

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2019-2020

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Parte applicata

Lezione 2

Screening high-throughput

**Volete effettuare uno screening in vitro di molecole bioattive
per identificare farmaci che inibiscono la migrazione di cellule tumorali.**

Strategia sperimentale

1. È necessario scegliere un opportuno sistema cellulare: es. Linea cellulare tumorale dotata di capacità di migrazione
2. È necessario scegliere un opportuno saggio di migrazione che permetta la valutazione high-throughput
3. In tale sistema possiamo effettuare uno screening di una libreria di molecole bioattive
4. Predisporre gli opportuni CONTROLLI
5. Analizzare l'effetto delle molecole in termini di riduzione della capacità di migrazione

Screening FUNZIONALI per nuovi farmaci

Modello cellulare tumorale

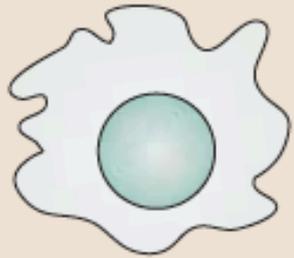
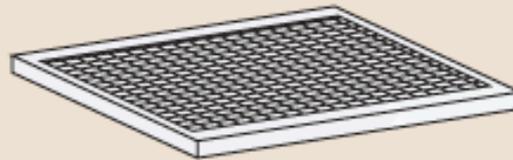
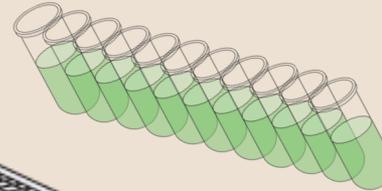


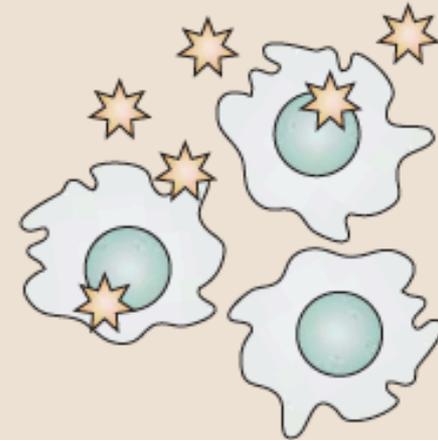
Plate cells onto clear bottom 384-well plate



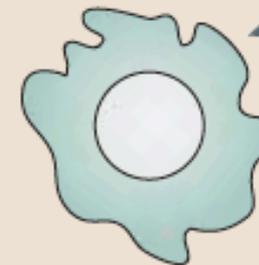
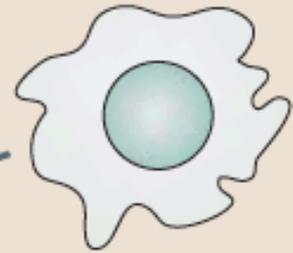
Libreria di molecole



Transfer compounds onto cells



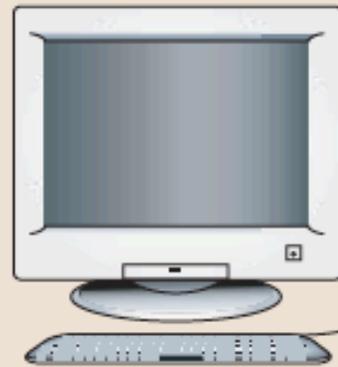
Compound treatment



riduzione della migrazione



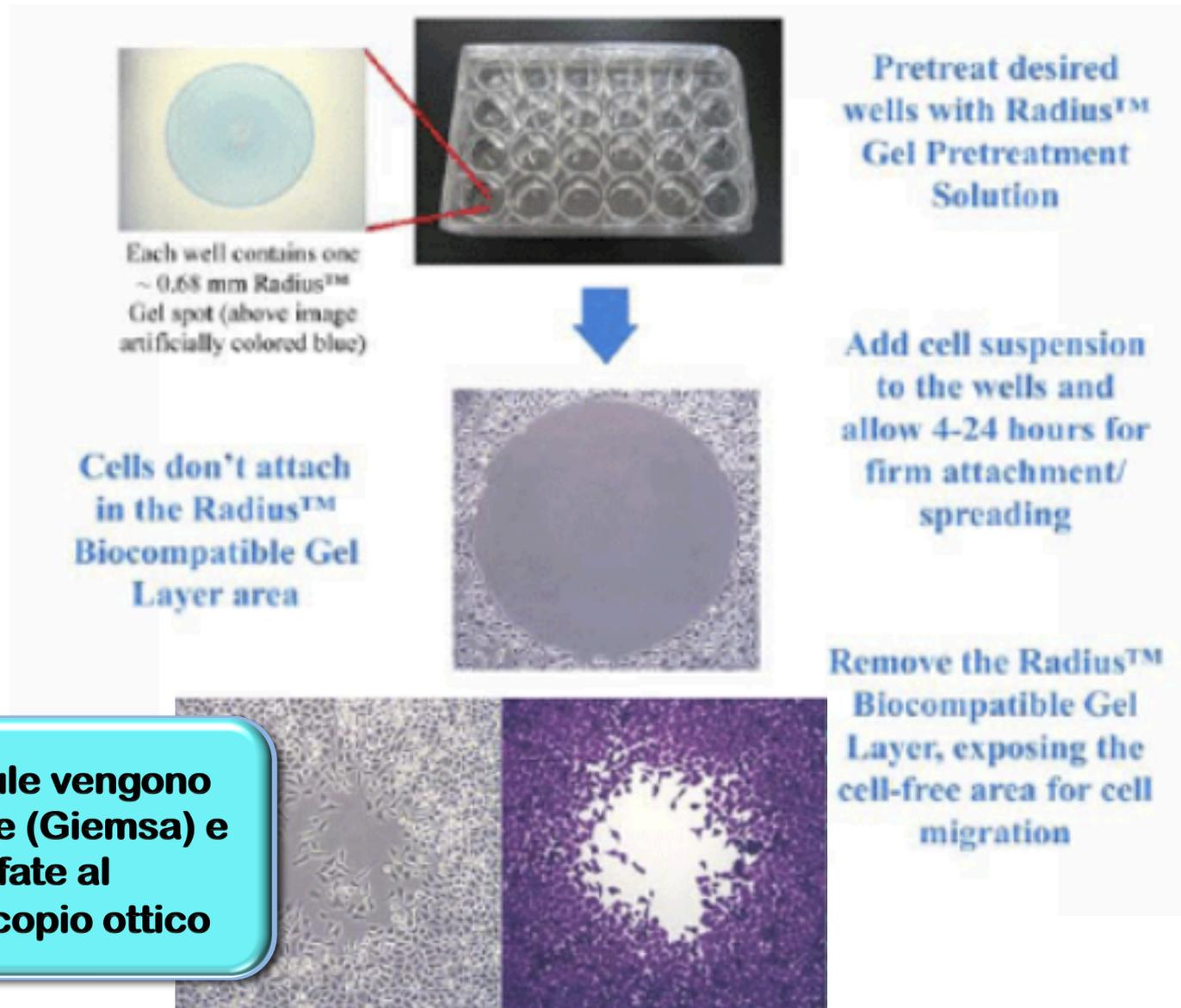
or hits



Analisi del fenotipo mediante opportuno saggio

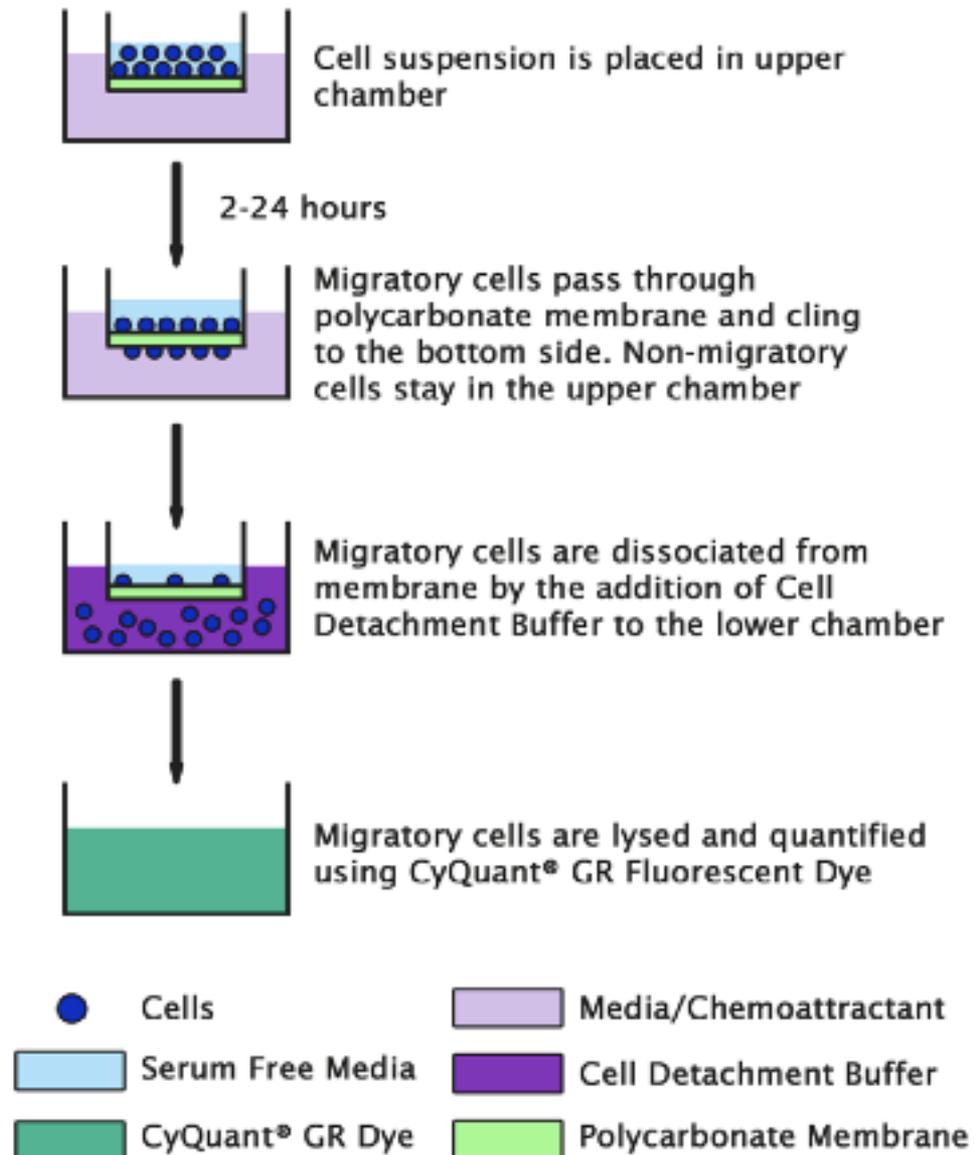
Identificazione del farmaco

Saggi di migrazione in piastra multipozzetto con lettura automatizzata al microscopio ottico/plate reader



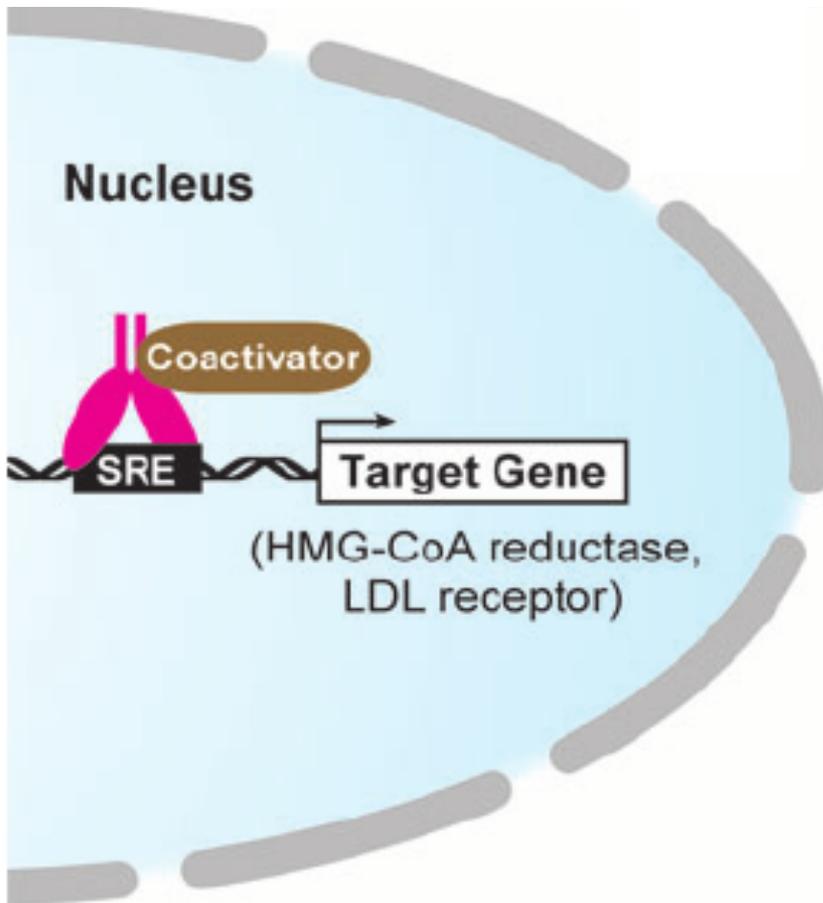
Le cellule vengono colorate (Giemsa) e fotografate al microscopio ottico

Saggi di transwelling (Boyden) in piastra multipozzetto con lettura fluorimetrica



**Esperimenti in laboratorio didattico
di biologia/microscopia**

Studio dei fattori di trascrizione SREBP, che controllano la disponibilità di colesterolo e lipidi di membrana

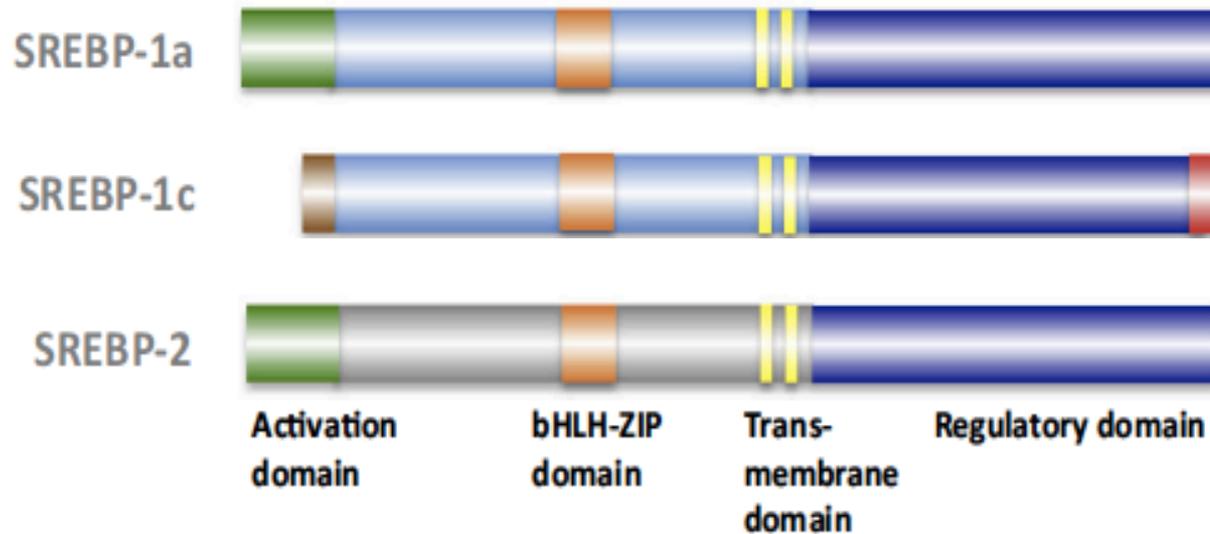


Le cellule necessitano di colesterolo e lipidi per la sintesi delle membrane, per svolgere le normali funzioni e soprattutto quando sono in attiva proliferazione oppure devono migrare.

Bassi livelli di colesterolo inducono nella cellula l'espressione del recettore per le LDL e la biosintesi del colesterolo (enzima HMG-CoA reduttasi).

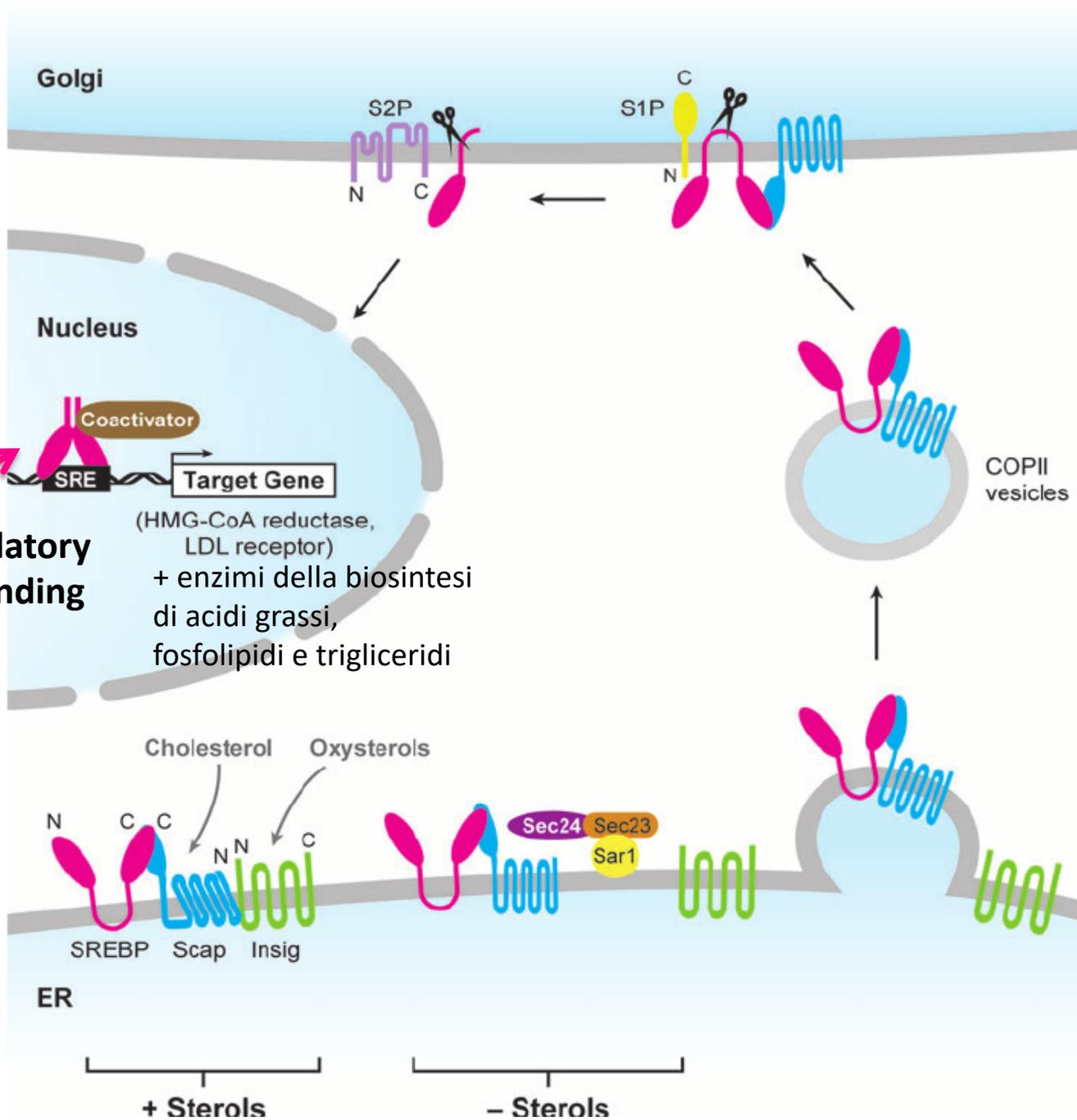
Ciò avviene attraverso la regolazione della disponibilità dei fattori di trascrizione che inducono questi geni:
SREBP = Sterol Regulatory Element Binding Proteins

I fattori di trascrizione SREBP = sterol regulatory element binding proteins



TRENDS in Pharmacological Sciences

Sterol regulatory element Binding Protein



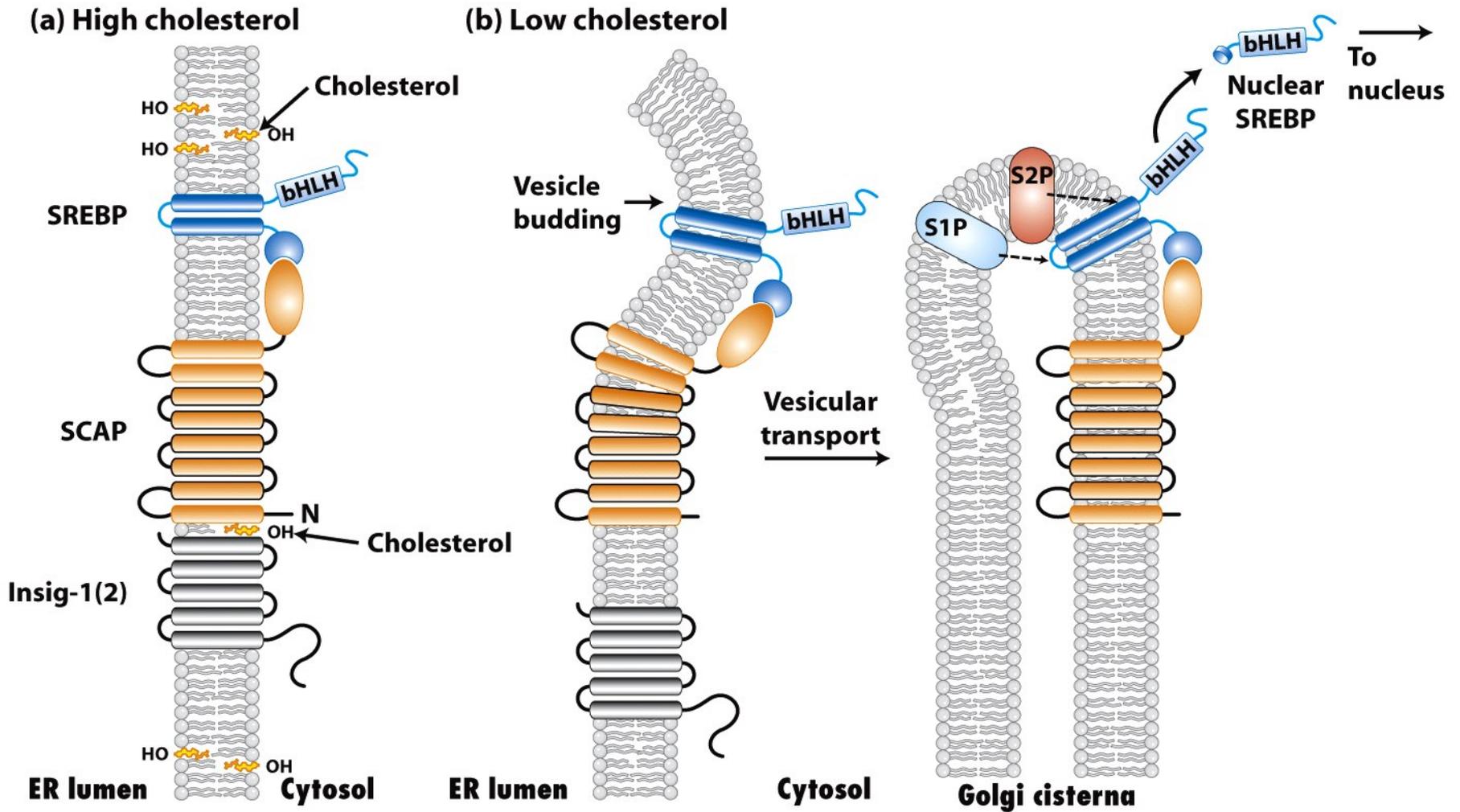
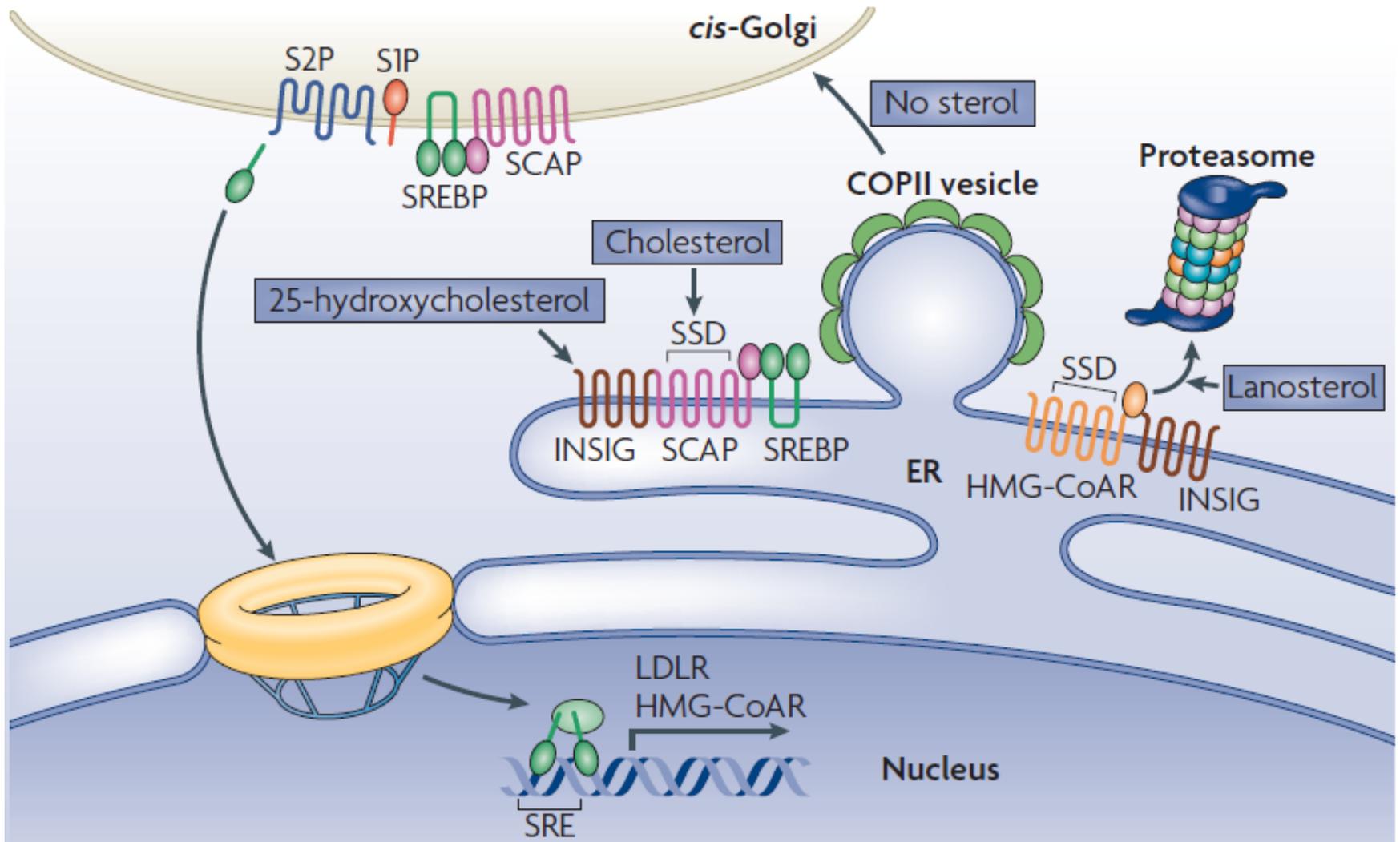


Figure 16-38
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company



Domande:

- 1. Come possiamo seguire sperimentalmente i cambiamenti nella localizzazione subcellulare delle proteine SREBP?**
- 2. Come possiamo comprendere i meccanismi attraverso cui i fattori SREBP regolano la trascrizione dei propri geni bersaglio?**
- 3. Come possiamo comprendere il contributo dei fattori SREBP e dei geni da essi regolati alla proliferazione e alla migrazione cellulare?**

Domande:

- 1. Come possiamo seguire sperimentalmente i cambiamenti nella localizzazione subcellulare delle proteine SREBP?**
- 2. Come possiamo comprendere i meccanismi attraverso cui i fattori SREBP regolano la trascrizione dei propri geni bersaglio?**
- 3. Come possiamo comprendere il contributo dei fattori SREBP e dei geni da essi regolati alla proliferazione e alla migrazione cellulare?**

Per effettuare questi esperimenti possiamo utilizzare le colture cellulari, introducendo nelle cellule opportuni vettori per l'espressione dei fattori SREBP (ed altri geni "reporter") ed effettuando opportuni trattamenti, confrontando diverse condizioni sperimentali.

Esperimento 1:

Visualizzare i cambiamenti nella localizzazione subcellulare della proteina SREBP1a

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:

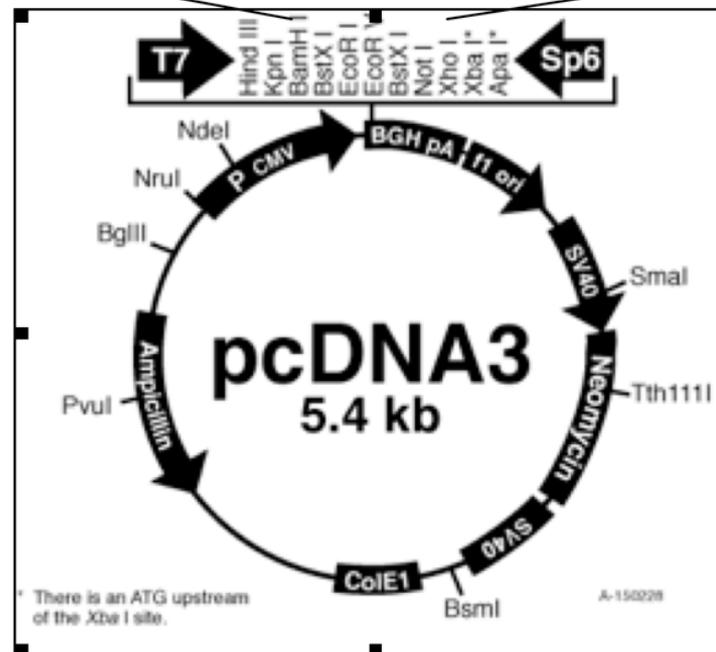
Selection: Amp^R (prokaryotic); Neo^R (eukaryotic)

Ref:

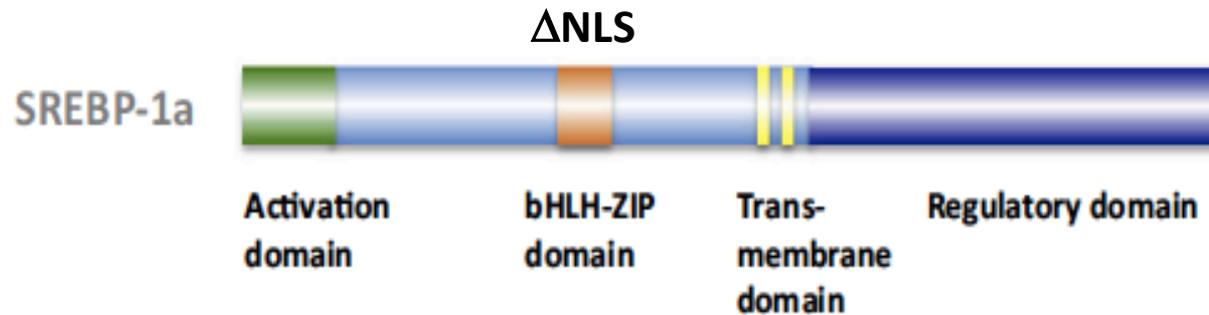
Notes:

BamHI

XhoI



**Step 2: mutagenesi del NLS di SREBP1a:
generazione del vettore di espressione SREBP1a Δ NLS**



Step 3:

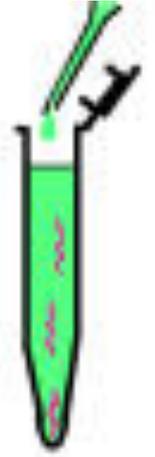
**trasfezione dei vettori di espressione in cellule in coltura
mediante lipofezione e incubazione con terreni diversi**

L: 10 min a TA

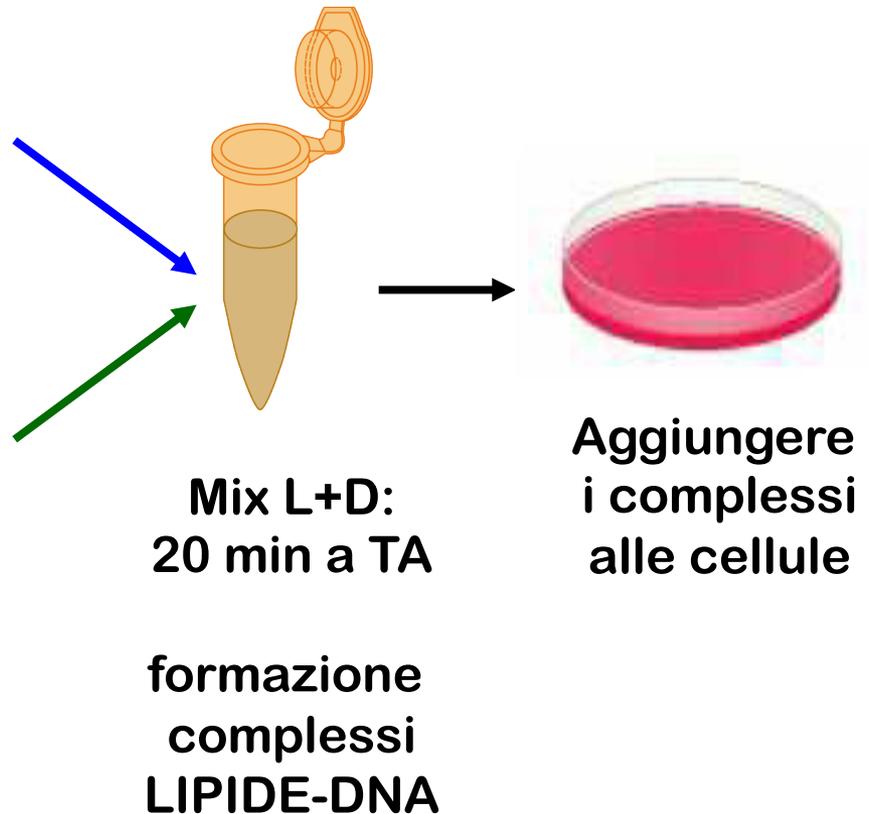


150 μ l terreno Optimem
+
2 μ l Lipofectamina

D: 10 min a TA



150 μ l terreno Optimem
+
DNA
vettore di espressione



**Step 4: analisi mediante immunofluorescenza
(utilizzando un Ab primario specifico per il TAG HA)
della localizzazione di:**

- 1) SREBP1a in terreno completo
- 2) SREBP1a in terreno deprivato da lipidi
- 3) SREBP1a Δ NLS in terreno deprivato da lipidi
- 4) S1P
- 5) COPB1
- 6) *Succinato deidrogenasi*

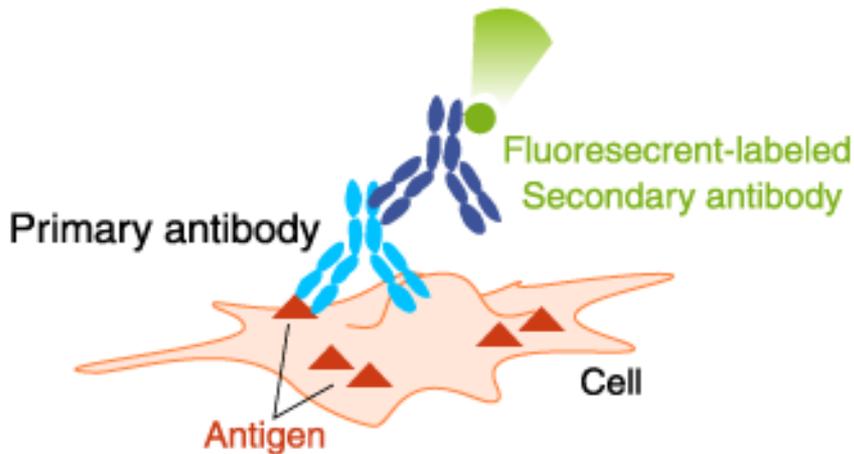
Step 4: analisi mediante immunofluorescenza (Ab primario specifico per TAG HA) della localizzazione di:

- | | |
|--------------------------------------------------------|------------------------|
| 1) SREBP1a in terreno completo | ER |
| 2) SREBP1a in terreno deprivato da lipidi | NUCLEO |
| 3) SREBP1a Δ NLS in terreno deprivato da lipidi | CITOPLASMA |
| 4) S1P | GOLGI |
| 5) COPB1 | vescicole di trasporto |
| 6) Succinato deidrogenasi | MITOCONDRIO |

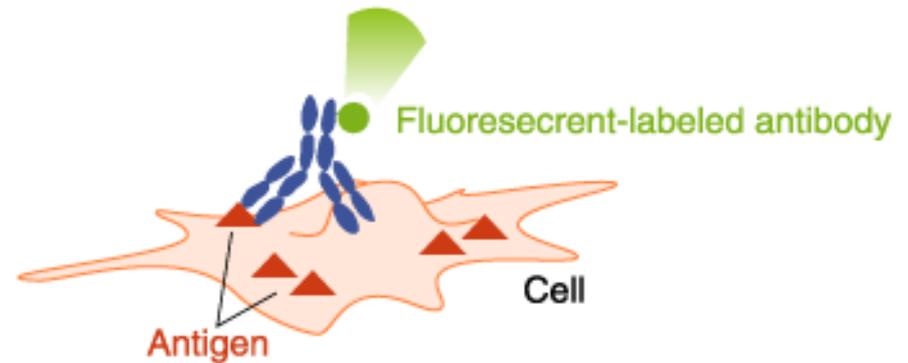
Immunofluorescenza

Permette di **visualizzare la localizzazione di una proteina sulla superficie o all'interno della cellula**

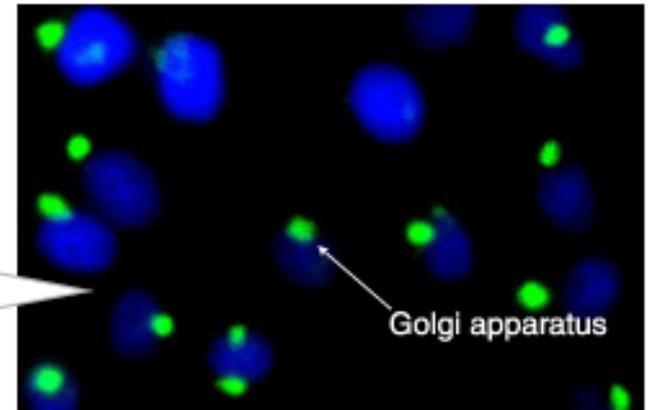
HeLa cells were stained with an antibody to the Golgi protein GM130.



Staining with a direct-labeled antibody



Green fluorescence of the fluorophore of the direct-labeled antibody (Alexa Fluor® 488) is observed by a fluorescence microscope.



Sample: HeLa cells

PROTOCOLLO: IMMUNOFLUORESCENZA

MATERIALE:

PBS

Glicina 0.1M

Triton X-100 0.1M

Soluzione di anticorpo primario anti-HA TAG (monoclonale prodotto in topo)

Soluzione di anticorpo secondario anti-mouse-FITC (coniugato con fluoresceina – fluorescenza verde)

Hoechst (colorante nucleare– intercalante del DNA con fluorescenza blu)

Agente montante: Mowiol (anche adesivo) o PROLONG (da abbinare ad un collante);

Vetrini portaoggetto

Camerette per immunofluorescenza

Pinzette e aghi

Pipette Pasteur di plastica

PROCEDIMENTO (si effettua INTERAMENTE sul banco)

Le cellule trasfettate sono state fissate direttamente nella capsula Petri dopo 24 ore, mediante incubazione con **paraformaldeide 3%** per 20 minuti. In seguito la PFA è stata **saturata** mediante incubazione con **Glicina 0.1M**.

LAVARE LE CELLULE. Rimuovere il terreno, **effettuare 2 lavaggi delicati con PBS**, rimuovere $\frac{3}{4}$ del PBS. Marcare il fondo di 2 pozzetti della cameretta da IF. Utilizzando un ago e le pinzette, trasferire ciascun vetrino in un pozzetto. **ATTENZIONE:** le cellule devono rimanere a **FACCIA IN SU!!!**

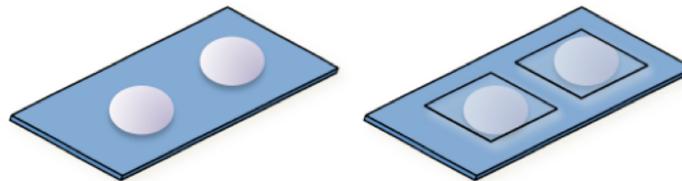
PERMEABILIZZARE le membrane cellulari. Aggiungere 2 ml di Triton X100 0.1M. Incubare per **5 minuti. 2 lavaggi** con 2 ml di **PBS** ciascuno. Rimuovere **tutto** il PBS.

Incubare con l'anticorpo primario (anti-HA). Coprire il vetrino con 100 ml di soluzione di anticorpo primario. Chiudere la cameretta e incubare 30 minuti.

Anticorpo secondario (anti-mouse-FITC). 2 lavaggi con 2 ml di **PBS** ciascuno. Rimuovere bene il PBS. Coprire il vetrino con 100 ml di soluzione di anticorpo secondario. Chiudere la cameretta e incubare 15 minuti.

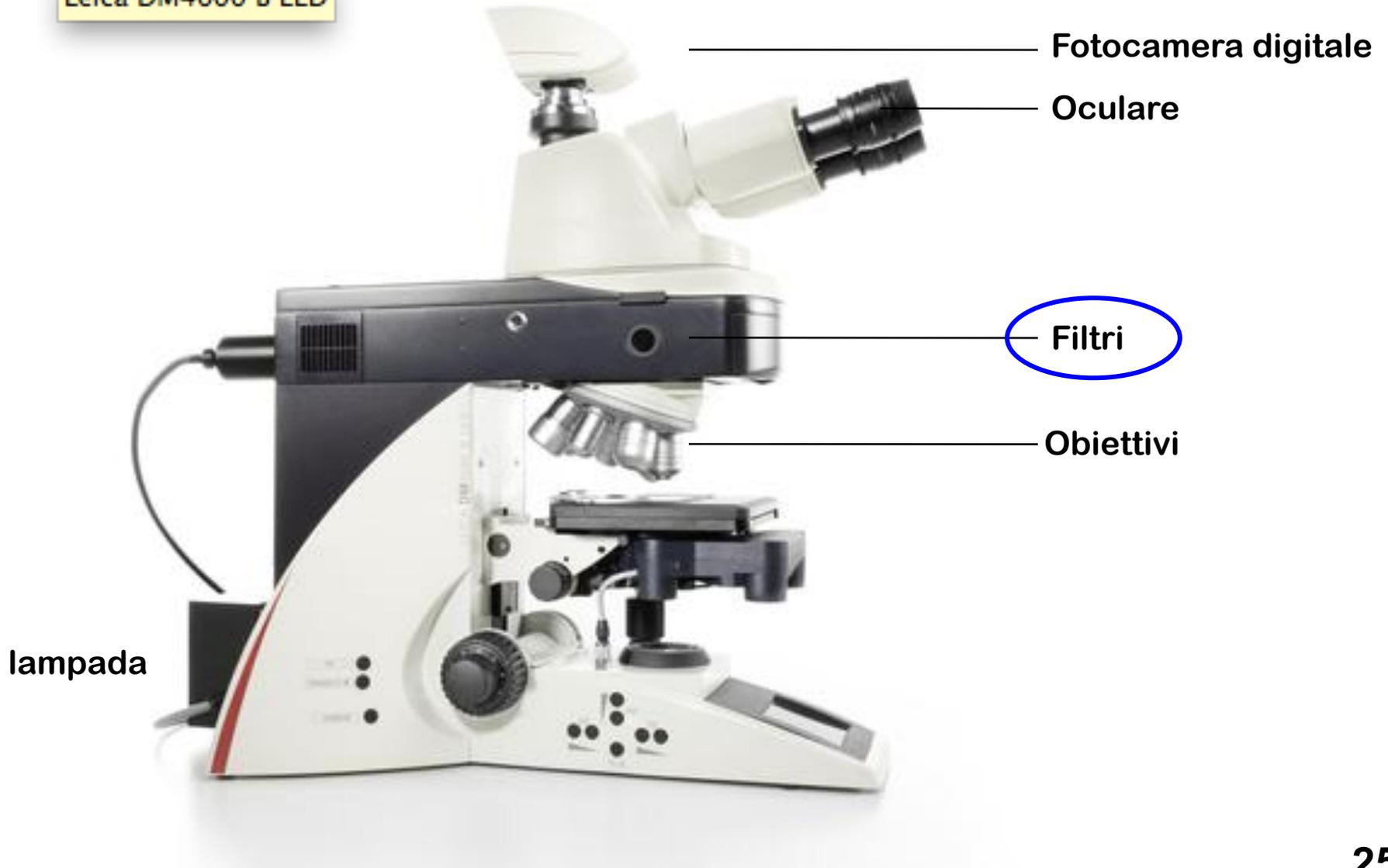
Controcolorare i nuclei con Hoechst. 2 lavaggi con 2 ml di **PBS** ciascuno. Rimuovere il PBS. **Aggiungere 2 ml di Hoechst.** Incubare per **5 minuti. 3 lavaggi** con 2 ml di **PBS** ciascuno. 1 lavaggio con 2 ml di **acqua.** Rimuovere $\frac{3}{4}$ dell'acqua.

MONTARE I VETRINI. Con un ago e le pinzette, sollevare il vetrino e spostarlo in un pozzetto asciutto, appoggiandolo verticalmente al bordo del pozzetto. **NB: le cellule guardano verso il centro del pozzetto, non verso il bordo!!!** Lasciar asciugare (almeno 5 minuti). Pulire con alcol un **vetrino portaoggetto,** scriverci il proprio nome, la linea cellulare ed il DNA trasfettato, quindi porvi 2 gocce di **MOWIOL.** **Con le pinzette, appoggiare il vetrino con le cellule a faccia in giù sul Mowiol.** Schiacciare bene con un puntale giallo per eliminare le bolle e lasciar asciugare. I vetrini sono pronti per essere osservati al microscopio a epifluorescenza.

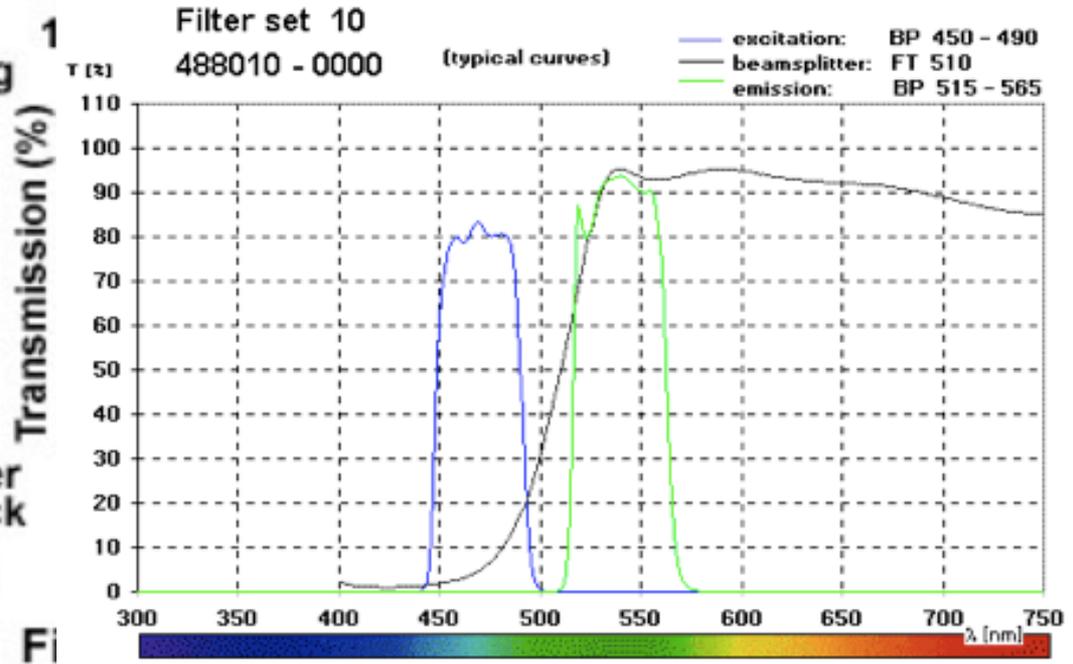
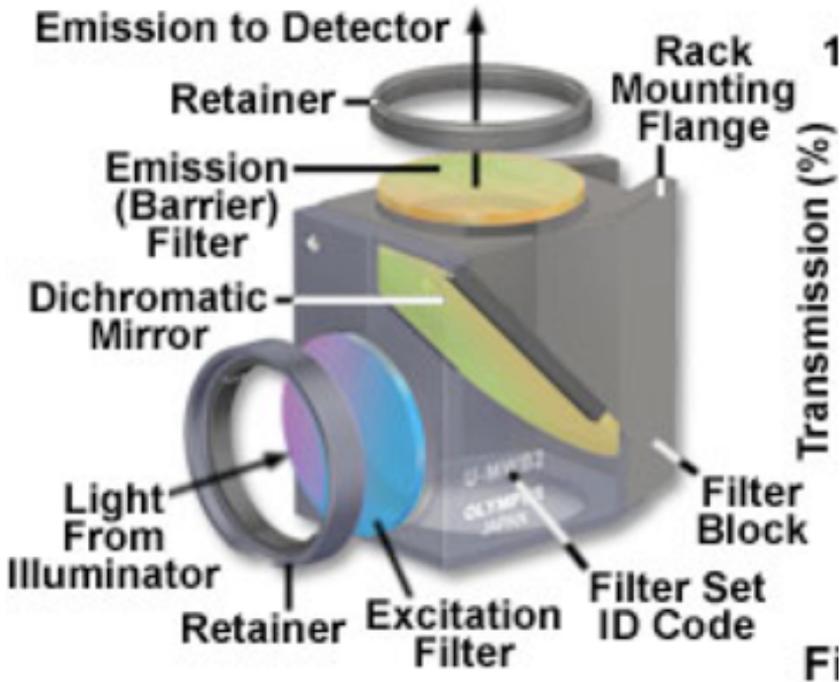


Osservazione al microscopio a epifluorescenza

Leica DM4000 B LED



Fluorescence Filter Cube (Block) and Associated Spectra



Combinazione A:

filtro d'eccitazione 340-380/ lamina dicromatica 400/ filtro di sbarramento 430

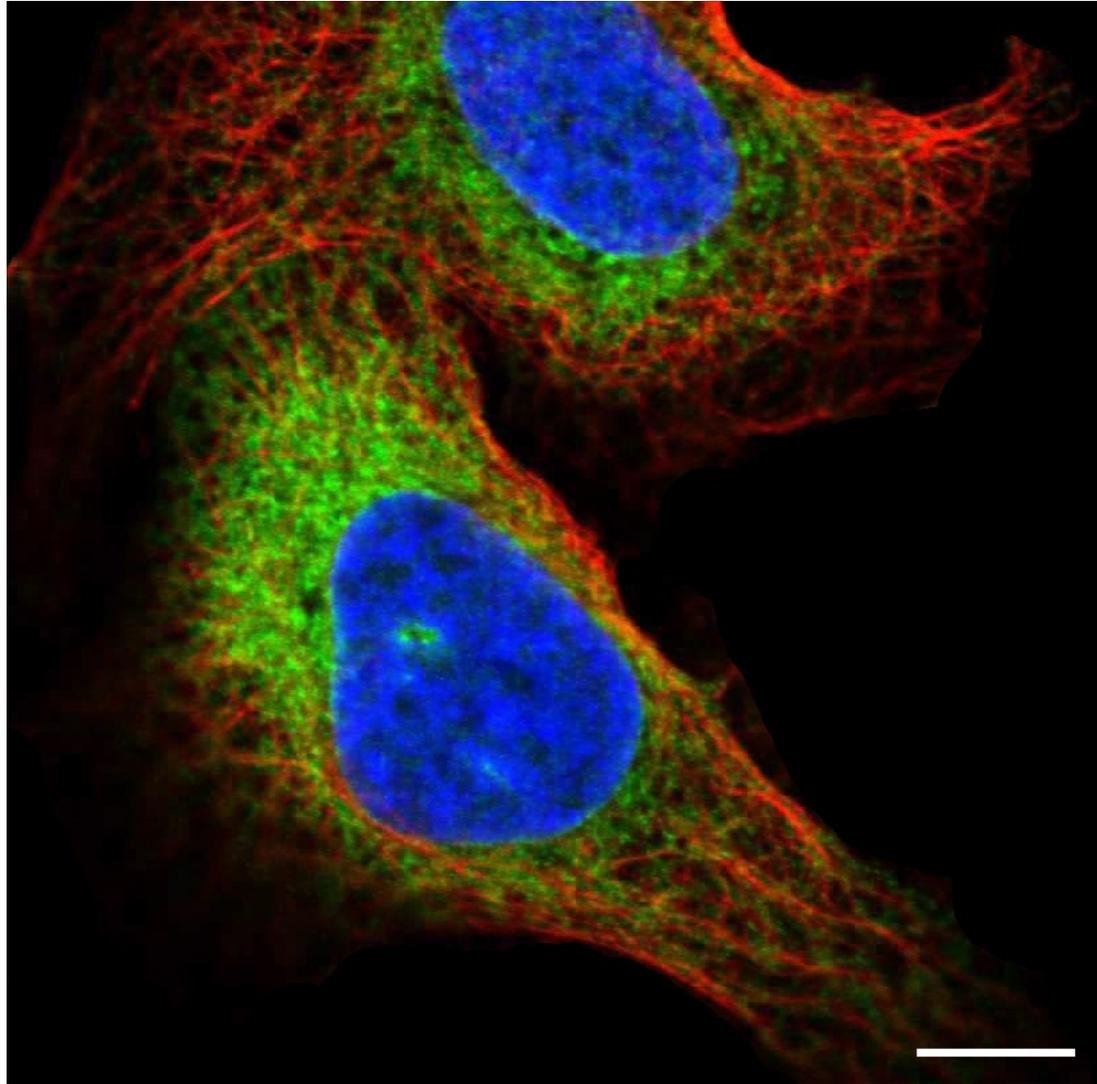
Combinazione I3:

filtro d'eccitazione 450-490/ lamina dicromatica 510 / filtro di sbarramento 515

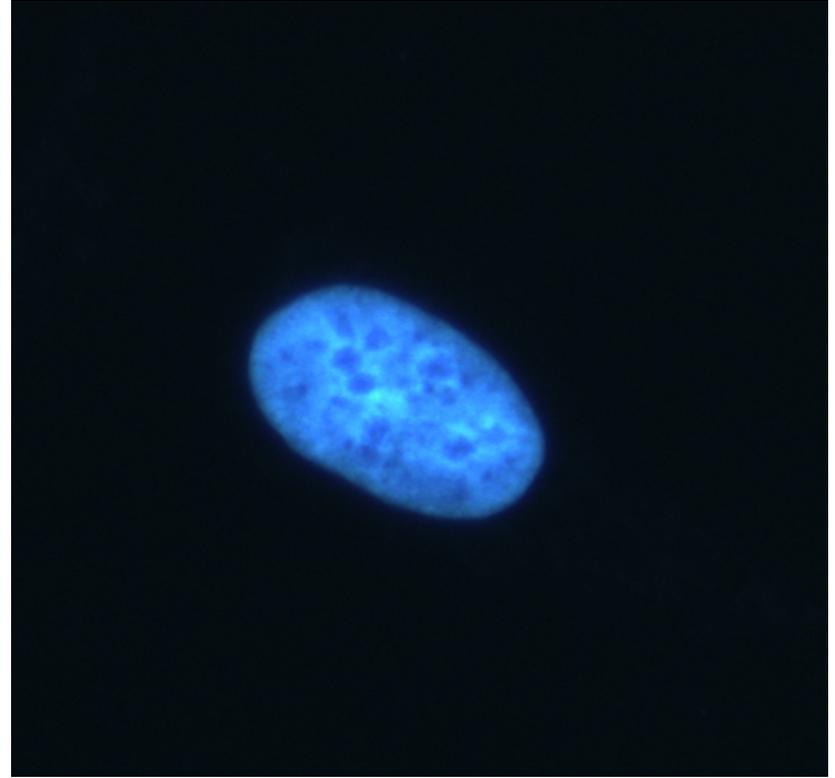
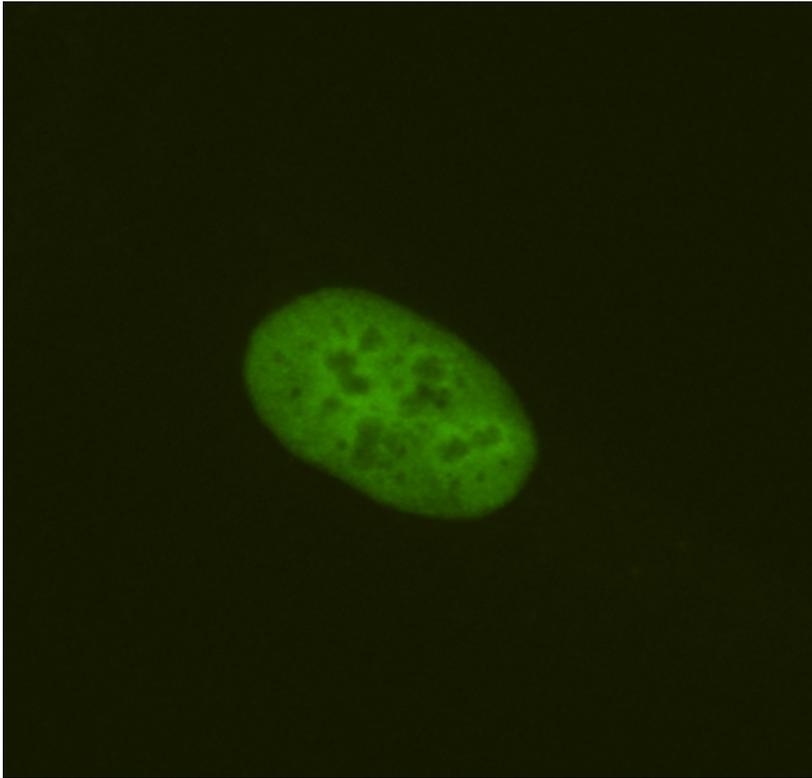
Combinazione N2.1:

filtro d'eccitazione 515-560/ lamina dicromatica 580/ filtro di sbarramento 590

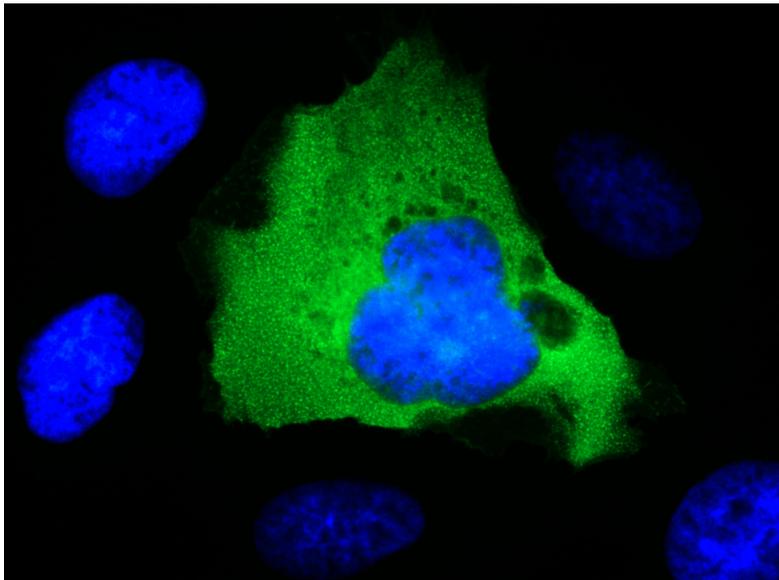
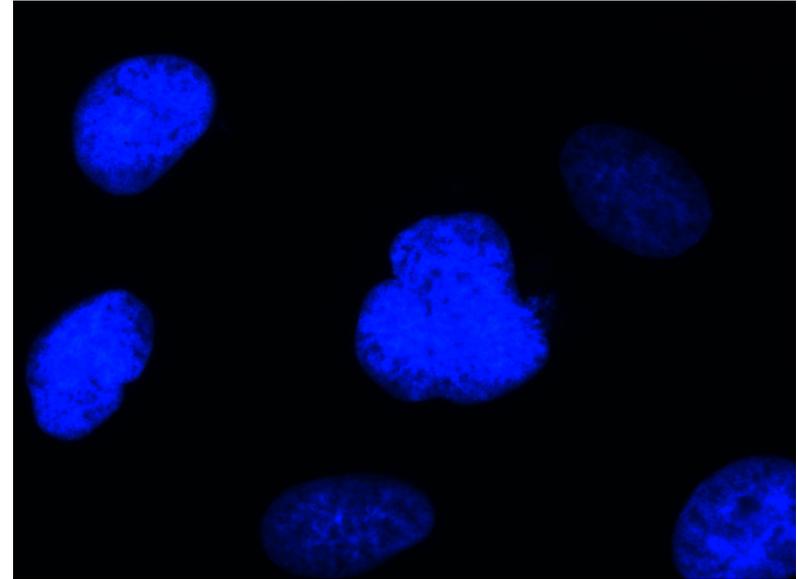
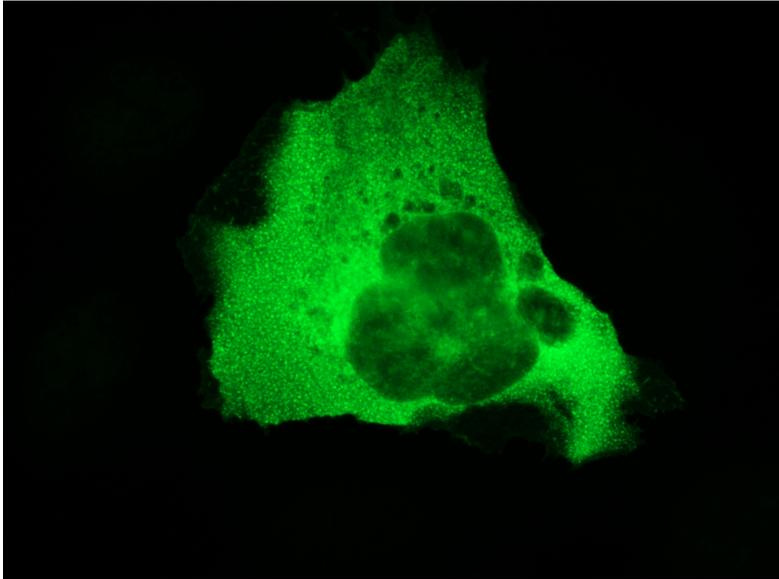
SREBP alto colesterolo



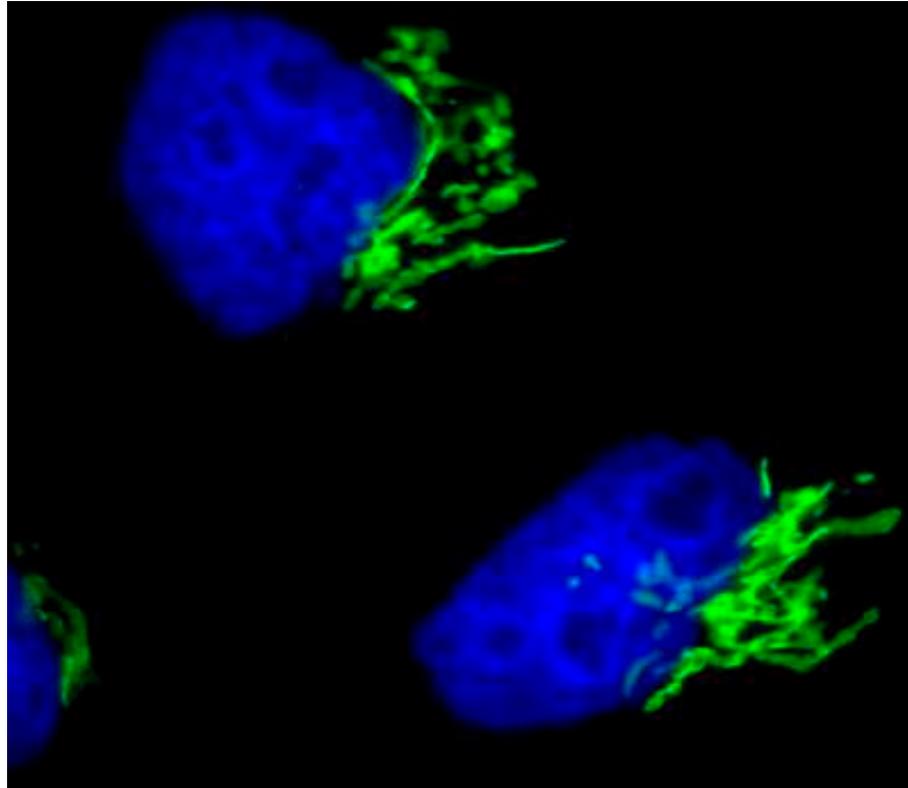
SREBP basso colesterolo



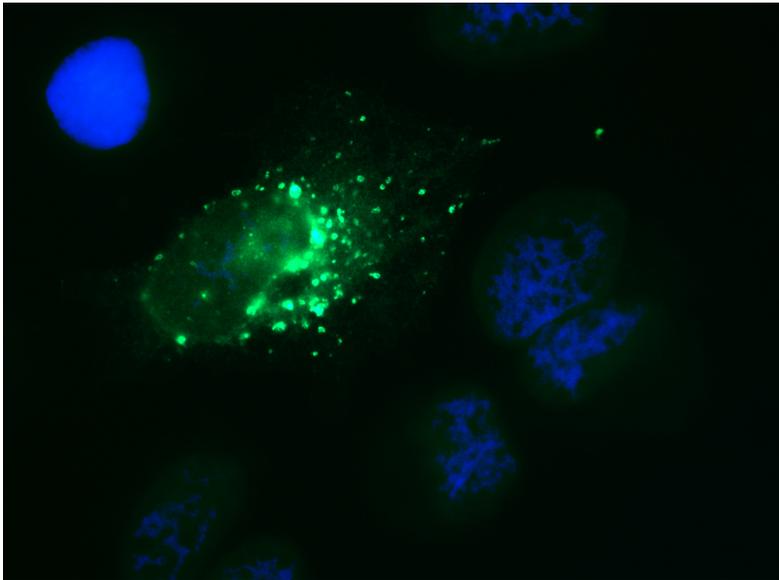
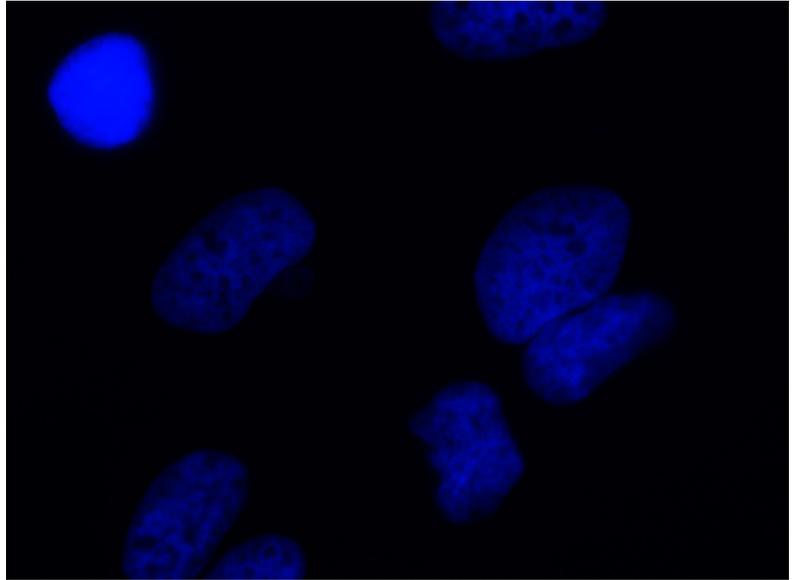
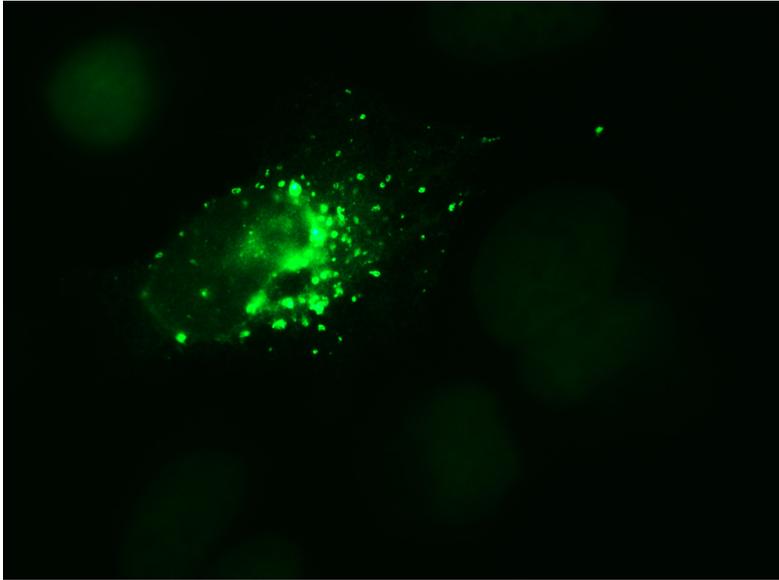
SREBP Δ NLS: cytoplasm



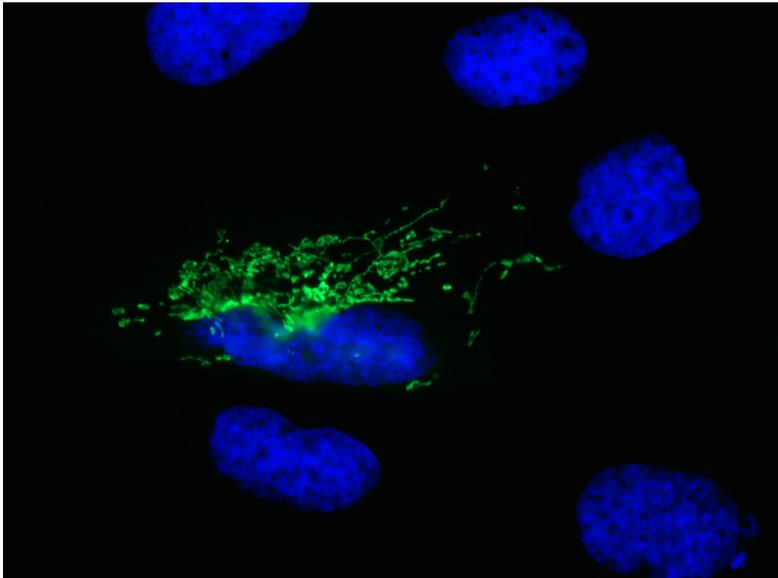
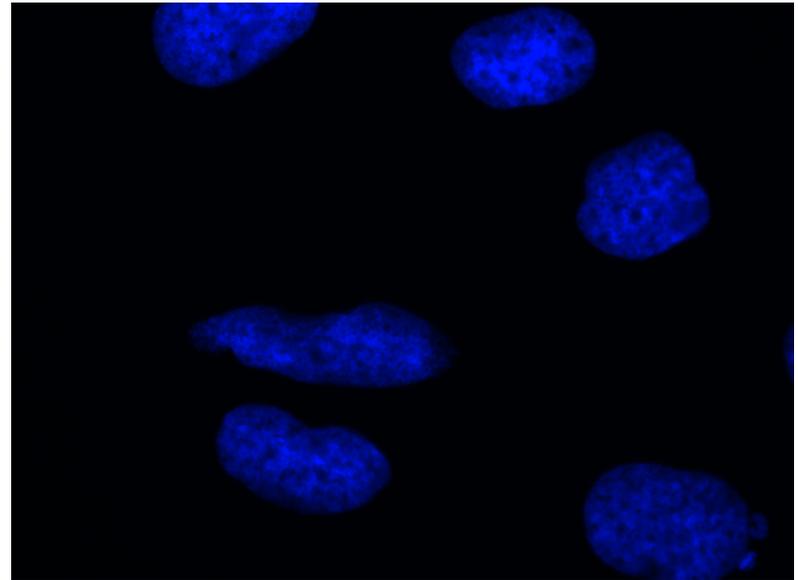
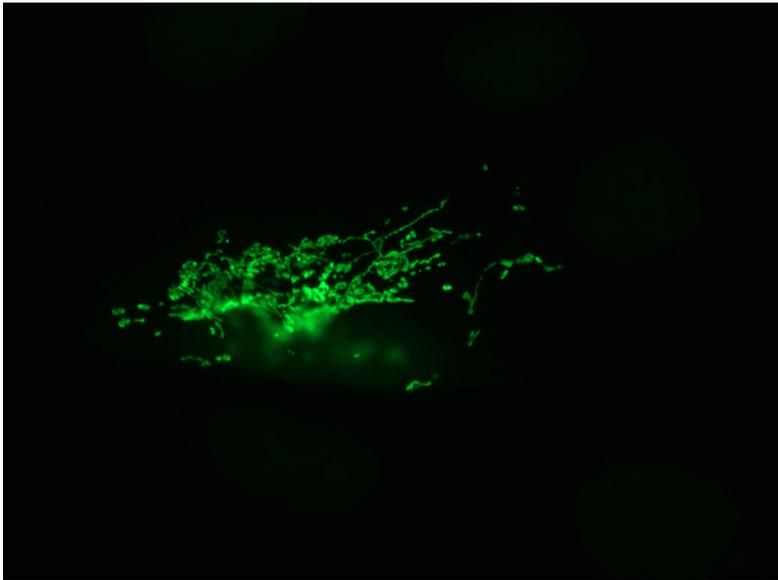
Golgi



COP1 vesicles



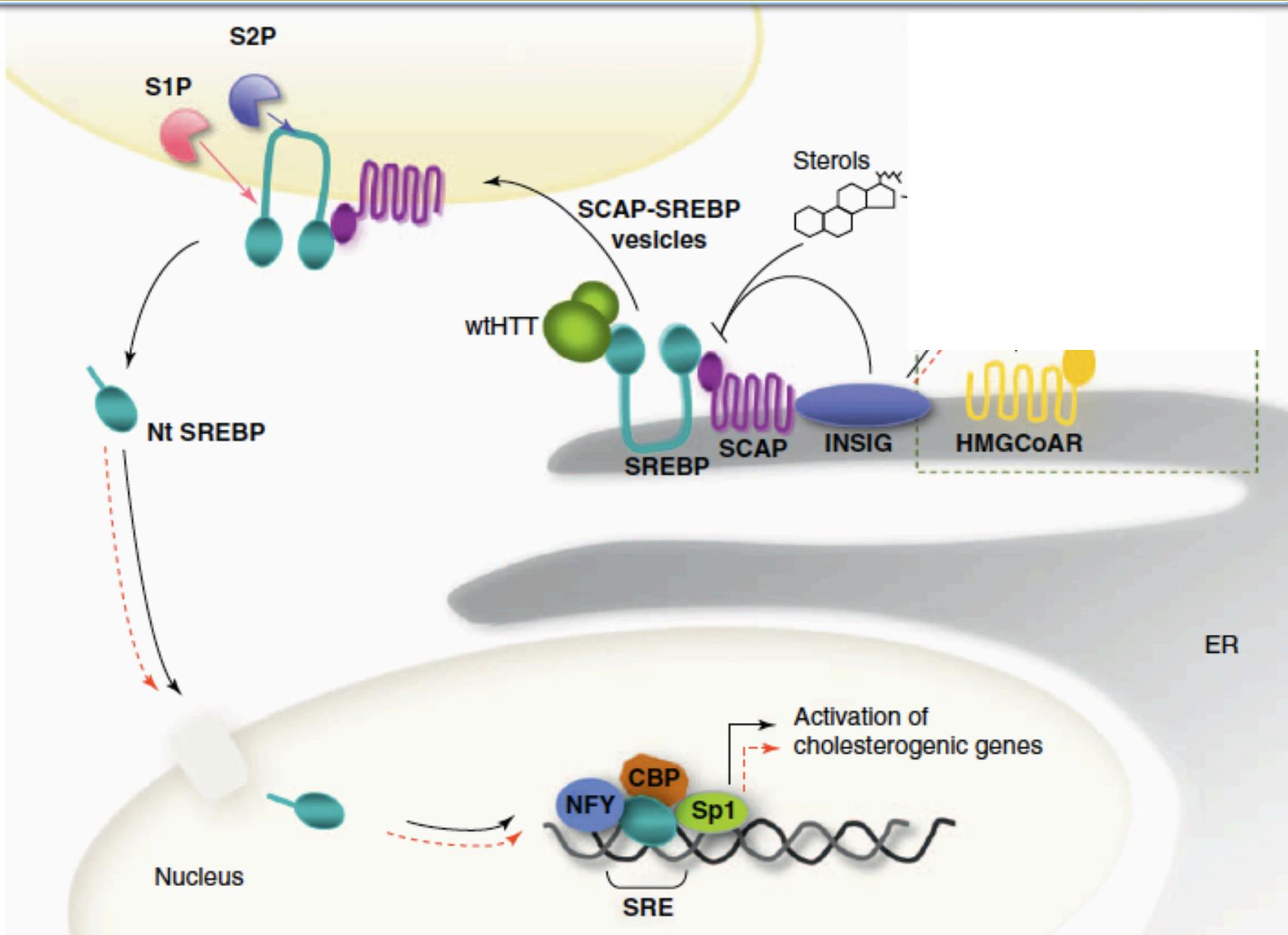
SUCCINATO DEIDROGENASI: mitocondrio



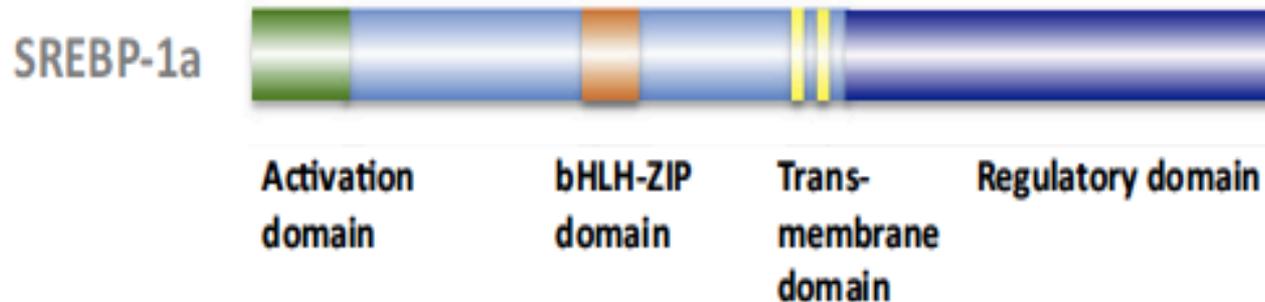
Esperimento virtuale:

Studio del ruolo del coattivatore NFY nell'induzione dei geni bersaglio di SREBP

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



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



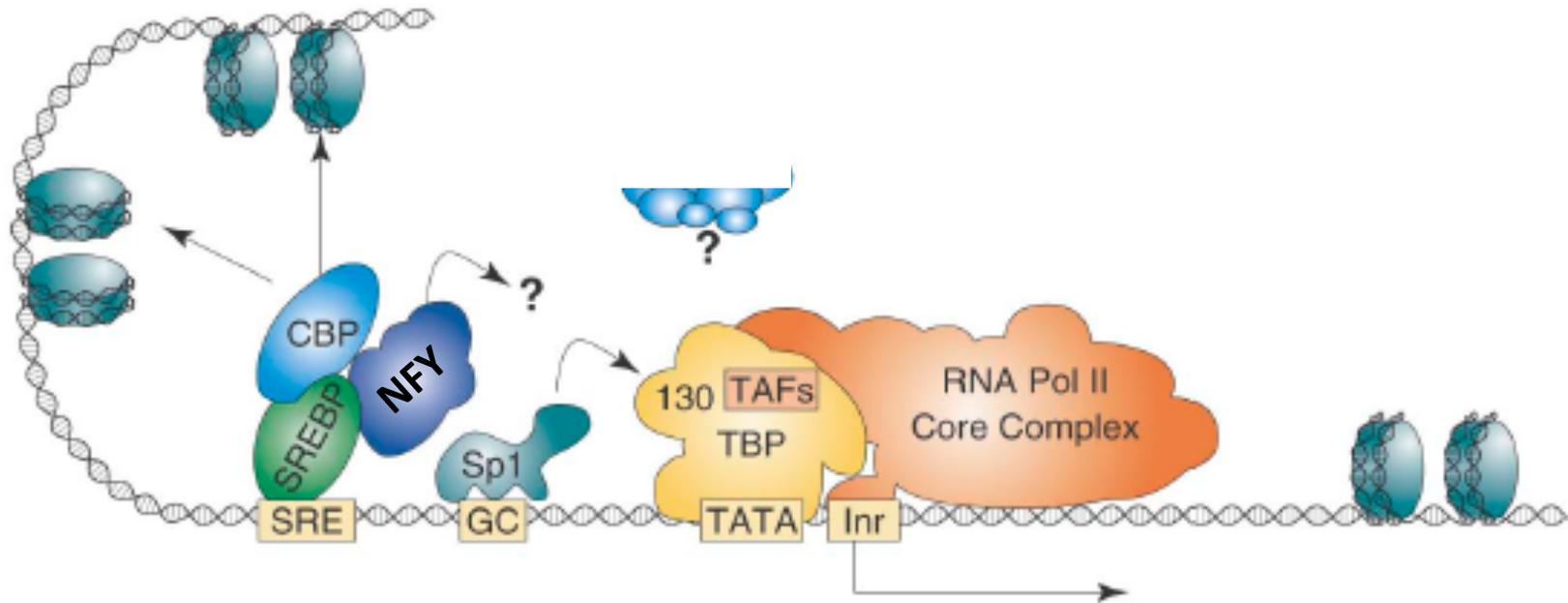
dominio di
attivazione
trascrizionale

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.)

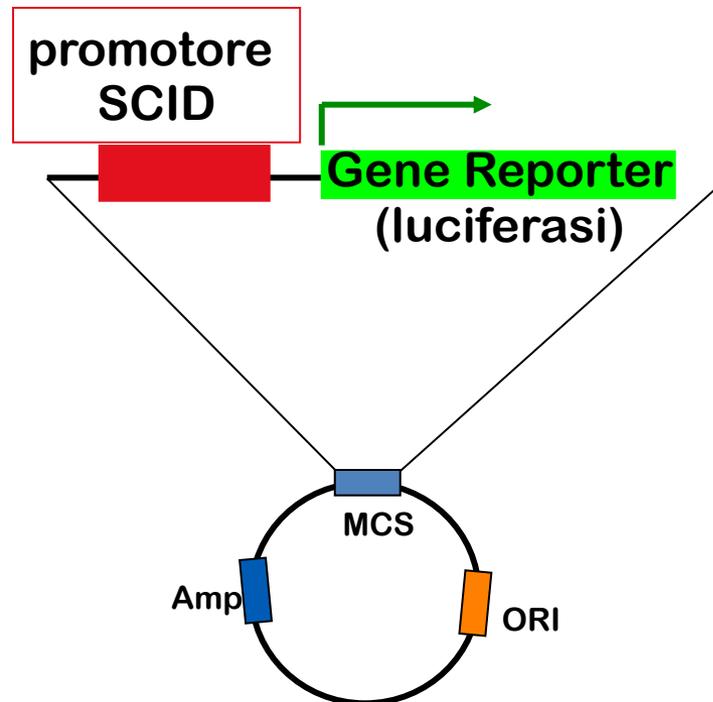
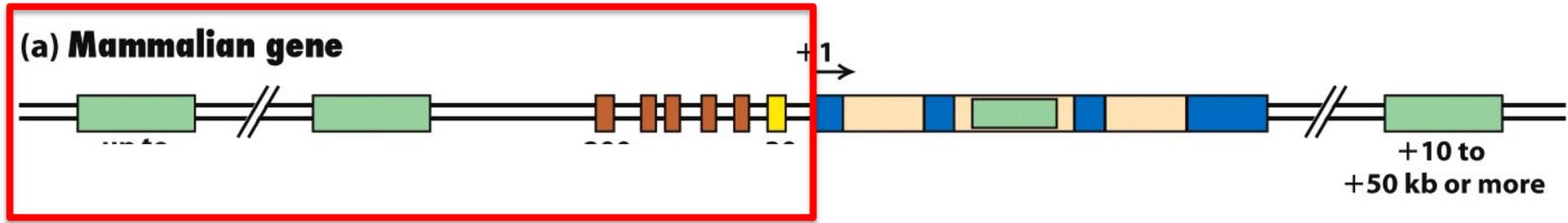
Ruolo del coattivatore NFY nell'induzione dei geni bersaglio di SREBP



Näär et al., PNAS 1998

Strategia sperimentale

Step 1: clonaggio del promotore SCD1 a monte del gene reporter luciferasi



Schema dell'esperimento

1- livello BASALE

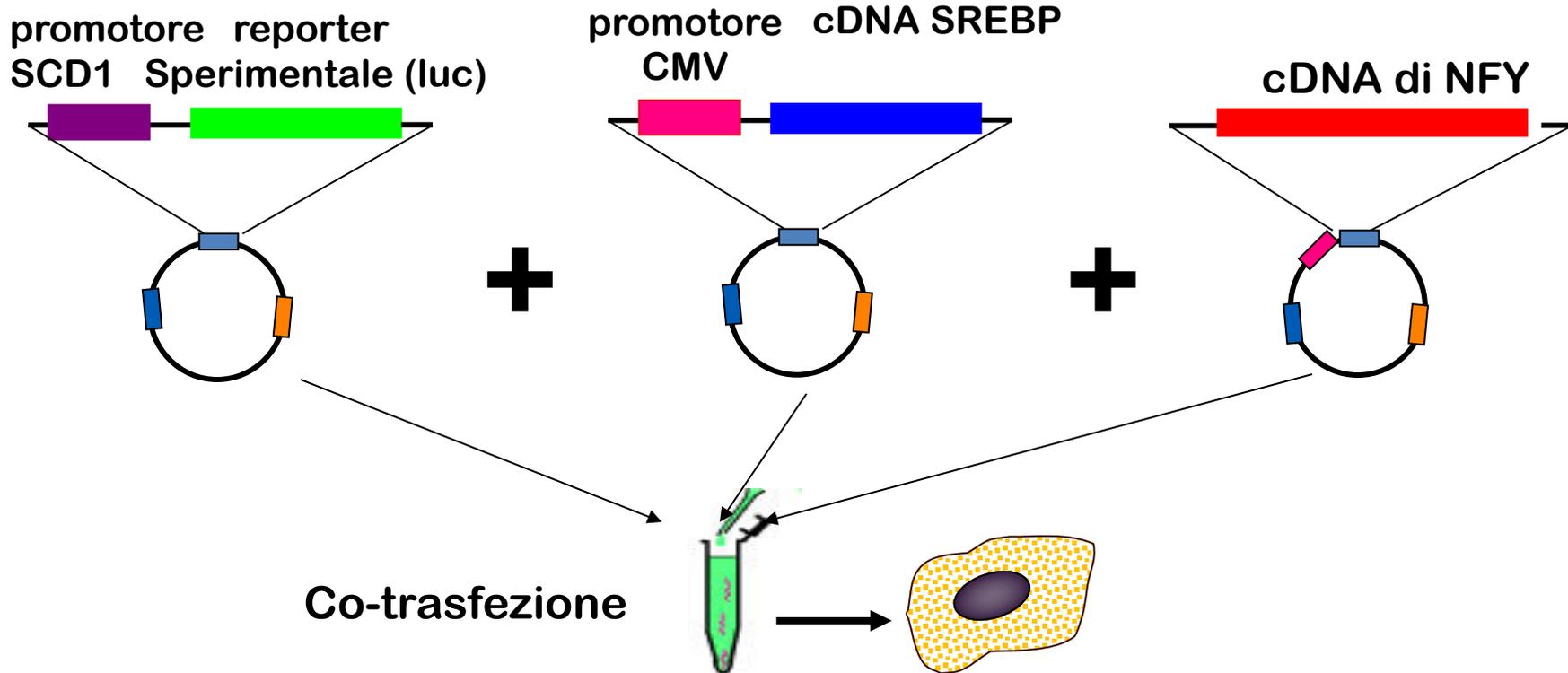
reporter pPROM-luc + vettore vuoto pcDNA3

2- effetto di SREBP1

reporter pPROM-luc + vettore pcDNA3-SREBP

3- contributo di NFY

reporter + pcDNA3-SREBP+ vettore pcDNA3-NFY



Step 2: clonaggio del cDNA di SREBP1a nel vettore di espressione pcDNA3 in fusione con il TAG HA

Name: pcDNA3

Insert: SREBP1a-HA

Original vector:

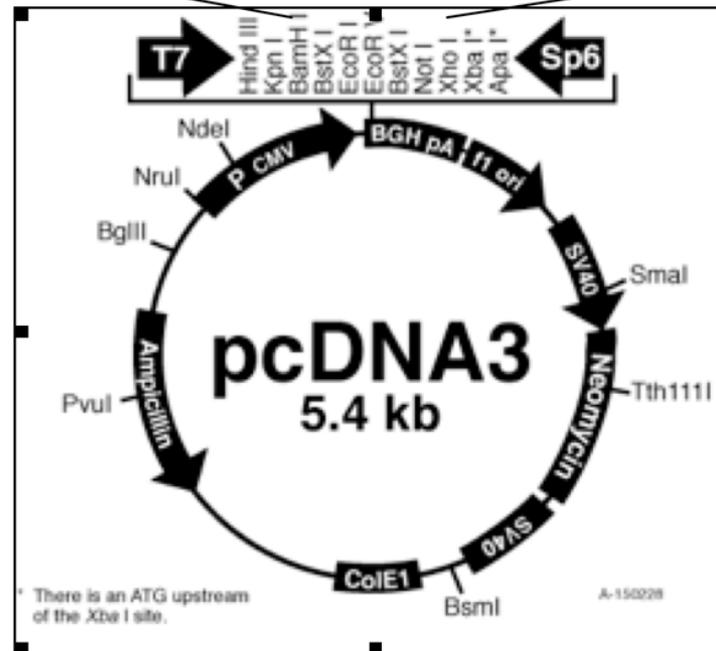
Selection: Amp^R (prokaryotic); Neo^R (eukaryotic)

Ref:

Notes:

BamHI

XhoI



**Step 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

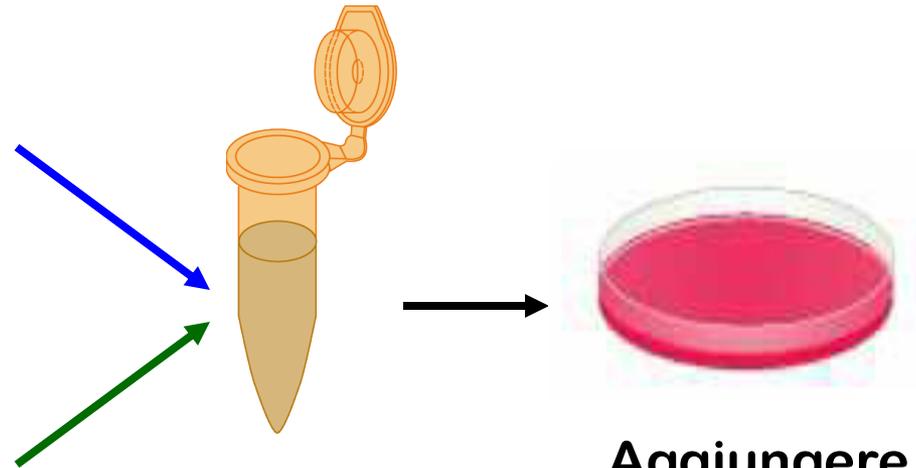
L: 10 min a TA

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)**
+ **vettori di espressione**

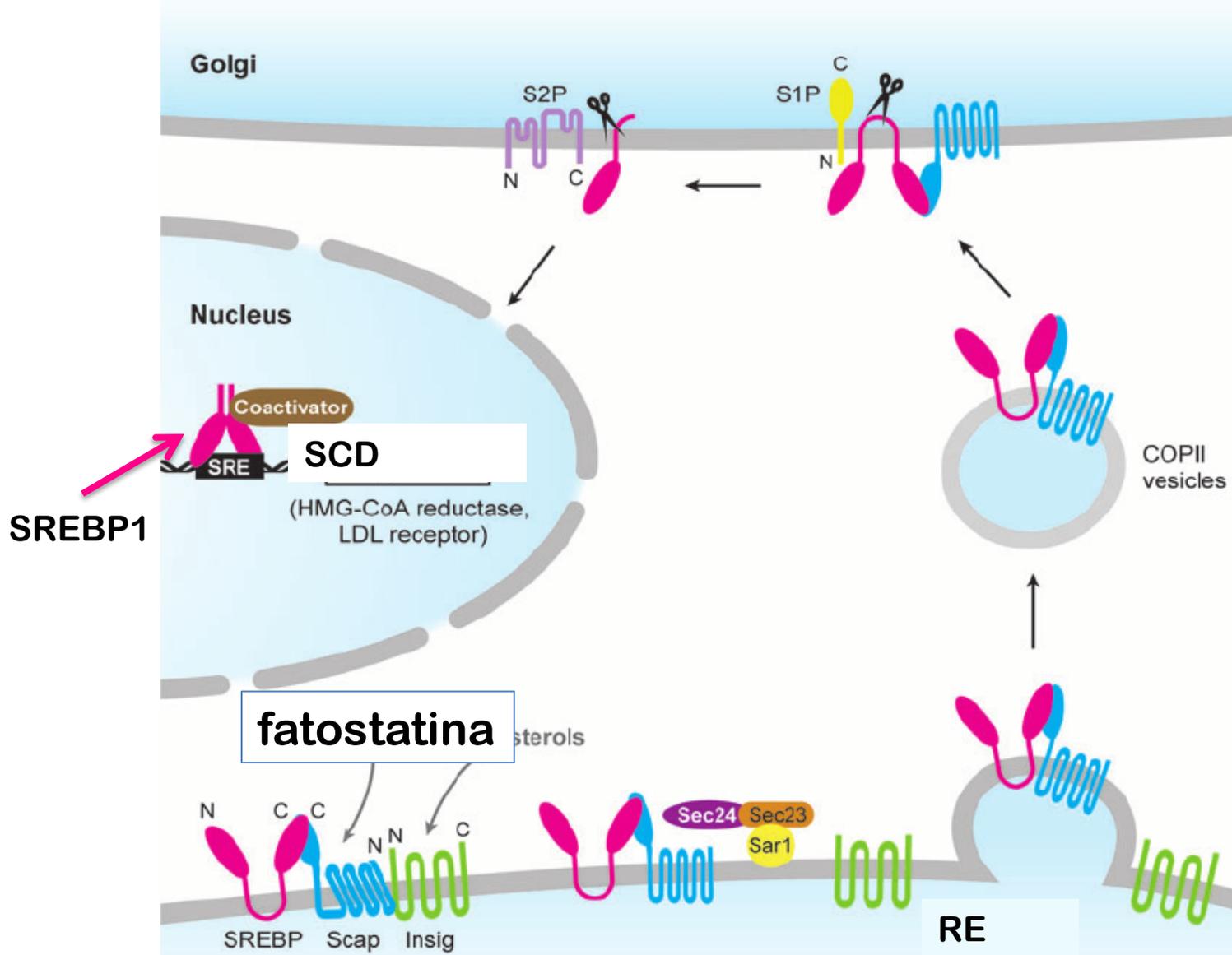


Mix L+D:
20 min a TA

formazione
complessi
LIPIDE-DNA

Aggiungere
i complessi
alle cellule

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

Saggi di transattivazione: confronto di TF1 e TF2

1- LIVELLO BASALE

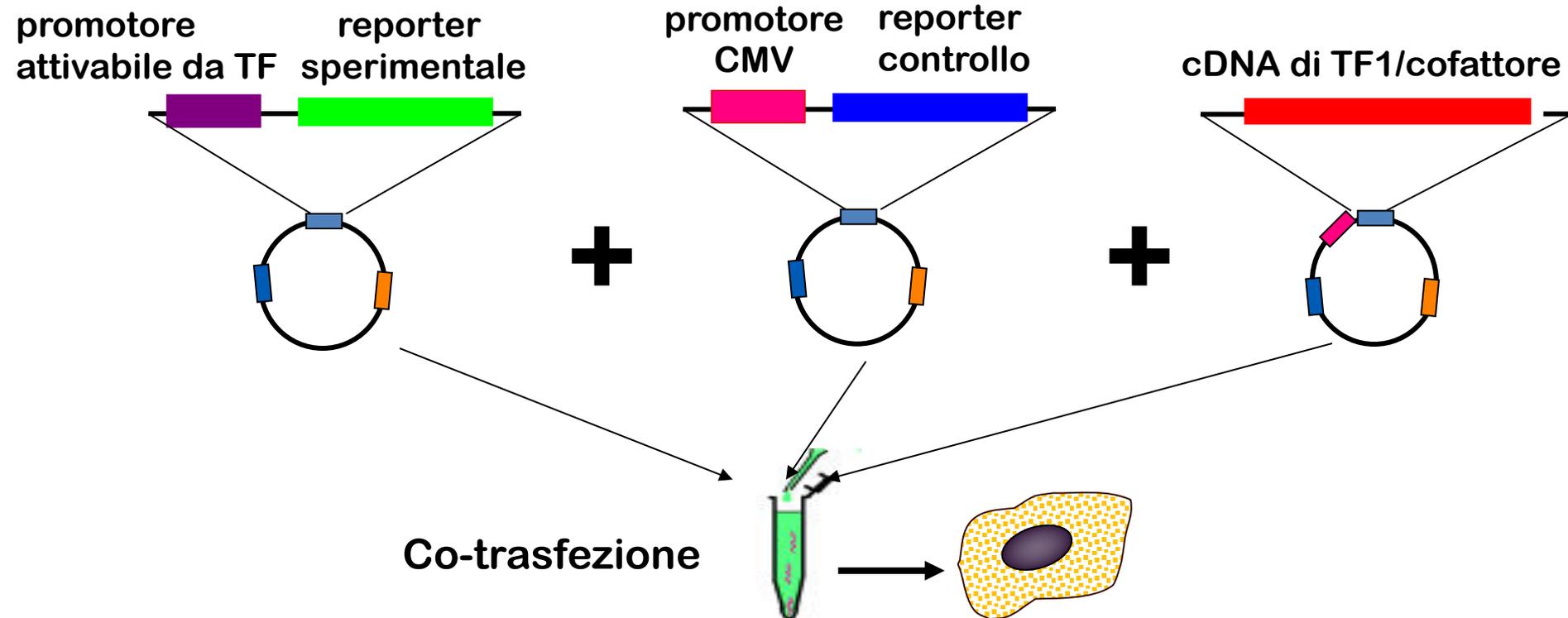
reporter sper.+ reporter controllo + vettore vuoto
(pPROM-luc) (pCON-Rluc) (pcDNA3)

2- effetto SREBP

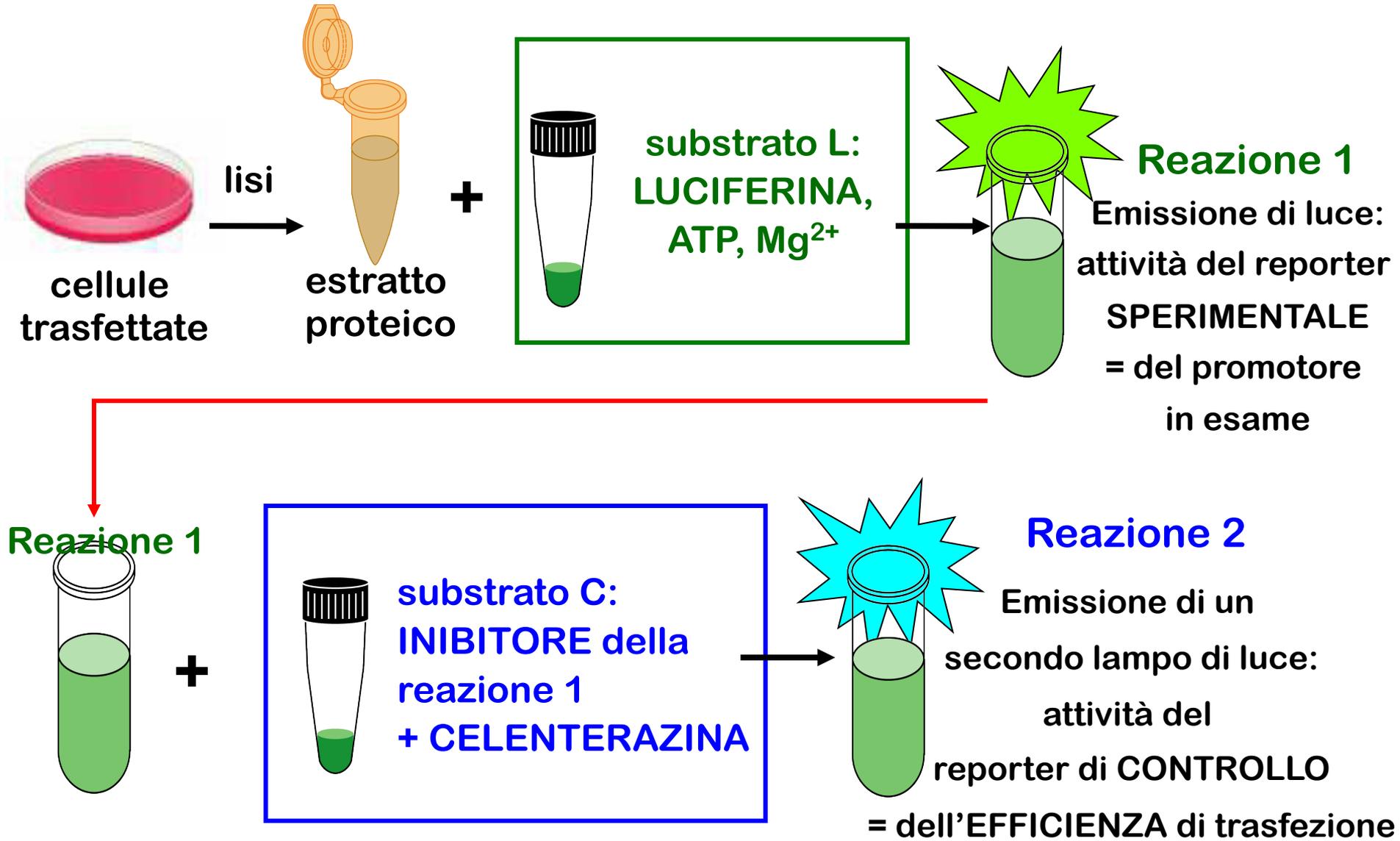
reporter sper.+ reporter controllo + vettore per SREBP

3- effetto SREBP + cofattore

reporter sper.+ reporter controllo + vettore per il cofattore



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



NORMALIZZAZIONE:

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



Val. misurato 1 = 10/ efficienza 0,5

Val. corretto= 20



“ “ 2 = 20/ “ 0,5

Val. corretto= 40 (2x)



“ “ 3 = 20/ “ 0,25

Val. corretto= 80 (4x)

Risultato: **TF1** attiva il promotore, aumentando la trascrizione
del reporter di **2 volte**

l'aggiunta del **cofattore** ha un'attività trascrizionale superiore, poichè
aumenta la trascrizione del reporter di **4 volte**.

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