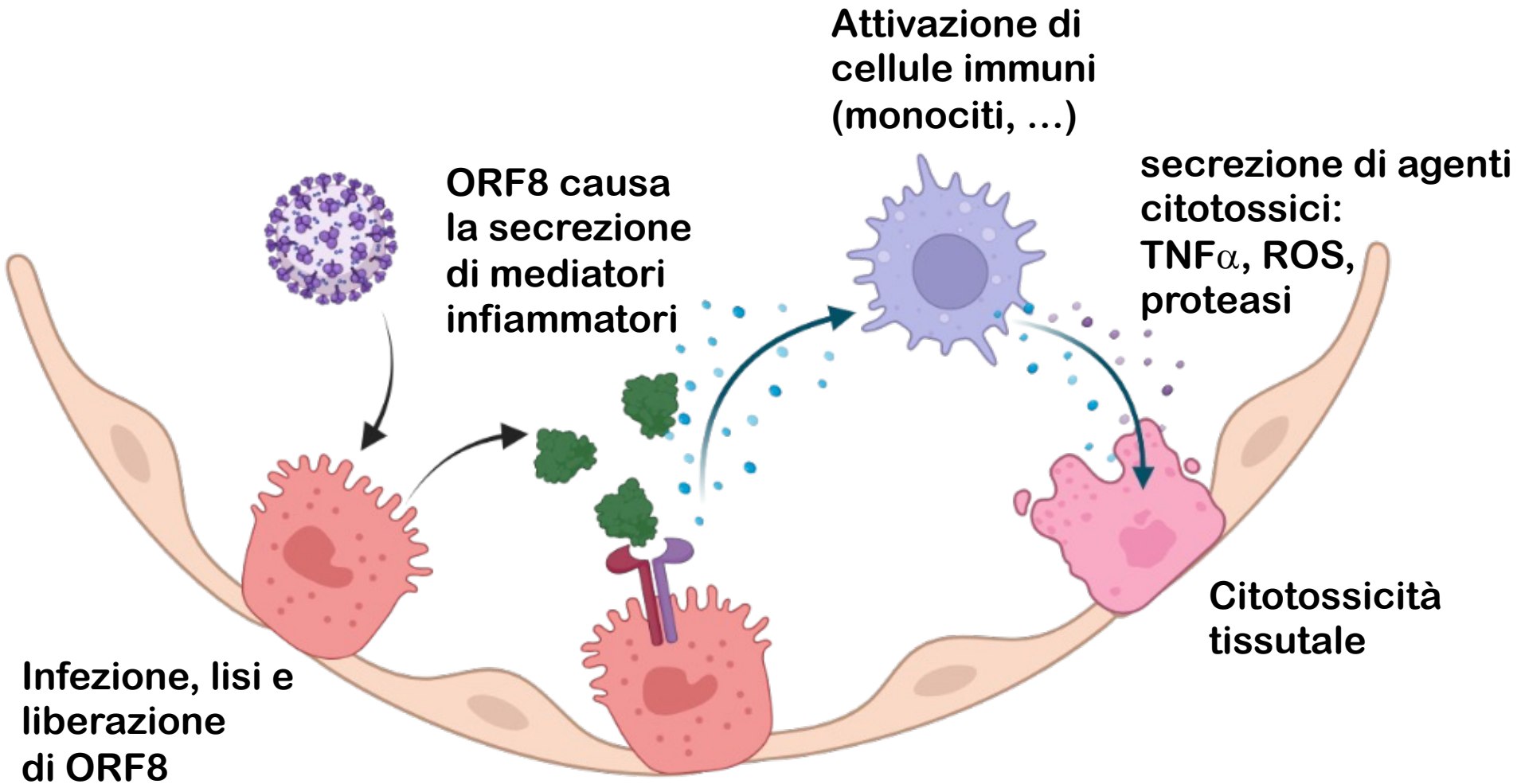
(inibitore della chinasi IKK)

CELLULE H1299
(linea cellulare epiteliale)

Schema creato con Biorender

MODELLO

ORF8 può innescare una reazione infiammatoria con conseguente danno tissutale mediante l'interazione con il recettore IL-17RA in cellule di epitelio polmonare



Schema creato con Biorender

STRATEGIA SPERIMENTALE

1) **Scelta dei modelli cellulari**
   H1299 (linea di cellule epiteliali – origine polmone)
   THP-1 (linea di cellule monocitiche che possono differenziare a macrofagi)

2) **Disegno dell'esperimento (5 punti)**
   1) Scelta dei punti sperimentali: trattamento di cellule epiteliali H1299 con/senza proteina ORF8 purificata
   2) Scelta dei controlli (controllo positivo e controlli di specificità)

3) **Scelta del saggio**
   analisi del reclutamento di monociti da terreno condizionato di cellule esposte a ORF8 mediante saggio di chemotassi (transwelling)

4) **Scelta dello strumento e del tipo di analisi**
   Analisi quantitativa mediante conta al microscopio ottico