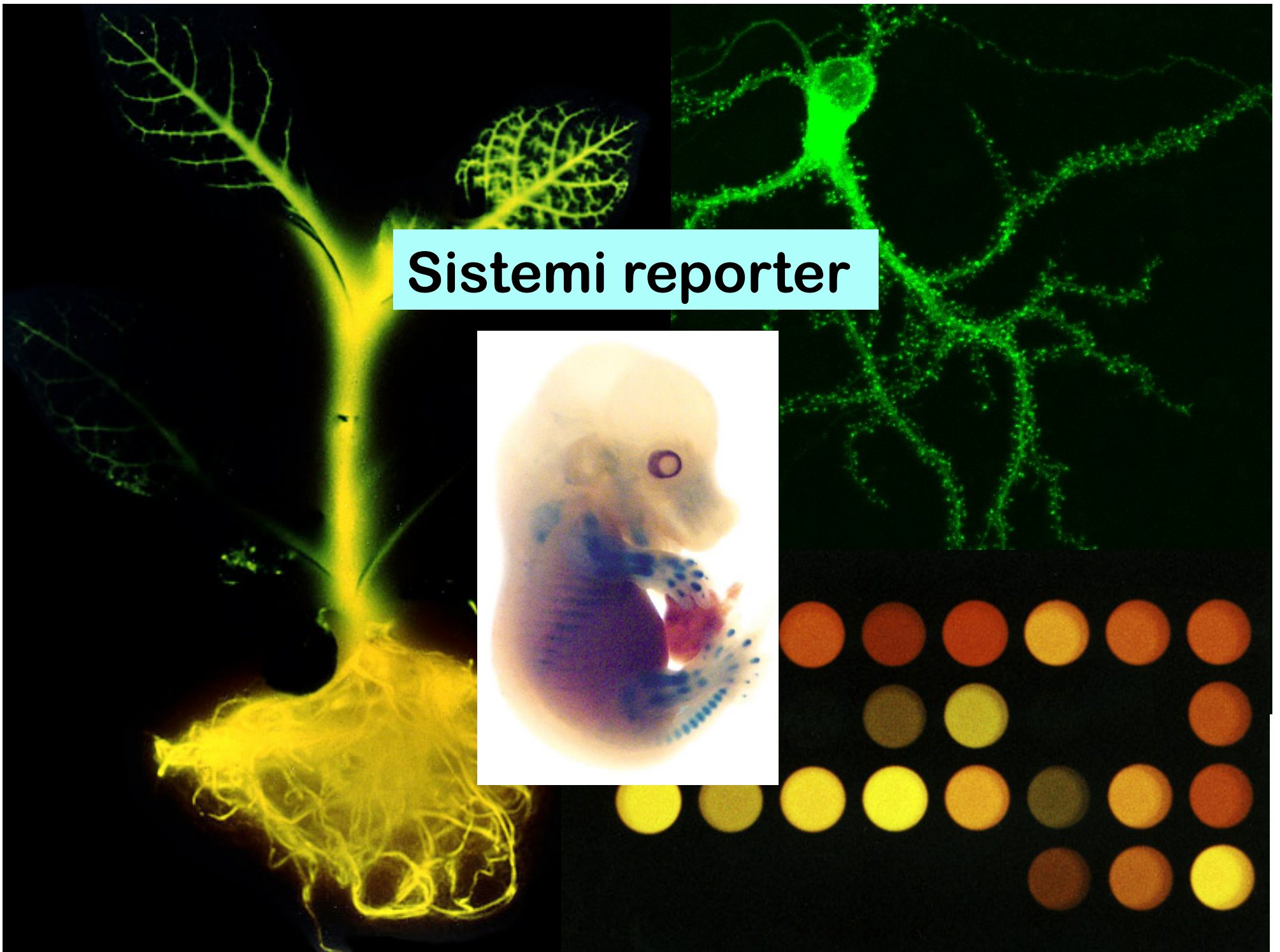


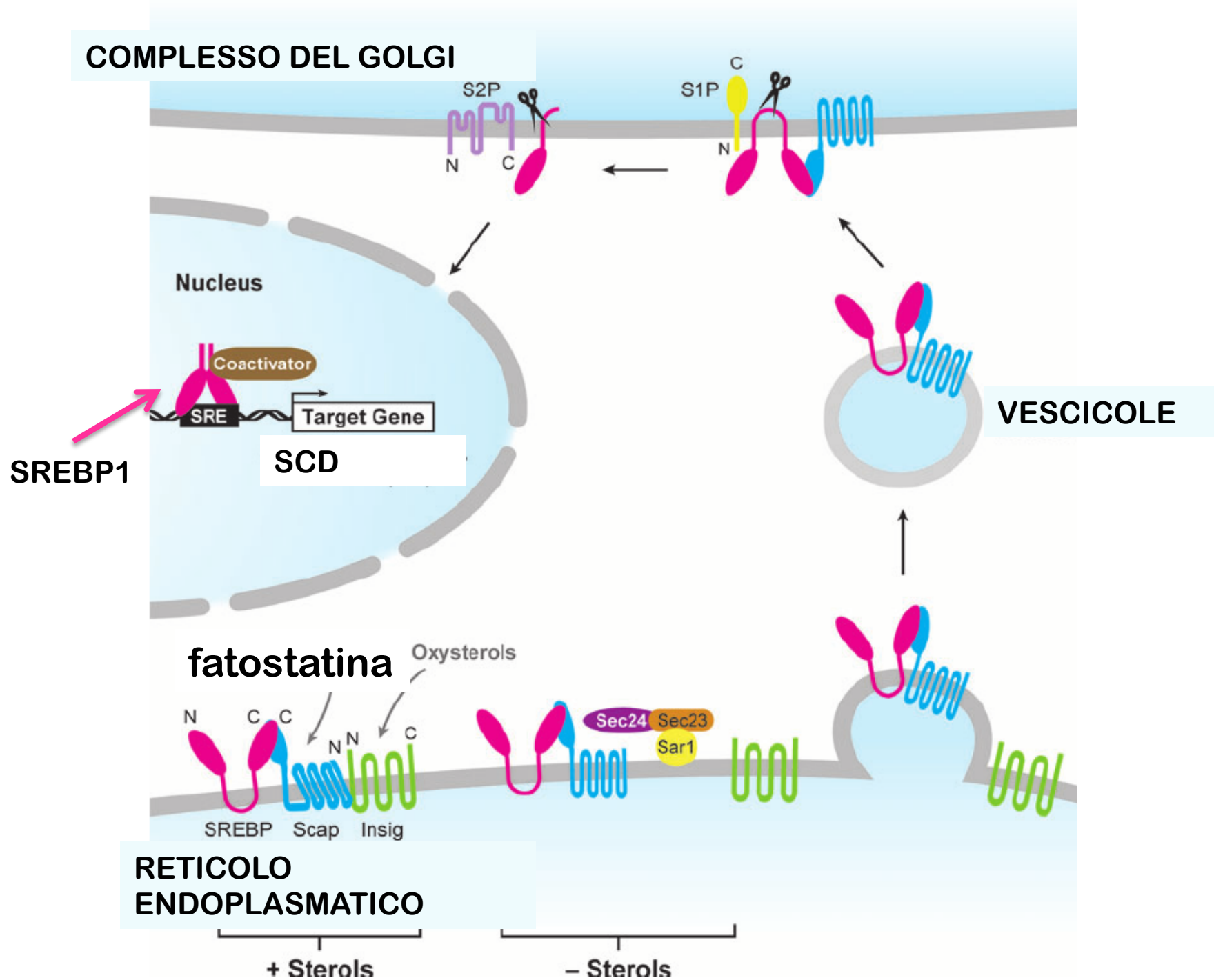
Sistemi reporter



Studi di regolazione dell'espressione genica mediante saggi reporter in vitro

Applicazione:

**analizzare la capacità del fattore di trascrizione SREBP1a di
attivare il gene bersaglio SCID**



Struttura dei geni di mammifero

(a) Mammalian gene SCD

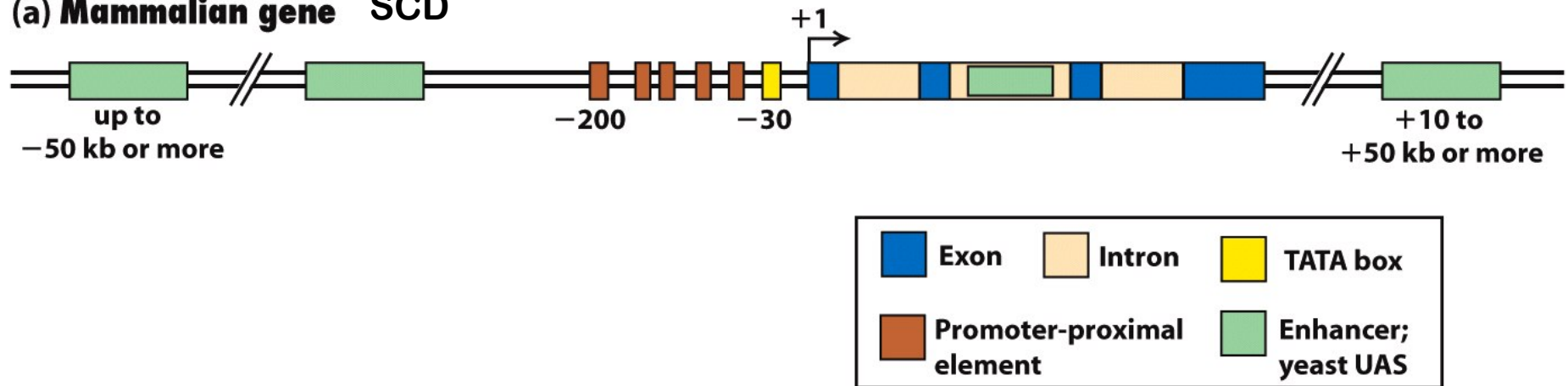


Figure 7-16
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Promotori di geni di mammifero

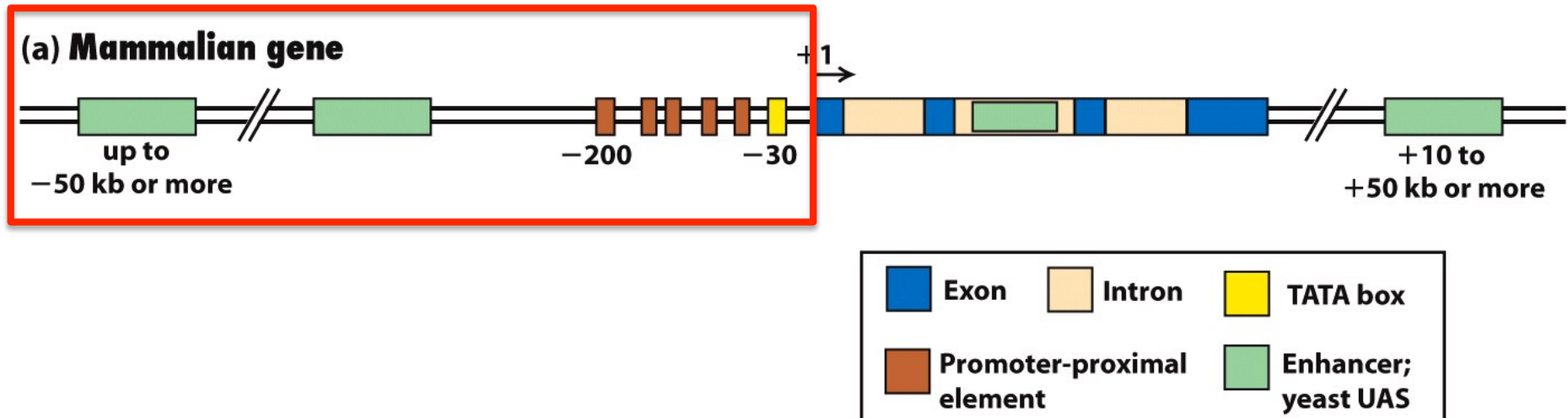
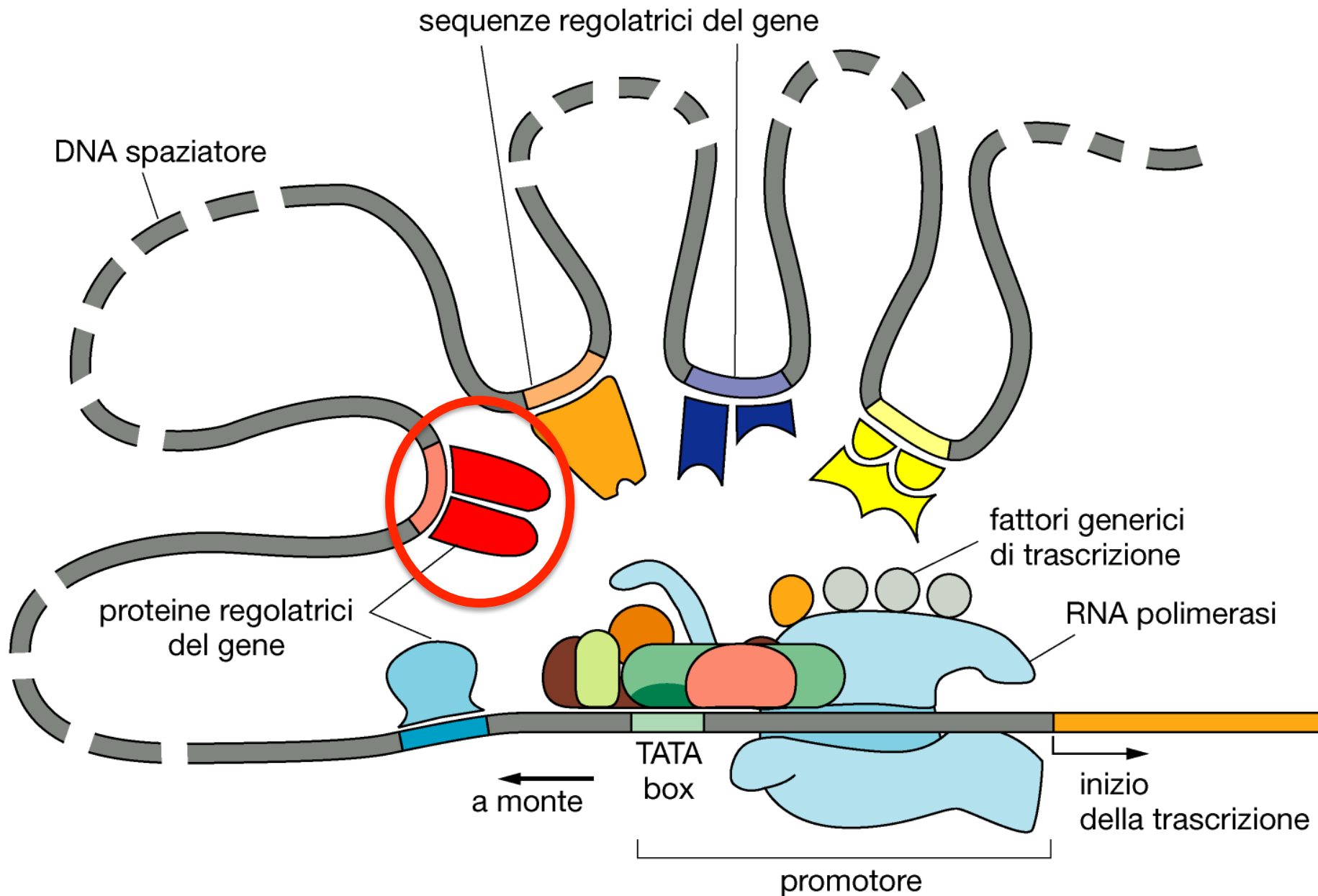
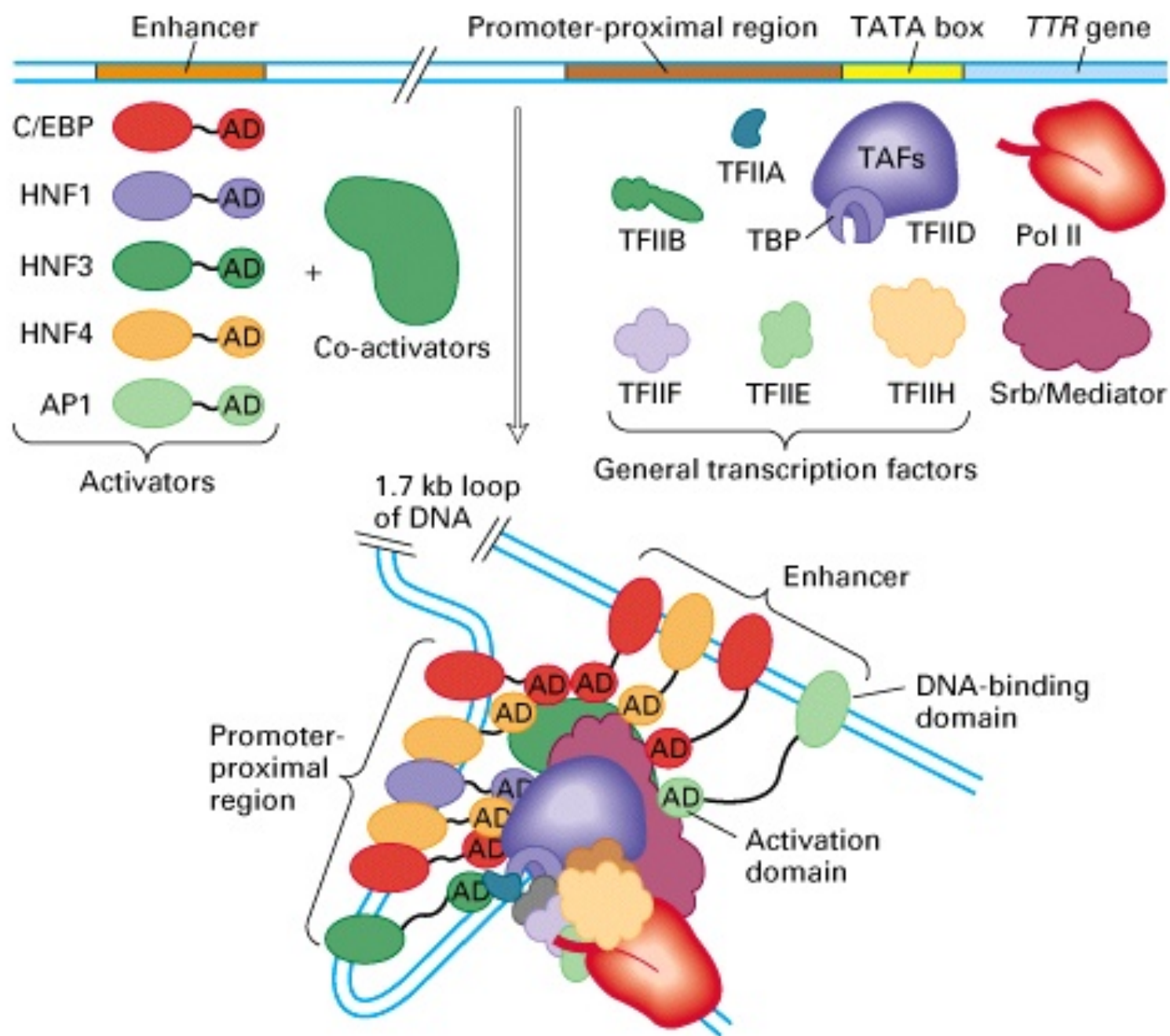


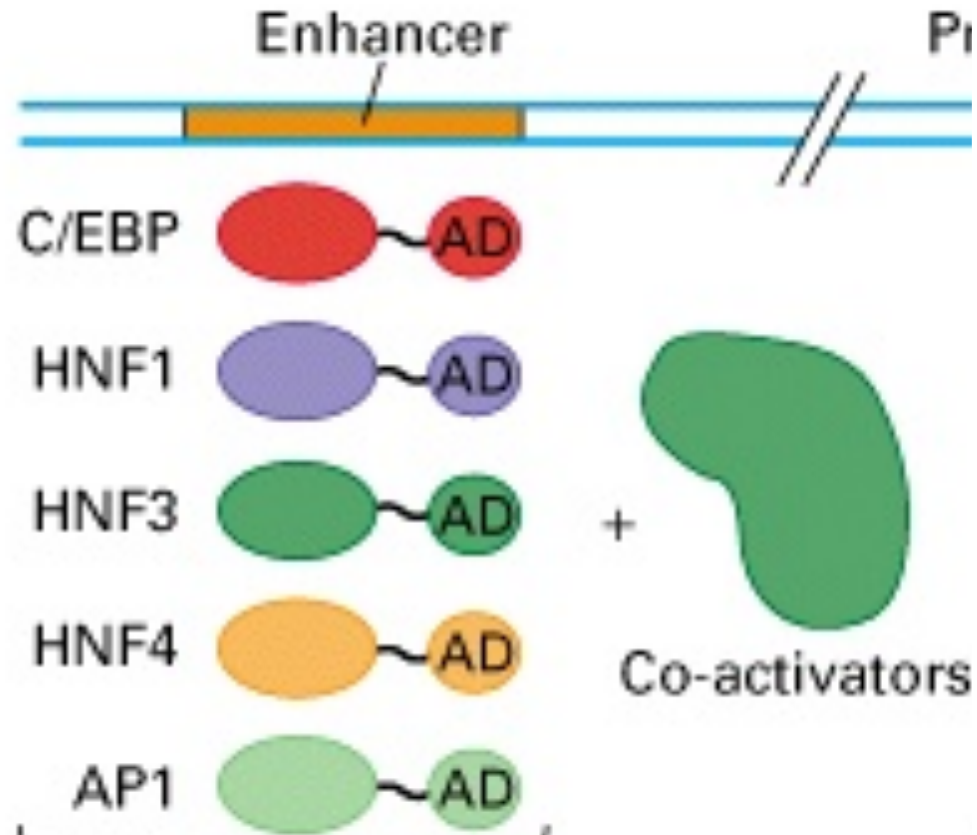
Figure 7-16
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Regolazione dell'inizio della trascrizione



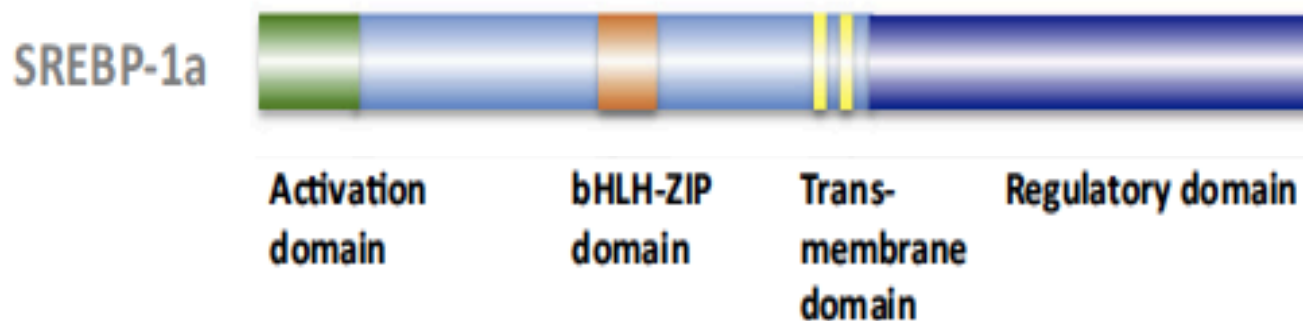


Fattori di trascrizione: proteine a struttura modulare



- dominio di *legame al DNA* (sequenza-specifico)
- dominio *transattivante / di repressione*
- *altri* domini (e.g. interazione proteina-proteina, interazione con ligandi, regolazione, etc.)

Il fattore di trascrizione SREBP1a = sterol regulatory element binding protein 1a



TRENDS in Pharmacological Sciences

dominio di
attivazione
trascrizionale

dominio
di legame
al DNA

- dominio di *legame al DNA* (sequenza-specifico)
- dominio di *trans-attivazione*
- *altri* domini (e.g. interazione proteina-proteina, interazione con ligandi, regolazione, etc.)

Analisi della capacità di un TF di regolare un promotore mediante saggi reporter

Per saggiare la capacità di un **fattore di trascrizione** di attivare/inibire un dato promotore, si può **clonare il promotore** bersaglio a monte di un **gene reporter**

Geni reporter

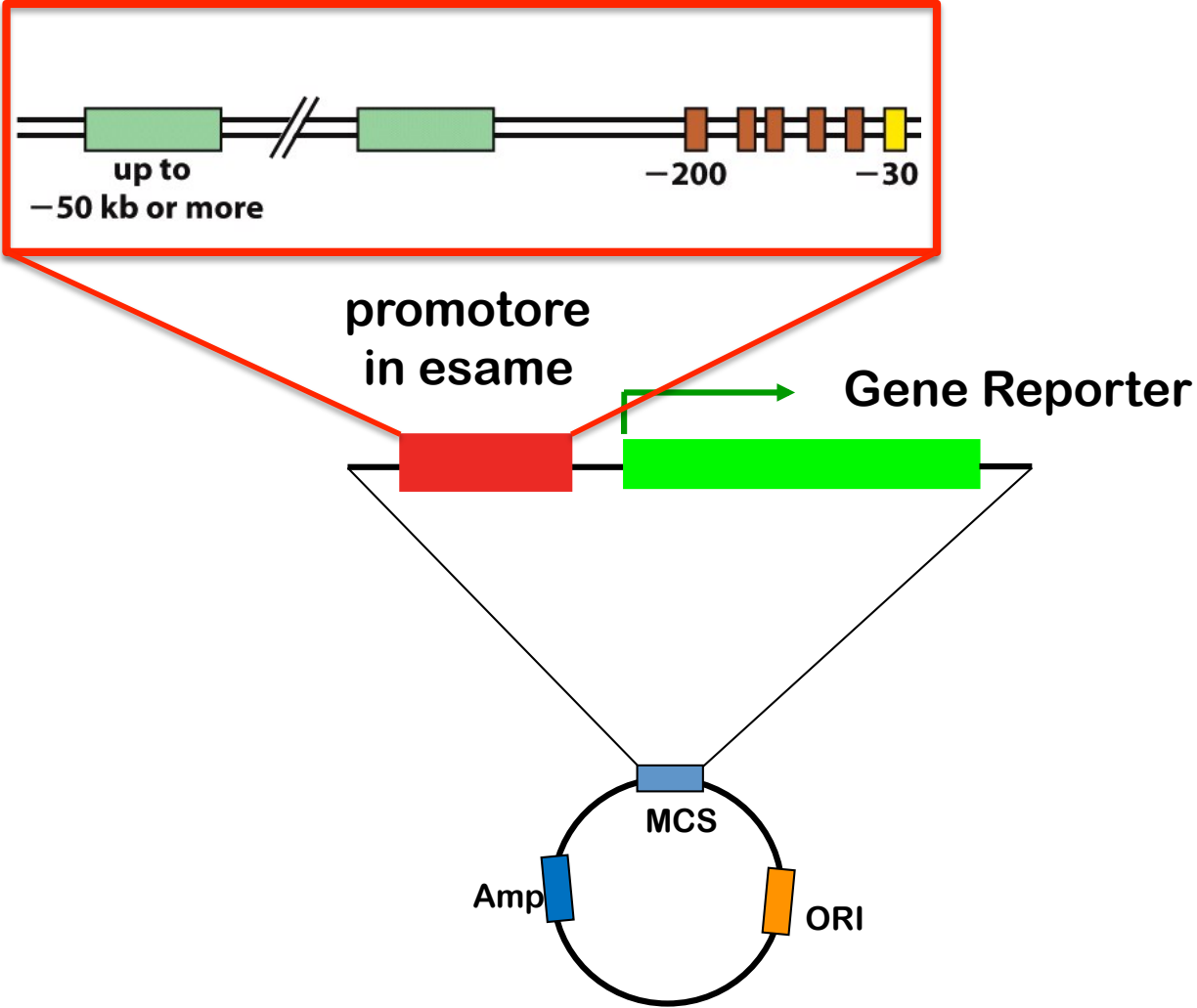
Geni la cui **espressione ectopica** può essere facilmente identificata e/o misurata mediante:

- ➡ **visualizzazione** diretta
- ➡ saggio di **attività enzimatica**

I geni reporter possono essere espressi a partire da un **promotore**:

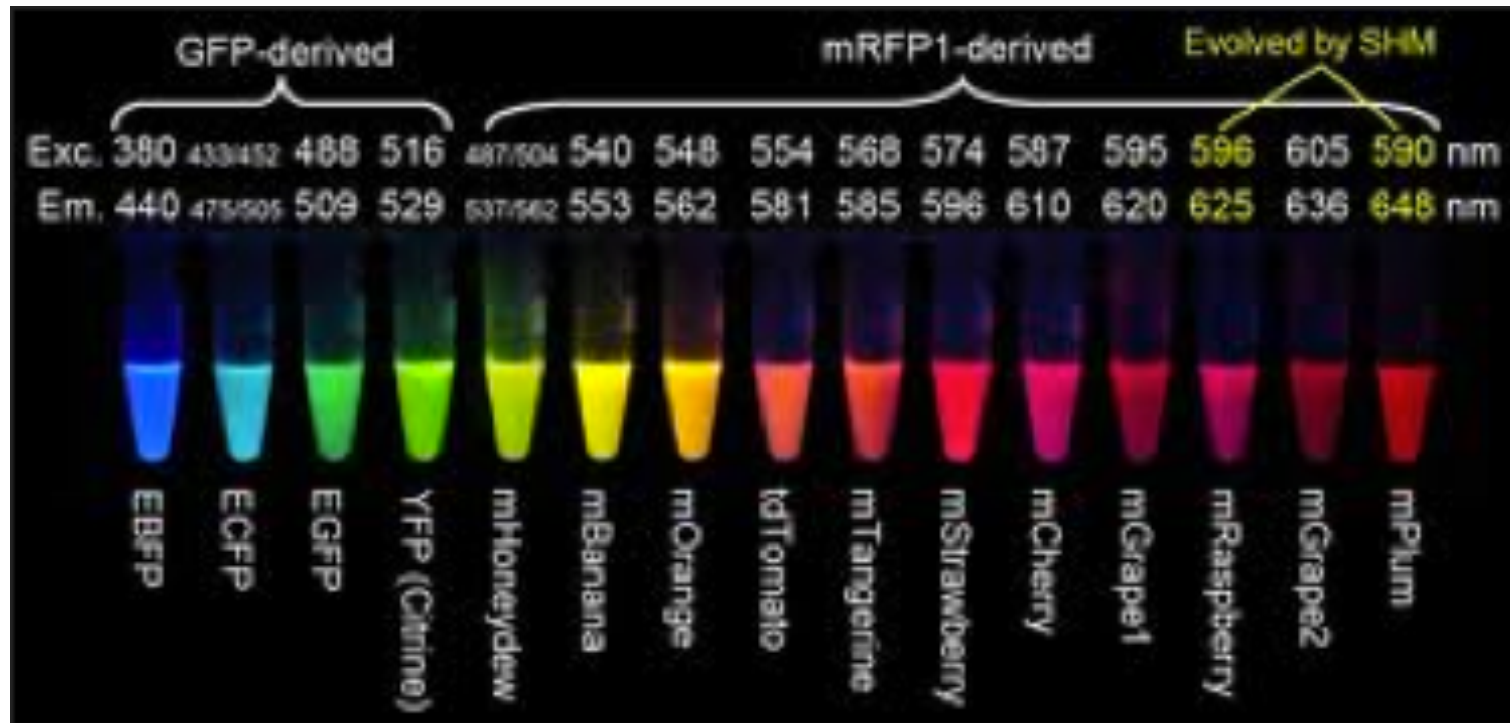
- ➡ **costitutivo** (utilizzo il reporter per visualizzare una cellula o una proteina)
- ➡ **regolato** (utilizzo il reporter per visualizzare o misurare l'attivazione del promotore)

Nel caso in cui si voglia saggiare l'attività di un promotore, lo si clona a monte di un gene reporter e si trasfetta il costrutto nelle cellule.



È conveniente utilizzare un gene reporter il cui livello di espressione sia MISURABILE quantitativamente

Per la visualizzazione diretta in situ
mediante tecniche di imaging
oppure per applicazioni med. tecniche di FACS
si utilizzano
reporters fluorescenti (fotoproteine)



Limite: non posso quantificarne l'espressione con precisione

Enzimi reporter:

Geni reporter la cui espressione è MISURABILE quantitativamente mediante SAGGIO DI ATTIVITA'

Reporter codificanti per **enzimi**

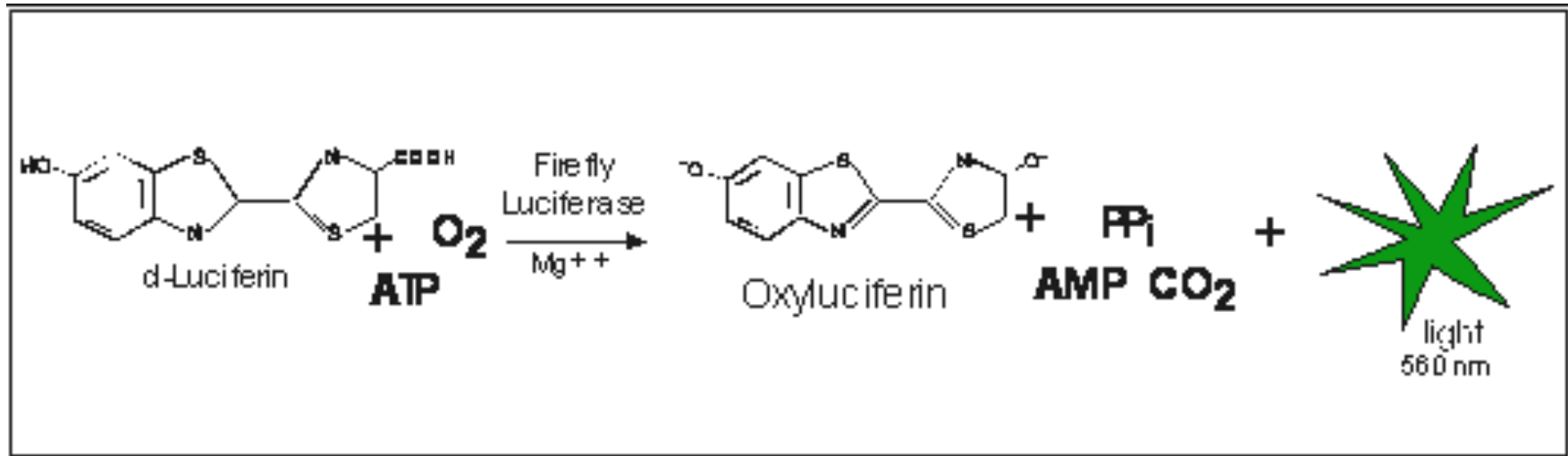
L'attività è facilmente **misurabile** utilizzando opportuni **substrati**

- L'attività deve essere facilmente e univocamente **distinguibile** da altre attività analoghe presenti nelle cellule prima della trasfezione
- I saggi di attività enzimatica devono essere **sensibili** e possibilmente **rapidi**

L'enzima luciferasi di Lucciola (*Photinus pyralis*)

Reazione:

catalizza l'**ossidazione** di un substrato specifico = la **luciferina**.
La reazione è accompagnata dall' **emissione di luce visibile** =
chemiluminescenza.



L'enzima luciferasi di Lucciola (*Photinus pyralis*)

Reazione:

catalizza l'**ossidazione** di un substrato specifico = la **luciferina**.
La reazione è accompagnata dall' **emissione di luce visibile** =
chemiluminescenza.

Rilevazione:

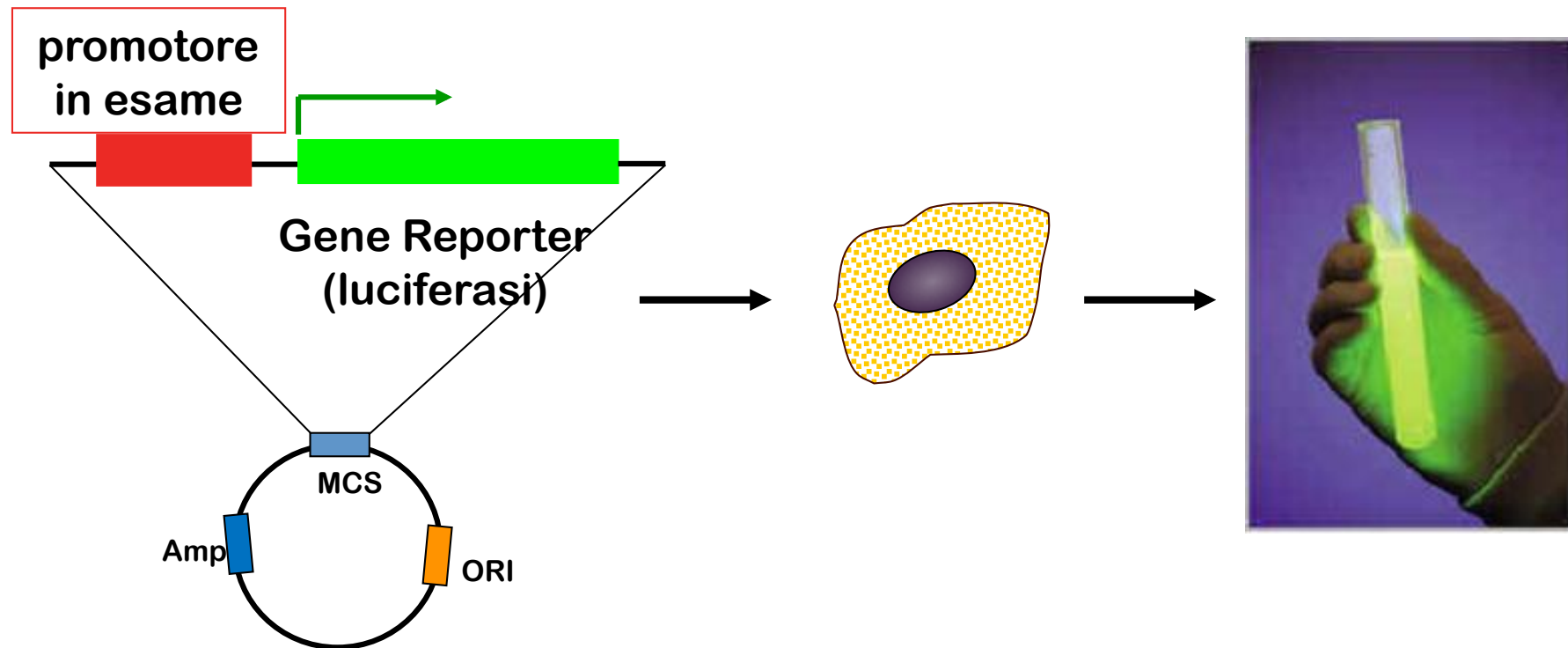
la **luce emessa** può essere **misurata** con il **luminometro** ed è
direttamente proporzionale alla **quantità** di enzima.

Vantaggi:

La luciferasi non ha PTMs e ha una breve emivita:
sistema rapido, sensibile con ampio range di linearità.
Cellule e tessuti di mammifero hanno bassa luminescenza intrinseca:
ridotto background;
Le misurazioni hanno elevata penetranza (imaging di organi interni)

Saggi di attività trascrizionale

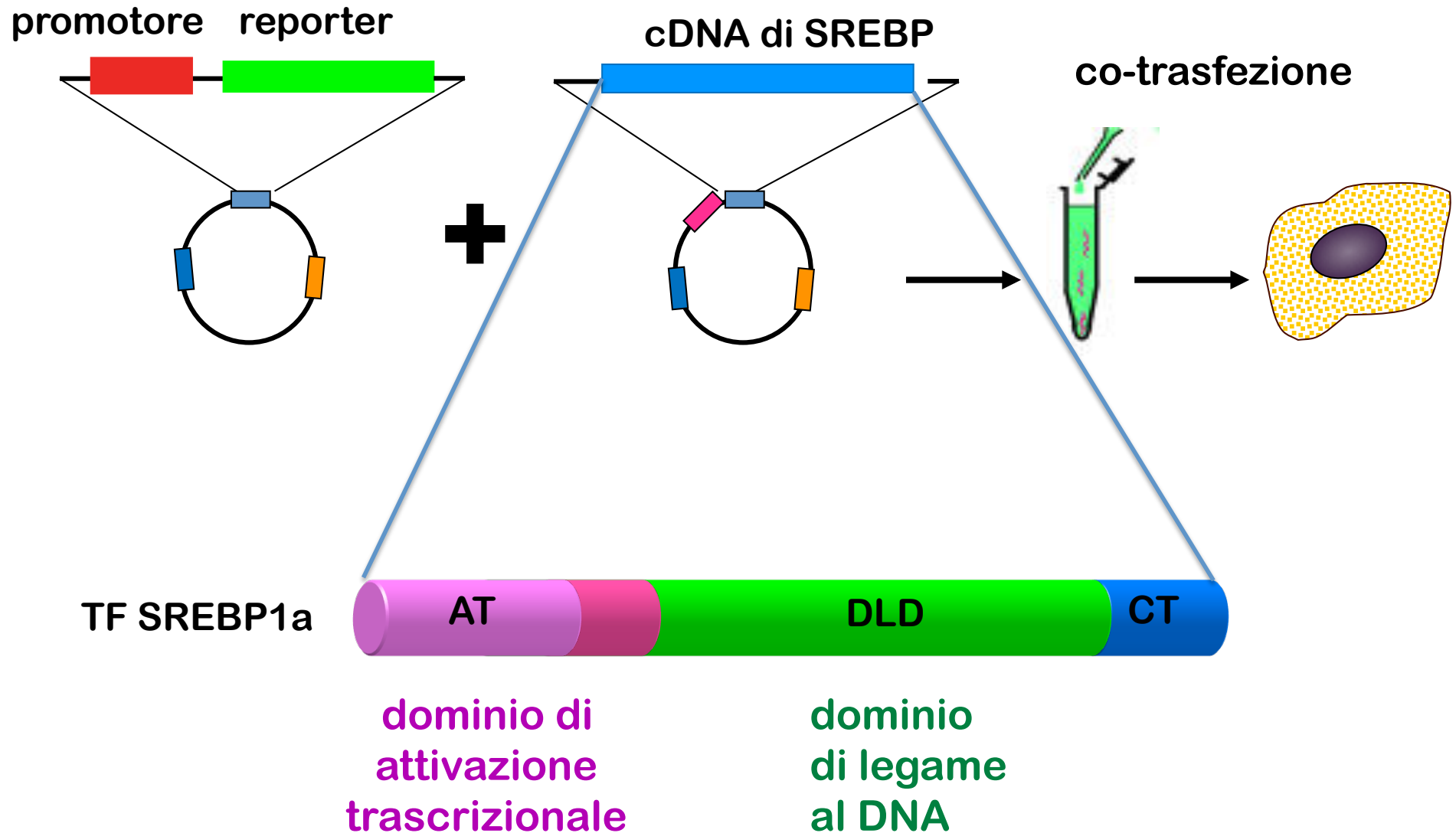
Se il promotore è attivo nelle cellule si avrà produzione dell'enzima:
aggiungendo il substrato al lisato cellulare, si misurerà emissione di luce

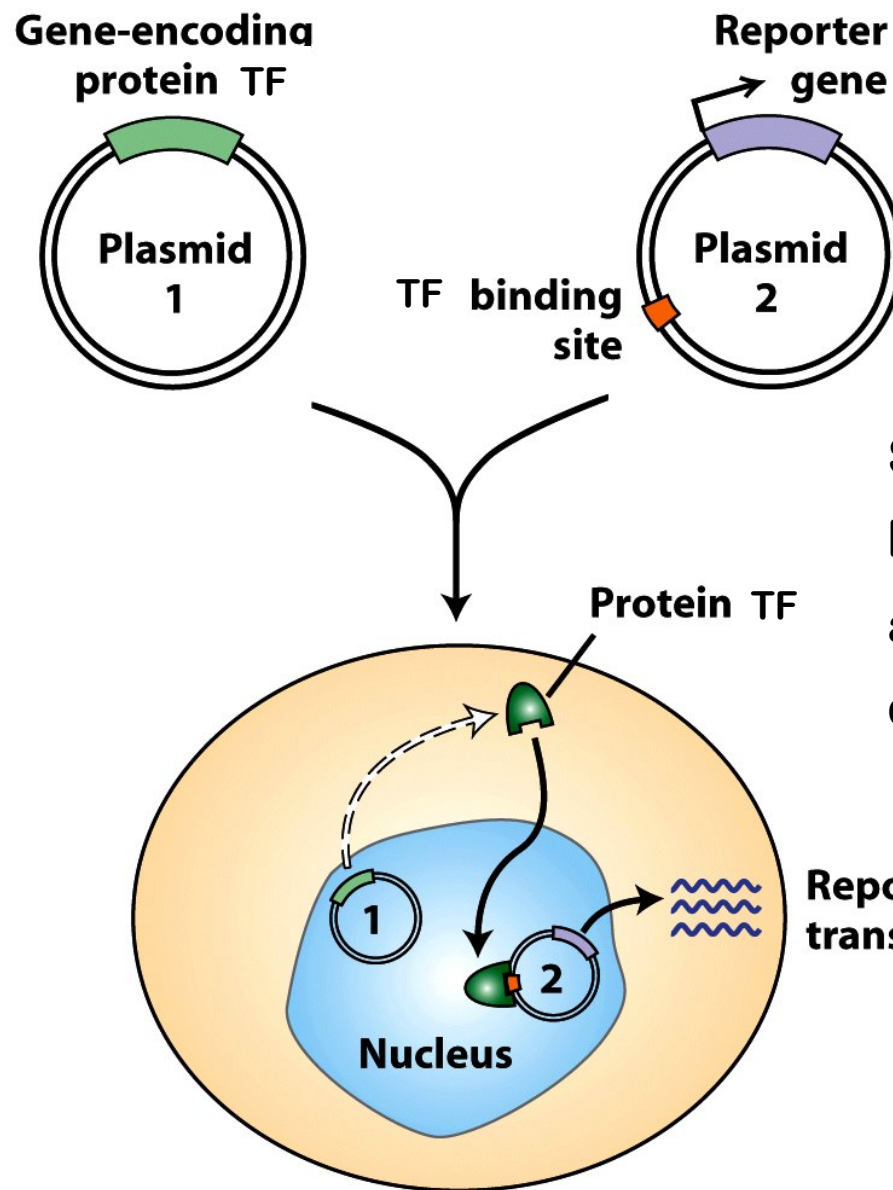


Quanto più attivo sarà il promotore, tanto maggiore la produzione di enzima e quindi l'emissione di luce

La quantità di luce emessa è proporzionale all'attività del promotore

.... il **plasmide reporter** così costruito viene **co-trasfettato** con un **vettore di espressione** per il fattore di trascrizione (**SREBP1a**)



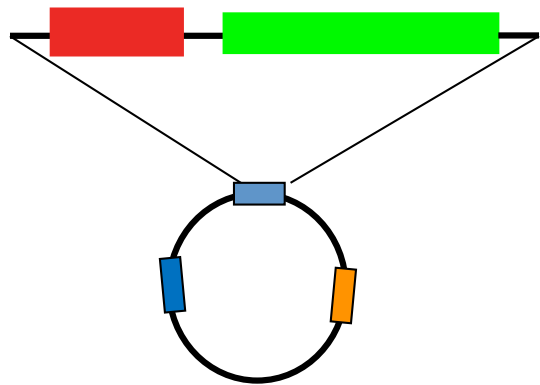


Se il TF lega il promotore bersaglio ed attiva la trascrizione del gene reporter

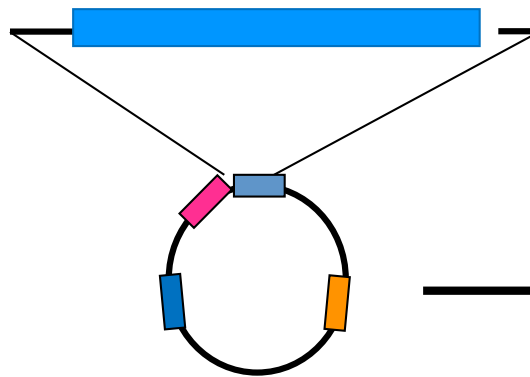
Nel saggio reporter verrà misurato un incremento di emissione di luce

Figure 7-20
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

promotore reporter

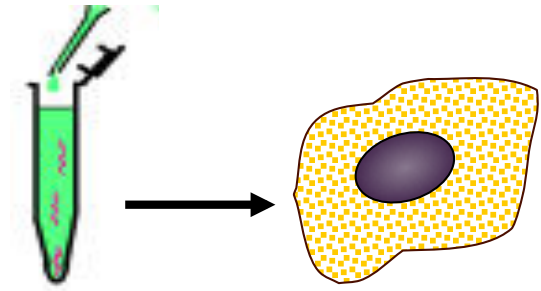


cDNA di TF



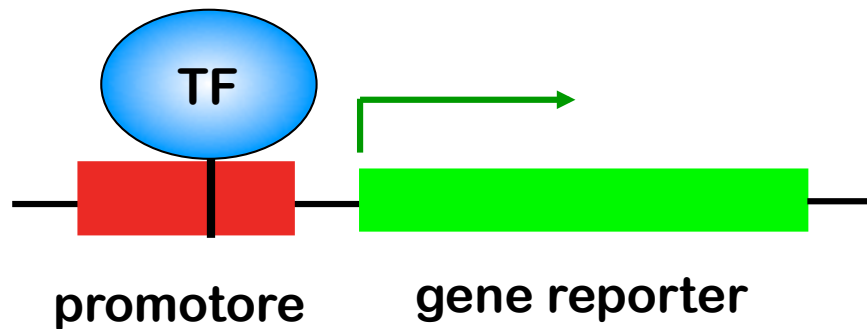
+

co-trasfezione

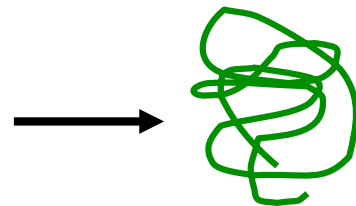


Se il TF lega il promotore bersaglio ed attiva la trascrizione del gene reporter

Espressione del TF

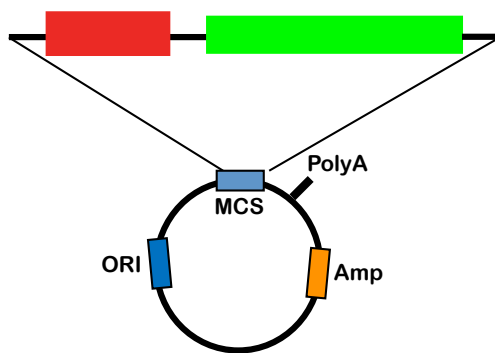


Verrà misurato un incremento di emissione di luce saggio reporter



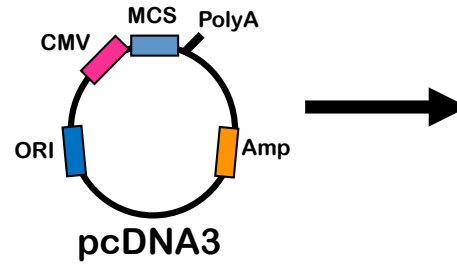
Strategia:

reporter
promotore luciferasi



pSCD1-luc

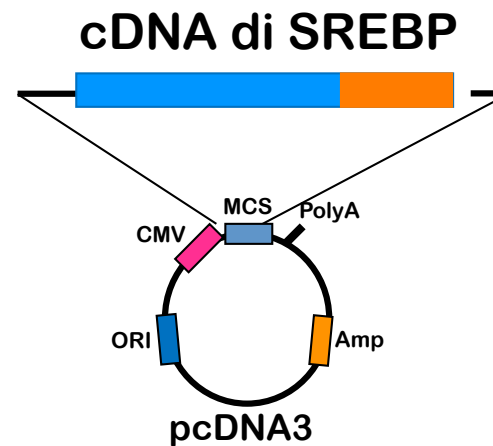
+



Attività BASALE
del promotore

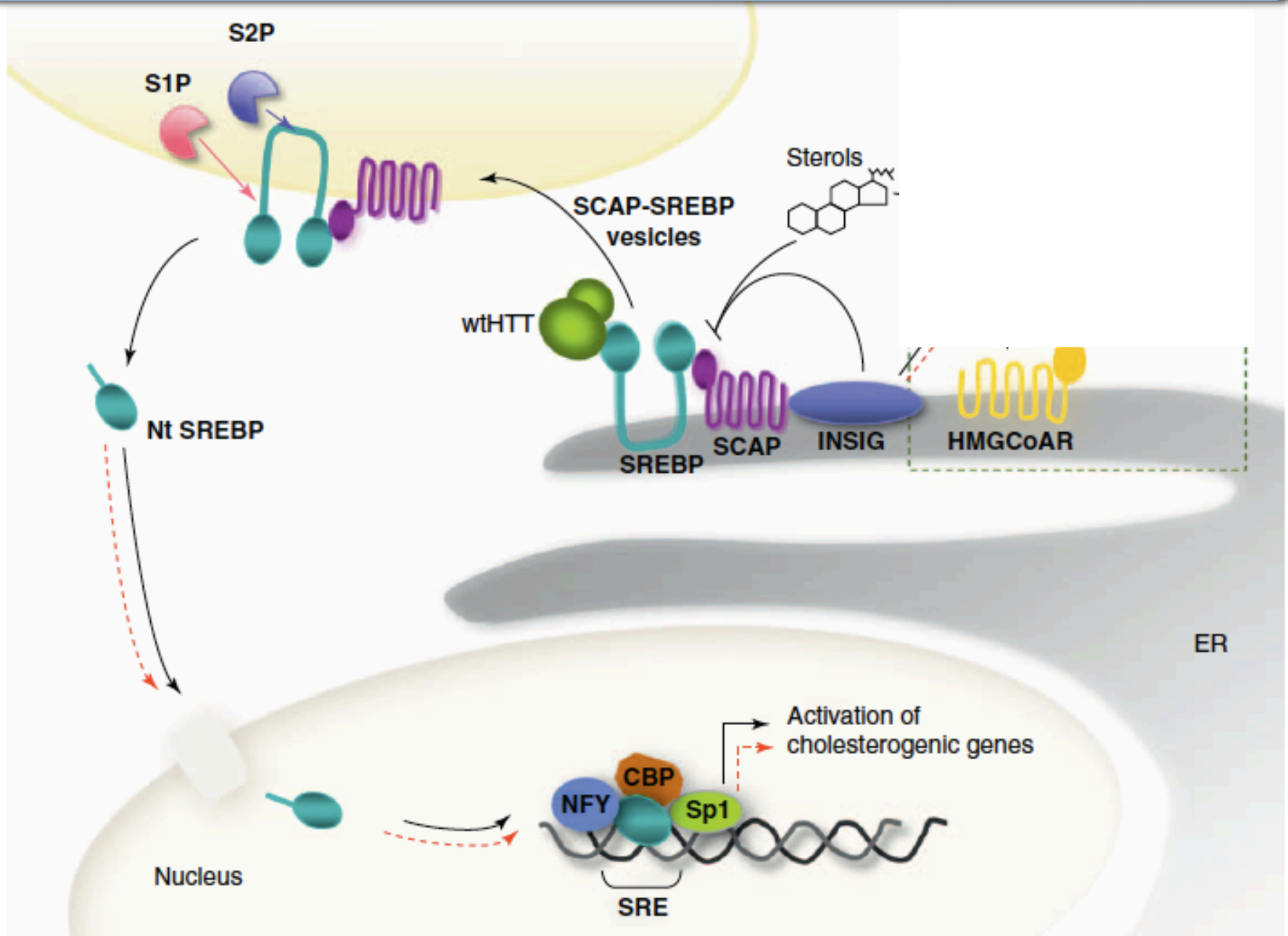
Oppure

+



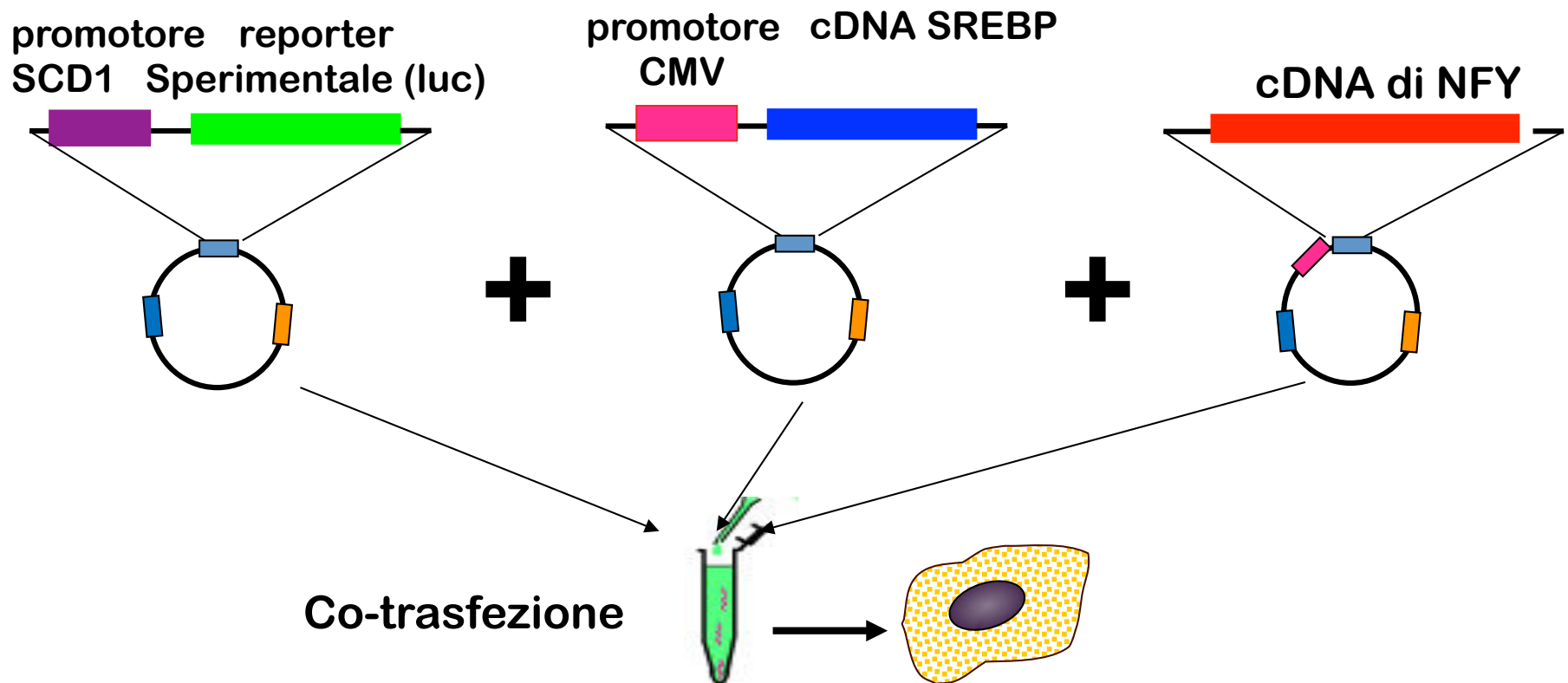
attivazione
del promotore
Da SREBP

Ruolo del coattivatore NFY nell'induzione dei geni bersaglio di SREBP



Strategia sperimentale

- 1- livello BASALE reporter pPROM-luc + vettore vuoto pcDNA3
- 2- effetto di SREBP1 reporter pPROM-luc + vettore pcDNA3-SREBP
- 3- contributo di NFY reporter + pcDNA3-SREBP+ vettore pcDNA3-NFY



Step 1: clonaggio del cDNA di SREBP1a nel vettore di espressione pcDNA3 in fusione con il TAG HA

Name: pcDNA3

Insert: SREBP1a-HA

Original vector:

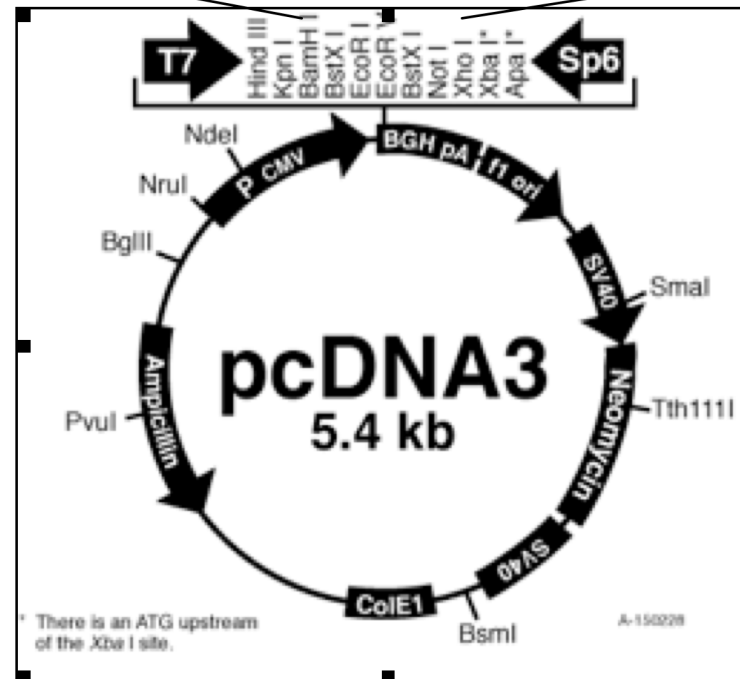
Selection: Amp^R (prokaryotic); Neo^R (eukaryotic)

Ref:

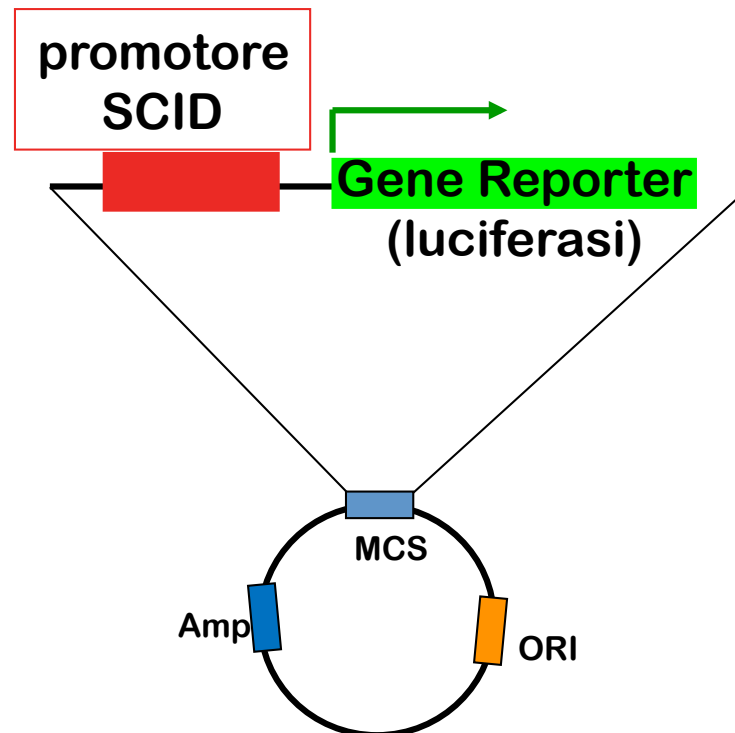
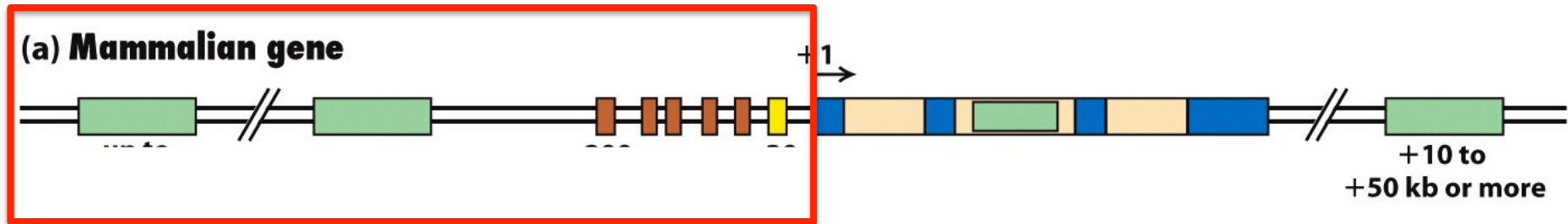
Notes:

BamHI

XhoI

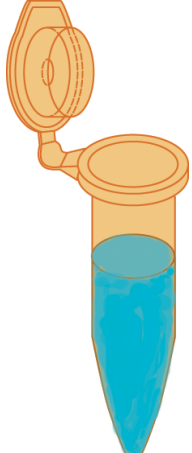


Step 2: clonaggio del promotore SCD1 a monte del gene reporter luciferasi




**Step 3: clonaggio del cDNA di NFY nel vettore di espressione
pcDNA3**

Step 4: co-trasfezione dei vettori di espressione in cellule in coltura mediante lipofezione



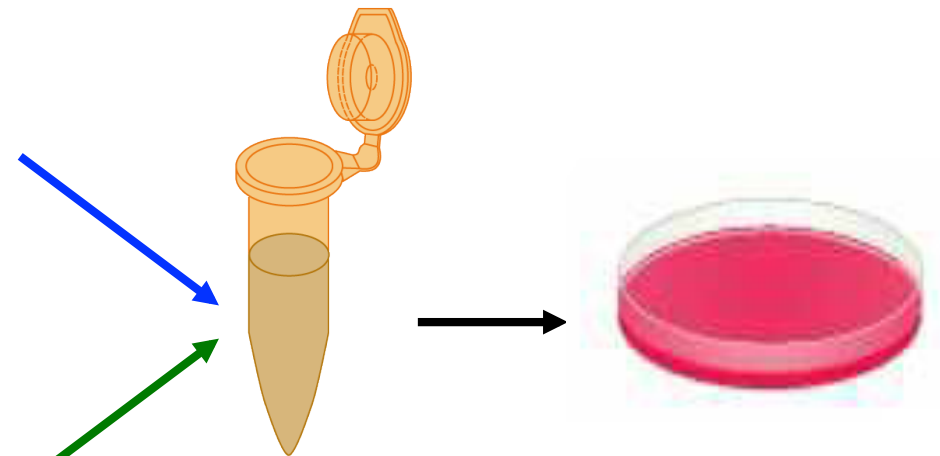
L: 10 min a TA

150 μ l terreno Optimem
+
2 μ l Lipofectamina

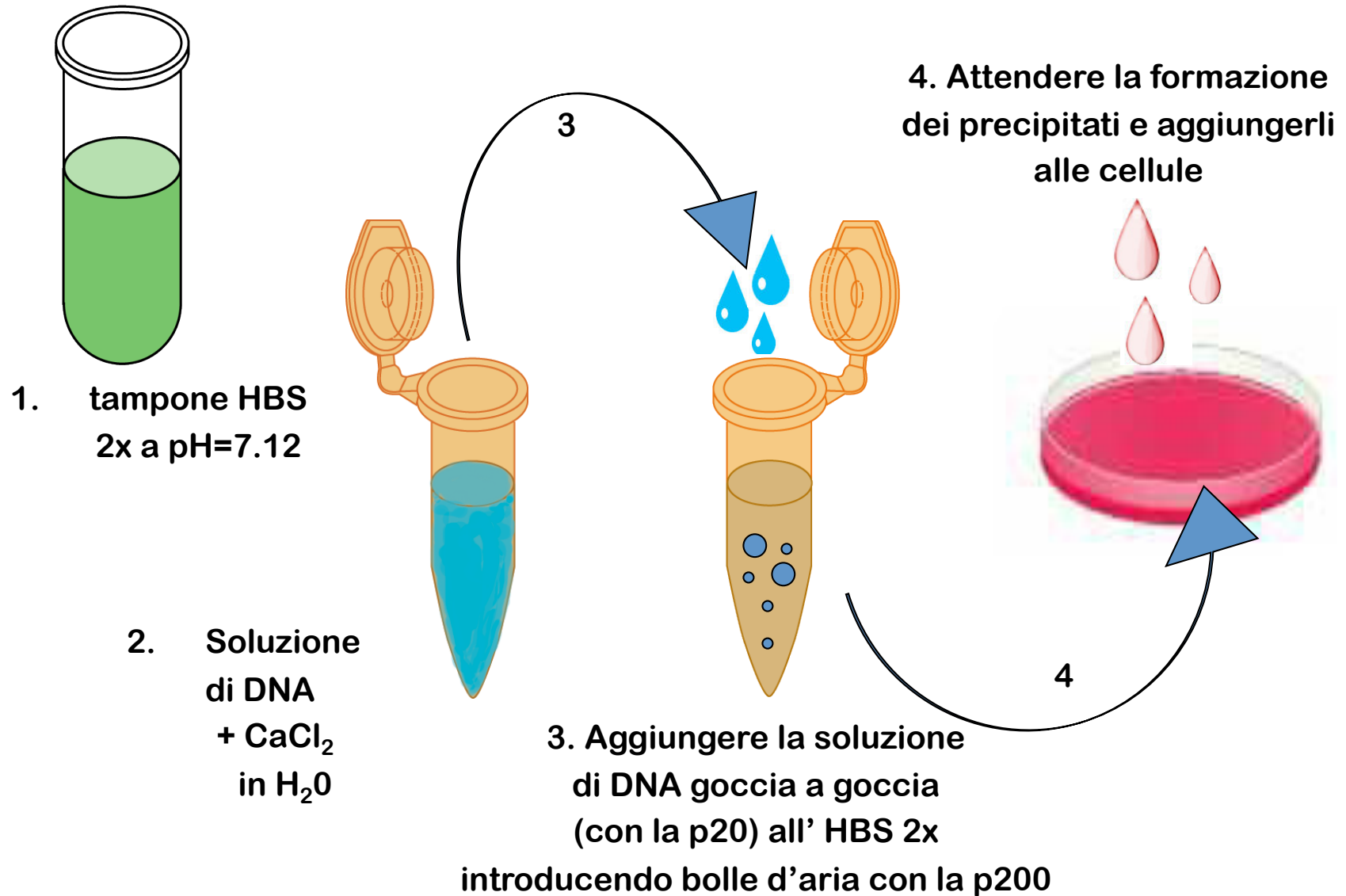


D: 10 min a TA

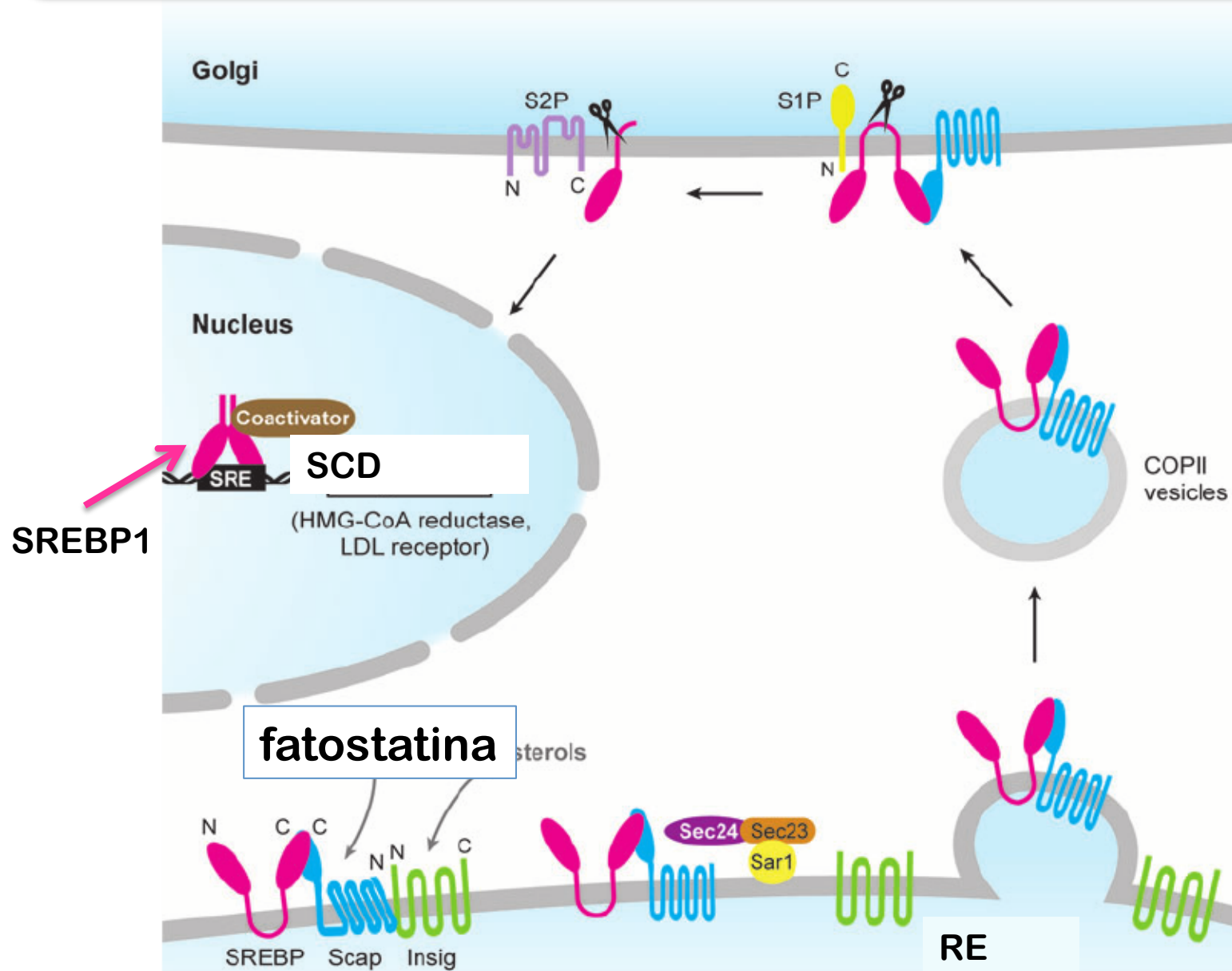
150 μ l terreno Optimem
+
DNA
= **reporter A (pPROMLuc)**
+ **reporter B (pCONRLuc)**
+ **vettore di espressione vuoto, o con TF-1 o TF-2**



Step 4: co-trasfezione dei vettori di espressione in cellule in coltura



Step 5: controllo = trattamento con fatostatina (inibitore della traslocazione di SREBP1 al Golgi)



Step 6: utilizzo di un reporter di controllo per il confronto di diversi punti sperimentali

- 1- attività basale costrutto reporter + vettore di espressione vuoto
- 2- effetto di SREBP costrutto reporter + vettore di espressione per SREBP
- 3- effetto di NFY costrutto reporter vettore di espressione per SREBP
 + vettore di espressione per NFY

Valore misurato	1 =	10
“	“	2 = 200
“	“	3 = 200

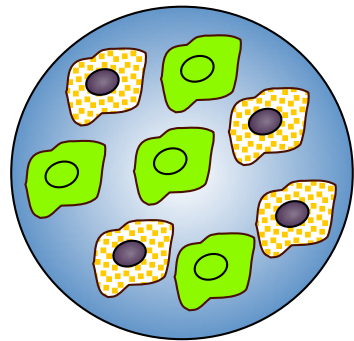
~~Risultato: SREBP attiva il promotore, aumentando la trascrizione del reporter di 20 volte
NFY non attiva ulteriormente SREBP~~

NO!

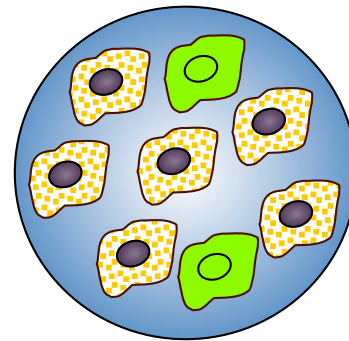
**Il valore di luminescenza misurato in un esperimento
è PROPORZIONALE
alla QUANTITÀ DI LUCIFERASI PRODOTTA**

**A livello di singola cellula
la QUANTITÀ DI LUCIFERASI PRODOTTA dipende
dall'ATTIVITÀ del PROMOTORE a monte della luciferasi**

**Ma la QUANTITÀ TOTALE dipende anche dal
NUMERO DI CELLULE TRASFETTATE**



50%



25%

Valore misurato

“ “

“ “

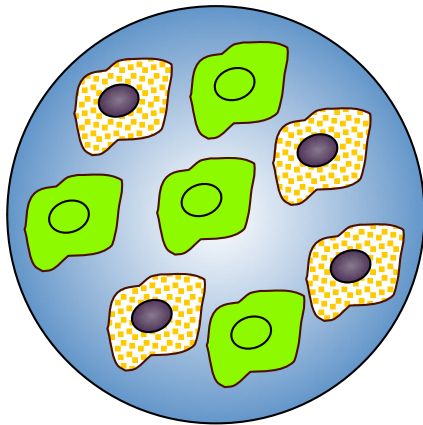
1 = 10

2 = 200

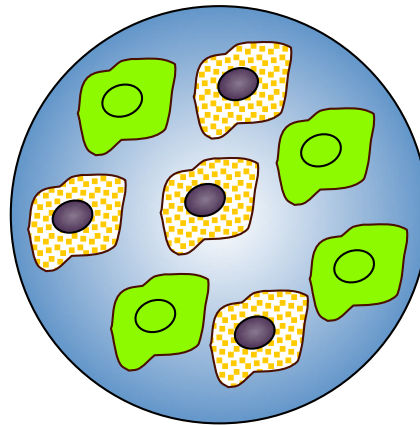
3 = 200

valori assoluti misurati

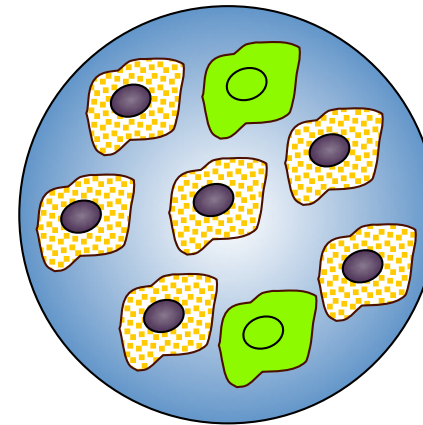
I valori assoluti di attività del reporter misurati nei 3 diversi esperimenti possono essere influenzati dalla diversa **efficienza di trasfezione** = diverso **numero di cellule trasfettate** nei diversi esperimenti.



1 = 50%



2 = 50%



3 = 25%

PROBLEMA:

**Normalizzare i diversi punti sperimentali tenendo conto di
differenze nell'efficienza di trasfezione**

PROBLEMA:

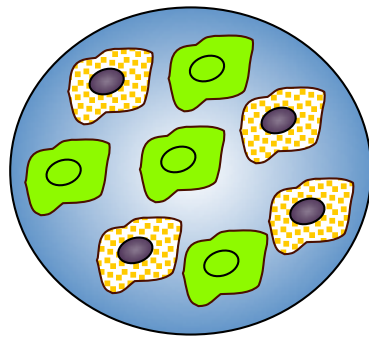
Qual è l'efficienza di trasfezione?

Come posso confrontare l'efficienza di trasfezione tra diversi punti sperimentali ?

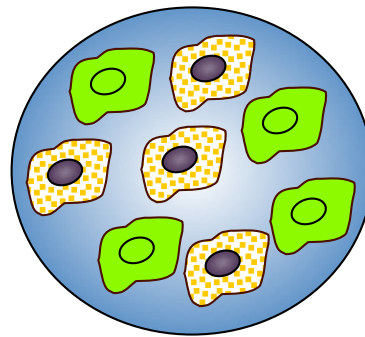


Soluzione: trasfezione di un gene reporter NON influenzato dalle condizioni sperimentali

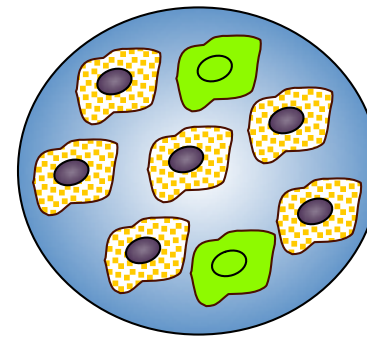
Per calcolare l'efficienza di trasfezione di ciascun esperimento si include un **CONTROLLO INTERNO**
= un **gene reporter DIVERSO** da quello sperimentale
sotto il controllo di un **promotore costitutivo**,
NON INFLUENZABILE DALLE CONDIZIONI SPERIMENTALI
(in questo caso non influenzato da SREBP o NFY)



1= 50%

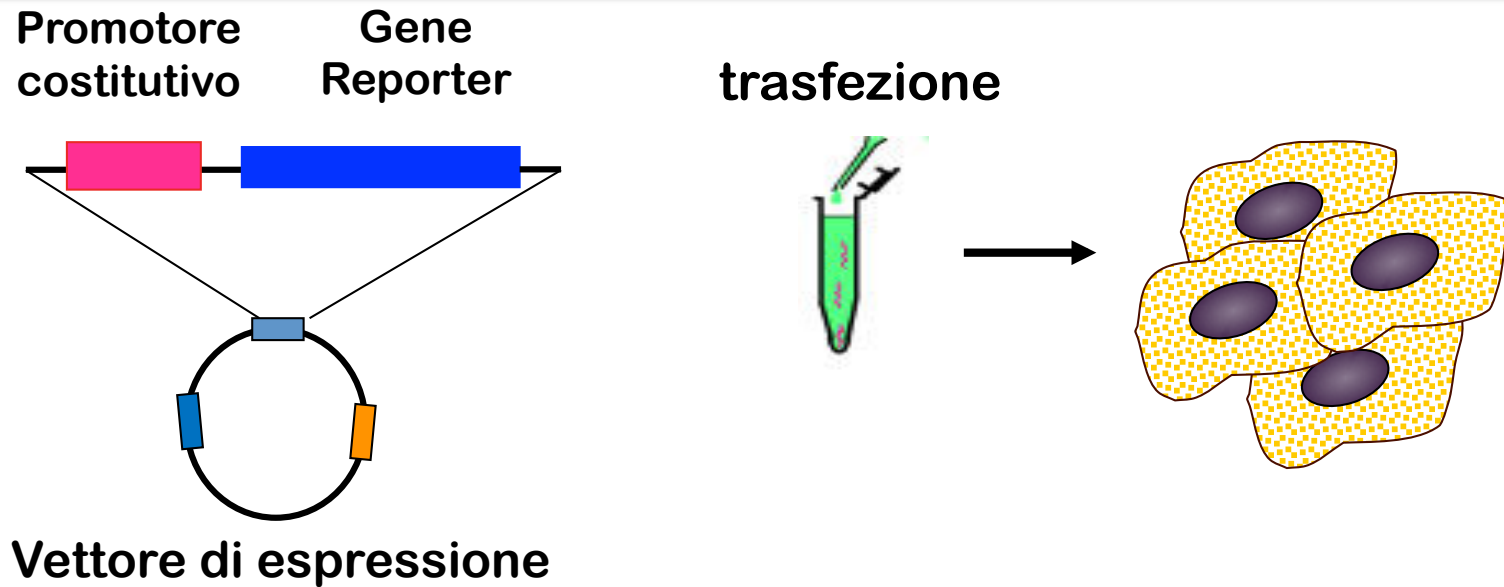


2= 50%

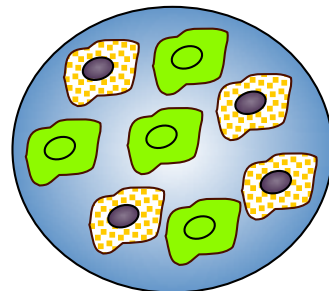


3= 25%

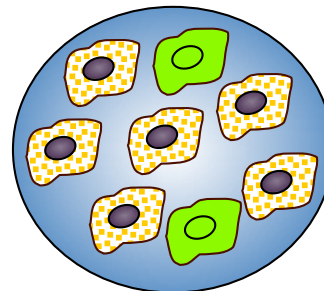
Soluzione 1: Gene reporter a visualizzazione diretta per analisi dell'efficienza di trasfezione: GFP



Solo le cellule trasfettate esprimono il gene reporter:
posso visualizzarle, calcolare la **% DI CELLULE TRASFETTATE**
e quindi l'**EFFICIENZA** DI TRASFUZIONE (VALORE ASSOLUTO)



50%



25%

Soluzione 2:

Gene reporter codificante per un enzima la cui attività è misurabile dallo stesso lisato cellulare analizzato per il reporter sperimentale

Reporter di controllo enzimatici: misurano l'**EFFICIENZA DI TRASFEZIONE RELATIVA**

Gene lacZ saggio colorimetrico da lisato proteico
 β -galattosidasi misurazione spettrofotometrica

Gene della **luciferasi di celenterato** (*Renilla reniformis*)
può essere usato in accoppiamento al gene della luciferasi di lucciola
come controllo interno dell'efficienza di trasfezione,
dal momento che esso catalizza l'ossidazione di un **diverso substrato**,
producendo **bioluminescenza**: le due reazioni possono essere misurate
con lo stesso strumento: il **luminometro**.

Luciferasi di lucciola: substrato **LUCIFERINA**
Luciferasi di celenterato: “ **CELENTERAZINA**

Deve essere posto a valle di un promotore costitutivo :

Es. CMV

pCON-luc = pCMV Rluc



Doppio sistema reporter F-luc/R-luc

Firefly luciferase

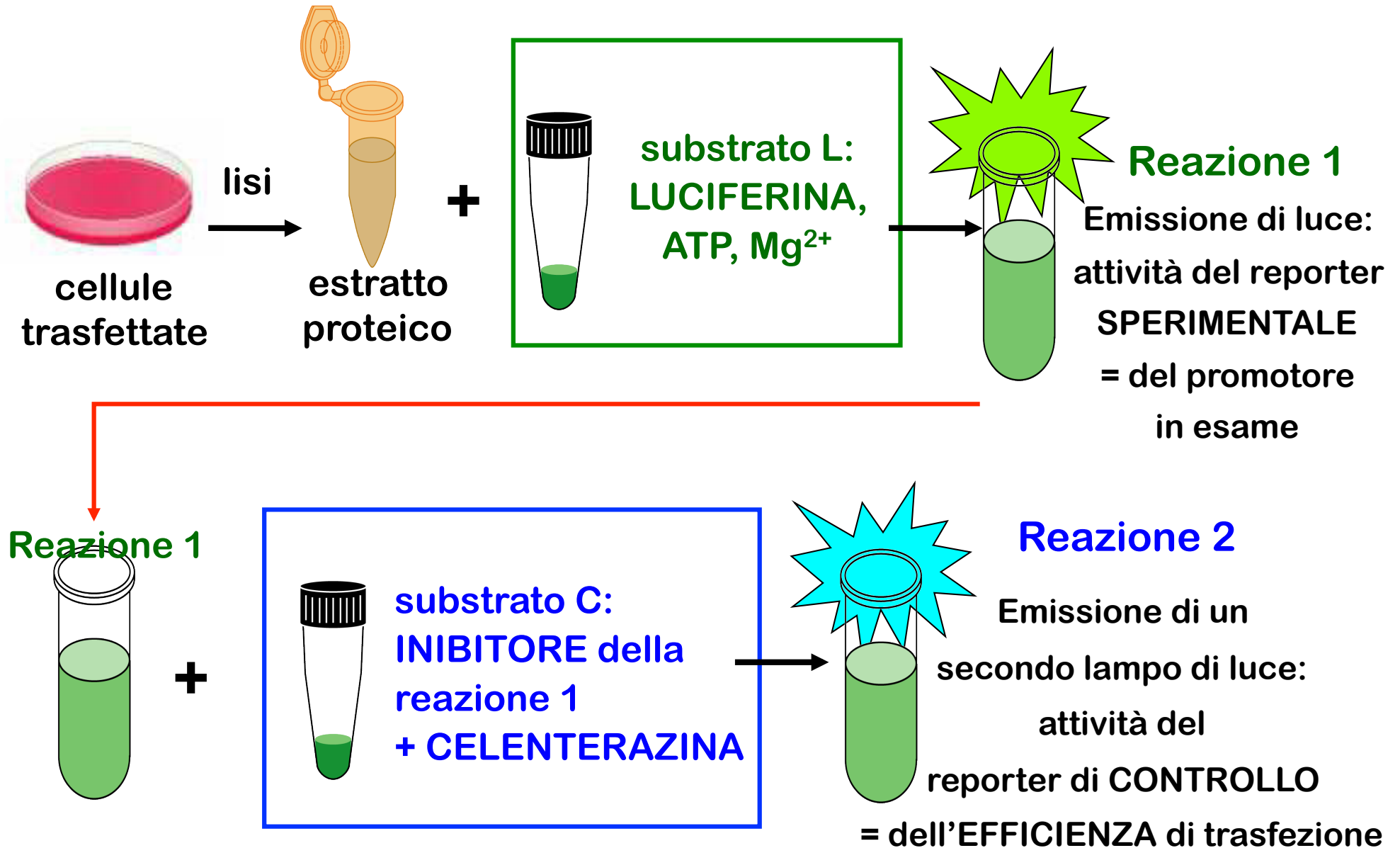


+

Renilla luciferase



Doppio sistema reporter **F-luc/R-luc**: saggi di attività dei reporter



L'attività del reporter di controllo permette di conoscere l'efficienza di trasfezione e di **CORREGGERE** i valori misurati

nell'esperimento devo tener conto del fatto che al punto **3** l'efficienza di trasfezione è **la metà** degli altri 2 punti, quindi il valore misurato è stato **SOTTOSTIMATO**:

Valore misurato 1 = 10	efficienza 50%	Valore corretto 1 = 10
“ “ 2 = 200	“ 50%	2 = 200 = 20x
“ “ 3 = 200	“ 25% X 2	3 = 400 = 40 x

NORMALIZZAZIONE: correggere i valori misurati come se le trasfezioni avessero la **STESSA efficienza**

NORMALIZZAZIONE:

Se ho più campioni con efficienze diverse,
divido il valore misurato di ciascun campione
per la propria **efficienza** di trasfezione
(oppure per la lettura del reporter enzimatico)



Val. misurato 1 = 10/ efficienza 0,5

Val. corretto= 20



“ “ 2 = 200/ “ 0,5

Val. corretto= 400 (20x)



“ “ 3 = 200/ “ 0,25

Val. corretto= 800 (40x)

Risultato: **SREBP1** attiva il promotore, aumentando la trascrizione
del reporter di **20 volte**

NFY potenzia la capacità transattivante di SREBP1, poichè
aumenta la trascrizione del reporter di **40 volte**