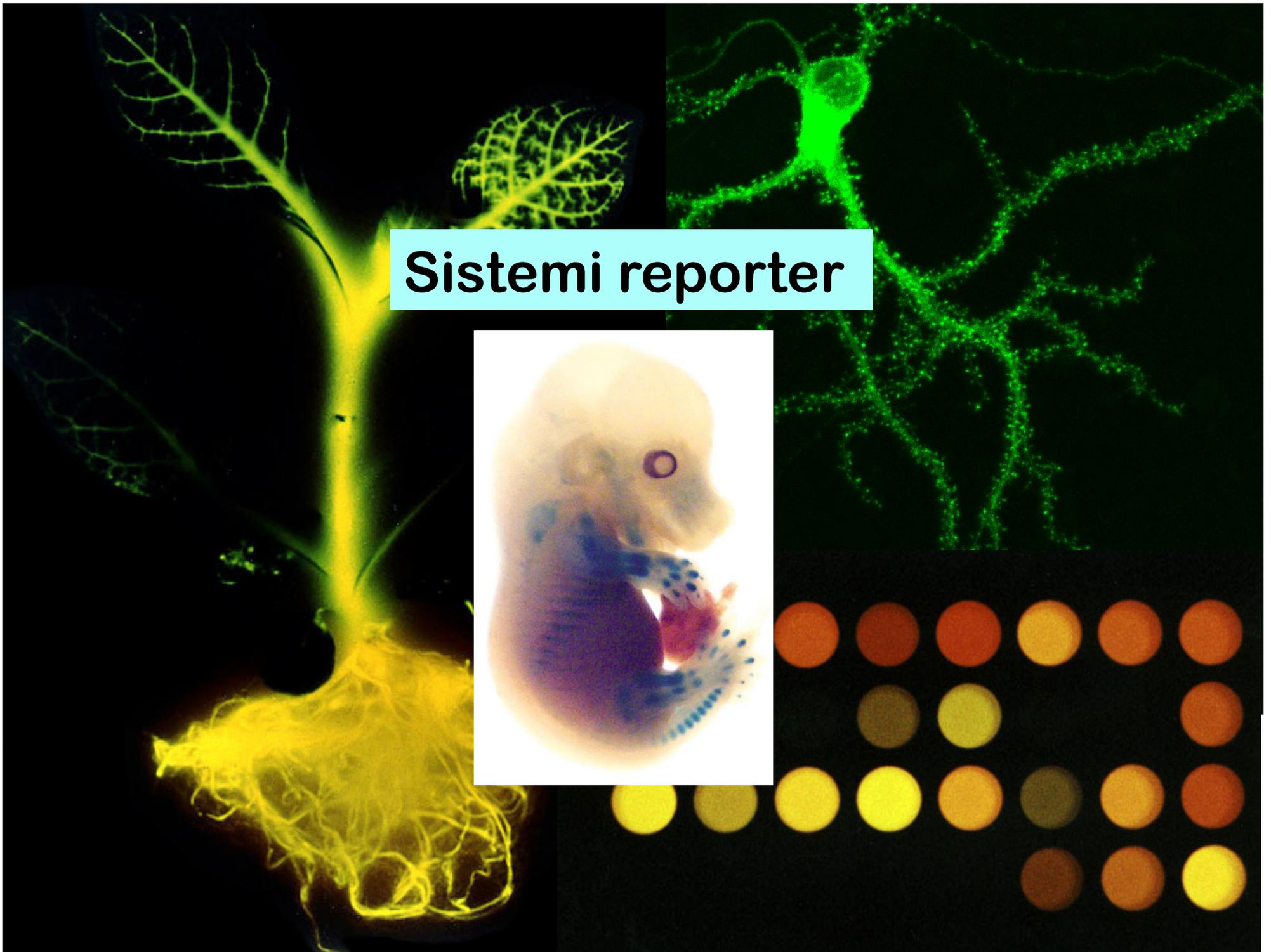


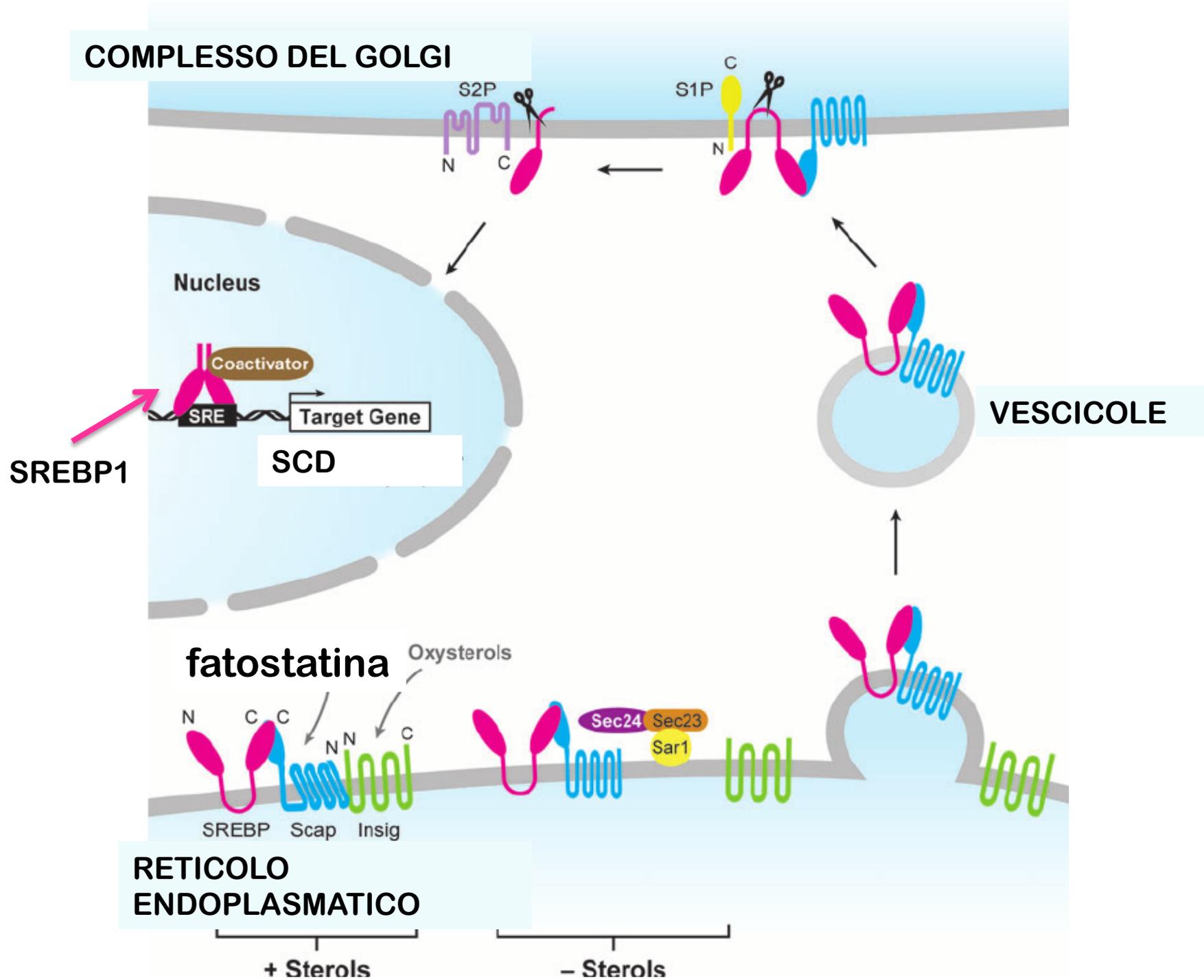
# Sistemi reporter



**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

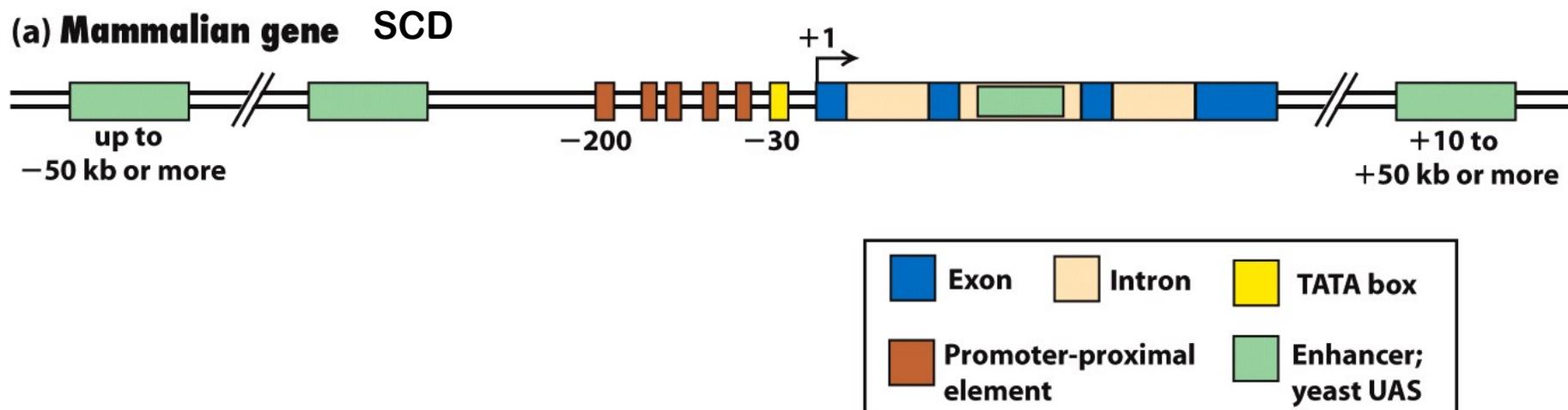


Figure 7-16  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
© 2008 W. H. Freeman and Company

# Promotori di geni di mammifero

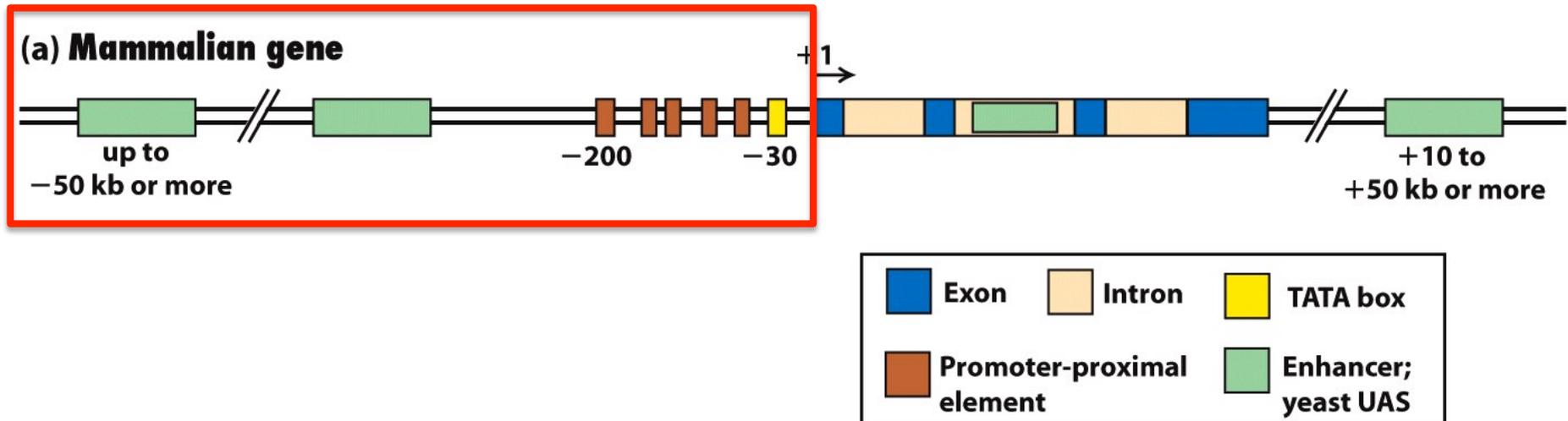
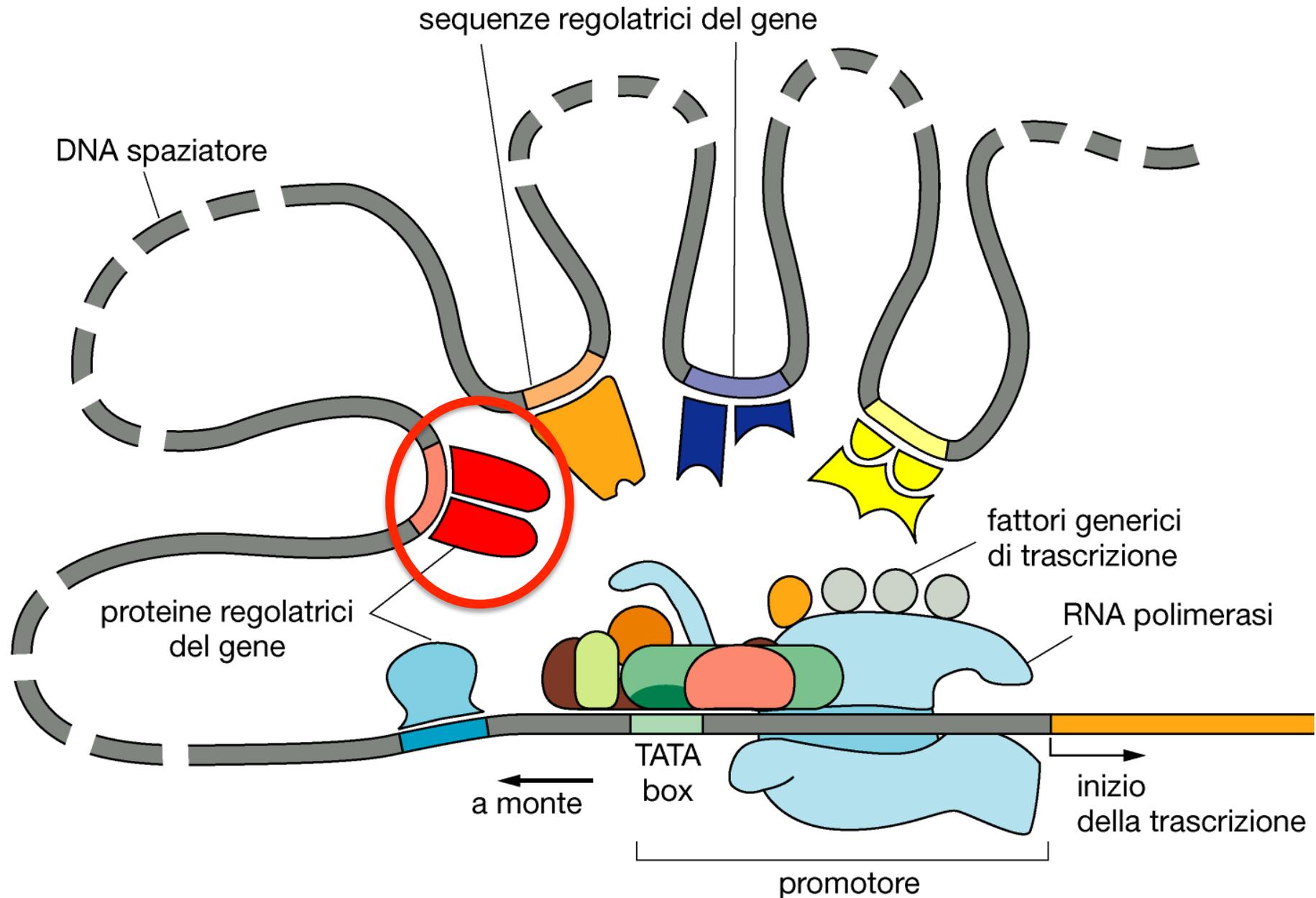
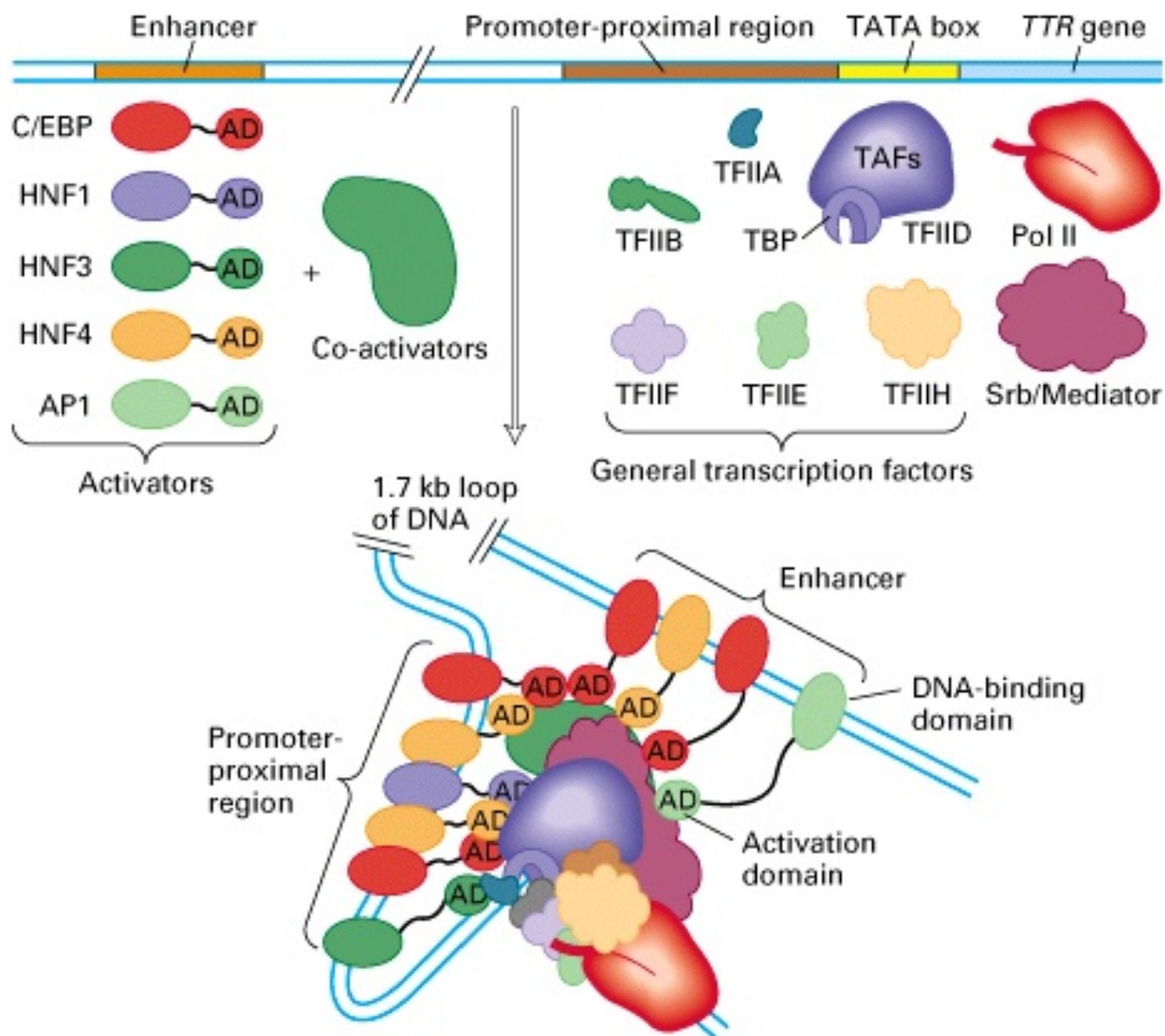


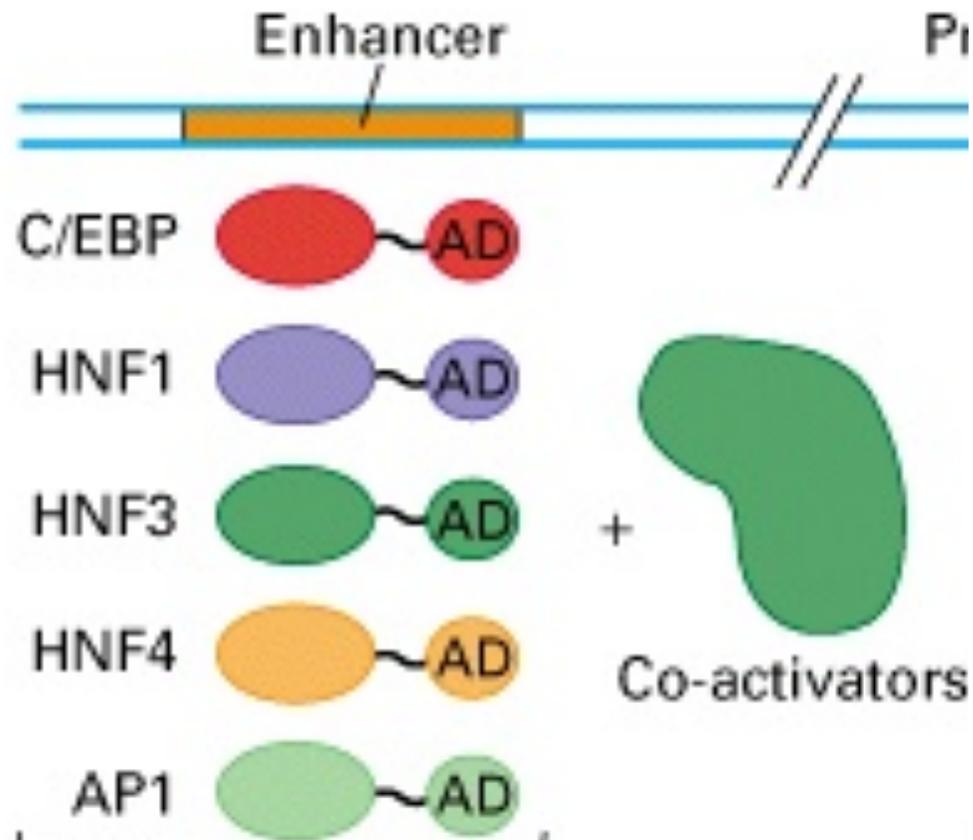
Figure 7-16  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
© 2008 W. H. Freeman and Company

# Regolazione dell'inizio della trascrizione



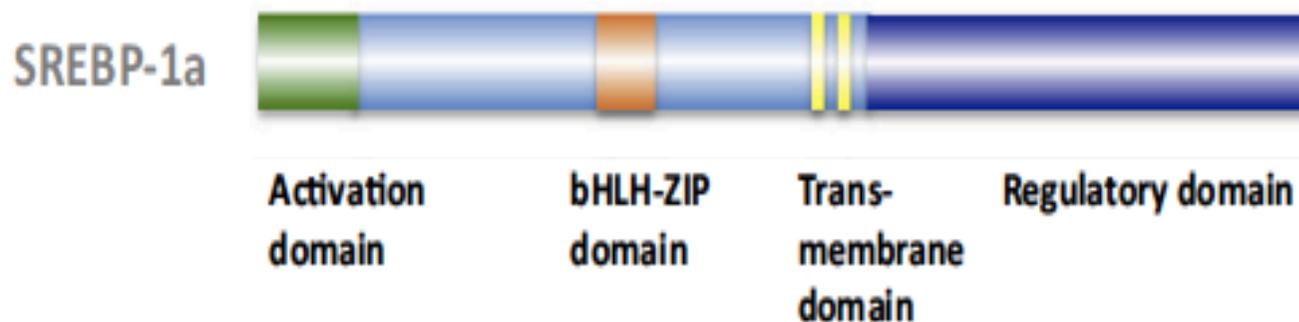


## Fattori di trascrizione: proteine a struttura modulare



- 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



dominio di  
attivazione  
trascrizionale

dominio  
di legame  
al DNA

*TRENDS in Pharmacological Sciences*

- 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

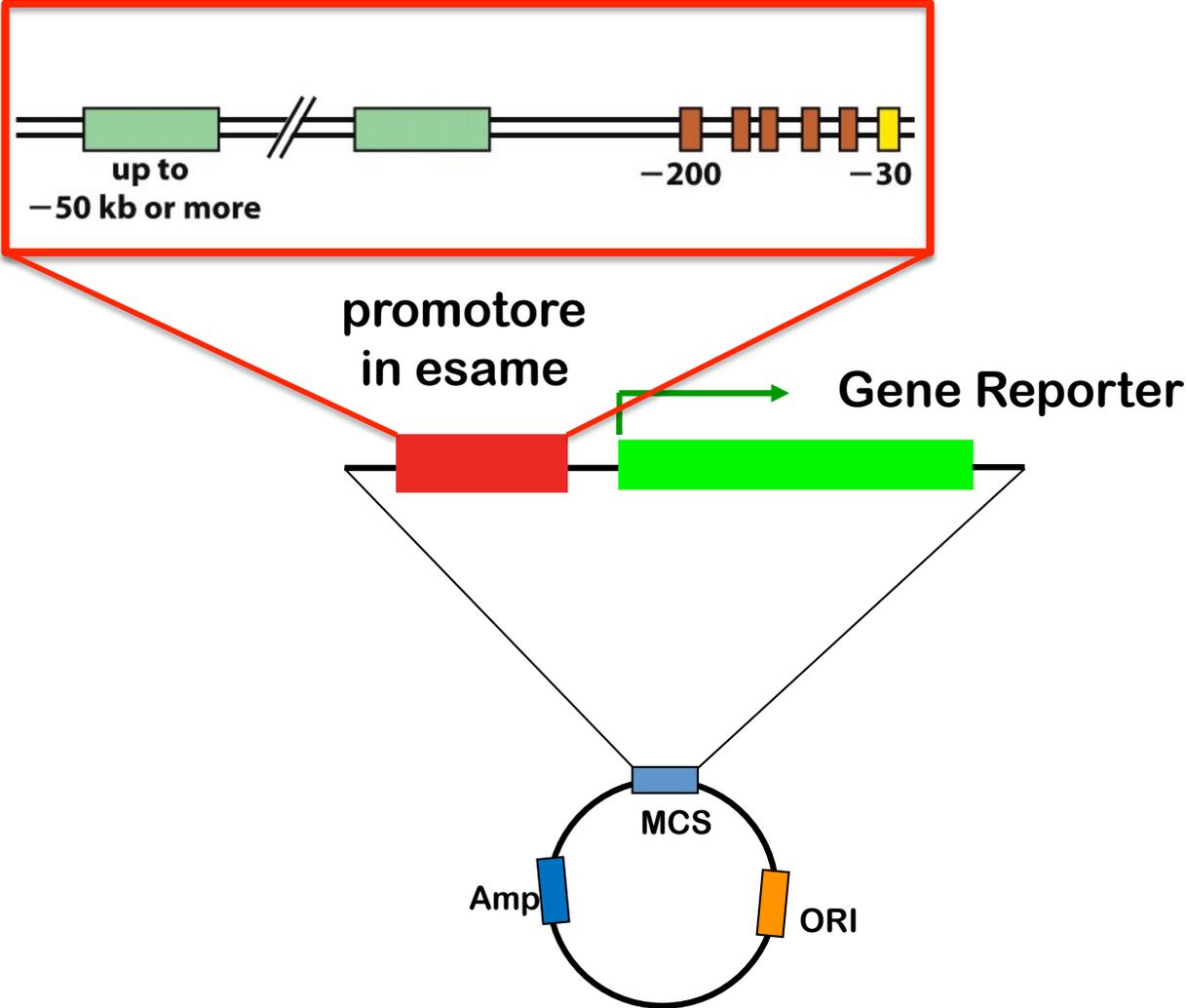
Geni la cui **espressione ectopica** può essere facilmente identificata e/o misurata mediante:

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

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

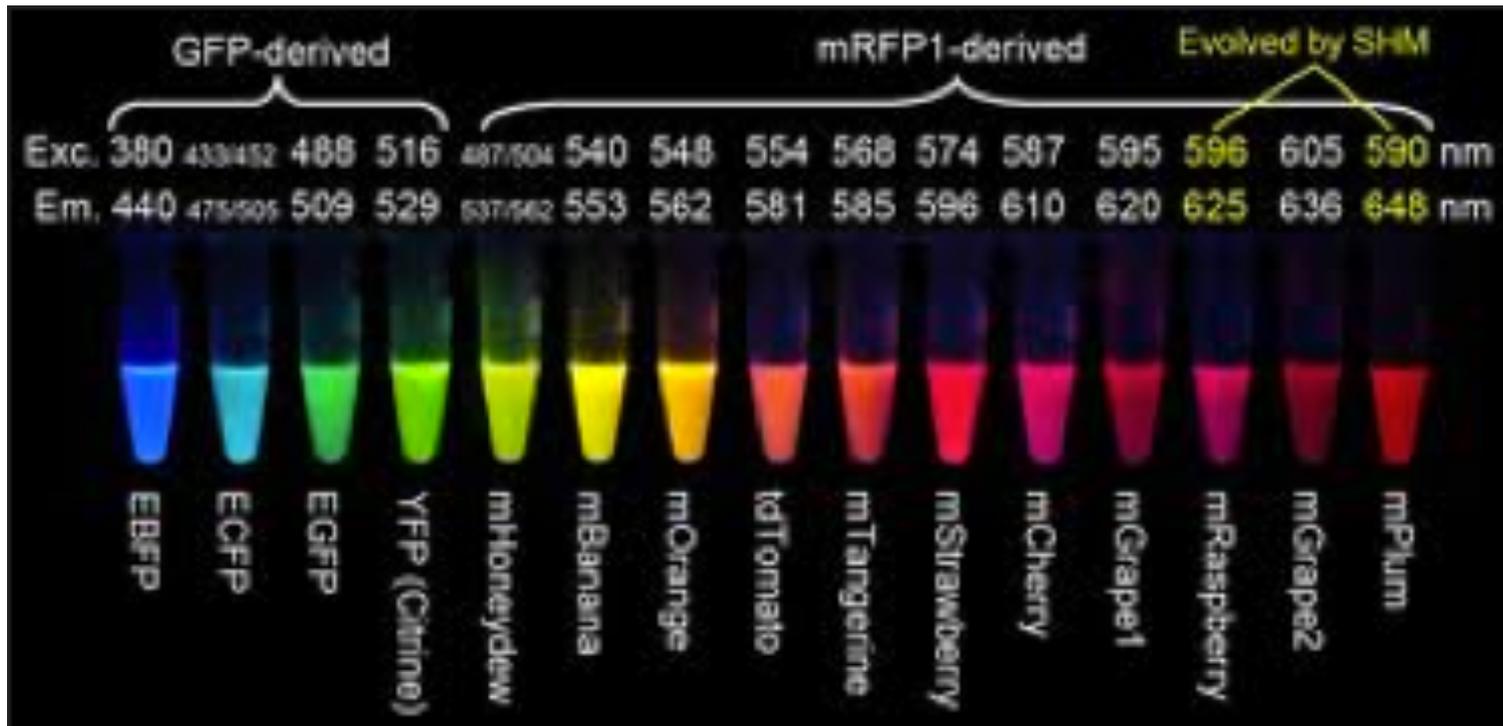
- ➡ **costitutivo** (utilizzo il reporter per visualizzare una cellula o una proteina)
- ➡ **regolato** (utilizzo il reporter per visualizzare o misurare l'attivazione del promotore)

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**

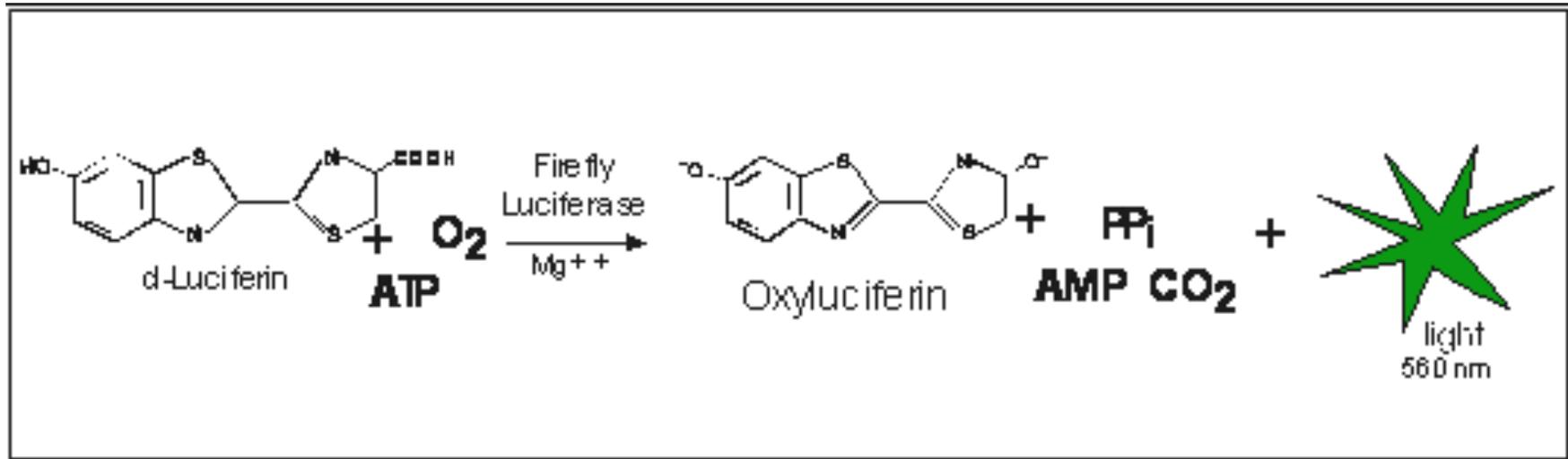
L'attività è facilmente **misurabile** utilizzando opportuni **substrati**

- 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:

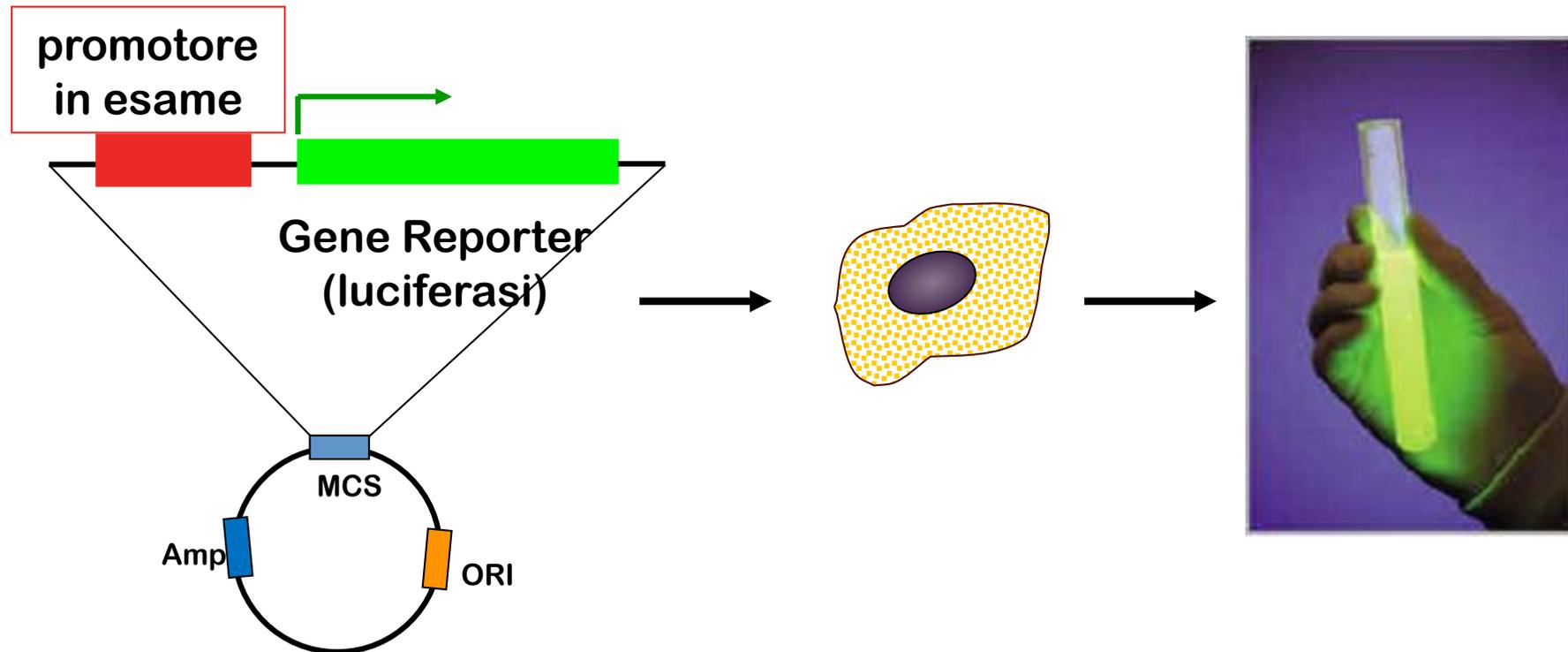
la **luce emessa** può essere **misurata** con il **luminometro** ed è  
direttamente proporzionale alla **quantità** di enzima.

### 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

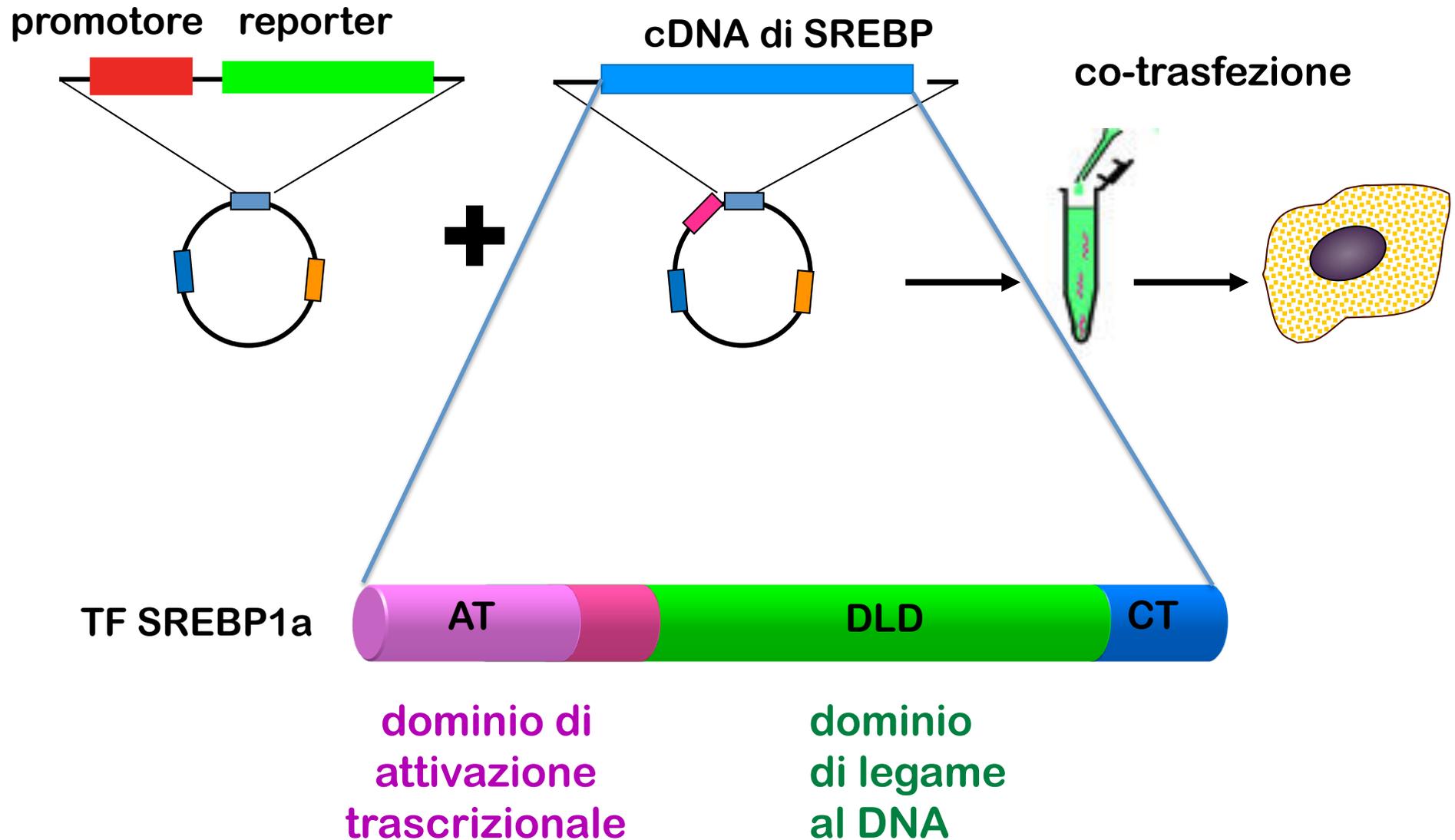
Se il promotore è attivo nelle cellule si avrà produzione dell'enzima:  
aggiungendo il substrato al lisato cellulare, si misurerà emissione di luce

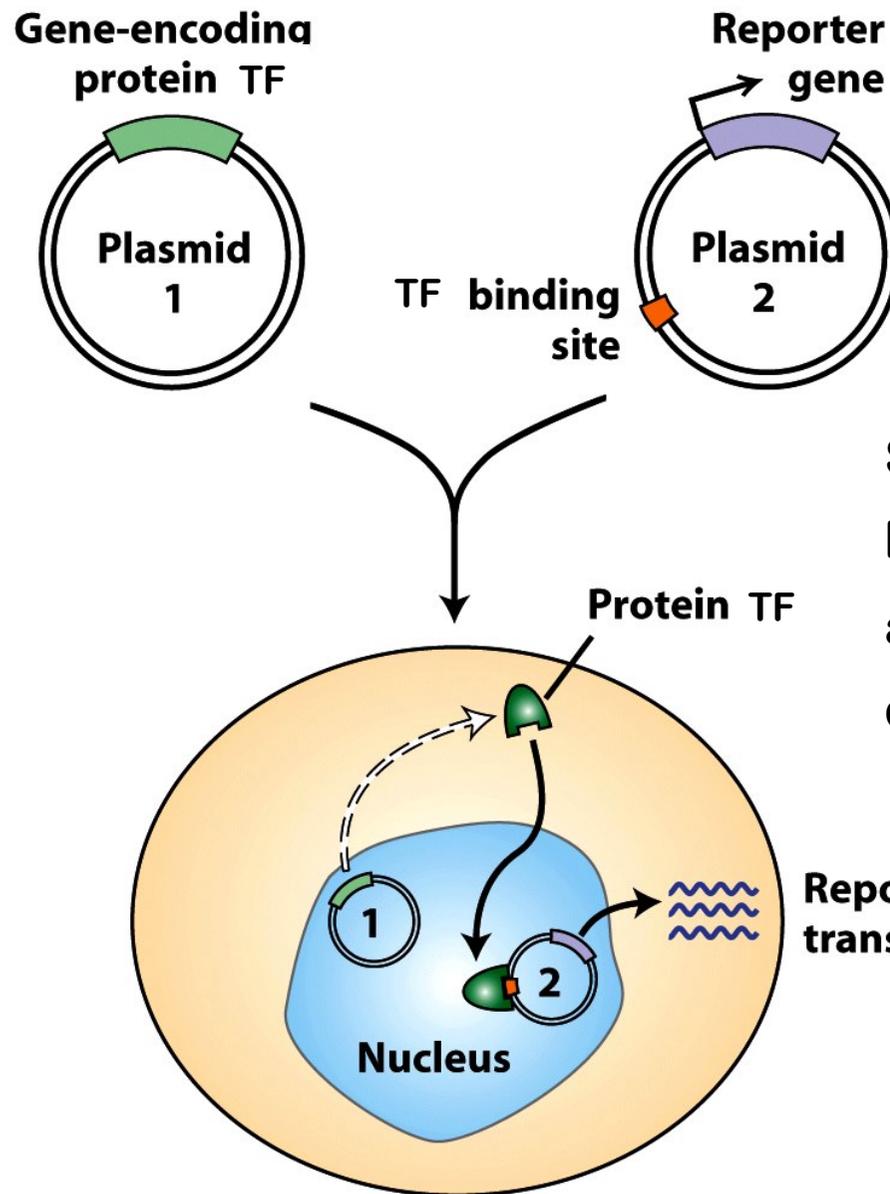


Quanto più attivo sarà il promotore, tanto maggiore la produzione di enzima e quindi l'emissione di luce

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**)





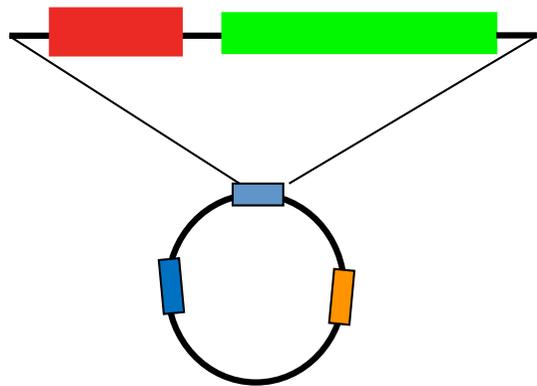
Se il TF lega il promotore bersaglio ed attiva la trascrizione del gene reporter

Reporter-gene transcripts

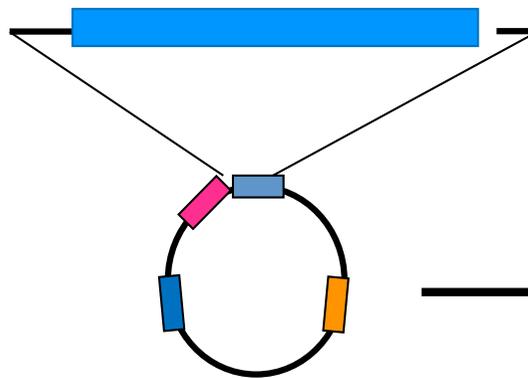
**Nel saggio reporter verrà misurato un incremento di emissione di luce**

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

promotore reporter

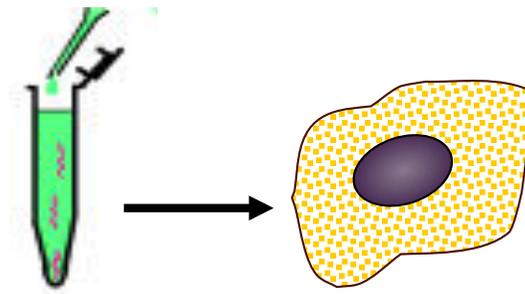


cDNA di TF



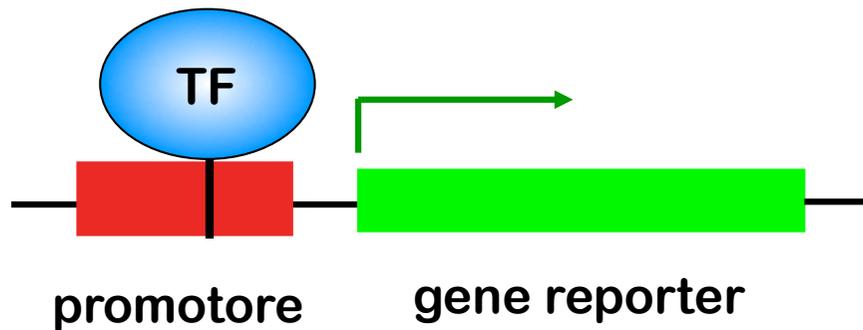
+

co-trasfezione



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

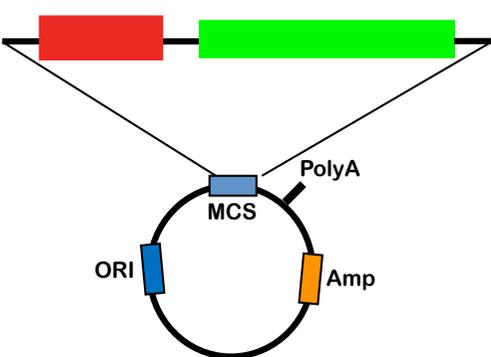
Espressione del TF



Verrà misurato un incremento di emissione di luce saggio reporter

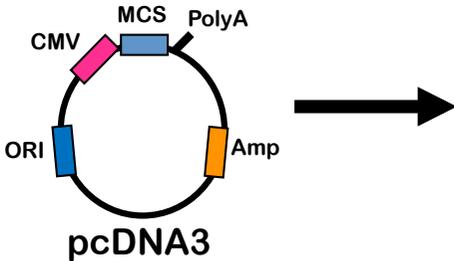
**Strategia:**

reporter  
promotore luciferasi



pSCD1-luc

+

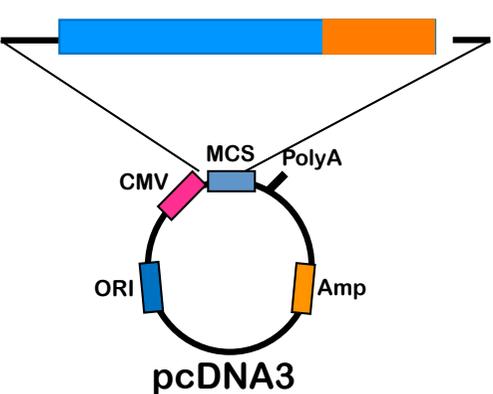


Attività BASALE  
del promotore

Oppure

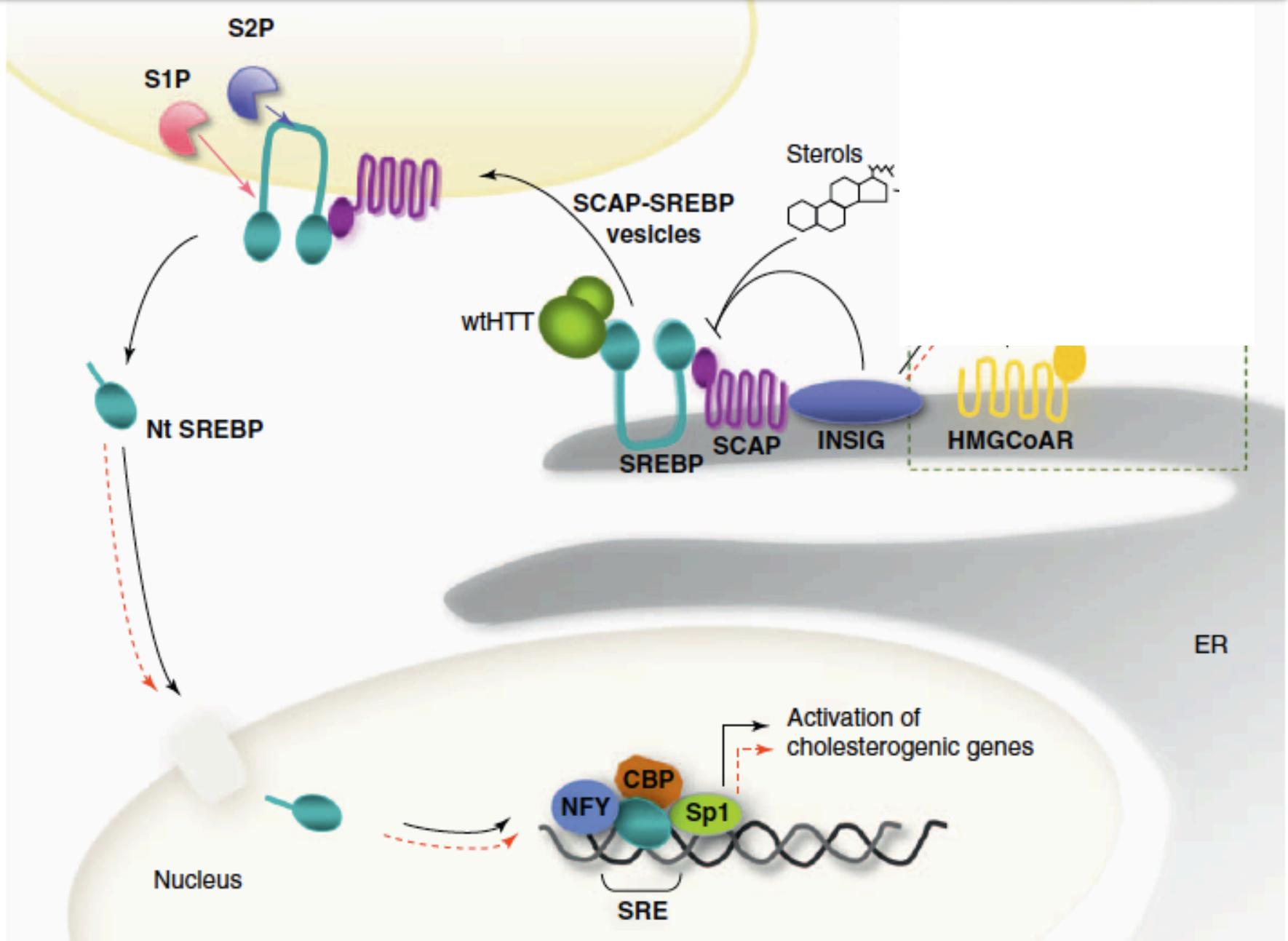
+

cDNA di SREBP



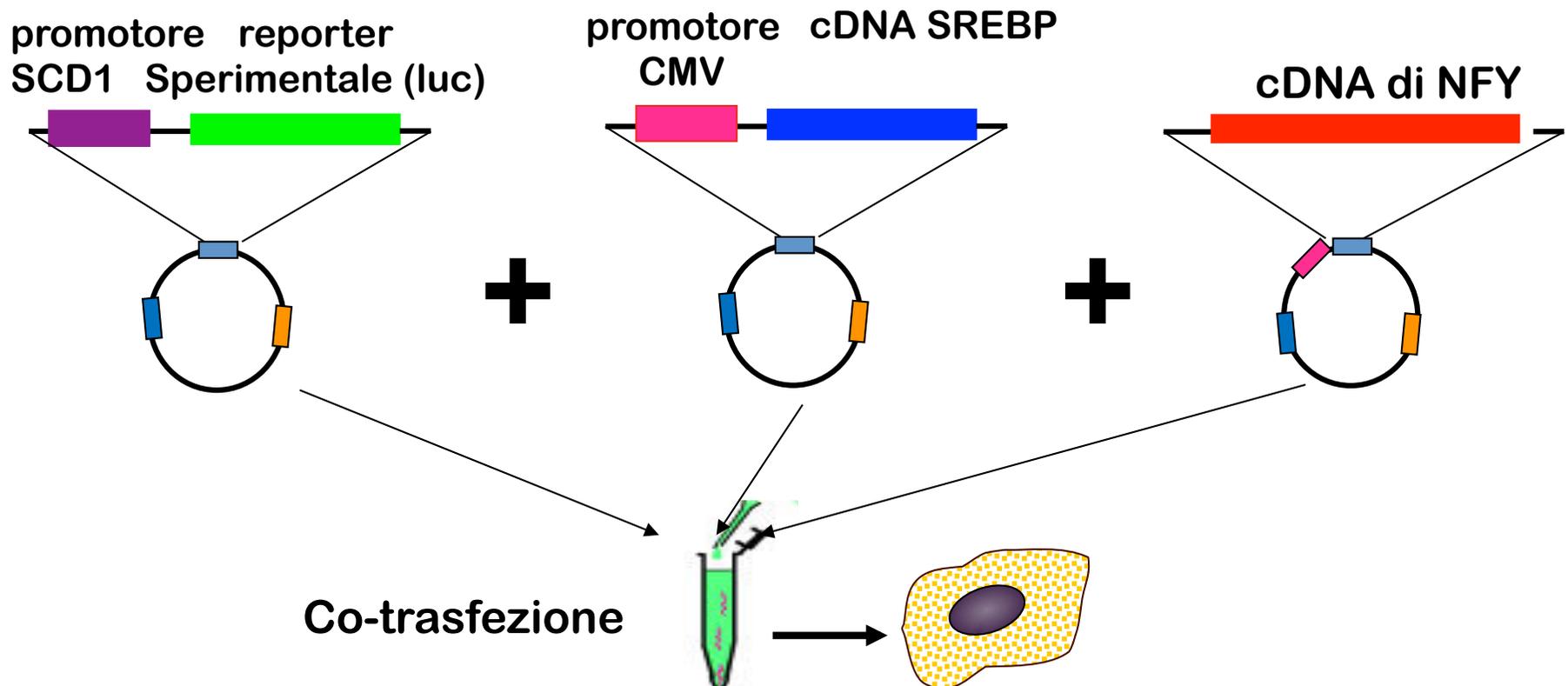
attivazione  
del promotore  
Da SREBP

# 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:

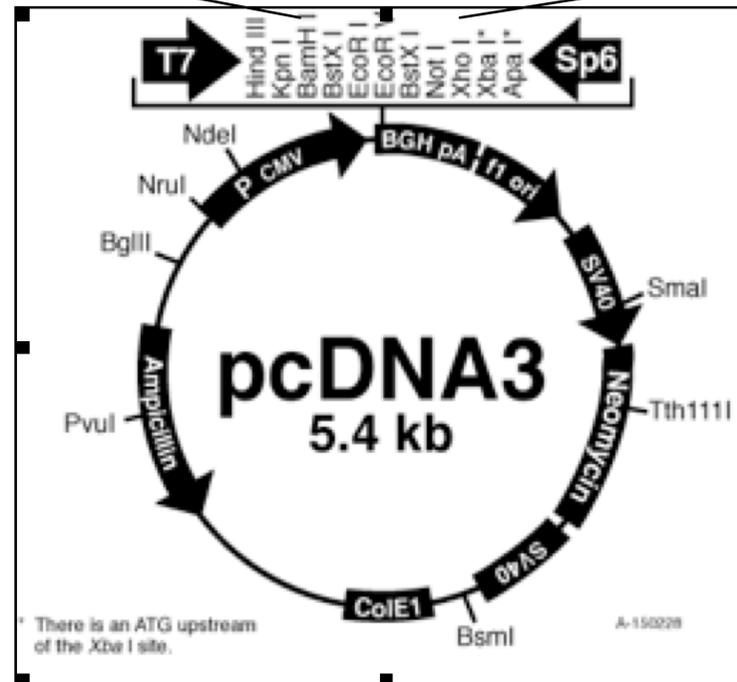
Selection: Amp<sup>R</sup> (prokaryotic); Neo<sup>R</sup> (eukaryotic)

Ref:

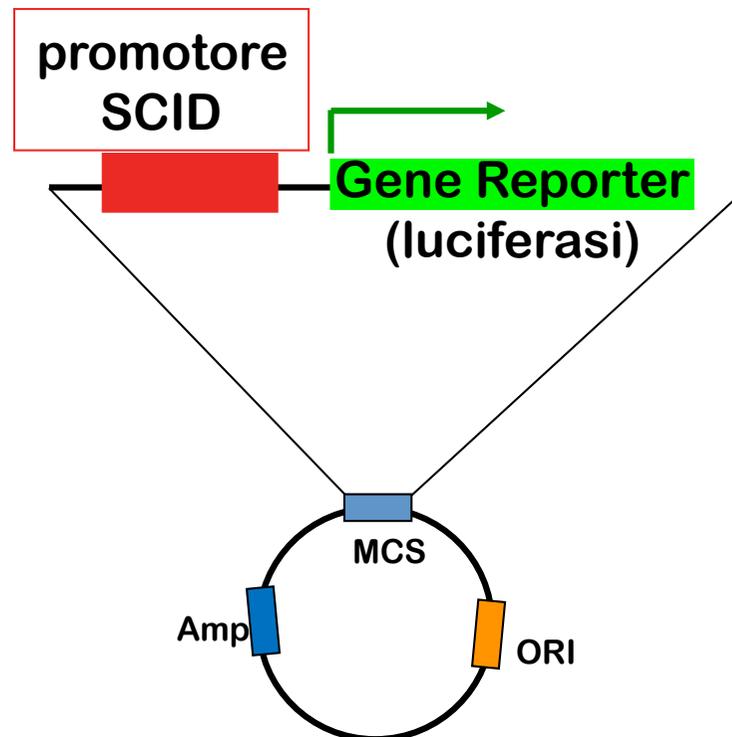
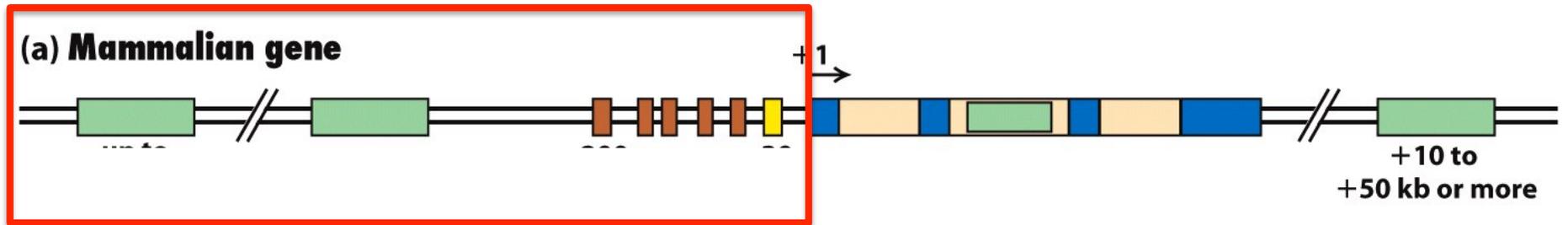
Notes:

BamHI

XhoI

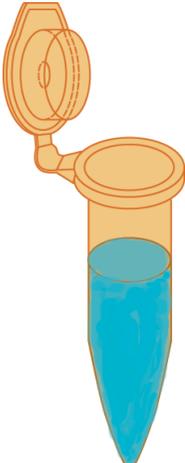


## Step 2: clonaggio del promotore SCD1 a monte del gene reporter luciferasi



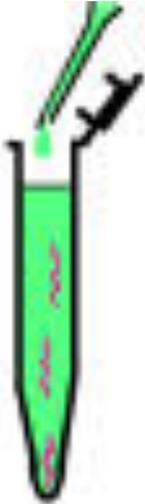
**Step 3: clonaggio del cDNA di NFY nel vettore di espressione  
pcDNA3**

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



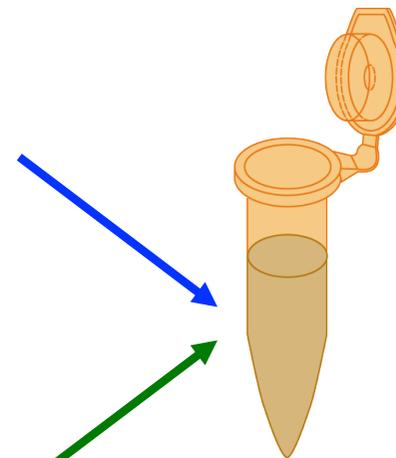
**L: 10 min a TA**

150  $\mu$ l terreno Optimem  
+  
2  $\mu$ l Lipofectamina



**D: 10 min a TA**

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



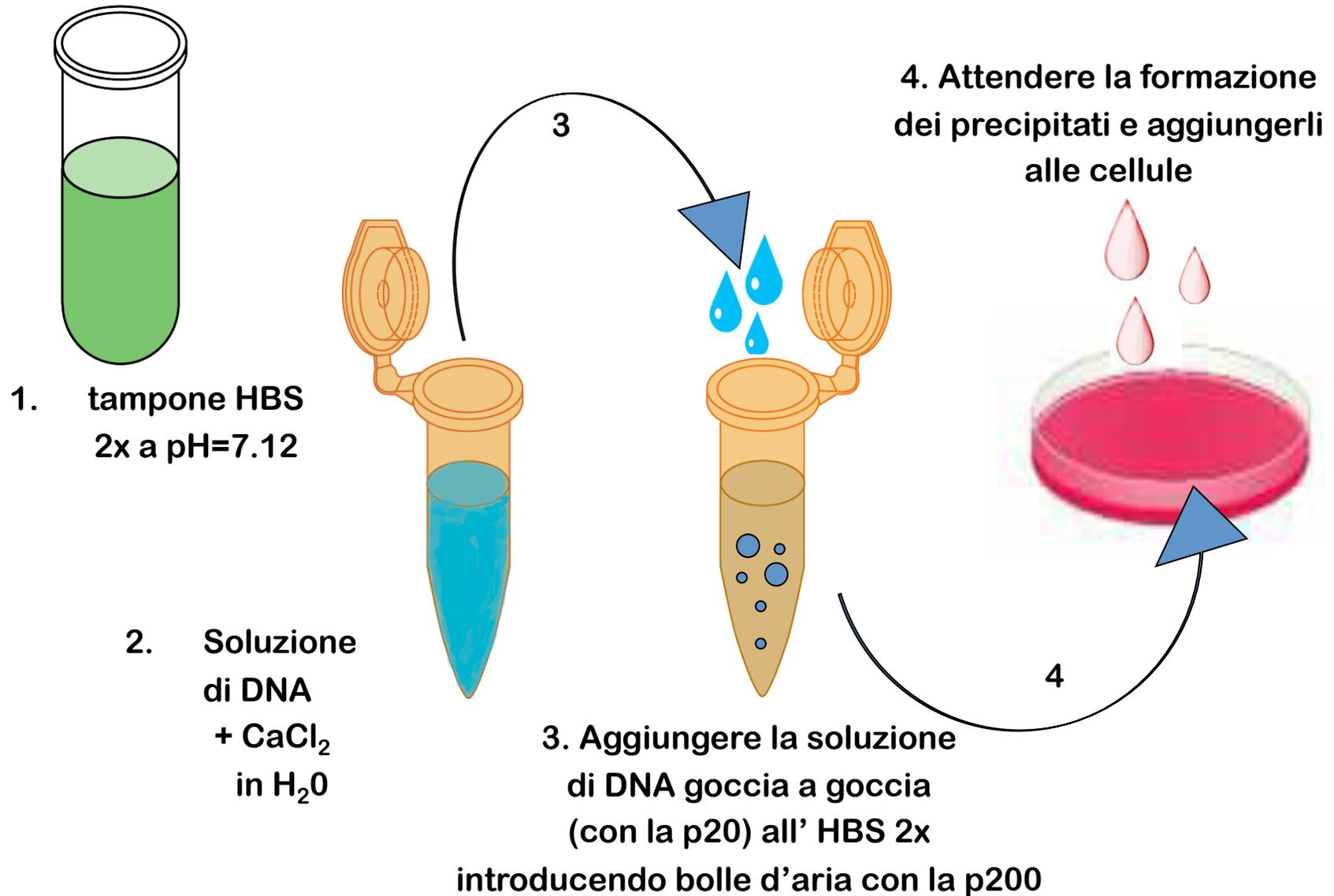
Mix L+D:  
20 min a TA

formazione  
complessi  
LIPIDE-DNA

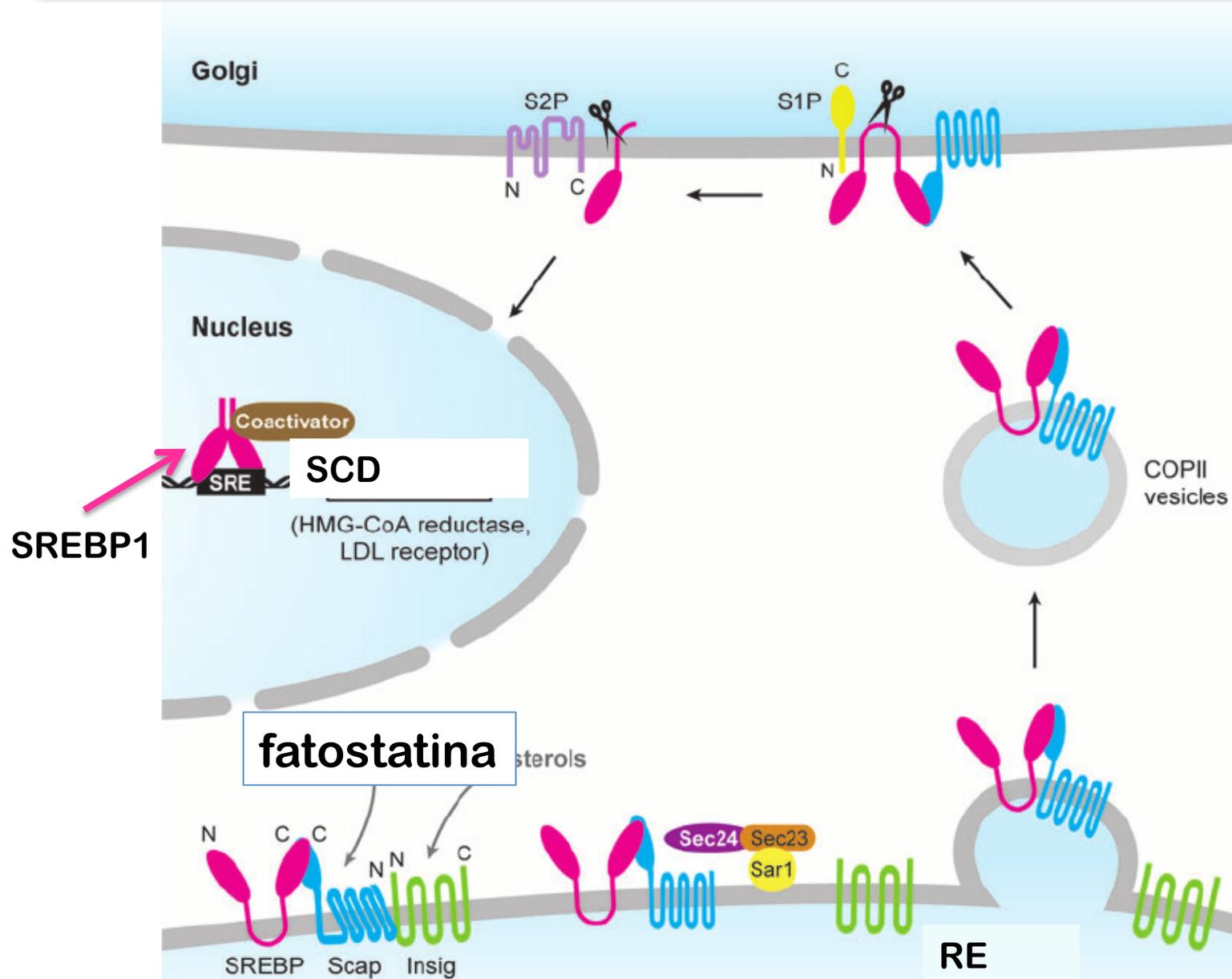


Aggiungere  
i complessi  
alle cellule

## 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

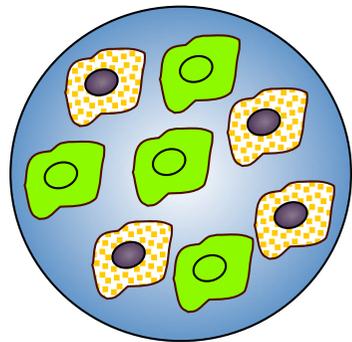
Risultato: ~~SREBP attiva il promotore, aumentando la trascrizione del reporter di 20 volte~~  
~~NFY non attiva ulteriormente SREBP~~

**NO!**

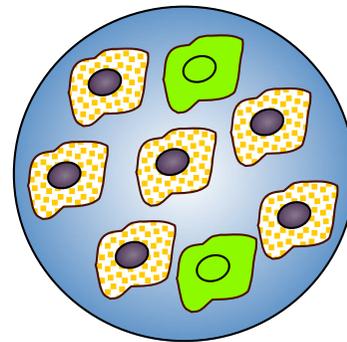
**Il valore di luminescenza misurato in un esperimento  
è PROPORZIONALE  
alla QUANTITÀ DI LUCIFERASI PRODOTTA**

**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

valori assoluti misurati

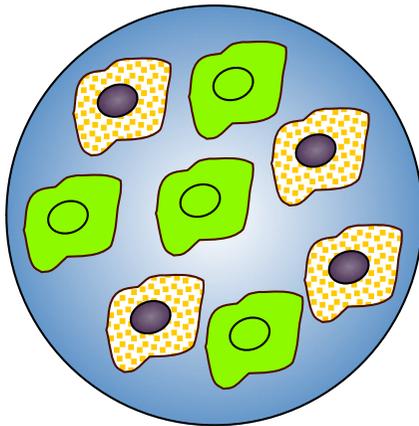
“ “

2 = 200

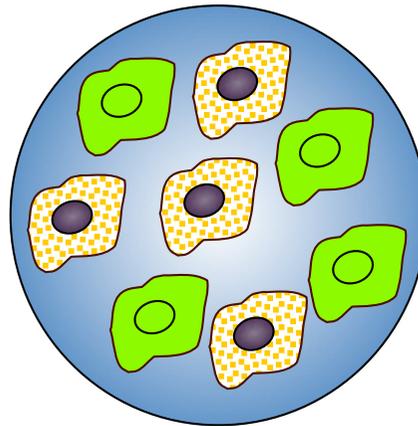
“ “

3 = 200

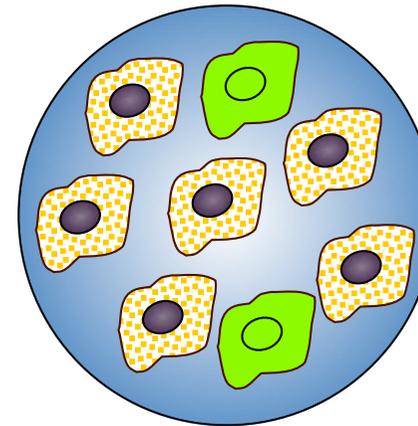
I valori assoluti di attività del reporter misurati nei 3 diversi esperimenti possono essere influenzati dalla diversa **efficienza di trasfezione** = diverso **numero di cellule trasfettate** nei diversi esperimenti.



1 = 50%



2 = 50%



3 = 25%

## **PROBLEMA:**

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

## PROBLEMA:

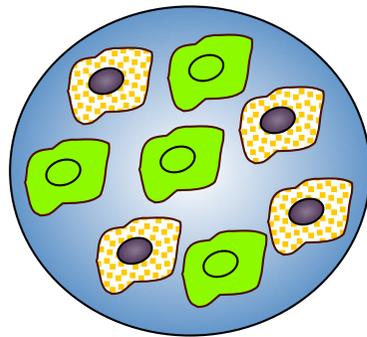
Qual è l'efficienza di trasfezione?

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

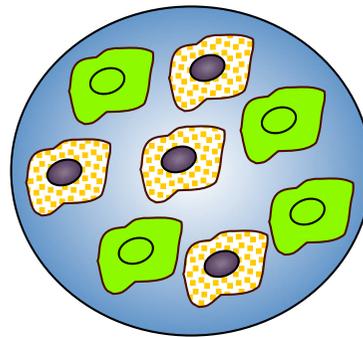


**Soluzione: trasfezione di un gene reporter NON influenzato dalle condizioni sperimentali**

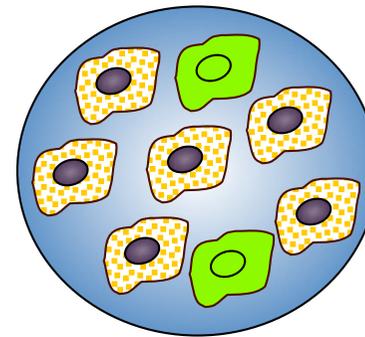
Per calcolare l'efficienza di trasfezione di ciascun esperimento si include un **CONTROLLO INTERNO**  
= un **gene reporter DIVERSO** da quello sperimentale  
sotto il controllo di un **promotore costitutivo**,  
**NON INFLUENZABILE DALLE CONDIZIONI SPERIMENTALI**  
(in questo caso non influenzato da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



1= 50%

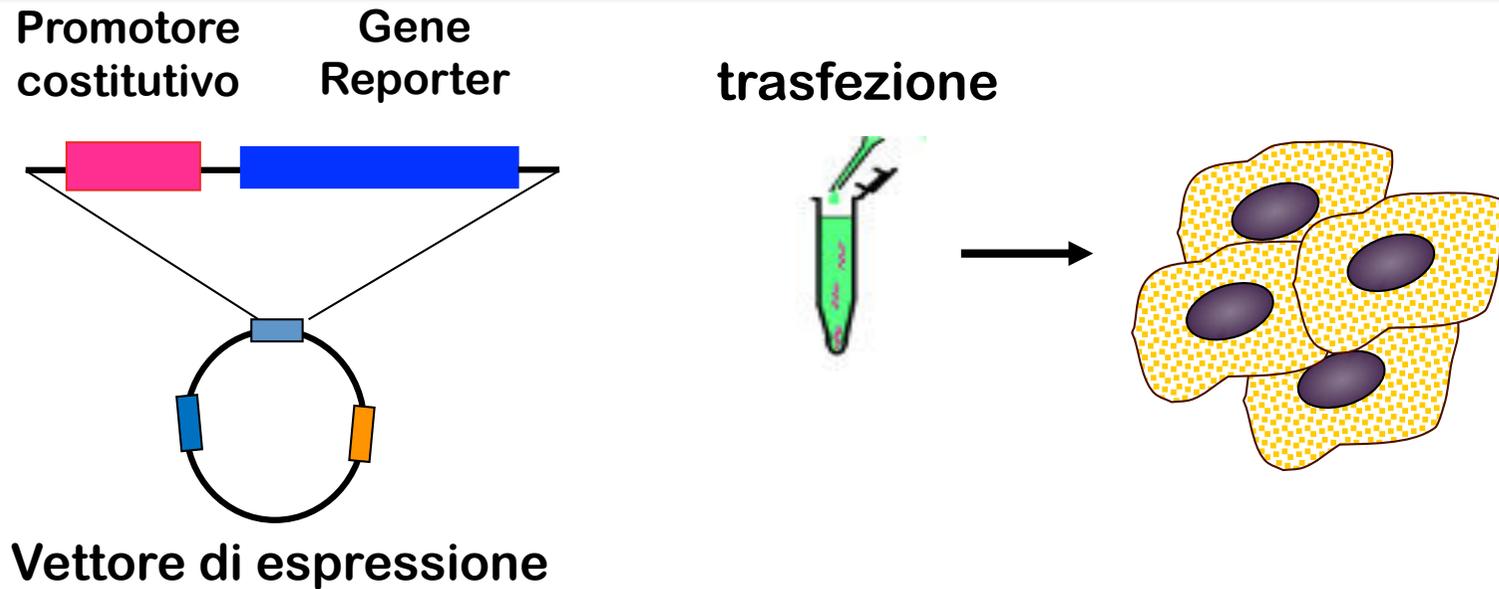


2= 50%

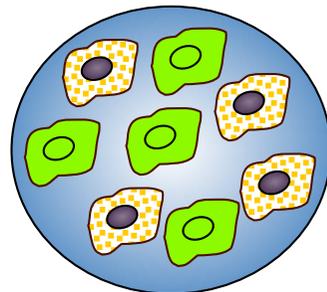


3= 25%

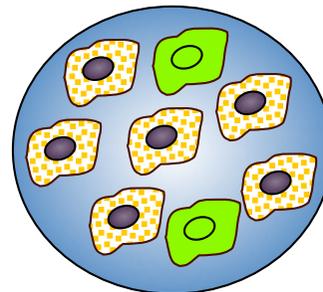
# Soluzione 1: Gene reporter a visualizzazione diretta per analisi dell'efficienza di trasfezione: GFP



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  
 **$\beta$ -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

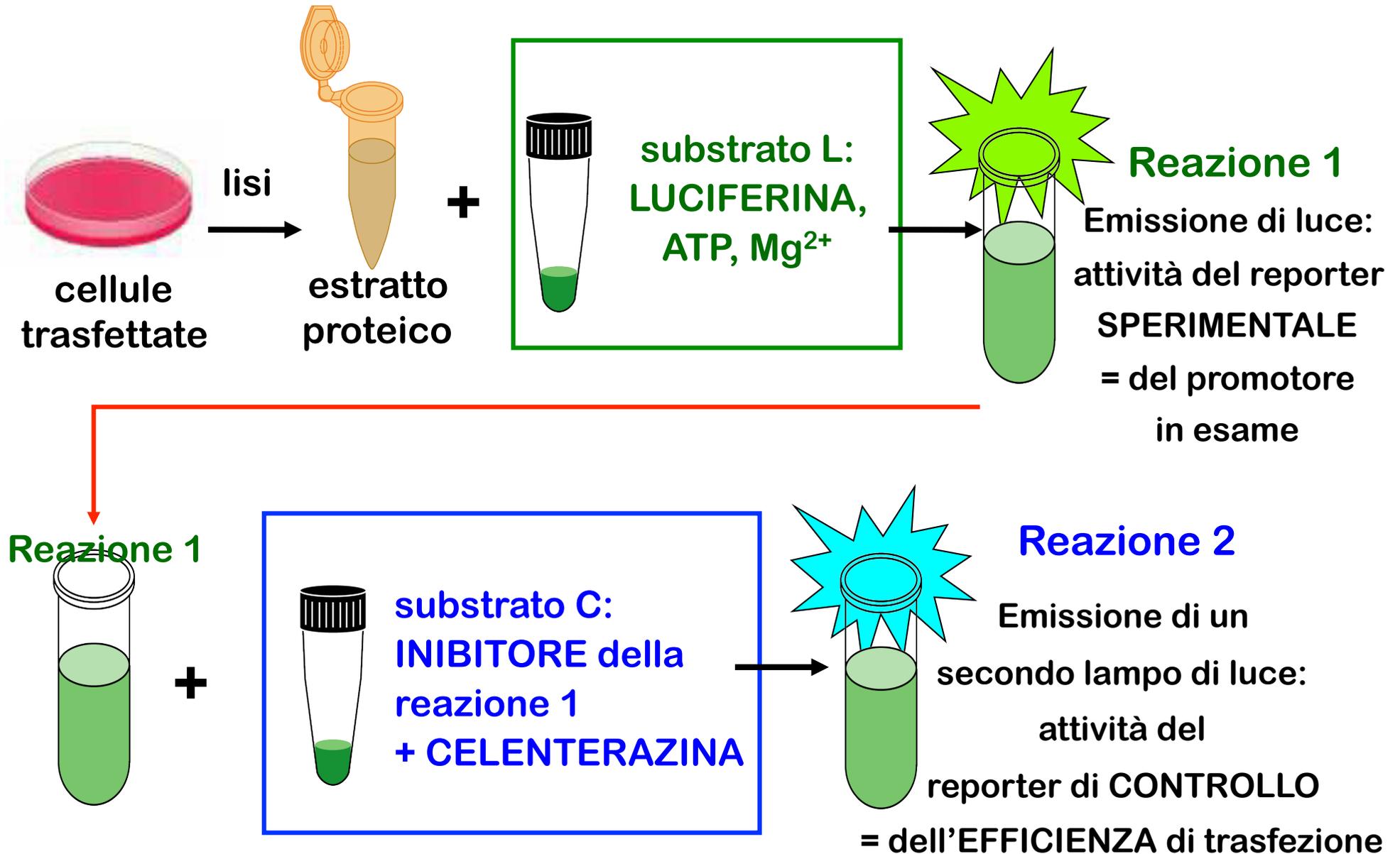


+

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 = <b>20x</b>
“ “ 3 = 200	“ <b>25%</b> <b>X 2</b>	3 = 400 = <b>40 x</b>

**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**