

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

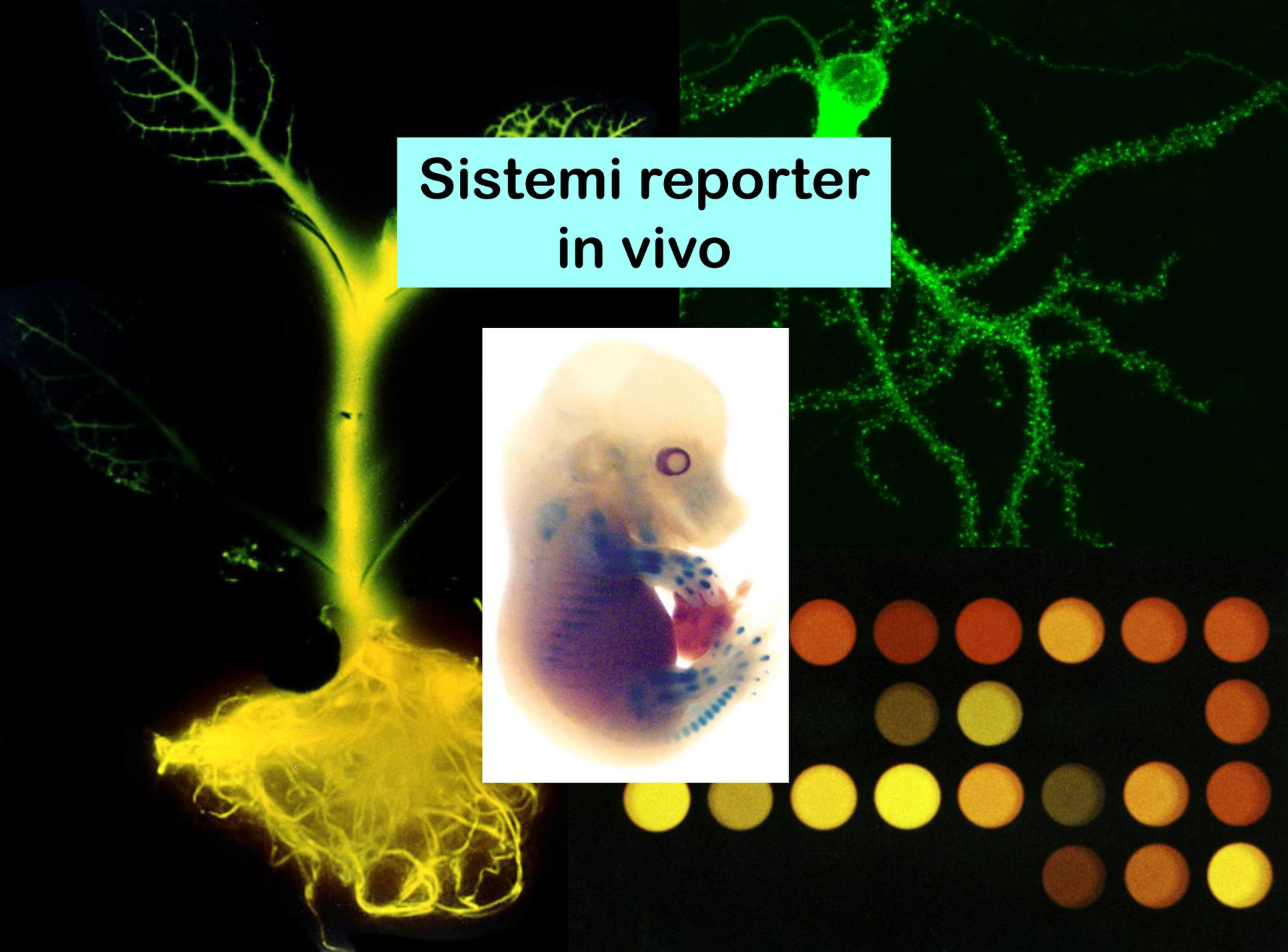
AA 2019-2020

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 12

**APPLICAZIONI DEI SISTEMI REPORTER
IN VIVO**

Sistemi reporter in vivo



**L'imaging in vivo mediante l'utilizzo di geni reporter
permette l'analisi non invasiva
di processi fisiologici e patologici**

Geni reporter

Identificazione dell'**espressione ectopica** mediante:

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

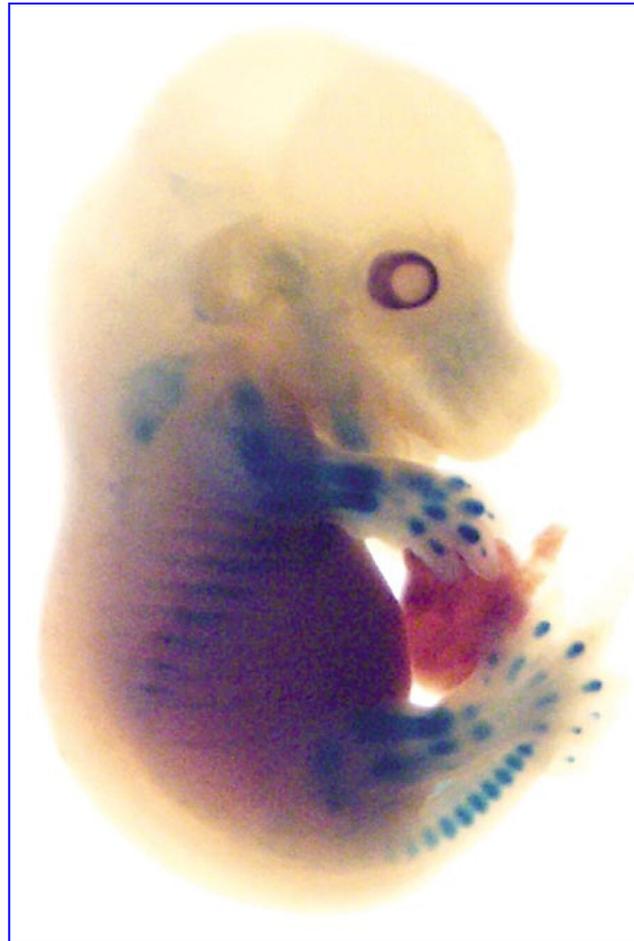
I geni reporter possono visualizzare l'attività di un **promotore**:

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

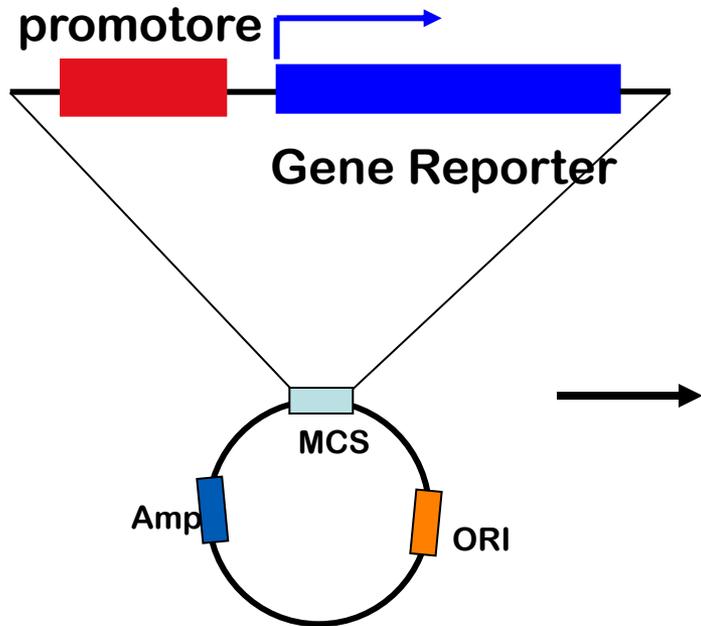
**Analisi dell'espressione genica
(attività di un promotore di interesse) in vivo**

PROBLEMA:

**DOVE/QUANDO (es. in quale tessuto o stadio dello sviluppo)
è ATTIVO UN GENE di interesse?**



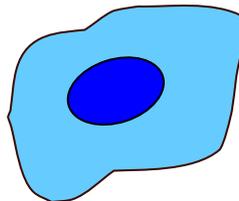
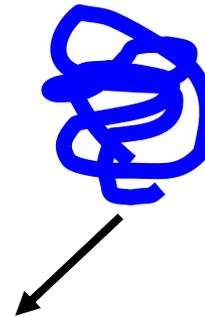
**Soluzione: gene reporter rilevabile in situ
clonato a valle di un promotore REGOLATO di interesse**



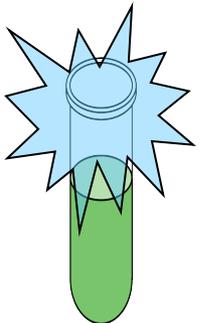
Generazione di
un organismo
transgenico



Espressione della
proteina nelle cellule
in cui il promotore è attivo



Visualizzazione
o saggio di attività
in situ



β -galattosidasi batterica

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

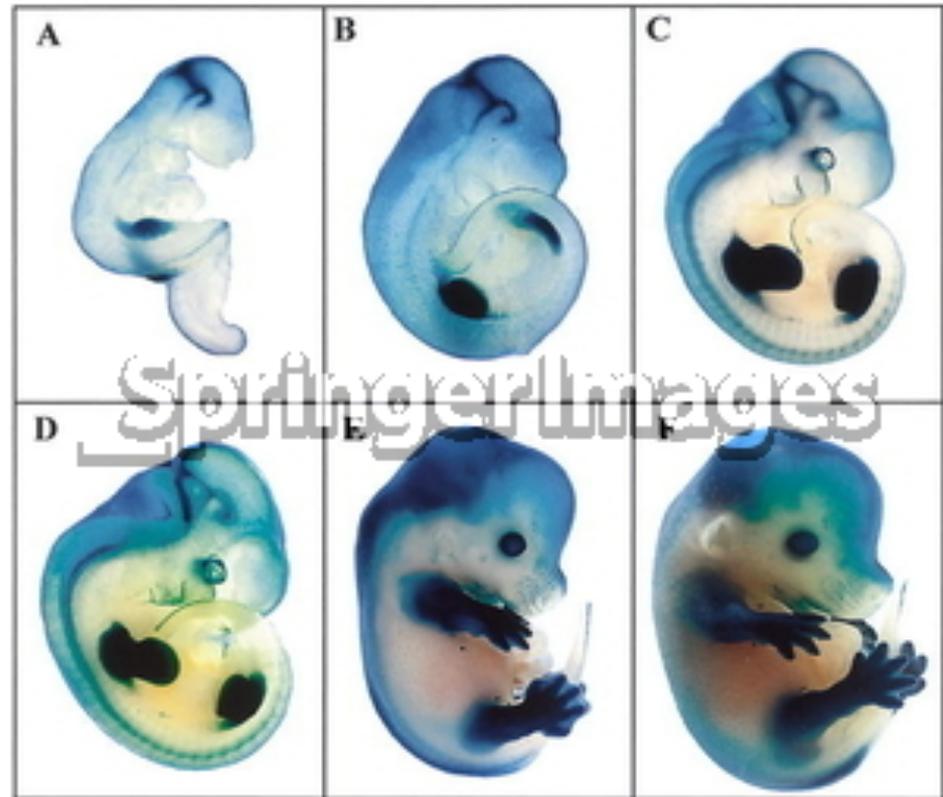
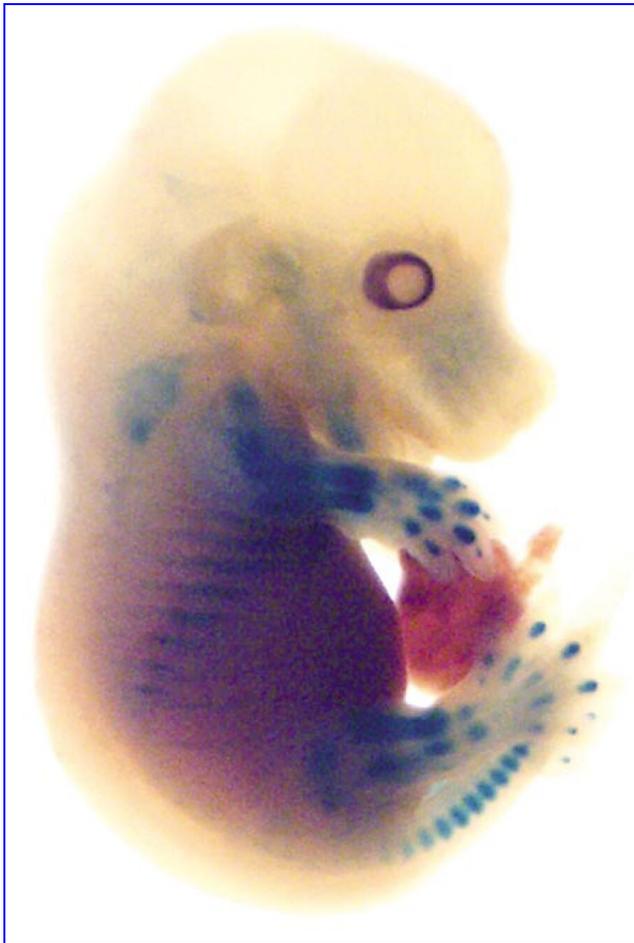
NB: optimum pH=7.5: distinguibile dall'attività dell'enzima eucariotico

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

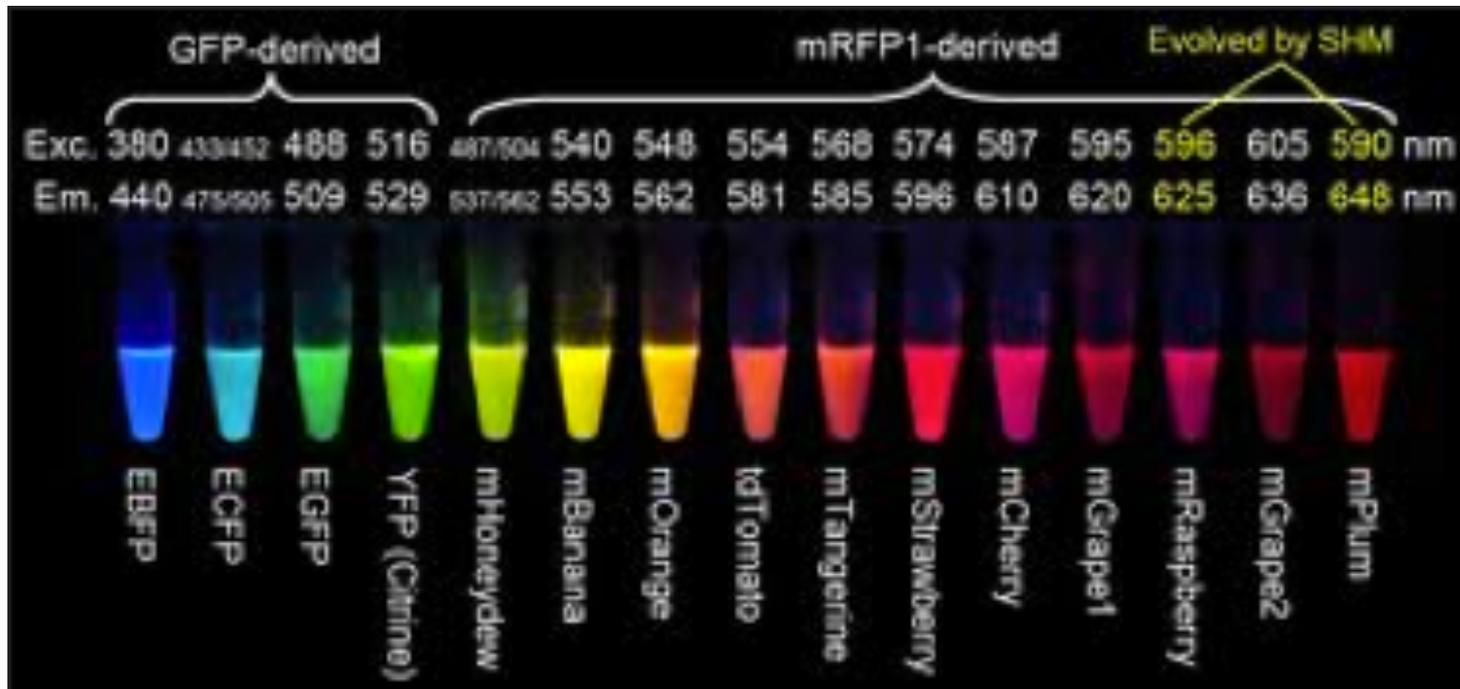
per saggi in situ su tessuti fissati: (qualitativi)

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

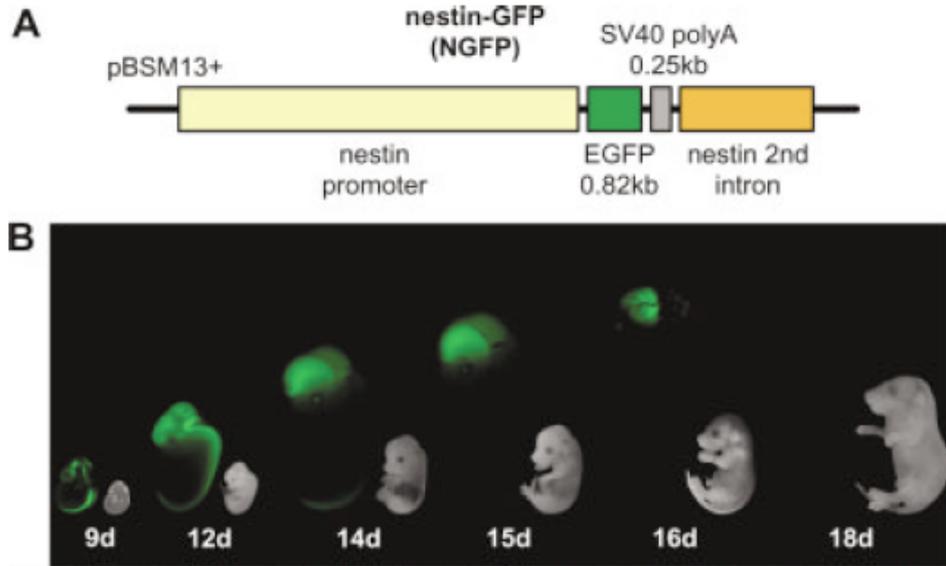
Animali transgenici (Knock-in in eterozigosi) in cui il gene lacZ è posto a valle del promotore di un gene di interesse: le cellule che esprimono tale gene sono positive al saggio con X-gal



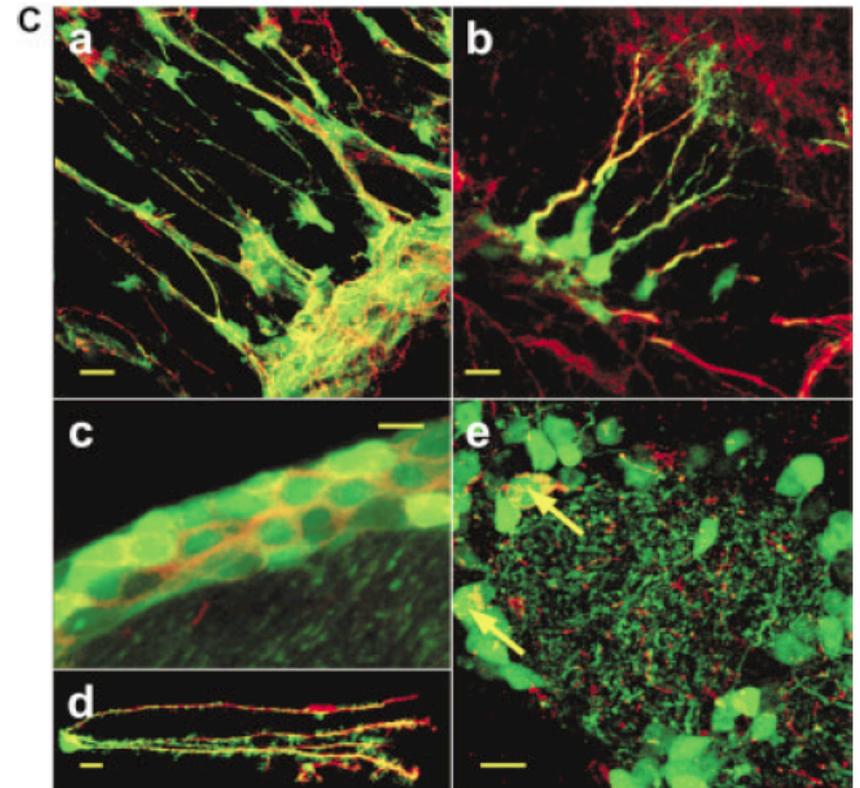
Utilizzo di reporters fluorescenti (fotoproteine) per la visualizzazione diretta in situ mediante tecniche di imaging



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

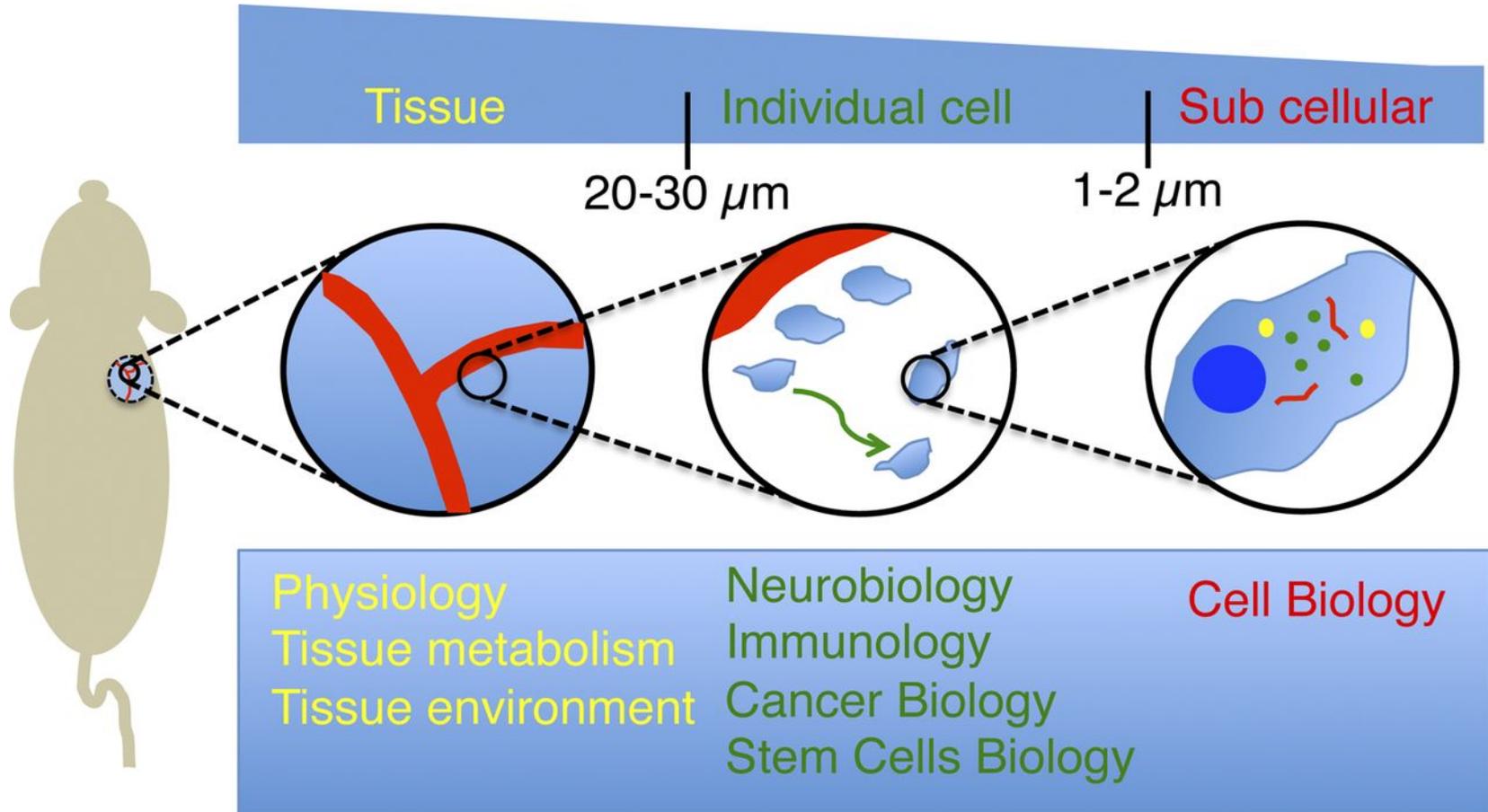


Whole mount di embrioni:
segue l'espressione del gene
durante lo sviluppo



nestin/GFP

Imaging in vivo mediante microscopia a fluorescenza intravitale



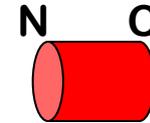
Roberto Weigert et al. J Cell Biol 2013;201:969-979

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

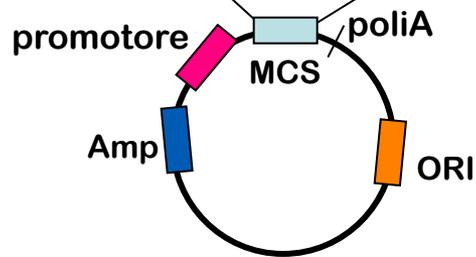
Gene X



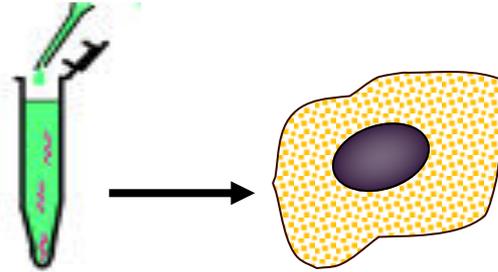
Codifica per la proteina di interesse X



Gene X Reporter - fluo

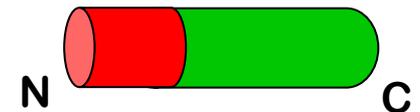


Trasfezione



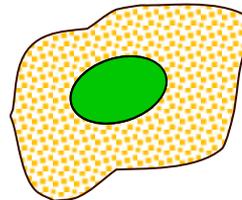
Trascrizione e traduzione:

espressione della proteina di fusione nelle cellule



La proteina X assume la sua tipica localizzazione intracellulare

Visualizzazione in situ

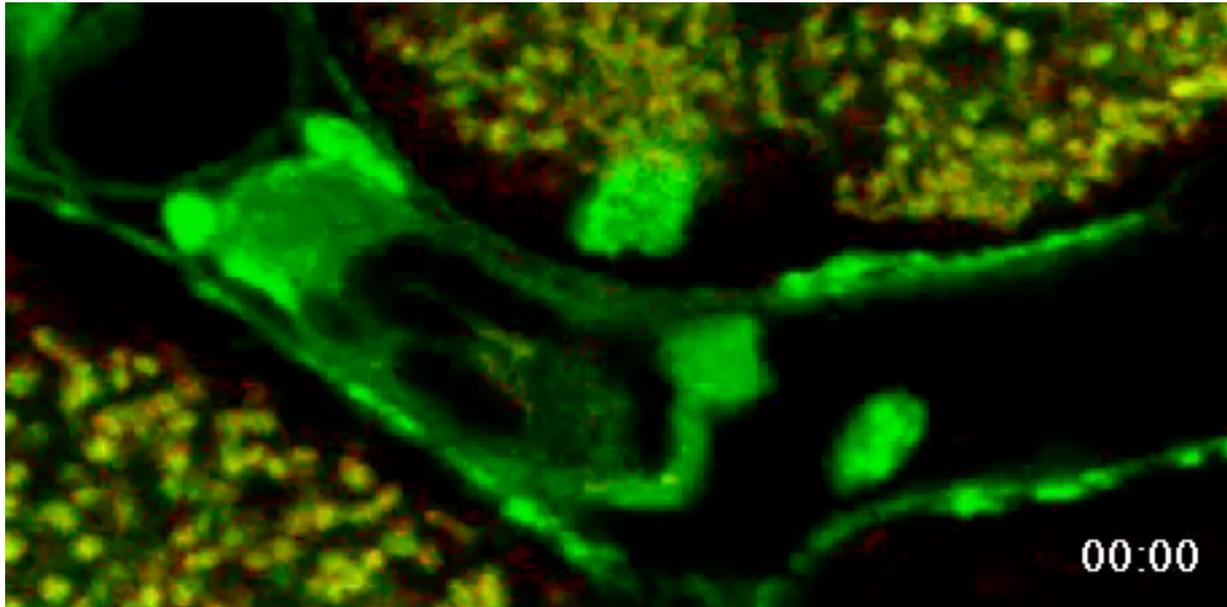


Osservazione al microscopio a fluorescenza

Ex: 475 nm

Em: 525 nm

Imaging in vivo mediante 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).

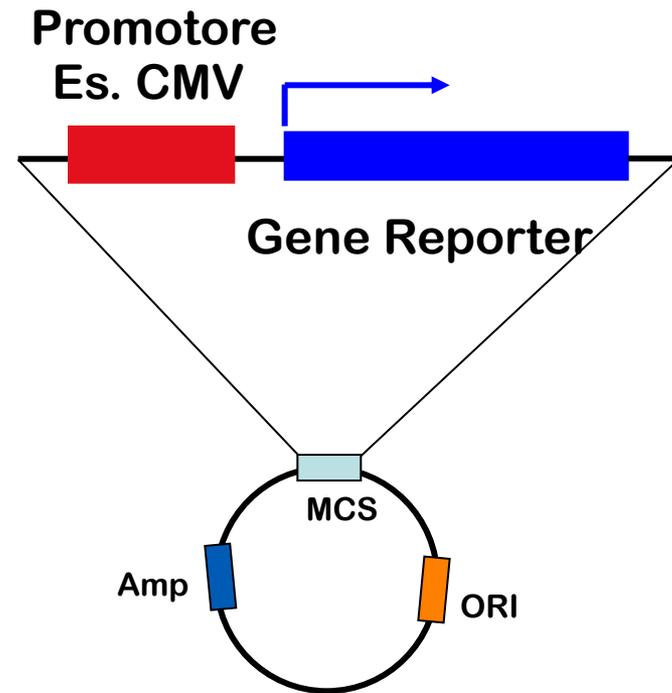
Time lapse was acquired by confocal microscopy.

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

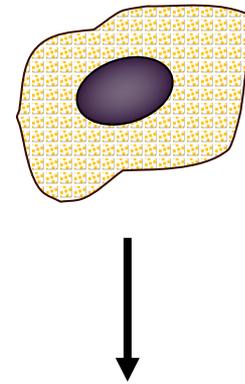
Analisi NON INVASIVA di trapianti
Es. sviluppo e progressione tumorale
mediante IMAGING IN VIVO

- ✓ **Imaging di fluorescenza mediante reporter fluorescenti (es. GFP)**
- ✓ **imaging di bioluminescenza (BMI) mediante reporter LUCIFERASI**

Gene reporter clonato a valle di un promotore COSTITUTIVO

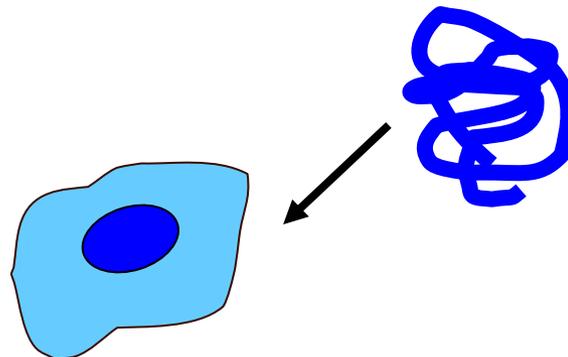


Trasfezione/infezione/CRISPR

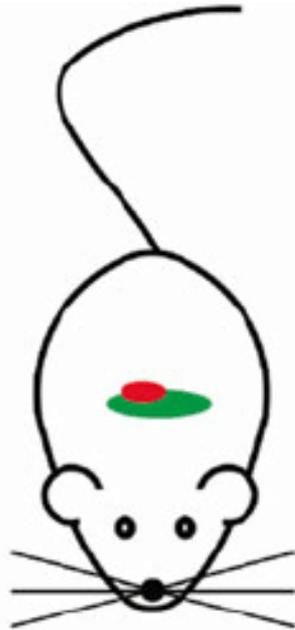


Espressione della
proteina nelle cellule
in cui è inserito il
costrutto reporter

Trapianto delle
cellule e analisi
in vivo



Trapianto di cellule-REPORTER



Orthotopic



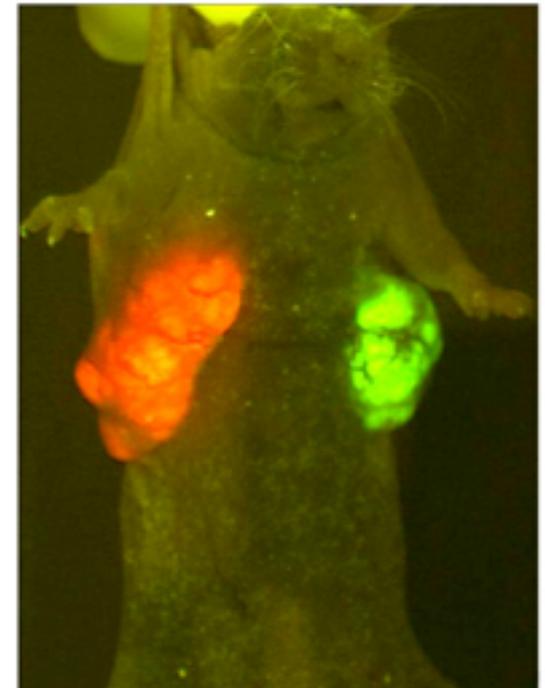
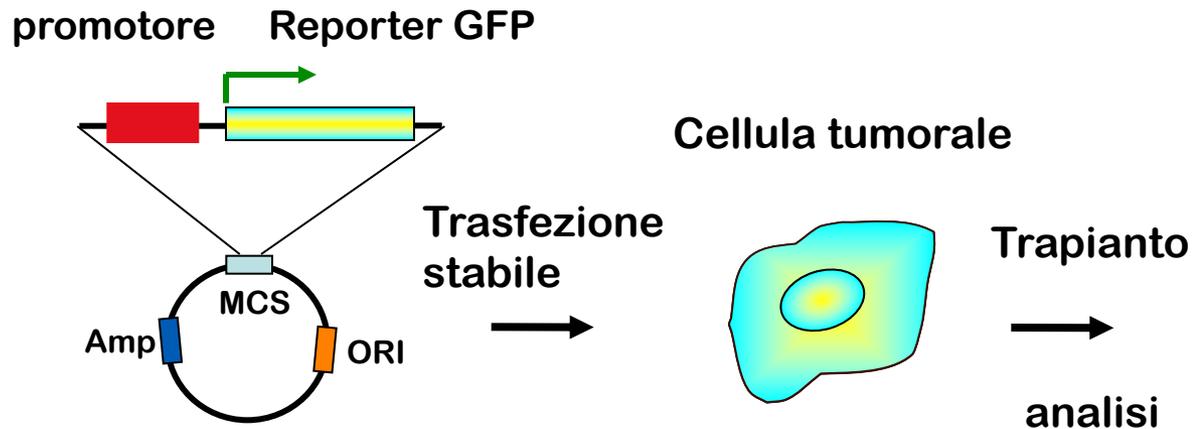
Subcutaneous

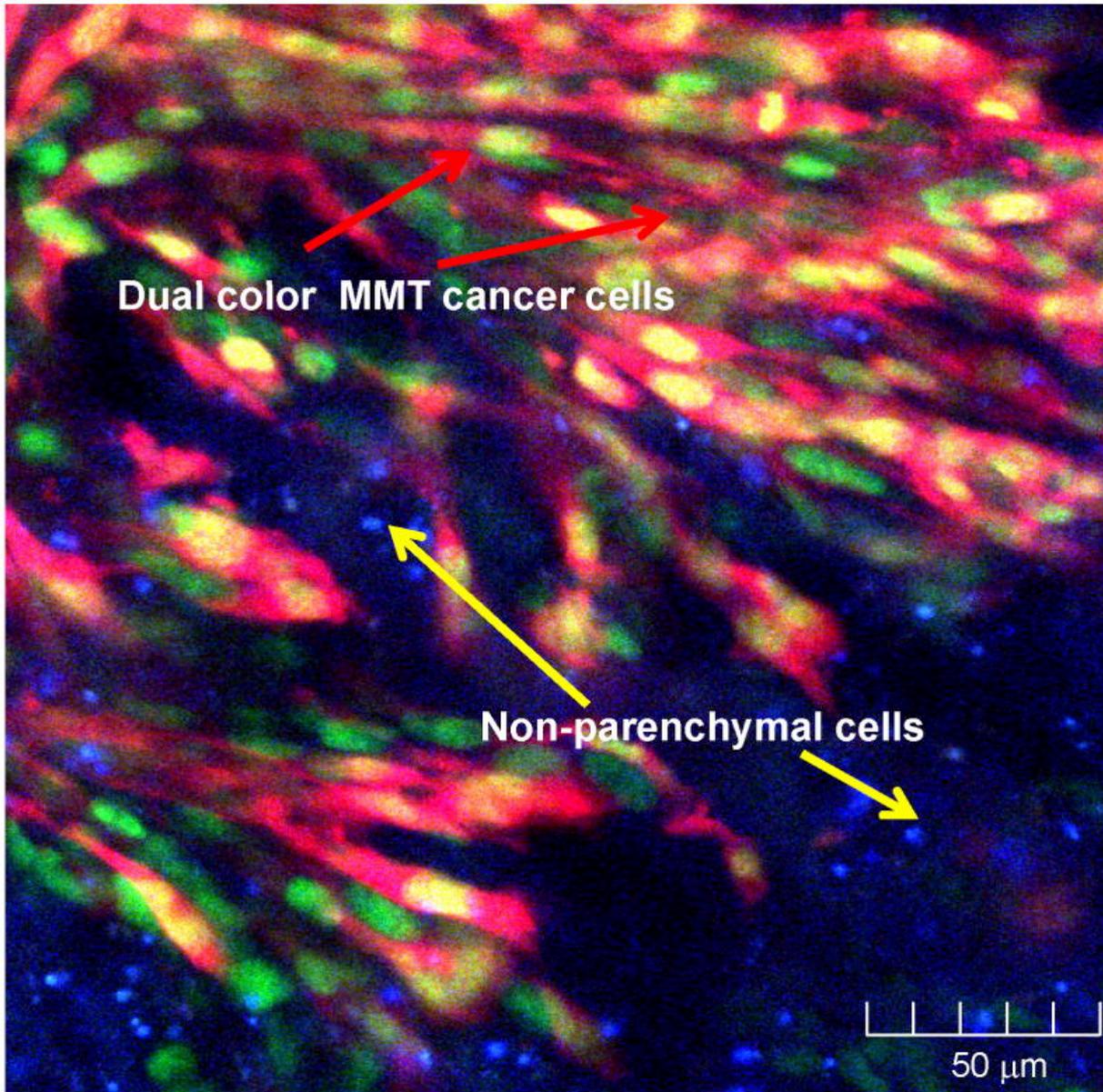


Disseminazione
metastatica
Iniezione iv

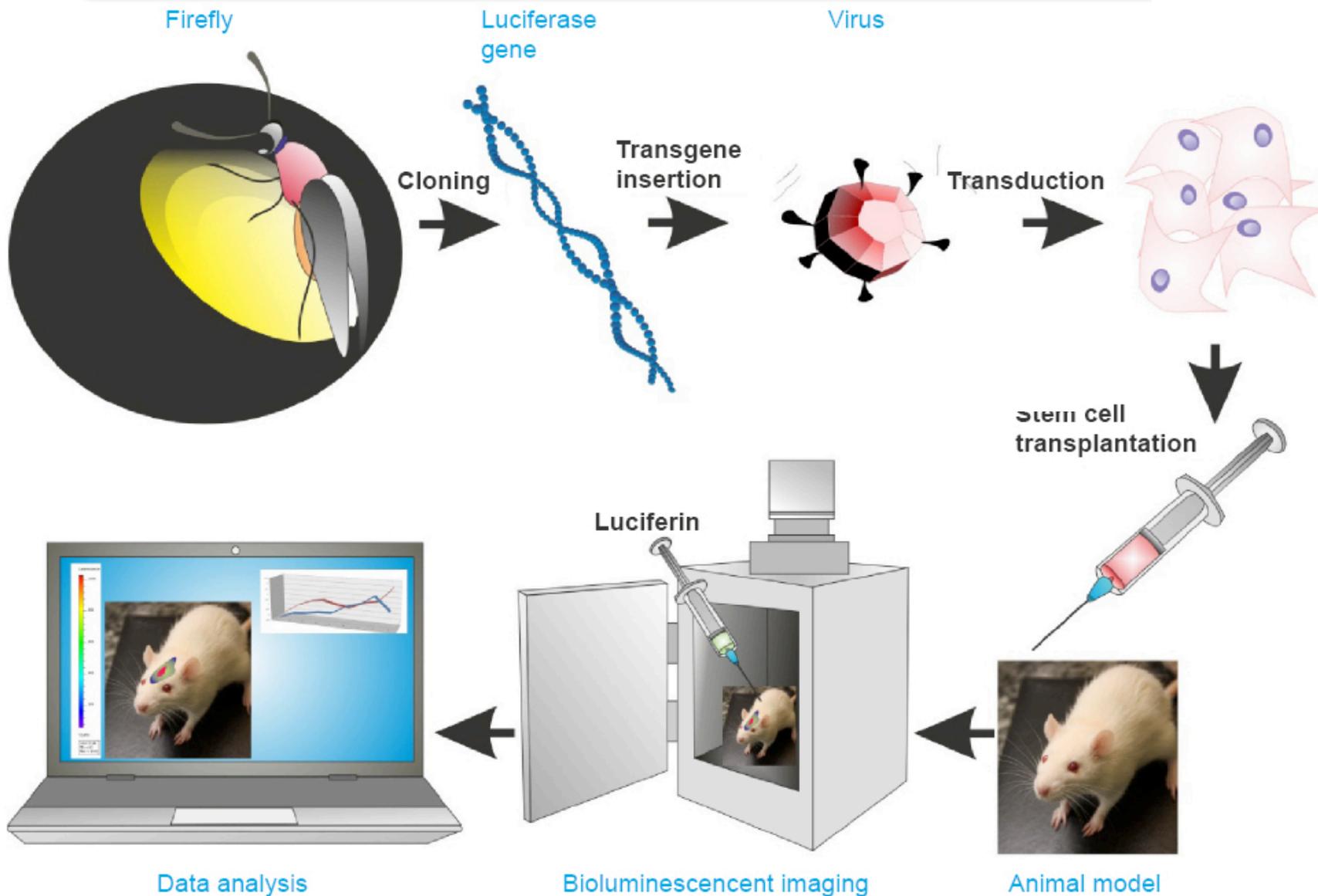
Trapianto di cellule/biopsie
tumorali

Imaging in vivo mediante fotoproteine reporter: analisi dello sviluppo e progressione tumorale mediante microscopia a fluorescenza intravitale





Imaging di bioluminescenza (BMI)



Iniezione del substrato, inserimento in dark box e misurazione della luce emessa mediante BMI (CCD camera)

In vivo imaging di bioluminescenza prodotta da reporter LUC

