

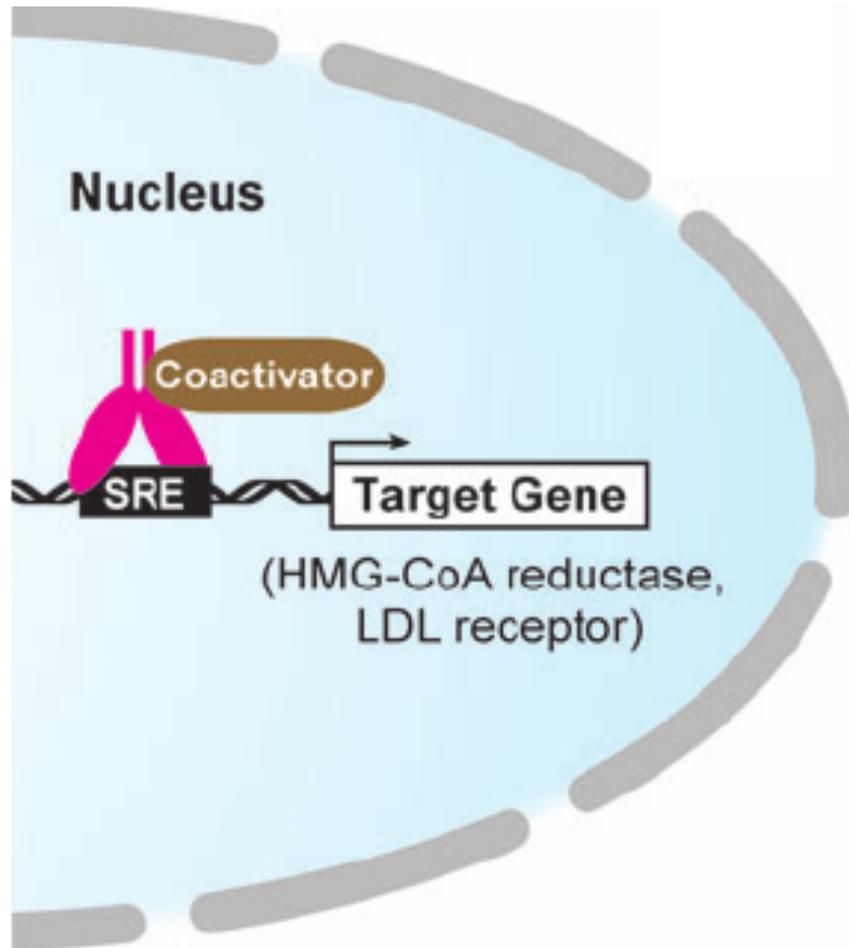
**Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche**

**AA 2018-2019**

**Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare**

**Lezione 4**

## Studio dei fattori di trascrizione SREBP, che controllano la disponibilità di colesterolo e lipidi di membrana

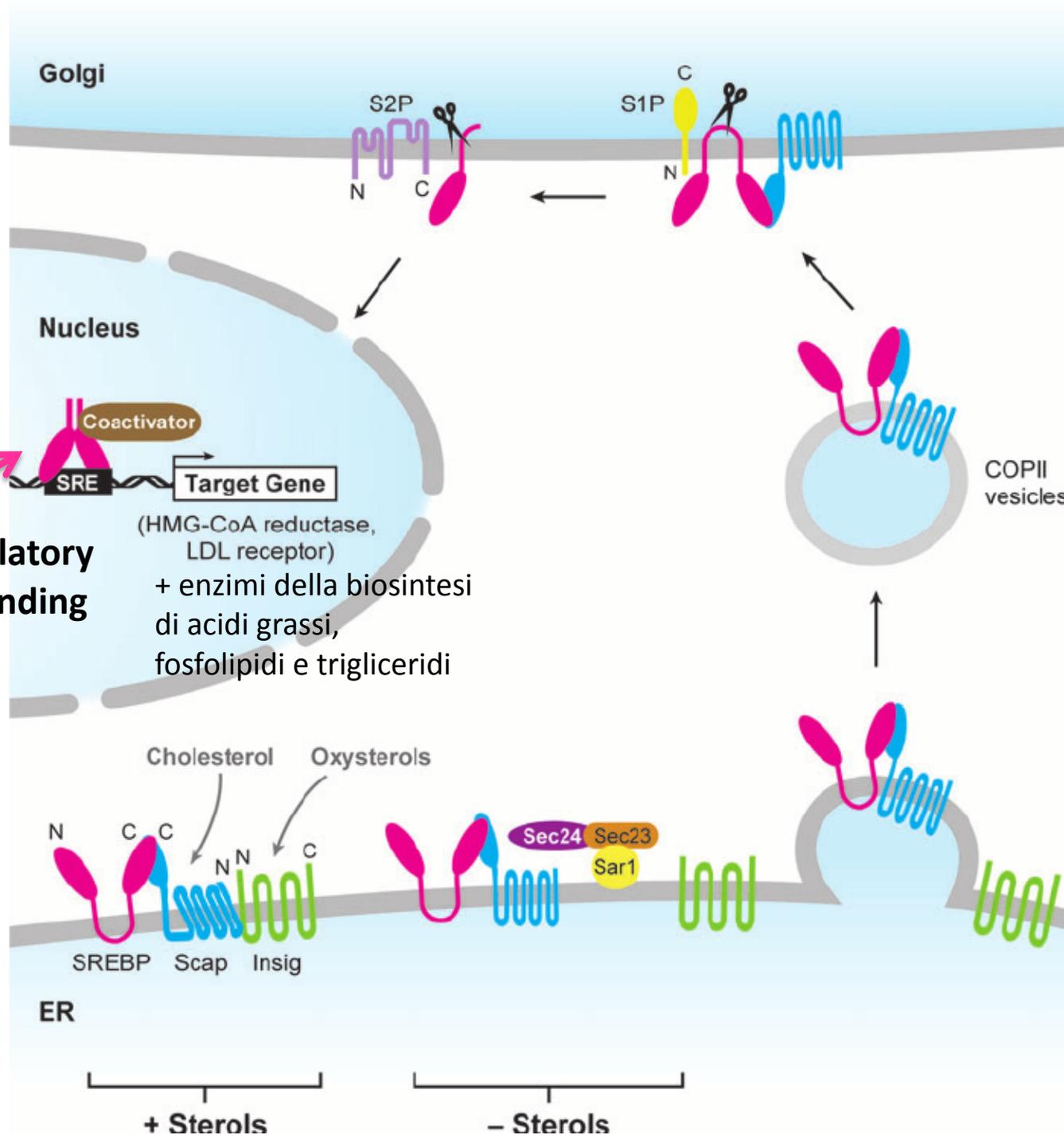


Le cellule necessitano di colesterolo e lipidi per la sintesi delle membrane, per svolgere le normali funzioni e soprattutto quando sono in attiva proliferazione oppure devono migrare.

Bassi livelli di colesterolo inducono nella cellula l'espressione del recettore per le LDL e la biosintesi (enzima HMG-CoA reduttasi).

Ciò avviene attraverso la regolazione della disponibilità dei fattori di trascrizione che inducono questi geni:  
SREBP = Sterol Regulatory Element Binding Proteins

**Sterol regulatory element Binding Protein**



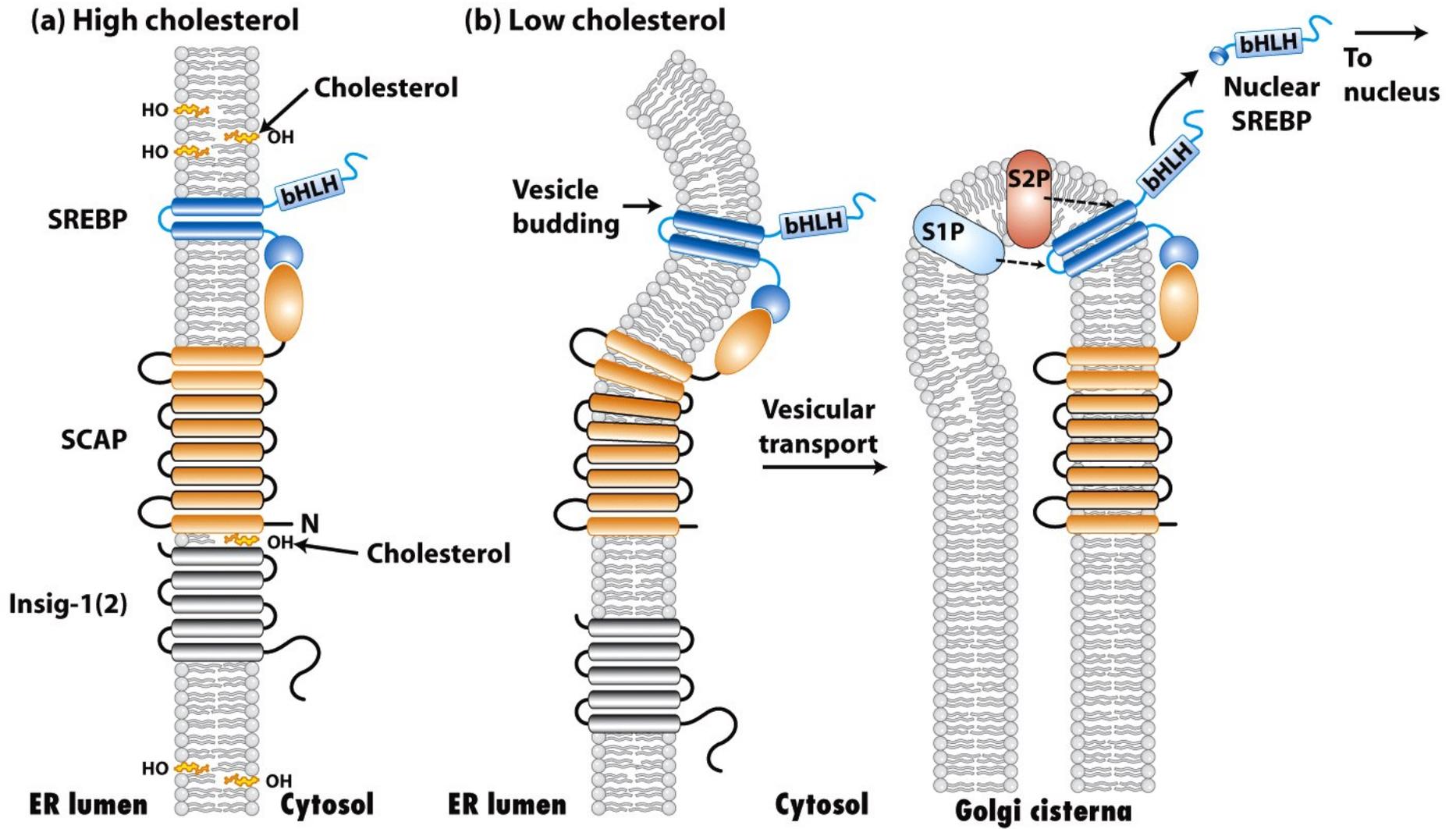
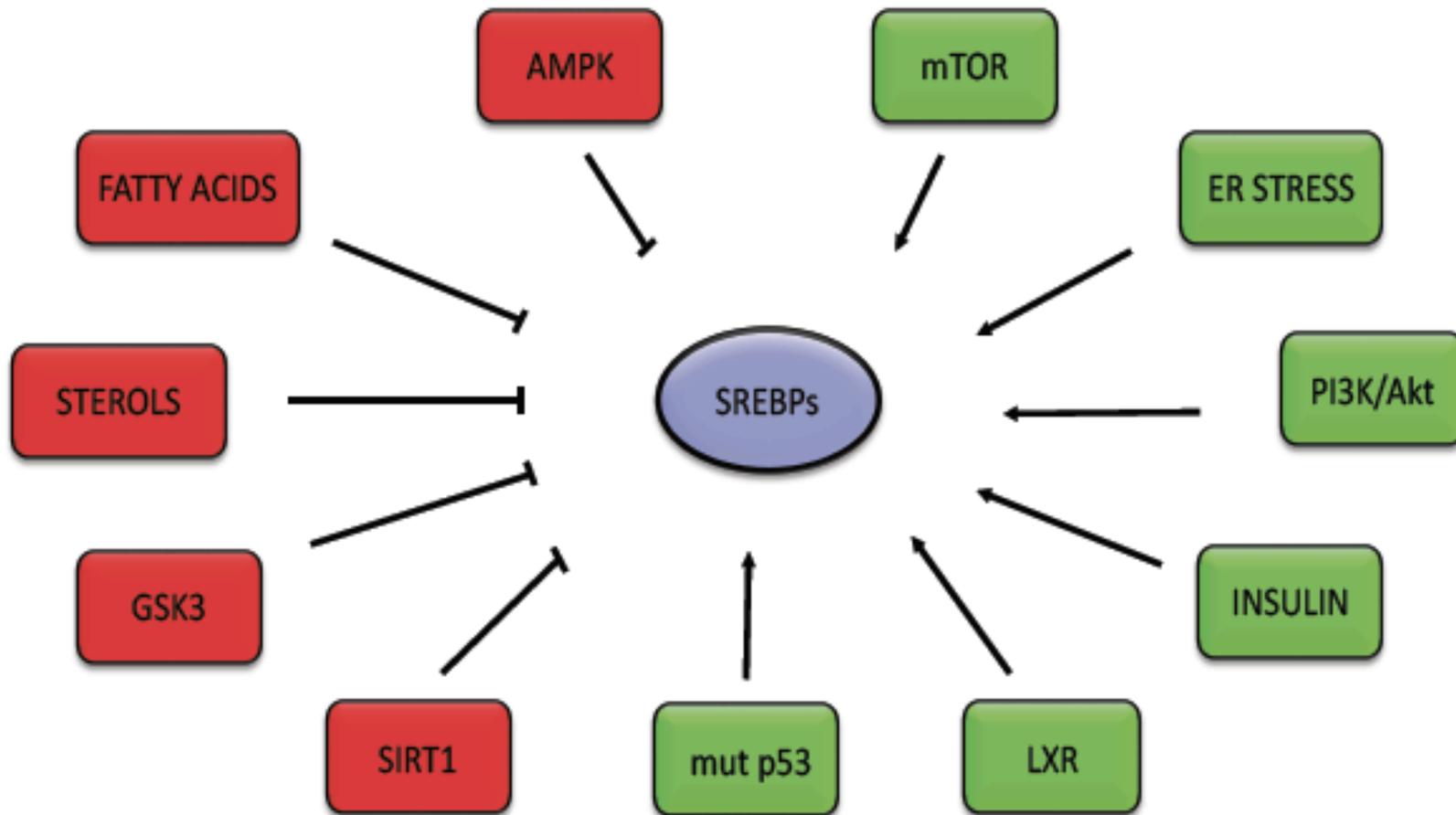
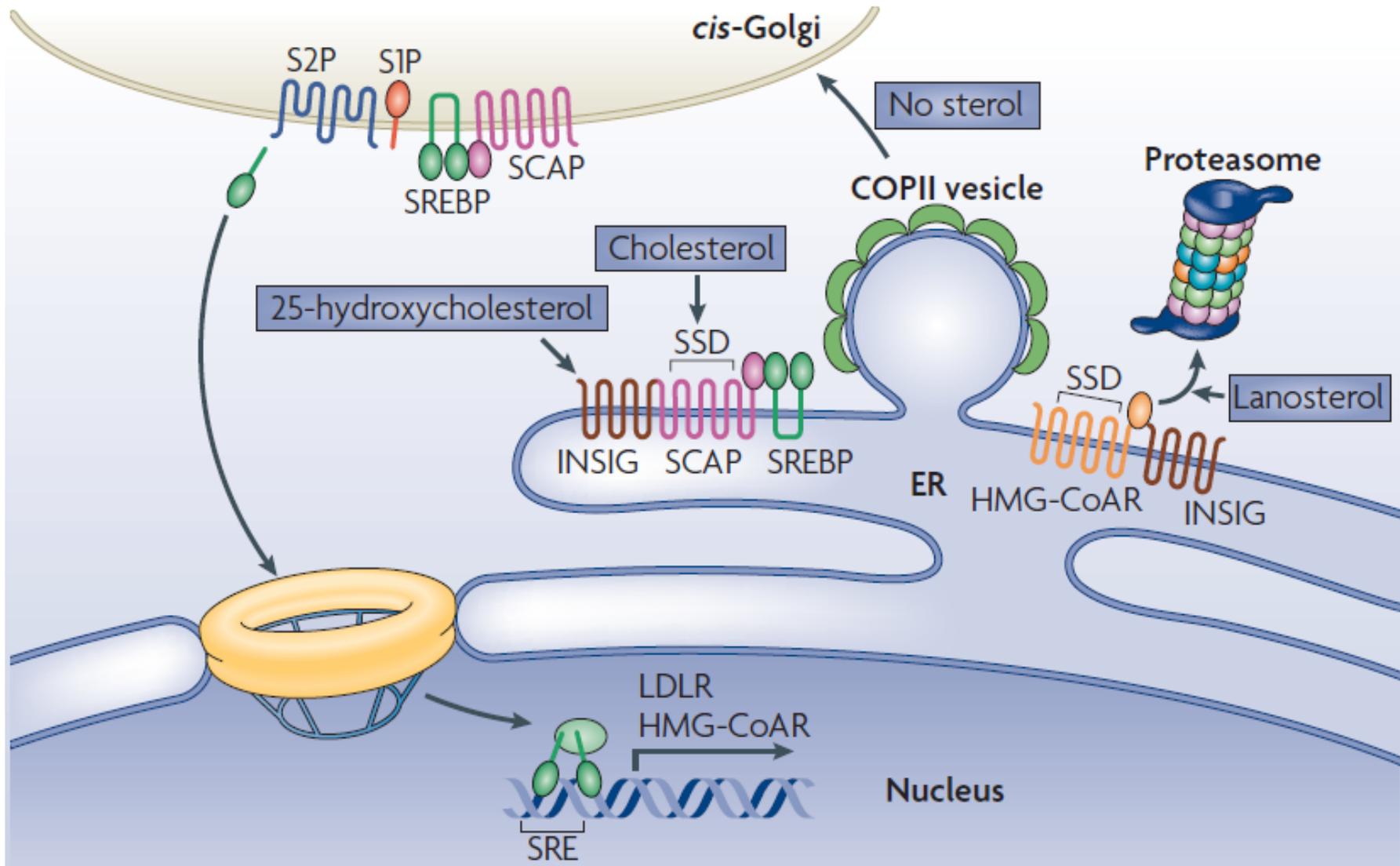


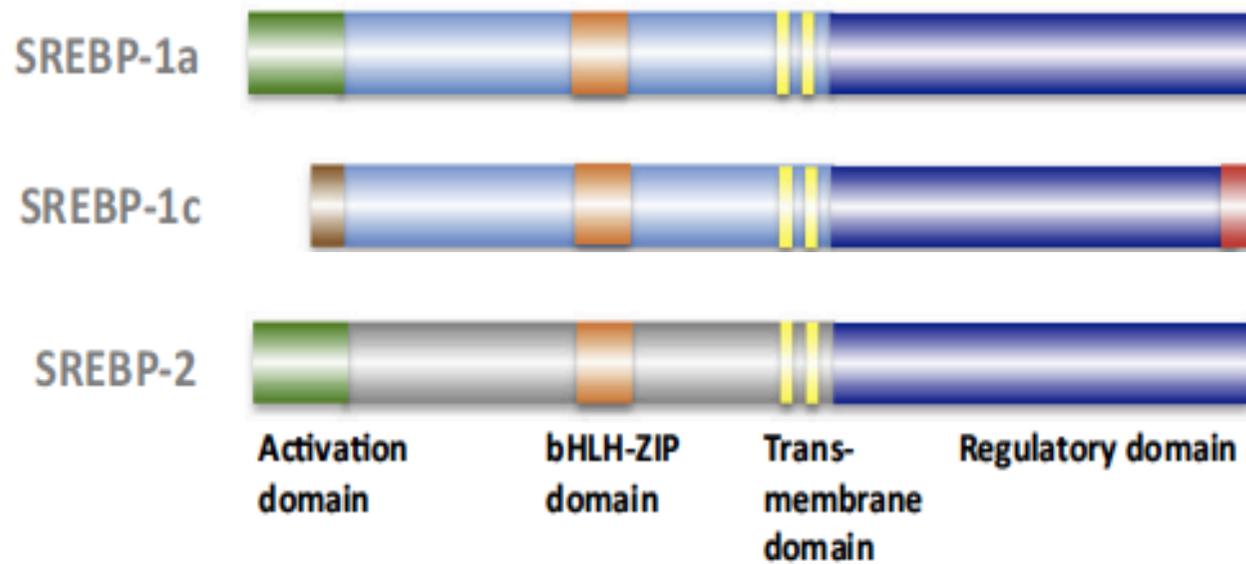
Figure 16-38  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
 © 2008 W. H. Freeman and Company

## Regolatori dei fattori di trascrizione SREBP nella cellula





## I fattori di trascrizione SREBP = sterol regulatory element binding proteins



## **Domande:**

- 1. Come possiamo seguire sperimentalmente i cambiamenti nella localizzazione subcellulare delle proteine SREBP?**
- 2. Come possiamo comprendere i meccanismi attraverso cui i fattori SREBP regolano la trascrizione dei propri geni bersaglio?**
- 3. Come possiamo comprendere il contributo dei fattori SREBP alla proliferazione e alla migrazione cellulare?**

## **Domande:**

- 1. Come possiamo seguire sperimentalmente i cambiamenti nella localizzazione subcellulare delle proteine SREBP?**
- 2. Come possiamo comprendere i meccanismi attraverso cui i fattori SREBP regolano la trascrizione dei propri geni bersaglio?**
- 3. Come possiamo comprendere il contributo dei fattori SREBP alla proliferazione e alla migrazione cellulare?**

**Per effettuare questi esperimenti possiamo utilizzare le colture cellulari, introducendo nelle cellule opportuni vettori per l'espressione dei fattori SREBP (ed altri geni "reporter") e quindi confrontando diverse condizioni sperimentali.**

**TRASFERIMENTO DI ACIDI NUCLEICI  
IN CELLULE DI MAMMIFERO**

### **TRASFEZIONE:**

**Trasferimento di acidi nucleici in cellule eucariotiche (in coltura o in vivo) mediante metodi fisici o chimici**

### **INFEZIONE:**

**Procedura per il trasferimento di acidi nucleici mediante infezione di cellule (in coltura o in vivo) con virus contenenti vettori basati sul genoma virale**

## Acido nucleico

## applicazione

**Vettore  
contenente cDNA**

**espressione di proteine**

**Costrutto cont. promotore**

**analisi regolazione trascrizionale**

**RNA  
siRNA  
miRNA  
(o costrutto contenente  
precursore)**

**espressione di una proteina**

**inibizione dell'espressione  
di una proteina**

## Trasfezione di vettori di espressione contenenti cDNA

### scopi:

- Studio della **funzione** di un gene (codificante o non codificante)
- ✓ Caratterizzazione biochimica
- ✓ Analisi della **localizzazione** subcellulare
- ✓ Analisi delle **interazioni** con altre componenti cellulari
- ✓ Analisi degli **effetti** sulla cellula
- ✓ Analisi **mutazionale**
- ✓ Analisi di **elementi regolativi**
- **Produzione** e purificazione di una specifica proteina

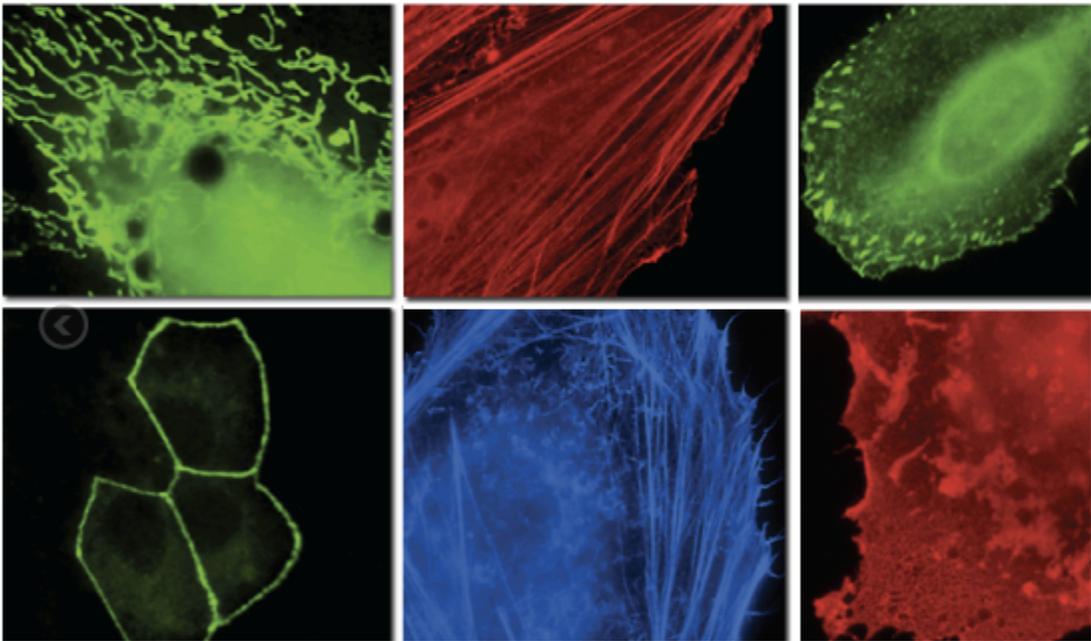
**Esperimento 1:**

**Sovraespressione transiente di proteine  
allo scopo di osservarne la localizzazione subcellulare**

## Come procedo per procurarmi i cDNA da esprimere?

- 1a. Dalla letteratura, ottengo i riferimenti degli autori di pubblicazioni rilevanti e scrivo una **richiesta agli autori**
- 1b. In alternativa, cerco il clone in un repository (Addgene)
2. **Otengo il cDNA** inserito in un vettore “shuttle” e lo utilizzo per trasformare un ceppo batterico in modo da **amplificare ed estrarre il costrutto**
3. Controllo il costrutto mediante **analisi di restrizione** ed eventualmente sequenziamento del DNA
4. Procedo al **subclonaggio (spostamento)** in un **vettore** adatto al mio scopo
5. Scelgo la **tecnica di trasfezione** appropriata per inserire il costrutto nelle cellule scelte per l’esperimento

This website uses cookies to ensure you get the best experience. By continuing the use this site, you agree to the use of cookies. [Close](#)



### Light Up Your Research

Choose the best fluorescent proteins for your experiments from Addgene's large collection.

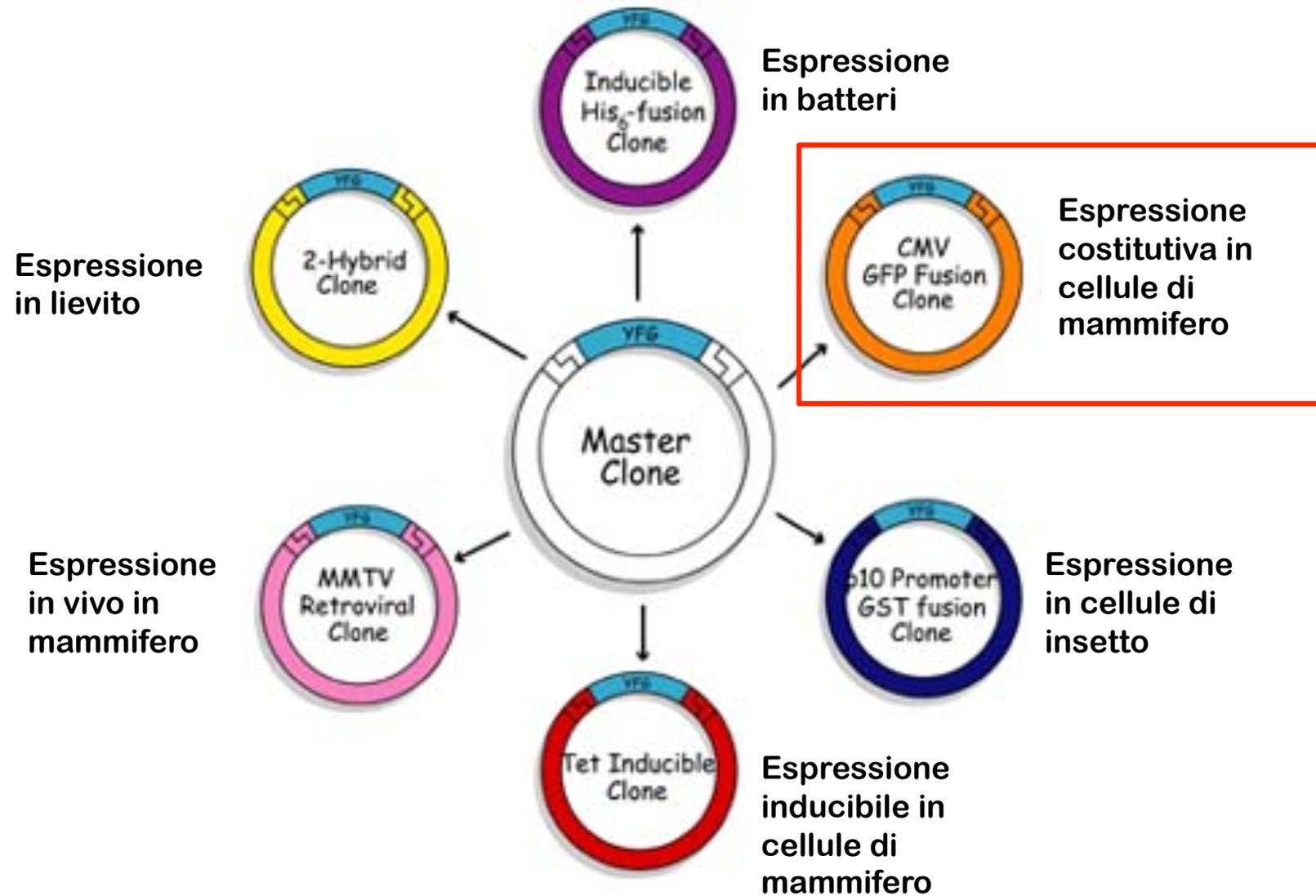
[Browse Fluorescent Proteins](#)

### Special Collections

[View All](#) »

 [Viral Service](#) [CRISPR Tools](#) [Fluorescent Proteins](#) [Cancer Resources](#)

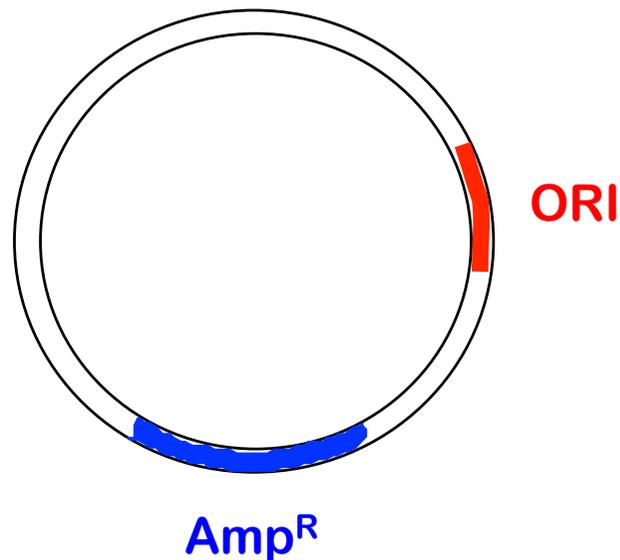
# Subclonaggio del master clone da un vettore shuttle



## Caratteristiche dei vettori plasmidici di espressione per cellule eucariotiche

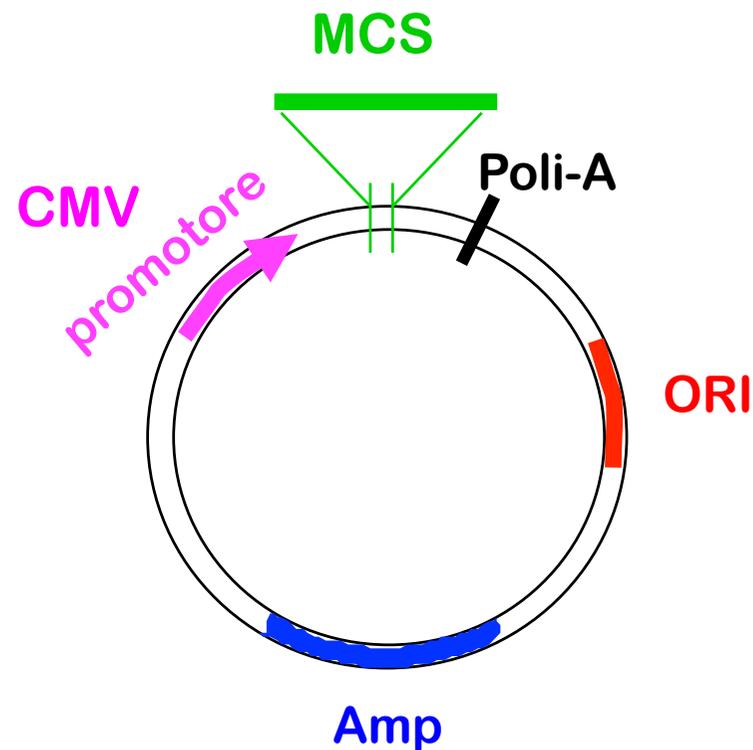
1) Sequenze necessarie per il mantenimento e l'amplificazione in **batteri**

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

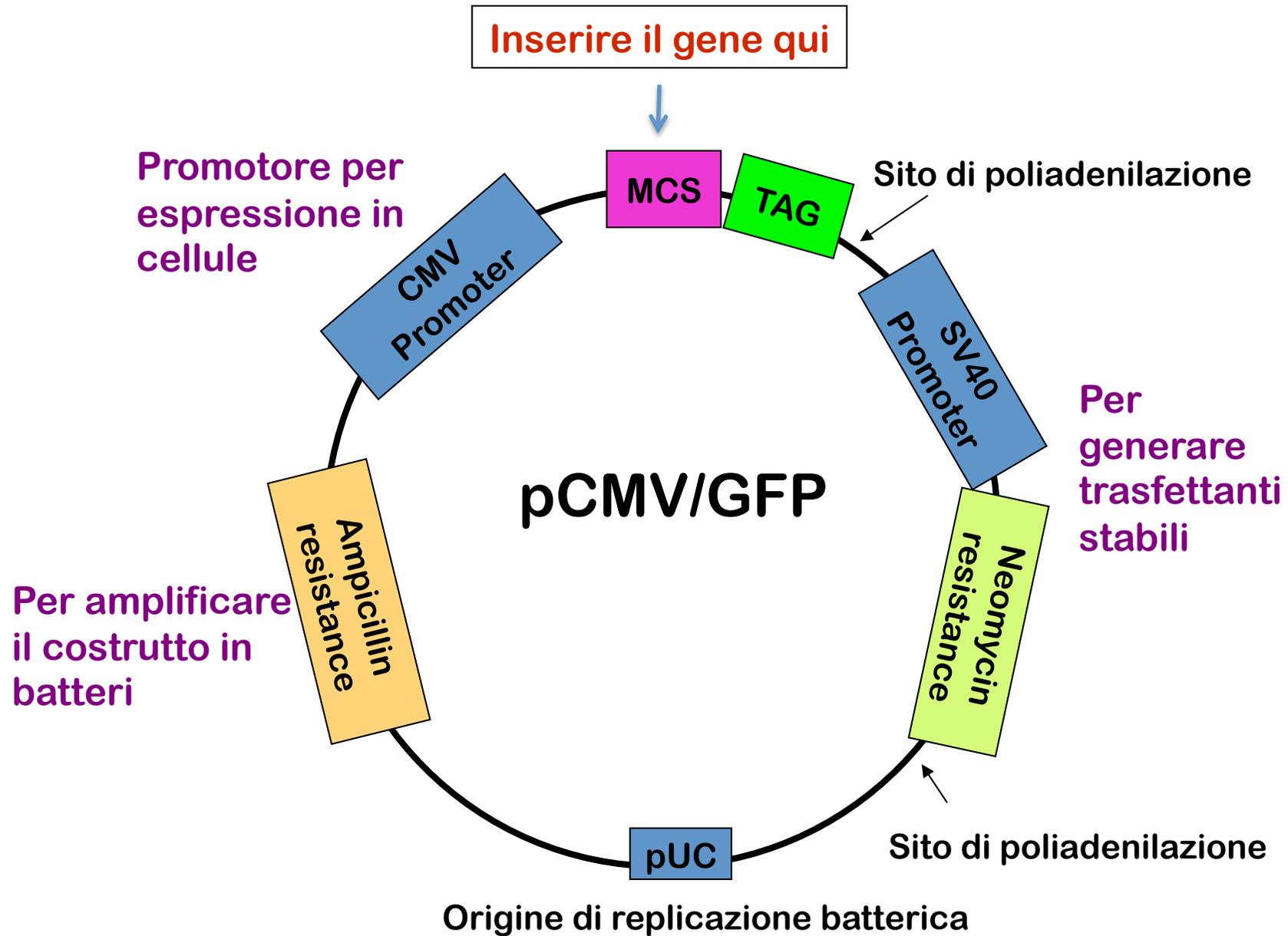


2) Sequenze necessarie al **clonaggio** del gene e alla sua **espressione** in cellule **eucariotiche**:

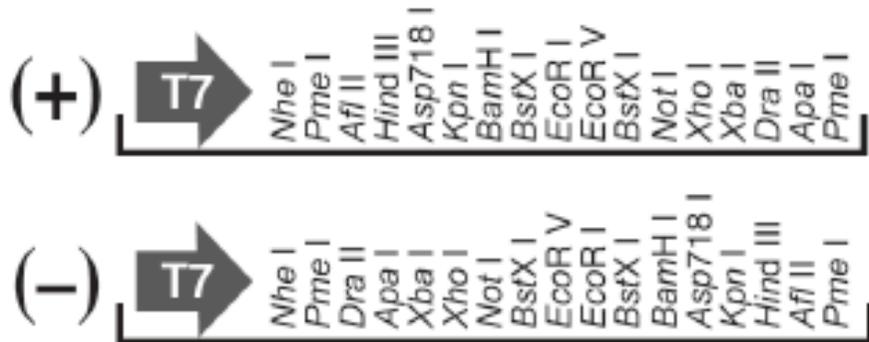
- **MCS** (sito di clonaggio multiplo)
- **promotore** forte virale (CMV, SV40...)
- **segnale di poliadenilazione**



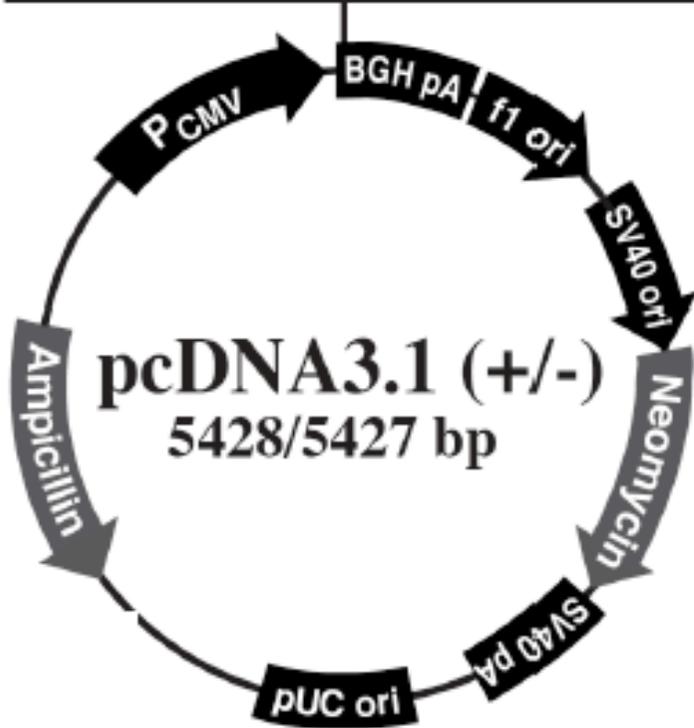
# Vettore per espressione di cDNA



# Il vettore pCDNA



**P<sub>CMV</sub>**: CMV enhancer-promoter  
**BGHpA**: BGH polyadenylation signal and termination sequence  
**f1 ori**  
**SV40 ori**  
**SV40 polyadenylation signal**  
**ampicillin resistance gene**  
**pUC origin**



# Espressione di proteine di fusione e TAGs

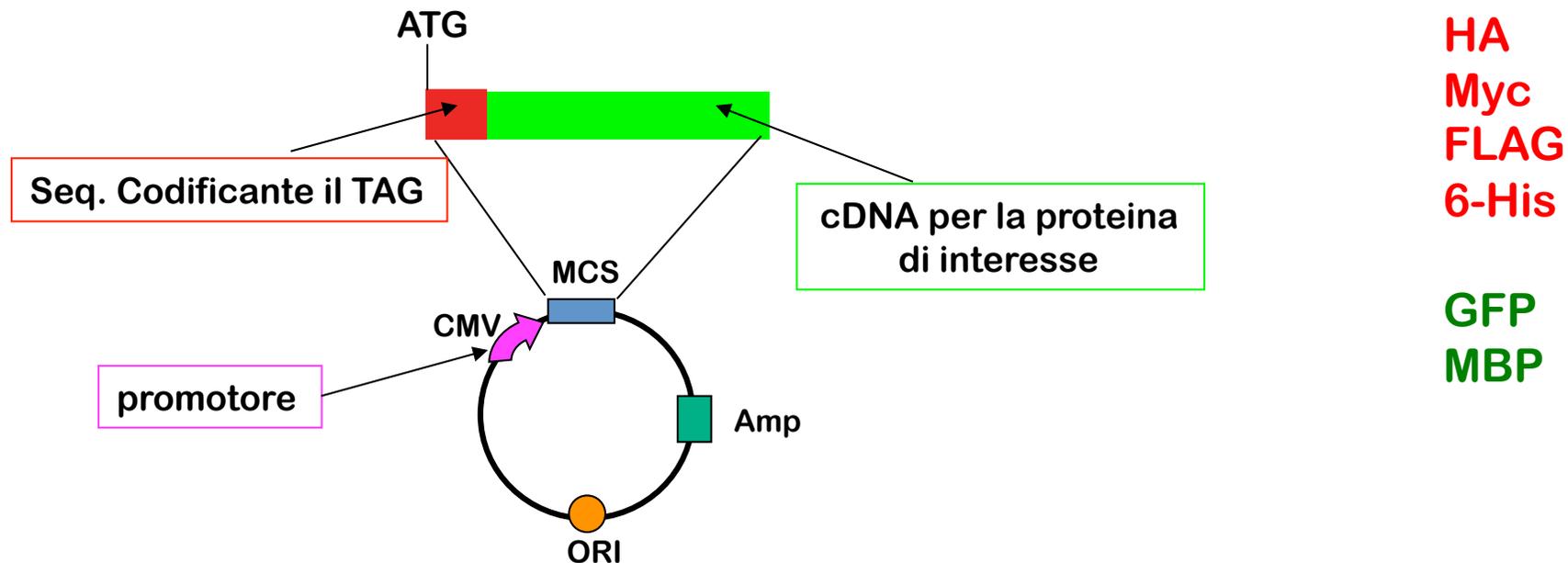
Allo scopo di VISUALIZZARE, ISOLARE O PURIFICARE una proteina sovraespressa,

è possibile sovraesprimere la **proteina in fusione** con un **polipeptide (GFP, MBP)** o con un **TAG** = un corto **peptide (epitopo** formato da 10 aa in media) che non modifichi le proprietà biologiche della proteina

La sequenza codificante il TAG è inserita in un **vettore di espressione** e **clonata 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:

**NB: bisogna controllare che la cornice di lettura sia mantenuta!**

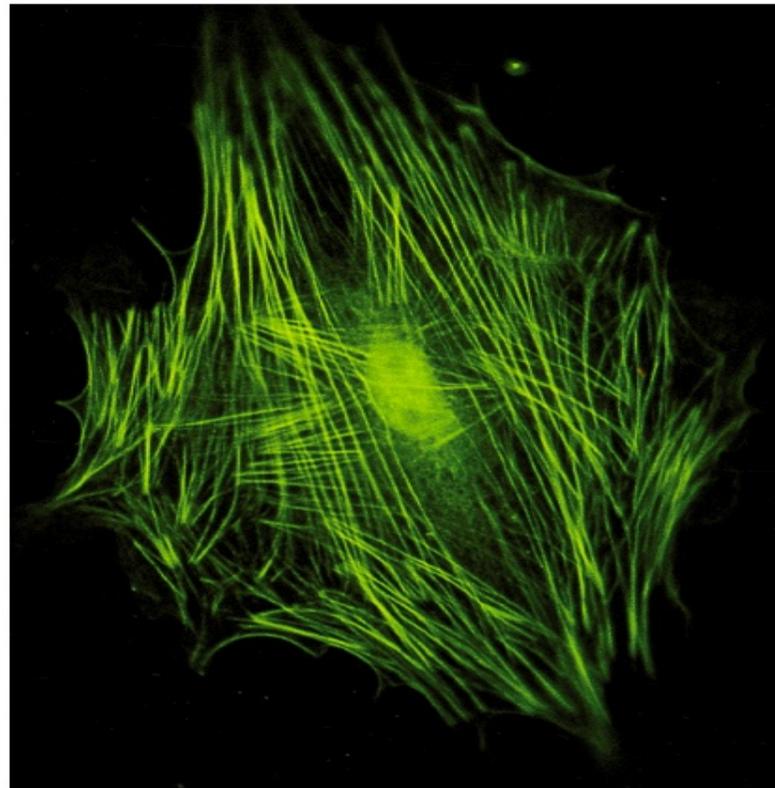




**PROBLEMA:**

**DOVE (in quale organello-cellula- tessuto) è espressa una proteina di interesse? VISUALIZZARE LA PROTEINA**

**Soluzione: FUSIONE del cDNA con un gene reporter facilmente visualizzabile (es. GFP)**



## GFP = Green Fluorescent Protein

◆ Proteina di circa 27 Kda isolata dalla medusa *Aequora victoria*

◆ Ha **FLUORESCENZA INTRINSECA**:

Il cromoforo è un

**TRIPETIDE CICLICO**

codificato nella

sequenza primaria,

che si forma mediante

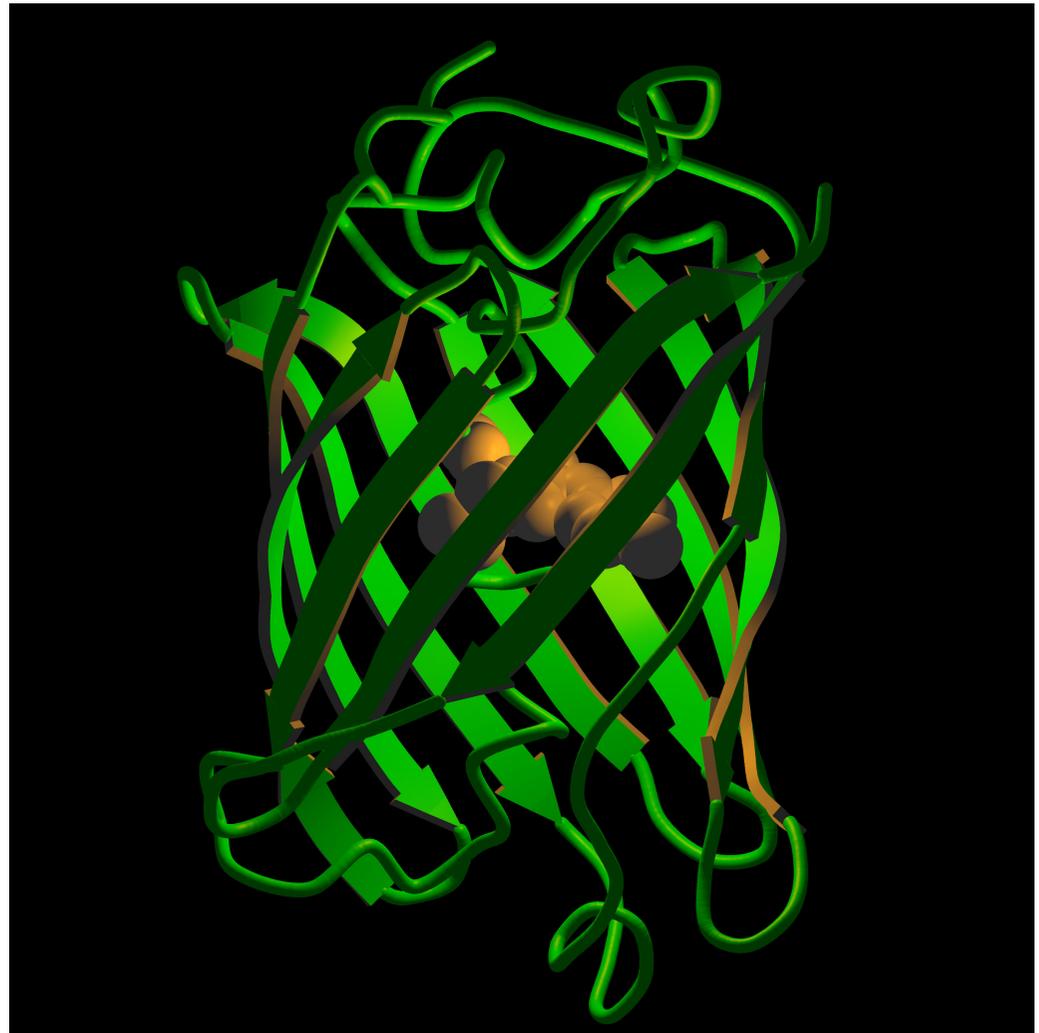
reazione autocatalitica

◆ Assorbe ed emette nel **visibile**

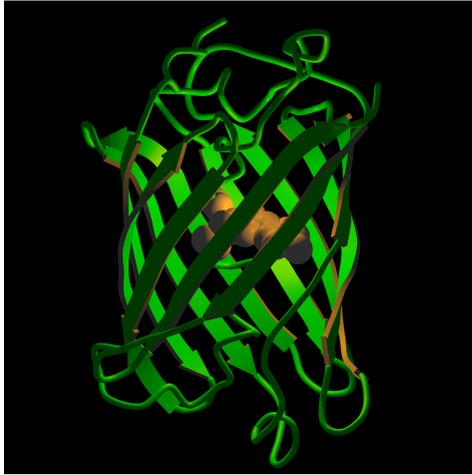
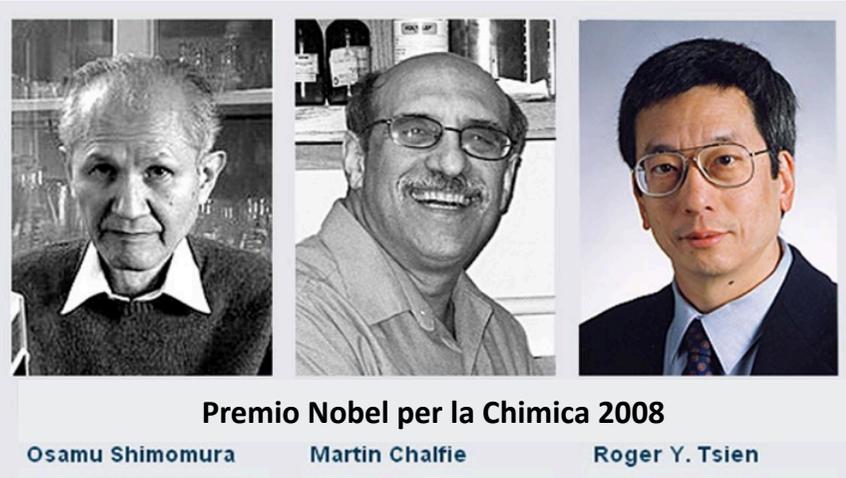
Osservazione al microscopio  
a fluorescenza

Ex: 475 nm

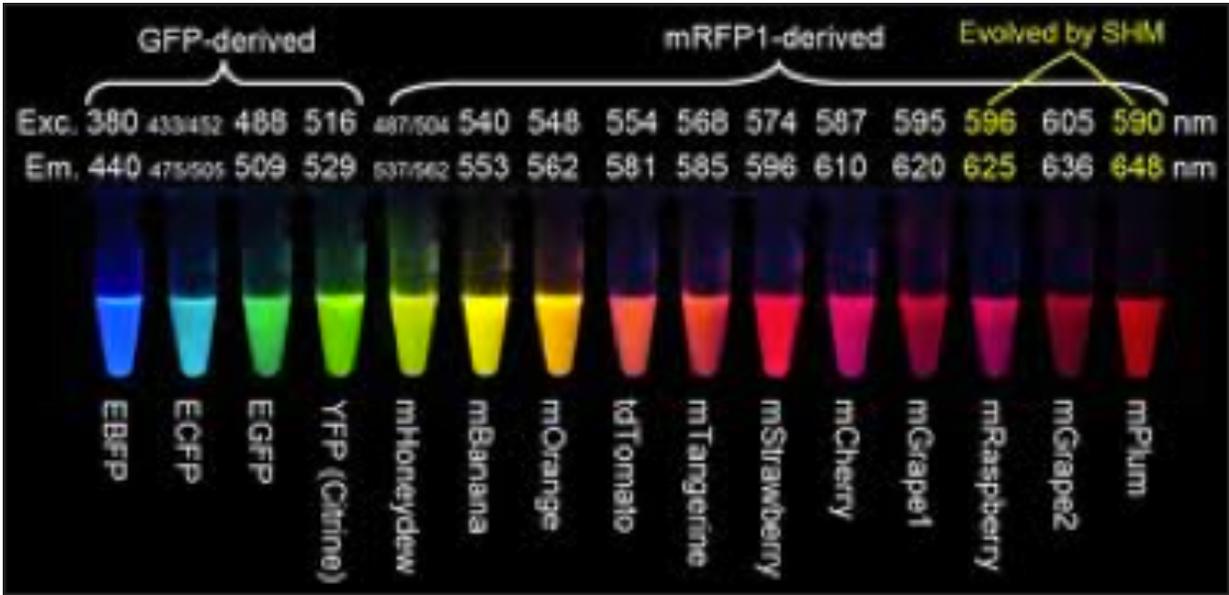
Em: 525 nm



# Imaging con reporters fluorescenti (fotoproteine)



GFP  
 ↓  
 EGFP etc.

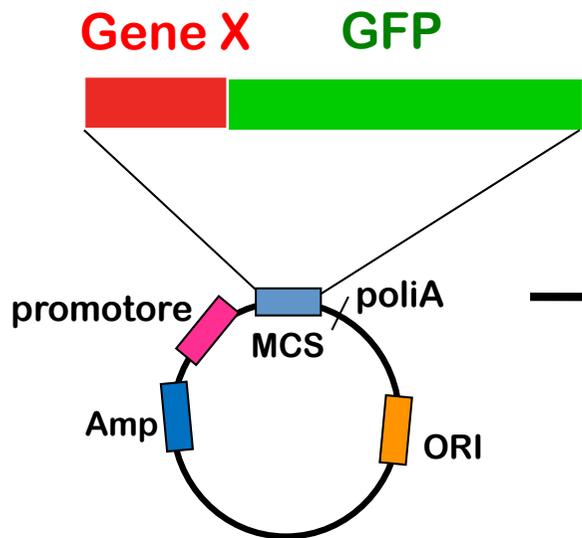
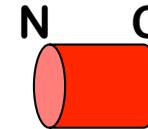


# Utilizzo di fotoproteine per determinare la LOCALIZZAZIONE di una proteina di interesse (espressa in fusione)

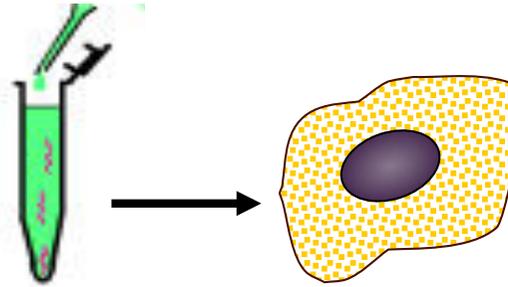
Gene X



Codifica per la proteina di interesse X

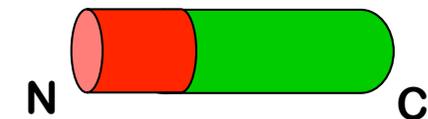


Trasfezione



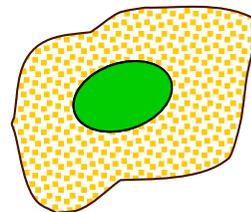
Trascrizione e traduzione:

espressione della proteina di fusione nelle cellule



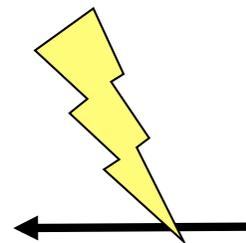
La proteina X assume la sua tipica localizzazione intracellulare

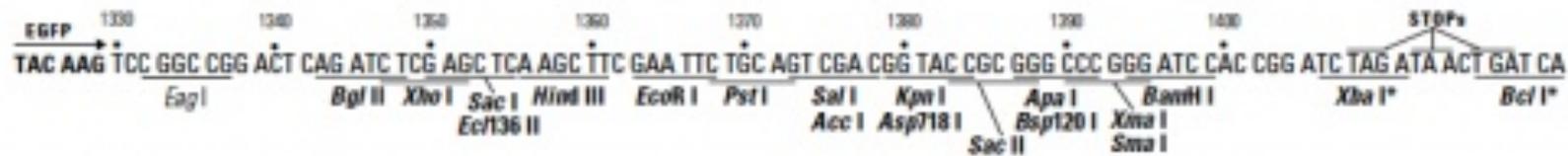
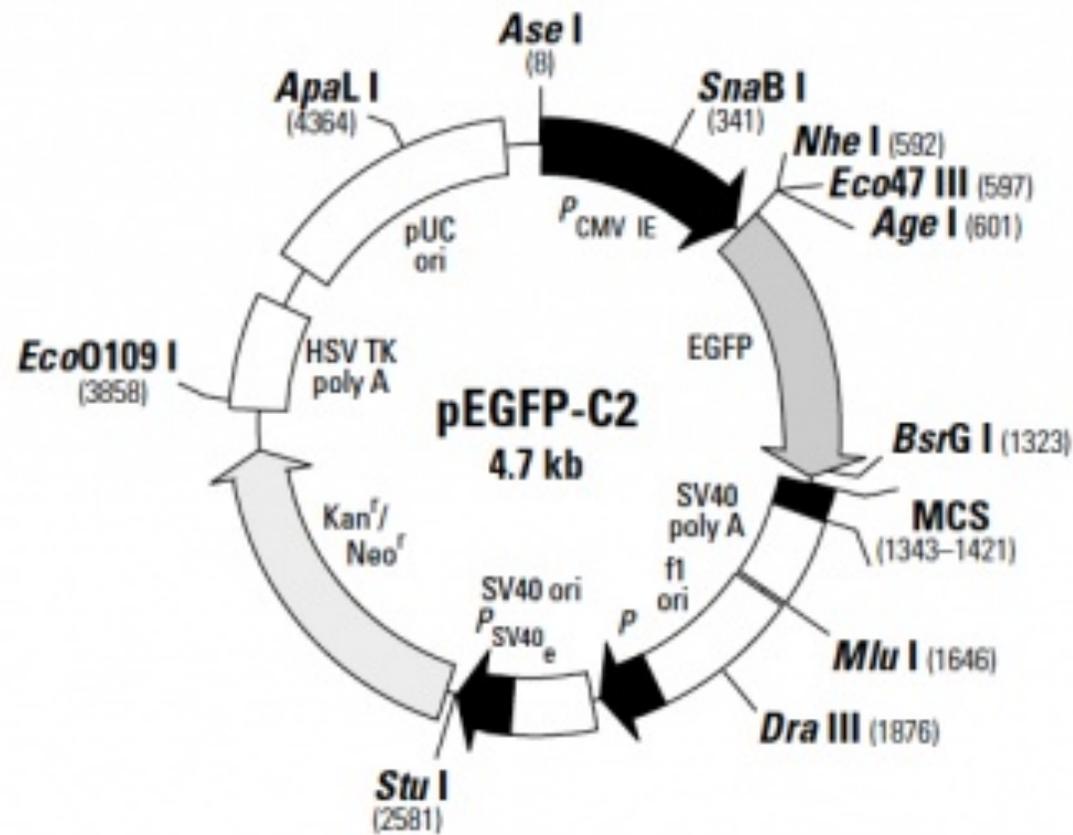
Visualizzazione in situ



Osservazione al microscopio a fluorescenza

Ex: 475 nm  
Em: 525 nm





**Problema:**

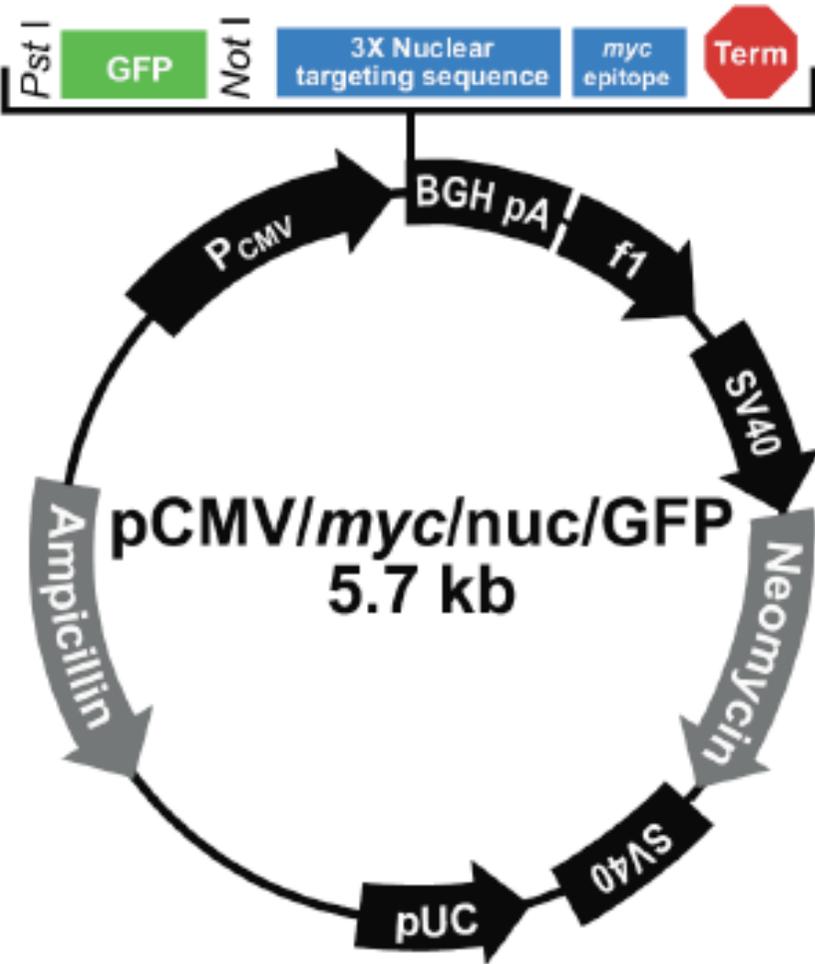
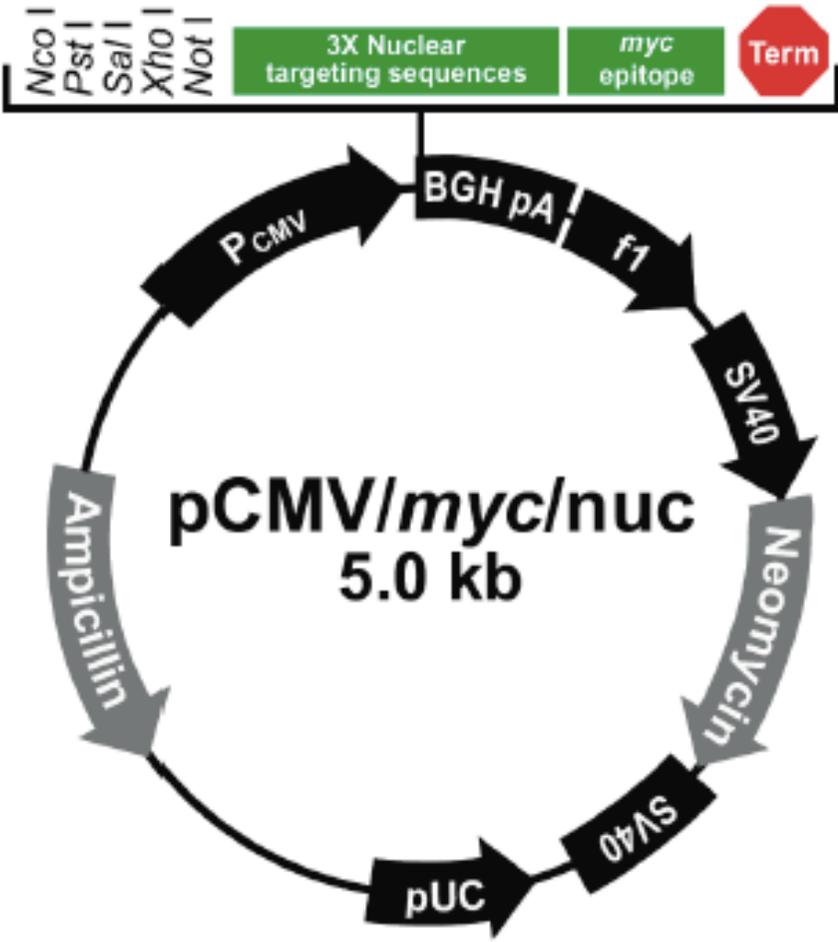
**dirigere l'espressione di una proteina ectopica a  
una specifica localizzazione subcellulare**

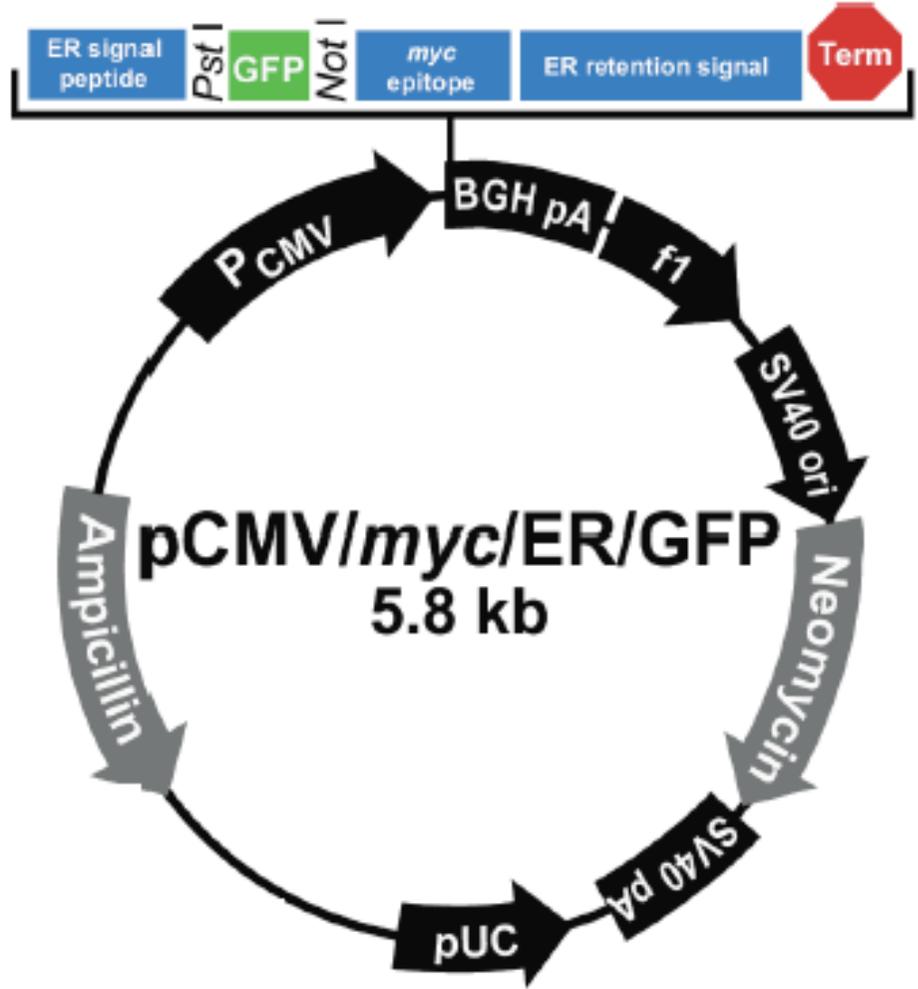
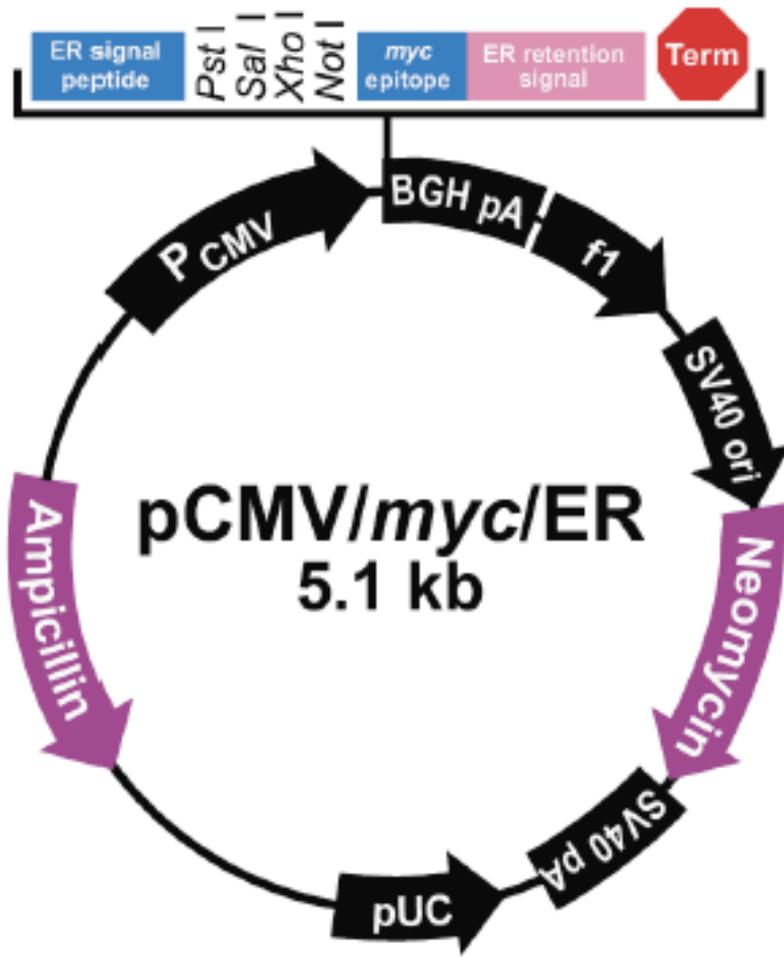
**Problema:**

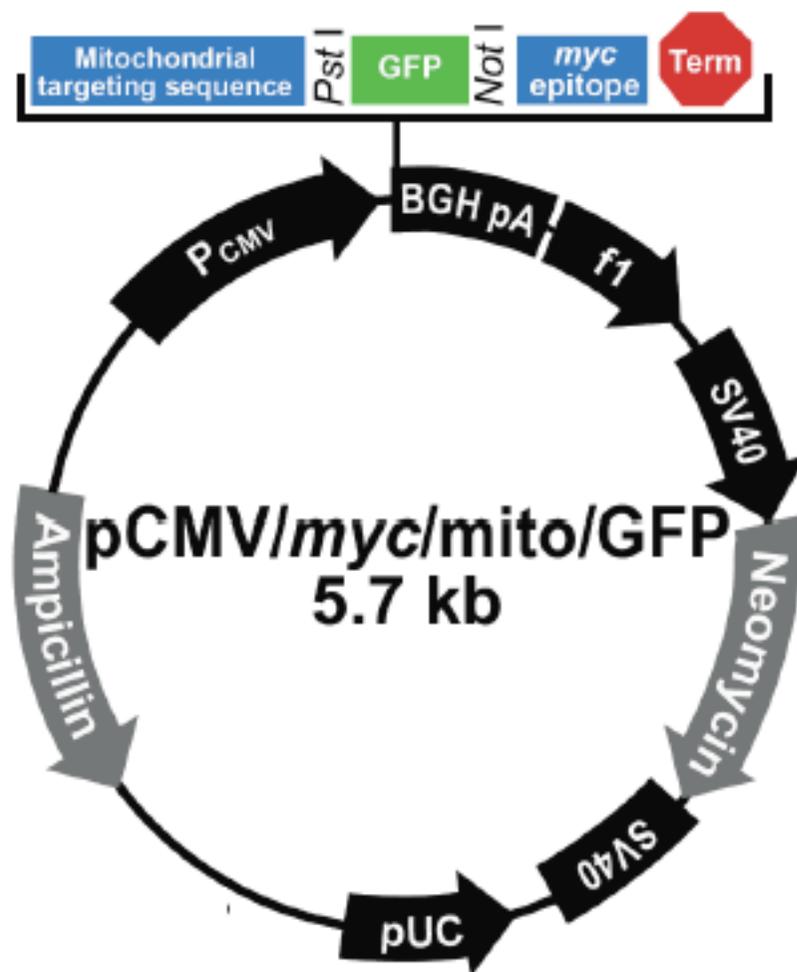
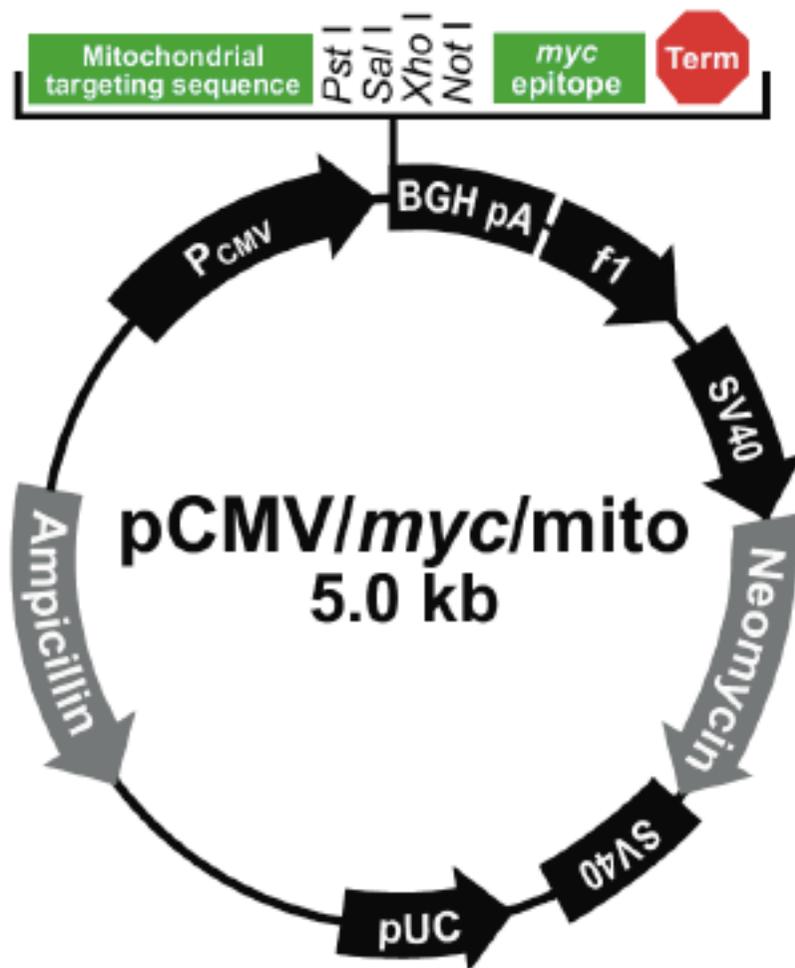
**dirigere l'espressione di una proteina ectopica a  
una specifica localizzazione subcellulare**

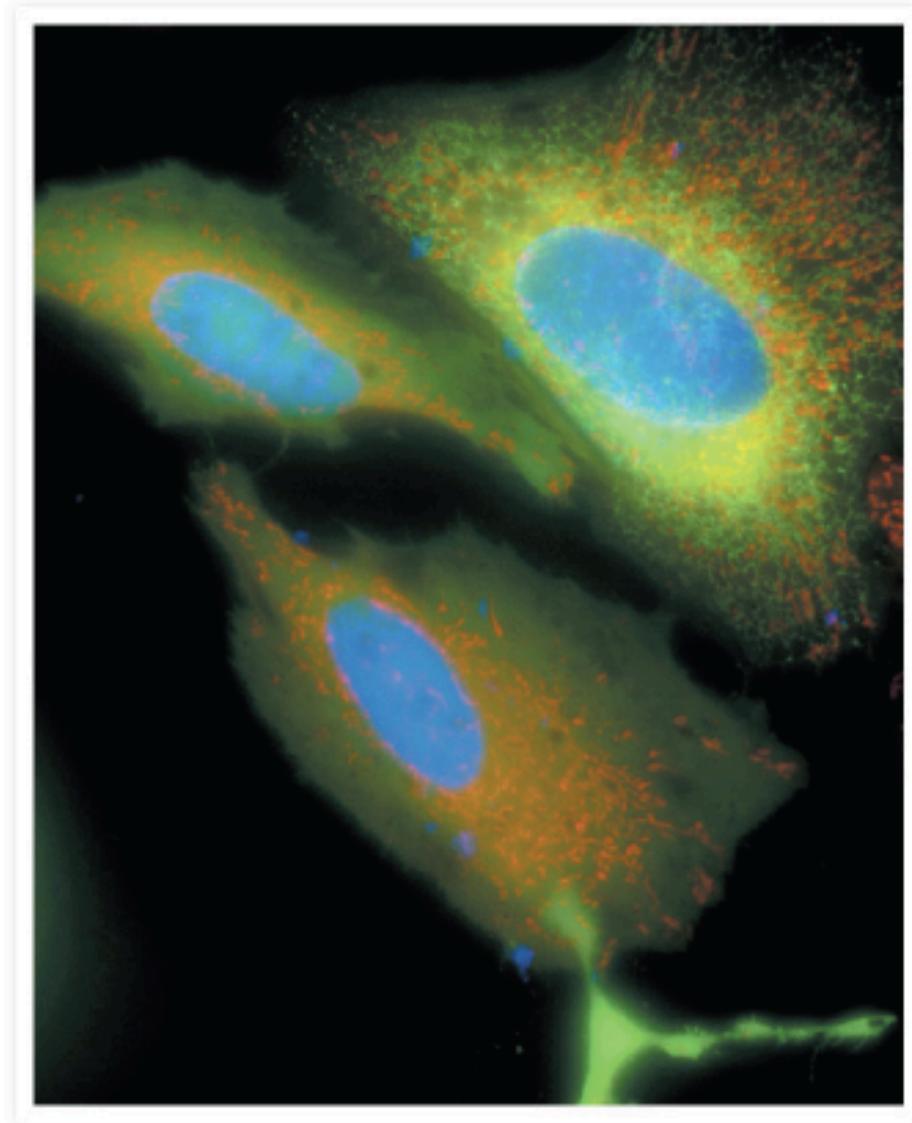
**Soluzione: vettori di espressione che contengono  
sequenze SEGNALE**

# Localizzazione subcellulare di proteine di fusione

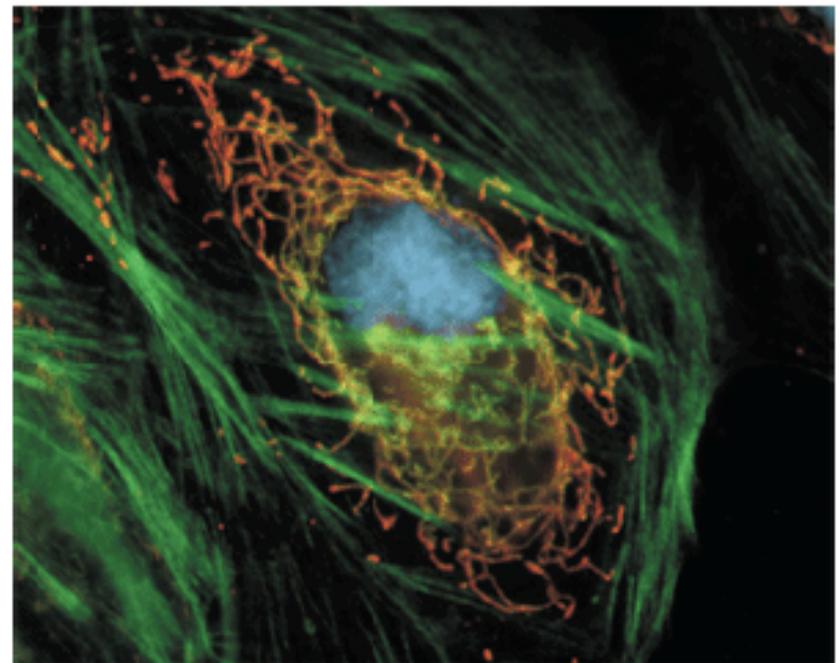
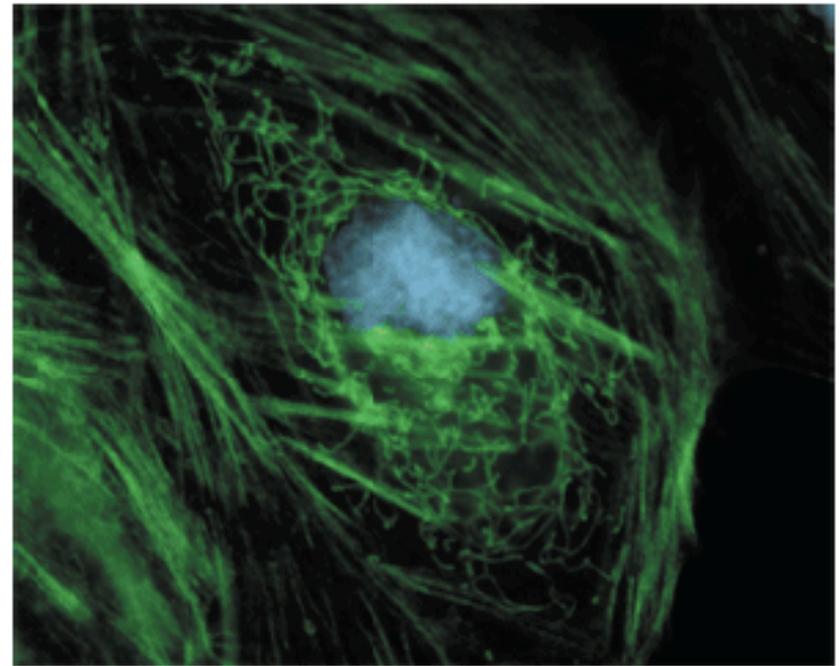








pShooter (ER)



pShooter (mito)

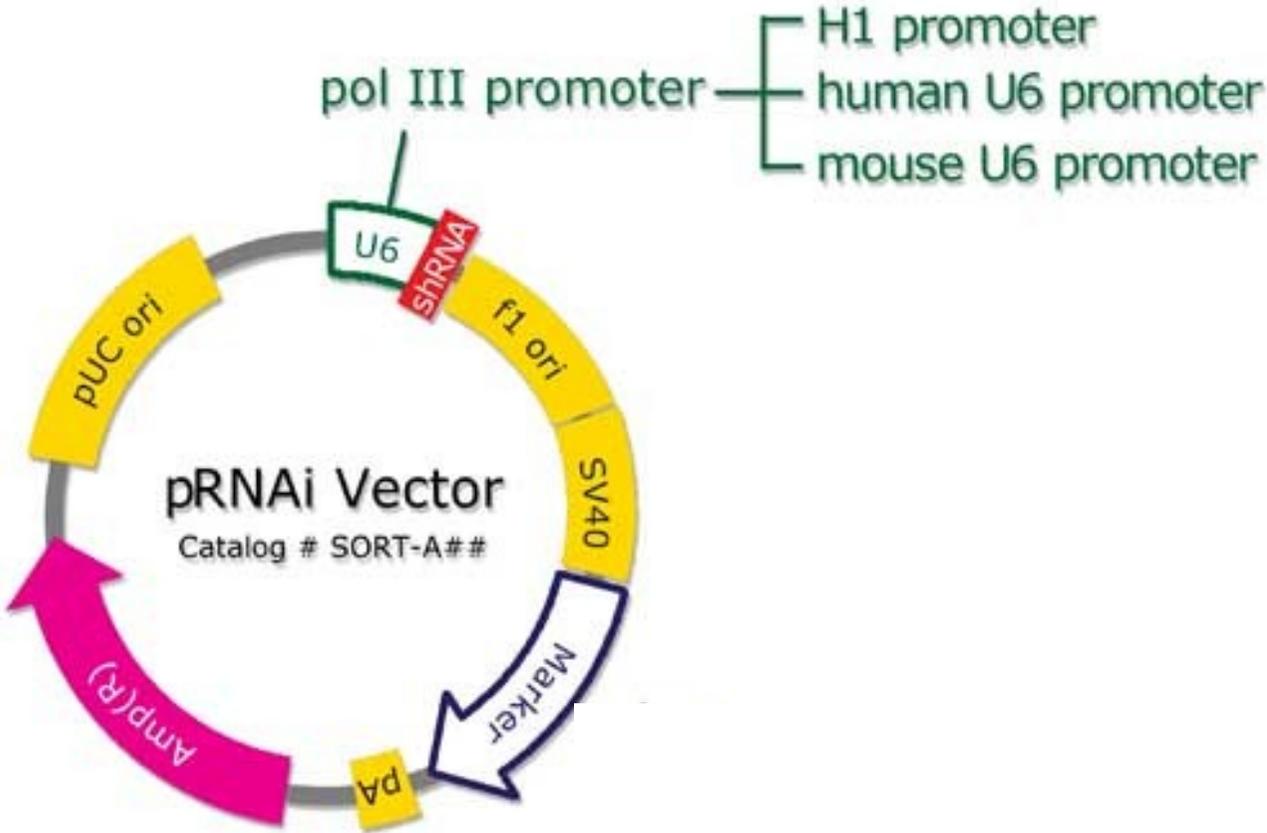
**Problema:  
ridurre l'espressione di una proteina endogena**

**Problema:**  
**ridurre l'espressione di una proteina endogena**

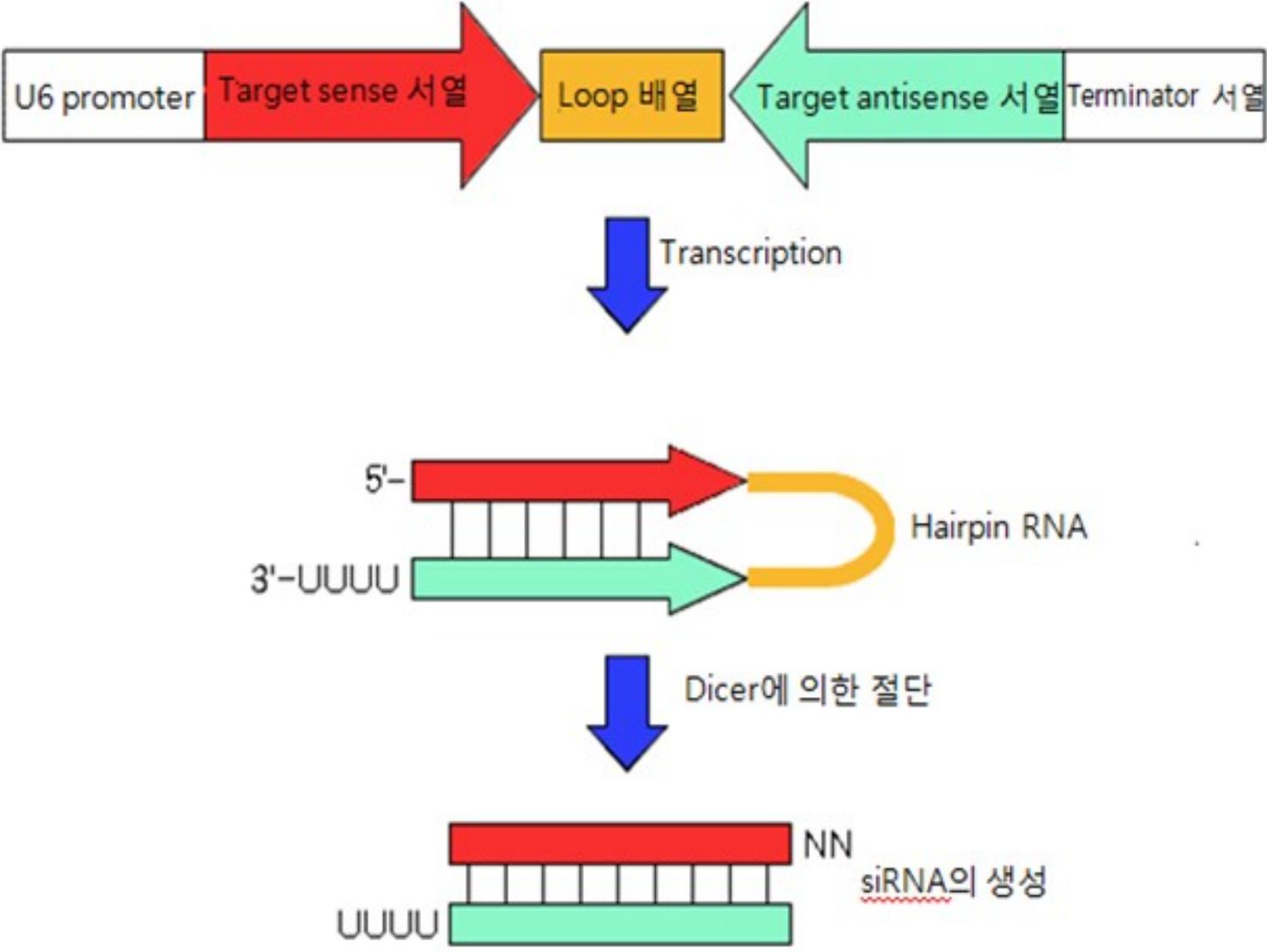
**Soluzione 1: vettori di espressione di shRNA  
(short interfering RNA)  
che dirigono la degradazione di un mRNA in  
maniera sequenza-specifica**

**Soluzione 2: gene editing mediante CRISPR-Cas9**

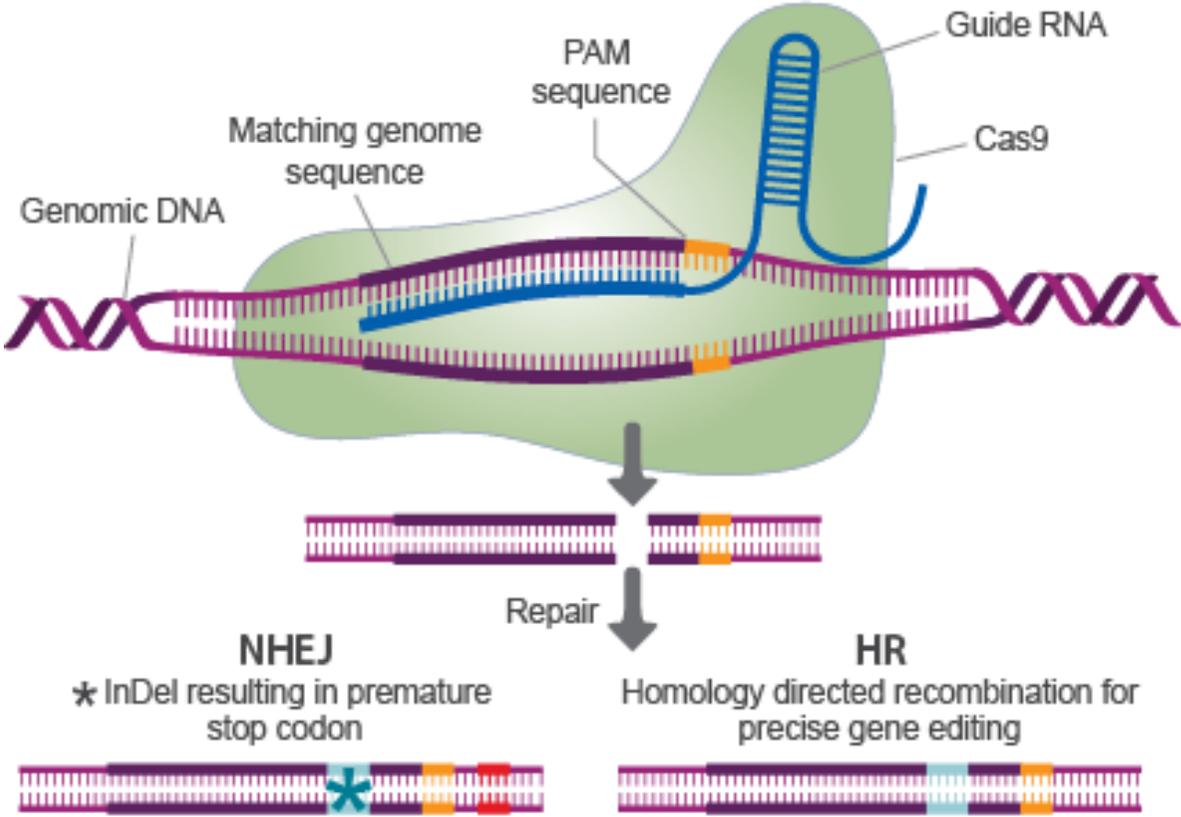
# Espressione di shRNA



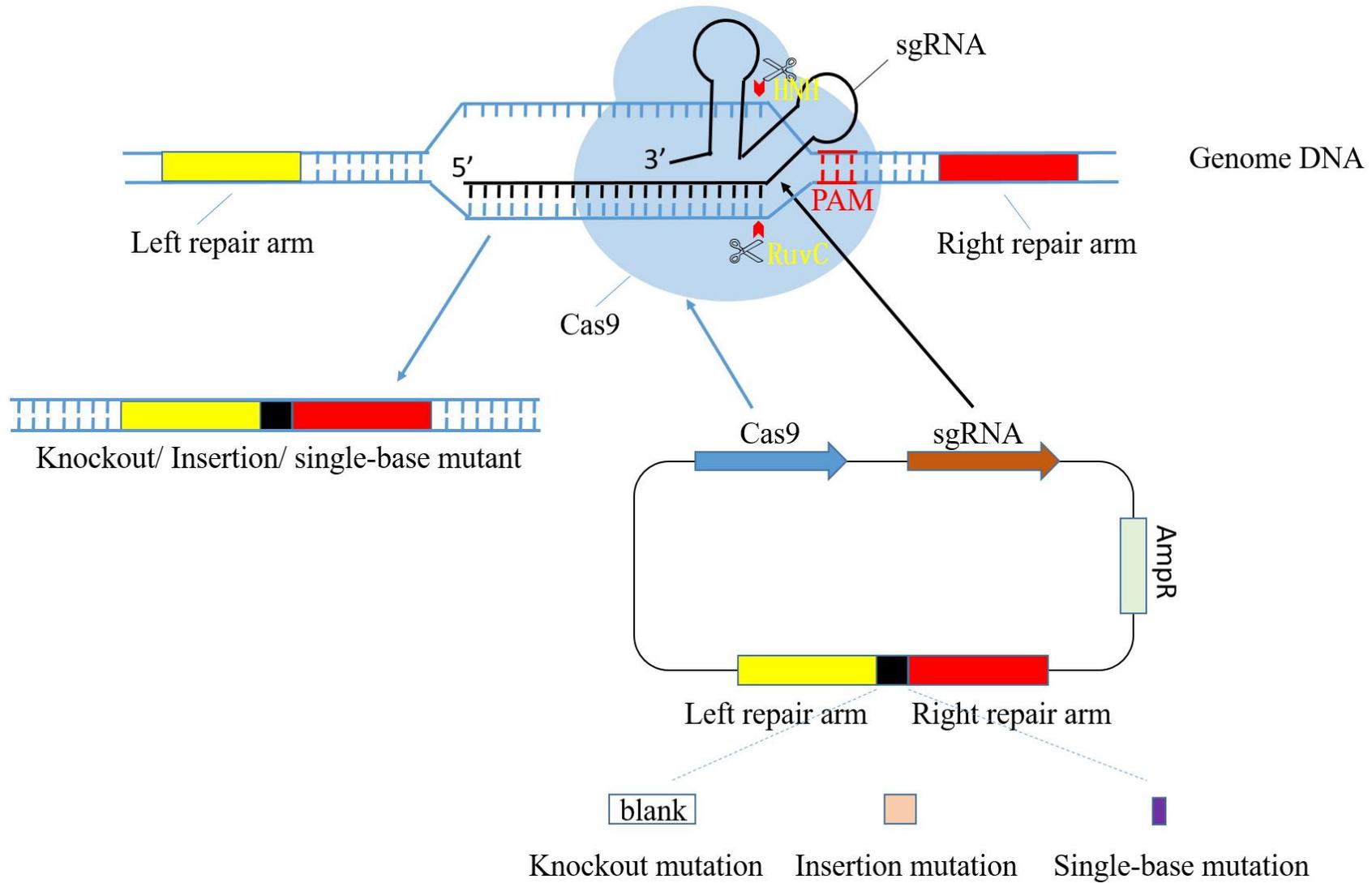
# Espressione di shRNA



# Gene editing mediante CRISPR-Cas9



# Vettori per gene editing mediante CRISPR-Cas9



## Espressione transiente

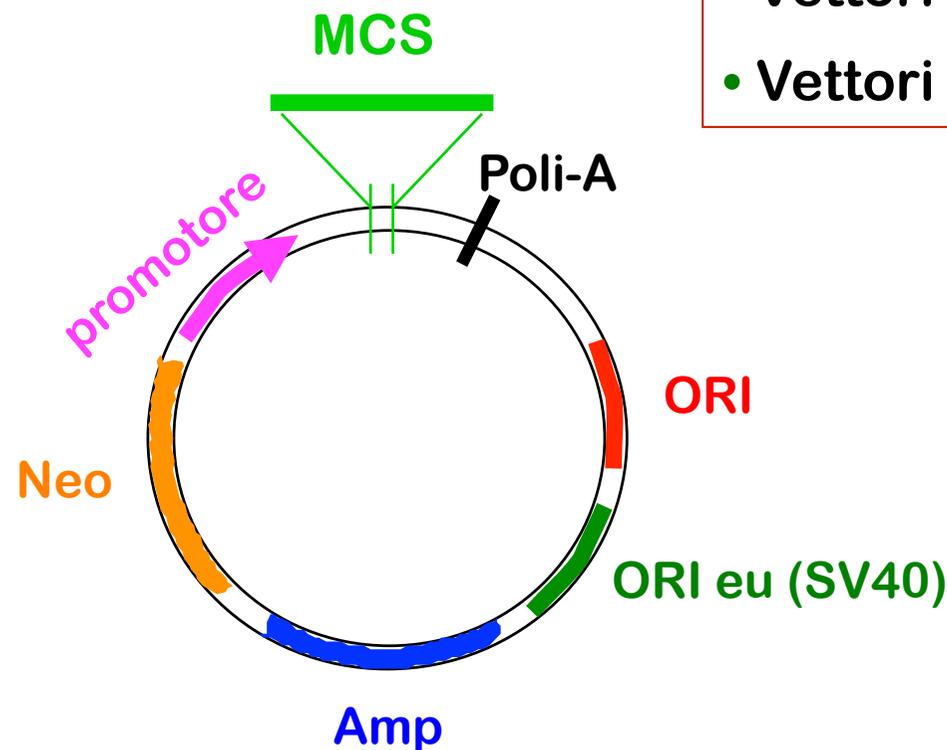
- Il DNA trasfettato rimane in forma di **episoma** ma non può essere replicato, e **viene perso** dopo qualche divisione
- **n° di copie** del plasmide nella cellula trasfettata: elevato e variabile
- **Eterogeneità** di espressione in diverse cellule
- **Esperimenti brevi** (24-72 ore)

## Espressione stabile

- Il DNA trasfettato può venir **integrato** nel genoma della cellula ed essere replicato con esso,
- **oppure** può essere mantenuto come **episoma stabile** (se il vettore ha un'**ORI**)
- **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**.

### 3) Caratteristiche facoltative:

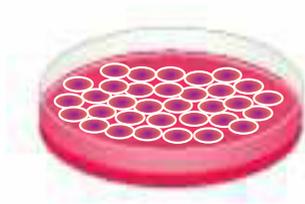
- Marker di **selezione** (geni per la resistenza a Neomicina –G418, Puromicina, Hygromicina) per l'ottenimento di cloni stabili
- Sequenze per la **replicazione autonoma** in cellule eucariotiche (**origine virale**)



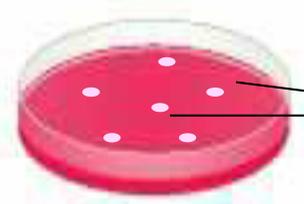
- Vettori ad integrazione
- Vettori episomiali

## Ottenimento di trasfettanti stabili

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



1. **Trasfezione**



Cloni

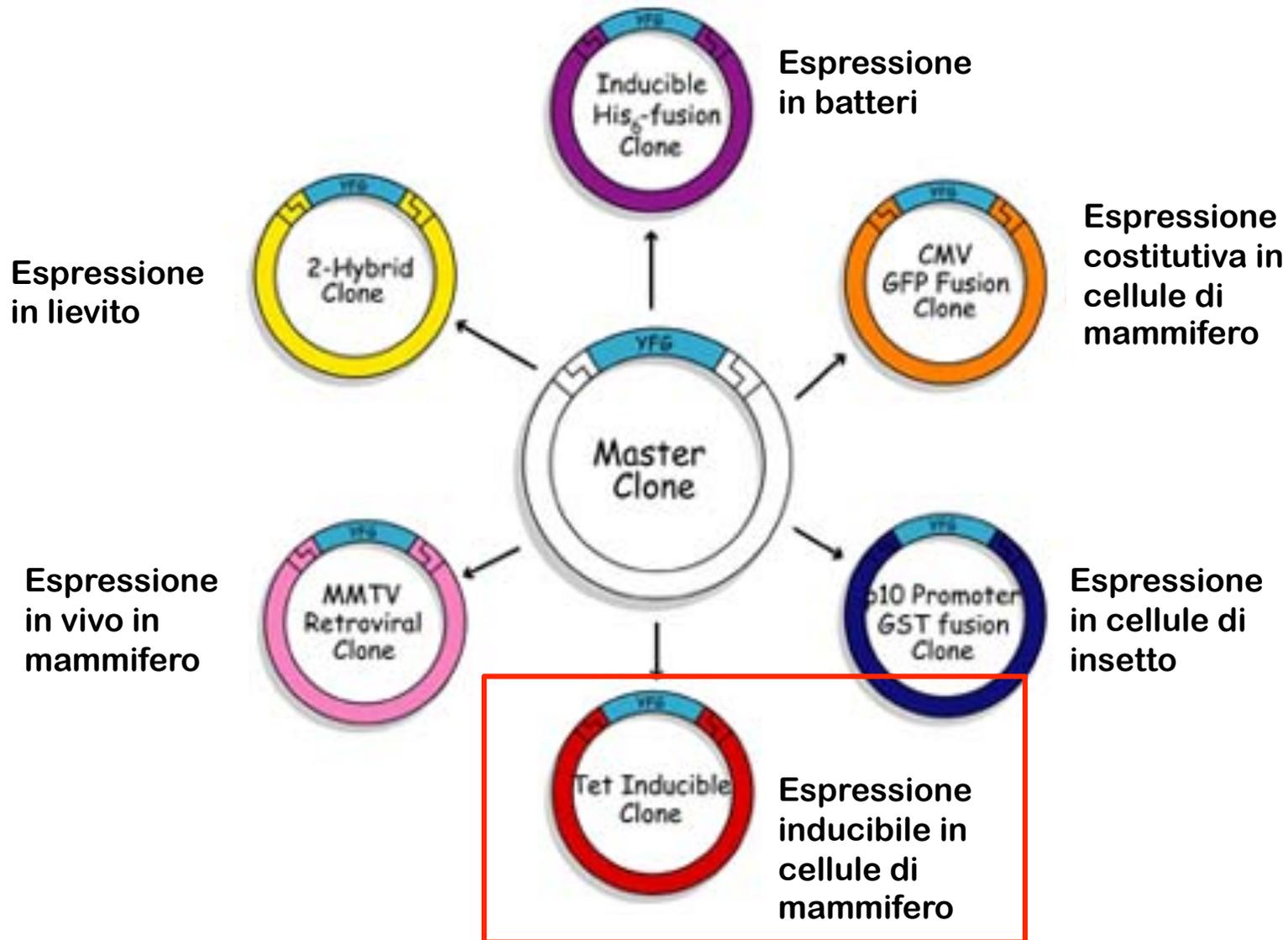
2. **Selezione**: le cellule non trasfettate moriranno

Dopo 2 o più settimane...

3. Isolamento di

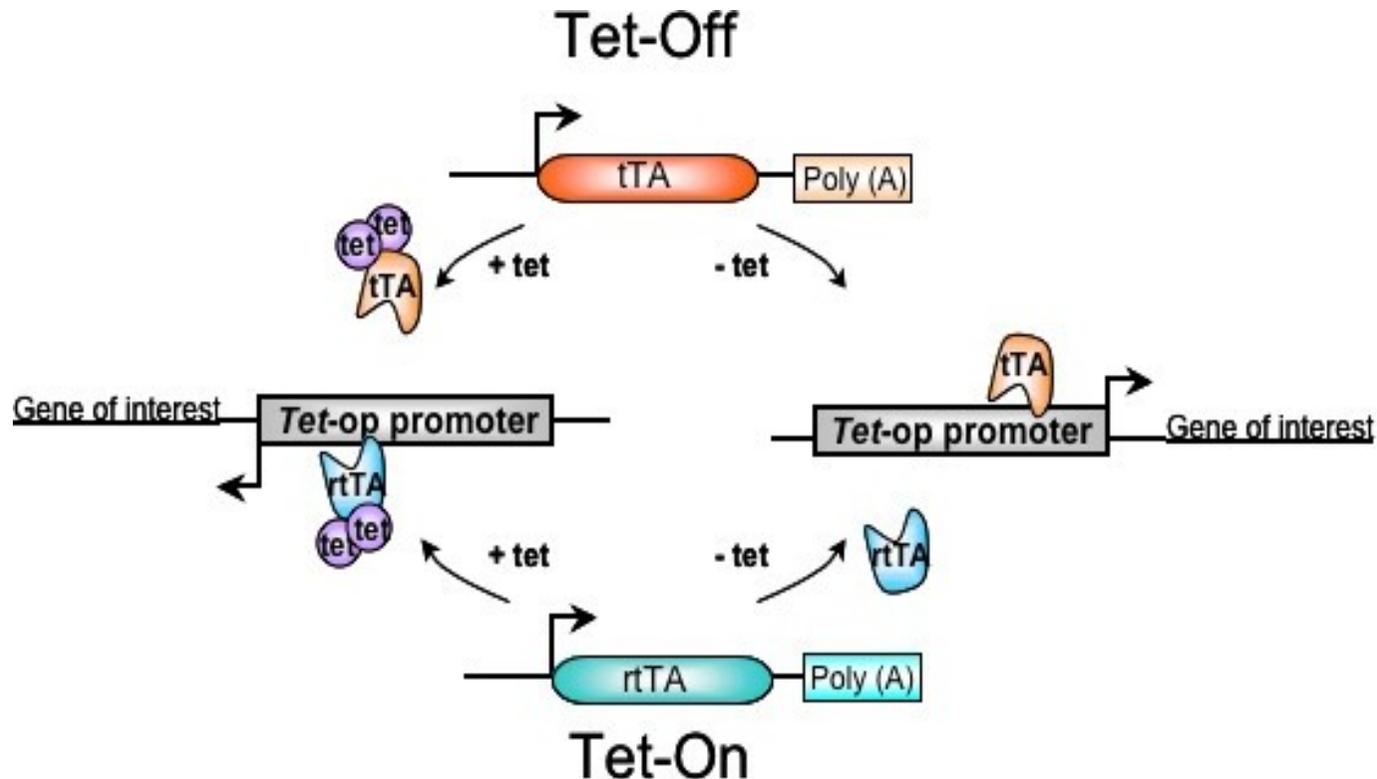
**cloni** di cellule che esprimono la proteina

# Espressione inducibile



## Sistemi tet-on/tet-off

TFs controllati da tetraciclina regolano il promotore Tet-op

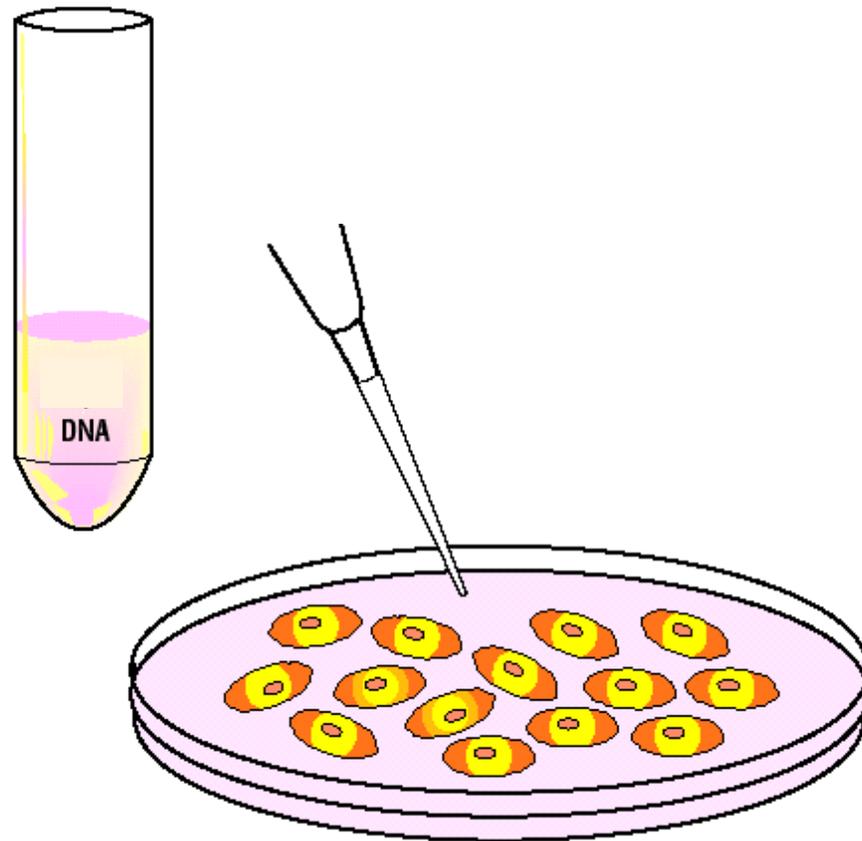


**TET-Off system: tetracycline prevents** the tTA transcription factor from binding DNA at the promoter. **Gene expression is inhibited** in the presence of tetracycline.

**TET-On system: tetracycline binds the rtTA transcription factor and allows** it to bind DNA at the promoter. **Gene expression is induced** in the presence of tetracycline.

# Tecniche di trasfezione

1. Reagenti chimici
2. Liposomi
3. Metodi fisici



**Diversi tipi cellulari si trasfettano con efficienza molto diversa!**

Tipo cellulare	Tecnica preferita
<b>Cellule che si trasfettano facilmente</b> (alcune linee cellulari)	Reagenti chimici
<b>Cellule che si trasfettano difficilmente</b> (alcune linee cellulari, cellule primarie)	Lipofezione
<b>Cellule che si trasfettano molto difficilmente</b> (cellule primarie, cellule differenziate)	Trasferimento genico mediato da virus
	Metodi fisici

## Precipitazione con calcio fosfato

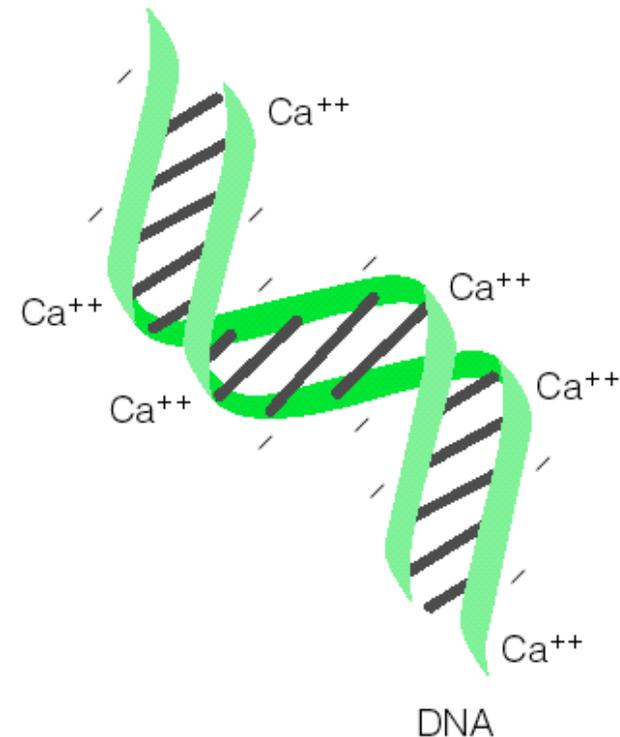
Il DNA viene mescolato a  $\text{CaCl}_2$  in un **tampone fosfato** a pH 7.12: si formano dei precipitati insolubili di  $\text{DNA}/\text{CaPO}_4$  che vengono poi aggiunti al mezzo di coltura e **precipitano** sulle cellule. Il DNA entra nelle cellule per **endocitosi**.

Tipo di **cellule**: in adesione

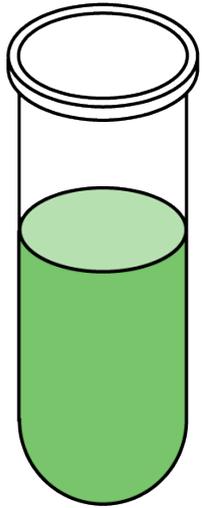
**Efficienza**: bassa

**Tossicità**: bassa

Tipo di **saggio**: transiente e stabile

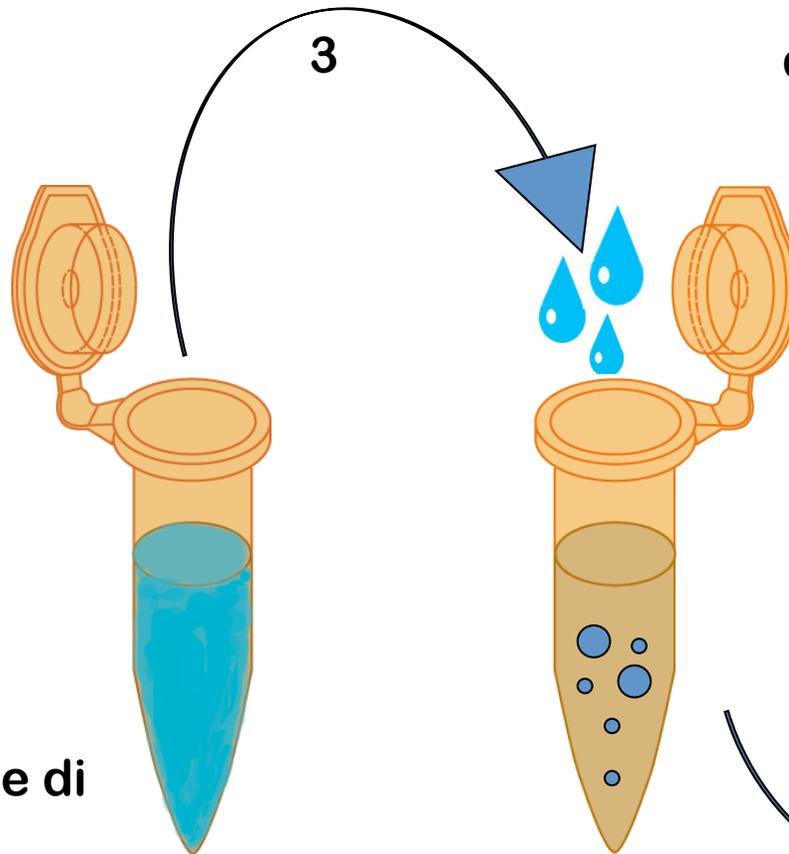


## Trasfezione con calcio-fosfato



1. Preparare 20 ml di tampone HBS 2x a pH=7.12

2. Soluzione di DNA + CaCl<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O



3. Aggiungere la soluzione di DNA goccia a goccia (con la p20) all' HBS 2x introducendo bolle d'aria con la p200

4. Attendere la formazione dei precipitati e aggiungerli alle cellule

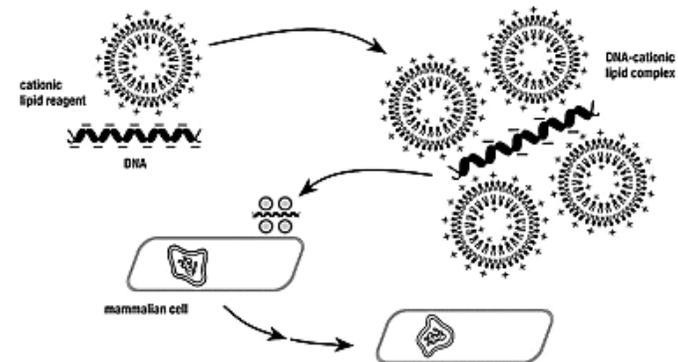


## Lipofezione

Questa tecnica si basa sulla capacità di alcuni **lipidi cationici** di complessare il DNA (carico negativamente) e rilasciarlo nelle cellule fondendosi con la membrana plasmatica.

➤ formazione di **complessi lipide-DNA**

➤ **Liposomi: vescicole a doppio strato lipidico** che possono complessare molecole di DNA (o anche RNA e proteine) = lipidi cationici ed entrare nelle cellule per endocitosi = aiutati da lipidi fusogenici neutri



Tipo di **cellule**: in adesione e in **sospensione**

**Efficienza**: alta

**Tossicità** : media

Tipo di **saggio**: transiente e stabile

## Elettroporazione

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.

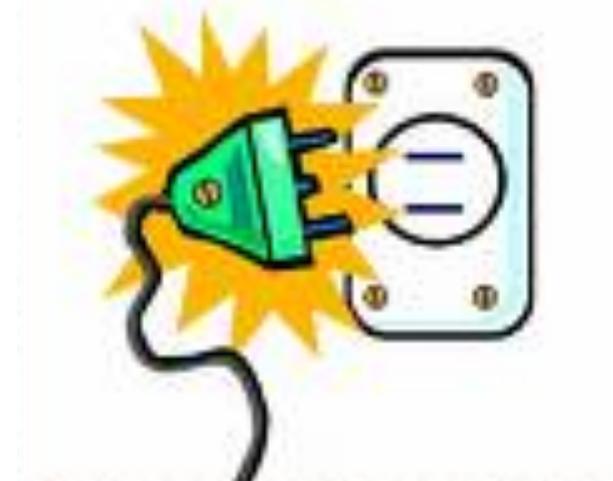
Tipo di **saggio**: transienti e **stabili**

Tipo di **cellule**: in adesione e in sospensione

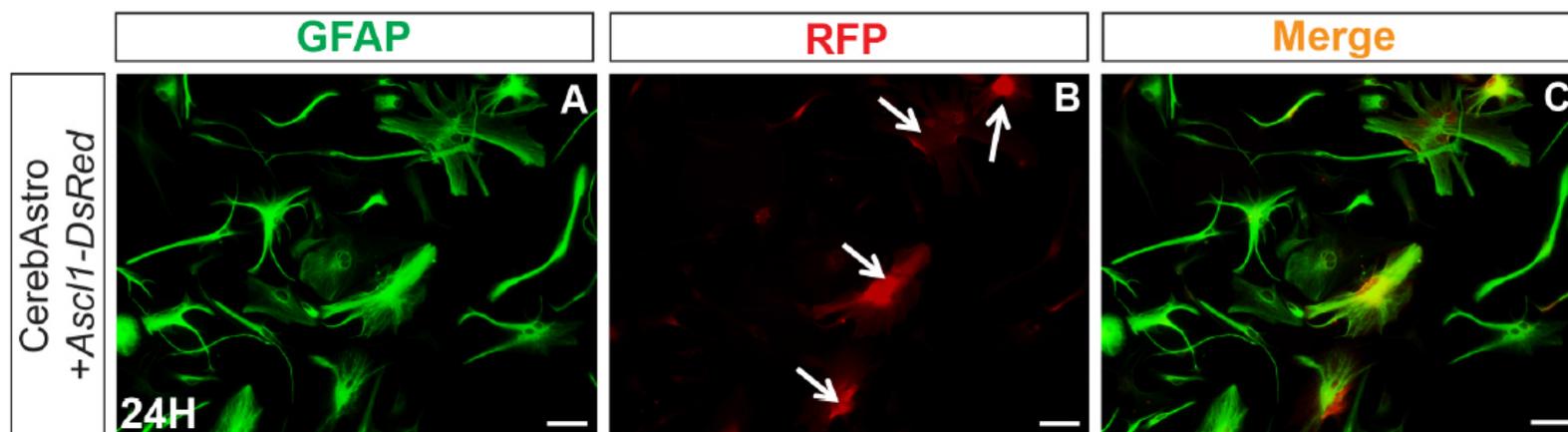
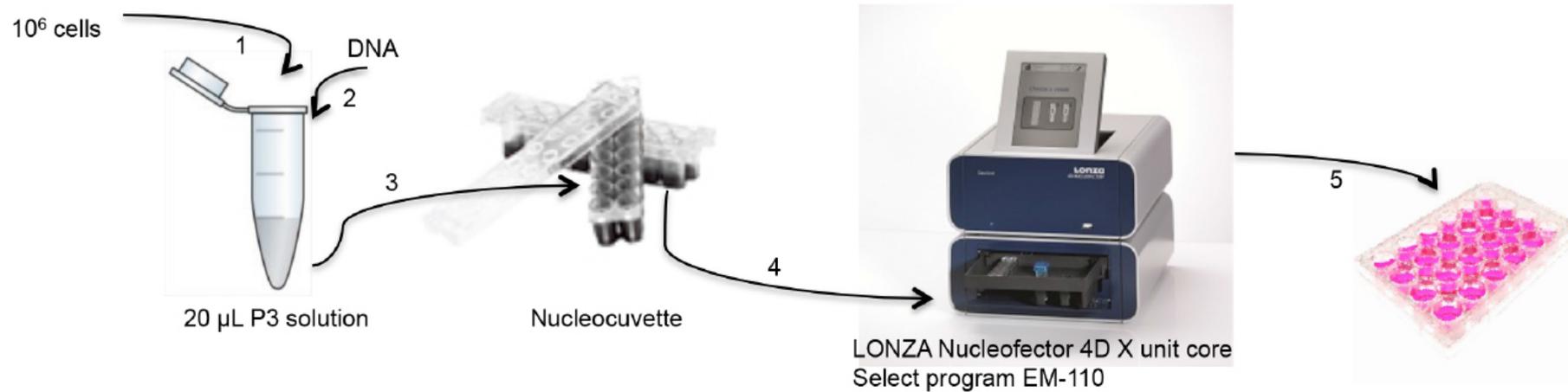
**Efficienza**: alta

**Tossicità** : dipende dallo strumento

(la scossa elettrica può causare elevata mortalità)



# Nucleofector: tecnica di elettroporazione ottimizzata per diversi tipi cellulari primari



## Microiniezione



## Microiniezione

Il **DNA** viene direttamente iniettato nel **nucleo** delle cellule con un **capillare** di vetro mediante sistemi automatizzati.

Il metodo permette di ottenere grande affidabilità e riproducibilità, ma **non è rapido**.

Vantaggi: possibilità di **seguire il destino di singole cellule trasfettate**.

Tipo di **saggio**: normalmente utilizzato per saggi **su singole cellule** piuttosto che su una popolazione cellulare.

Tipo di **cellule**: normalmente in **adesione (ma anche in sospensione)**

**Efficienza: elevata**

**Applicazione**: trasfezione di cellule Staminali Embrionali per generare **organismi transgenici**

## Trasferimento genico mediato da particelle metalliche

Tecnica che utilizza **microproiettili**



il DNA viene precipitato su **microscopiche particelle d'oro o tungsteno**

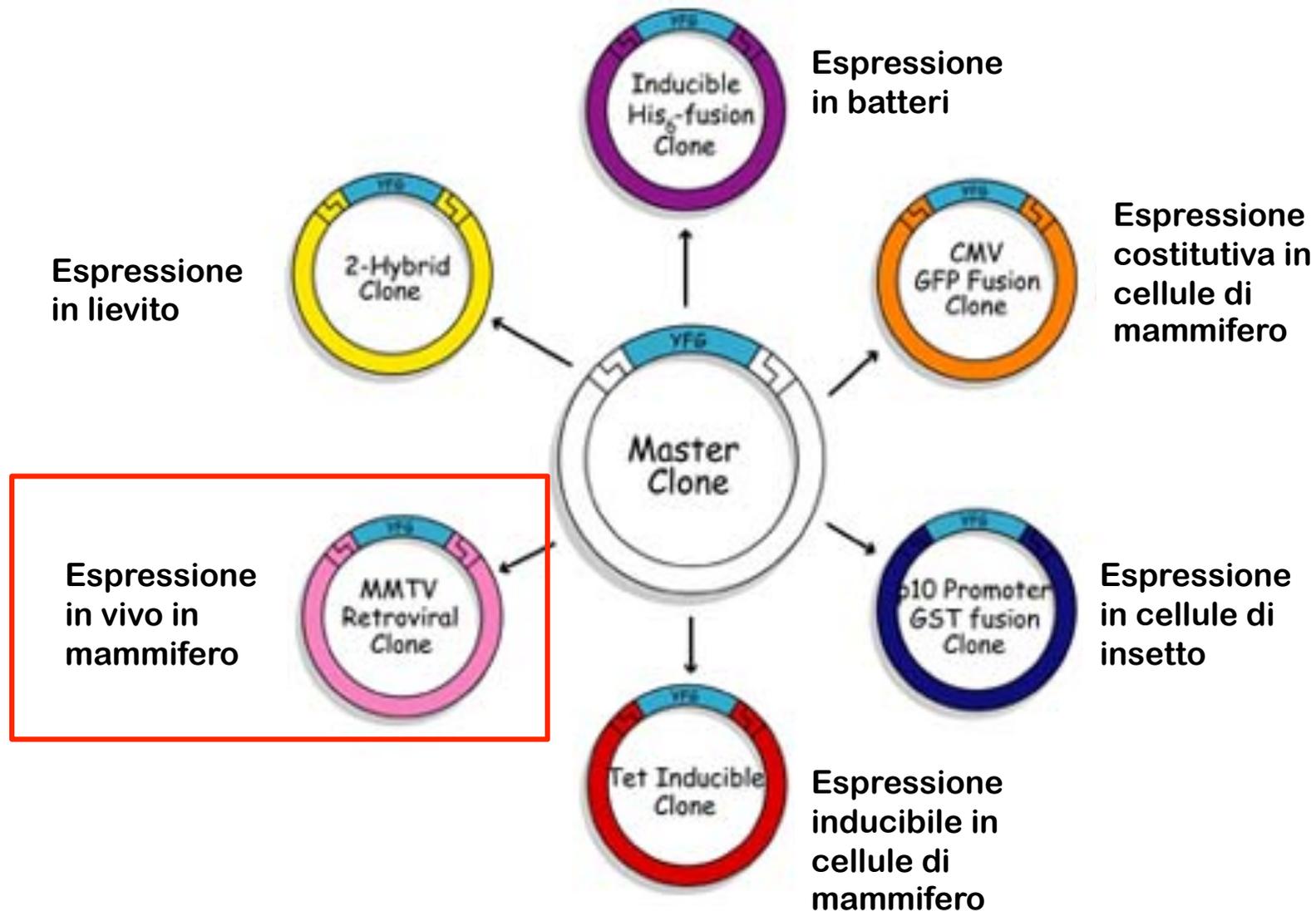
che vengono poi “**sparate**” nelle cellule mediante un'apposita strumentazione che usa **elio** ad alta pressione.

Usato per trasfettare cellule **all'interno di tessuti, anche in vivo.**

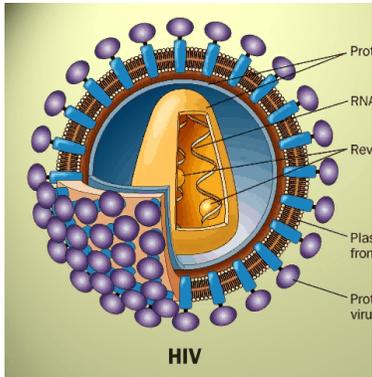
Oppure cellule molto difficili da trasfettare, es. cellule vegetali (dotate di parete).



# Metodi biologici: vettori derivati da virus



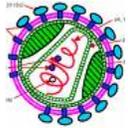
## Trasferimento genico mediato da virus



Diversi tipi di **virus** possono essere **modificati** per ottenere **vettori** per il trasferimento di geni non virali mediante l'**infezione** di cellule eucariotiche.

I **virus ricombinanti** possono essere **impaccati** in speciali linee cellulari, che esprimono stabilmente le proteine del capsidico virale (*packaging cell line*).

## Trasferimento genico mediato da virus

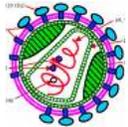


**Infezione stabile:**

**Retrovirus** – hanno la capacità di **integrarsi** nel genoma di cellule **proliferanti**

**Lentivirus** – si integrano anche in cellule **quiescenti**

Per cellule difficili da trasfettare (es. primarie) ed anche **in vivo**,  
**in cellule differenziate. Utilizzati in terapia genica.**

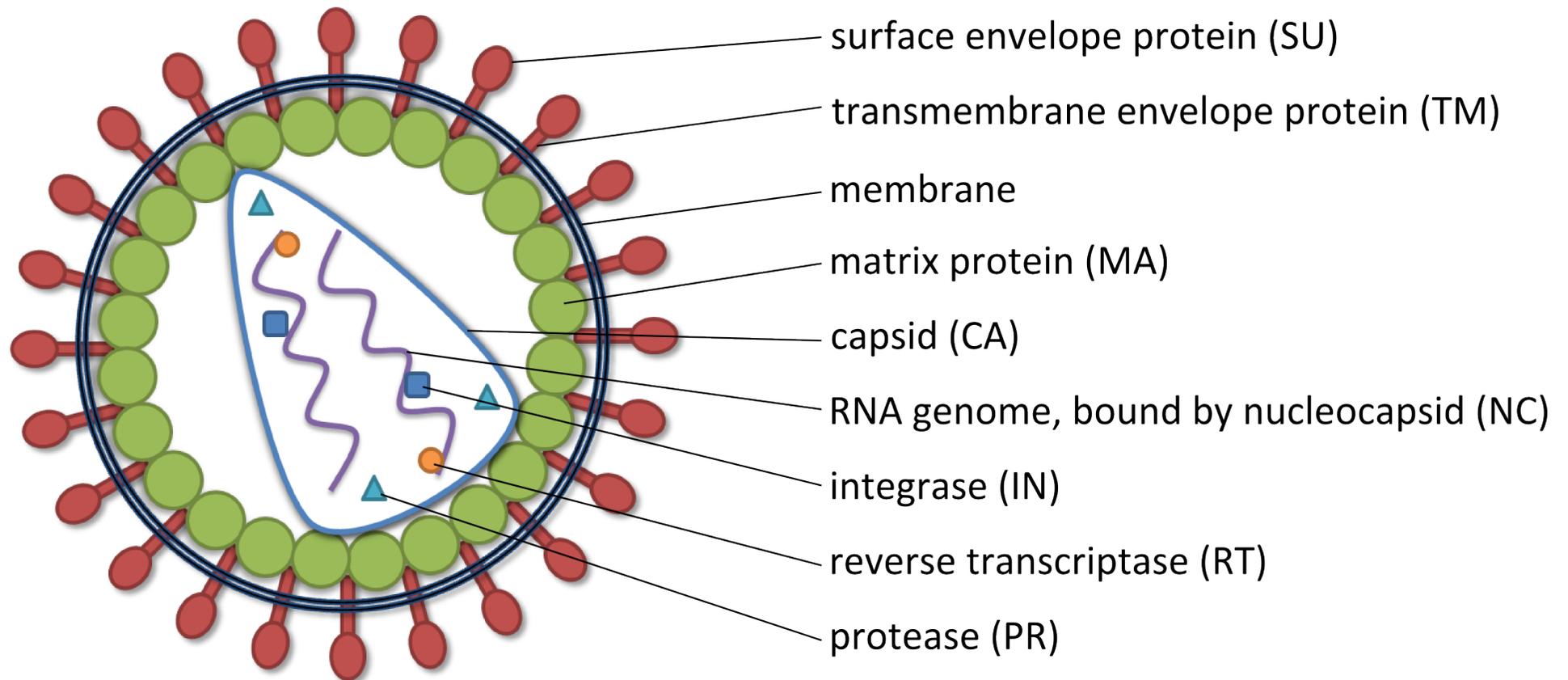


**Infezione transiente:**

**Adenovirus e AAV** – infettano anche cellule quiescenti, ma **non** hanno la capacità di **integrarsi** nel genoma cellulare.

**Baculovirus** -per produrre grandi quantità di proteine da purificare. Infettano solo **cellule di insetto** (lepidottero).

## Retrovirus e lentivirus

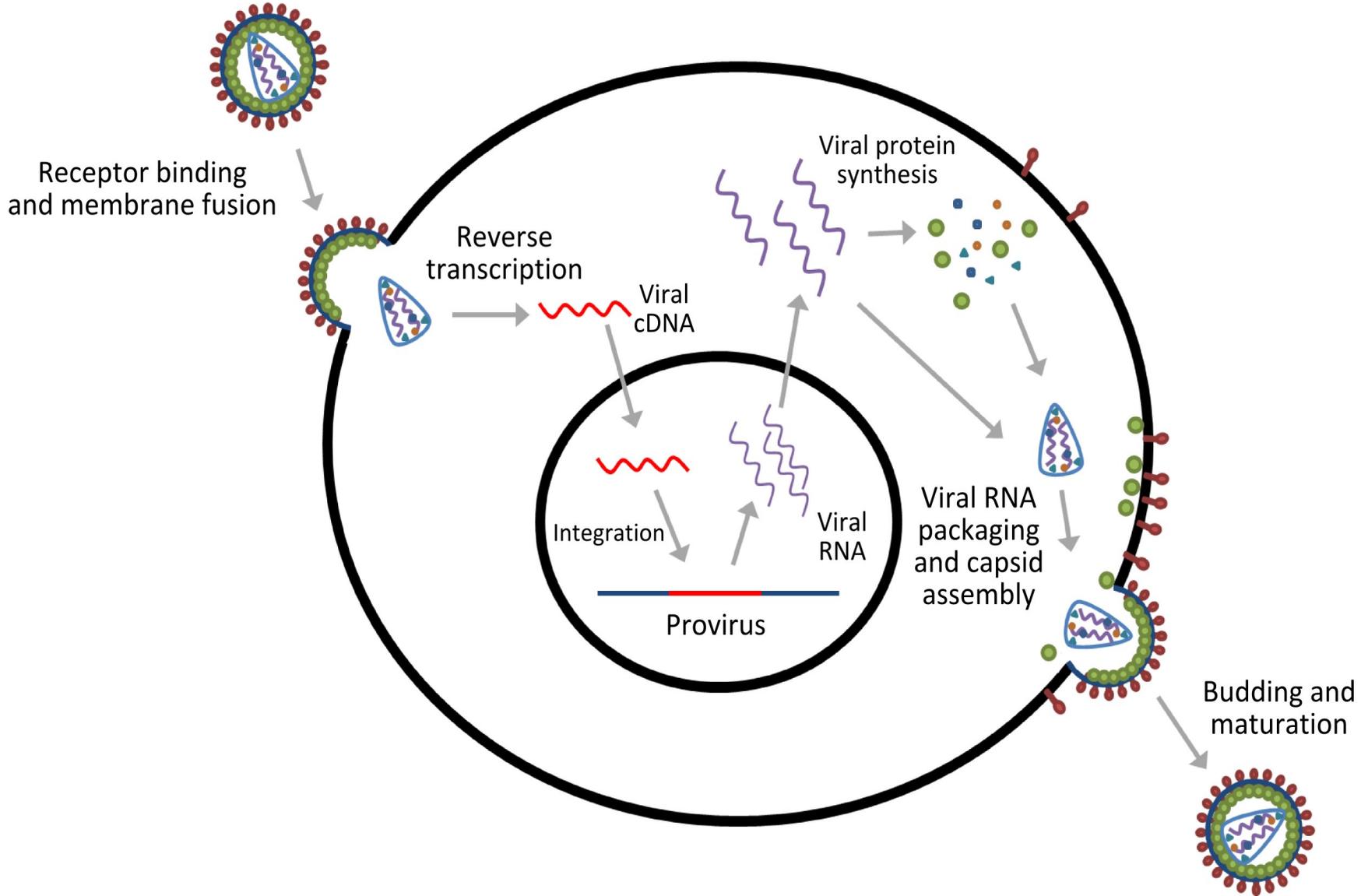


**POL** codifica per gli enzimi **RT, PR e IN**.

**GAG** codifica per proteine della **matrice** e **capside** MA CA, NC

**ENV** codifica per glicoproteine di **superficie** e transmembrana SU e TM

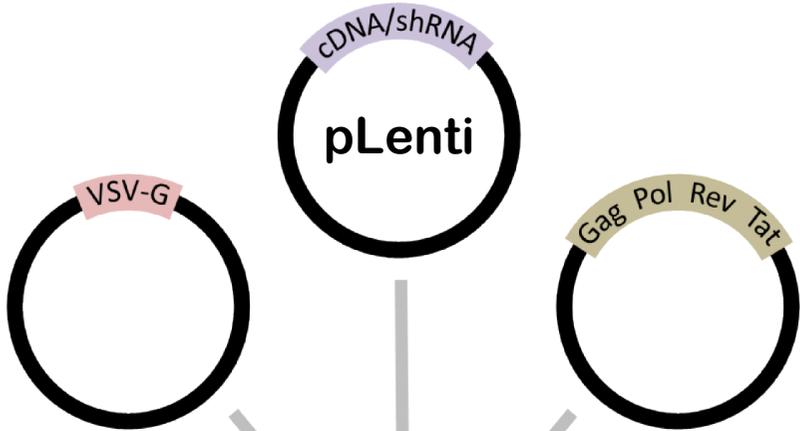
# Il ciclo retrovirale



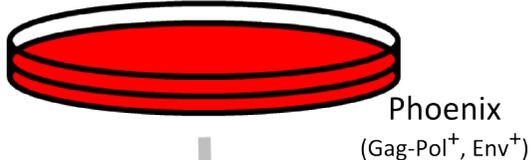
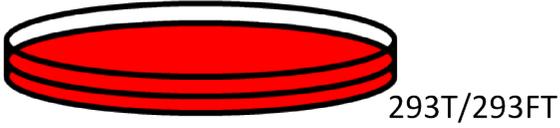
# Preparazione di virus ricombinanti per trans-complementazione

## Lentivirus

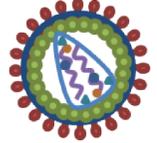
## Retrovirus



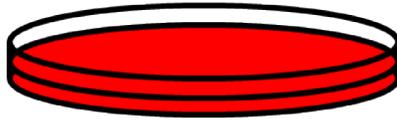
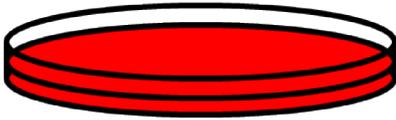
1) Transfect packaging cells



2) Collect virus particles



3) Transduce target cells







## **Rischio biologico e sicurezza nell'utilizzo dei vettori retrovirali**

### **Principali rischi:**

- 1. Generazione di virus contaminanti competenti per la replicazione (ricombinazione con virus endogeni)**
  - 2. Potenziale oncogenico per integrazione random (in vivo)**
  - 3. Potenziale tossicità del transgene.**
- 
- 1. I vettori lentivirali di 2 e 3 generazione hanno diverse caratteristiche di sicurezza (vettori separati packaging & enzimatici)  
molti sono vettori auto-inattivanti (delezione del 3' LTR)**
  - 2. Vettori lentivirali integration-defective o che si integrano per HR (promotore specifico)**