

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2019-2020

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 11

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

Struttura dei geni di mammifero

Promotore/enhancer

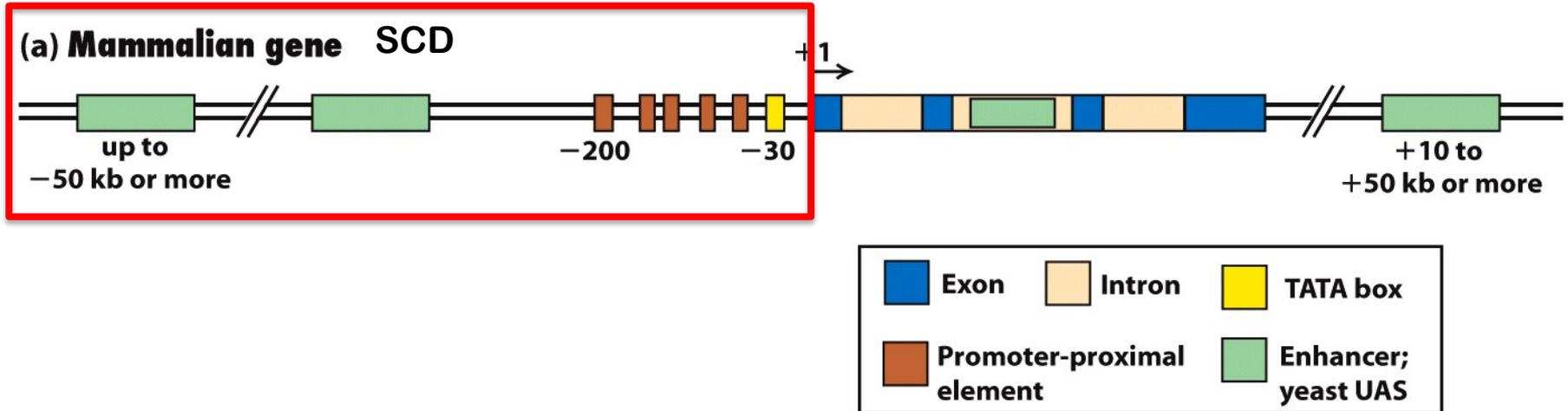
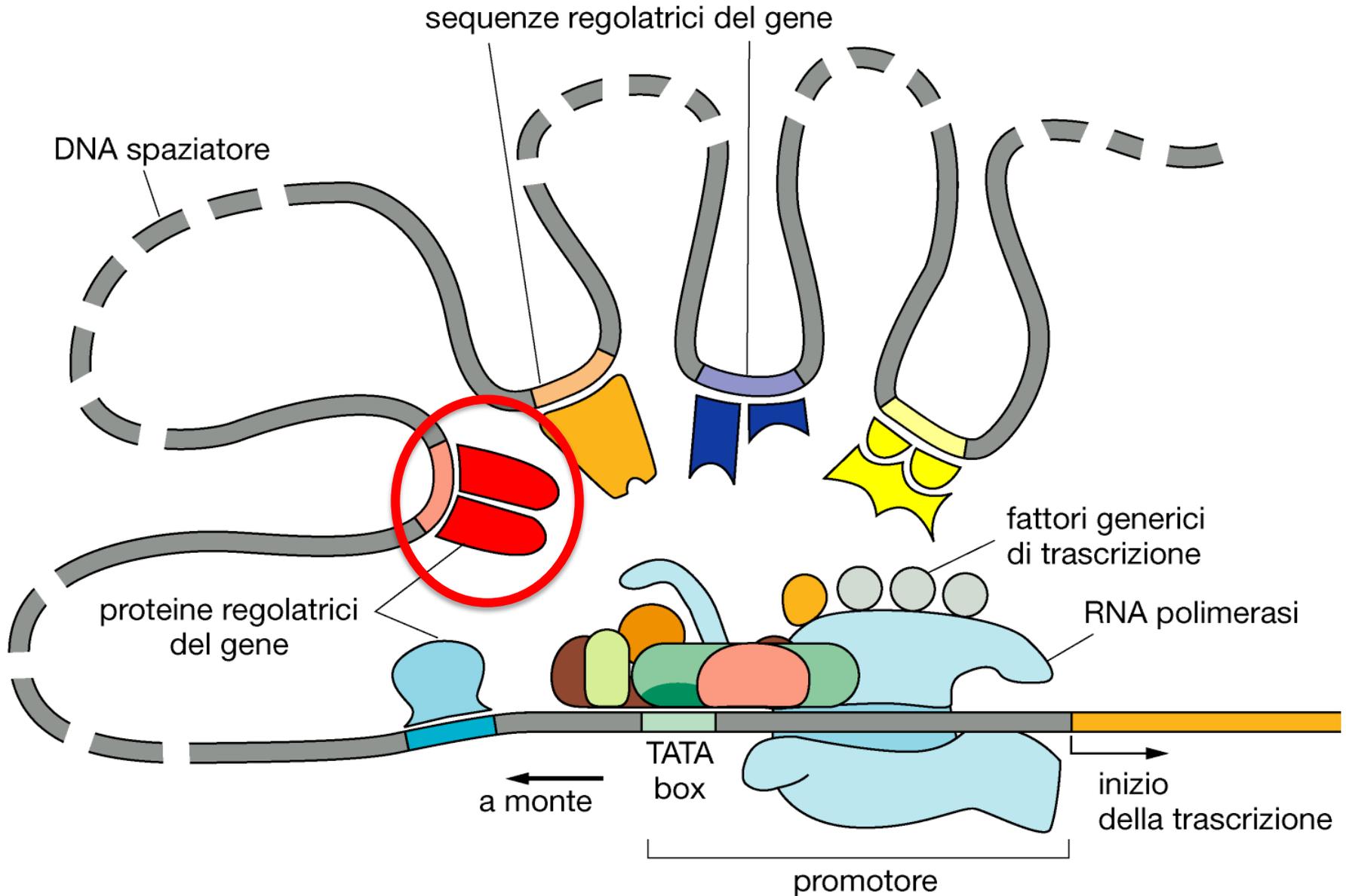
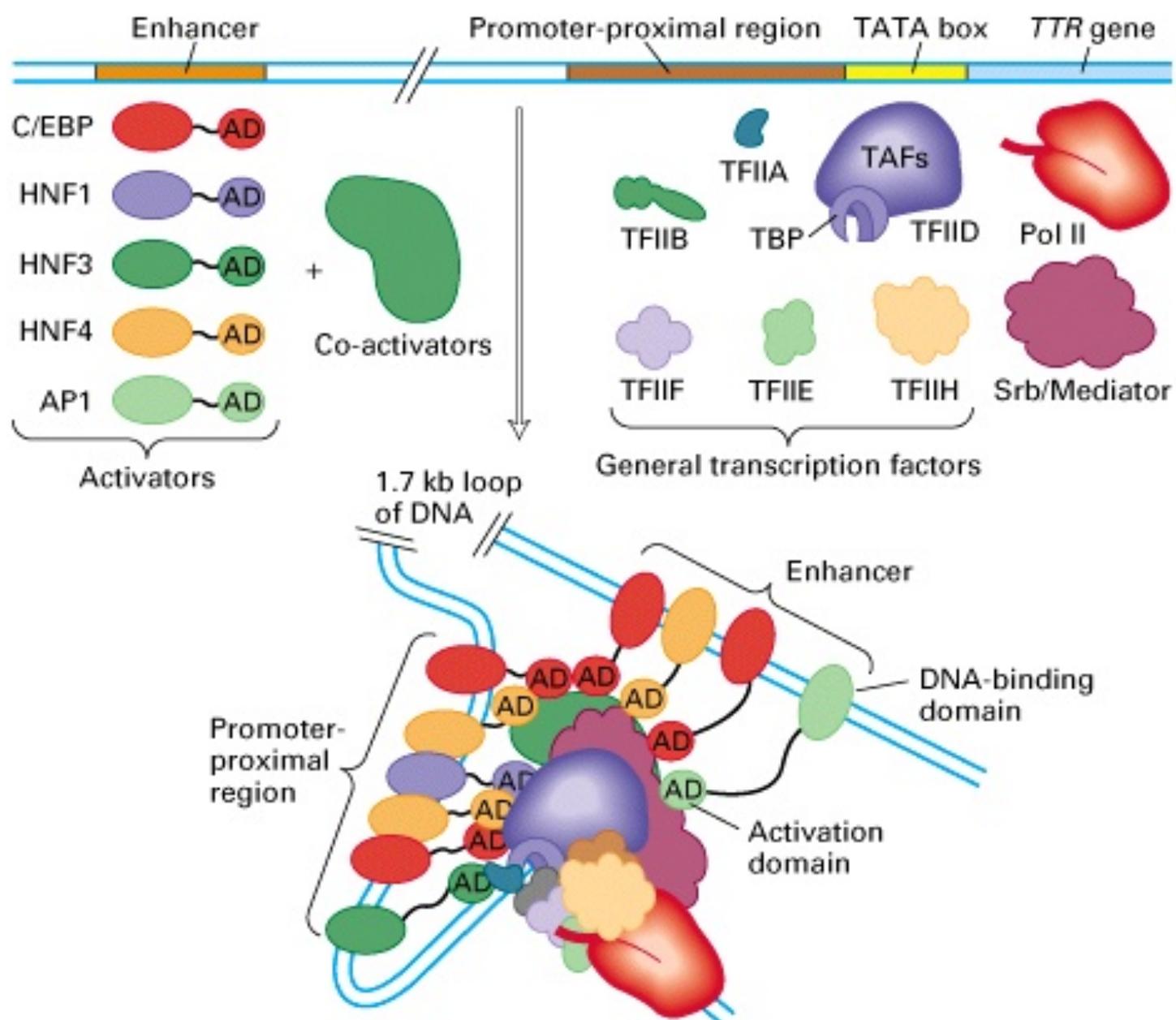


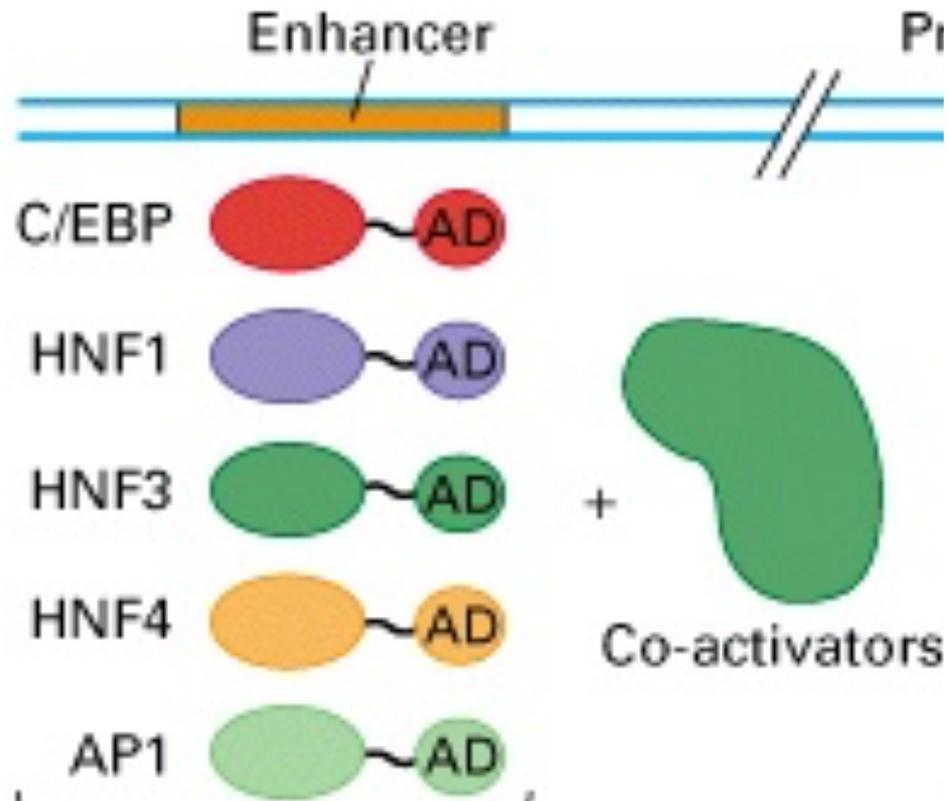
Figure 7-16
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Regolazione dell'inizio della trascrizione



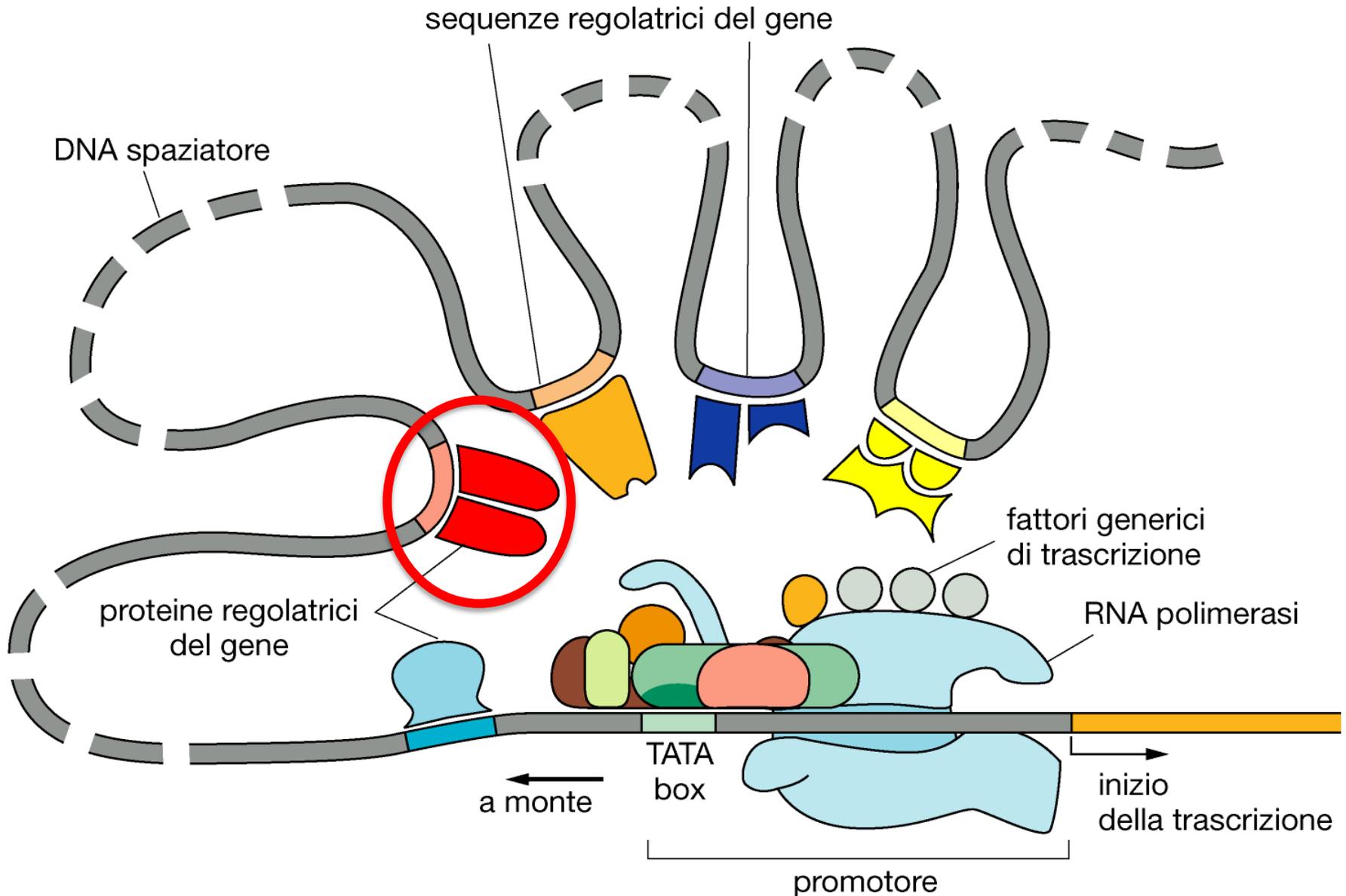


Fattori di trascrizione: proteine a struttura modulare

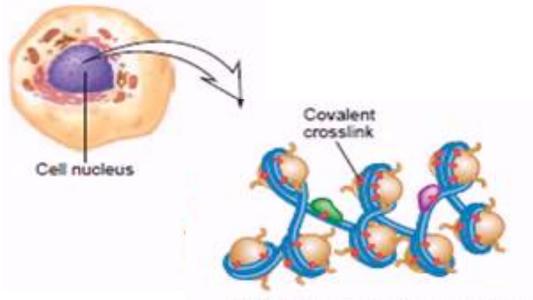


- dominio di *legame al DNA* (sequenza-specifico)
- dominio *transattivante / di repressione*
- *altri* domini (e.g. interazione proteina-proteina, interazione con ligandi, regolazione, etc.)

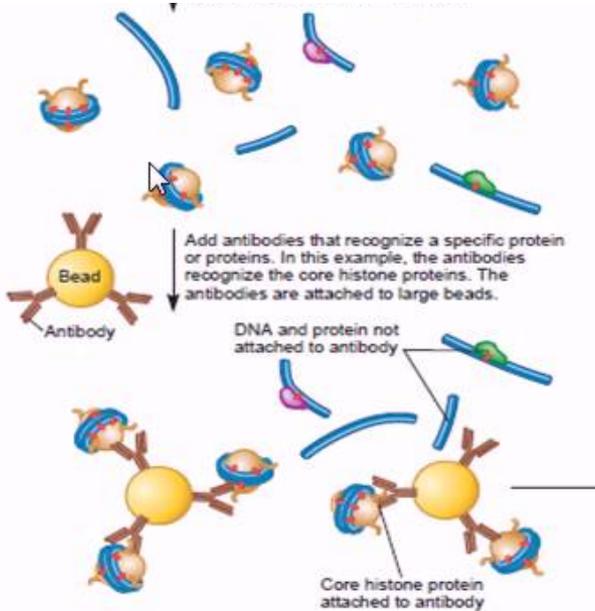
Analisi dell'interazione di proteine con specifici siti della cromatina: immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)



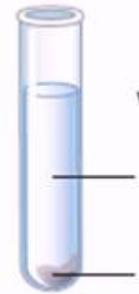
1



2

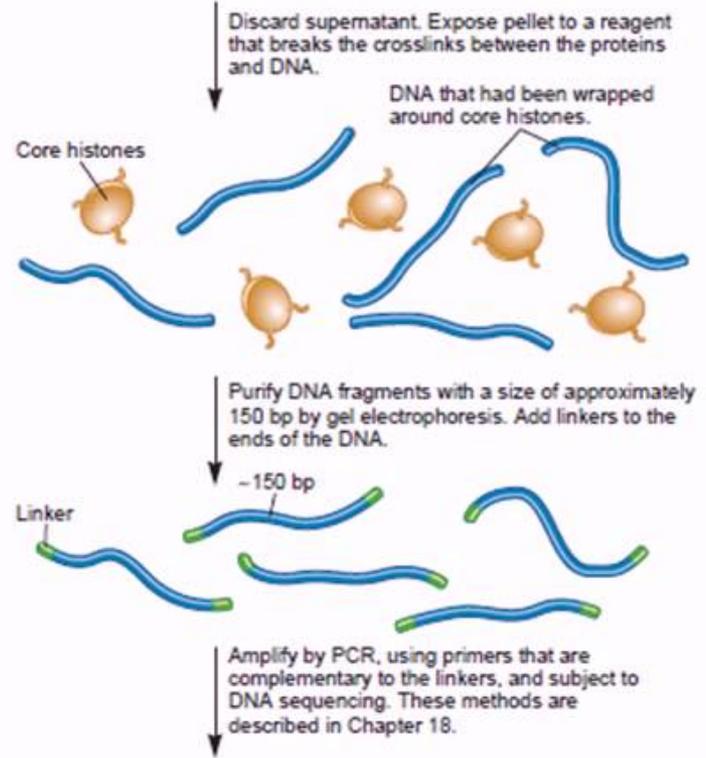


3



Centrifuge at a speed that causes the beads and anything attached to the beads to form a pellet at the bottom of the tube. DNA and proteins not attached to the beads remain in the supernatant.

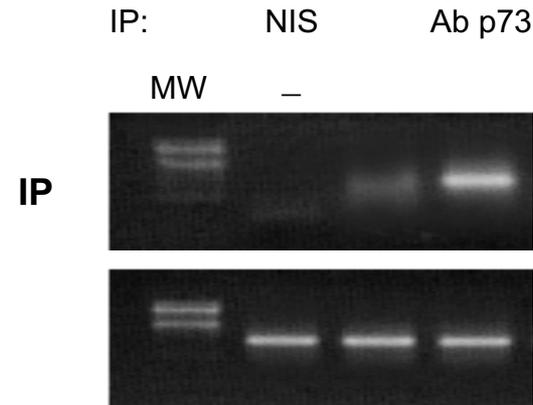
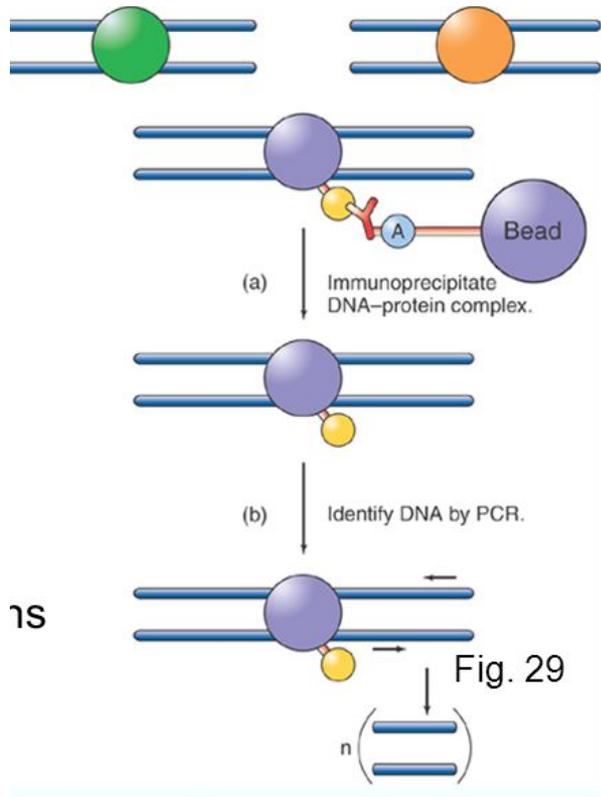
4



Quantificazione della cromatina legata dal fattore immunoprecipitato

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

} Sequenza nota: mi chiedo **QUANTO** si lega



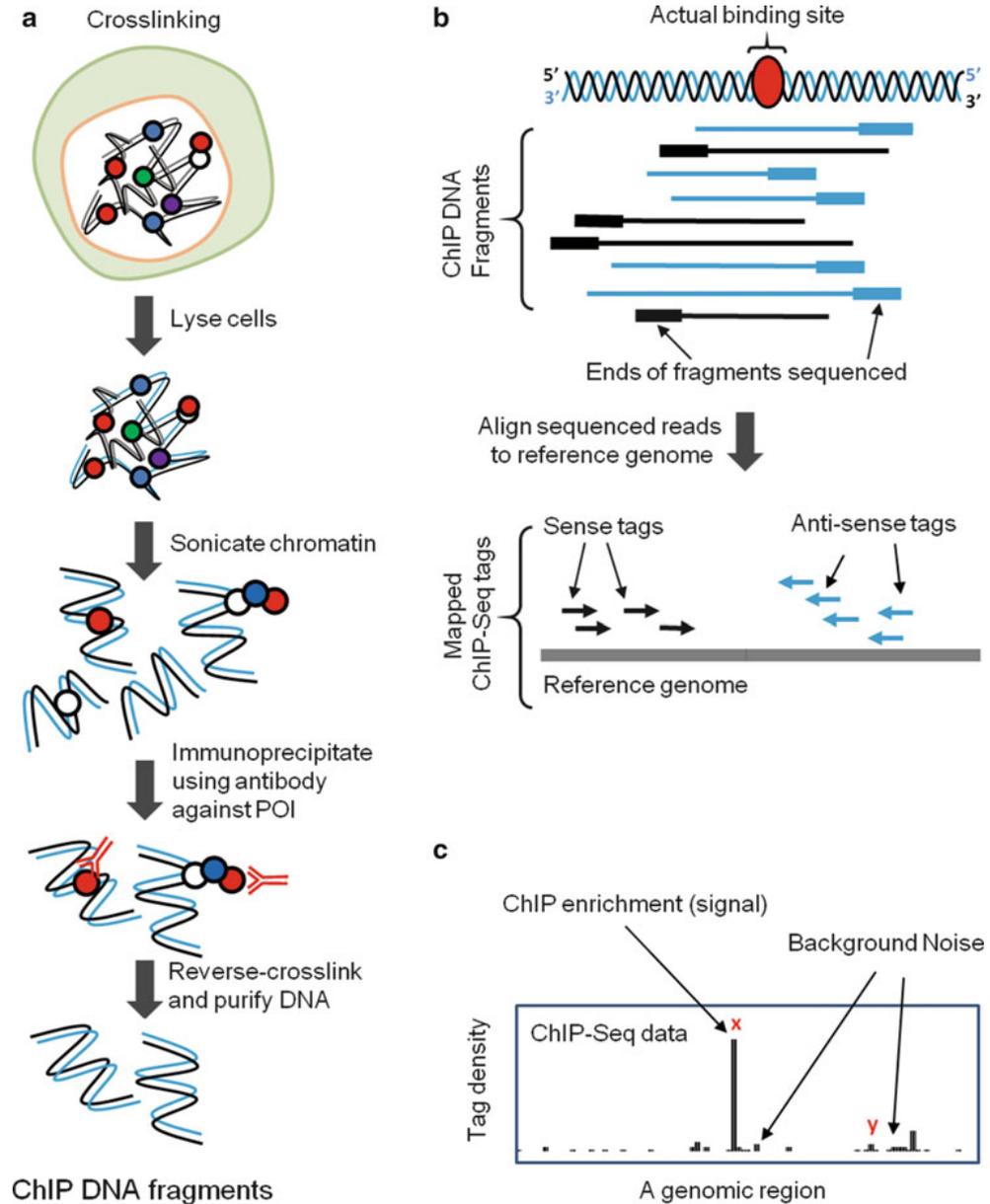
1S

Fig. 29

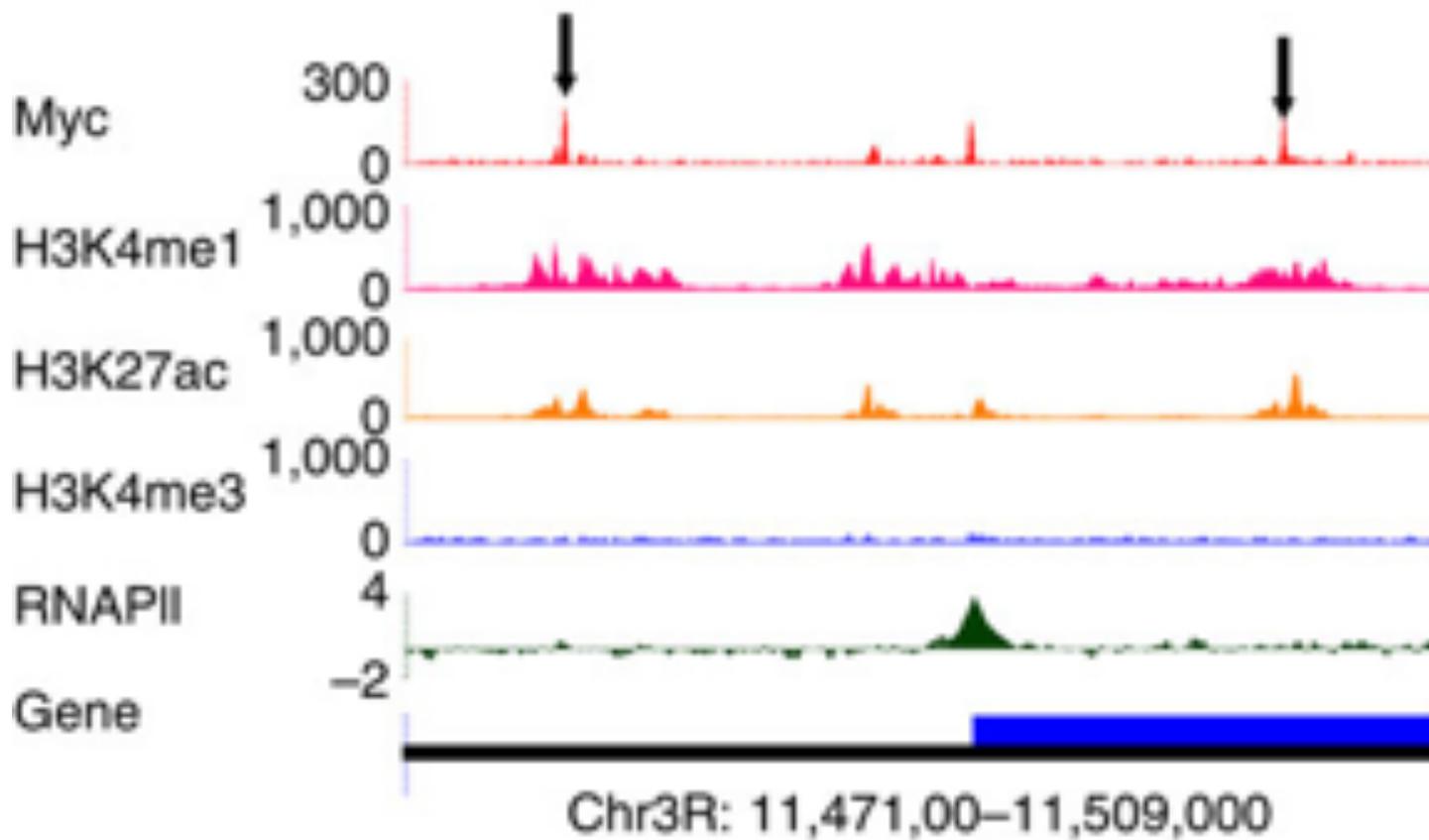
ChIP-seq: analisi dei siti di legame di una proteina nel genoma

3) sequenziamento

Le sequenze di legame
NON sono note:
mi chiedo **a quale**
regione si lega



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



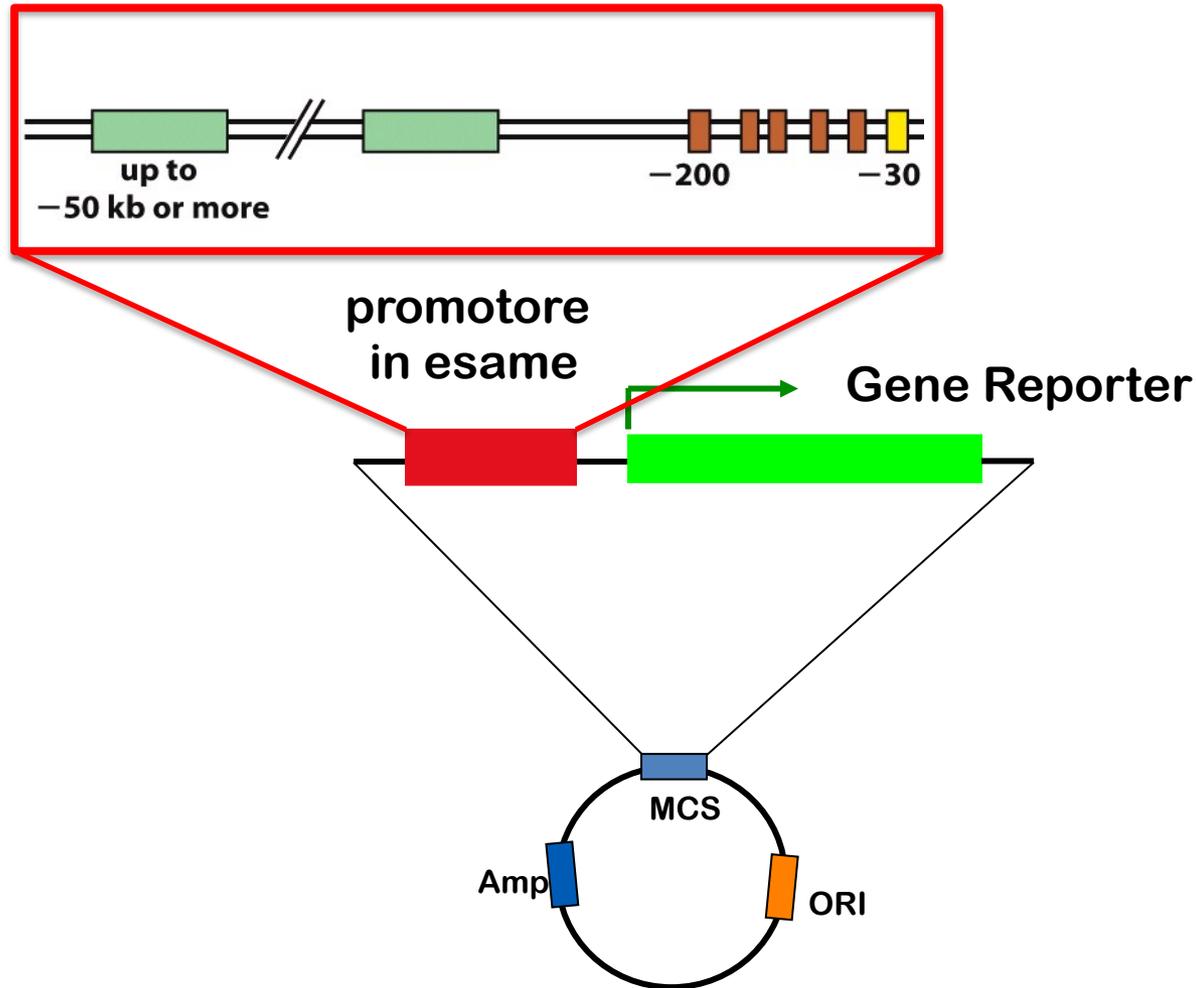
Analisi della capacità di un TF di regolare un promotore mediante saggi reporter

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, la cui espressione sia misurabile.**

Quanto più attivo sarà il promotore, tanto maggiore la produzione della proteina codificata dal gene reporter .

L'espressione/attività del reporter è **proporzionale all'attività 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/attività sia
MISURABILE quantitativamente**

Enzimi reporter:

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

Reporter codificanti per **enzimi**

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

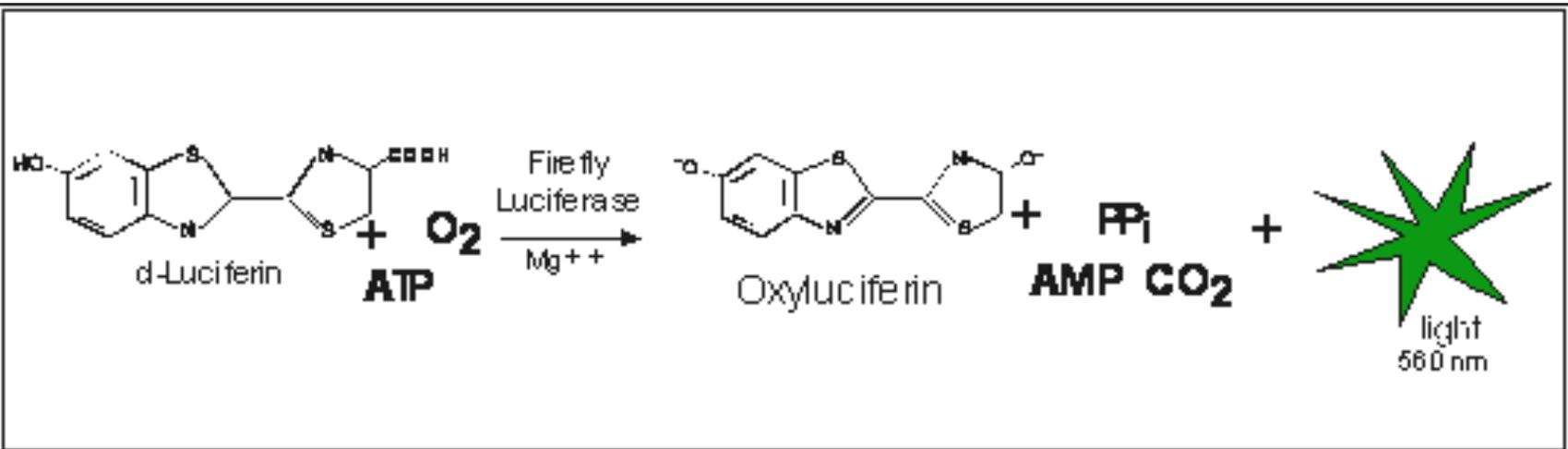
- I saggi di attività enzimatica devono essere **sensibili** e possibilmente **rapidi**
- L'attività deve essere facilmente e univocamente **distinguibile** da altre attività analoghe presenti nelle cellule prima della trasfezione

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

Reazione:

catalizza l'ossidazione ATP-dipendente 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:

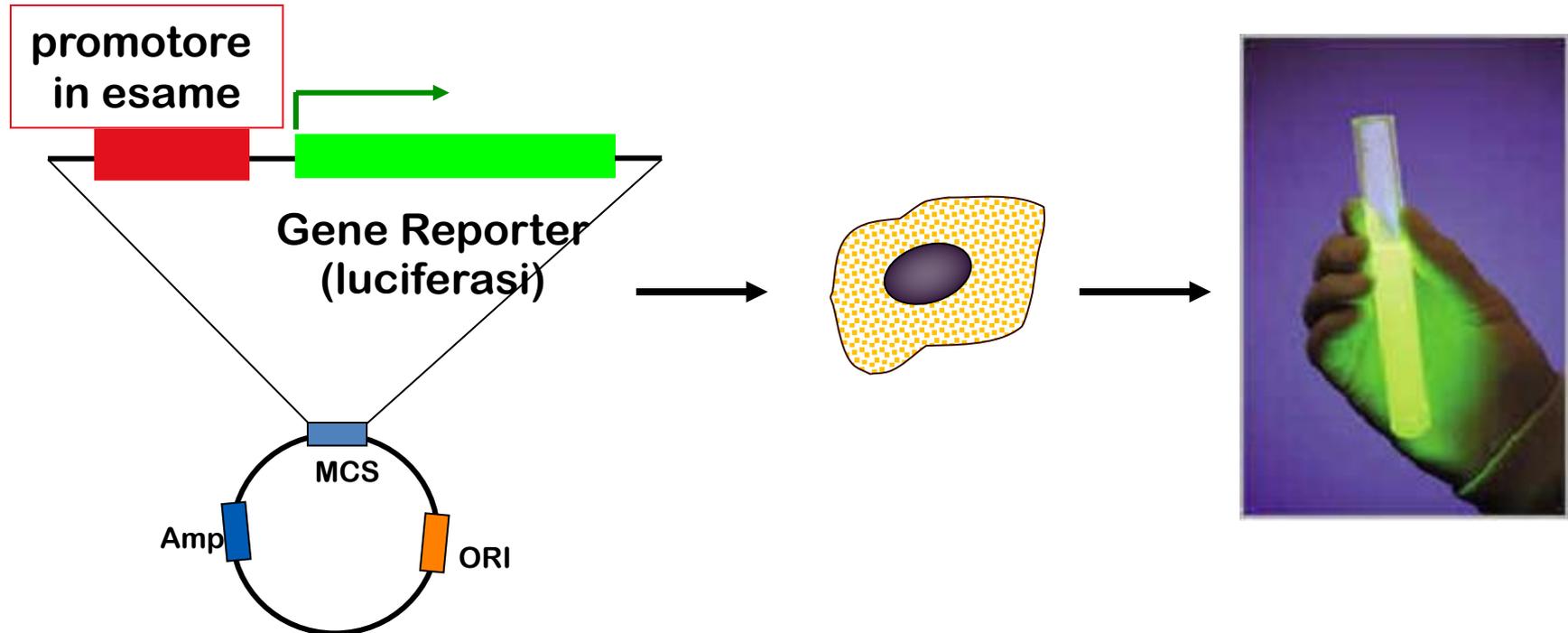
sistema rapido, sensibile con ampio range di linearità.

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 avrà 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

Domanda:

**Studio del ruolo di un fattore di trascrizione TF
nell'induzione di un promotore bersaglio**

.... il **plasmide reporter** costruito prima viene **co-trasfettato** con un **vettore di espressione** per il fattore di trascrizione TF

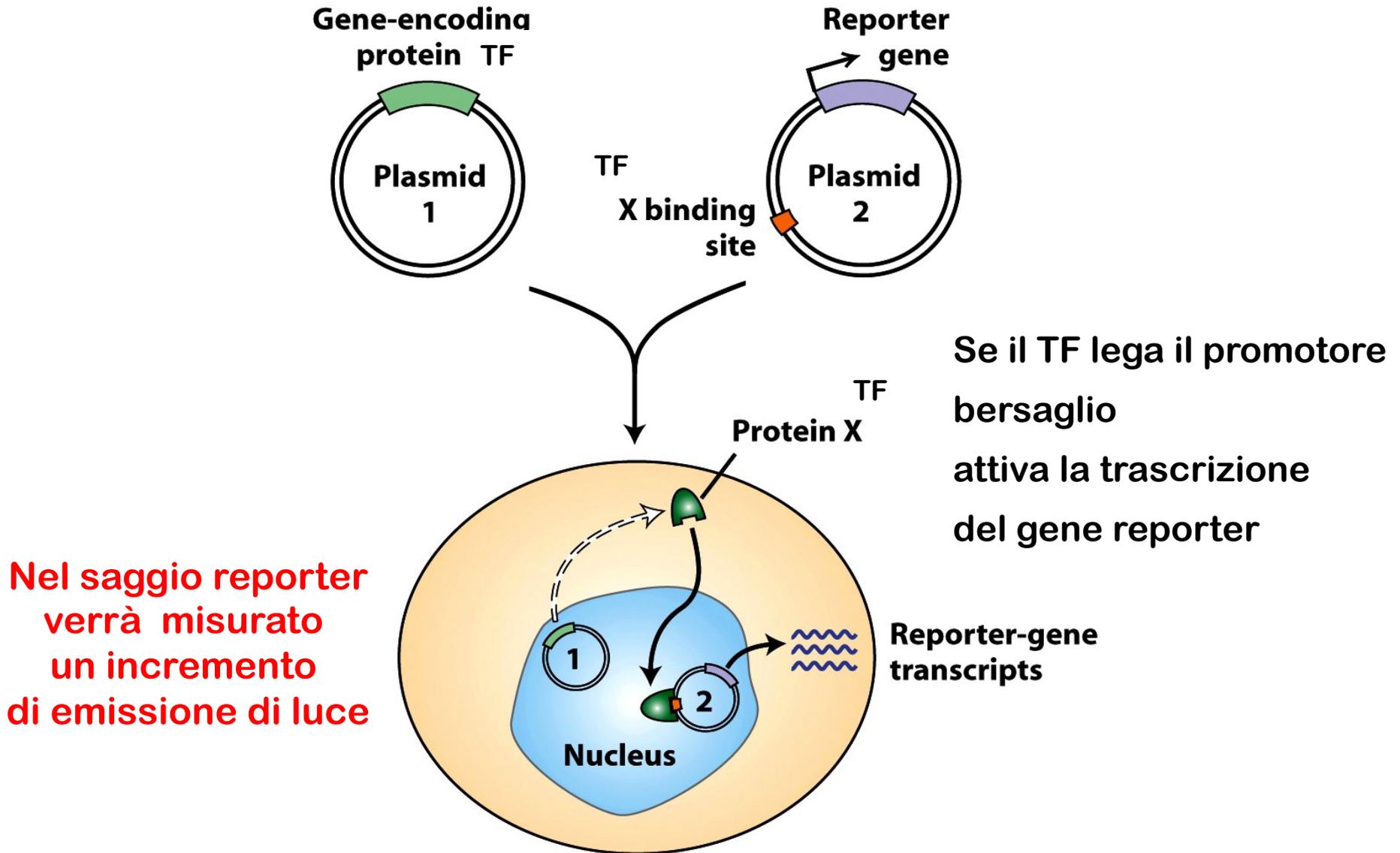
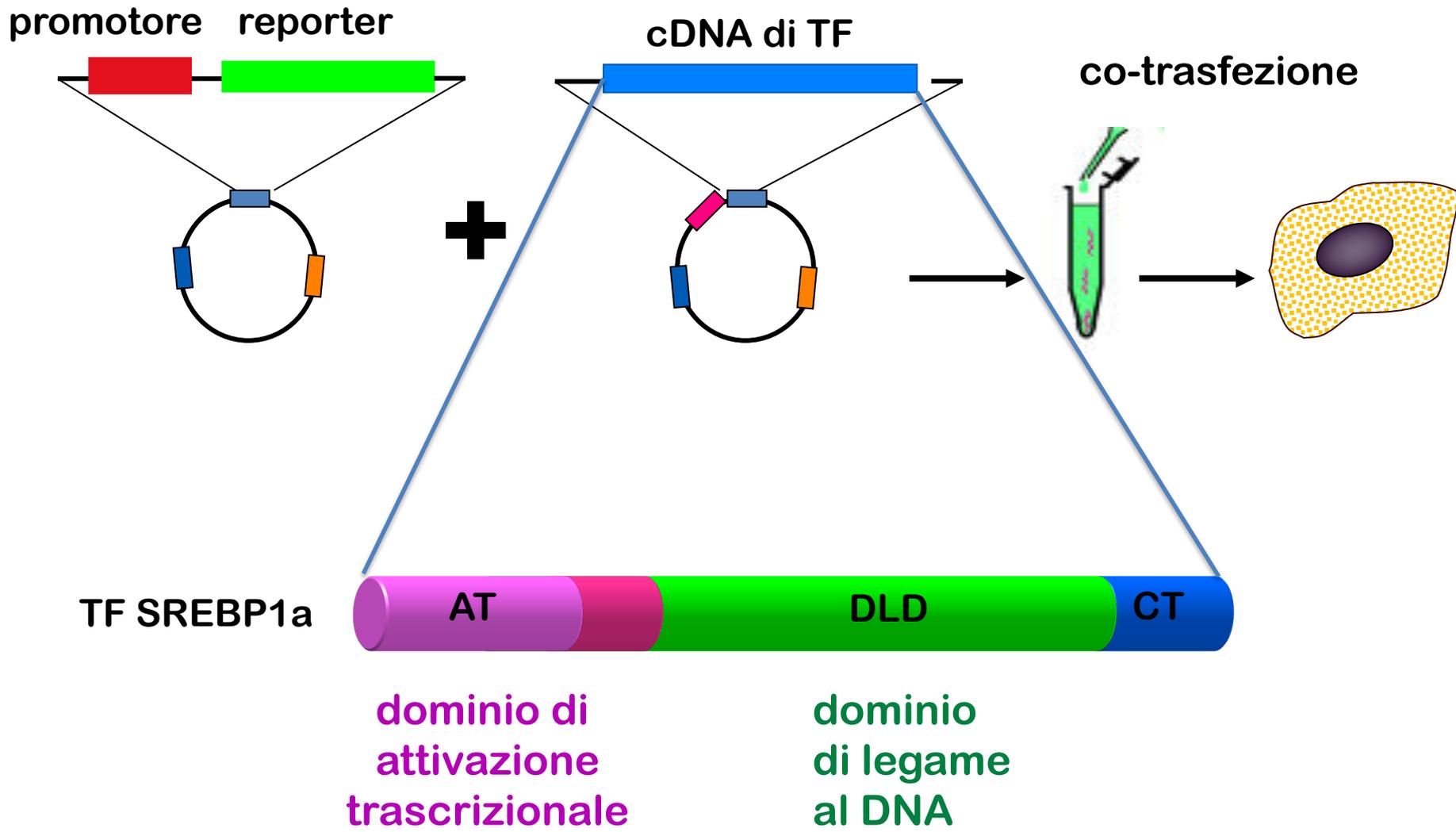
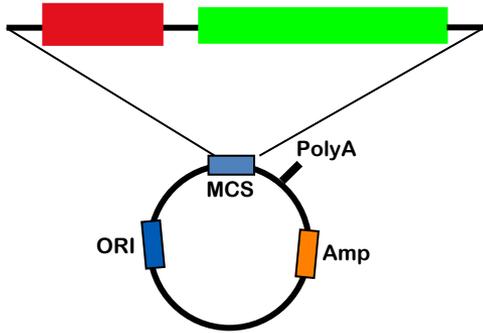


Figure 7-20
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company



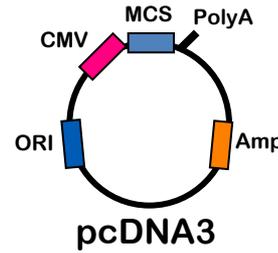
Strategia:

reporter
promotore luciferasi



pPROM-luc

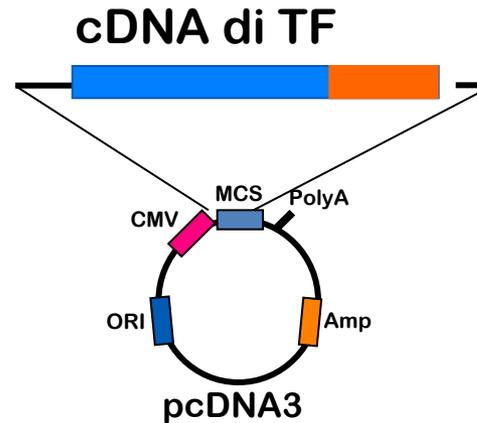
+



Attività BASALE
del promotore

Oppure

+



attivazione
del promotore
Da TF

Domanda:

Ruolo di un coattivatore nell'induzione del promotore bersaglio di un TF

Strategia sperimentale

1- livello BASALE

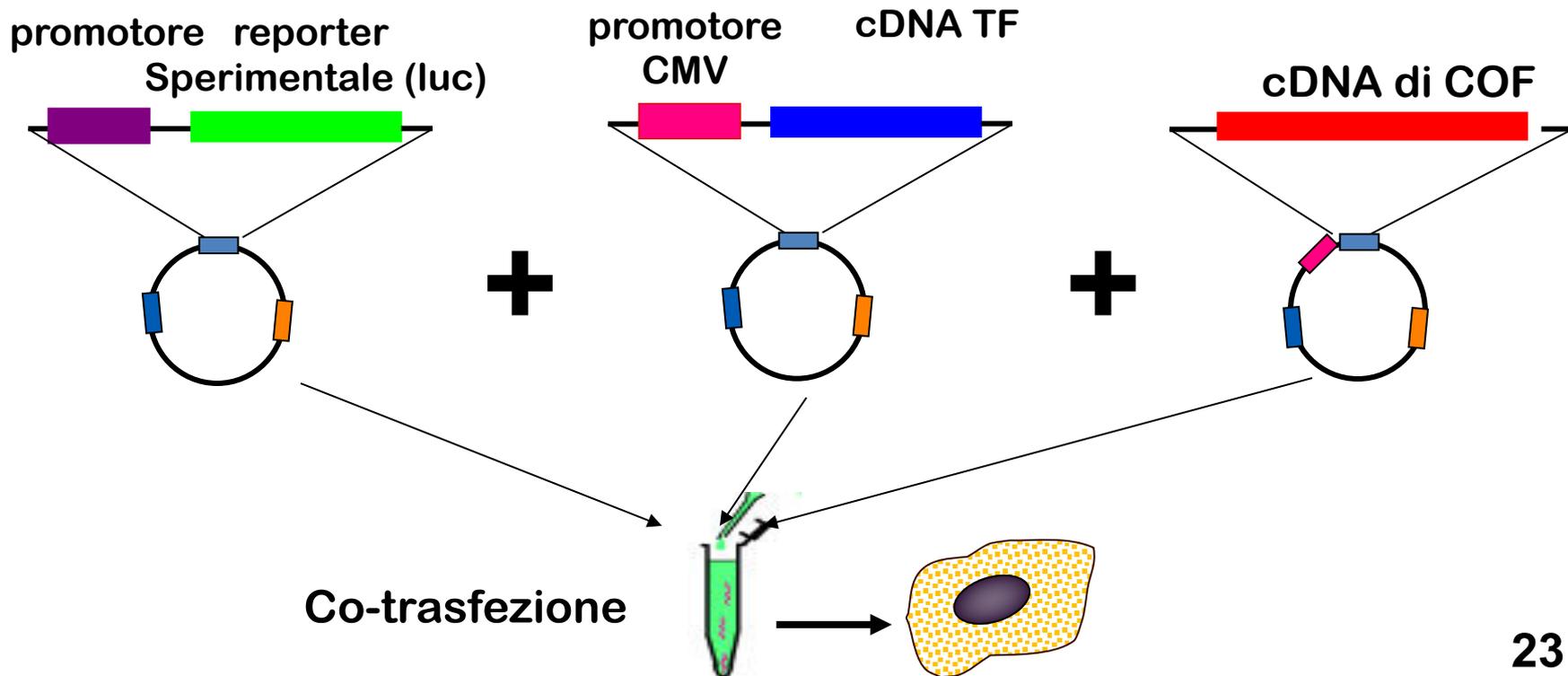
2- effetto di TF

3- contributo di COF

reporter pPROM-luc + vettore vuoto pcDNA3

reporter pPROM-luc + vettore pcDNA3-TF

reporter + pcDNA3-TF+ vettore pcDNA3-COF



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

Name: pcDNA3

Insert: SREBP1a-HA

Original vector:

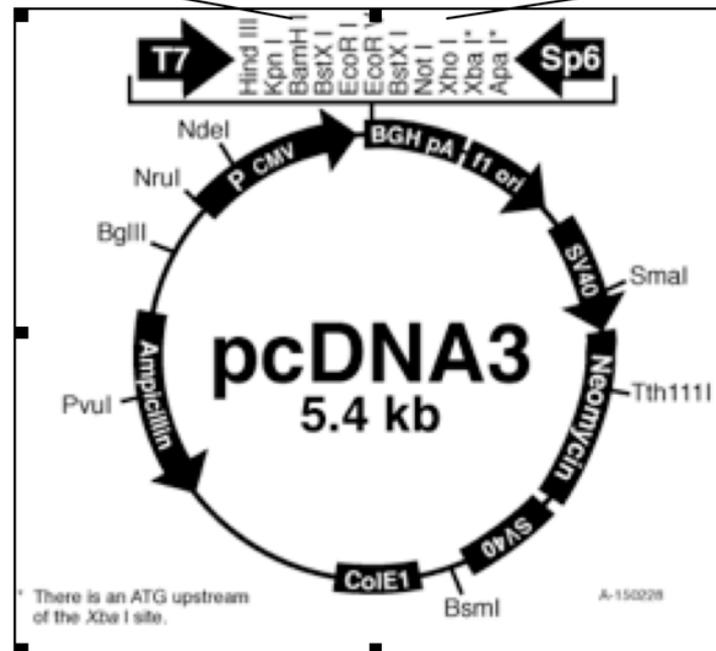
Selection: Amp^R (prokaryotic); Neo^R (eukaryotic)

Ref:

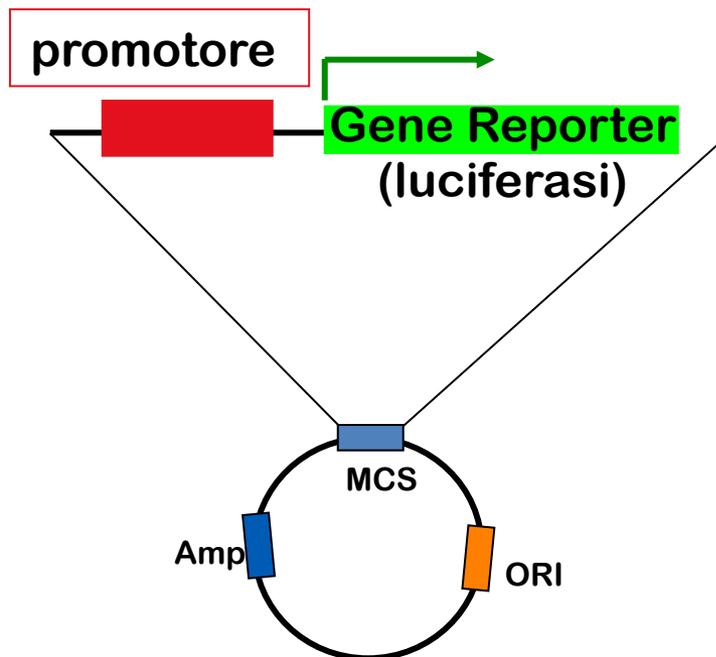
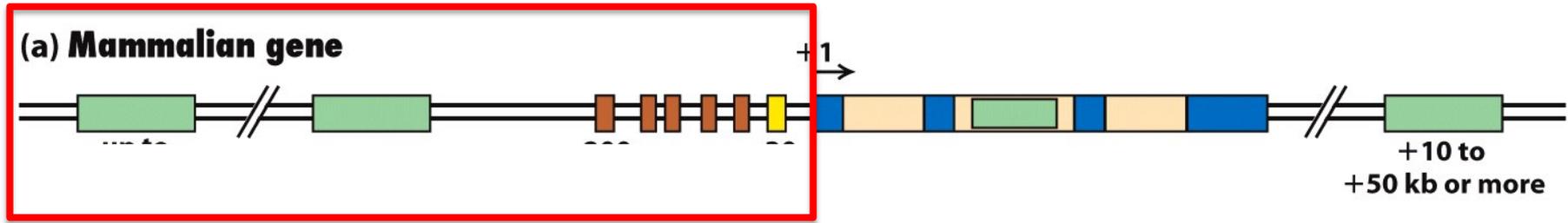
Notes:

BamHI

XhoI



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



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

**Step 4: co-trasfezione del costrutto reporter e dei vettori di
espressione in cellule in coltura**

Step 5: confronto di diversi punti sperimentali

- 1- attività basale costrutto reporter + vettore di espressione vuoto
- 2- effetto di TF costrutto reporter + vettore di espressione per TF
- 3- effetto di COF costrutto reporter vettore di espressione per TF
+ vettore di espressione per COF

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

Risultato: **TF** attiva il promotore, aumentando la trascrizione del reporter di **20 volte**
COF non attiva ulteriormente la trascrizione

Step 5: confronto di diversi punti sperimentali

- 1- attività basale costrutto reporter + vettore di espressione vuoto
- 2- effetto di TF costrutto reporter + vettore di espressione per TF
- 3- effetto di COF costrutto reporter vettore di espressione per TF
+ vettore di espressione per COF

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

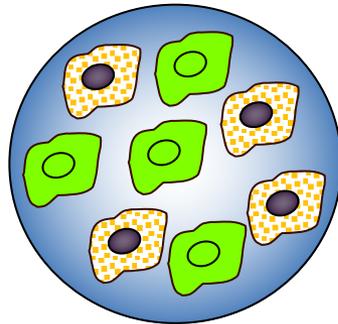
~~Risultato: TF attiva il promotore, aumentando la trascrizione del reporter di 20 volte
COF non attiva ulteriormente la trascrizione~~

NO!

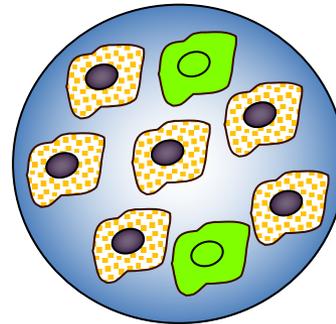
**Il valore di luminescenza misurato in un esperimento
è PROPORZIONALE
alla QUANTITÀ DI LUCIFERASI PRODOTTA**

**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

“ “

“ “

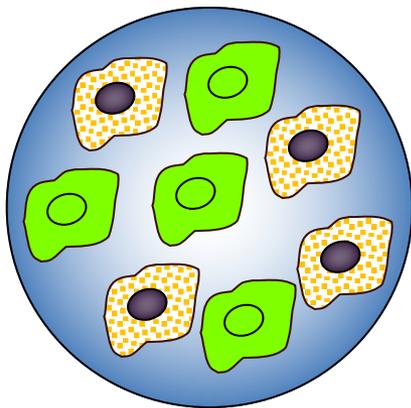
1 = 10

2 = 200

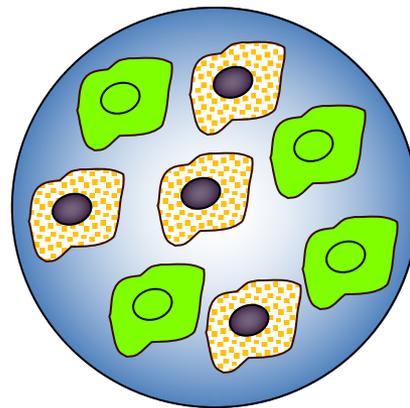
3 = 200

valori assoluti misurati

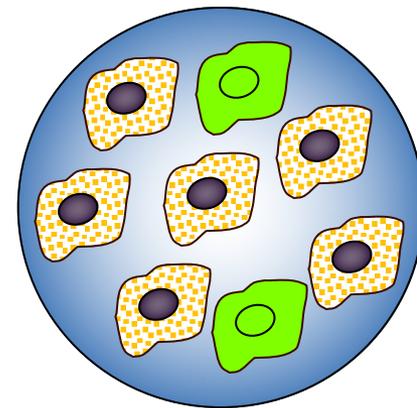
I valori assoluti di attività del reporter misurati nei 3 diversi esperimenti possono essere influenzati dalla diversa **efficienza di trasfezione** = diverso **numero di cellule trasfettate** nei diversi esperimenti.



1 = 50%



2 = 50%



3 = 25%

PROBLEMA:

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

= Normalizzare i risultati

PROBLEMA:

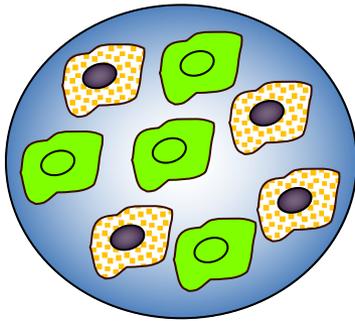
Qual è l'efficienza di trasfezione?

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

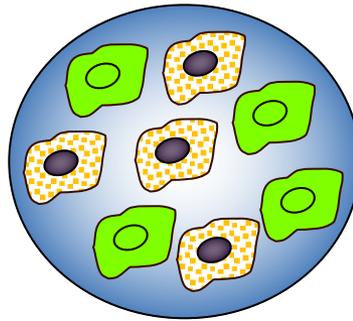


Soluzione: trasfezione di un gene reporter NON influenzato dalle condizioni sperimentali

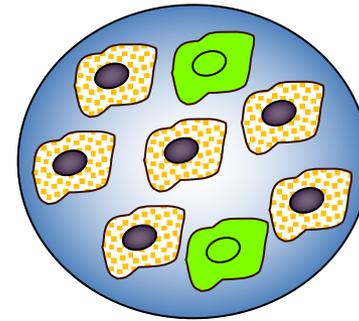
Per calcolare l'efficienza di trasfezione di ciascun esperimento si include un **CONTROLLO INTERNO**
= un **gene reporter DIVERSO** da quello sperimentale
sotto il controllo di un **promotore costitutivo**,
NON INFLUENZABILE DALLE CONDIZIONI SPERIMENTALI
(in questo caso non influenzato da TF o COF)



1= 50%

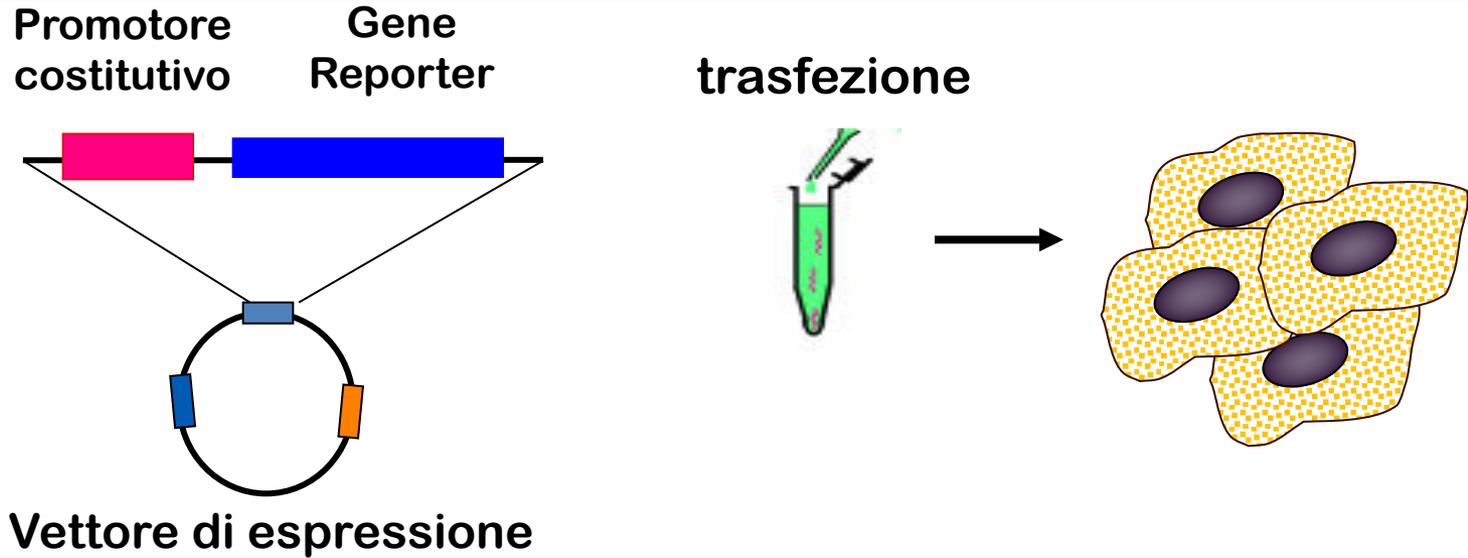


2= 50%



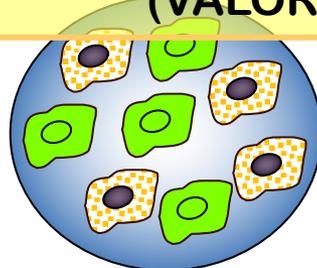
3= 25%

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

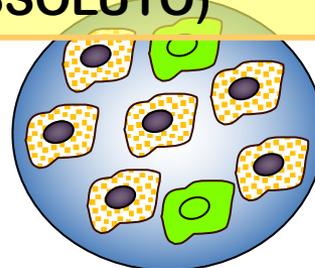


Solo le cellule trasfettate esprimono il gene reporter:
posso visualizzarle, contarle, calcolare la **% DI CELLULE TRASFETTATE** e quindi l'**EFFICIENZA DI TRASFEZIONE**

(VALORE ASSOLUTO)



50%



25%

Soluzione 2:

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

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

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

Gene della **luciferasi di celenterato** (*Renilla reniformis*)
può essere usato in combinazione 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 sono completamente
separate ma 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

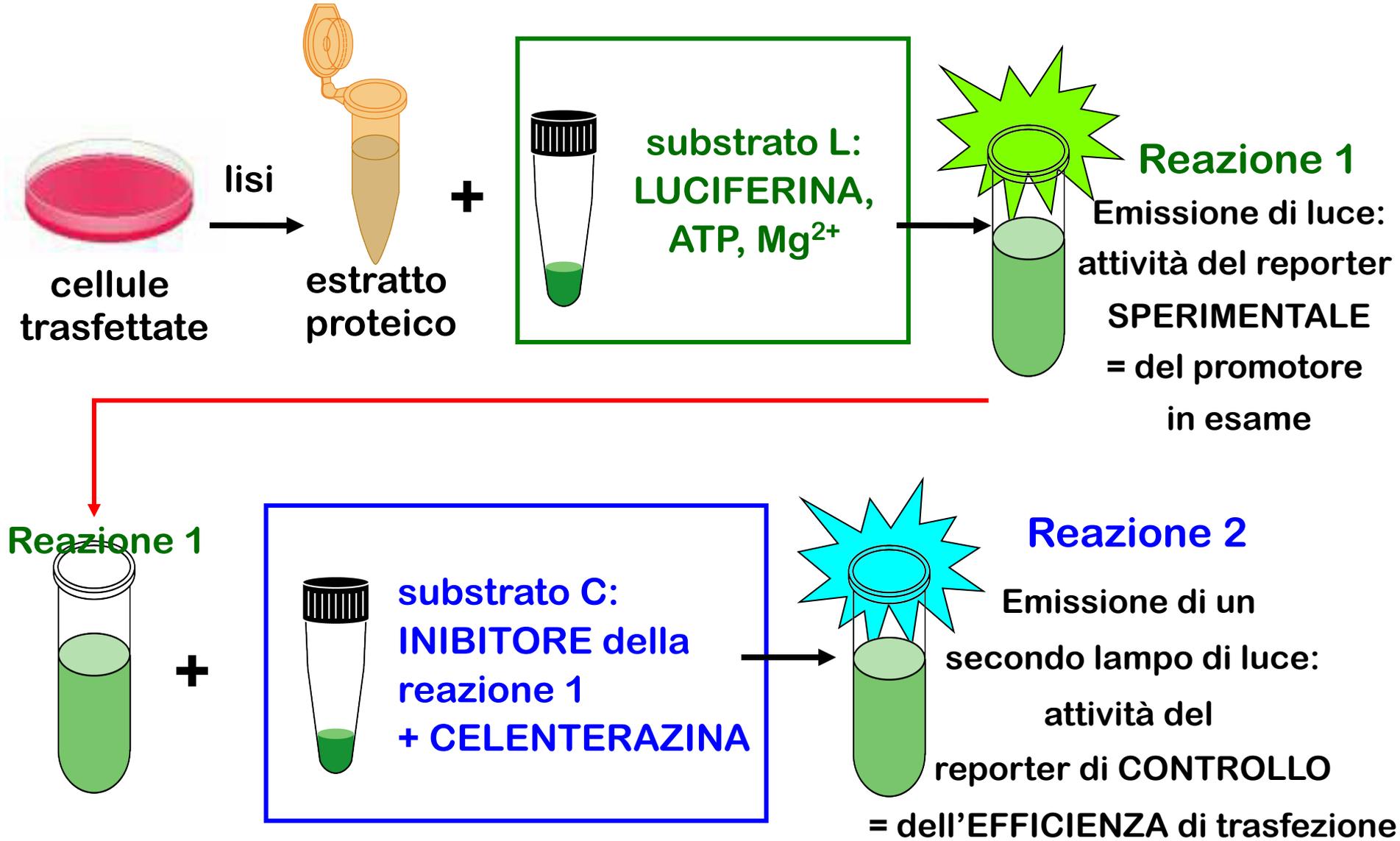


+

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 = 40x

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

COF potenzia la capacità transattivante di TF, poichè
aumenta la trascrizione del reporter di **40 volte**