

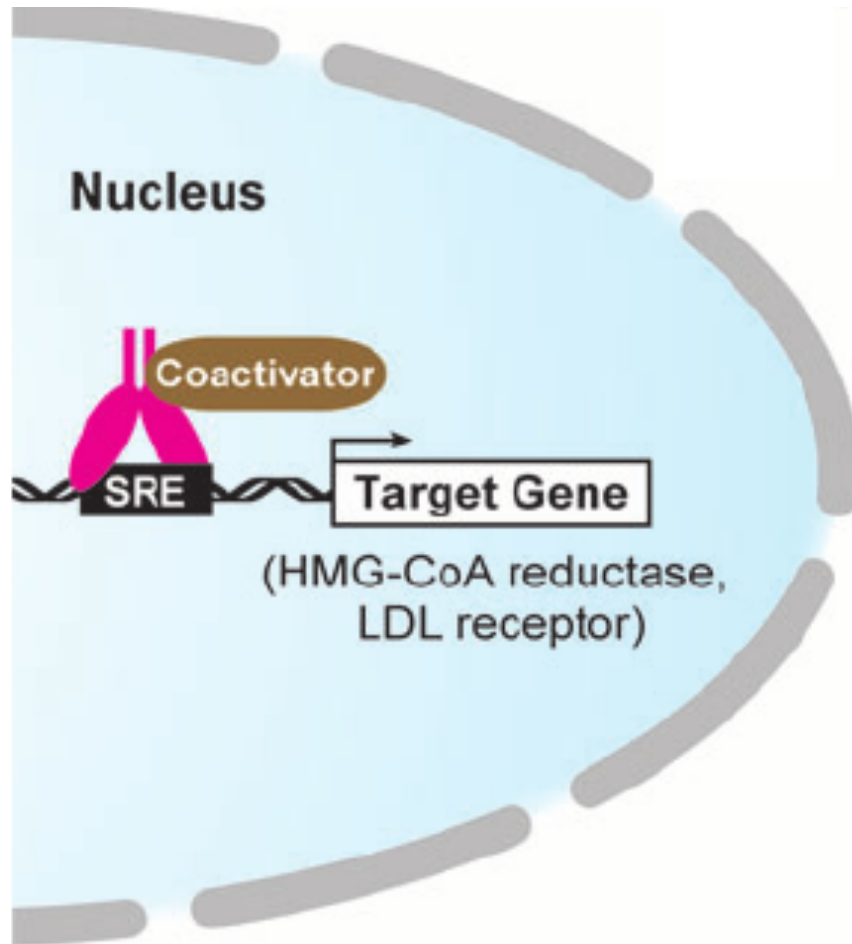
Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

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

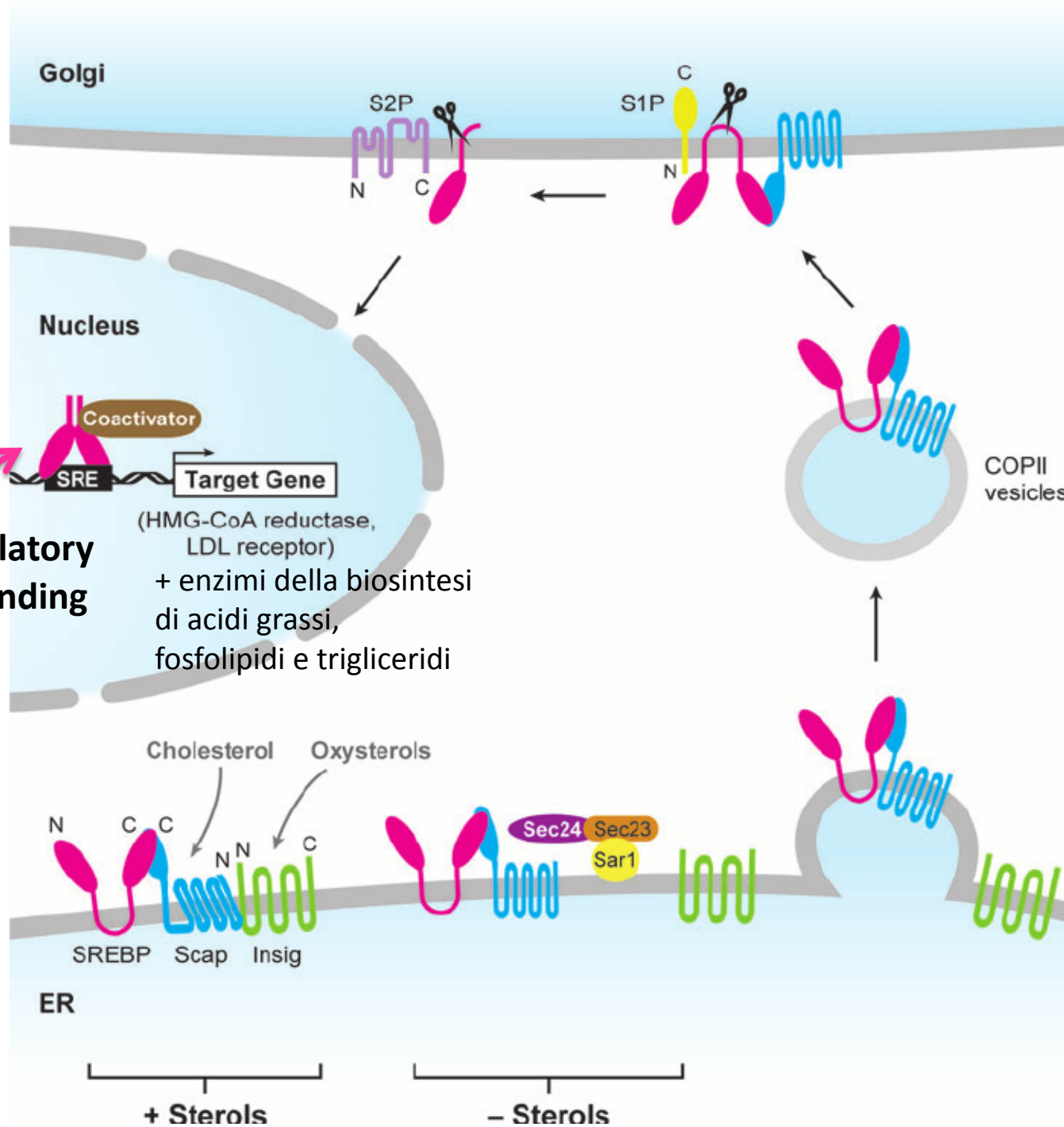


Le cellule necessitano di colesterolo e lipidi per la sintesi delle membrane, per svolgere le normali funzioni e soprattutto quando sono in attiva proliferazione oppure devono migrare.

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



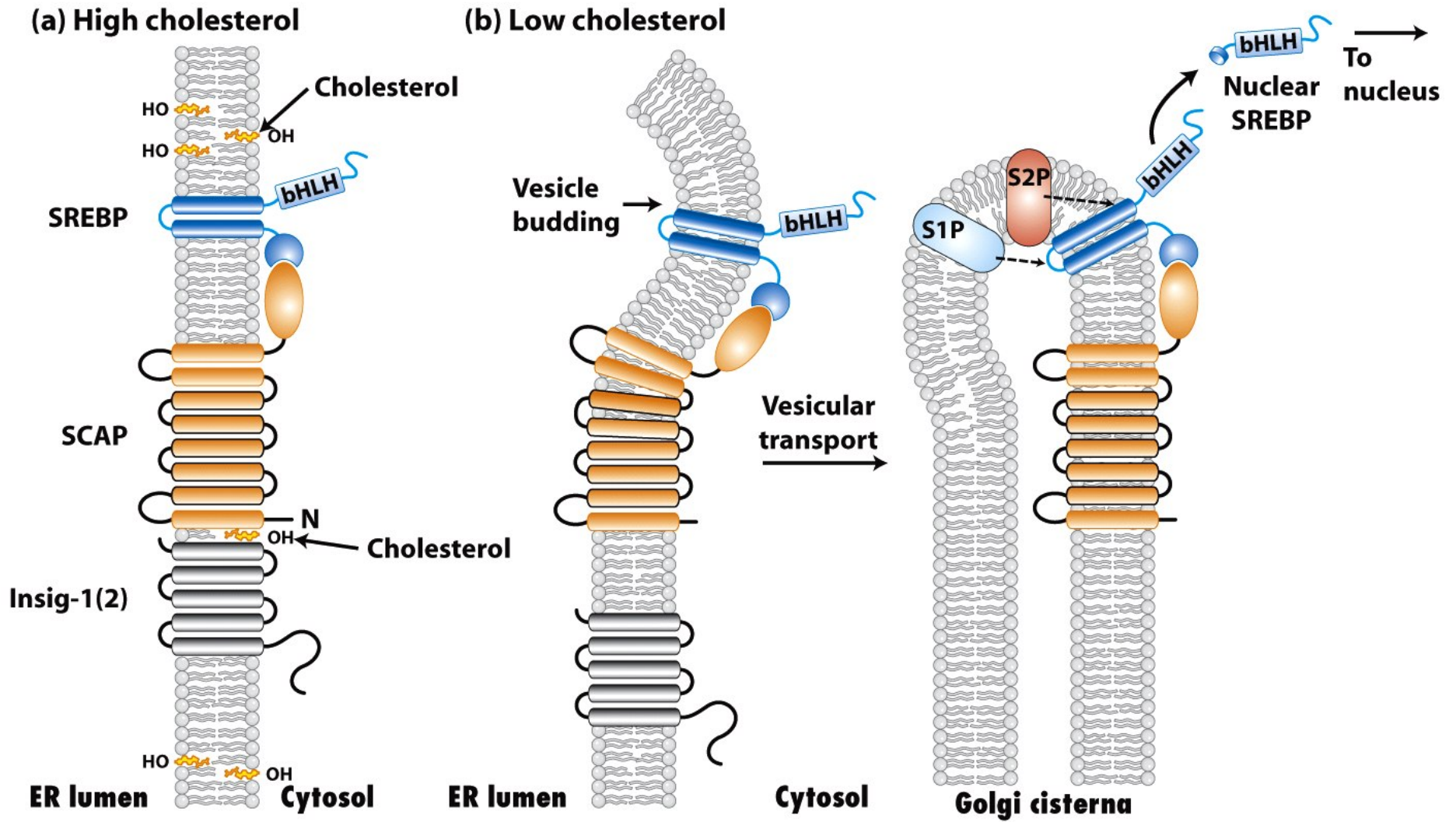
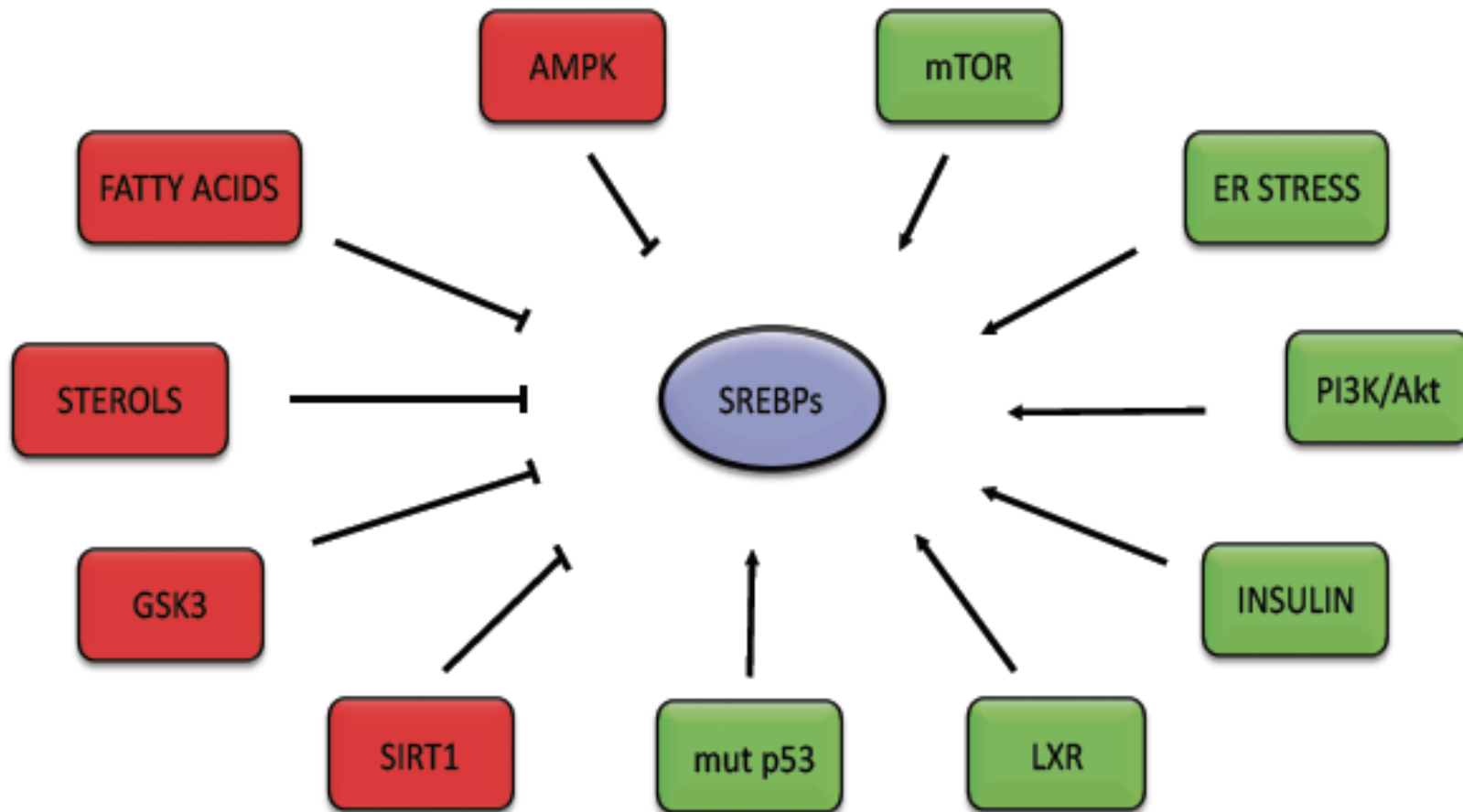
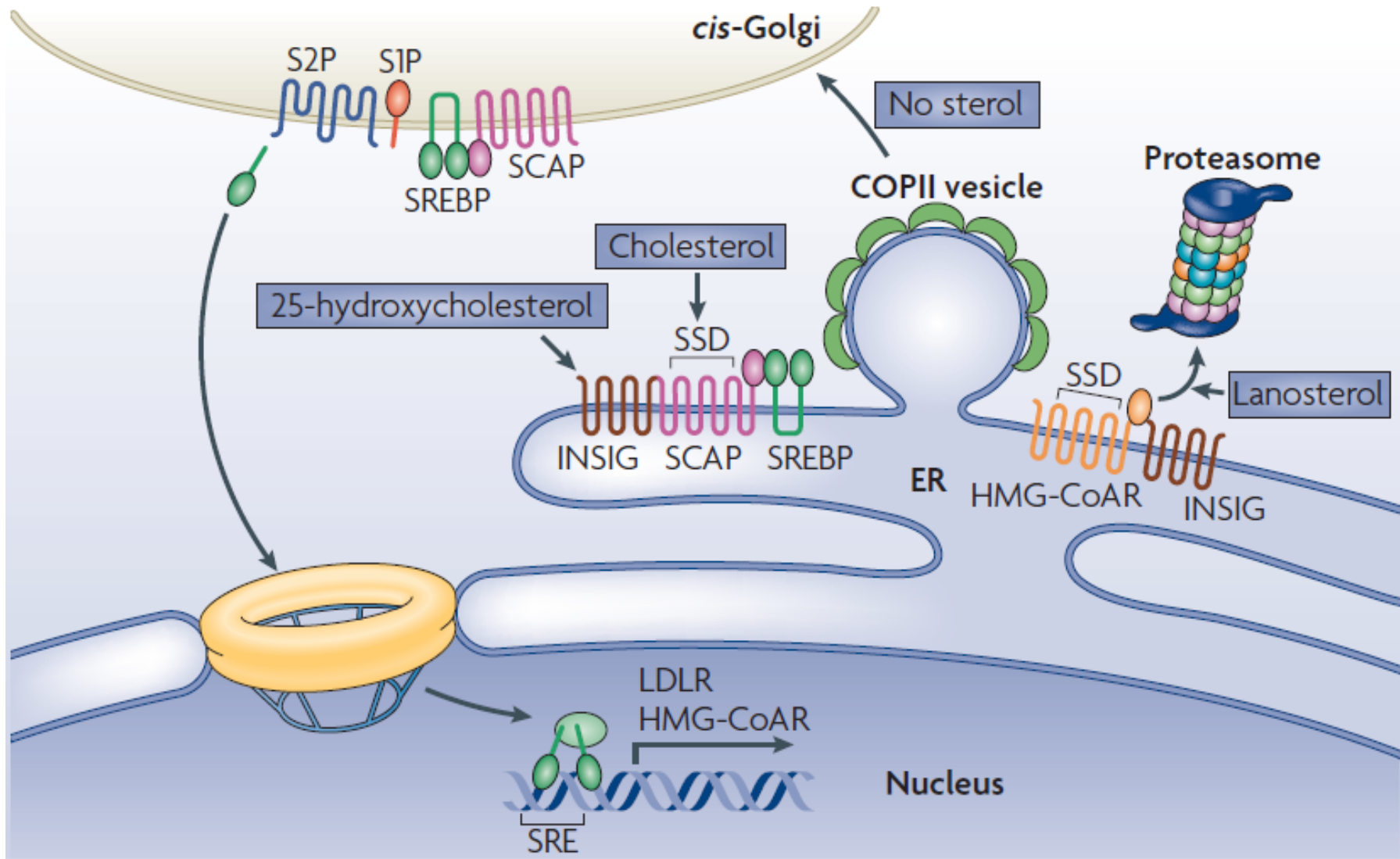


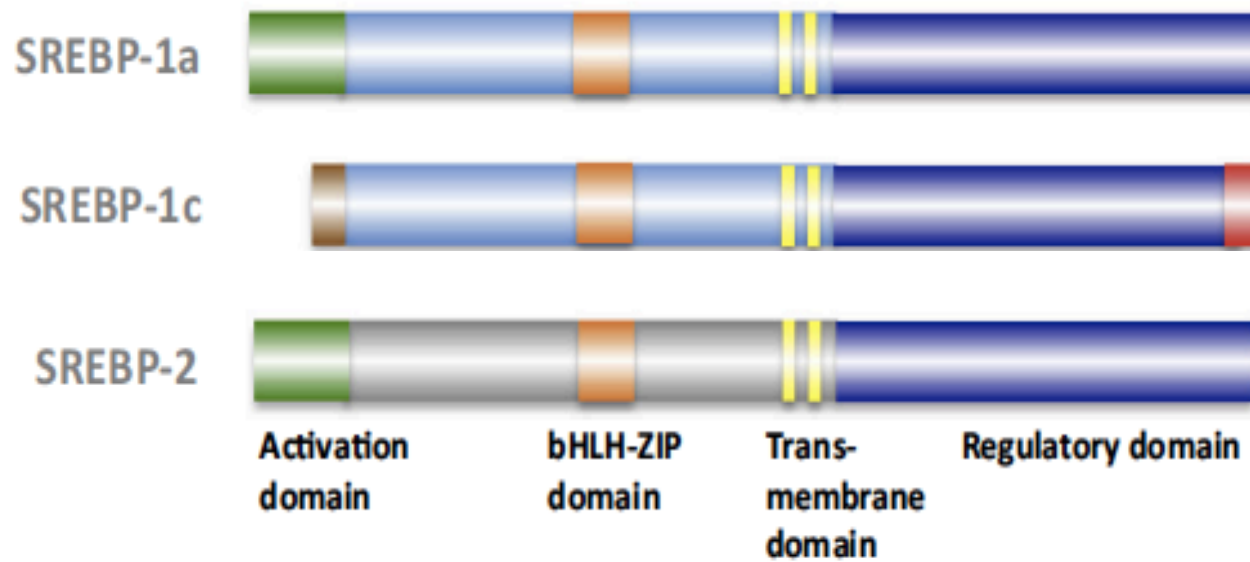
Figure 16-38
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

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

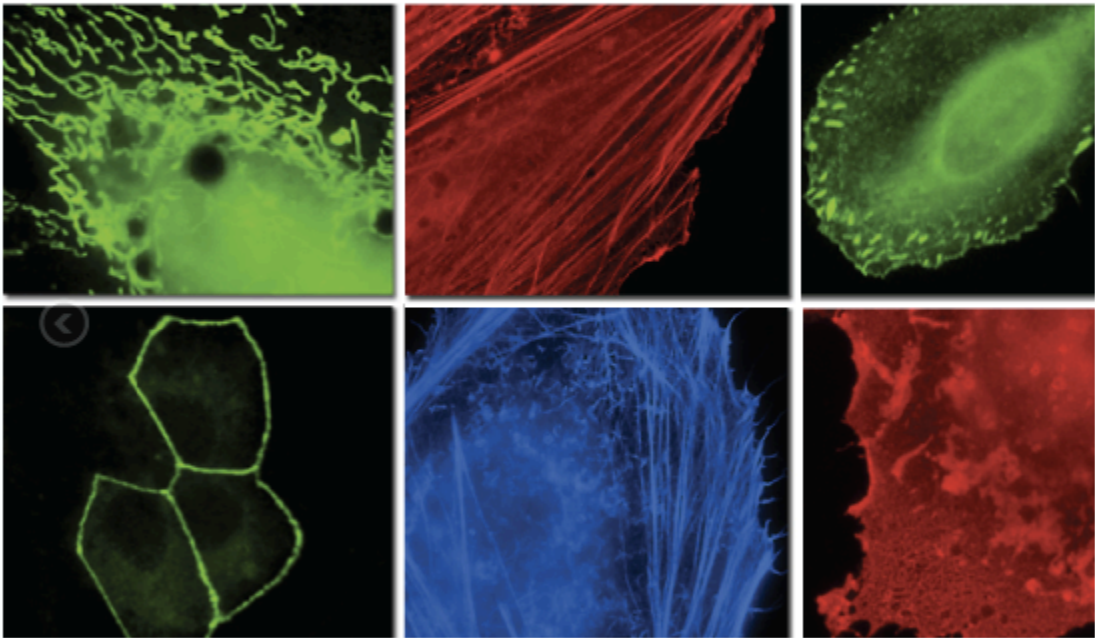
Esperimento 1:

**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. **Ottingo 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.

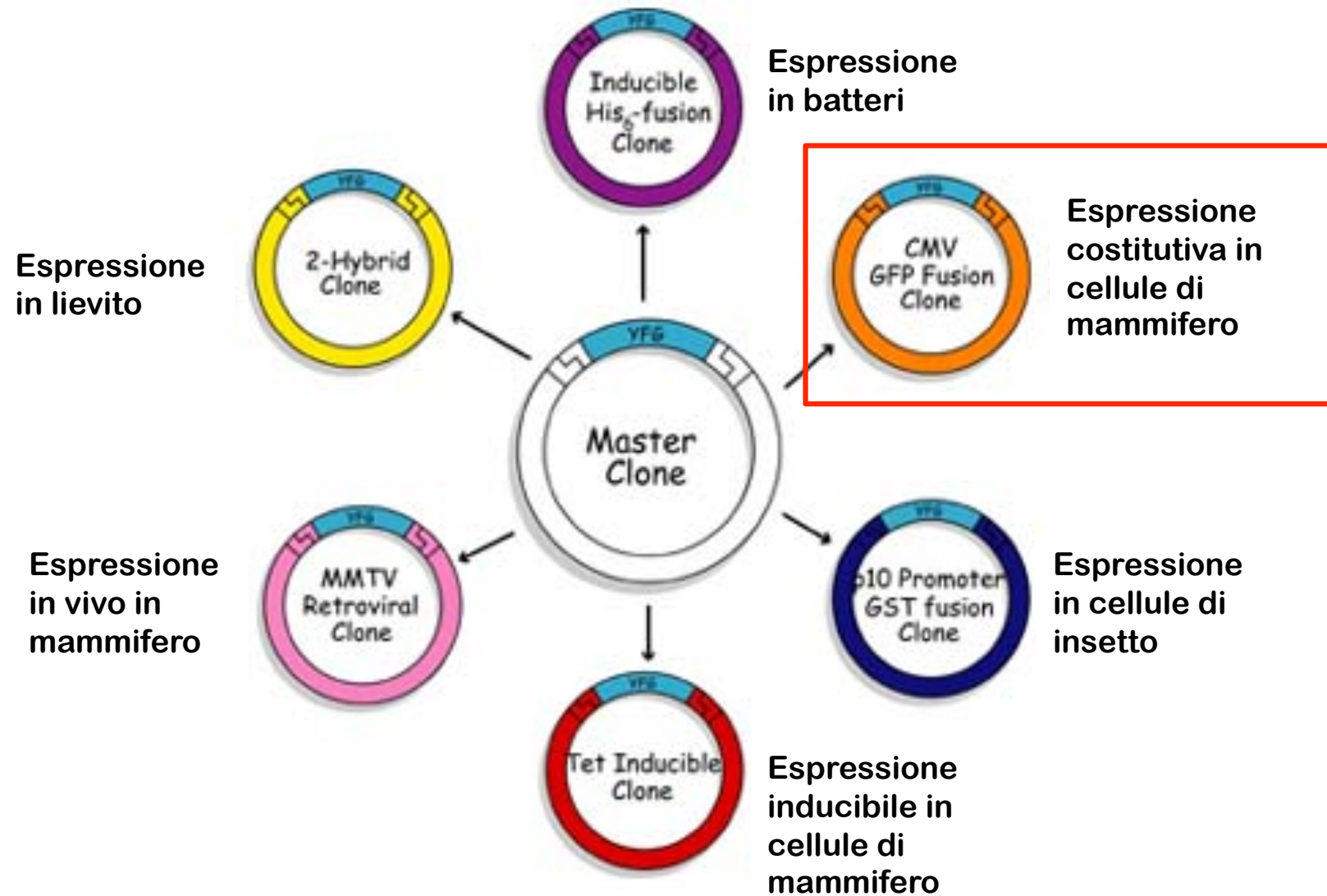
[Browse Fluorescent Proteins](#)

Special Collections

[View All](#) »

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

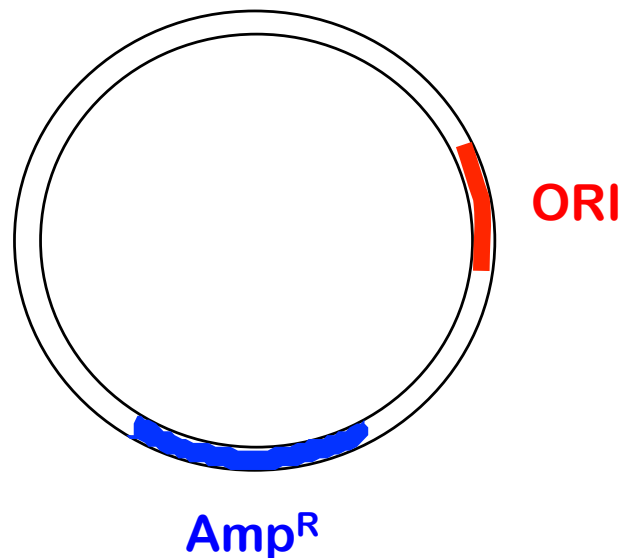
Subclonaggio del master clone da un vettore shuttle



Caratteristiche dei vettori plasmidici di espressione per cellule eucariotiche

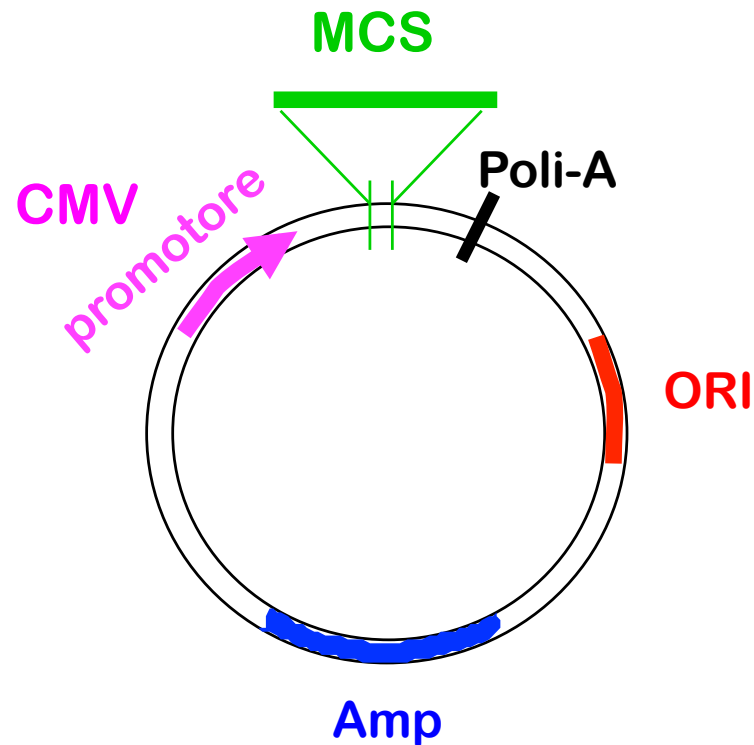
1) Sequenze necessarie per il mantenimento e l'amplificazione in **batteri**

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

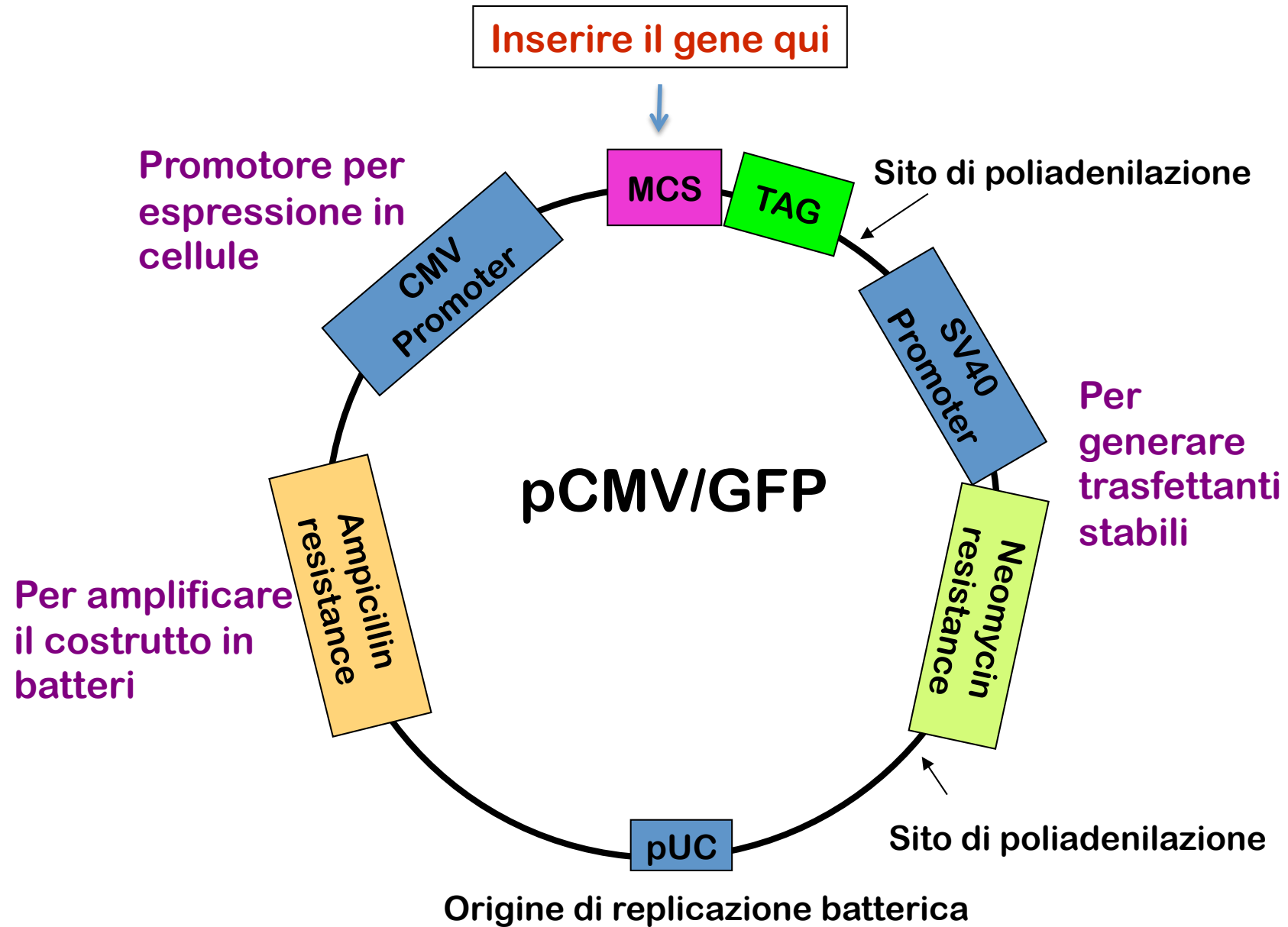


2) Sequenze necessarie al **clonaggio** del gene e alla sua **espressione** in cellule **eucariotiche**:

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



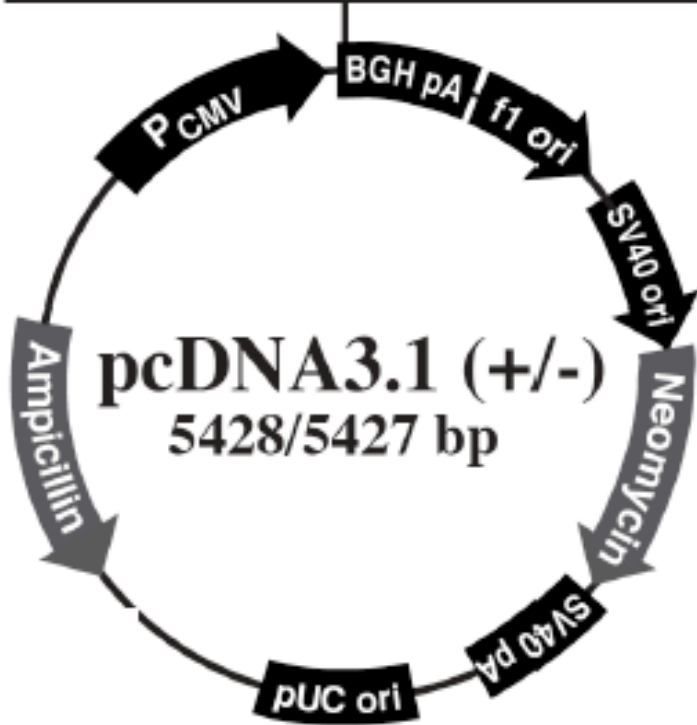
Vettore per espressione di cDNA



Il vettore pCDNA



P_{CMV}: CMV enhancer-promoter
 BGHpA: BGH polyadenylation
 signal and termination sequence
 f1 origin
 SV40 origin
 SV40 polyadenylation signal
 ampicillin resistance gene
 pUC origin



Espressione di proteine di fusione e TAGs

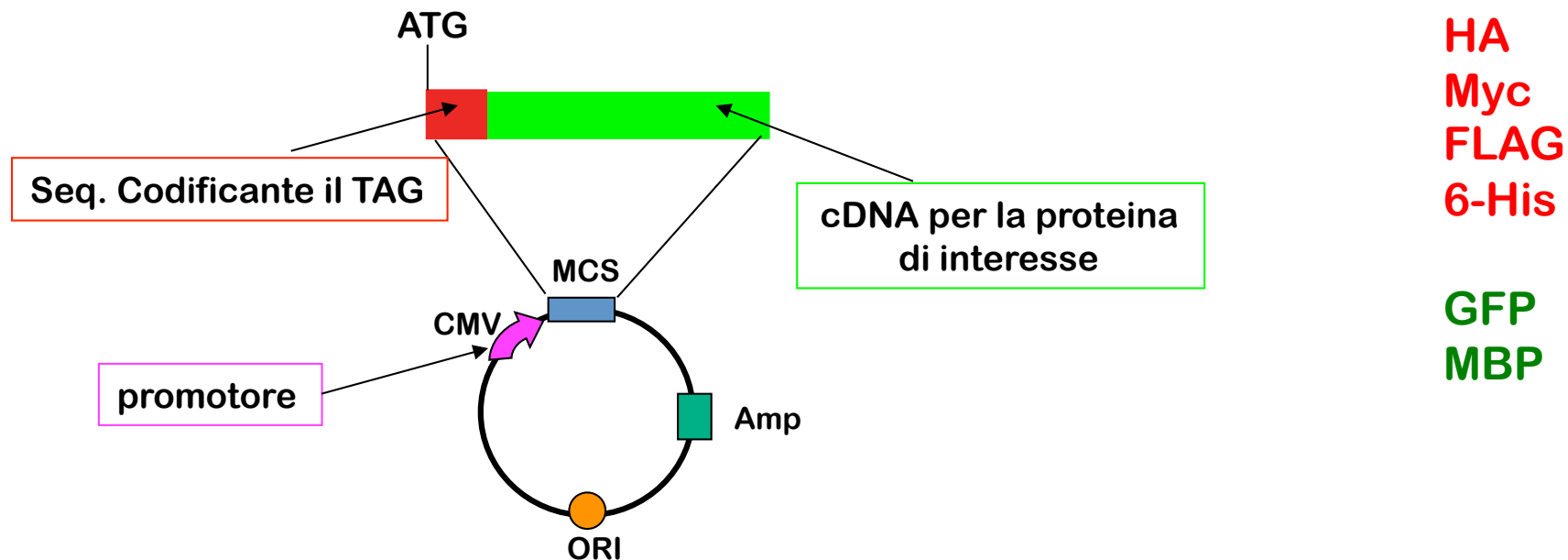
Allo scopo di VISUALIZZARE, ISOLARE O PURIFICARE una proteina sovraespressa,

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:

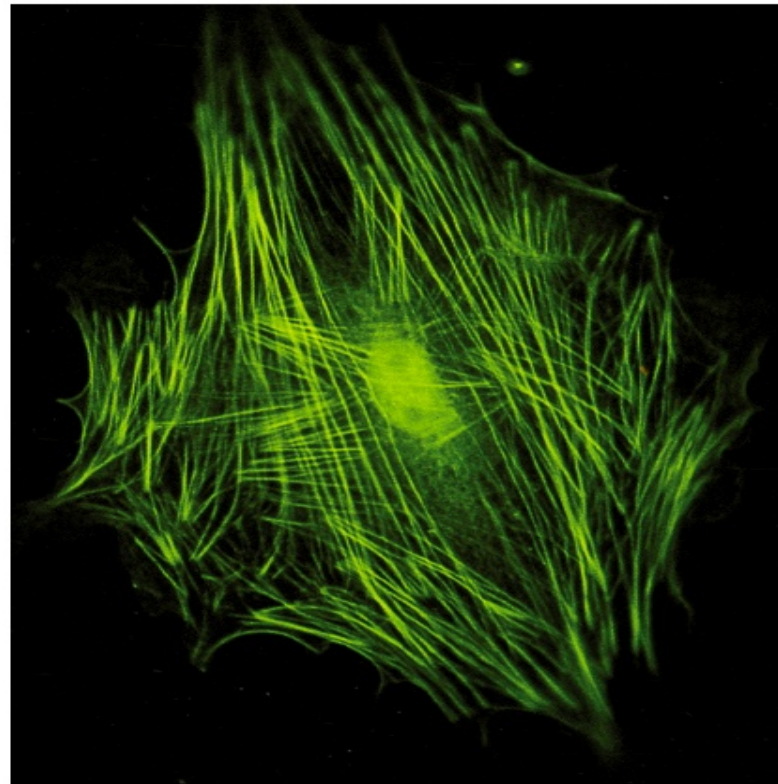
NB: bisogna controllare che la cornice di lettura sia mantenuta!



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

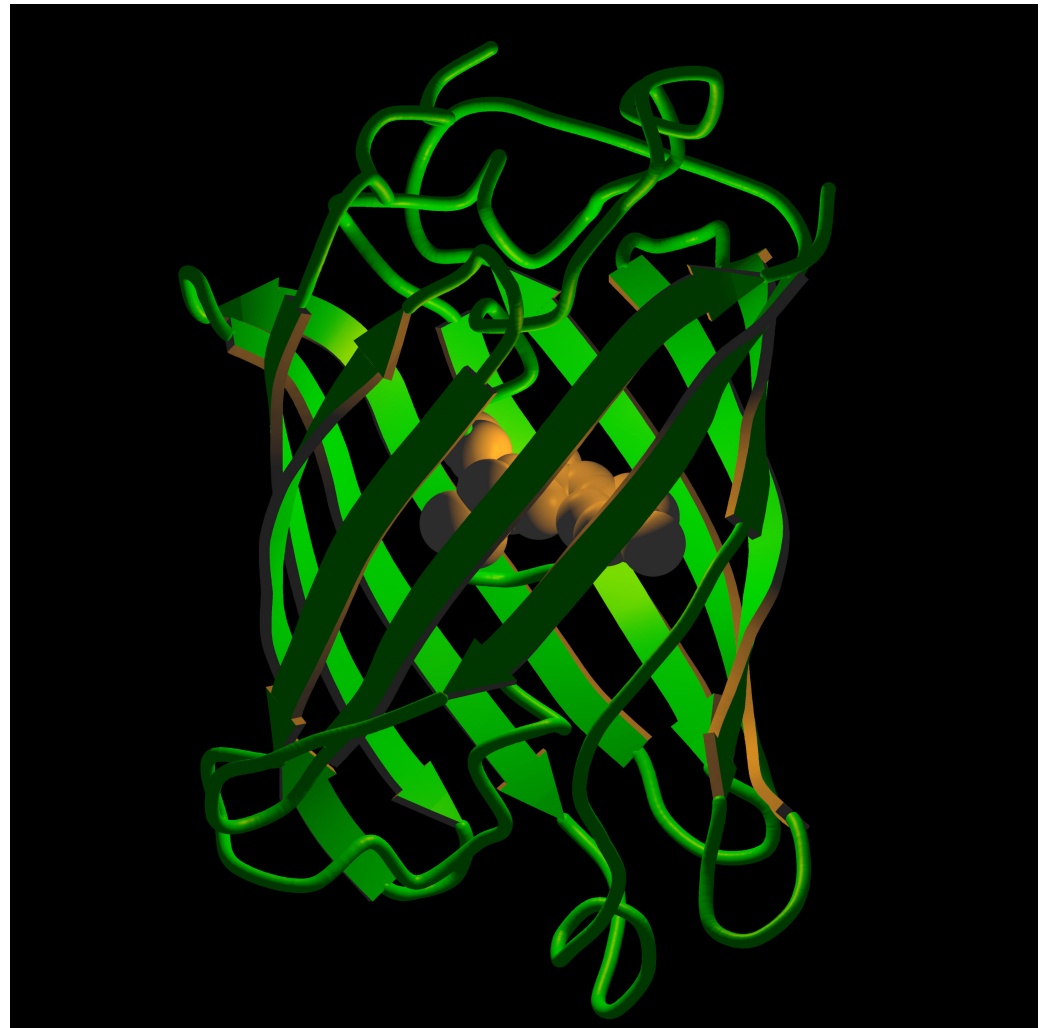
reazione autocatalitica

◆ Assorbe ed emette nel **visibile**

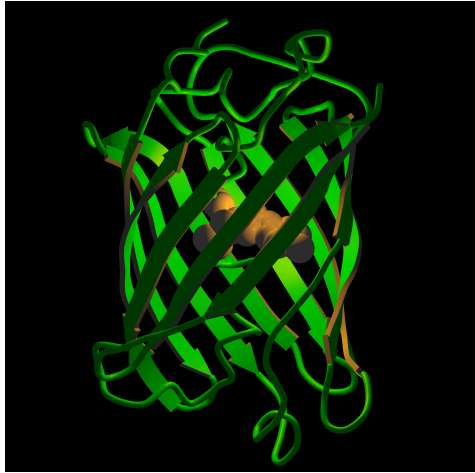
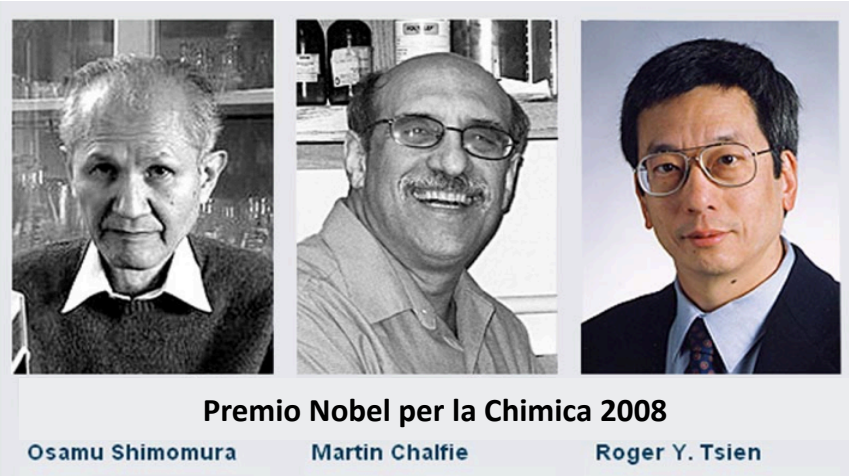
Osservazione al microscopio
a fluorescenza

Ex: 475 nm

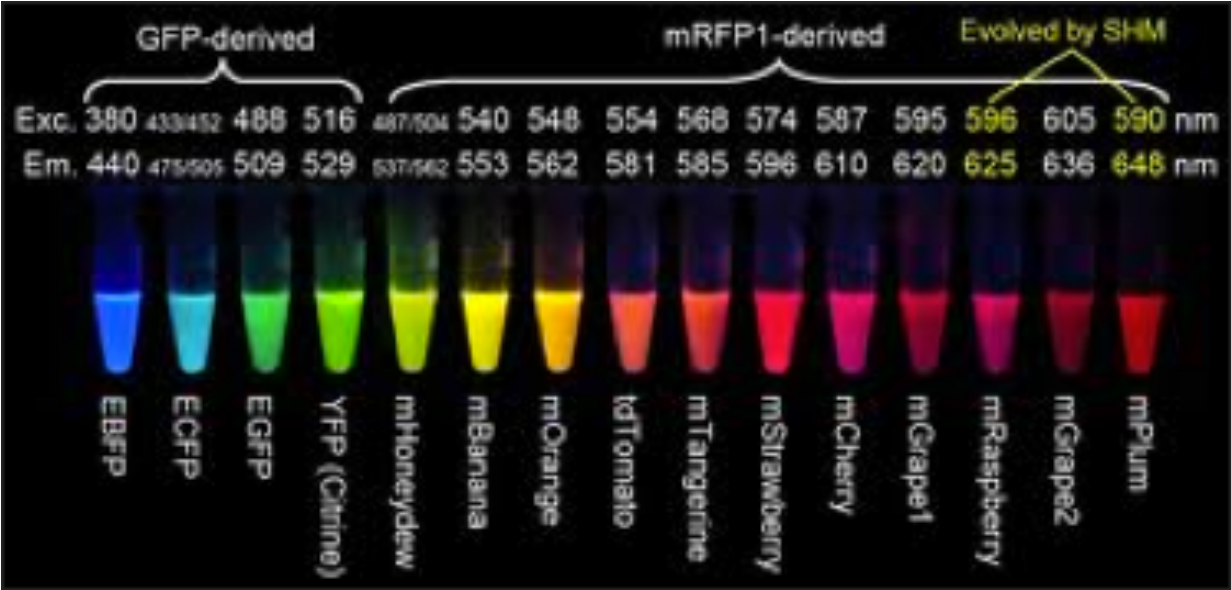
Em: 525 nm



Imaging con reporters fluorescenti (fotoproteine)



GFP
 ↓
 EGFP etc.

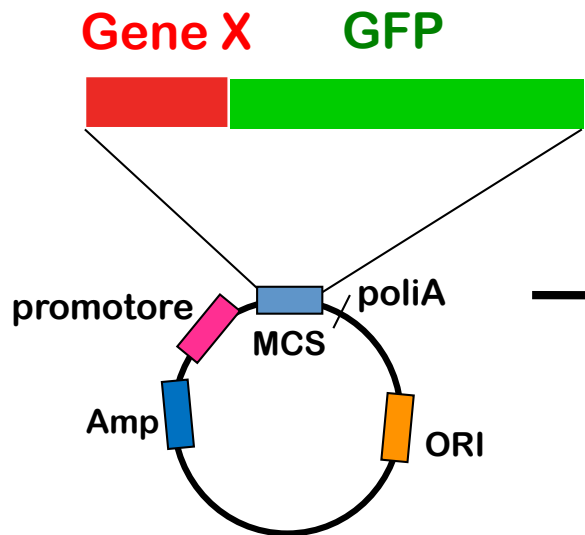
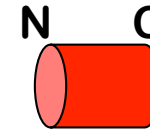


Utilizzo di fotoproteine per determinare la LOCALIZZAZIONE di una proteina di interesse (espressa in fusione)

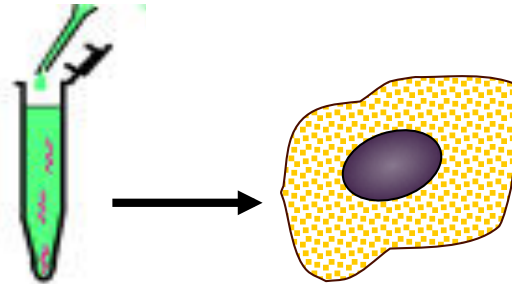
Gene X



Codifica per la proteina di interesse X

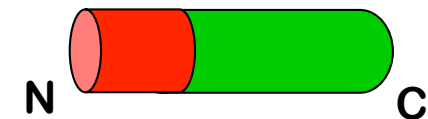


Trasfezione



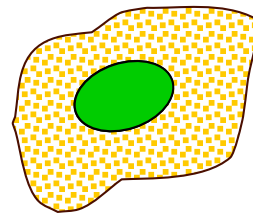
Trascrizione e traduzione:

espressione della proteina di fusione nelle cellule



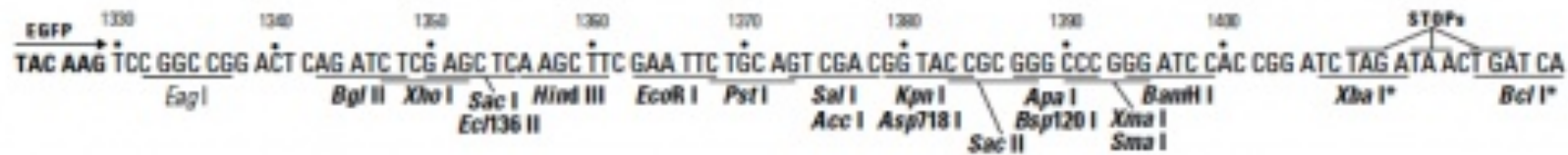
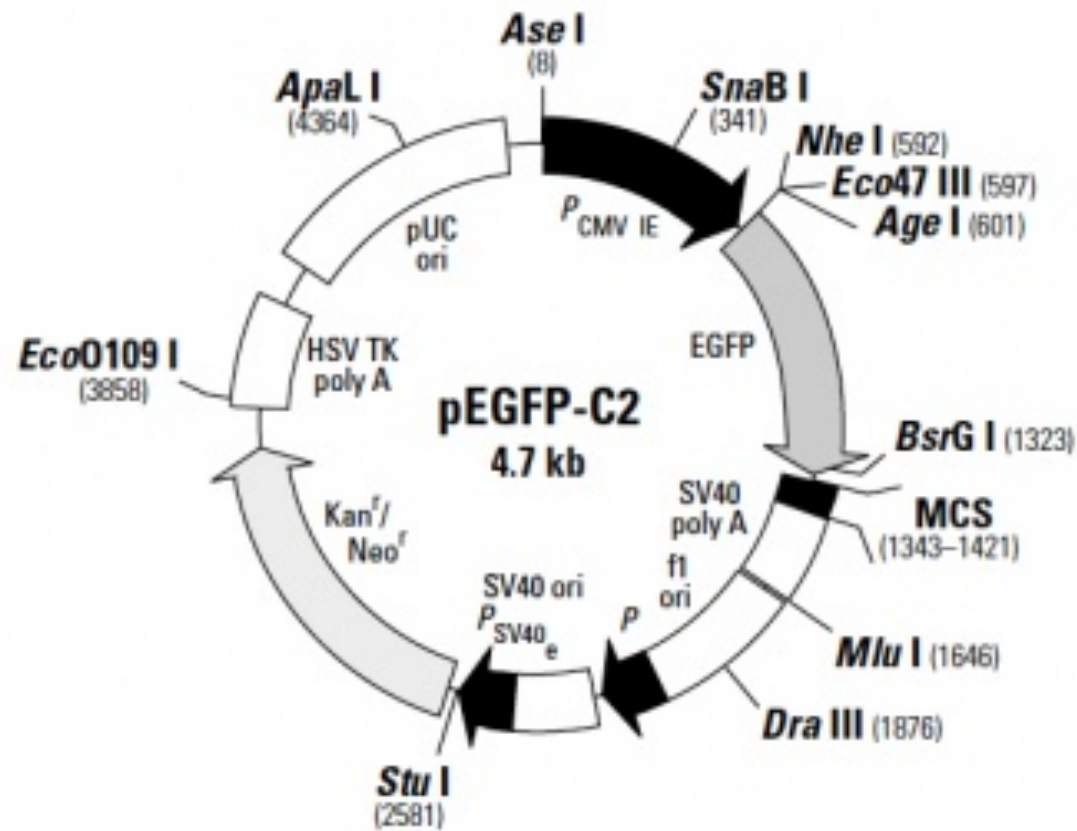
La proteina X assume la sua tipica localizzazione intracellulare

Visualizzazione in situ



Osservazione al microscopio a fluorescenza

Ex: 475 nm
Em: 525 nm



Problema:

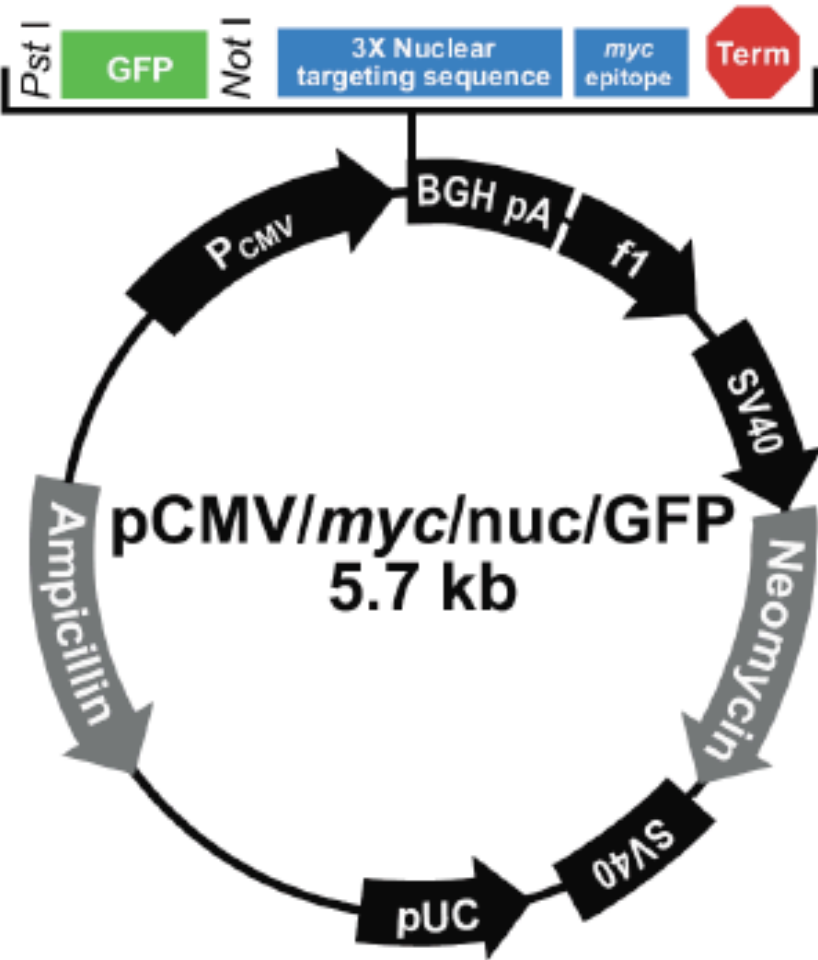
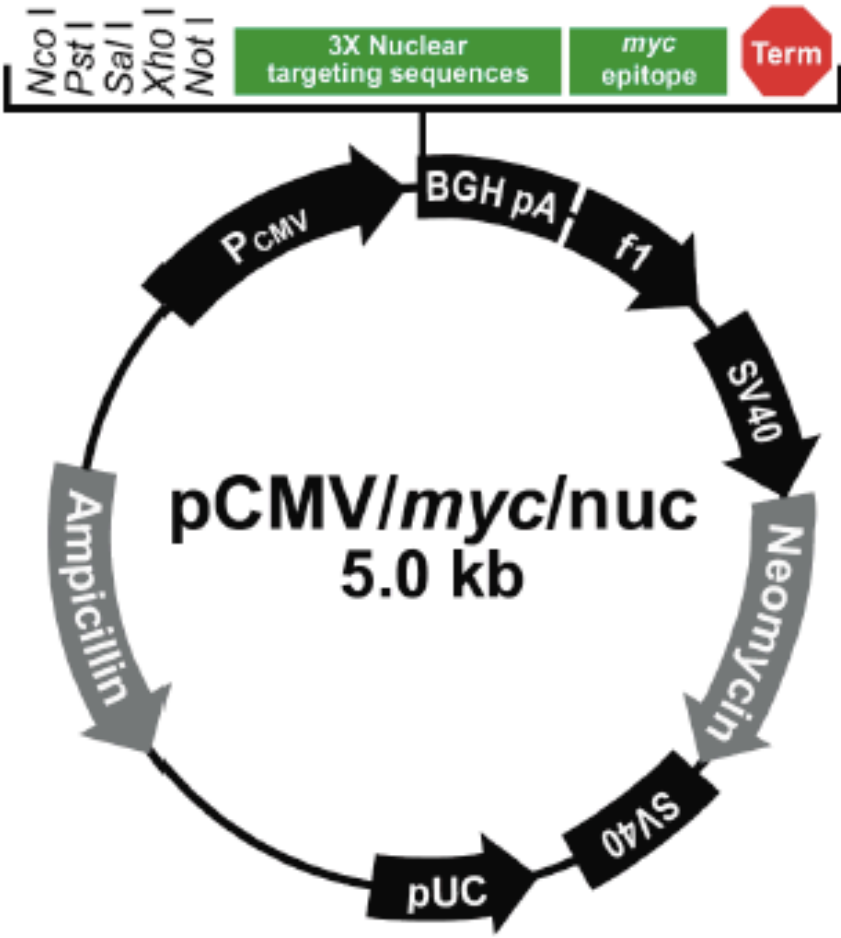
**dirigere l'espressione di una proteina ectopica a
una specifica localizzazione subcellulare**

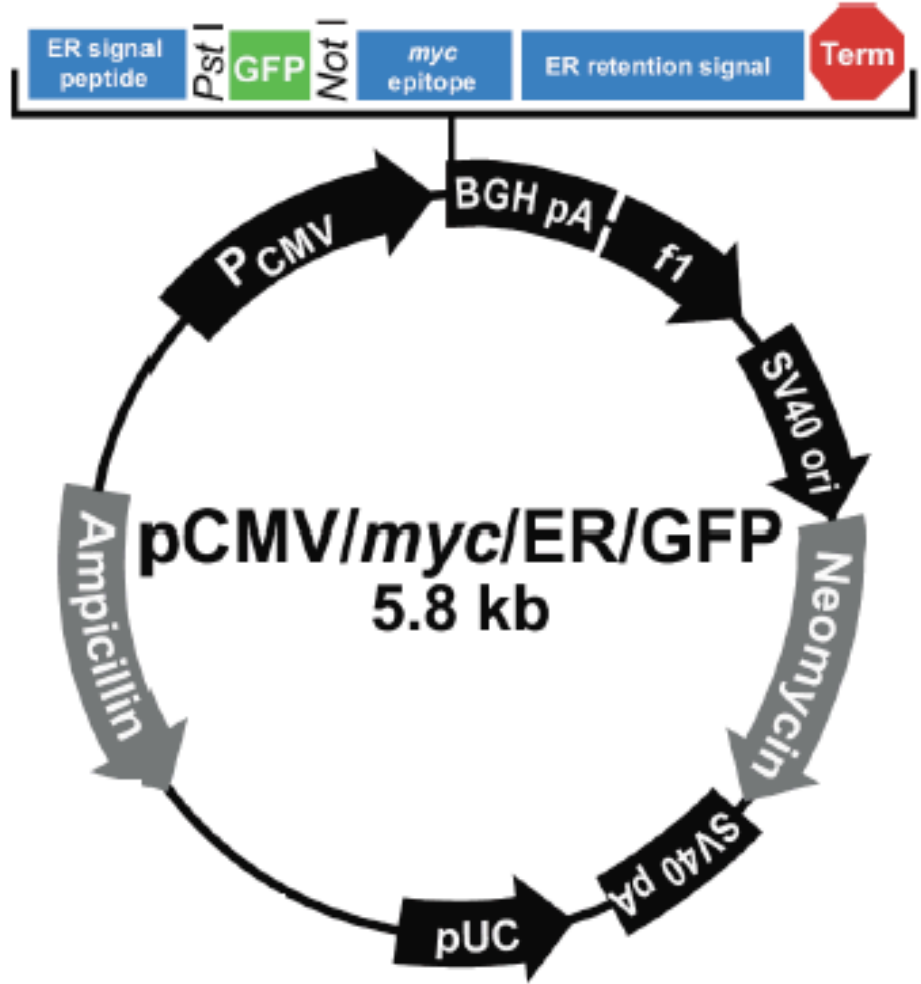
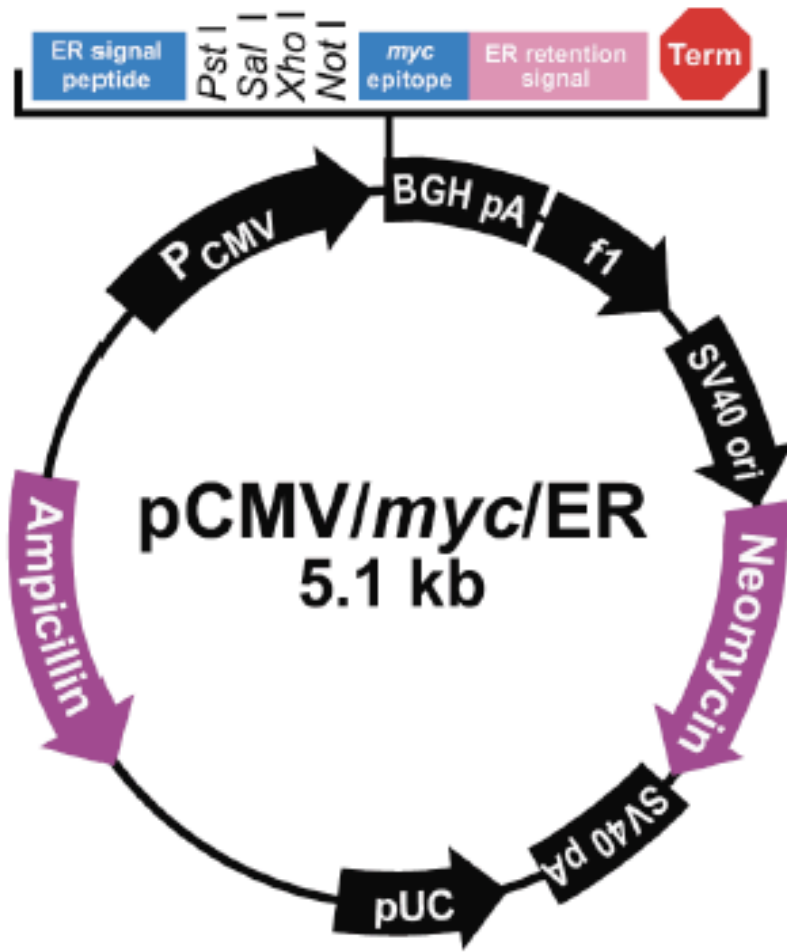
Problema:

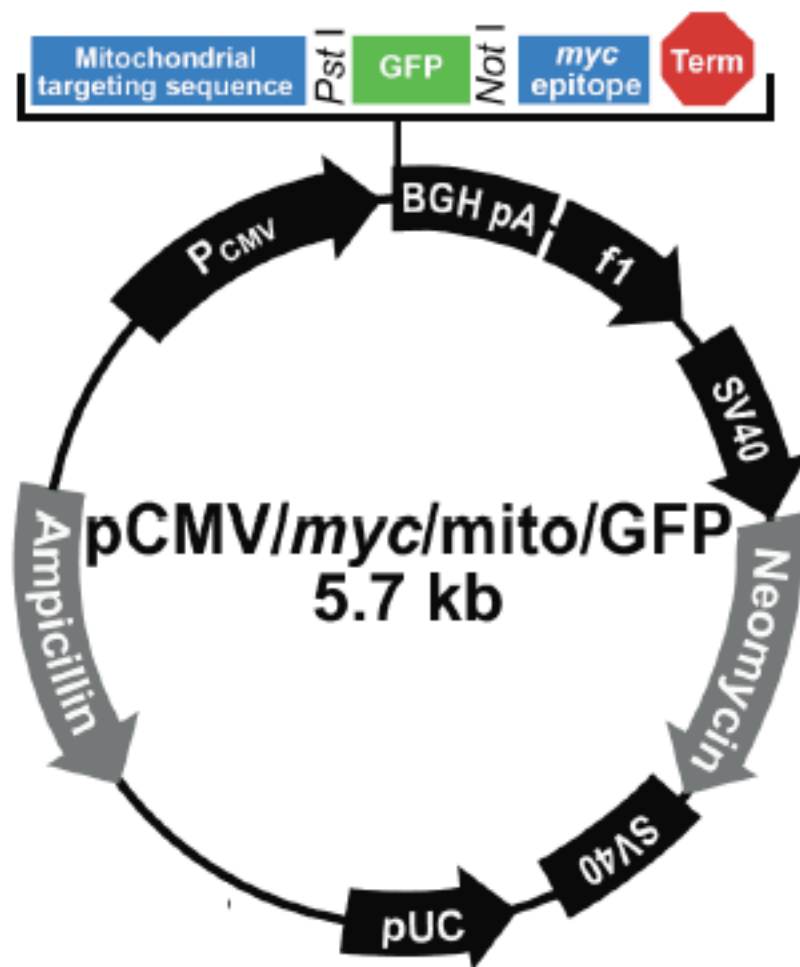
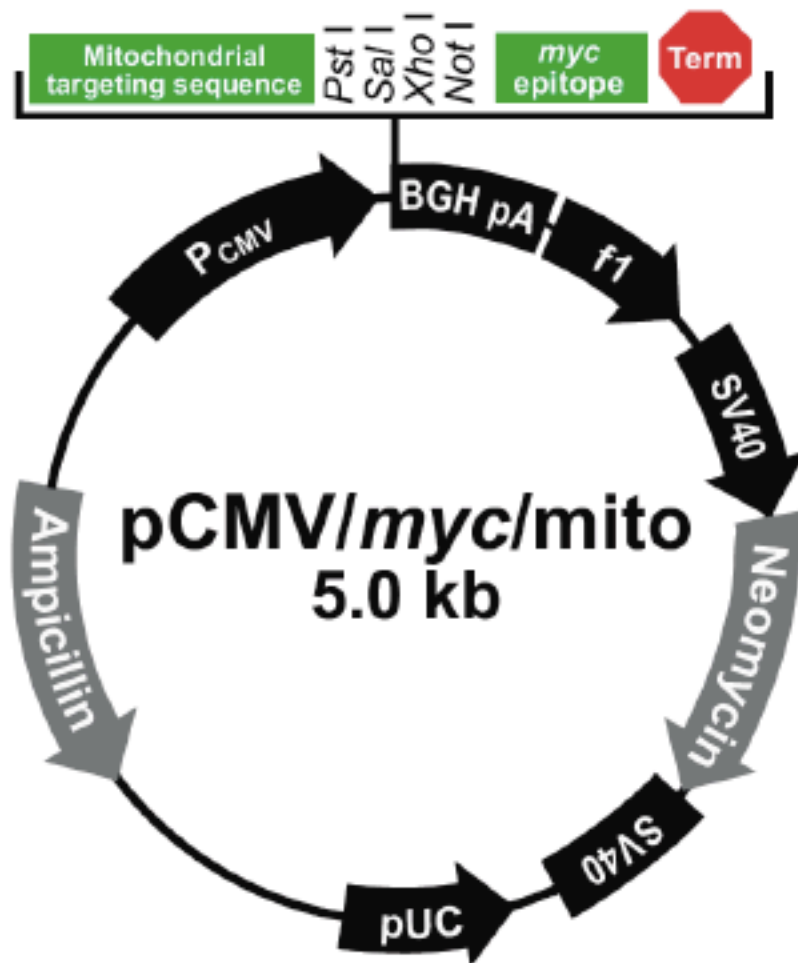
**dirigere l'espressione di una proteina ectopica a
una specifica localizzazione subcellulare**

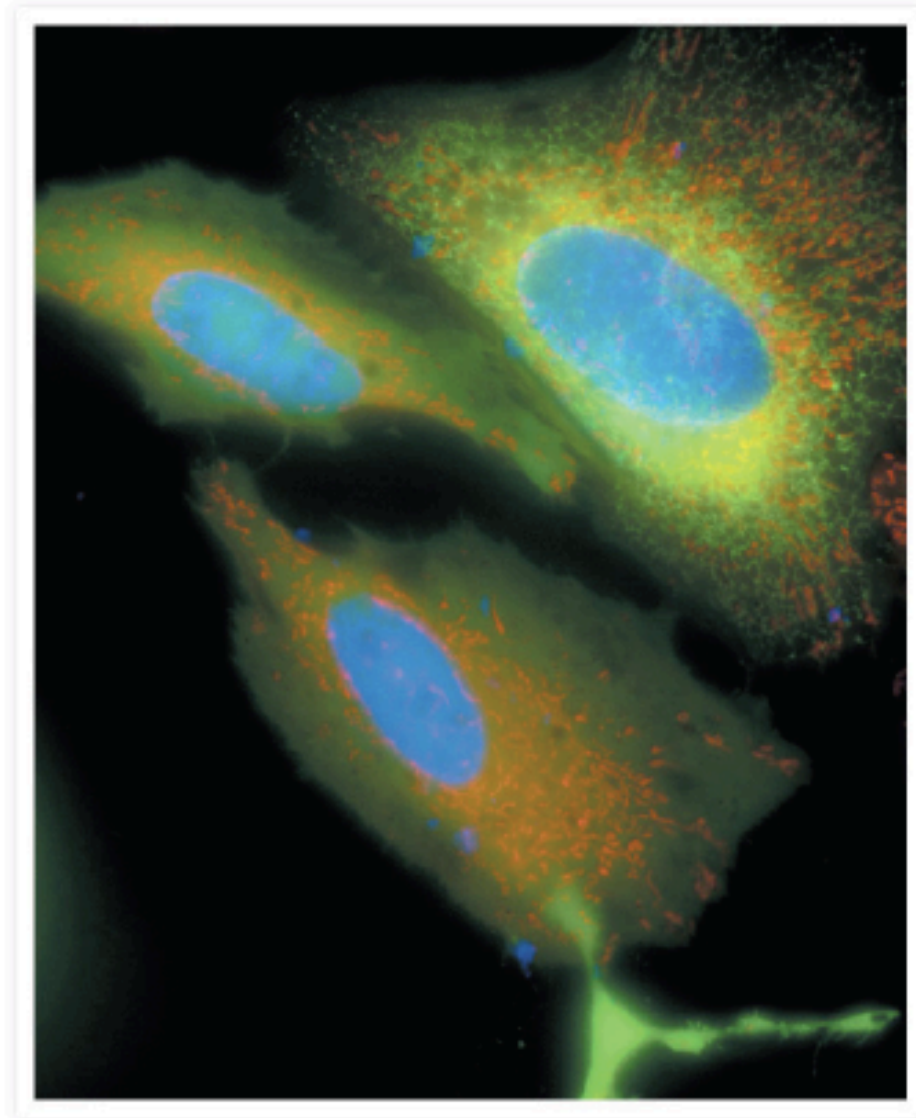
**Soluzione: vettori di espressione che contengono
sequenze SEGNALE**

Localizzazione subcellulare di proteine di fusione

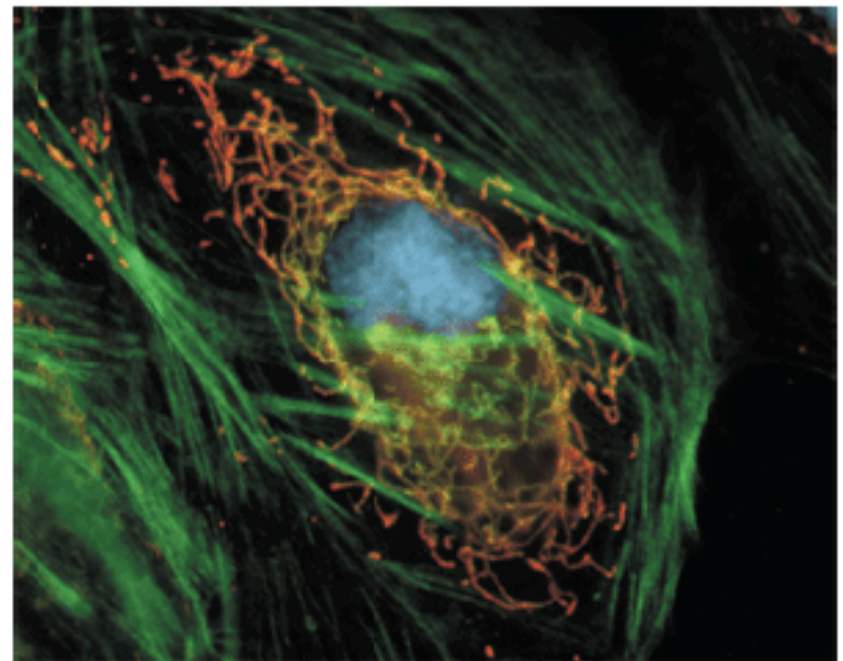
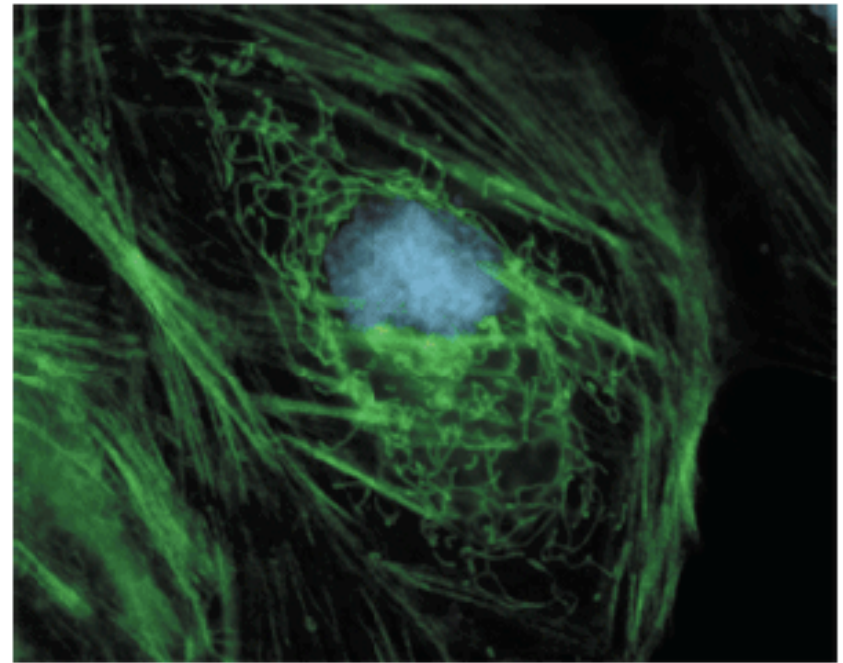








pShooter (ER)



pShooter (mito)

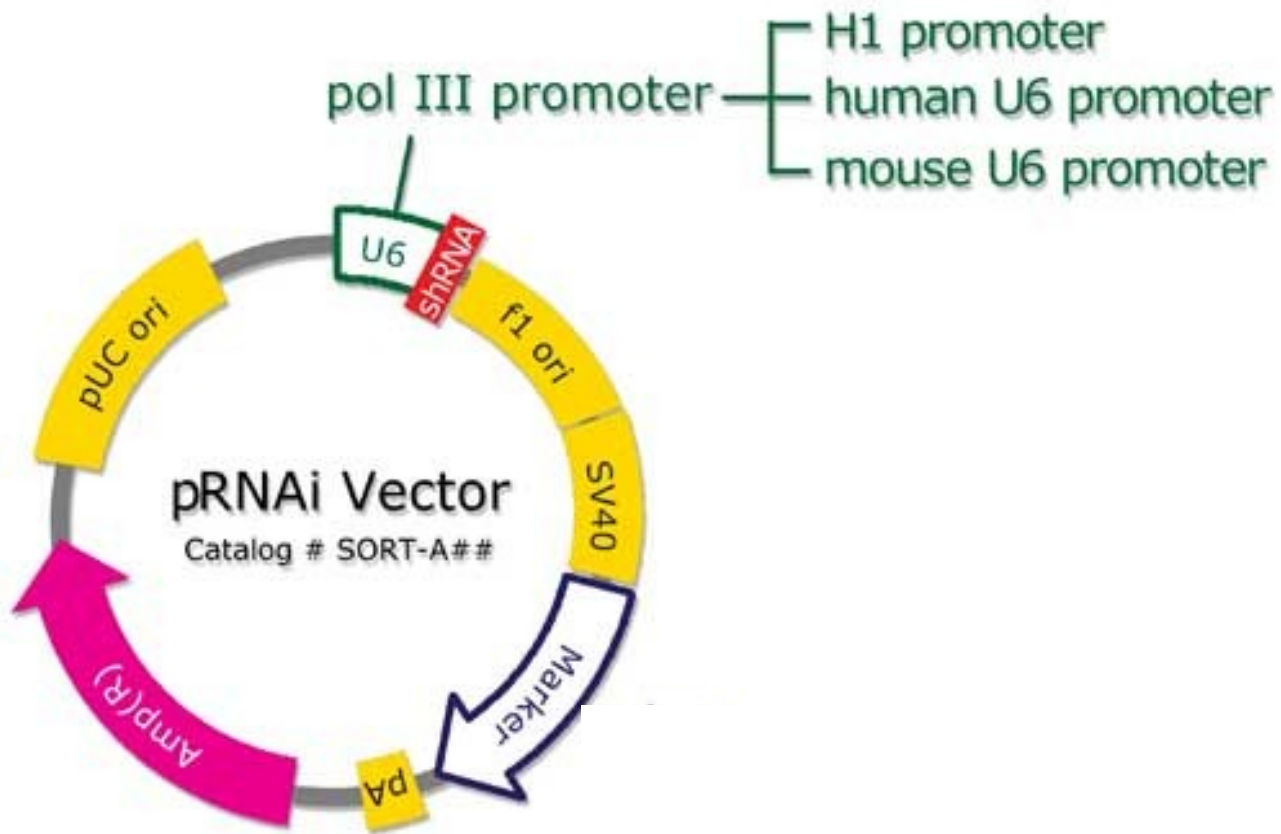
**Problema:
ridurre l'espressione di una proteina endogena**

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

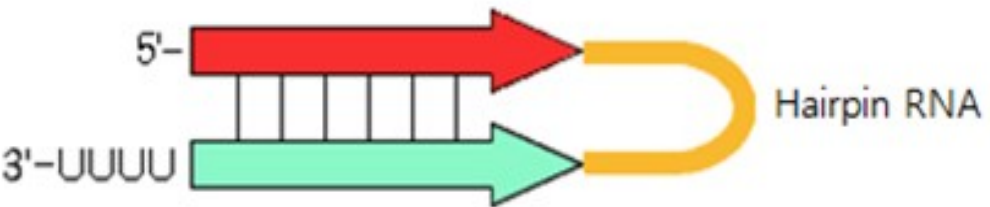
Espressione di shRNA



Espressione di shRNA



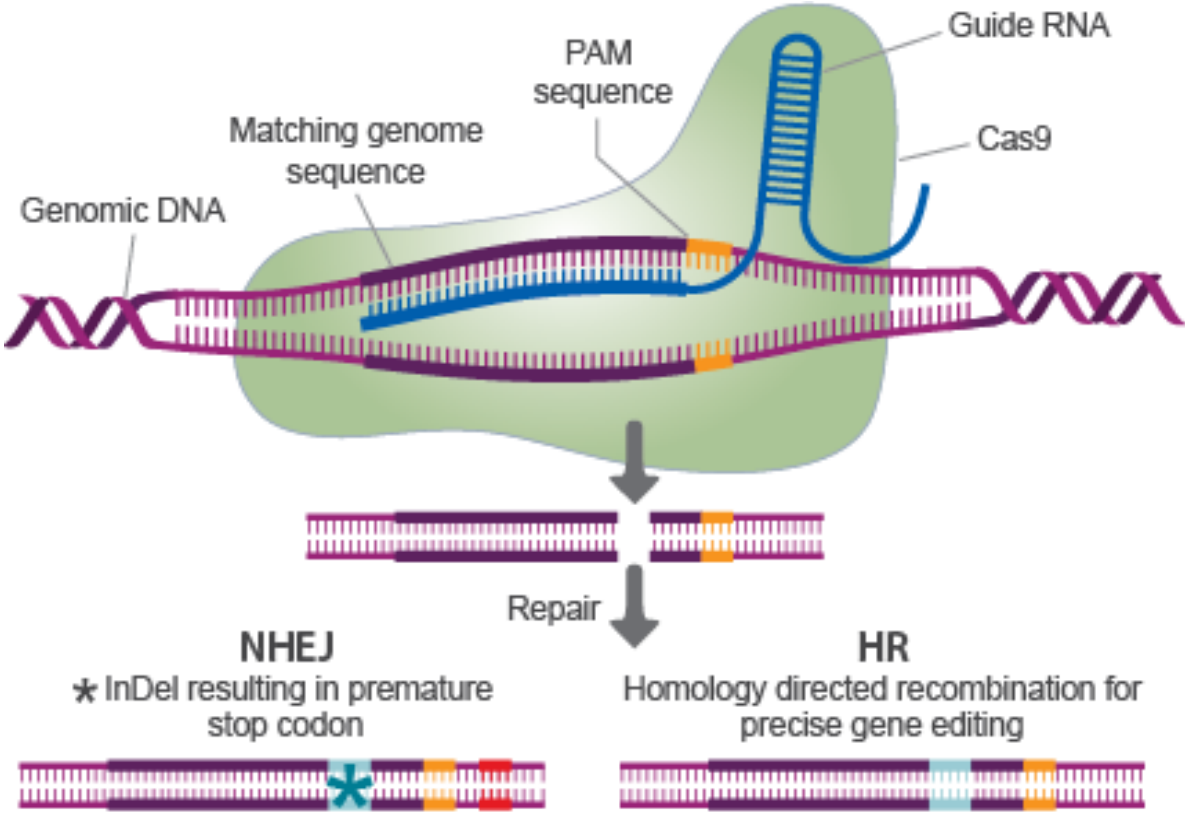
↓ Transcription



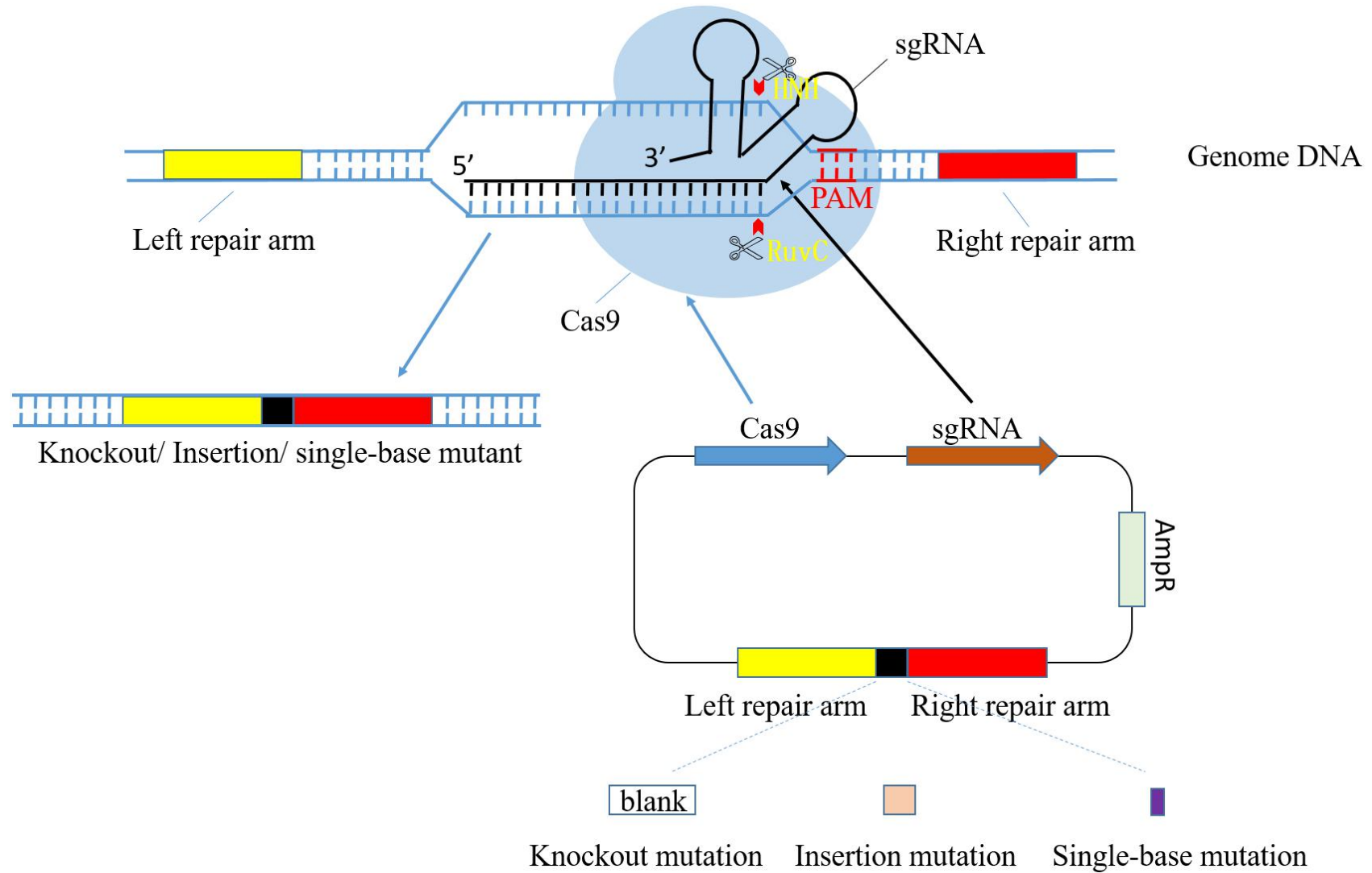
↓ Dicer에 의한 절단



Gene editing mediante CRISPR-Cas9



Vettori per gene editing mediante CRISPR-Cas9



Espressione transiente

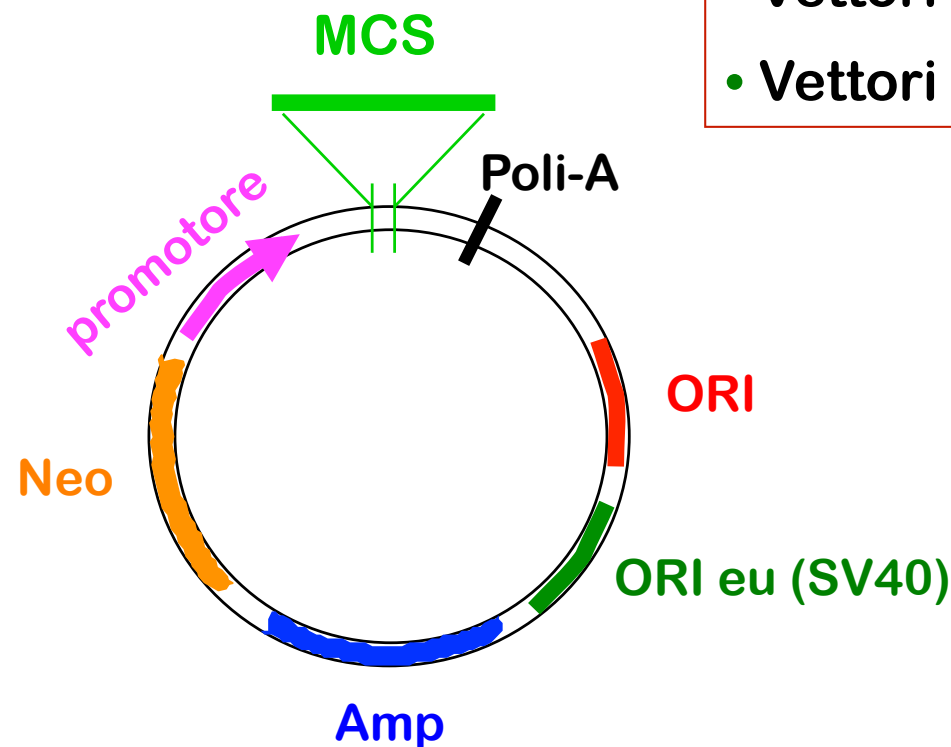
- Il DNA trasfettato rimane in forma di **episoma** ma non può essere replicato, e **viene perso** dopo qualche divisione
- **n° di copie** del plasmide nella cellula trasfettata: elevato e variabile
- **Eterogeneità** di espressione in diverse cellule
- **Esperimenti brevi** (24-72 ore)

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:

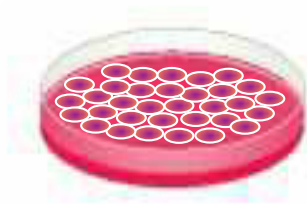
- Marker di **selezione** (geni per la resistenza a Neomicina –G418, Puromicina, Hygromicina) per l'ottenimento di cloni stabili
- Sequenze per la **replicazione autonoma** in cellule eucariotiche (**origine virale**)



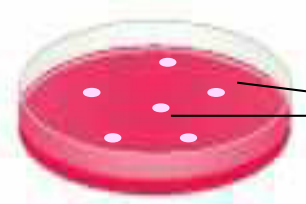
- Vettori ad integrazione
- Vettori episomiali

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

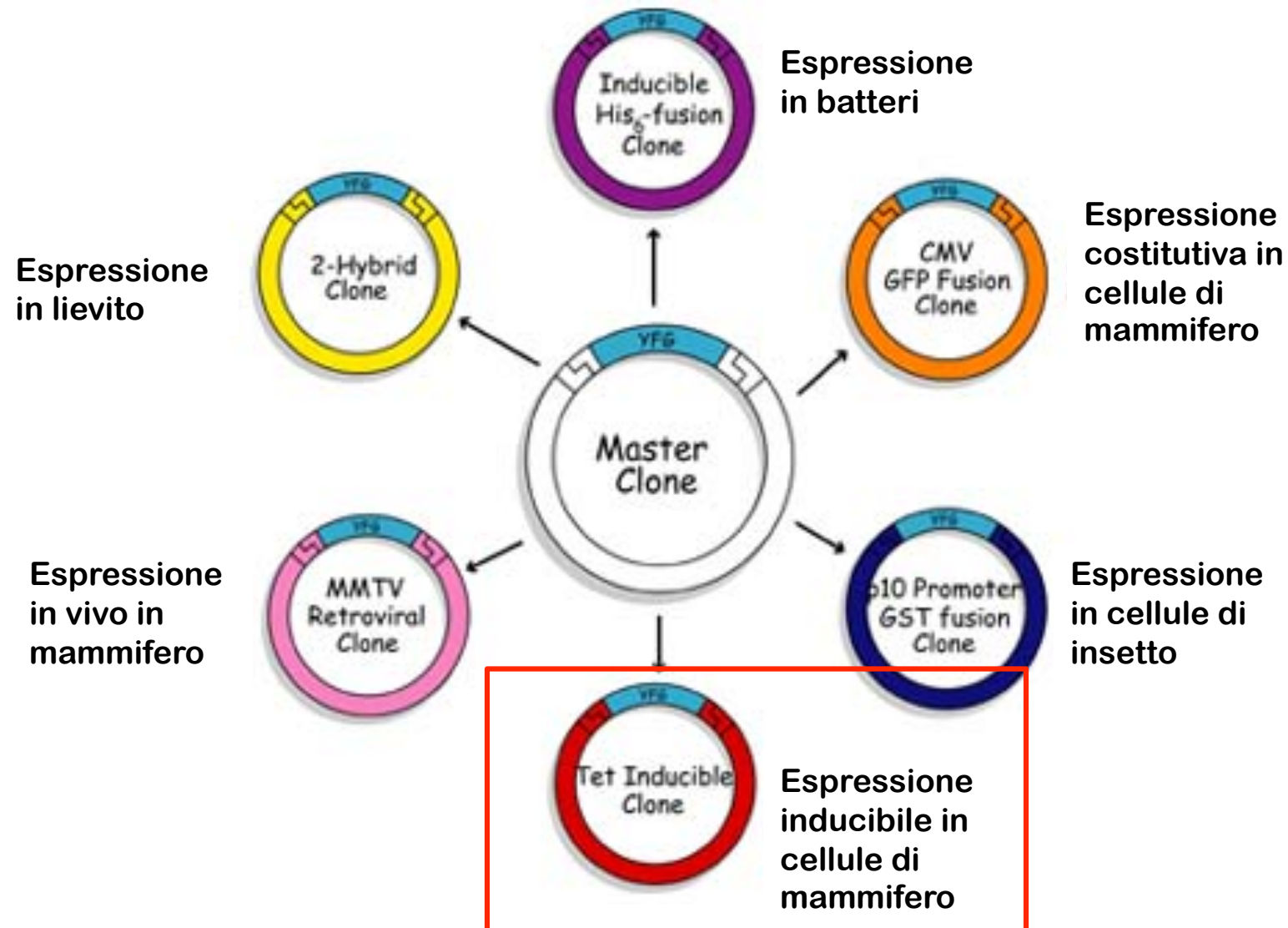
2. **Selezione**: le cellule non trasfettate moriranno

Dopo 2 o più settimane...

3. Isolamento di

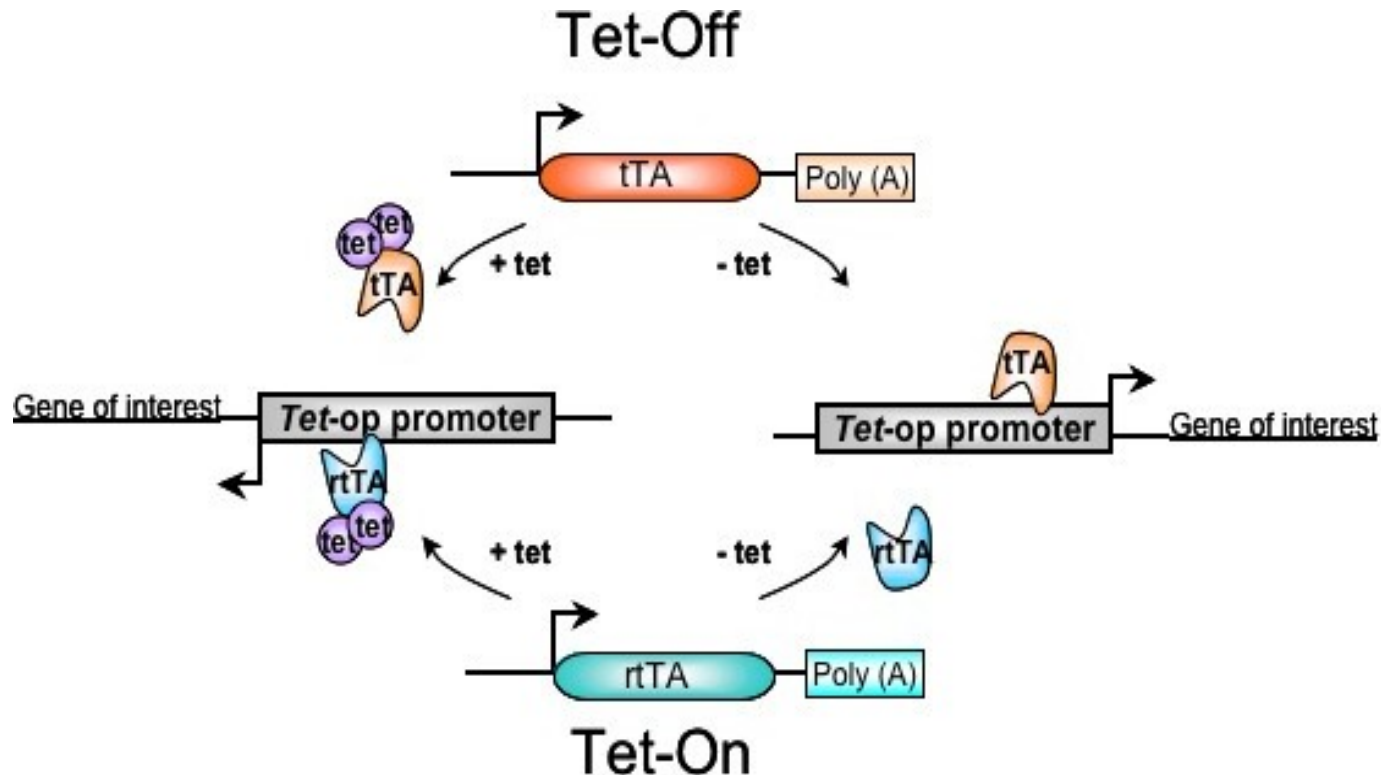
cloni di cellule che esprimono la proteina

Espressione inducibile



Sistemi tet-on/tet-off

TFs controllati da tetraciclina regolano il promotore Tet-op

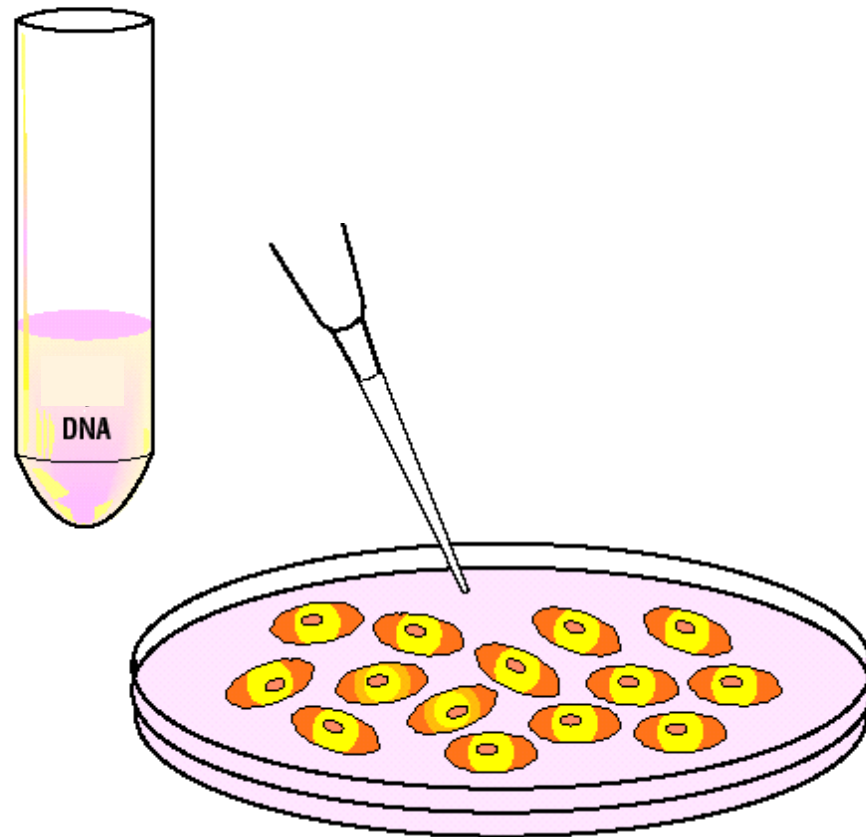


TET-Off system: tetracycline prevents the tTA transcription factor from binding DNA at the promoter. **Gene expression is inhibited** in the presence of tetracycline.

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
Cellule che si trasfettano facilmente (alcune linee cellulari)	Reagenti chimici
Cellule che si trasfettano difficilmente (alcune linee cellulari, cellule primarie)	Lipofezione
Cellule che si trasfettano molto difficilmente (cellule primarie, cellule differenziate)	Trasferimento genico mediato da virus
	Metodi fisici

Precipitazione con calcio fosfato

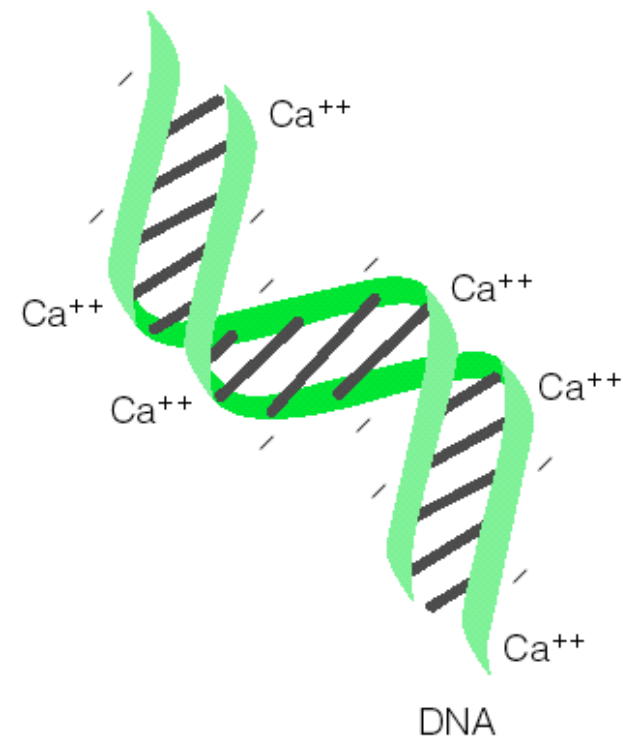
Il DNA viene mescolato a CaCl_2 in un **tampone fosfato** a pH 7.12: si formano dei precipitati insolubili di DNA/CaPO_4 che vengono poi aggiunti al mezzo di coltura e **precipitano** sulle cellule. Il DNA entra nelle cellule per **endocitosi**.

Tipo di **cellule**: in adesione

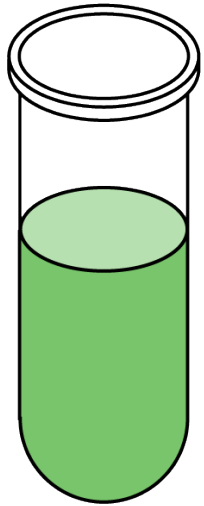
Efficienza: bassa

Tossicità: bassa

Tipo di **saggio**: transiente e stabile

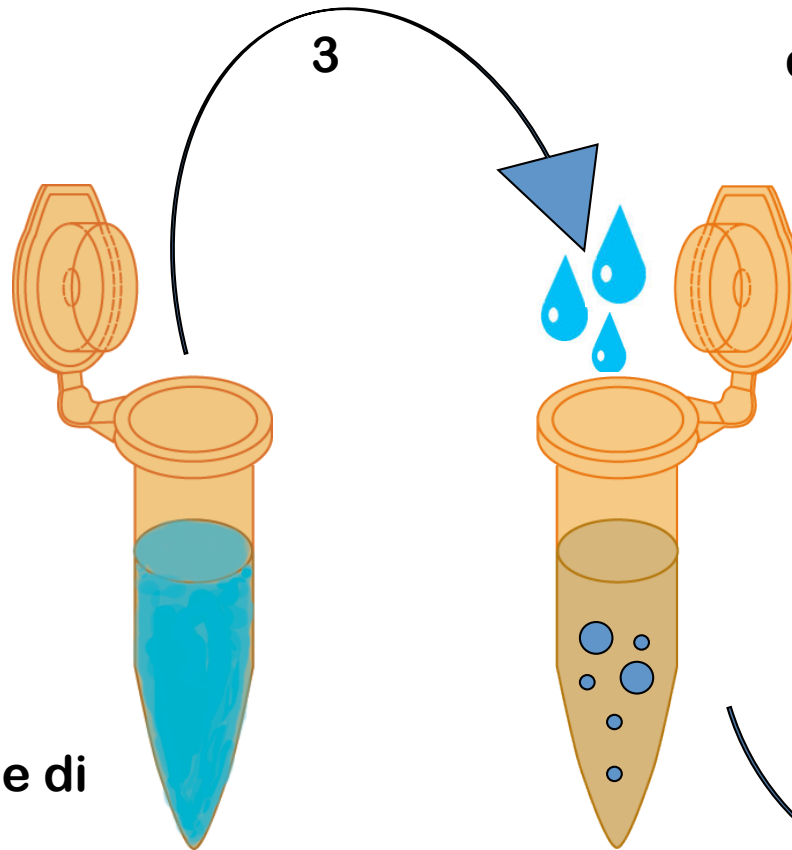


Trasfezione con calcio-fosfato



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

2. Soluzione di DNA + CaCl₂ in H₂O



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

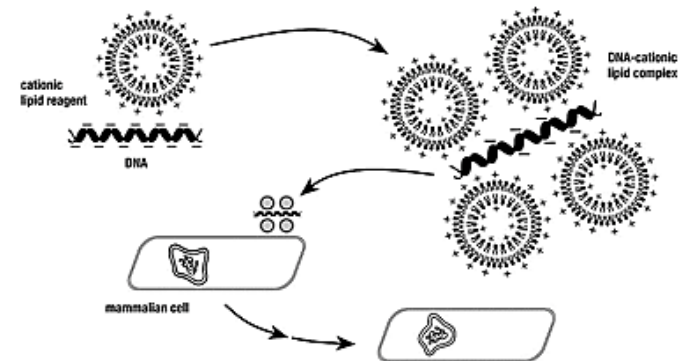


Lipofezione

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

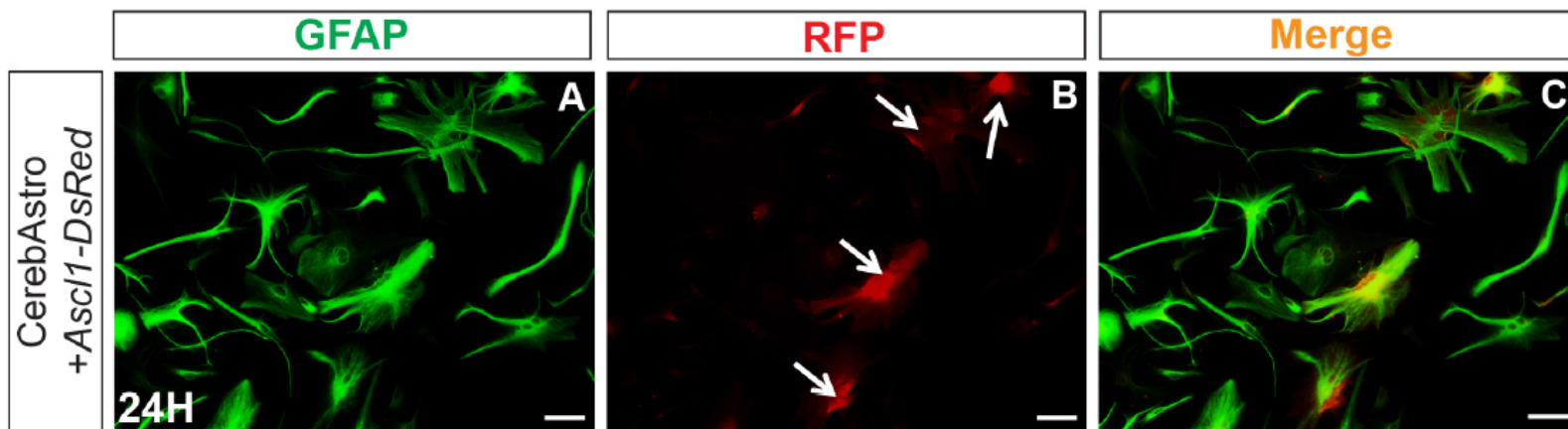
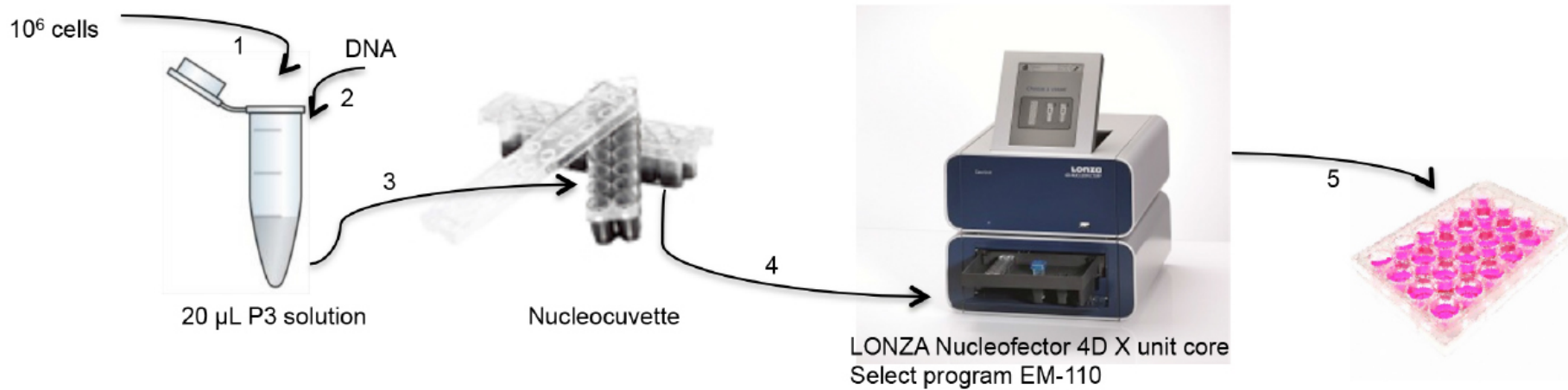
Efficienza: alta

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**

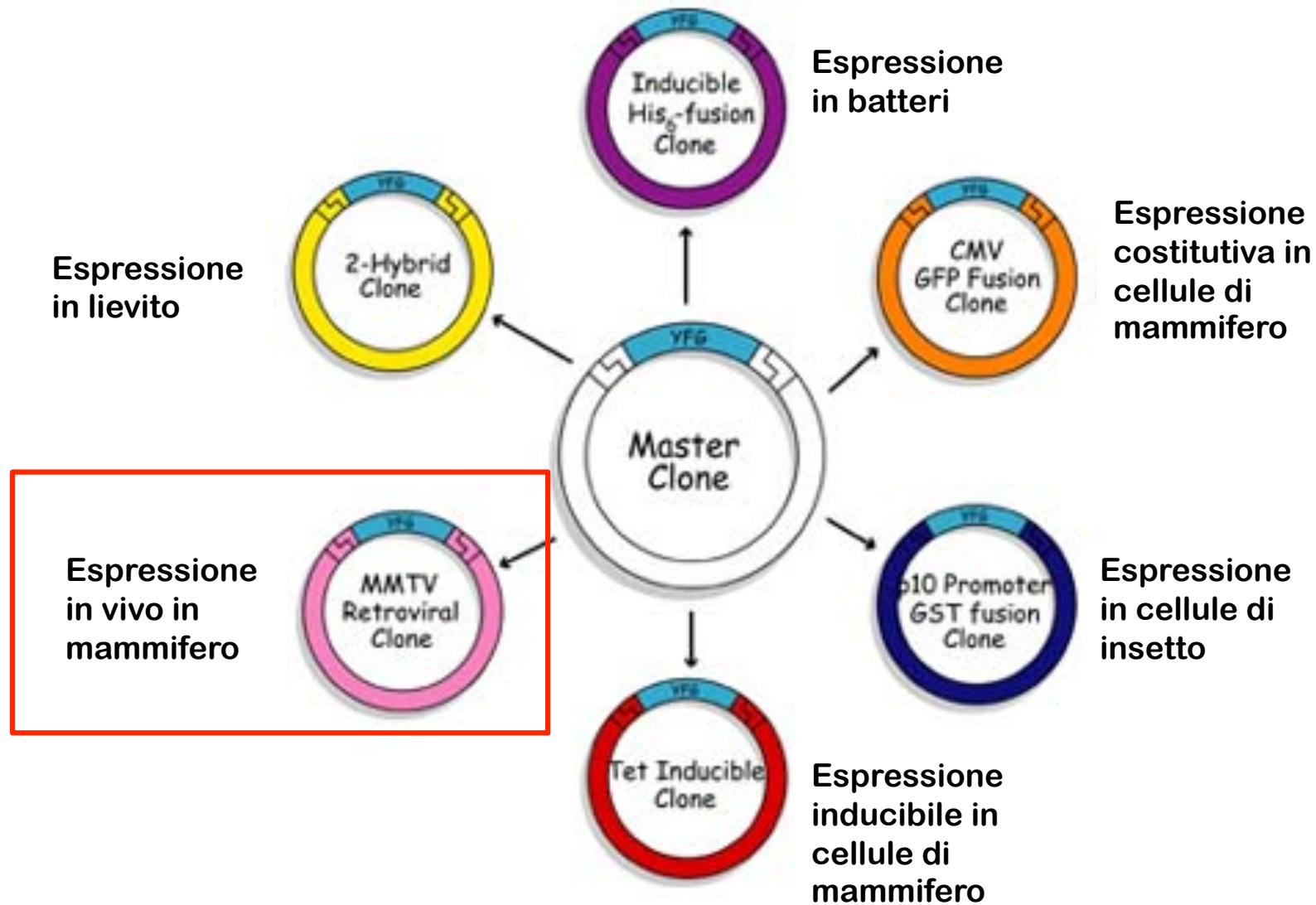
che vengono poi “**sparate**” nelle cellule mediante un'apposita strumentazione che usa **elio** ad alta pressione.

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

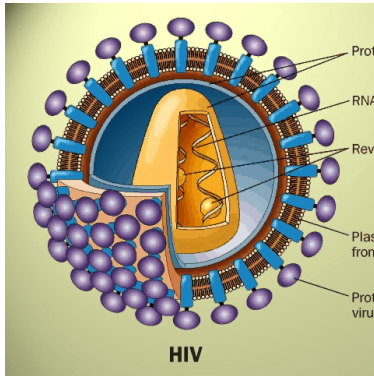
Oppure cellule molto difficili da trasfettare, es. cellule vegetali (dotate di parete).



Metodi biologici: vettori derivati da virus



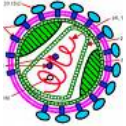
Trasferimento genico mediato da virus



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 capside virale (*packaging cell line*).

Trasferimento genico mediato da virus

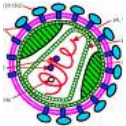


Infezione stabile:

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.**

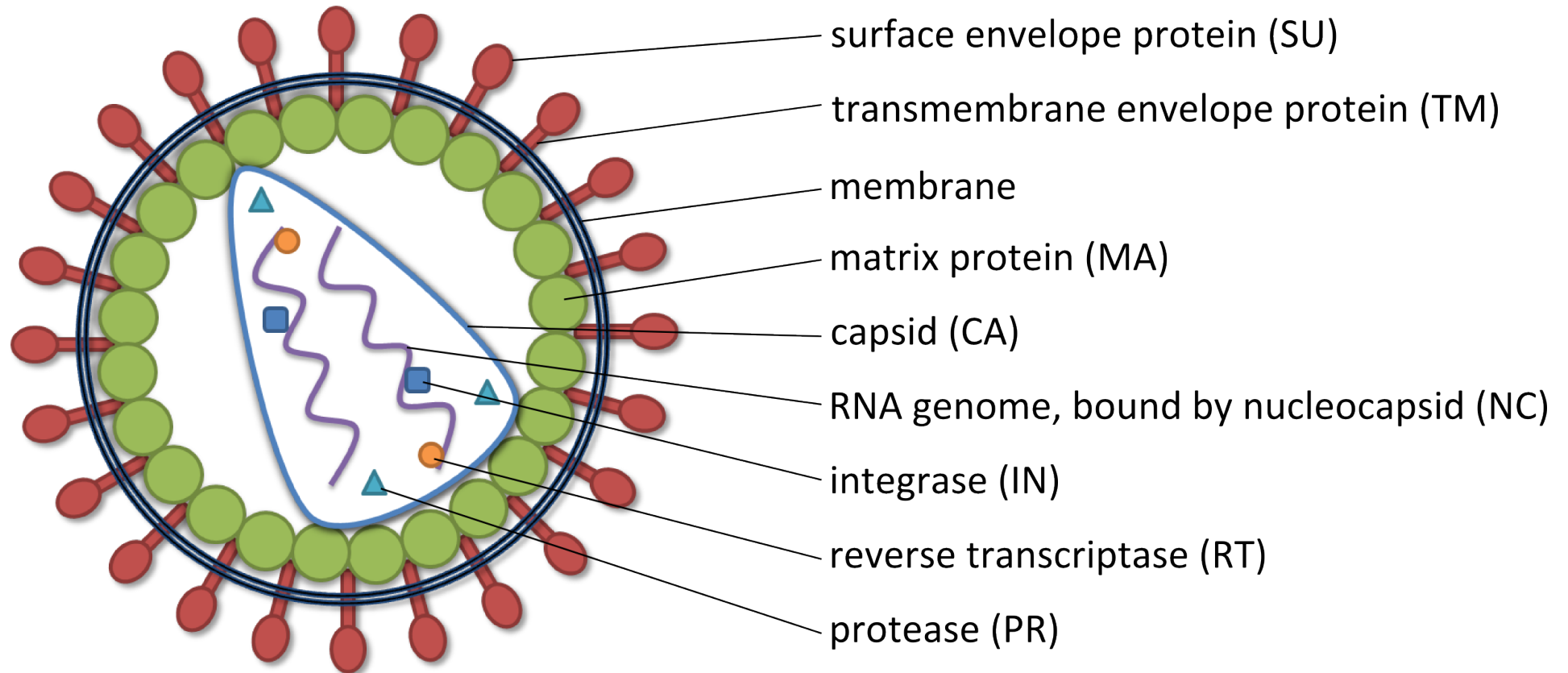


Infezione transiente:

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

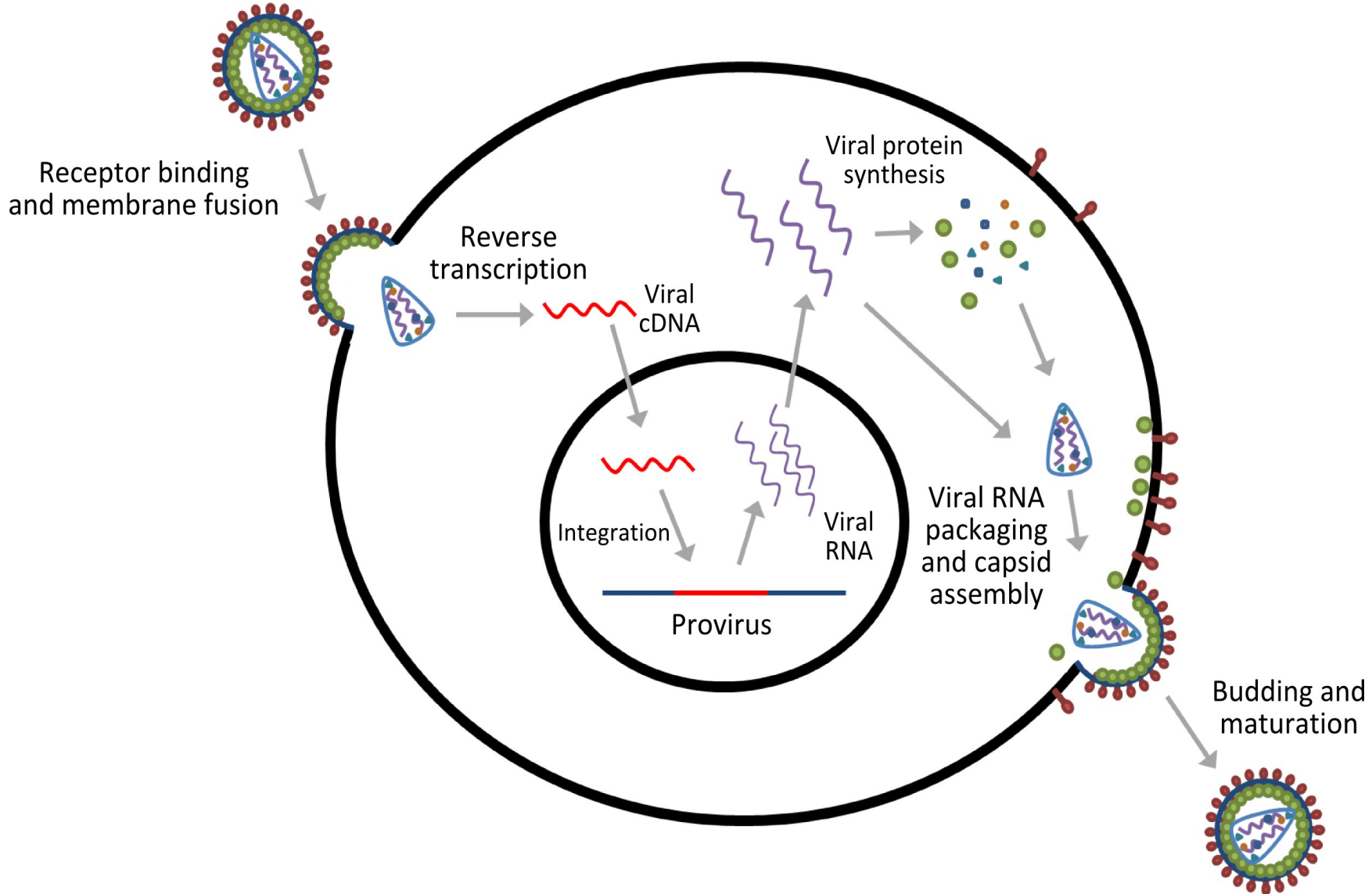


POL codifica per gli enzimi **RT, PR e IN**.

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

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

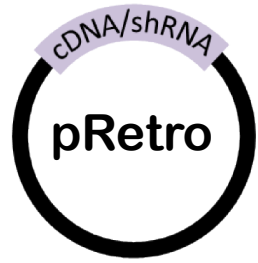
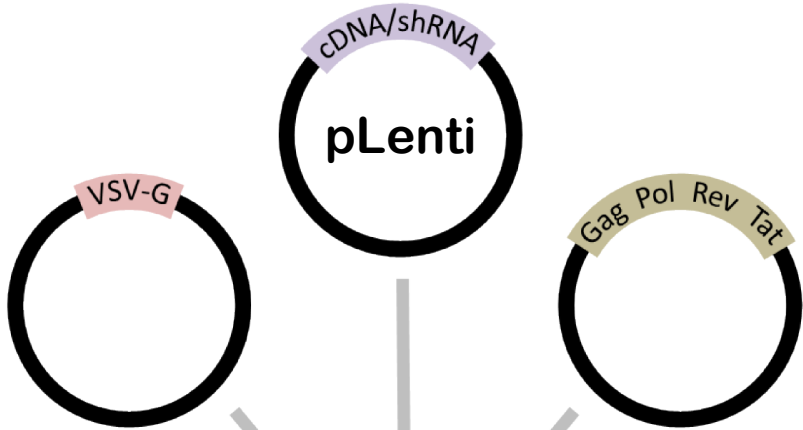
Il ciclo retrovirale



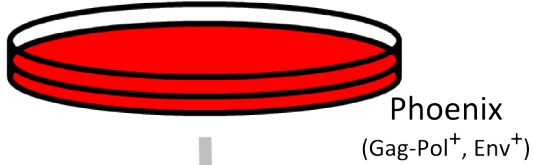
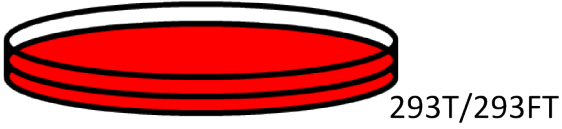
Preparazione di virus ricombinanti per trans-complementazione

Lentivirus

Retrovirus



1) Transfect packaging cells



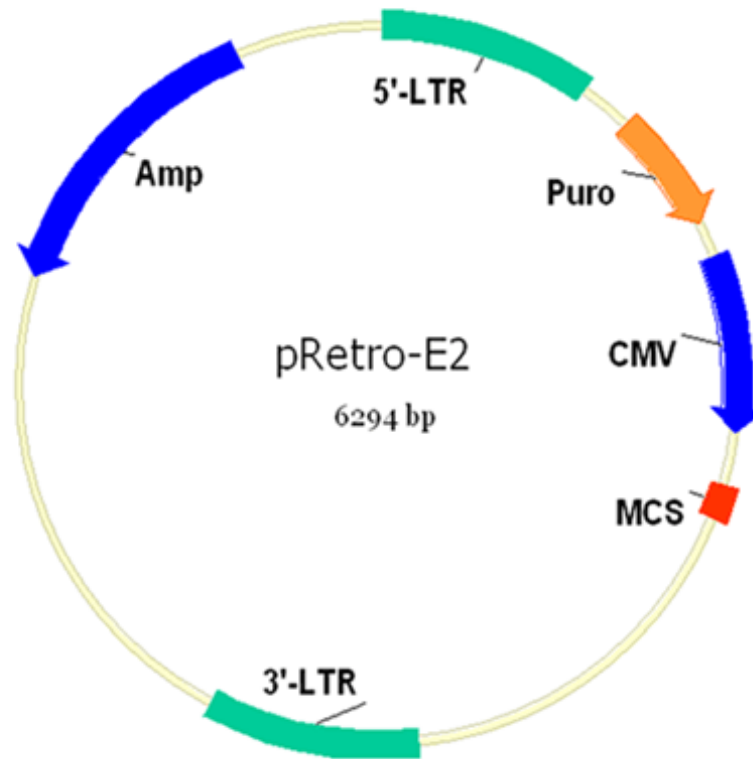
2) Collect virus particles



3) Transduce target cells



Esempio di un vettore retrovirale



Xho I *Apa I* *BamH I* *Hpa I* *Sph I* *Swa I* *Hind III*
 5'- A GAT CTC GAG GGG CCC GGA TCC GTT AAC GCA TGC ATT TAA ATA AGC TTC

EcoR I *Sal I* *Not I* *Cla I*
 GAA TTC GTT AGG CCA TTA AGG CCT GTC GAC AAG CGG CCG CCT CGG CCA AAC ATC GAT -3'



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)**