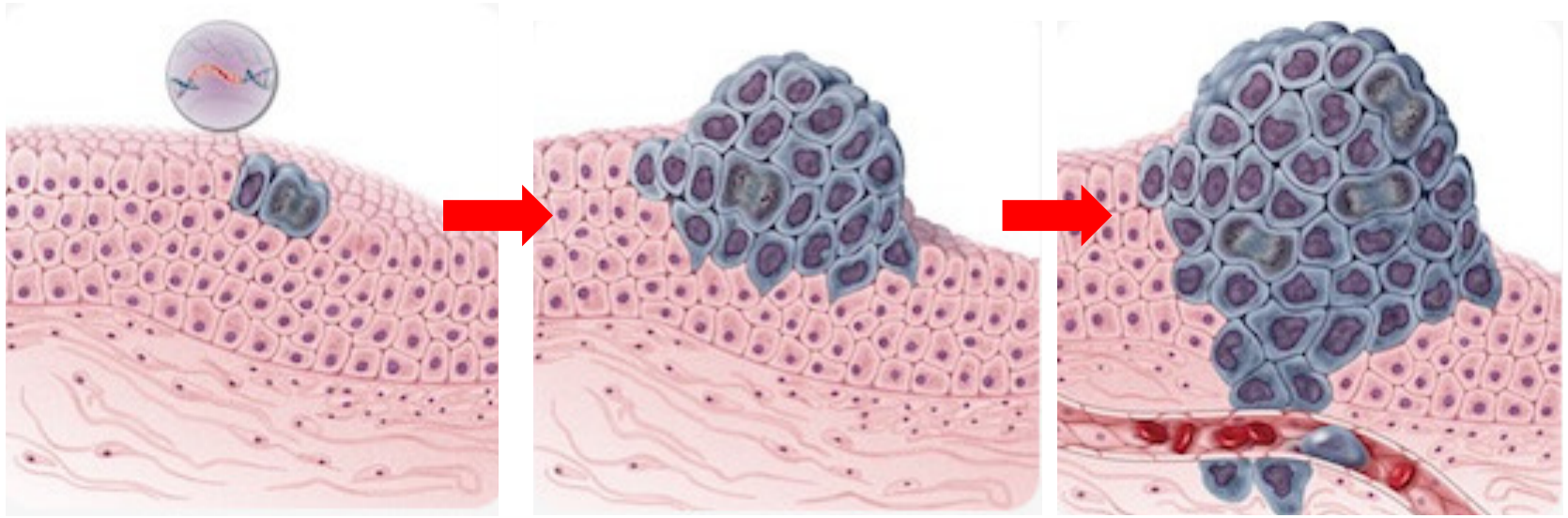
CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche

Corso di Biotecnologie Cellulari 2026-27

Lezione 9

Realizzazione di un progetto sperimentale

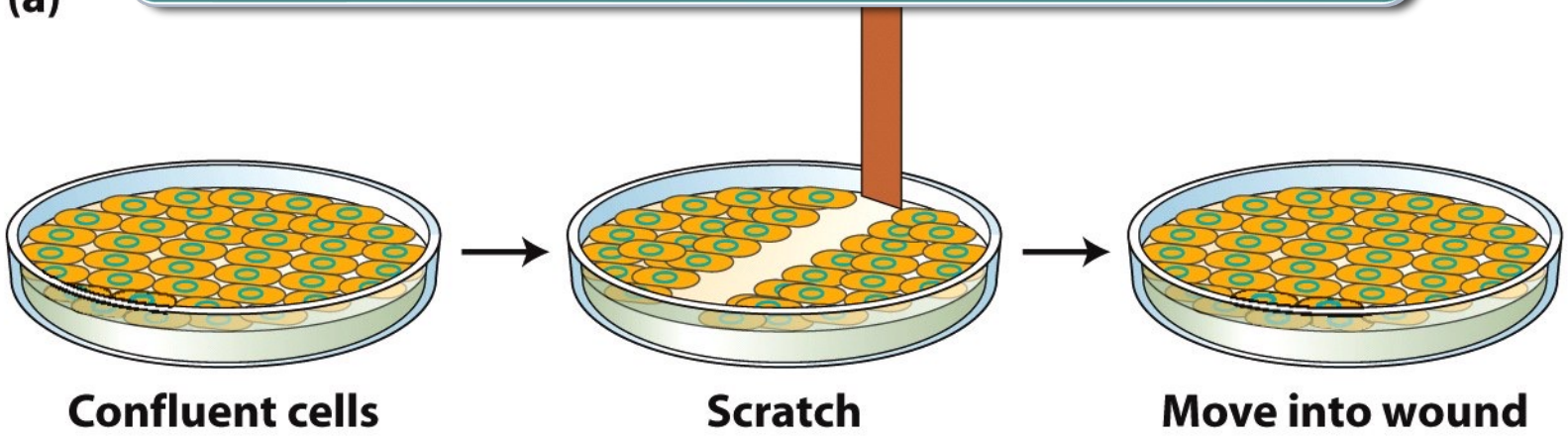
Saggi di migrazione e invasione di cellule tumorali

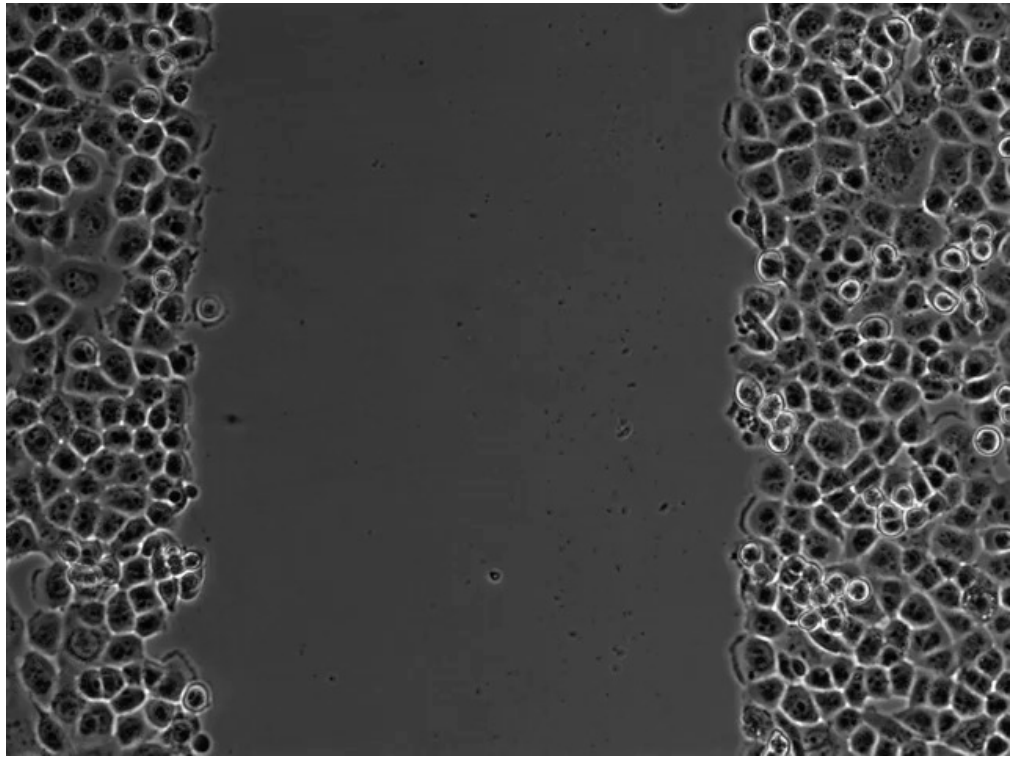


Il cancro è una patologia nella quale le cellule proliferano senza controllo, invadono e colonizzano i tessuti normali.

Saggi di motilità cellulare 2D per cellule in adesione: wound-healing

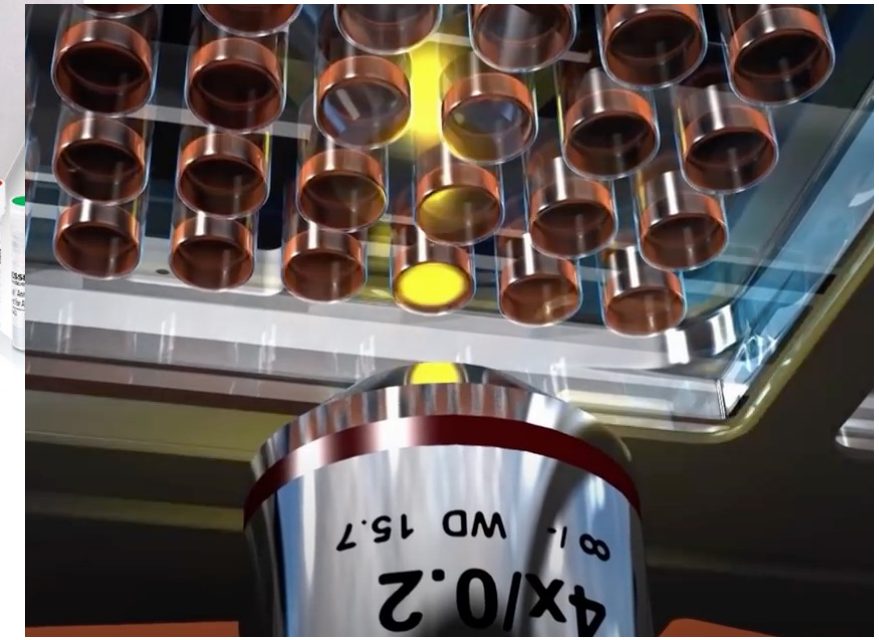
(a)





Saggi di motilità o chemotassi mediante live imaging

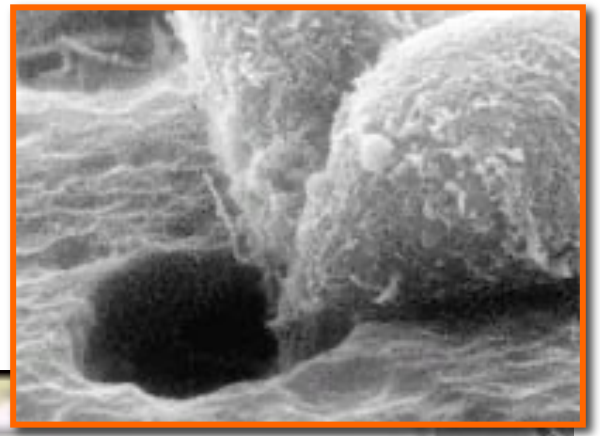


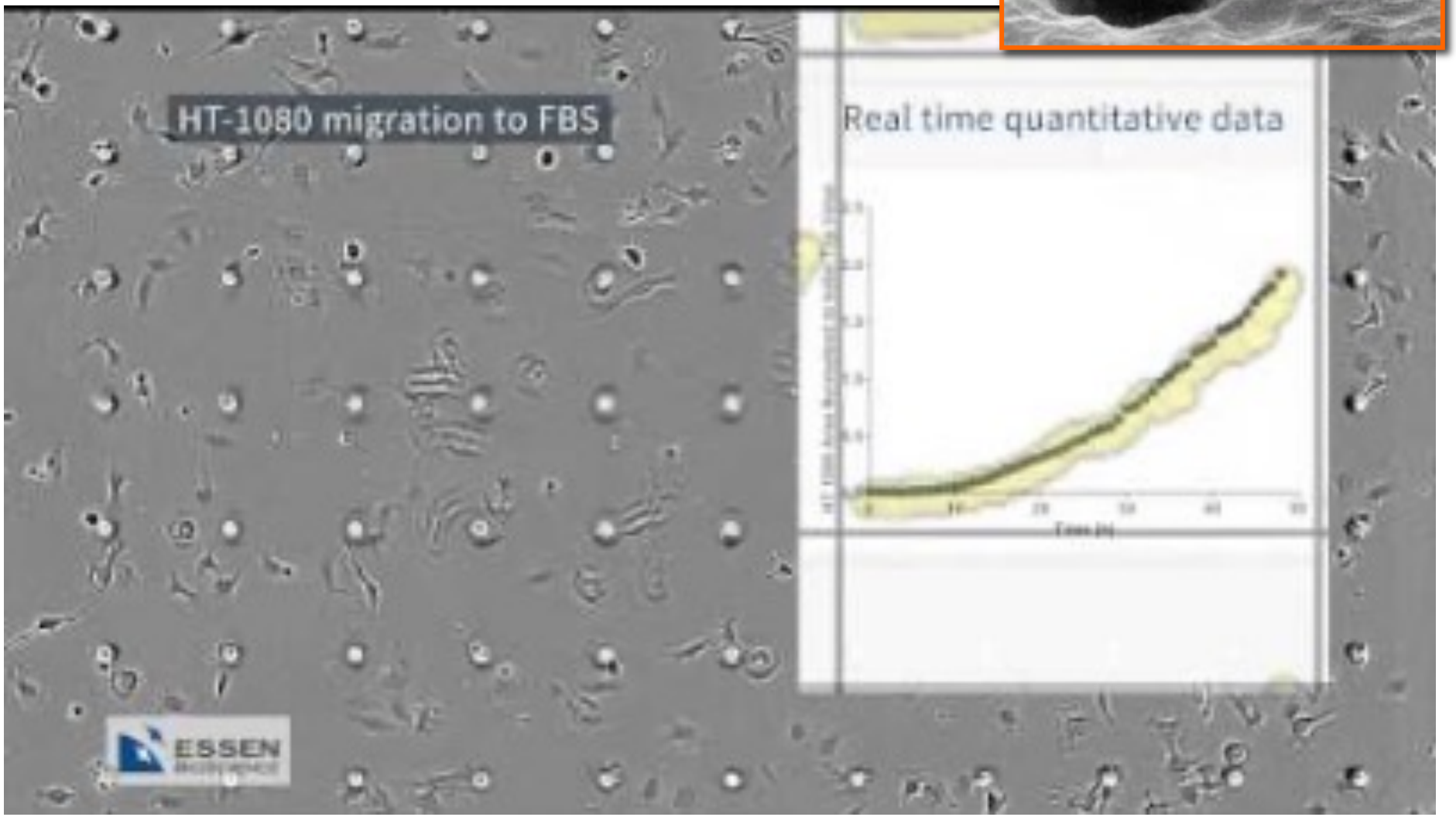


IncuCyte® live-cell analysis system

https://www.sartorius.com/en/products/live-cell-imaging-analysis/live-cell-analysis-instruments#id-819590

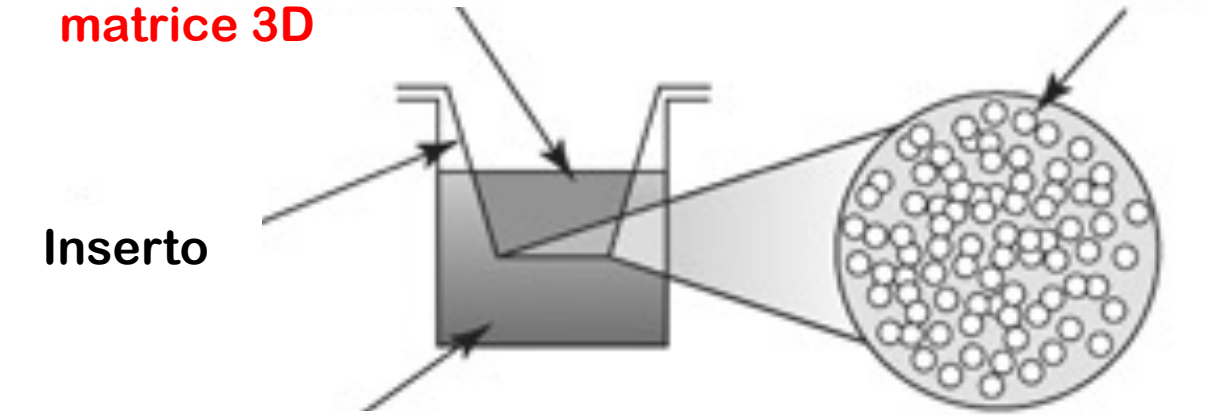
Live imaging per saggi di transwelling



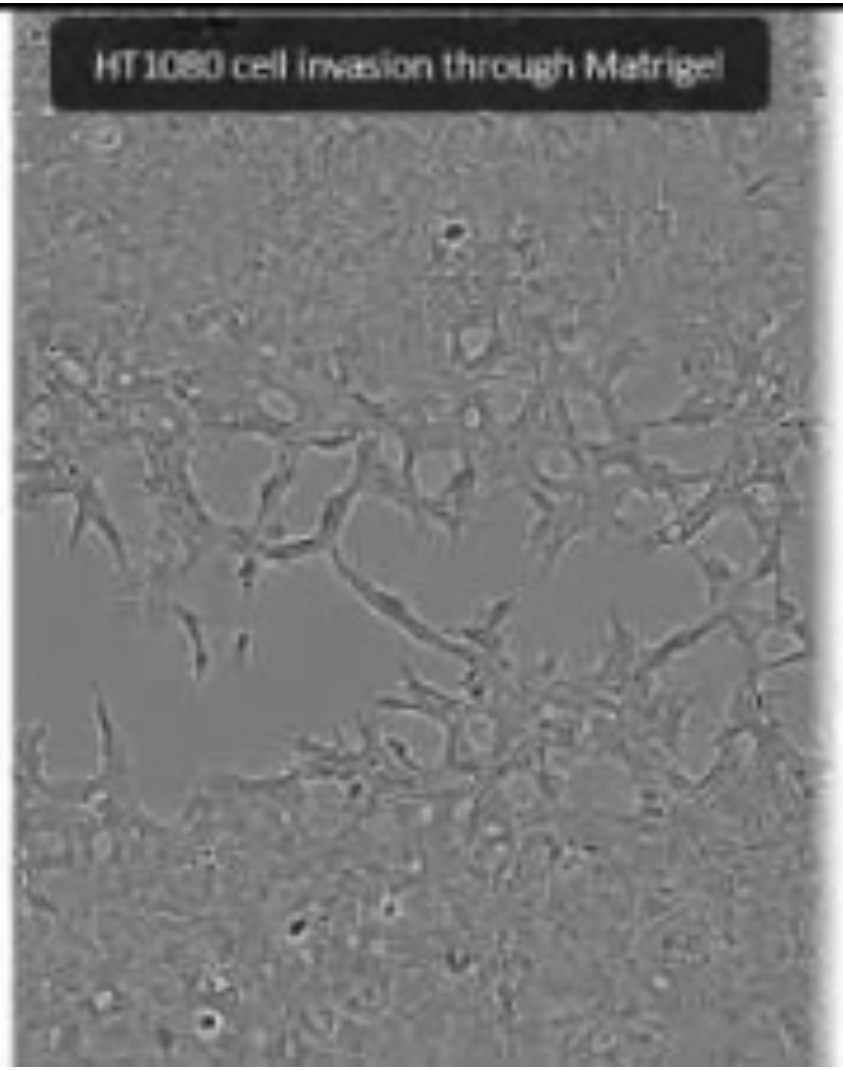


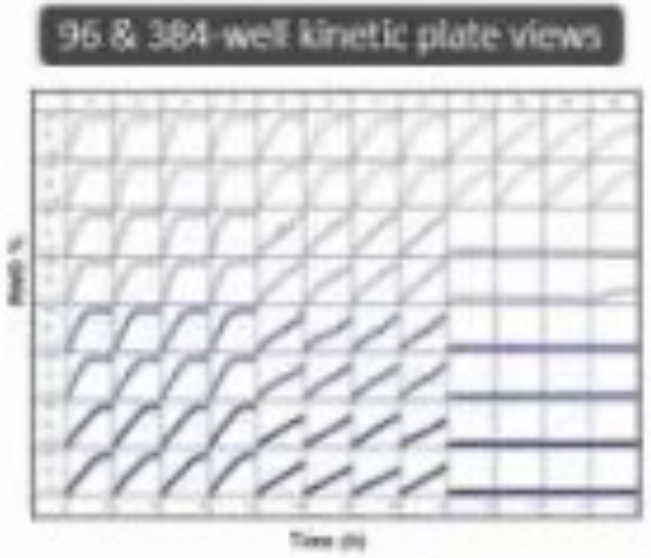
Saggi di invasione

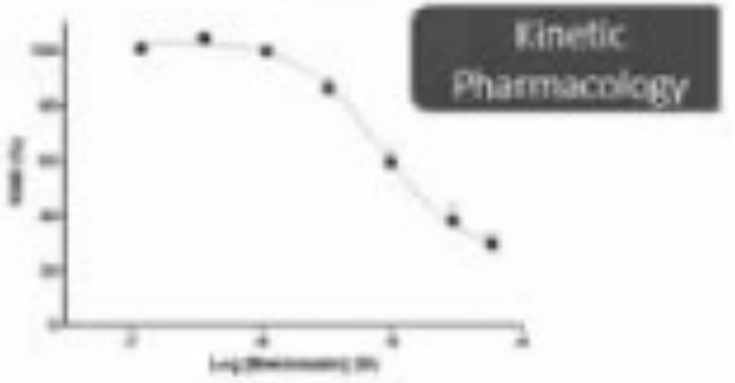
Si misura la capacità delle cellule di invadere una matrice polimerizzata su un filtro poroso.



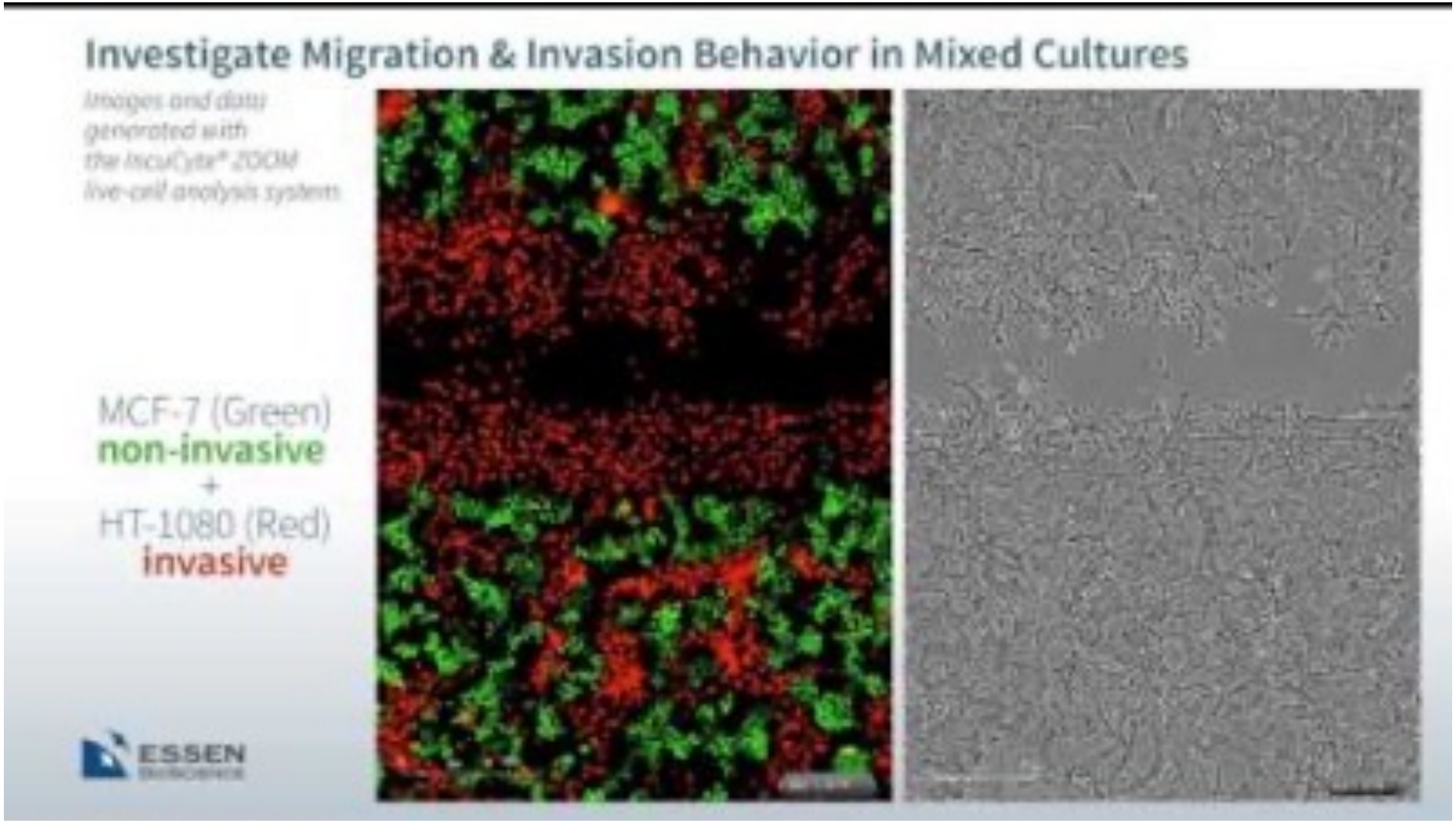
Live imaging per saggi di invasione





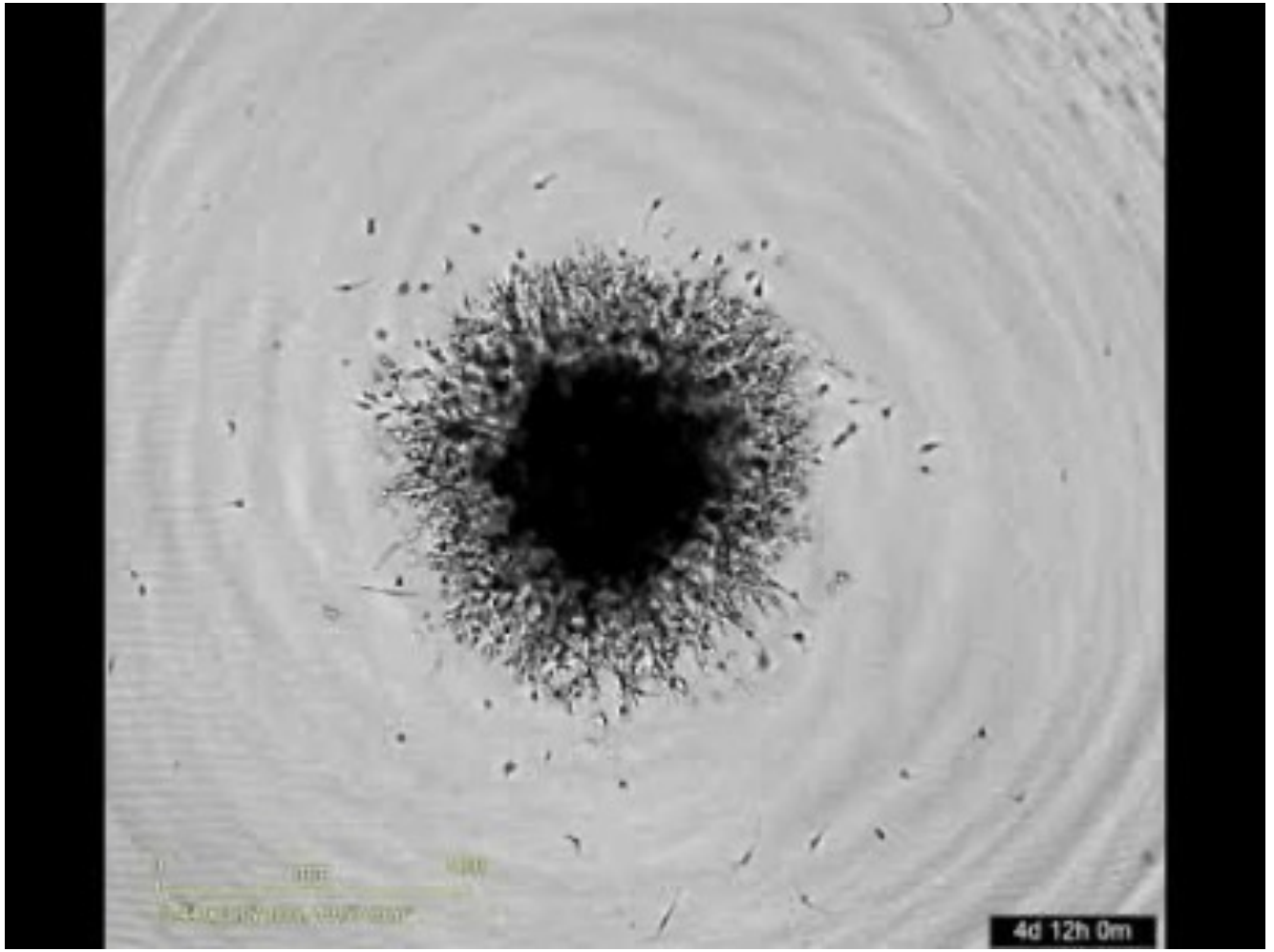


Live imaging di co-colture



Cellule reporter: esprimono GFP o RFP

Saggio di invasione di sferoidi

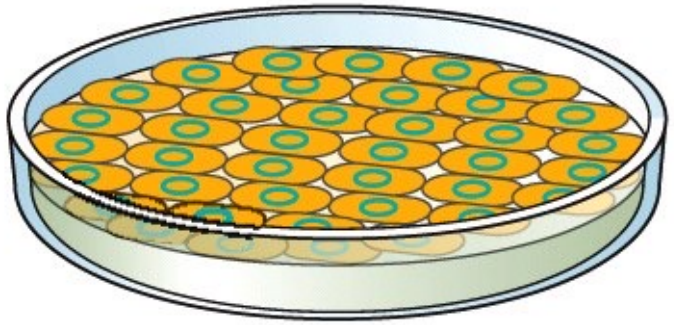


DOMANDA D'ESAME

Problema sperimentale:

Identificare FARMACI che INIBISCONO LA MIGRAZIONE DI CELLULE TUMORALI utilizzando una libreria di molecole

Screening funzionali per farmaci/geni che regolano la migrazione (invasione)

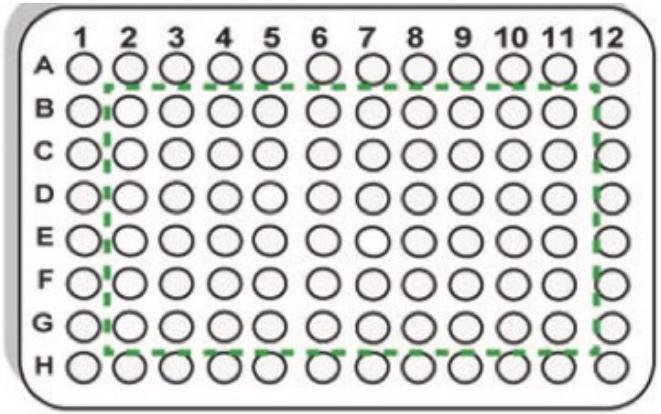


Modello cellulare della patologia
(cellule in grado di migrare)



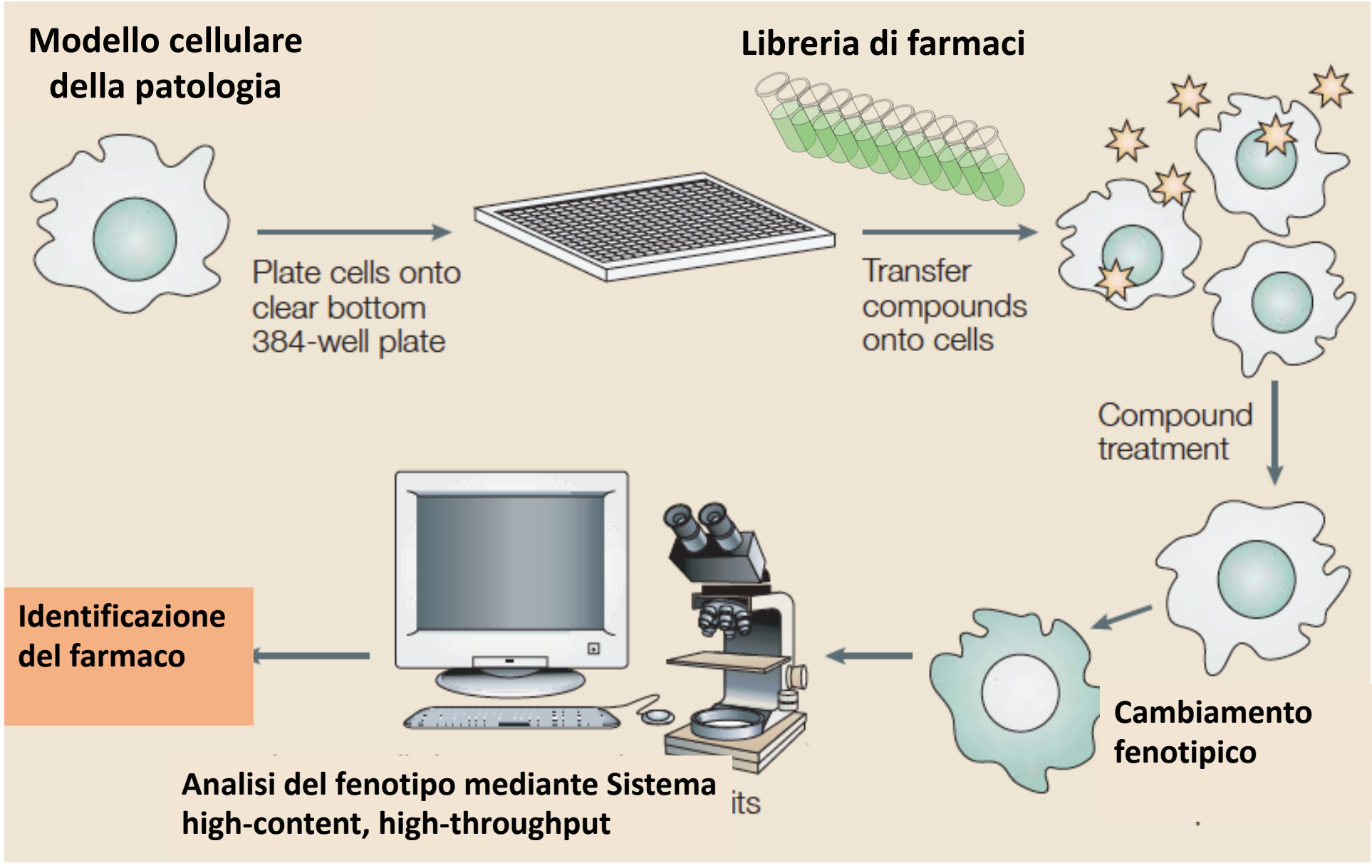
Libreria di farmaci
(collezione di molecole)

Semina delle cellule in piastra multipozzetto
e trattamento con singole molecole

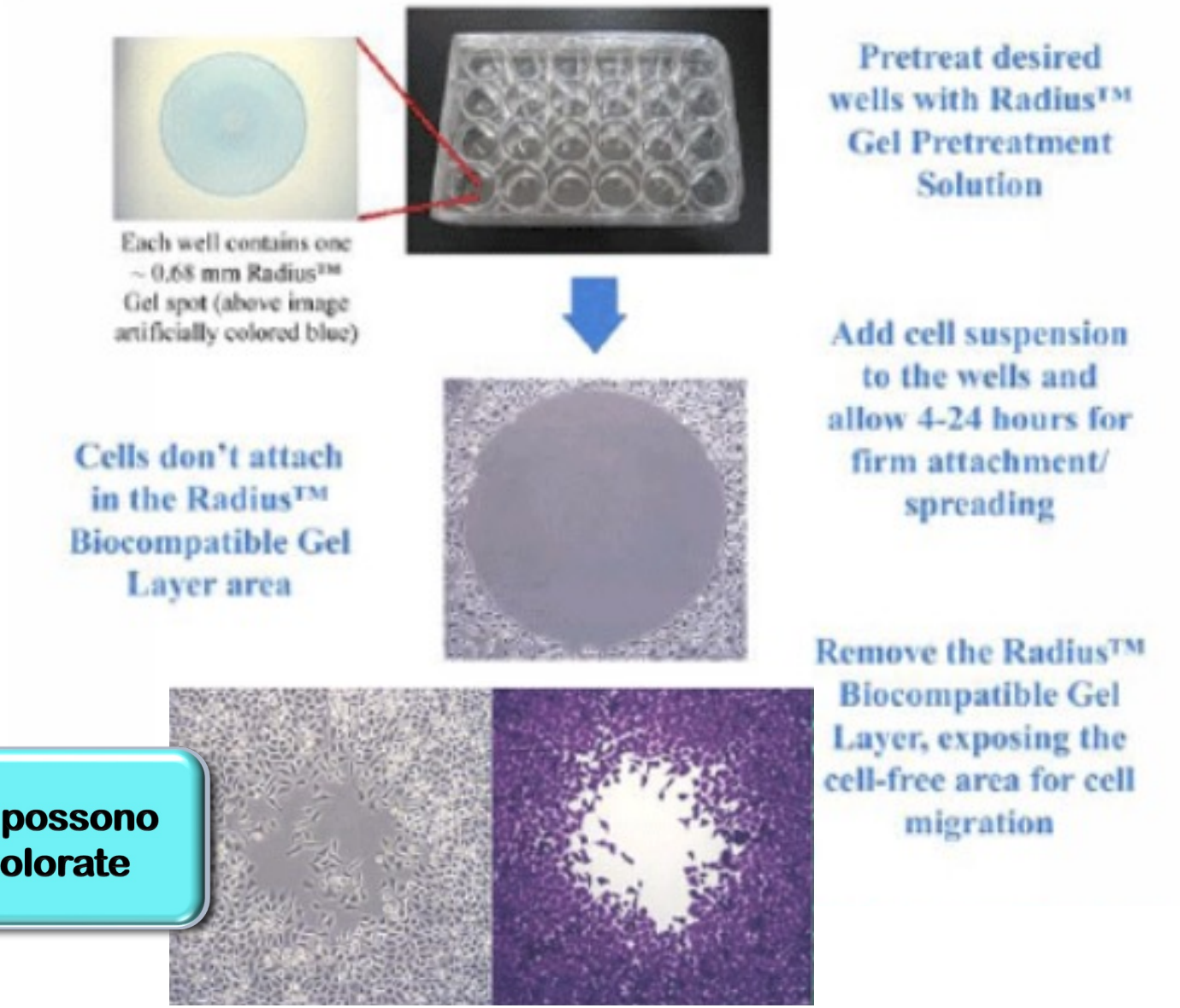


Saggio morfologico/funzionale

Screening FUNZIONALI

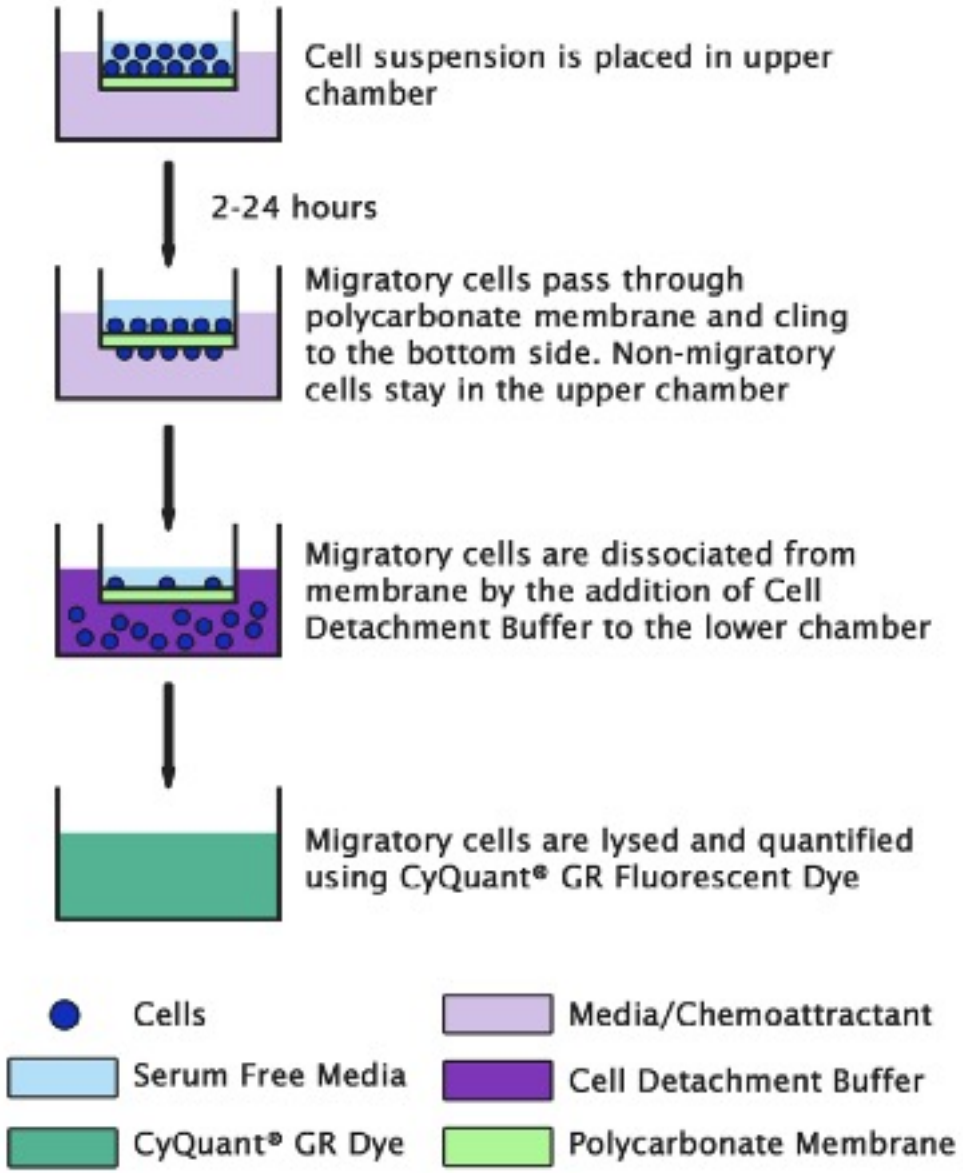


Saggi di wound-healing high-throughput in piastra multipozzetto con lettura automatizzata al microscopio ottico/ reader



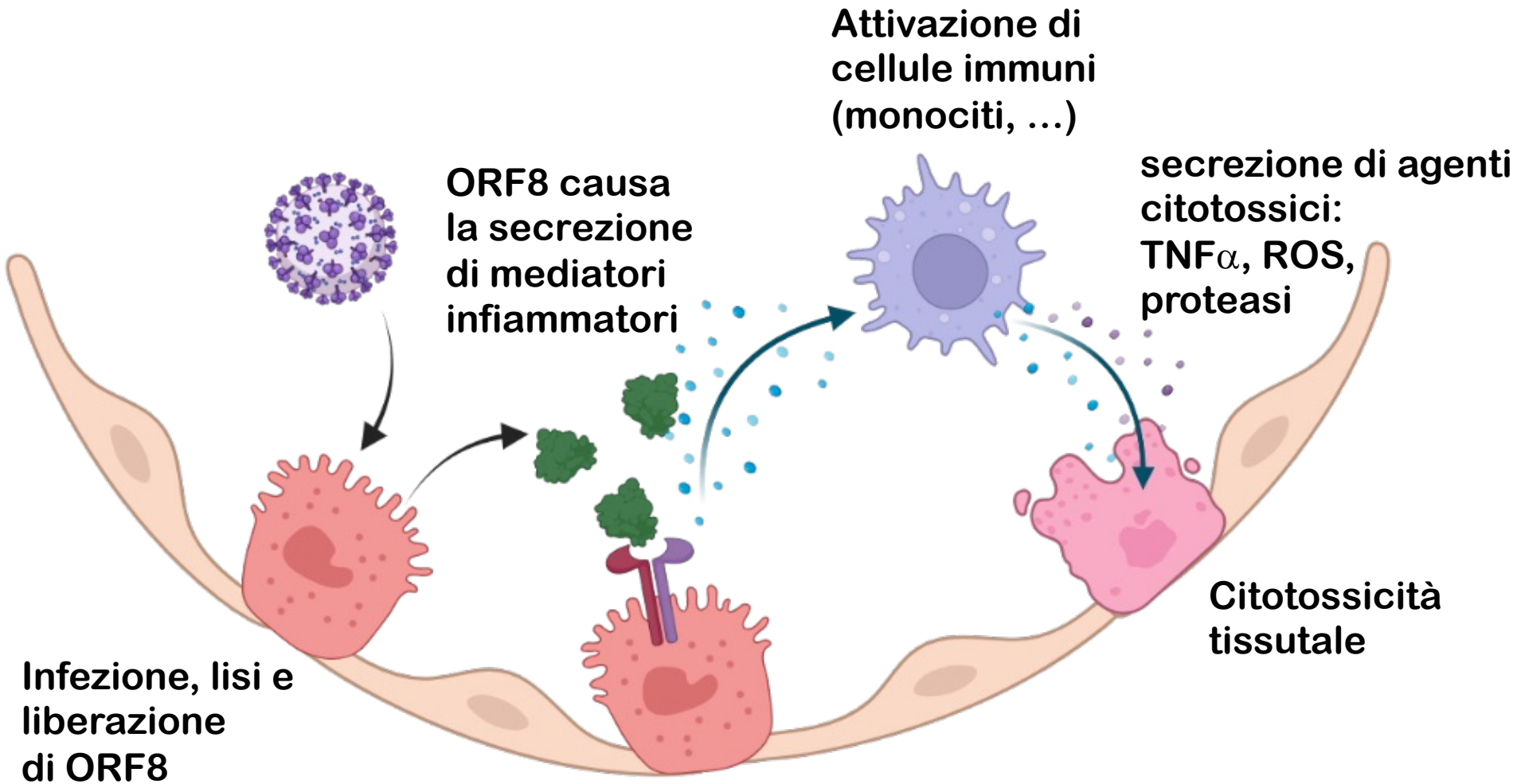
Le cellule possono essere colorate

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



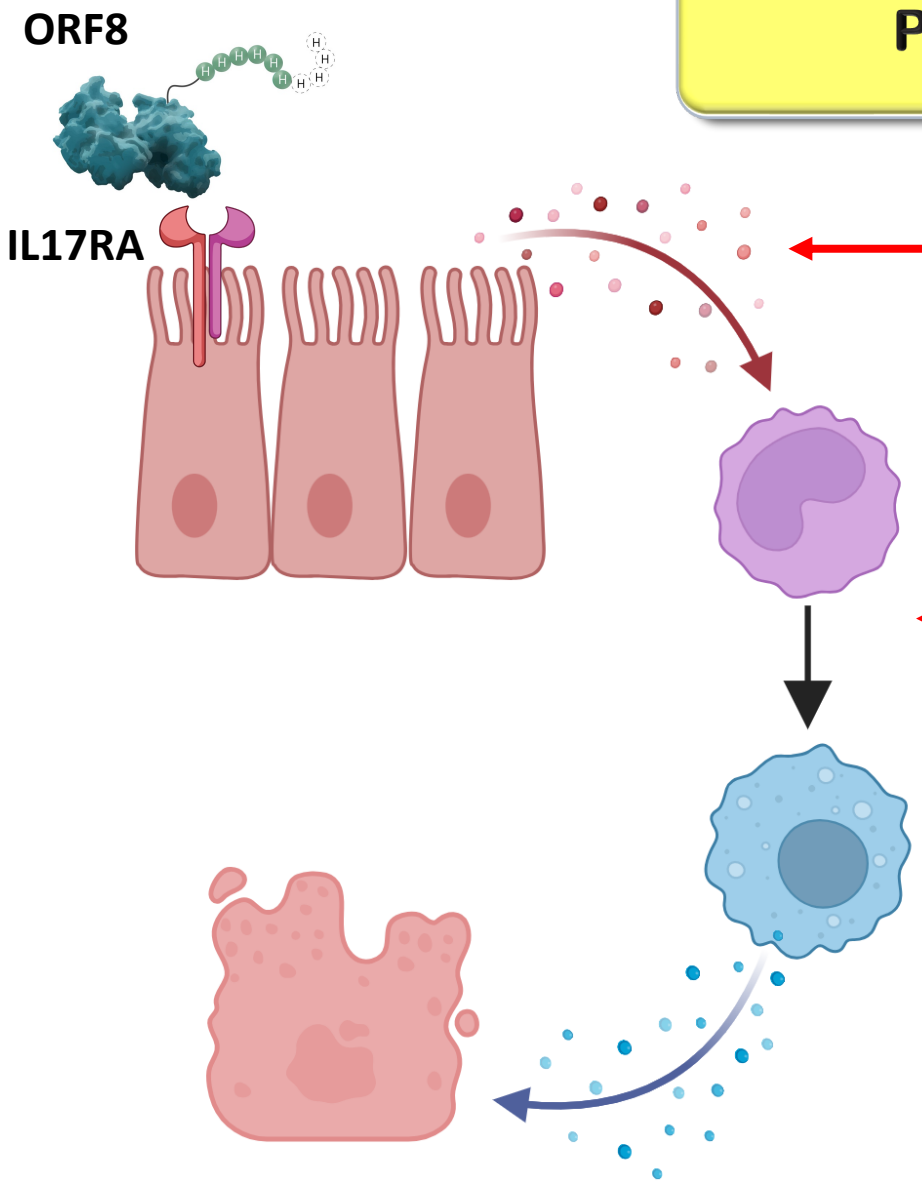
IPOTESI

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

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. **Saggio ELISA**

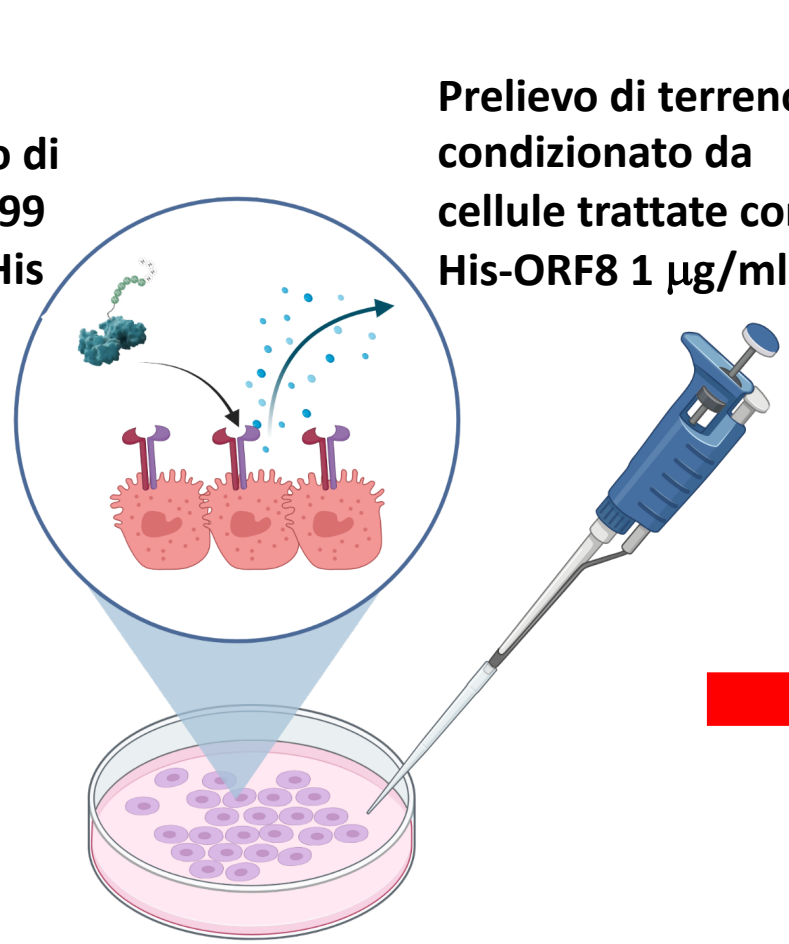
Esperimento 1)
Analisi della capacità di ORF8 di indurre **reclutamento di cellule infiammatorie** attraverso l'interazione con IL17RA su cellule del polmone. **Saggio TRANSWELLING**

ESPERIMENTO 1):

Analisi della capacità di ORF8 di indurre reclutamento di monociti attraverso l'interazione con IL17RA su cellule del polmone

Trattamento di cellule H1299 con ORF8-His

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 di chemotassi

Migrazione direzionale: chemotassi

ESPERIMENTO 1):

Analisi dell'attivazione di monociti THP1 da cellule epiteliali esposte a ORF8

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

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)

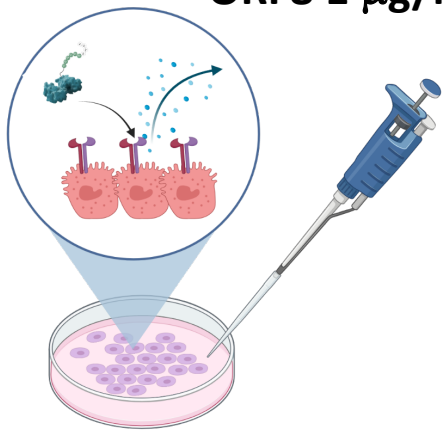
3) **Scelta del saggio**
   Analisi della migrazione direzionale mediante saggio di transwelling

4) **Scelta dello strumento e del tipo di analisi**
   Analisi quantitativa mediante colorazione e conta delle cellule migrate al microscopio

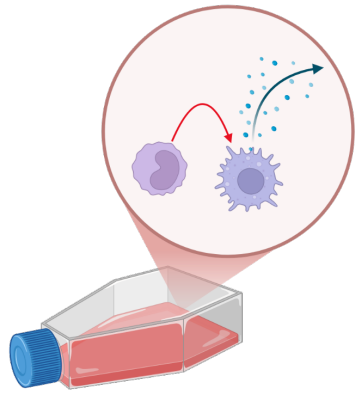
ESPERIMENTO 2A):

Analisi dell'attivazione di monociti THP1 da cellule epiteliali esposte a ORF8

1 Prelievo di terreno condizionato da cellule H1299 trattate con His-ORF8 1 μg/ml



2 Incubazione di CELLULE THP-1 (linea cellulare monocitica) con il terreno condizionato da H1299



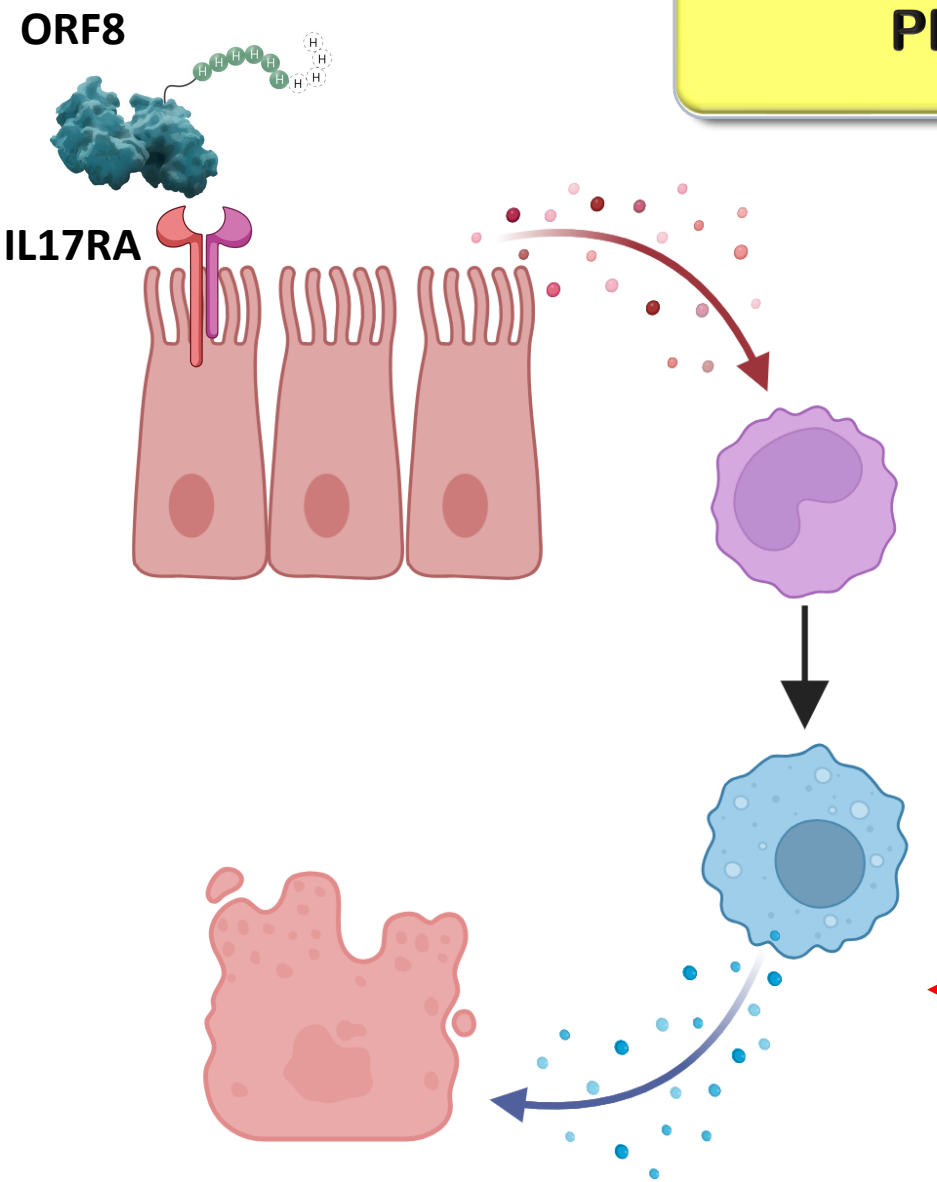
ATTIVAZIONE

3 Analisi della secrezione di TNFα (marker di attivazione) da parte di monociti THP1



Analisi del terreno condizionato da THP1

PIANO SPERIMENTALE



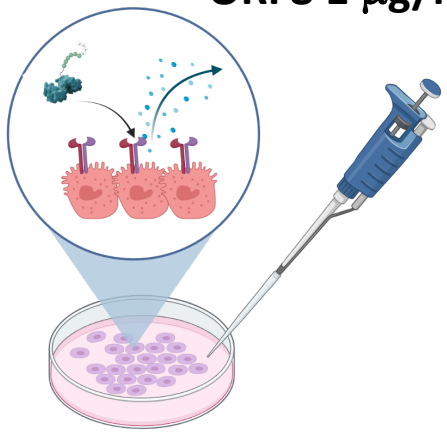
Esperimento 2A) Analisi della capacità delle cellule epiteliali esposte a ORF8 di indurre attivazione di cellule infiammatorie (CI)
Saggio REPORTER per TNFα

Esperimento 2B) Analisi della capacità delle CI attivate di causare tossicità in cellule di polmone
Saggio di VITALITA'

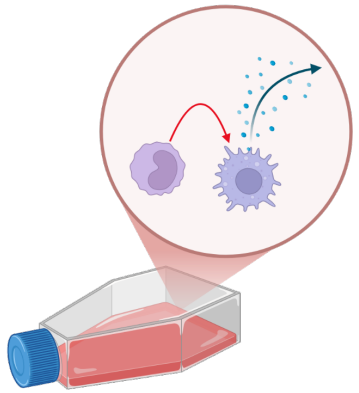
ESPERIMENTO 2A):

Analisi dell'attivazione di monociti THP1 da cellule epiteliali esposte a ORF8

1 Prelievo di terreno condizionato da cellule H1299 trattate con His-ORF8 1 μg/ml



2 Incubazione di CELLULE THP-1 (linea cellulare monocitica) con il terreno condizionato da H1299



ATTIVAZIONE

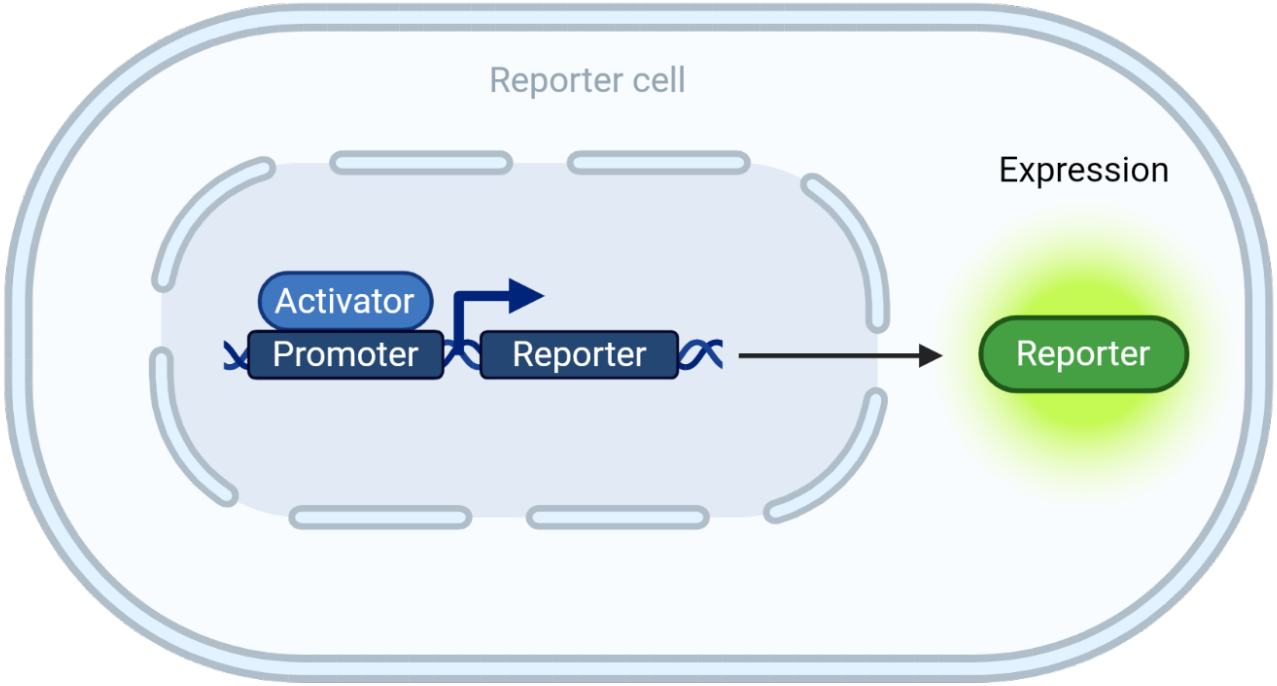
3 Analisi della secrezione di TNFα (marker di attivazione) da parte di monociti THP1



Analisi del terreno condizionato da THP1

Analisi di citochine infiammatorie secrete da monociti attivati mediante SISTEMA REPORTER

SISTEMI REPORTER: la cellula diventa un SENSORE



Gene reporter:
codifica per un prodotto

- direttamente visualizzabile (es. fotoproteina) nella cellula/organismo
- o quantificabile mediante un saggio di attività (enzima) in situ o da lisato cellulare

SISTEMI REPORTER: la cellula diventa un SENSORE



Gene reporter:
codifica per una fotoproteina (visualizzazione diretta) o enzima (saggio di attività, quantitativo)

Luciferasi

Ossida un substrato e produce **chemoluminescenza**; si legge al luminometro.

+ molto sensibile

GFP e simili

Fluorescenza senza substrato; microscopio o citofluorimetro.

+ cellule vive, singola cellula

– meno sensibile, risposta lenta

SEAP

Fosfatasi alcalina **secreta**: si misura nel surnatante con un substrato **colorimetrico**.

+ cellule intatte, più letture nel tempo

β-galattosidasi

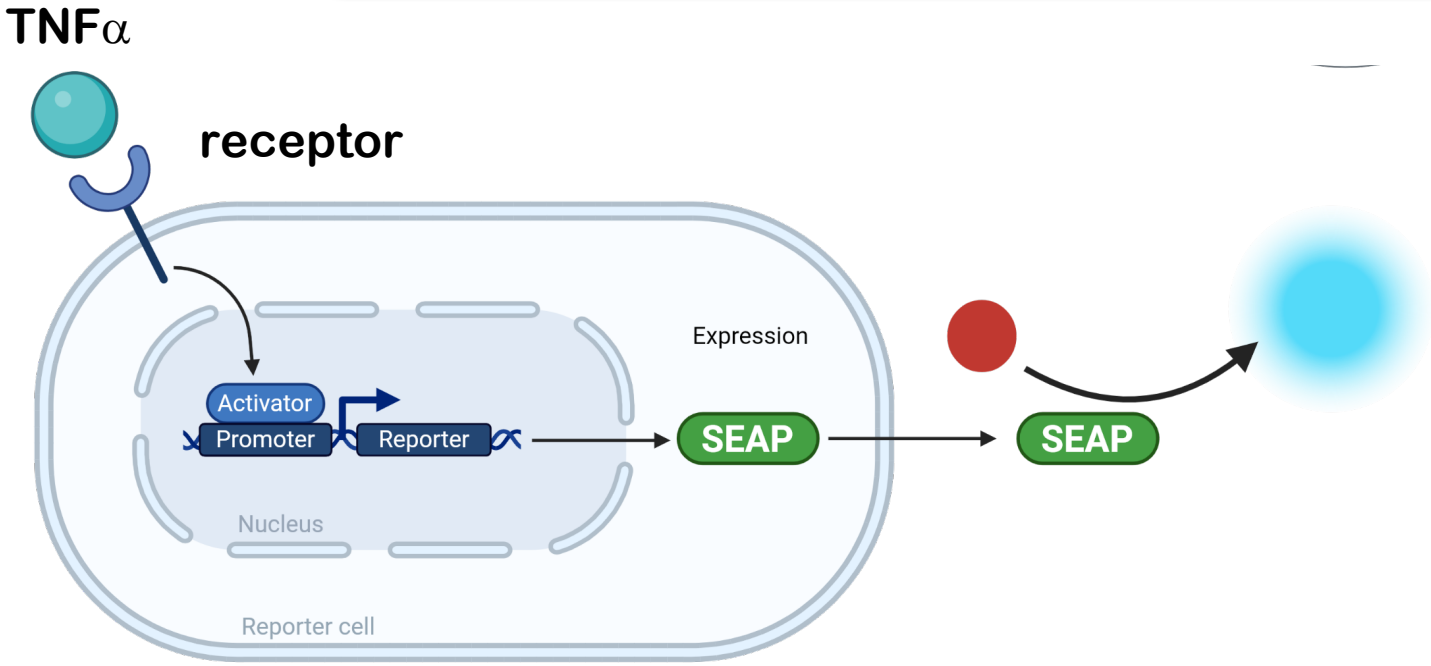
Gene *lacZ*: con X-gal le cellule diventano **blu**.

+ economica, visibile al microscopio

– poco quantitativa

Saggio transiente o linea stabile: il costrutto si trasfetta per un singolo esperimento, oppure si integra nel genoma e si seleziona una linea cellulare reporter pronta all'uso.

Utilizzo di una linea cellulare SEAP REPORTER per la rilevazione di citochine infiammatorie (TNFα)



Come è costruita

HEK293 con **TNFR1 e TNFR2** umani e il gene **SEAP** sotto un promotore attivato da NF-κB e AP-1, integrati in modo stabile.

Lettura con QUANTI-Blue

Si preleva il surnatante e si aggiunge il substrato: più SEAP, più il colore vira.

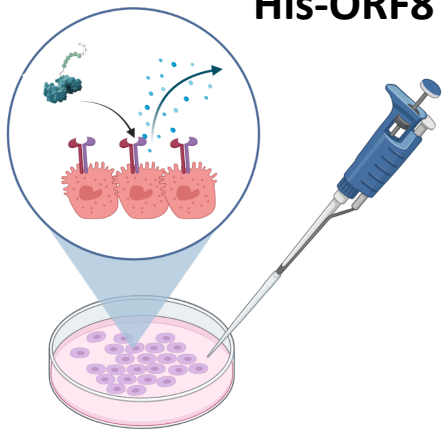


rosa → blu
assorbanza ~ 630 nm

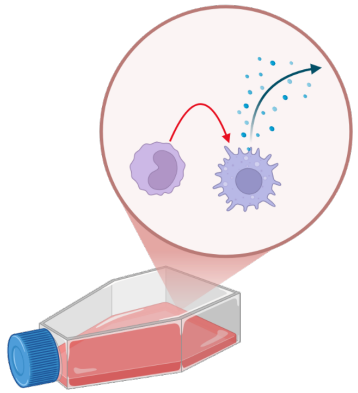
Secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP), a truncated form of placental AP, is a widely used reporter gene. SEAP is secreted into cell culture supernatant and therefore offers many advantages over intracellular reporters. A wide collection of reporter cell lines with the SEAP reporter gene is commercially available.

ESPERIMENTO 2): Analisi della secrezione di TNFα da monociti attivati (da cellule epiteliali esposte a ORF8) mediante cellule SEAP-reporter

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



Incubazione di CELLULE THP-1 (linea di monociti) con il terreno condizionato

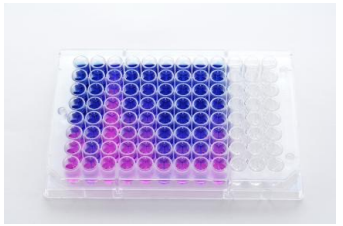


Attivazione: secrezione di citochine Infiammatorie (TNFα, …)

Terreno condizionato



Aggiunta del terreno di THP1 alle cellule reporter HEK-blue e saggio colorimetrico SEAP

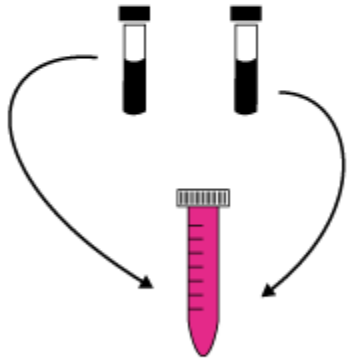


Saggio colorimetrico SEAP-reporter con reagente QUANTI-Blue

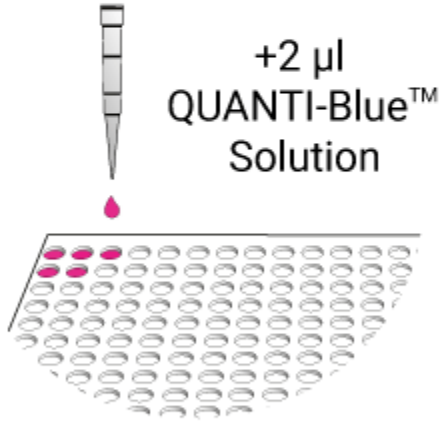
01 Prepare QUANTI-Blue™ Solution

02 Add detection reagent to cell culture plate and mix using a plate shaker

03 Incubate at 37°C for 15 min to 6 h



Add 1 ml QB reagent and 1 ml QB buffer to 15 ml sterile H_2O



1536-well plate

04 Measure OD using a microplate reader