

CdS in Scienze e Tecnologie Biologiche

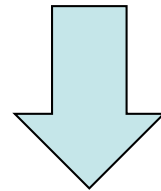
AA 2018-2019

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Discussione dell'esperienza di laboratorio per lo studio del ruolo del coattivatore NFY nell'induzione dei geni bersaglio di SREBP

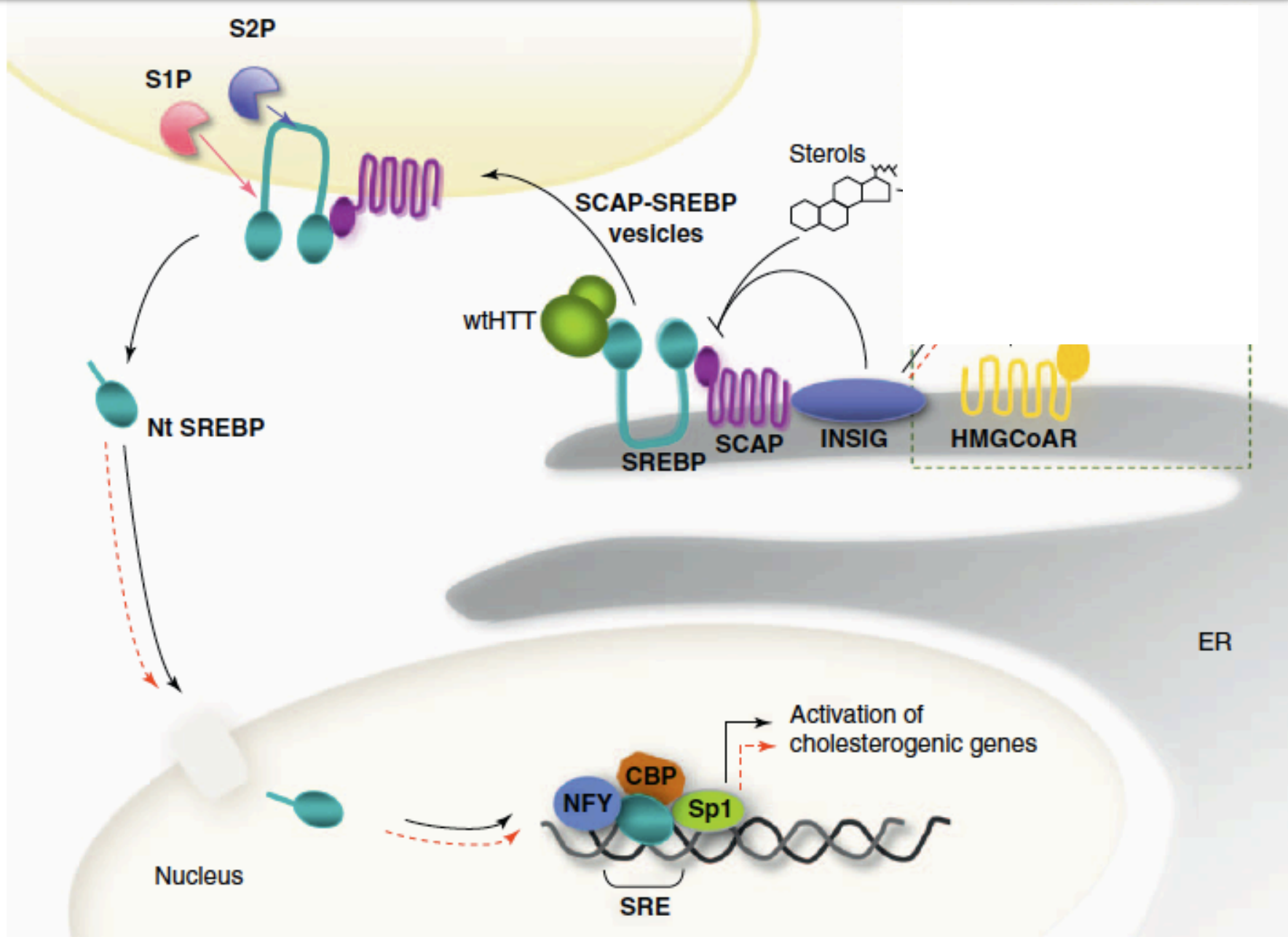
Analisi dell'espressione genica mediante saggi reporter (luciferasi)

- 1) Analisi dell'attivazione di un promotore**
- 2) Analisi dell'efficienza di trasfezione**

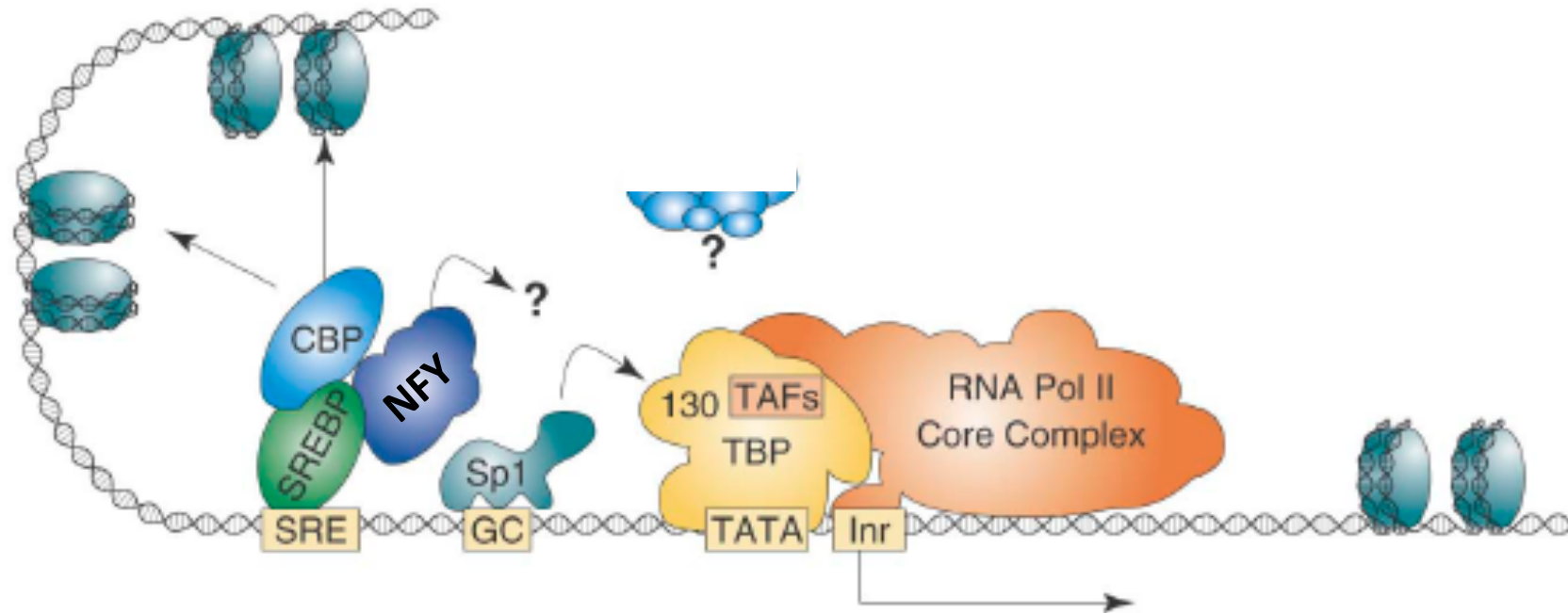


Doppi saggi reporter

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

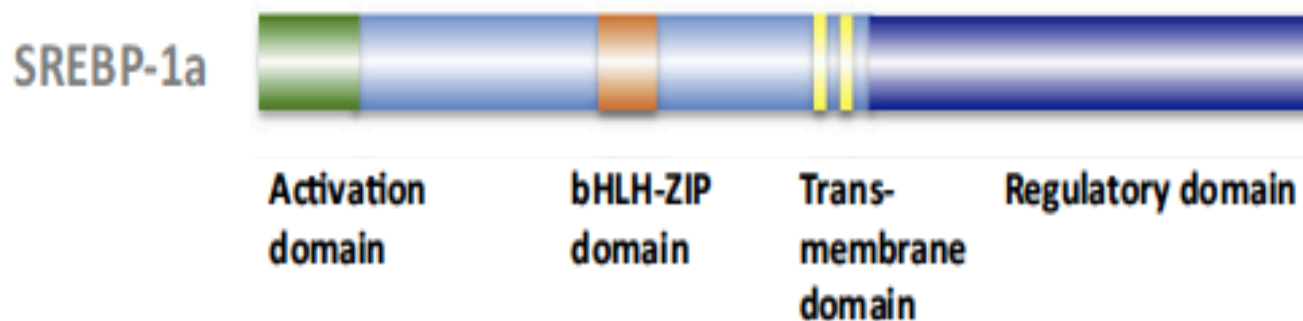


Ruolo del coattivatore NFY nell'induzione dei geni bersaglio di SREBP



Näär et al., PNAS 1998

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



dominio di attivazione trascrizionale

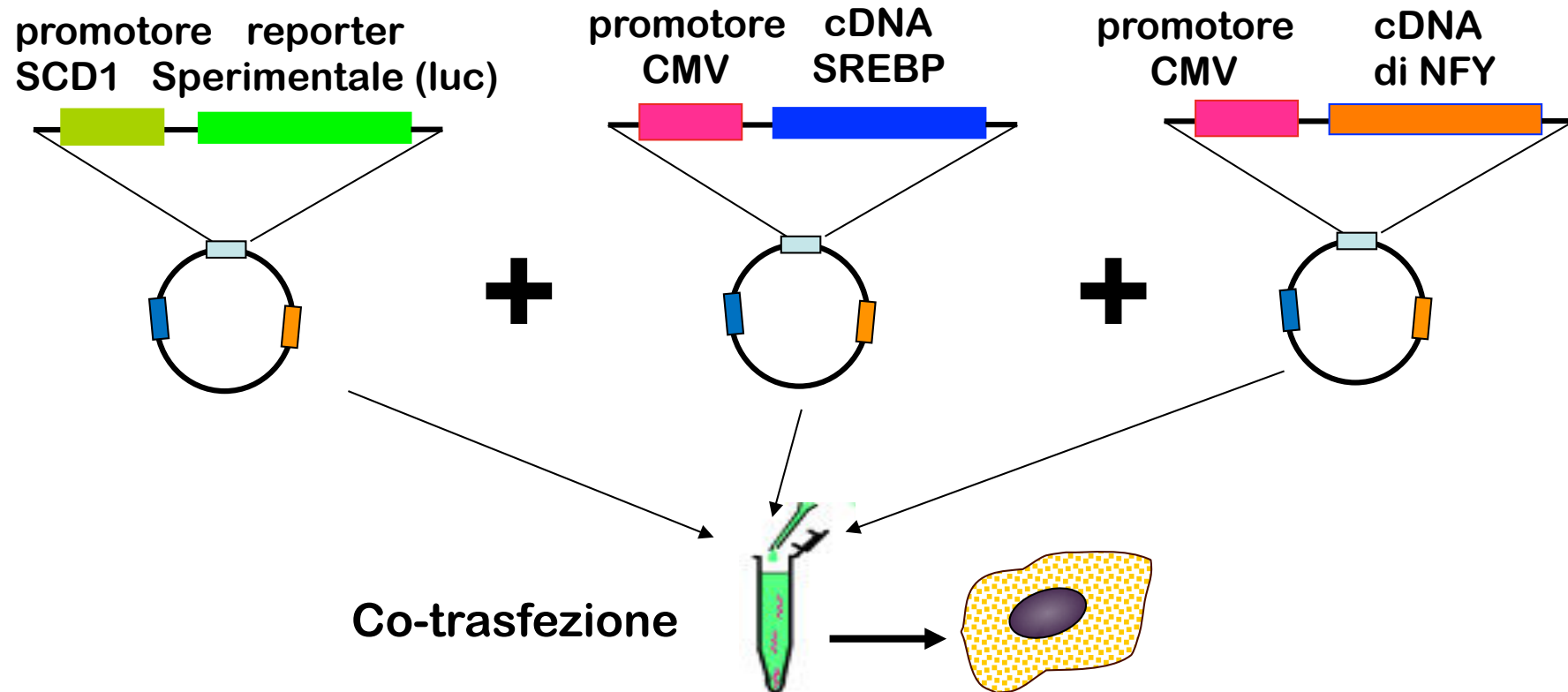
dominio di legame al DNA

TRENDS in Pharmacological Sciences

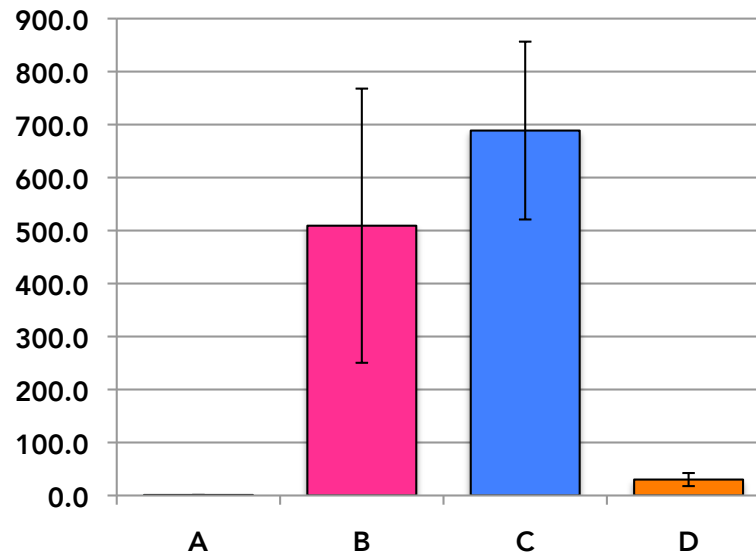
- dominio di *legame al DNA* (sequenza-specifico)
- dominio di *trans-attivazione*
- *altri* domini (e.g. interazione proteina-proteina, interazione con ligandi, regolazione, etc.)

Strategia sperimentale

- A- livello BASALE reporter pPROM-luc + vettore vuoto pcDNA3 + reporter controllo
- B- effetto di SREBP reporter pPROM-luc + vettore pcDNA3-SREBP + reporter controllo
- C- contributo di NFY reporter + pcDNA3-SREBP + vettore pcDNA3-NFY + reporter controllo
- D- come C con fatostatina = inibitore della maturazione di SREBP1



Risultato:



Commento 1: Il confronto tra A e B mostra che SREBP1 porta ad un aumento dell'attività di SCD/LUC di circa 500 volte (tranne un caso)

Commento 2: il confronto tra B e C mostra che non si è potuto apprezzare il contributo di NFY in tutti i campioni, dovuto essenzialmente all'aumento molto forte che c'è stato con SREBP1. deviazioni standard troppo alte e nessuna significatività statistica della differenza tra punto B e C. Dunque l'esperimento deve essere rivisto, eventualmente abbassando la quantità di pCDNA3-SREBP1 e aggiungendo quantità crescenti di pCDNA3-NFY (da solo e con SREBP1) per verificare se c'è sinergia di attivazione.

Commento 3: la reazione D mostra il contributo del solo NFY su SCD/LUC, dato che le cellule sono state trattate con fatostatina che blocca la maturazione di SREBP1 (sia endogeno che sovraespresso). Tale aumento è di piccola entità rispetto all'azione della sovraespressione di SREBP.

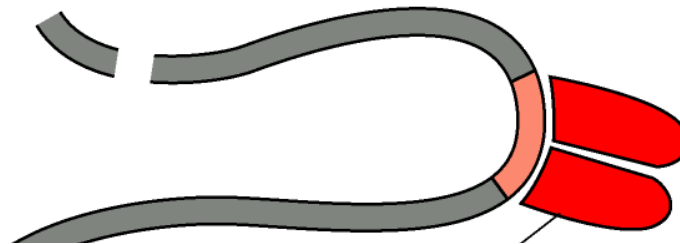
Quali sono i meccanismi molecolari alla base dell'effetto di NFY?

Ipotesi 1: NFY modifica l'affinità di legame di SREBP per il DNA bersaglio

Ipotesi 2: NFY recluta un coattivatore trascrizionale (es. CBP) che promuove l'acetilazione degli istoni sul promotore

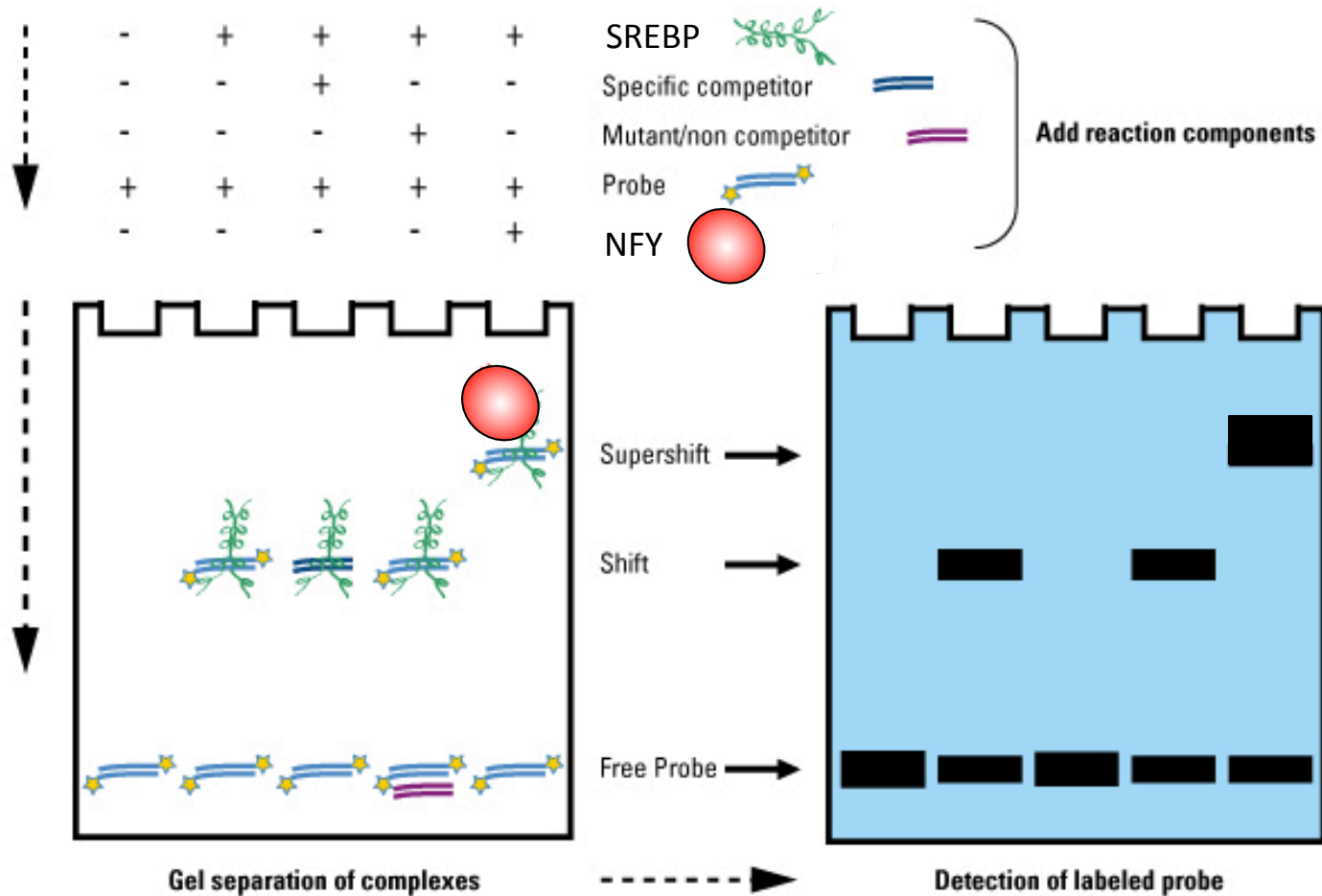
Ipotesi 3: NFY spiazza un repressore trascrizionale dal promotore

Analisi dell'interazione di un TF con una specifica regione di DNA in vitro



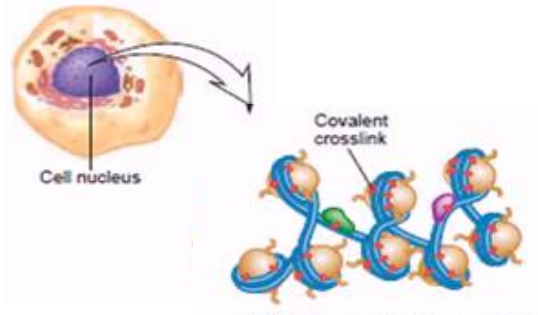
Analisi dell'interazione di un TF con una specifica sequenza di DNA in vitro: EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

In gel di poliacrilammide non denaturanti

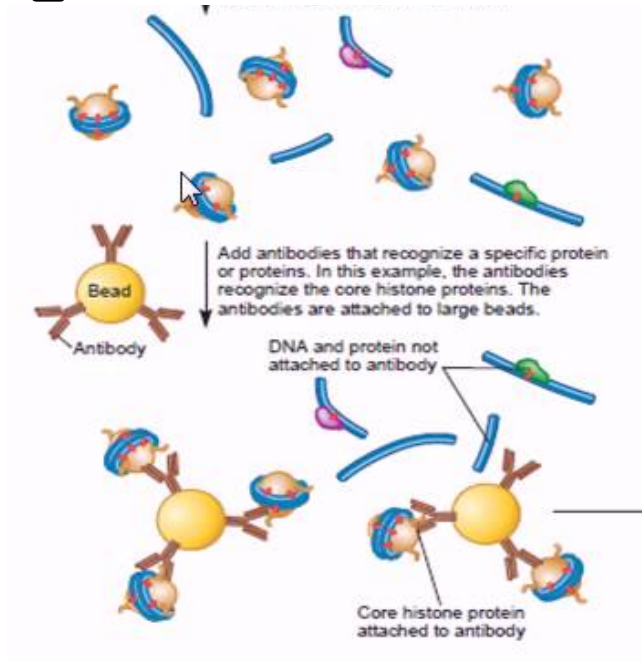


Analisi dell'interazione di proteine (TF) con specifici siti della cromatina: immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)

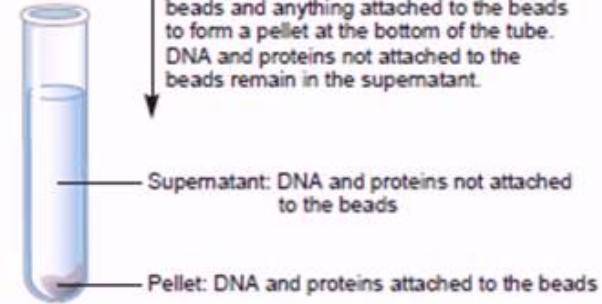
1



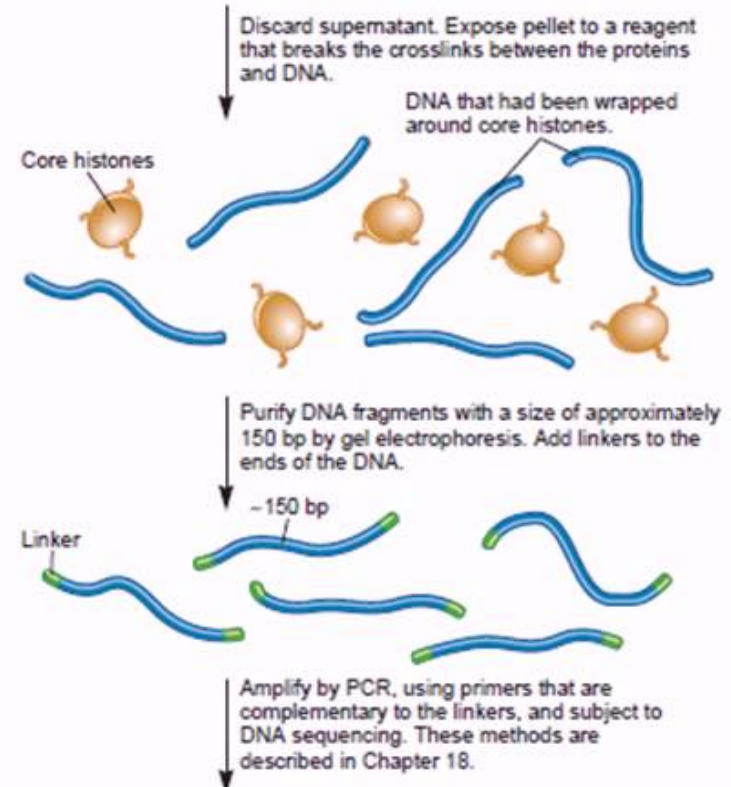
2



3



4



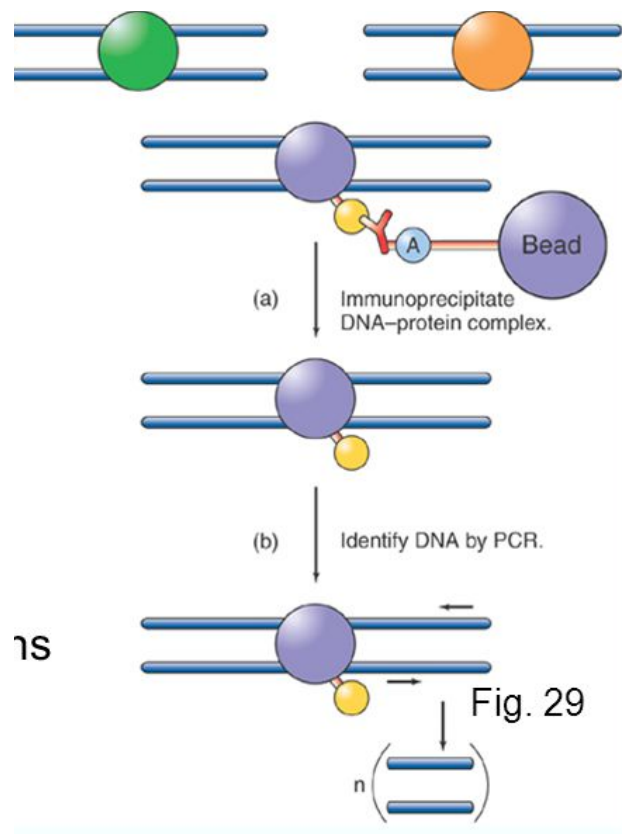
5

Analisi dell'interazione del fattore NFY con la cromatina del promotore SCD1

- 1) PCR semiquantitativa
- 2) qPCR real-time

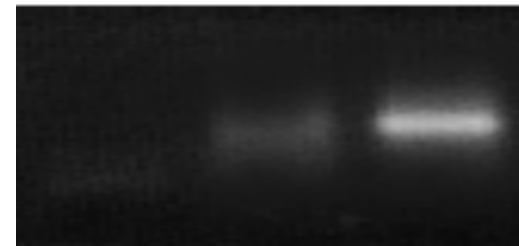


Sequenza nota: mi chiedo QUANTO si lega

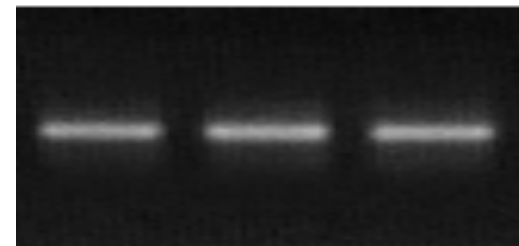


IP: controllo SREBP

ChIP

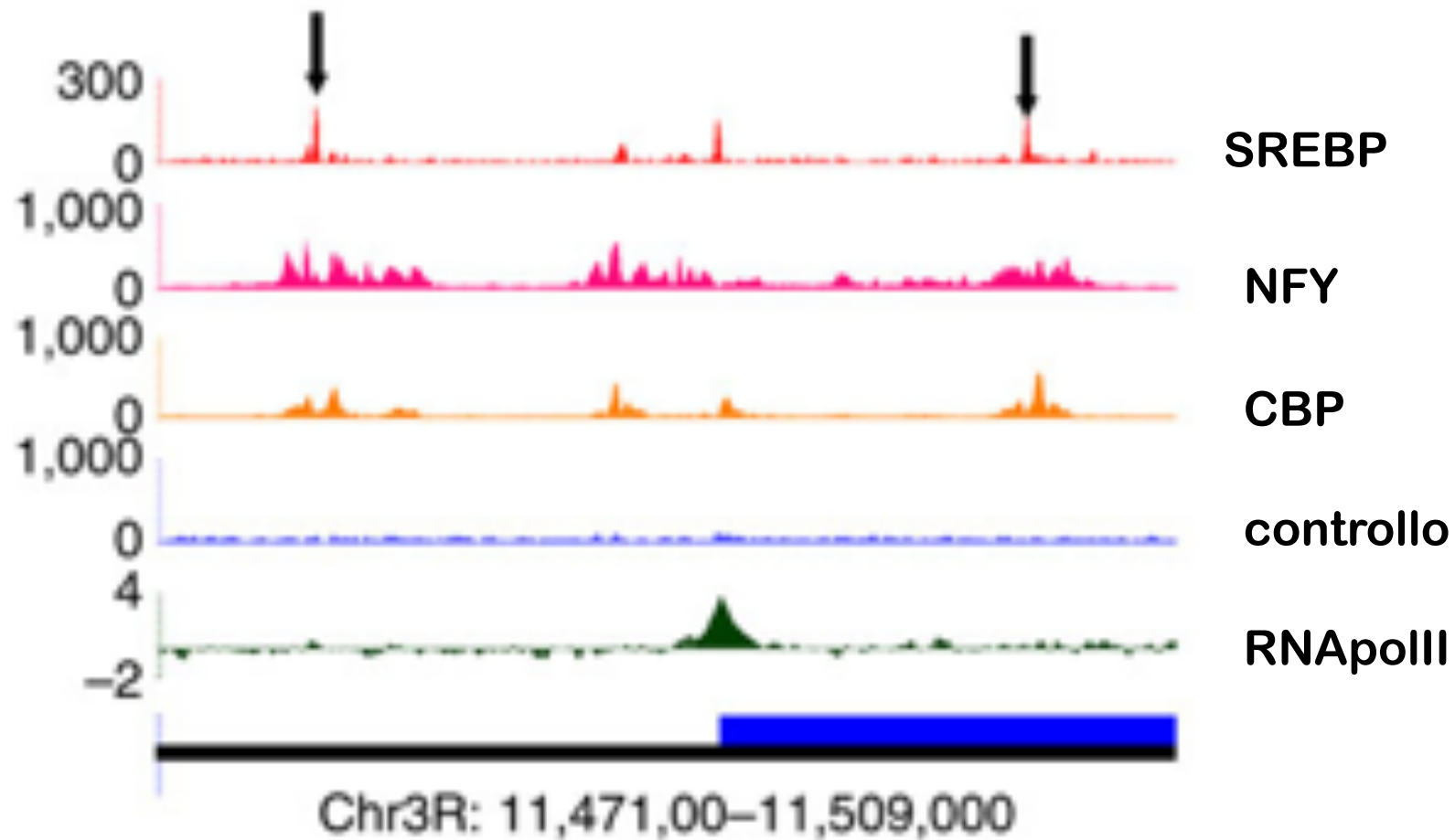


SREBP SREBP SREBP
+ NFY

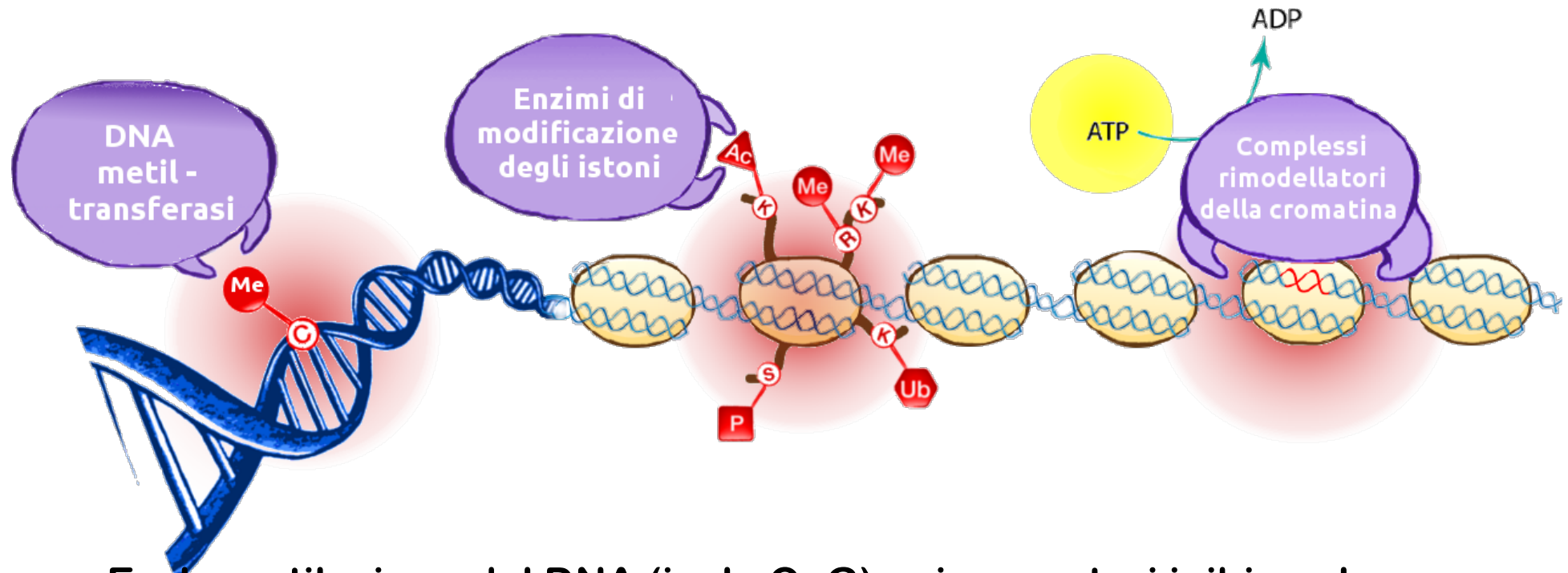


Input cromatina

ChIP-seq: analisi delle proteine legate a specifici siti sul genoma



Regolazione dell'espressione genica: ruolo dei cofattori trascrizionali e delle modificazioni epigenetiche

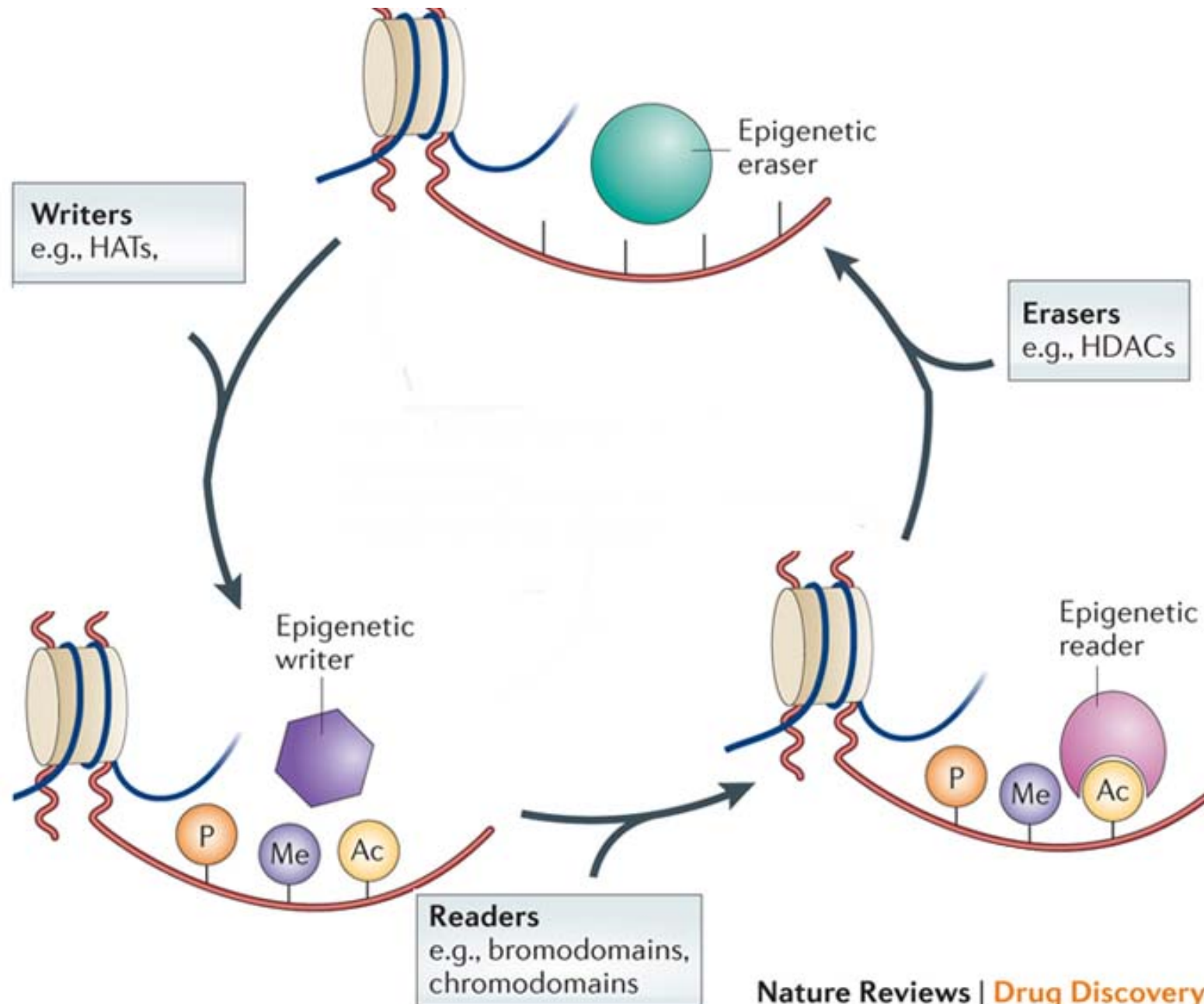


Es. la metilazione del DNA (isole CpG) nei promotori inibisce la trascrizione;

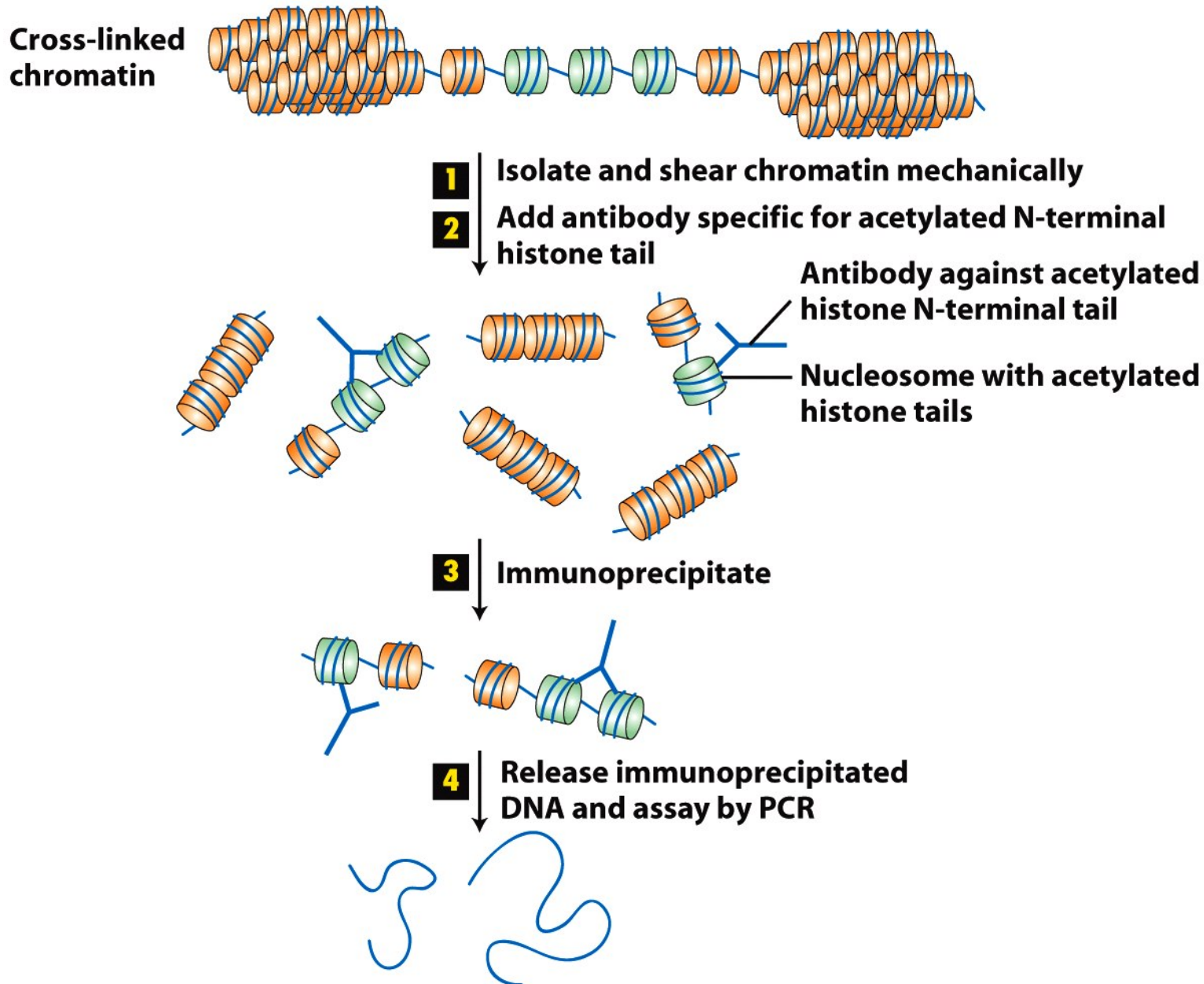
specifiche modificazioni istoniche (es. acetilazione H3K9) facilitano lo svolgimento della cromatina e il legame di alcuni attivatori;

al contrario, altre modificazioni (es. metilazione H3K9) promuovono il legame di inibitori della trascrizione.

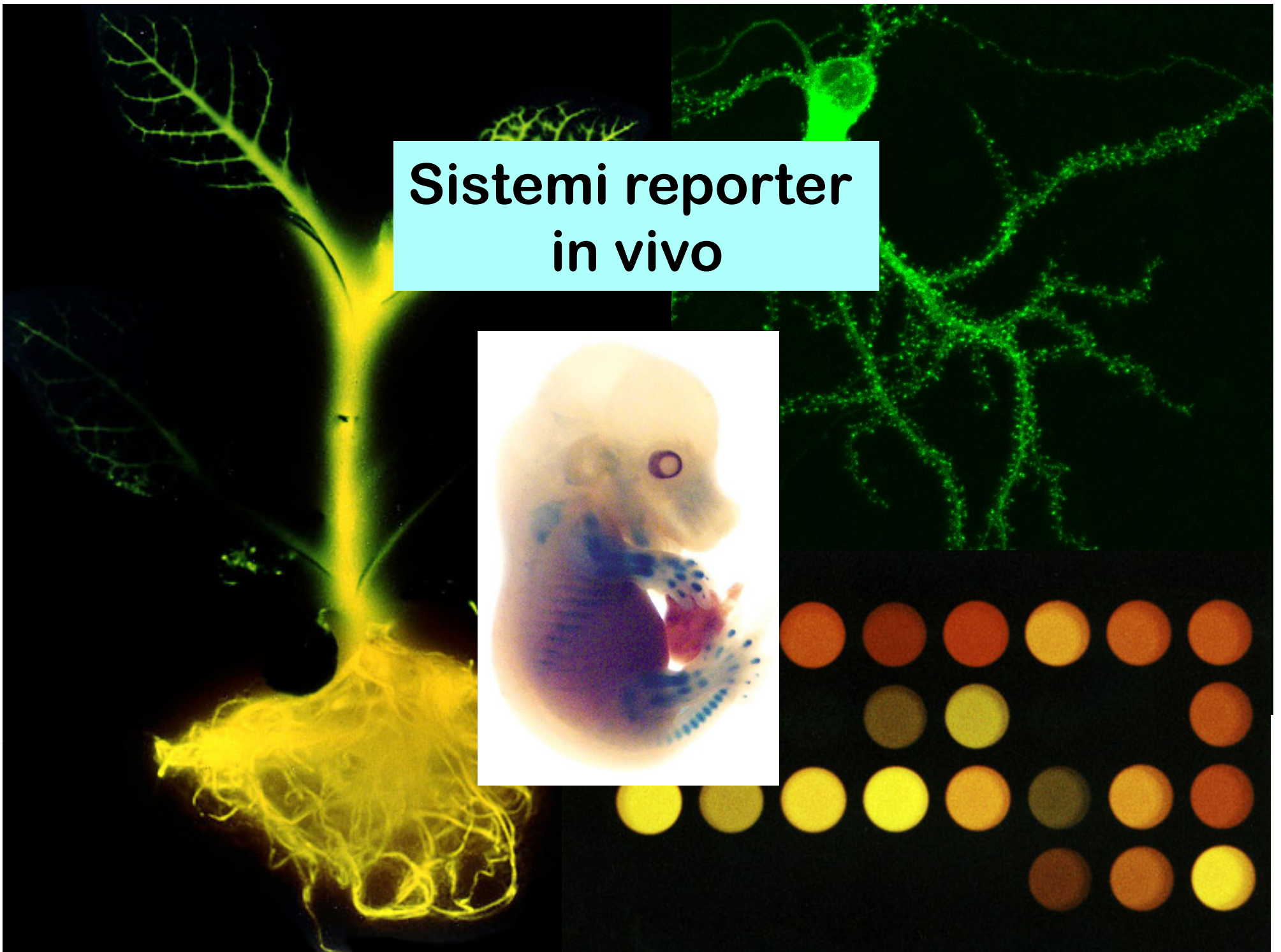
Regolazione epigenetica dell'espressione genica: ruolo dei cofattori



Analisi delle modificazioni degli istoni mediante ChIP



Sistemi reporter in vivo



Geni reporter

Identificazione dell'**espressione ectopica** mediante:

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

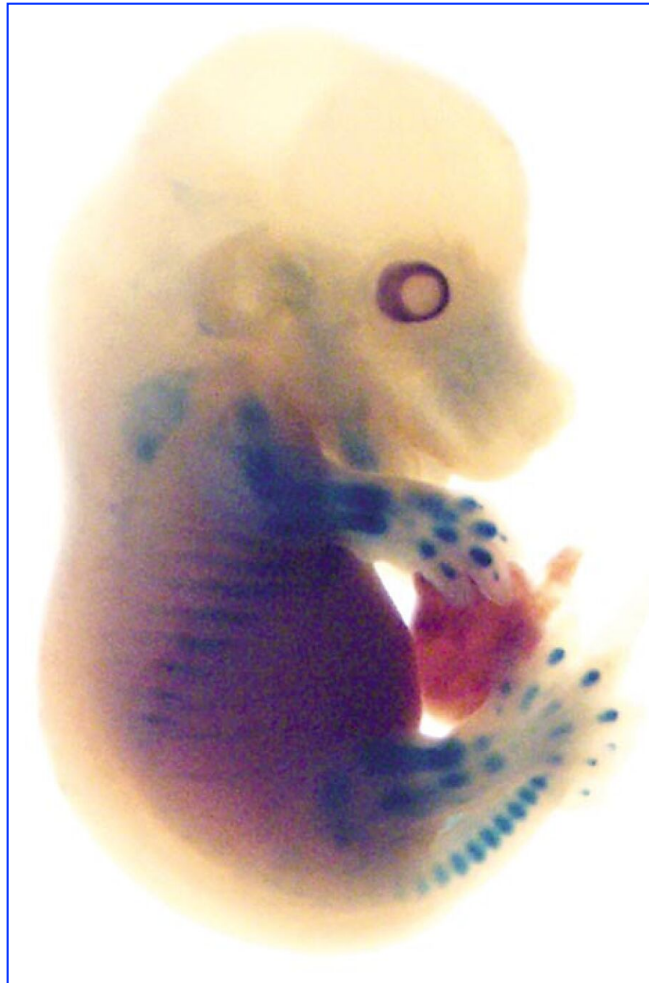
I geni reporter possono visualizzare l'attività di un **promotore**:

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

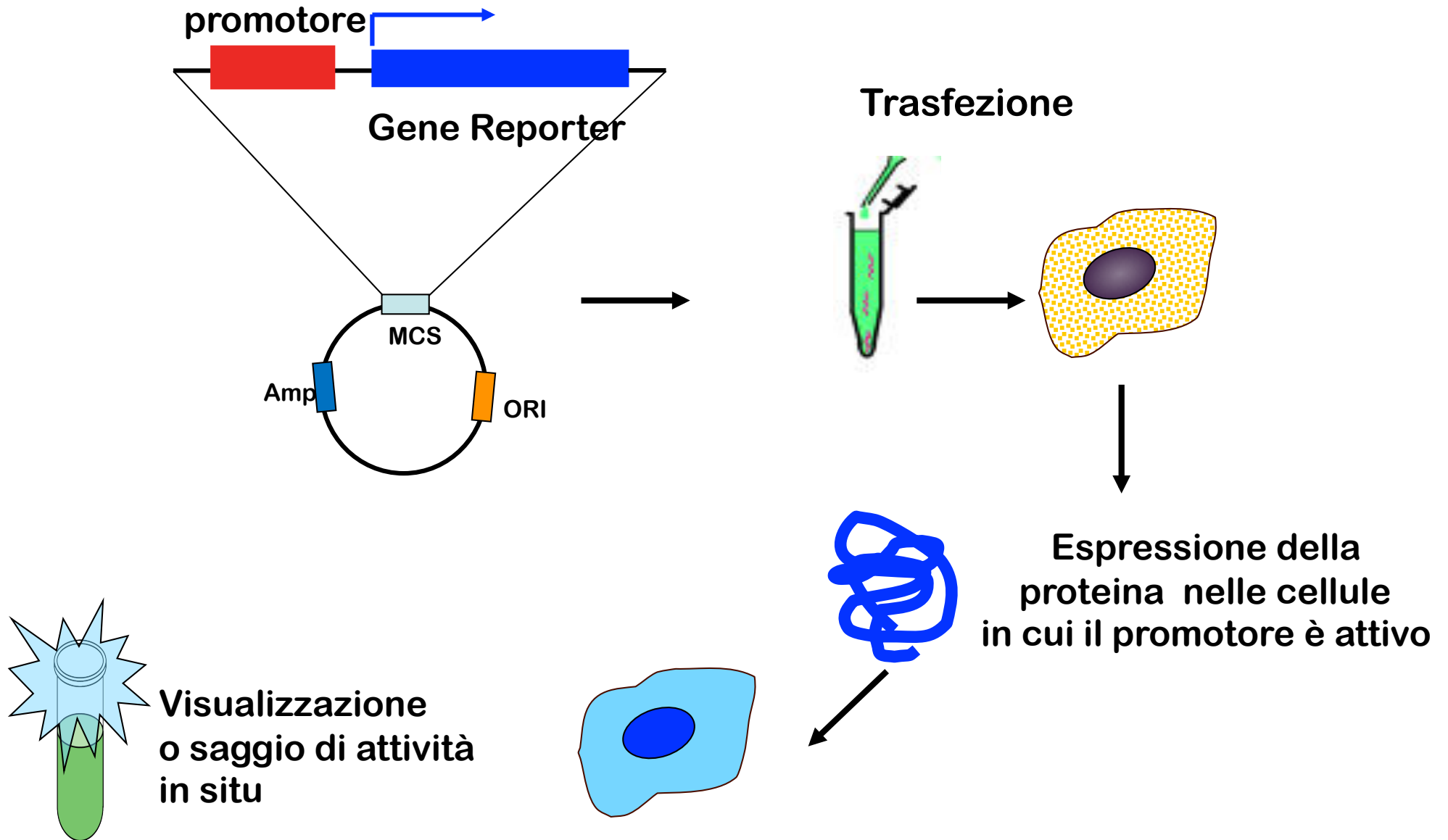
Analisi dell'espressione genica in vivo

PROBLEMA:

DOVE/QUANDO (in quale tessuto- stadio dello sviluppo) è
ATTIVO il GENE di interesse?



**Soluzione: gene reporter rilevabile in situ
clonato a valle di un promotore REGOLATO**



β -galattosidasi batterica

Il gene **batterico lacZ** codifica per l'enzima **β -galattosidasi batterica** la cui attività è misurabile mediante diversi saggi.

NB: optimum pH=7.5: distinguibile dall'attività dell'enzima eucariotico

Si usano **substrati artificiali** che danno **prodotti di idrolisi** facilmente identificabili.

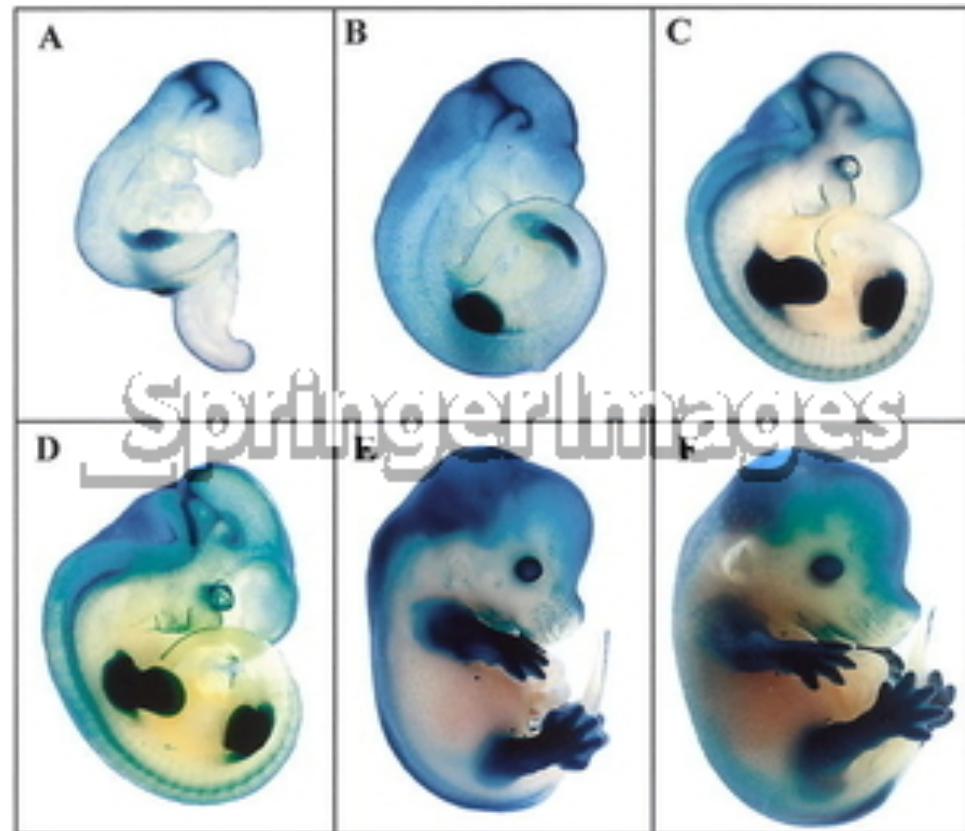
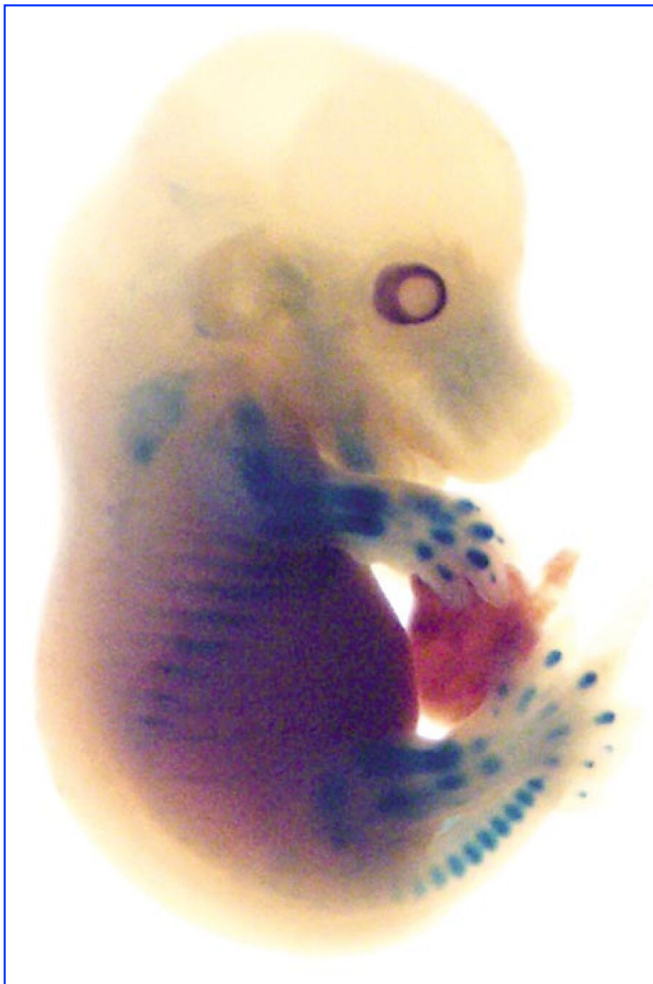
per saggi in situ su tessuti fissati: (qualitativi)

uso del substrato **X-gal** (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galattopiranoside)
quando viene idrolizzato forma un **precipitato insolubile di colore blu**

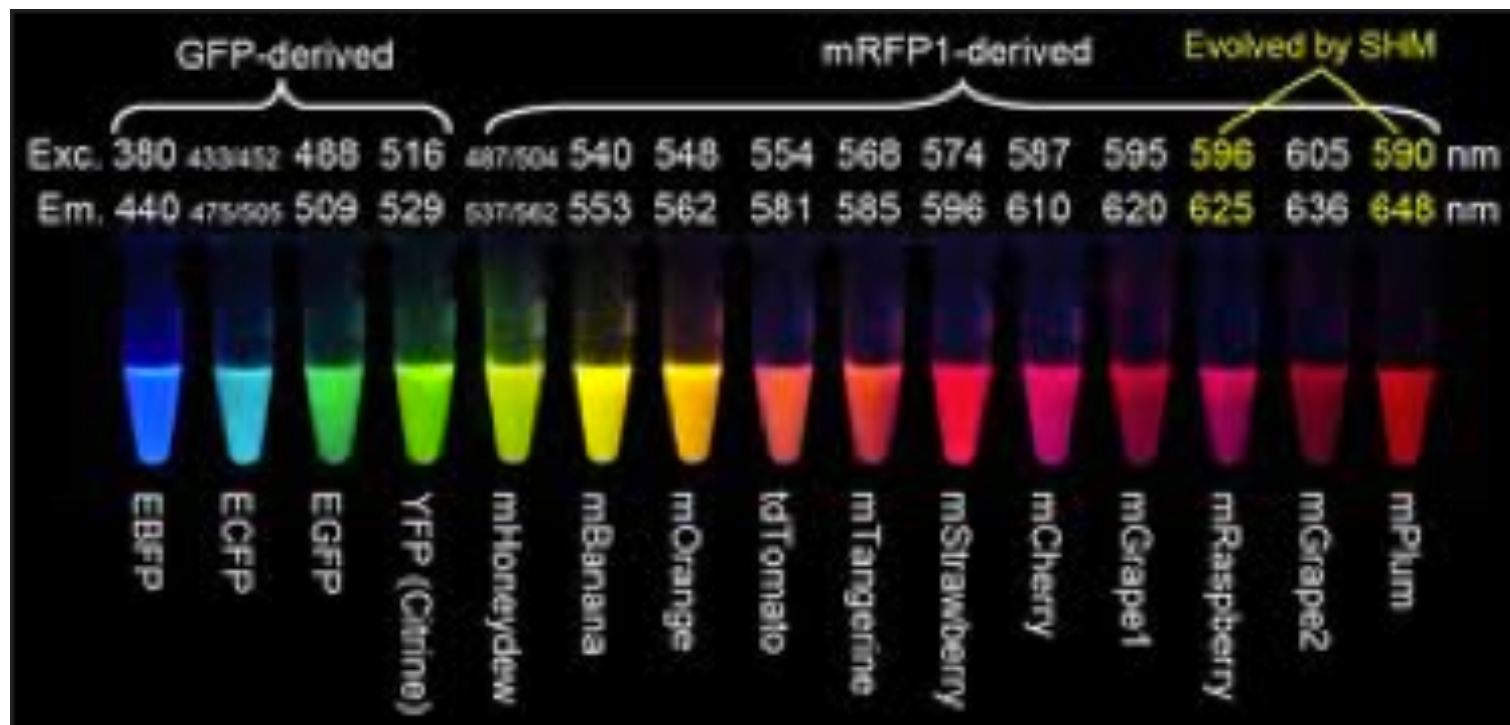
per saggi quantitativi (da lisato cellulare):

uso del substrato incolore **ONPG** (o-nitrophenol- β -D-galattopiranoside)
quando viene idrolizzato forma un **composto solubile color giallo**
(lettura SF a 400 nm)

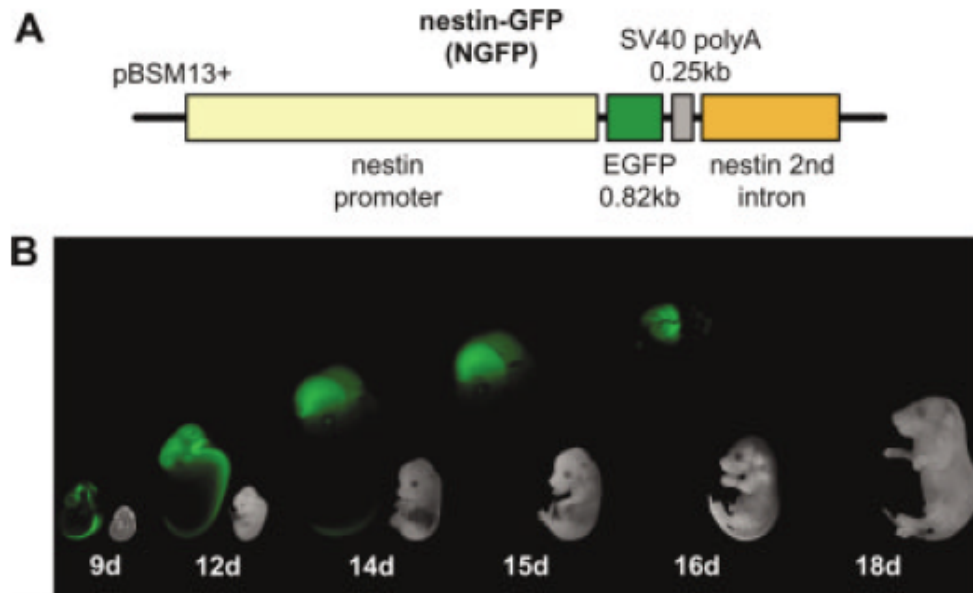
Animali transgenici (Knock-in in eterozigosi) in cui il gene lacZ è posto a valle del promotore di un gene di interesse: le cellule che esprimono tale gene sono positive al saggio con X-gal



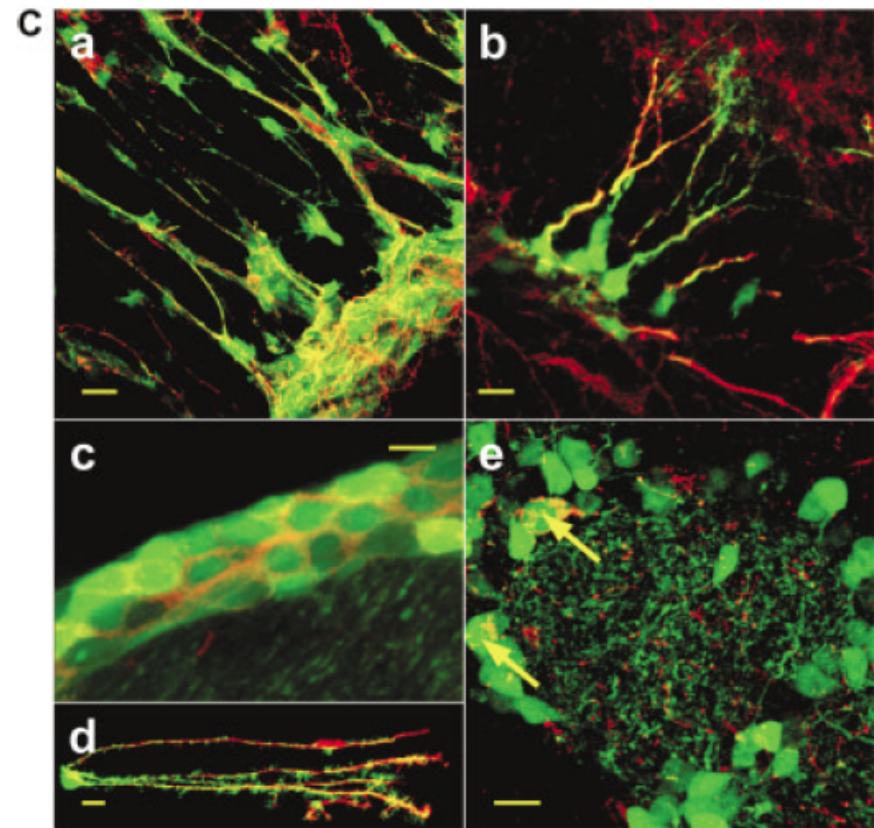
**Utilizzo di reporters fluorescenti (fotoproteine)
per la visualizzazione diretta in situ
mediante tecniche di imaging**



Topo KI per EGFP a valle del promotore della nestina (neurofilamento) in eterozigosi: visualizzazione per “whole mount”, microscopia intravitale e su sezioni



Whole mount di embrioni:
segue l'espressione del gene
durante lo sviluppo



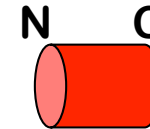
nestin/GFP

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

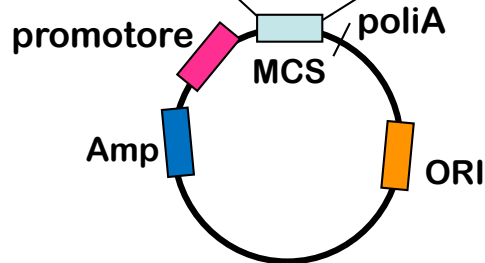
Gene X



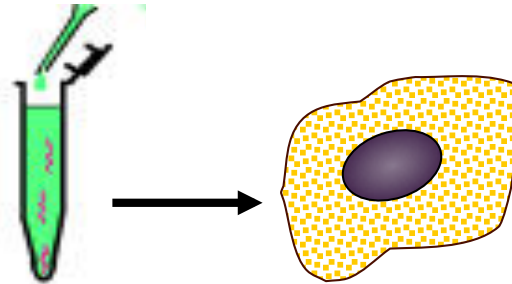
Codifica per la proteina di interesse X



Gene X Reporter - fluo

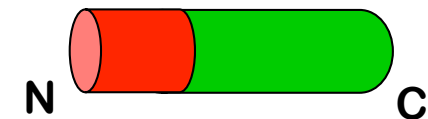


Trasfezione



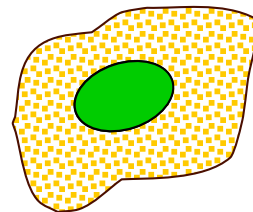
Trascrizione e traduzione:

espressione della proteina di fusione nelle cellule



La proteina X assume la sua tipica localizzazione intracellulare

Visualizzazione in situ

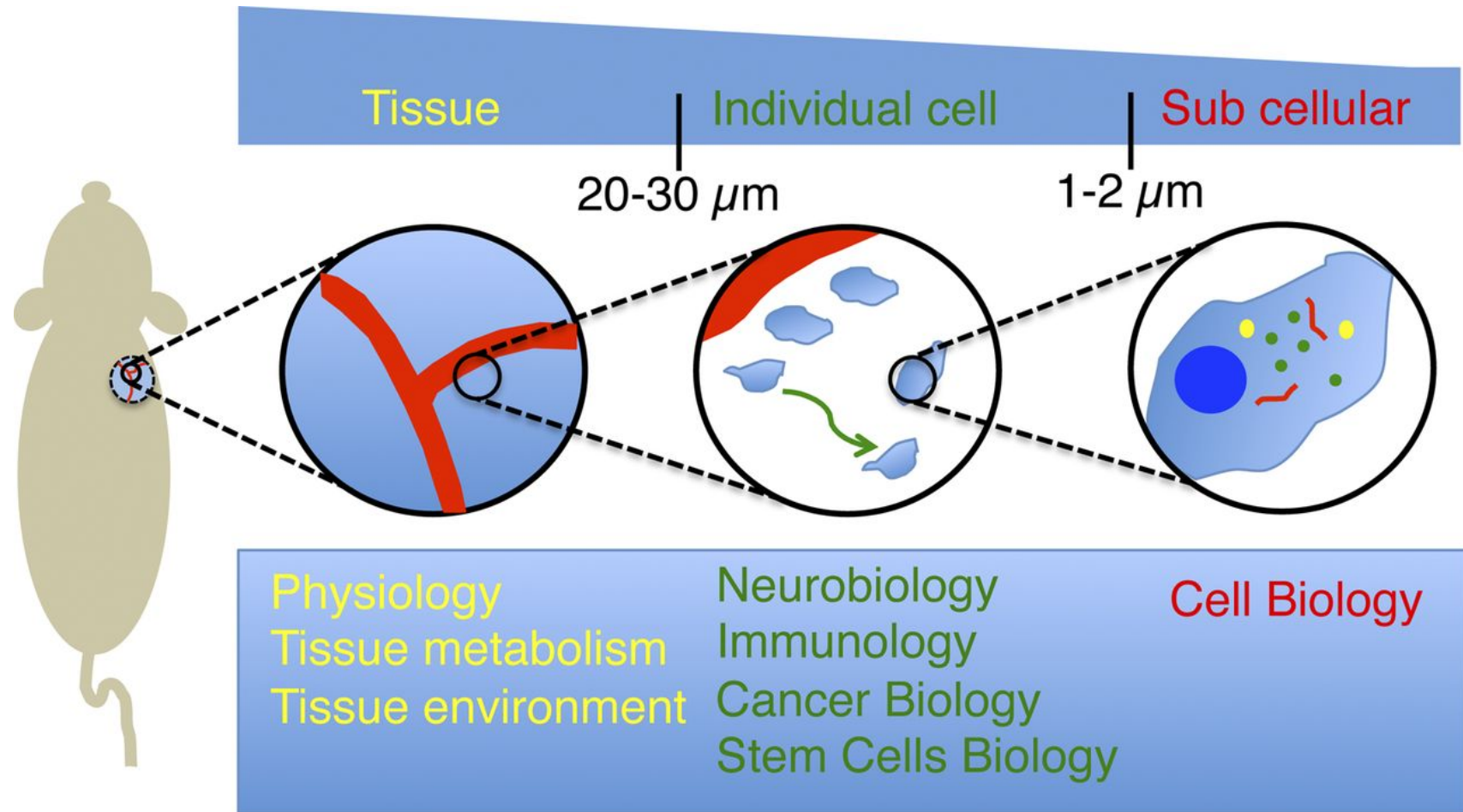


Osservazione al microscopio a fluorescenza

Ex: 475 nm
Em: 525 nm

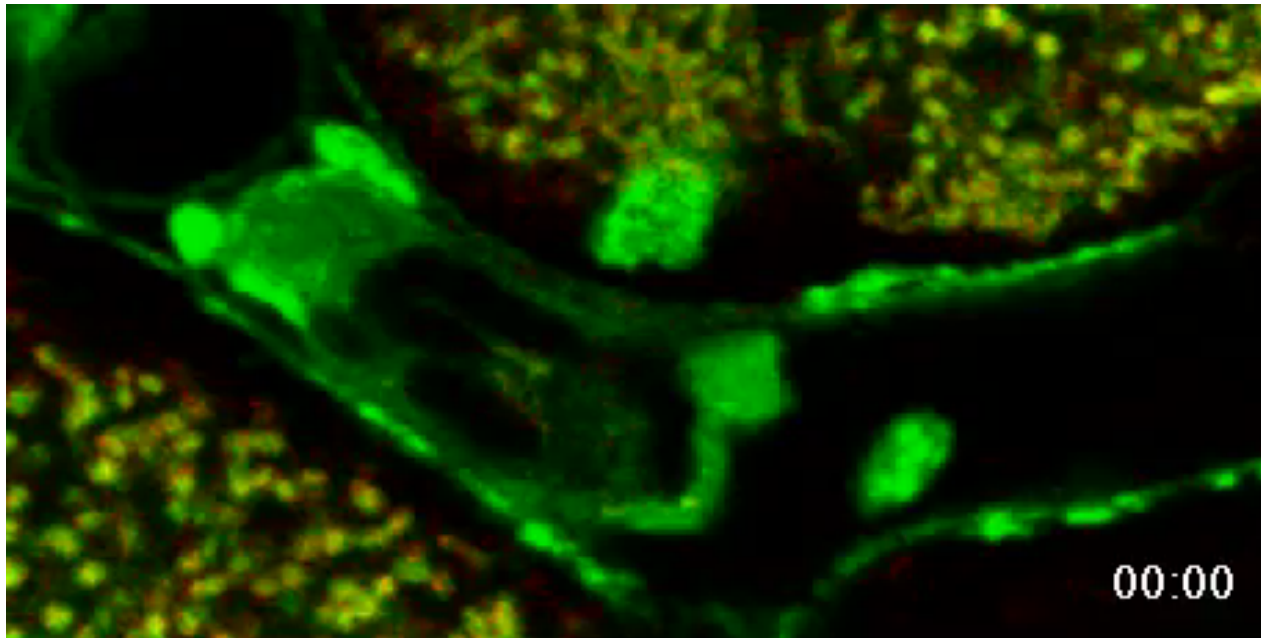
**Imaging in vivo mediante reporter:
permette l'analisi realtime non invasiva
di processi fisiologici e patologici**

Imaging in vivo mediante microscopia a fluorescenza intravitale



Roberto Weigert et al. J Cell Biol 2013;201:969-979

Imaging in vivo mediante microscopia a fluorescenza intravitale

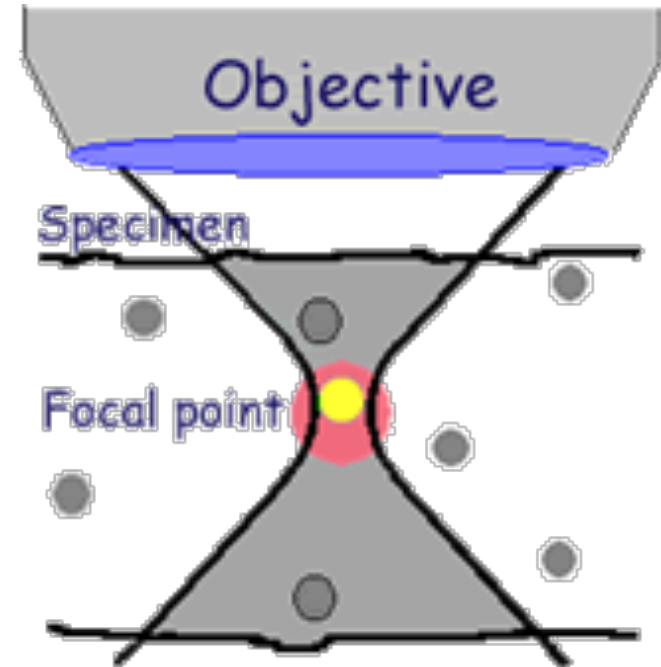
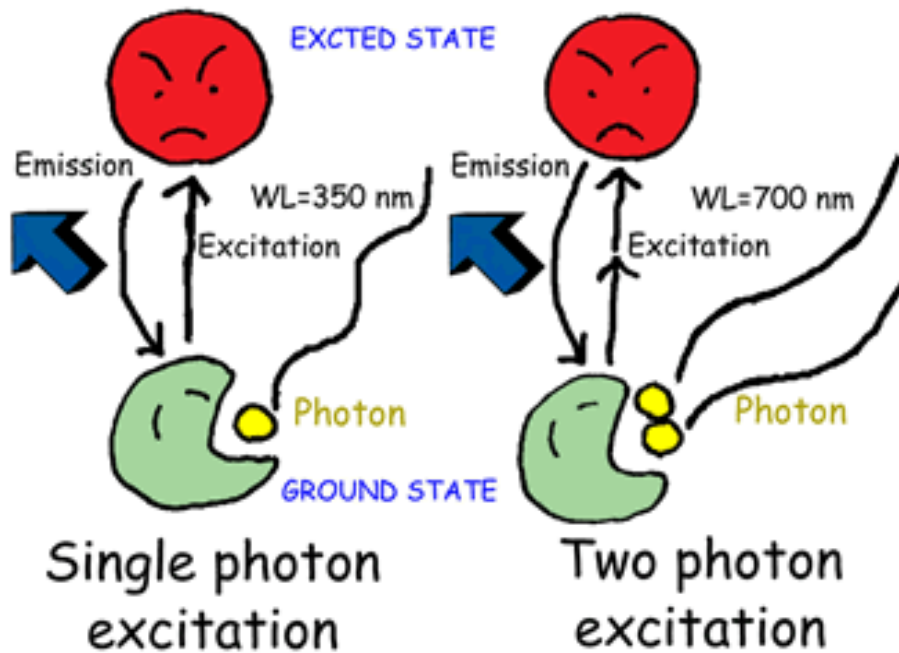


A **granulocyte** moving inside a blood vessel in the mammary gland of a mouse expressing **GFP-tagged myosin IIb (green)** and labeled with MitoTracker (red).

Time lapse was acquired by confocal microscopy.

Excitation wavelengths: 488 nm and 561 nm. Bar, 10 μm .

2-photon excitation microscopy



For each excitation, 2 photons are absorbed.
Excitation wavelength (Infrared) of 2 exciting photons is longer than emitted light

The use of Infrared or near-infrared light ensures high penetrability into the LIVING BODY