

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2020-2021

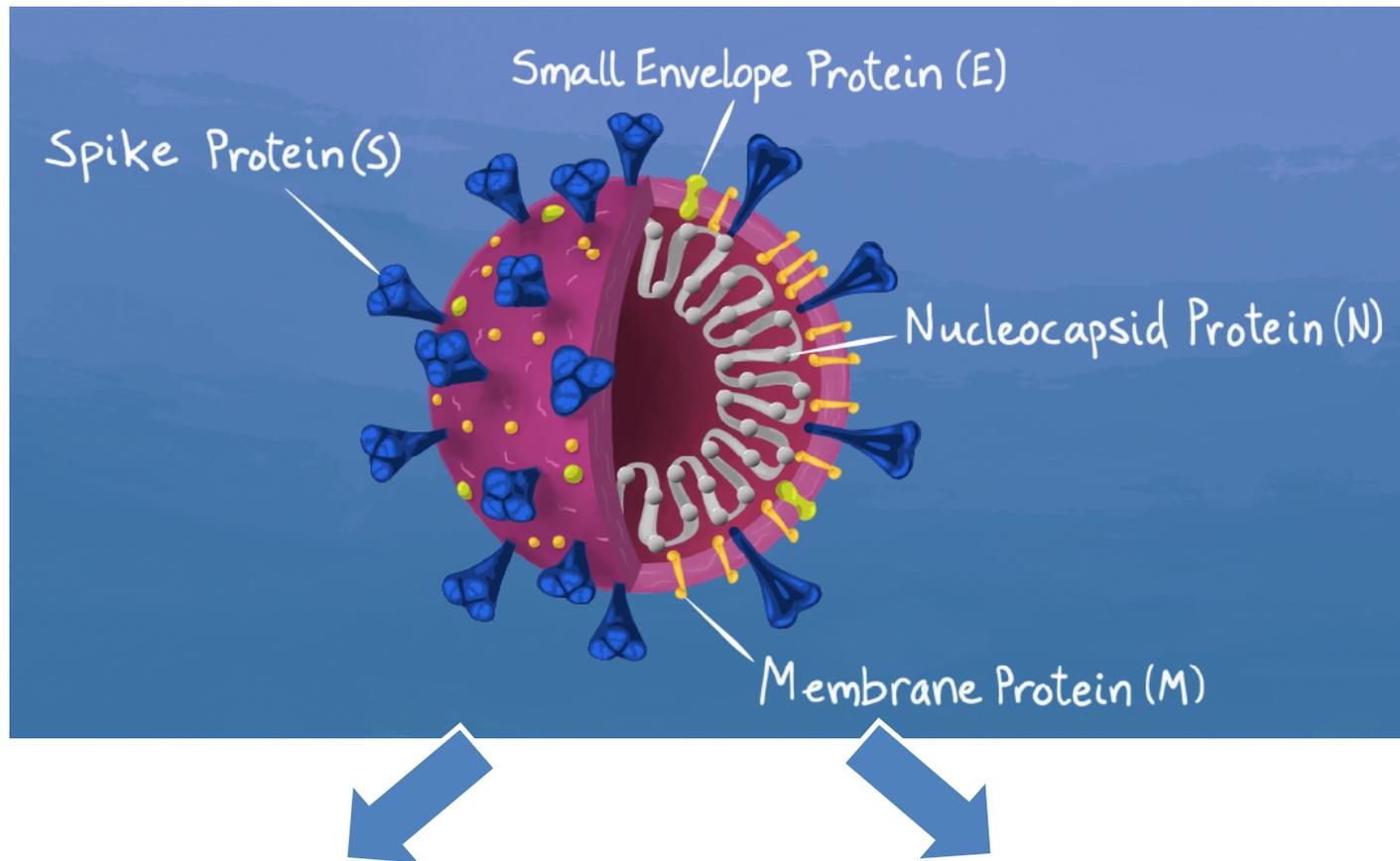
Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 3

**TRASFERIMENTO DI ACIDI NUCLEICI IN
CELLULE DI MAMMIFERO**

Piano sperimentale:

Sovraespressione transiente di proteine del virus SARS-CoV-2 allo scopo di individuare gli organelli cellulari e le proteine cellulari essenziali per l'infezione.



Localizzazione subcellulare

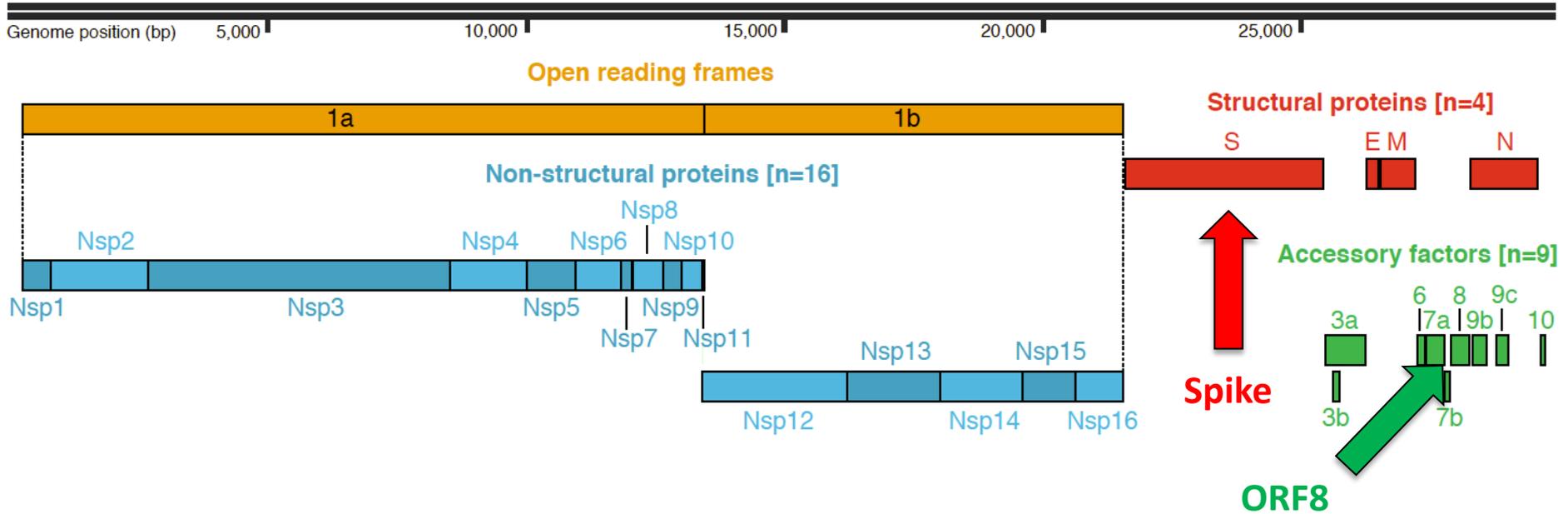
Interazione con proteine cellulari

Vettori di espressione

applicazioni:

- Studio della **funzione** di un gene (codificante o non codificante)
- Studio della **funzione proteica**
 - ✓ Caratterizzazione biochimica
 - ✓ Analisi della **localizzazione** subcellulare
 - ✓ Analisi delle **interazioni** con altre componenti cellulari
 - ✓ Analisi degli **effetti** fenotipici sulla cellula
 - ✓ Analisi **mutazionale**
- **Produzione** e purificazione di una specifica proteina
 - ✓ Analisi dell'**interattoma** (proteine cellulari che interagiscono con quella in esame)

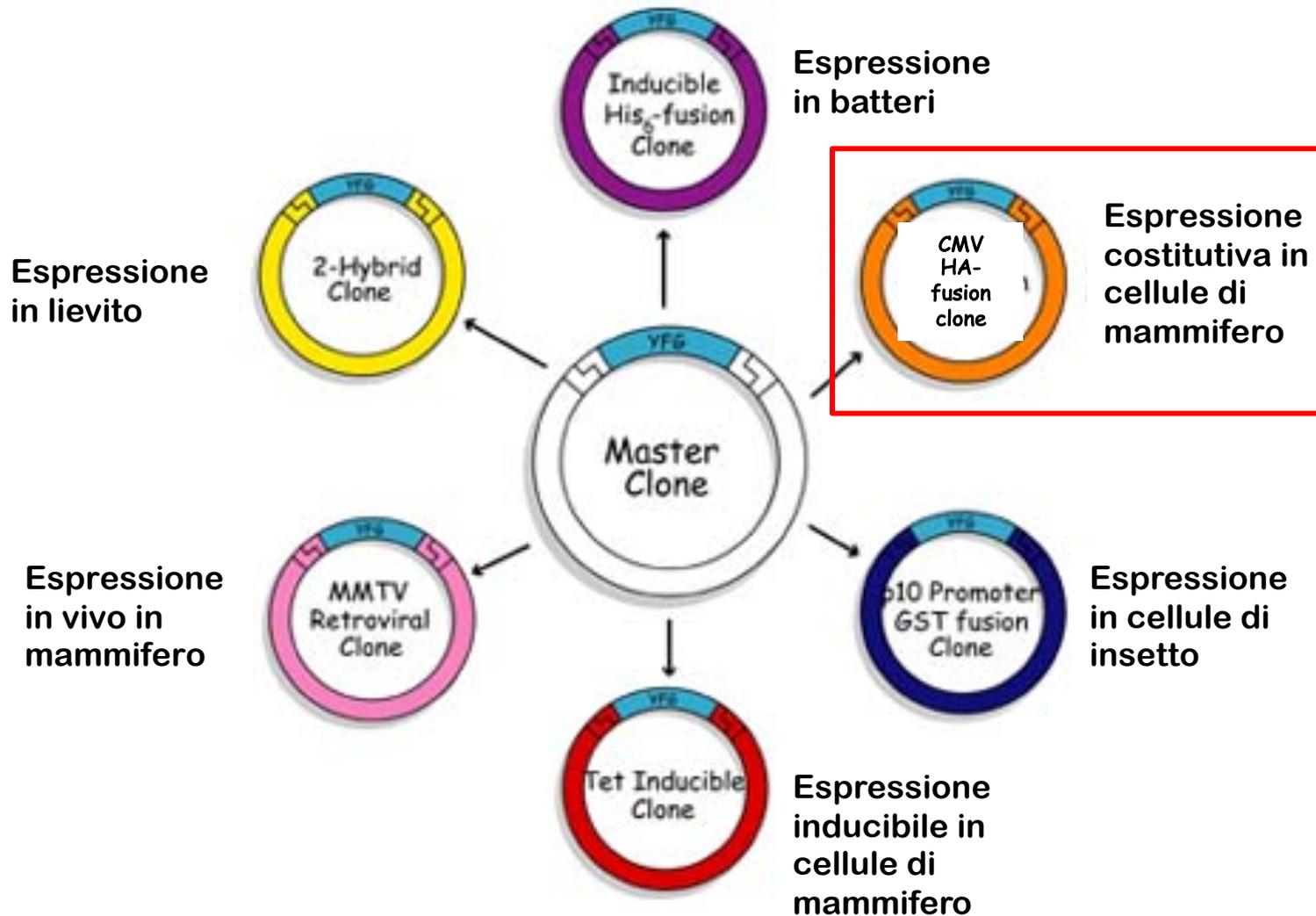
SARS-CoV-2 Genome



Procedura sperimentale

1. **Ottingo il cDNA** inserito in un vettore “shuttle” e lo utilizzo per trasformare un ceppo batterico in modo da **amplificare ed estrarre il costrutto**
2. Controllo il costrutto mediante **analisi di restrizione** ed eventualmente sequenziamento del DNA
3. Procedo al **subclonaggio** in un **vettore di espressione** adatto al mio scopo
4. Scelgo la **tecnica di trasfezione** appropriata per inserire il costrutto nelle cellule scelte per l’esperimento

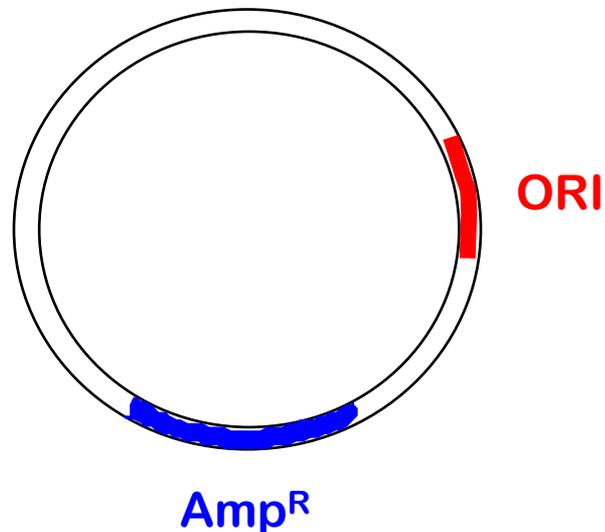
Subclonaggio del master clone da un vettore shuttle



Caratteristiche dei vettori plasmidici di espressione per cellule eucariotiche

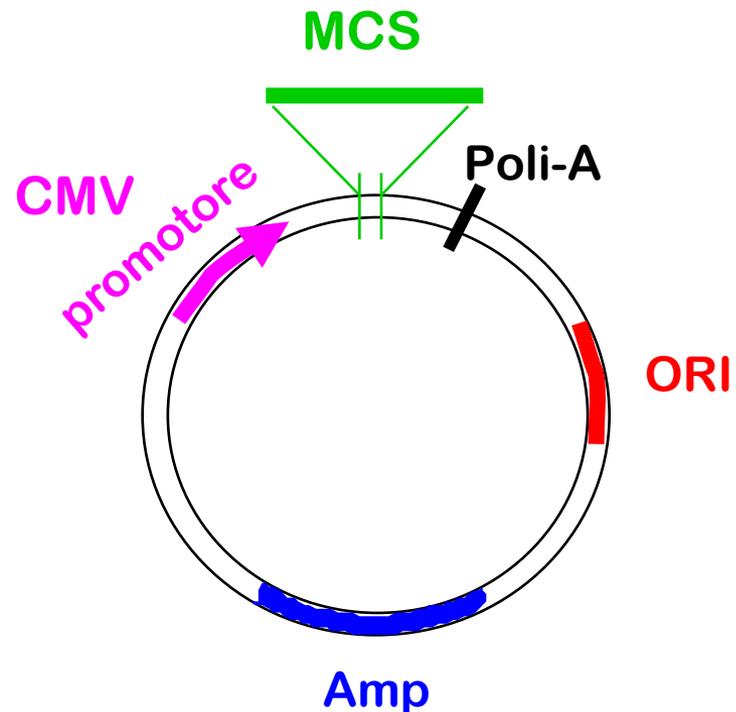
1) Sequenze necessarie per il mantenimento e l'amplificazione in **batteri**

- **Origine di replicazione batterica (ColE1 ori)**
- **Marker per la selezione dei batteri trasformati:
di solito un gene per la resistenza ad un antibiotico (antibatterico)**

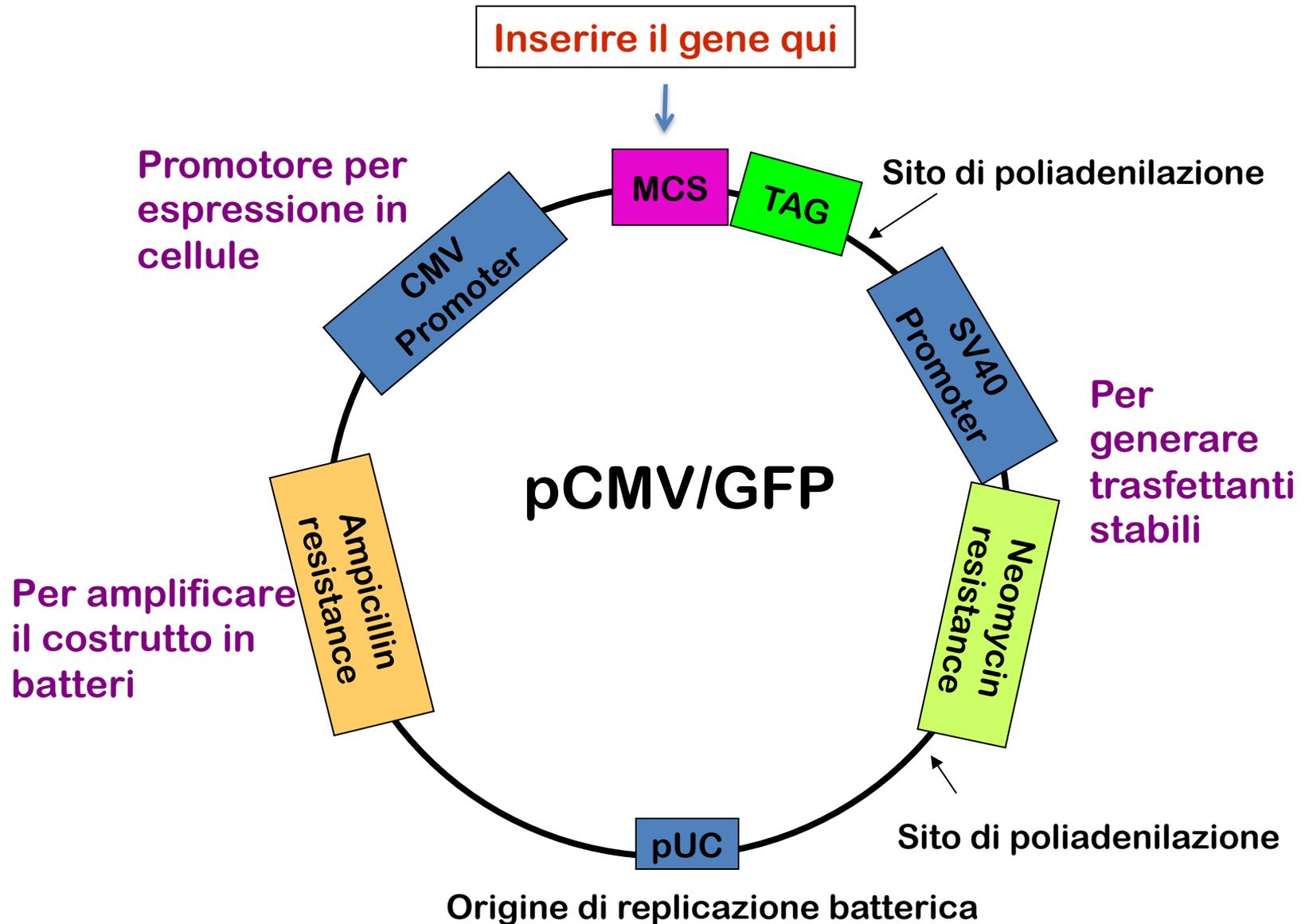


2) Sequenze necessarie al **clonaggio** del gene e alla sua **espressione** in cellule **eucariotiche**:

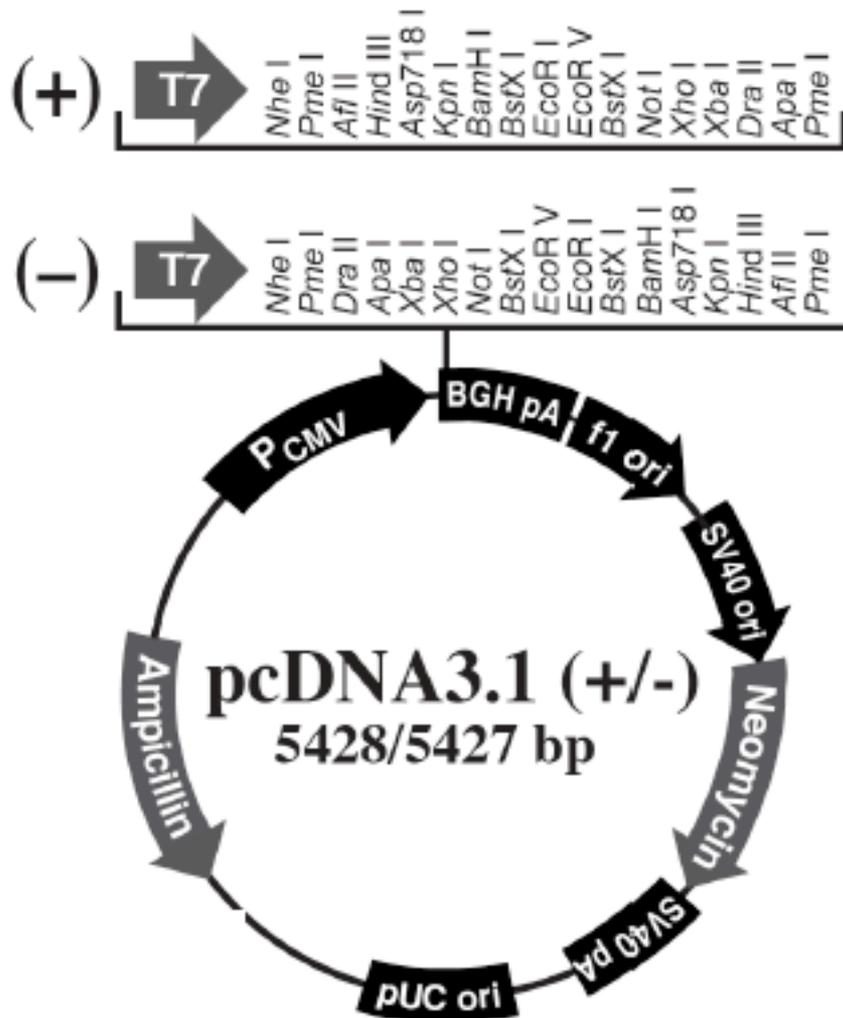
- **MCS** (sito di clonaggio multiplo)
- **promotore** forte virale (CMV, SV40...)
- **segnale di poliadenilazione**



Vettore per espressione di cDNA



Il vettore pCDNA3



P_{CMV}: CMV enhancer-promoter
 BGHpA: BGH polyadenylation
 signal and termination sequence
 f1 origin
 SV40 origin
 SV40 polyadenylation signal
 ampicillin resistance gene
 pUC origin

Espressione di proteine di fusione e TAGs

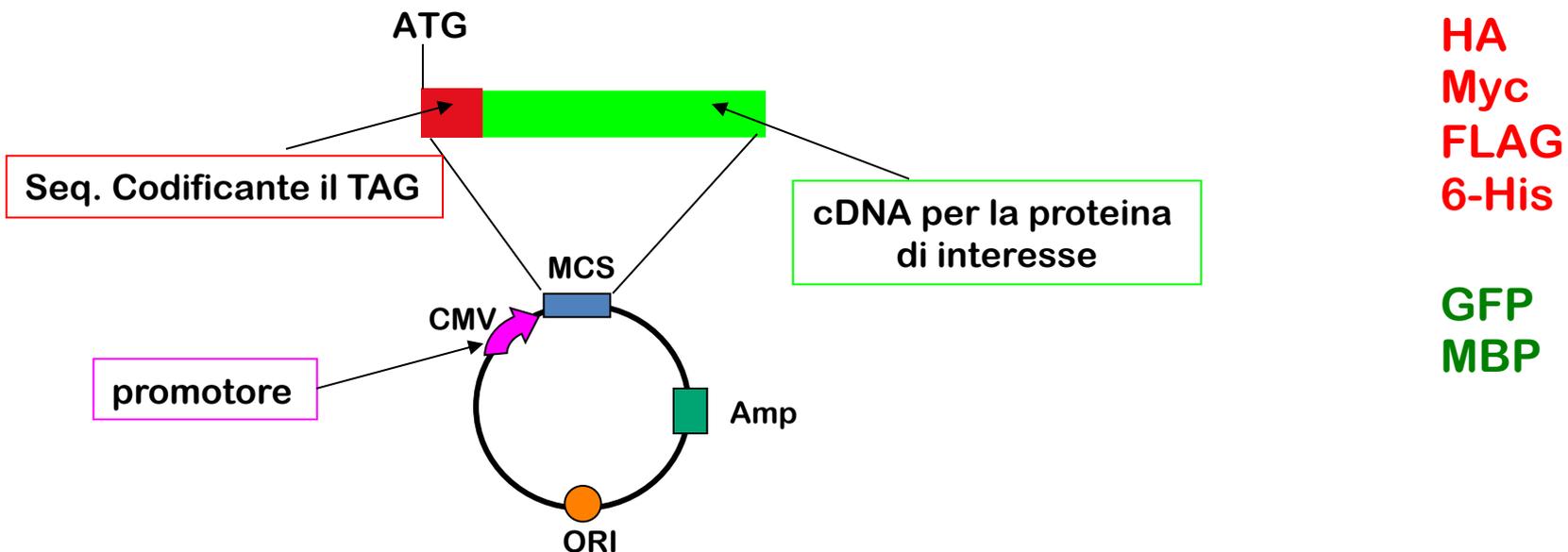
Allo scopo di VISUALIZZARE, RECUPERARE O PURIFICARE una proteina sovraespressa,

è possibile sovraesprimere la **proteina in fusione** con un **polipeptide (GFP, MBP)** o con un **TAG** = un corto **peptide (epitopo** formato da 10 aa in media) che non modifichi le proprietà biologiche della proteina

La sequenza codificante il TAG è inserita in un **vettore di espressione** e **clonata nella stessa cornice di lettura (in frame)** al **cDNA** codificante la proteina, a monte o a valle.

Quindi il TAG può essere fuso all'N o al C-terminale della proteina:

NB: bisogna controllare che la cornice di lettura sia mantenuta!

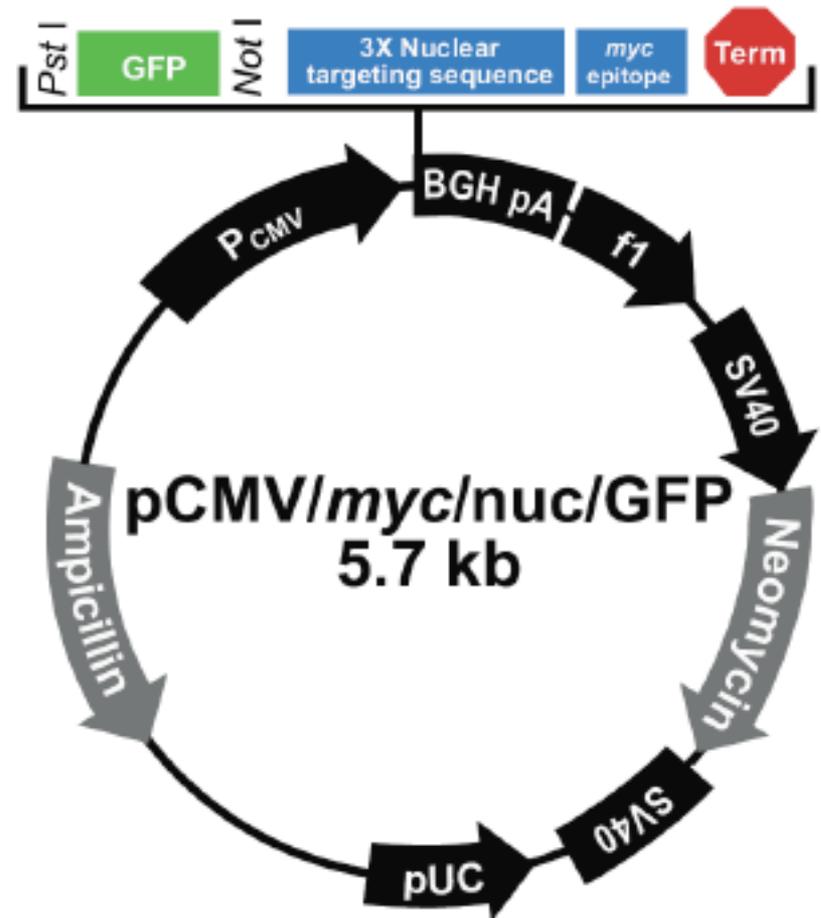
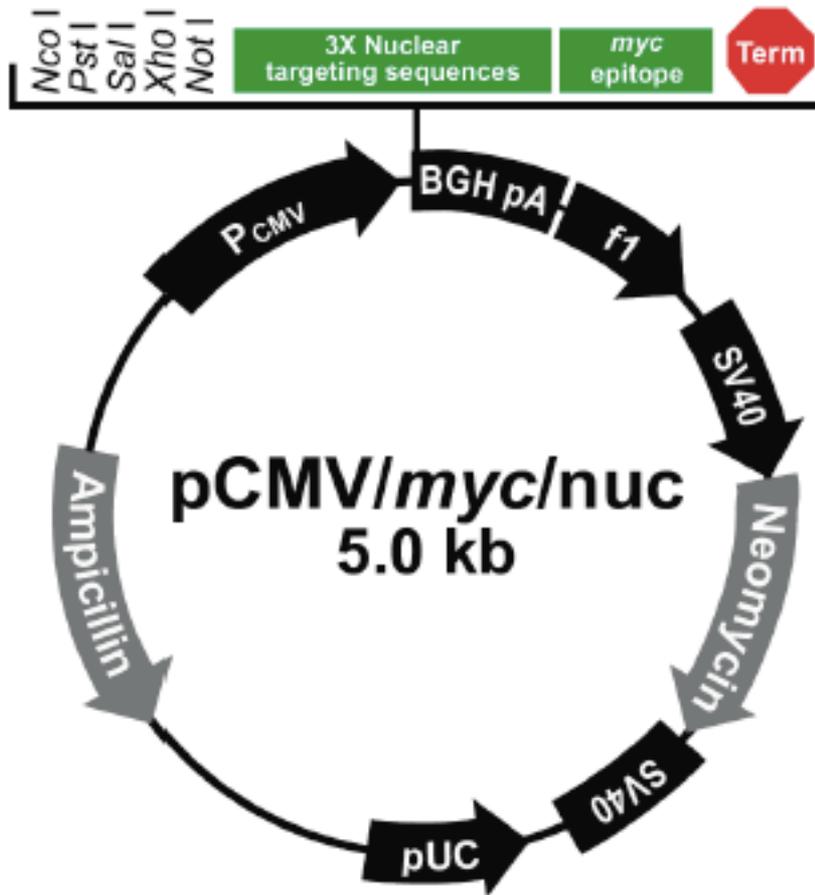


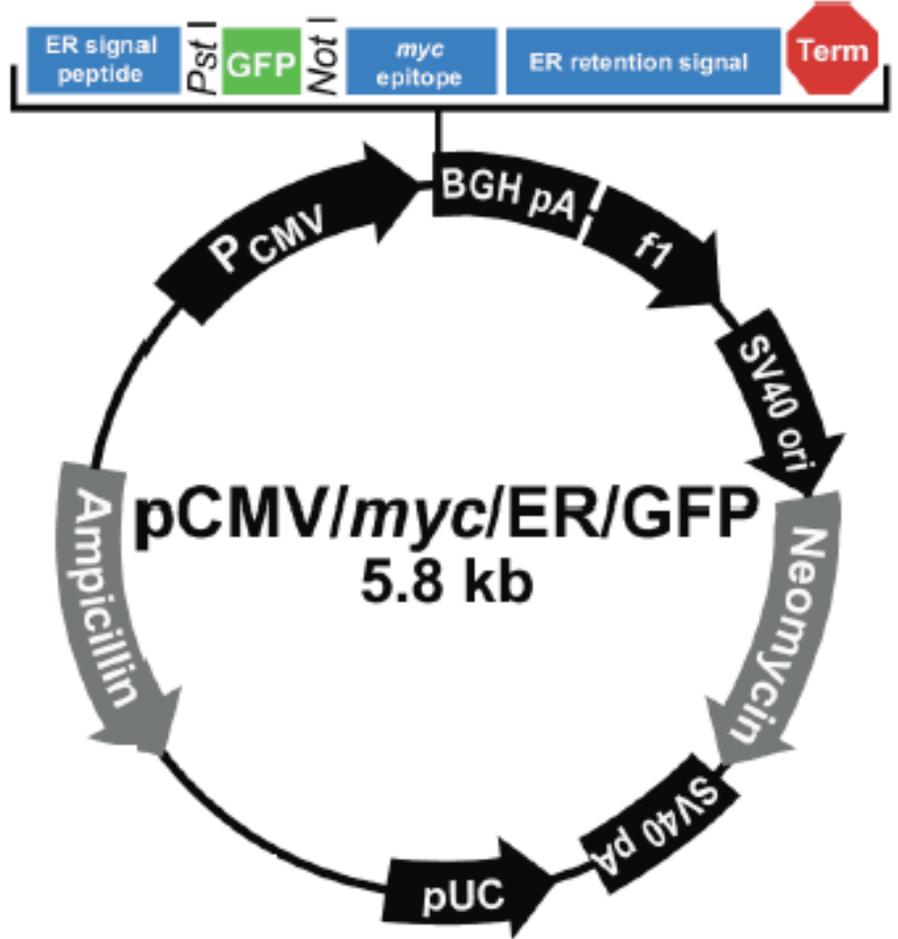
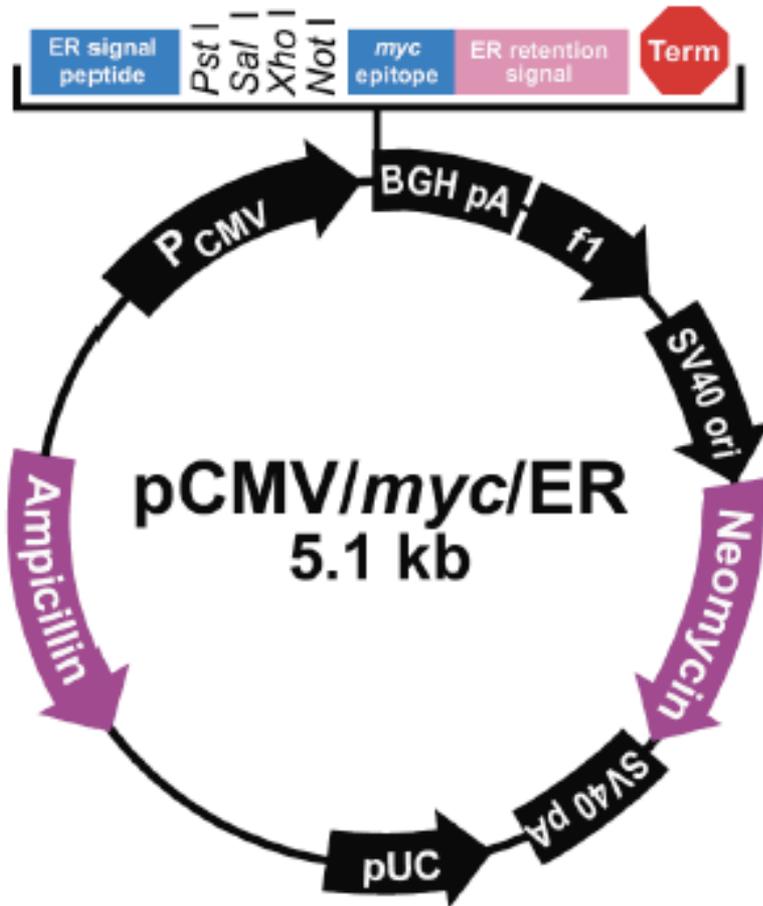
Problema:
**dirigere l'espressione di una proteina ectopica a
una specifica localizzazione subcellulare**

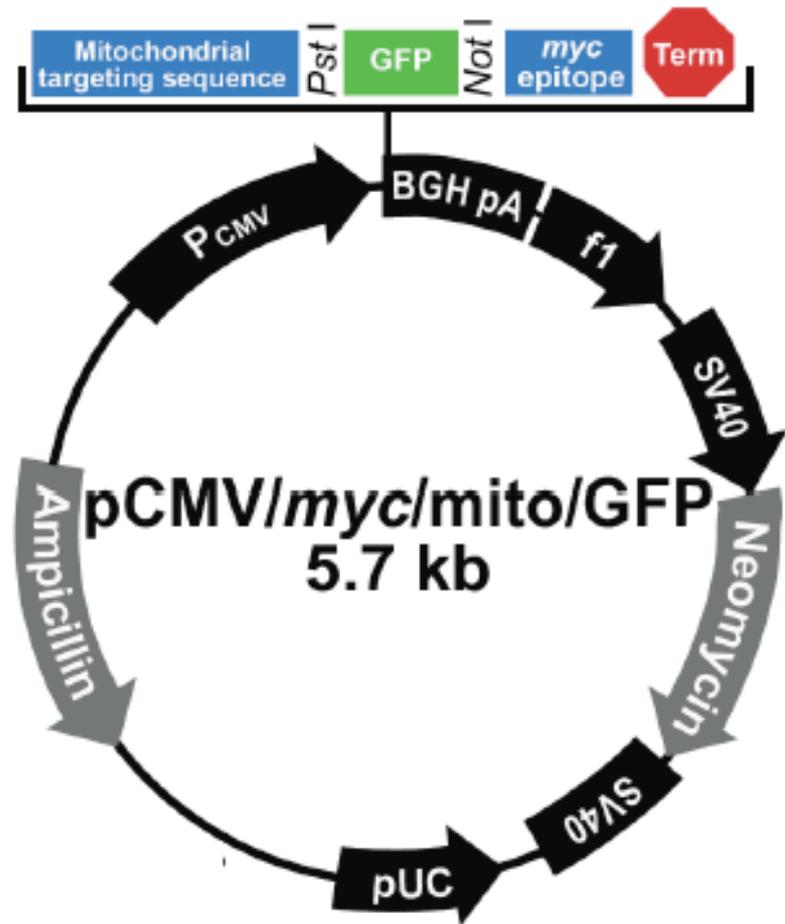
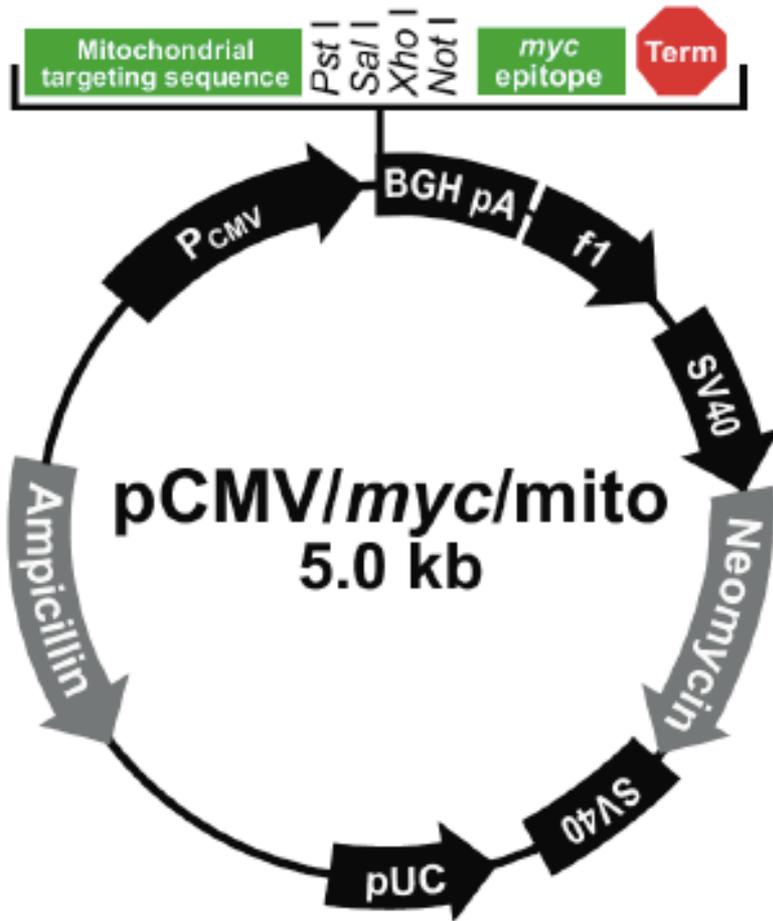
Problema:
**dirigere l'espressione di una proteina ectopica a
una specifica localizzazione subcellulare**

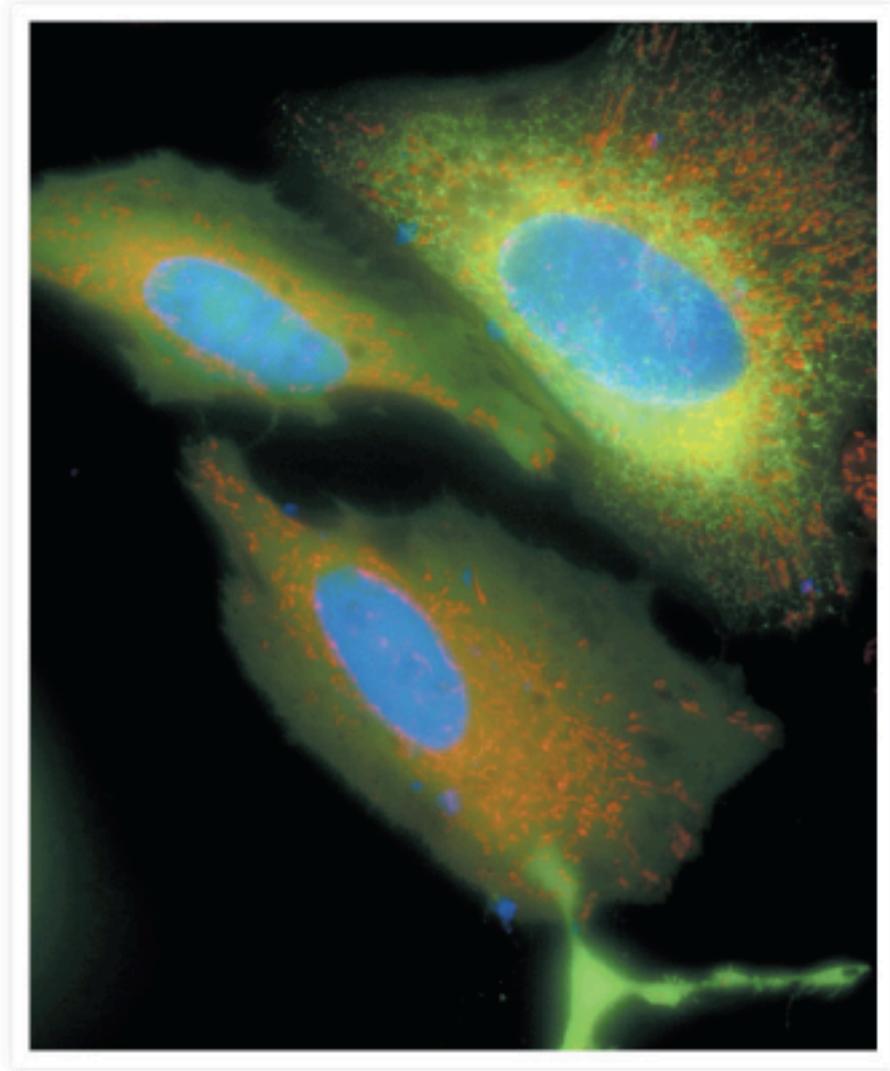
**Soluzione: vettori di espressione che contengono
sequenze SEGNALE**

Localizzazione subcellulare di proteine di fusione

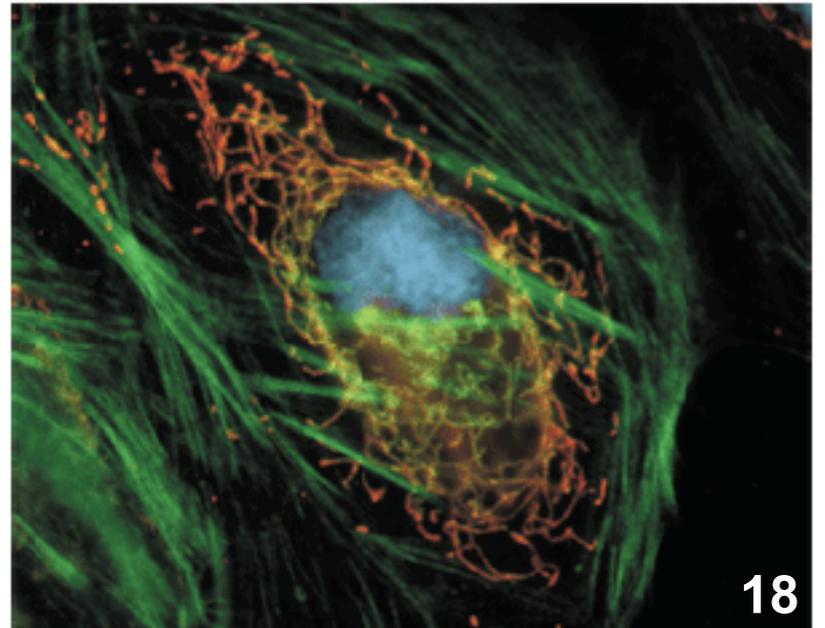
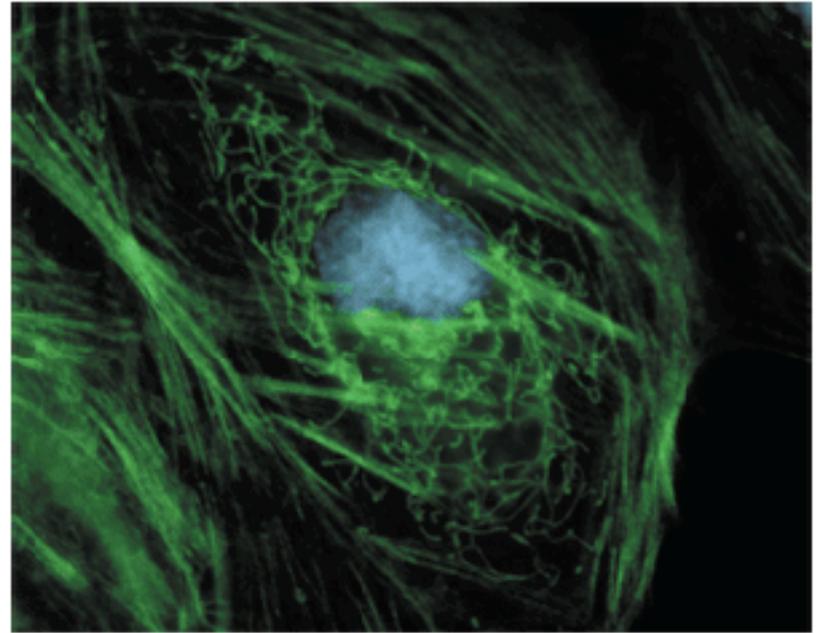








pShooter (ER)

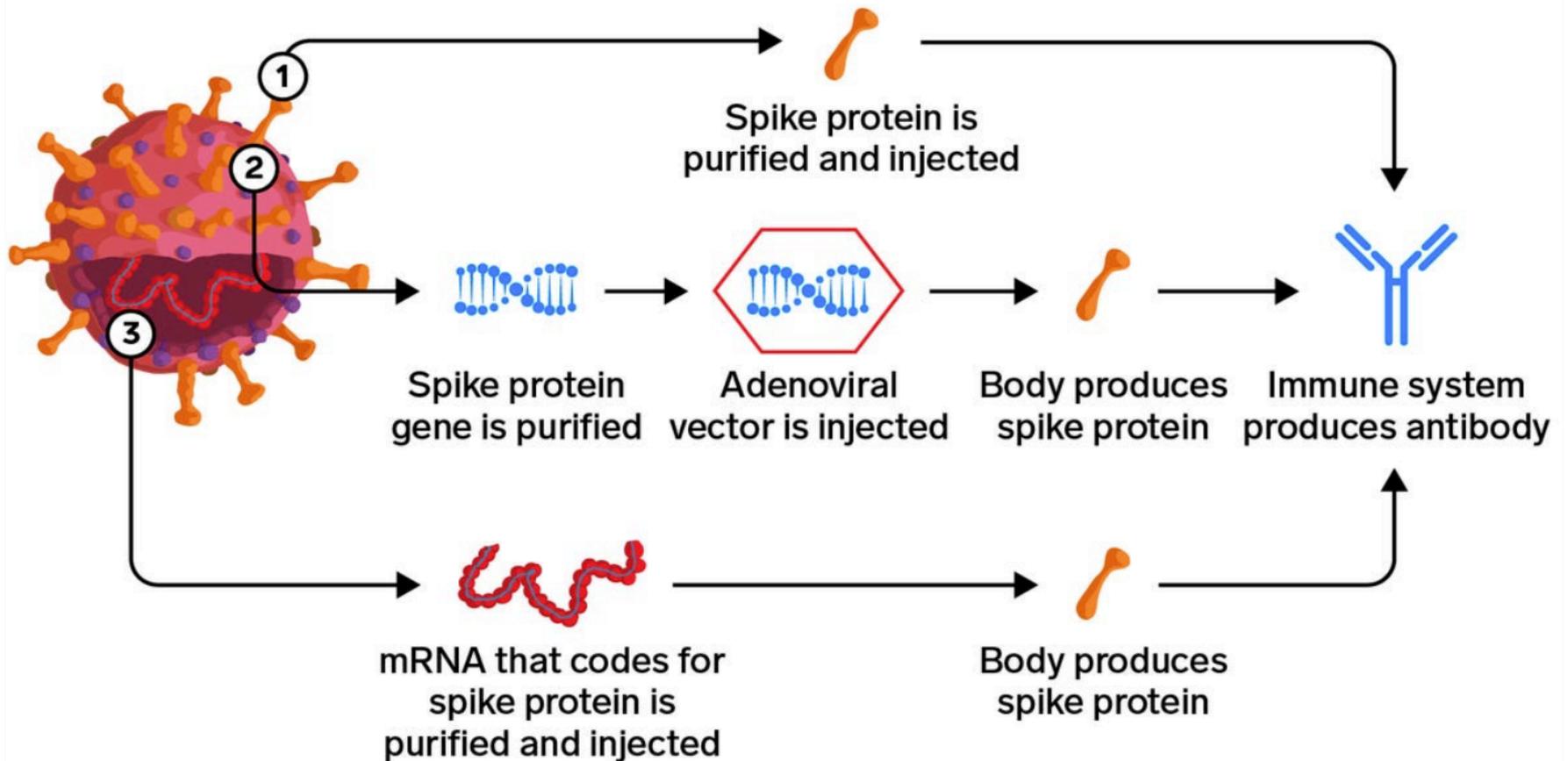


pShooter (mito)

**Metodi alternativi per indurre l'espressione
ectopica di una proteina**

Three types of coronavirus vaccines in development

- ① Protein-based ② Viral vector ③ mRNA



TRASFEZIONE:

Trasferimento di acidi nucleici (DNA o RNA) in cellule eucariotiche (in coltura o in vivo) mediante metodi fisici o chimici

INFEZIONE:

Procedura per il trasferimento di acidi nucleici mediante infezione di cellule (in coltura o in vivo) con virus contenenti vettori basati su genomi virali modificati

Trasfezione di RNA



The New York Times



[The Road to a
Coronavirus Vaccine >](#)

[U.S. Vaccinations Begin](#)

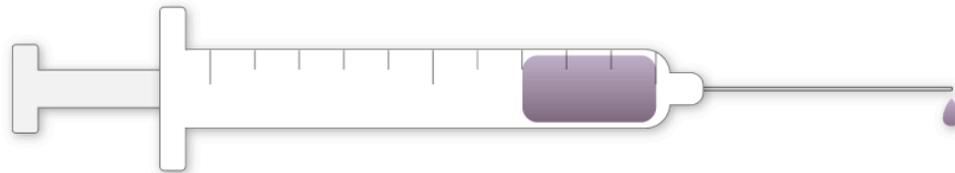
[Answers to Your Vaccine Questions](#)

[11 Things to Know](#)

[How Pfizer](#)

How the Pfizer-BioNTech Vaccine Works

By [Jonathan Corum](#) and [Carl Zimmer](#) Updated Dec. 14, 2020

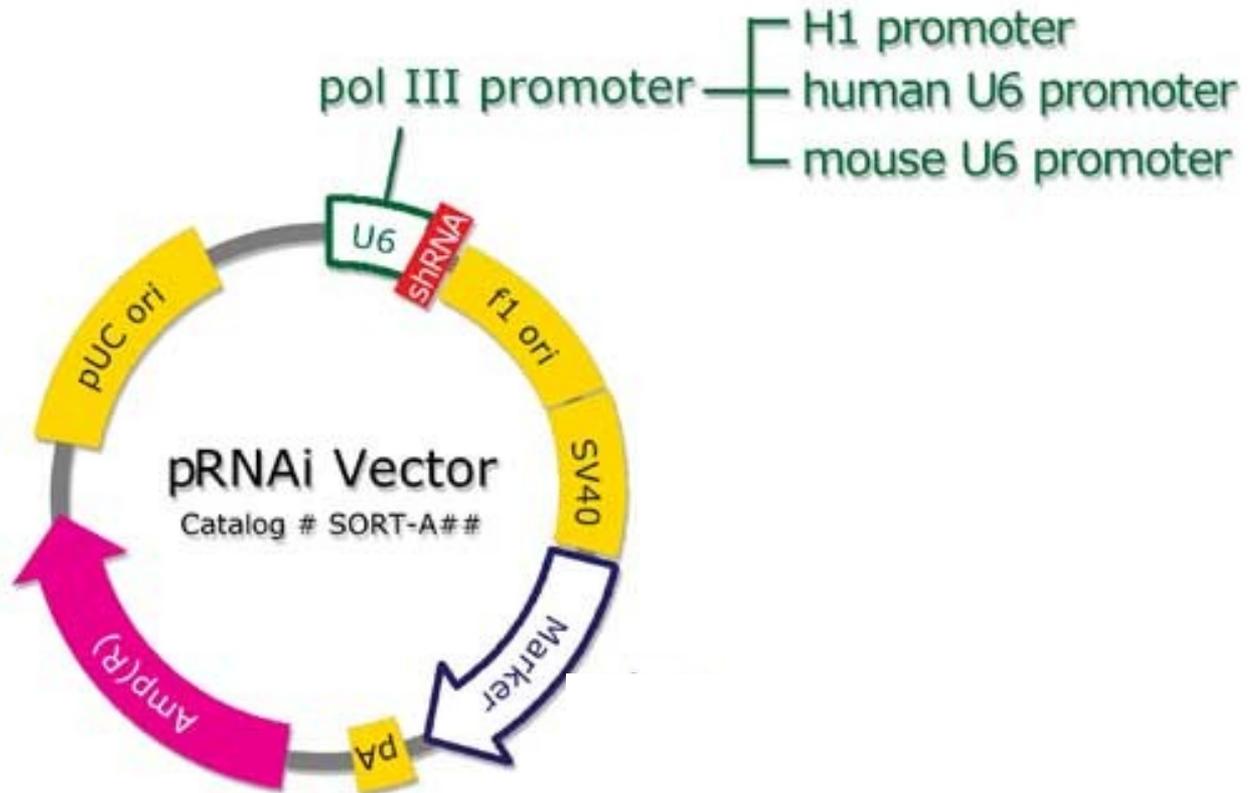


**Problema:
ridurre l'espressione di una proteina endogena**

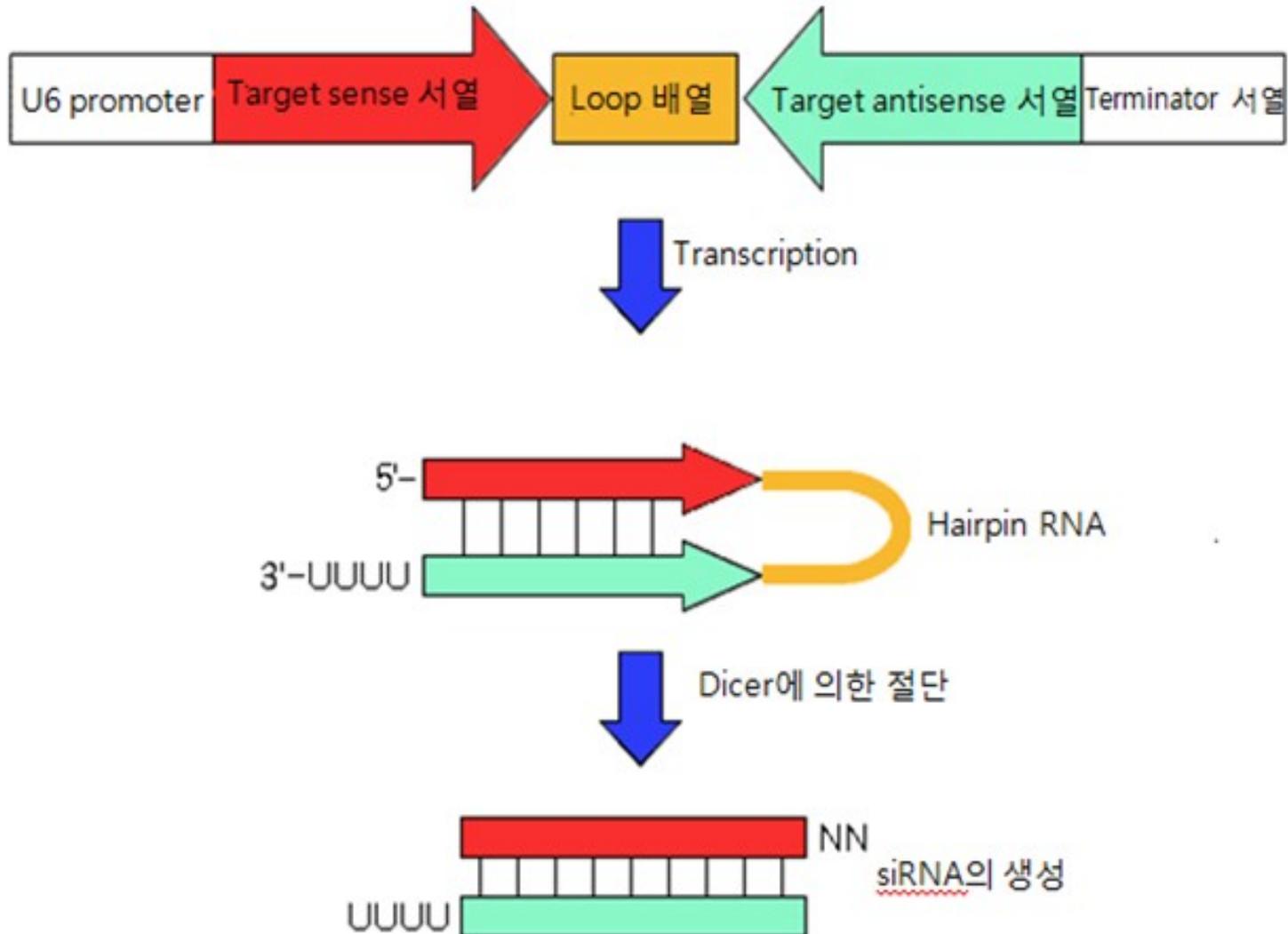
**Soluzione 1: vettori di espressione di shRNA
(short interfering RNA) oppure siRNA a ds
che dirigono la degradazione di un mRNA in
maniera sequenza-specifica**

Soluzione 2: gene editing mediante CRISPR-Cas9

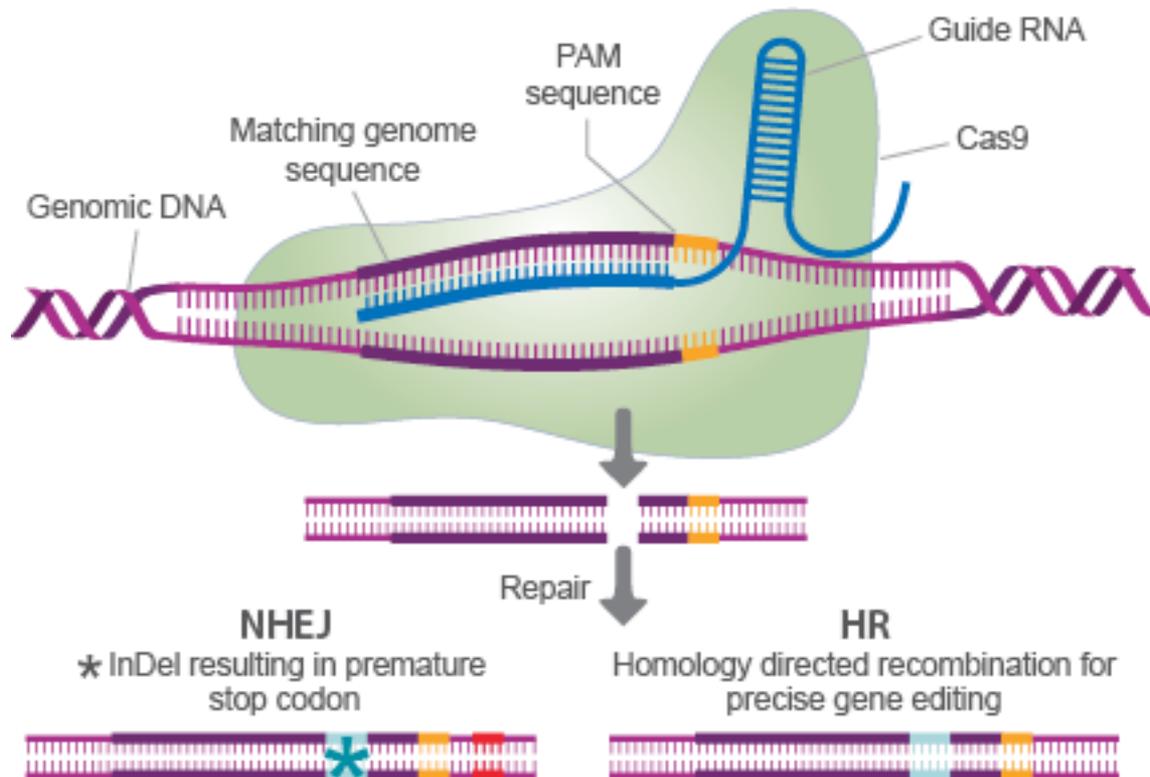
Espressione di shRNA



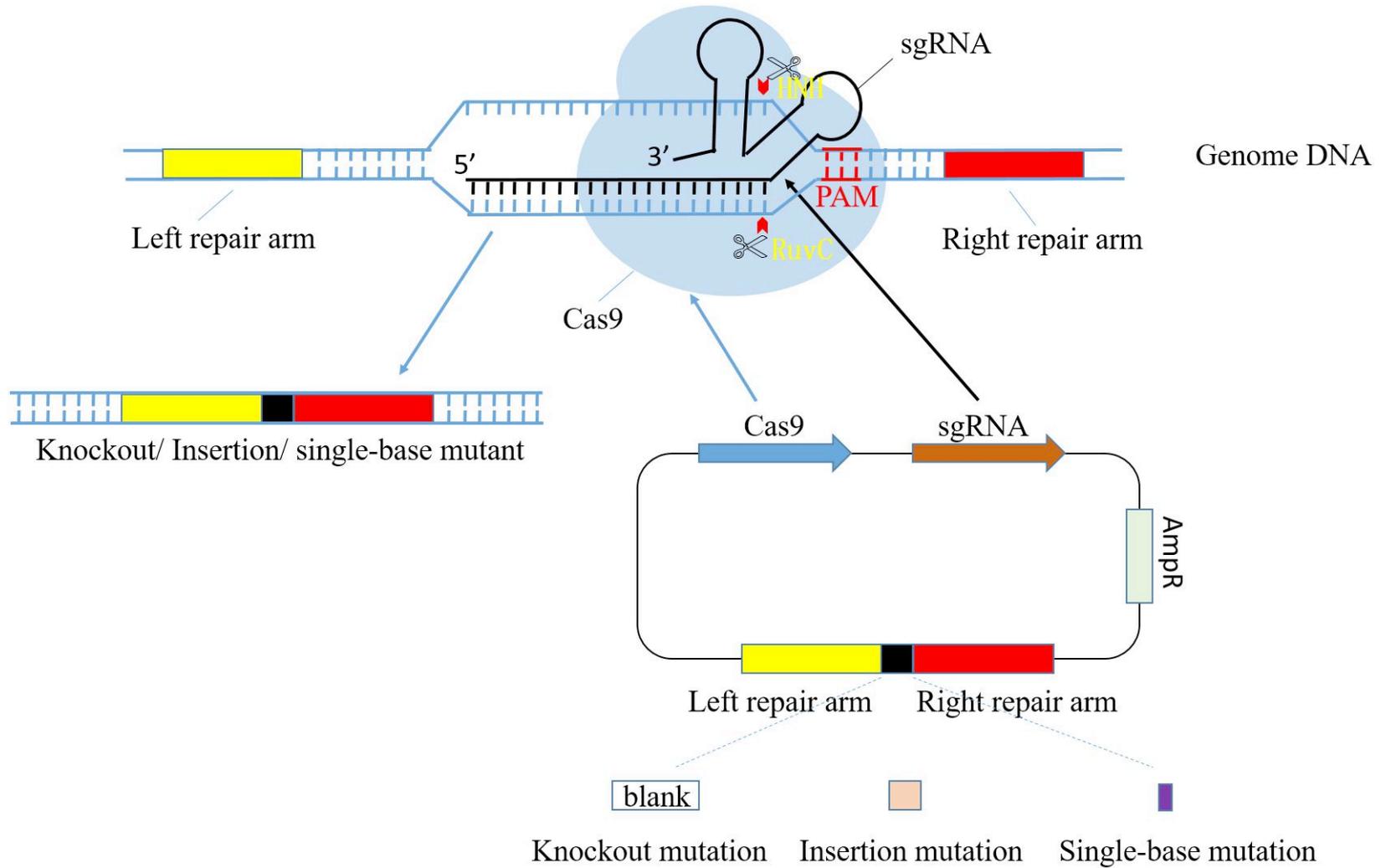
Espressione di shRNA



Gene editing mediante CRISPR-Cas9



Vettori per gene editing mediante CRISPR-Cas9



Espressione transiente

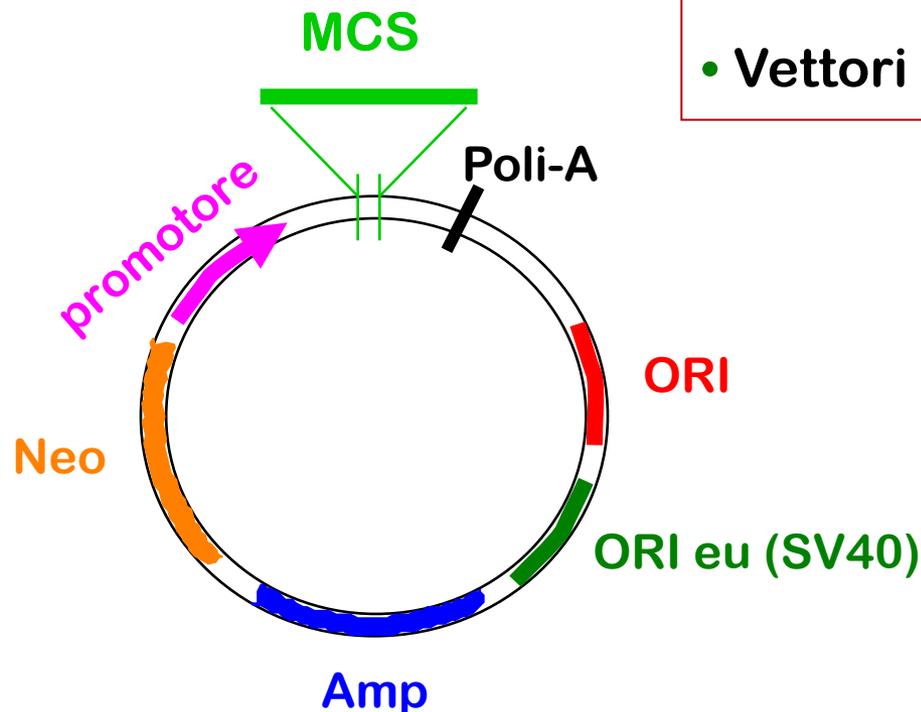
- Il DNA trasfettato rimane in forma di **episoma** ma non può essere replicato, e **viene perso** dopo qualche divisione
- **n° di copie** del plasmide nella cellula trasfettata: elevato e variabile
- **Eterogeneità** di espressione in diverse cellule
- **Esperimenti brevi** (24-72 ore)

Espressione stabile

- Il DNA trasfettato può venir **integrato** nel genoma della cellula ed essere replicato con esso,
- **oppure** può essere mantenuto come **episoma stabile** (se il vettore ha un'**ORI**)
- **L'efficienza** di integrazione varia a seconda del vettore e del tipo cellulare.
- Omogeneità di espressione (ottenimento di cloni stabili)
- Possibilità di effettuare **saggi a lungo termine**.

3) Caratteristiche facoltative:

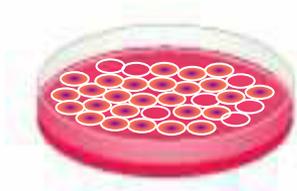
- Marker di **selezione** (geni per la resistenza a Neomicina –G418, Puromicina, Hygromicina) per l'ottenimento di cloni stabili
- Sequenze per la **replicazione autonoma** in cellule eucariotiche (**origine virale**)



- Vettori ad integrazione
- Vettori episomiali

Ottenimento di trasfettanti stabili

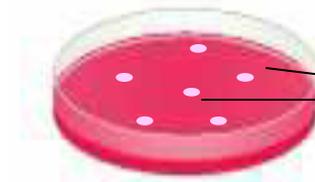
Per ottenere cellule trasfettate stabilmente è necessario **subclonare** il cDNA di interesse in un **vettore** di espressione per cell eucariotiche che contenga un **gene codificante** per un **marcatore selezionabile**, ad es. **resistenza ad un antibiotico** (es. Neomicina).



1. **Trasfezione**



2. **Selezione**: le cellule non trasfettate moriranno

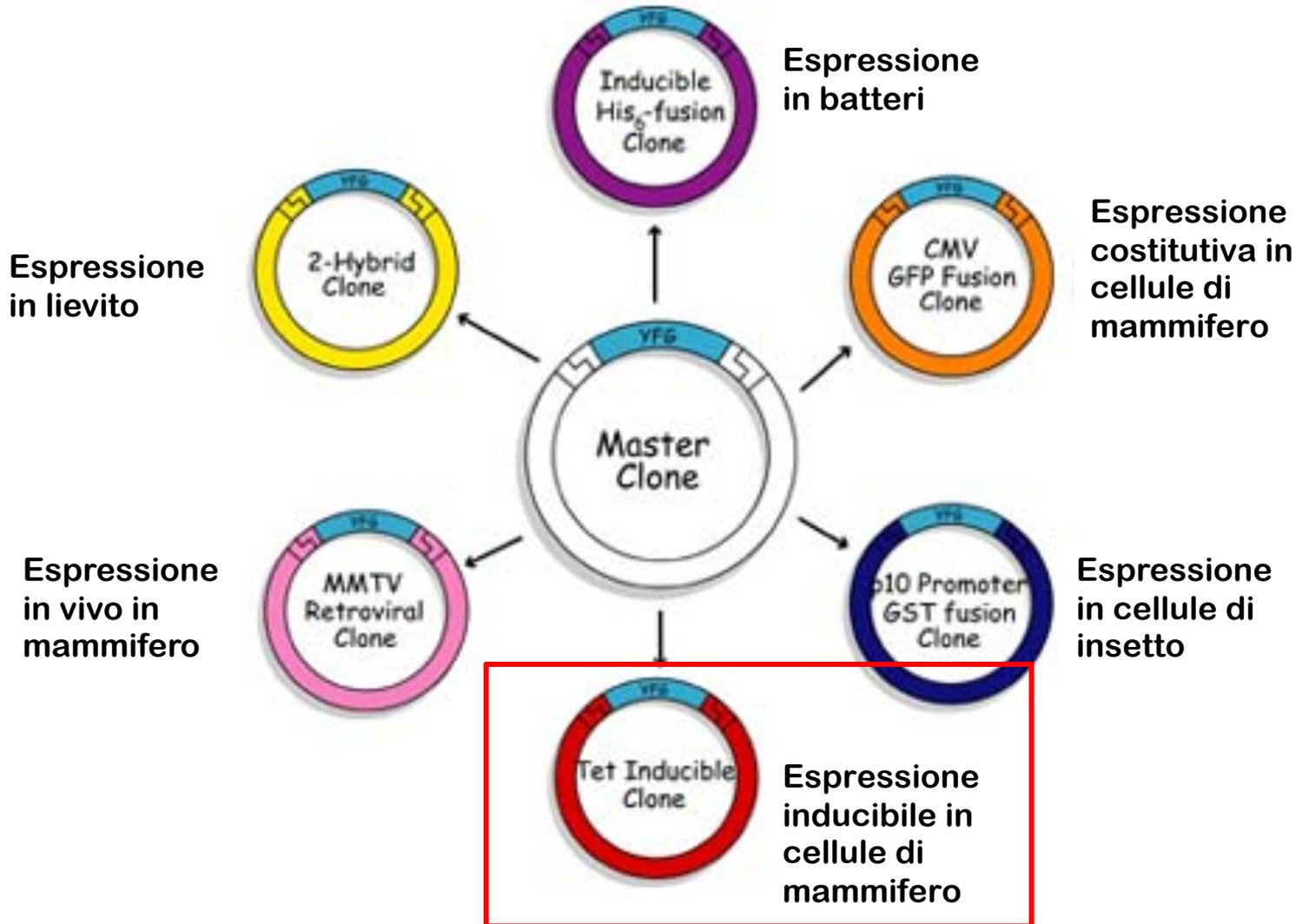


Cloni

Dopo 2 o più settimane...

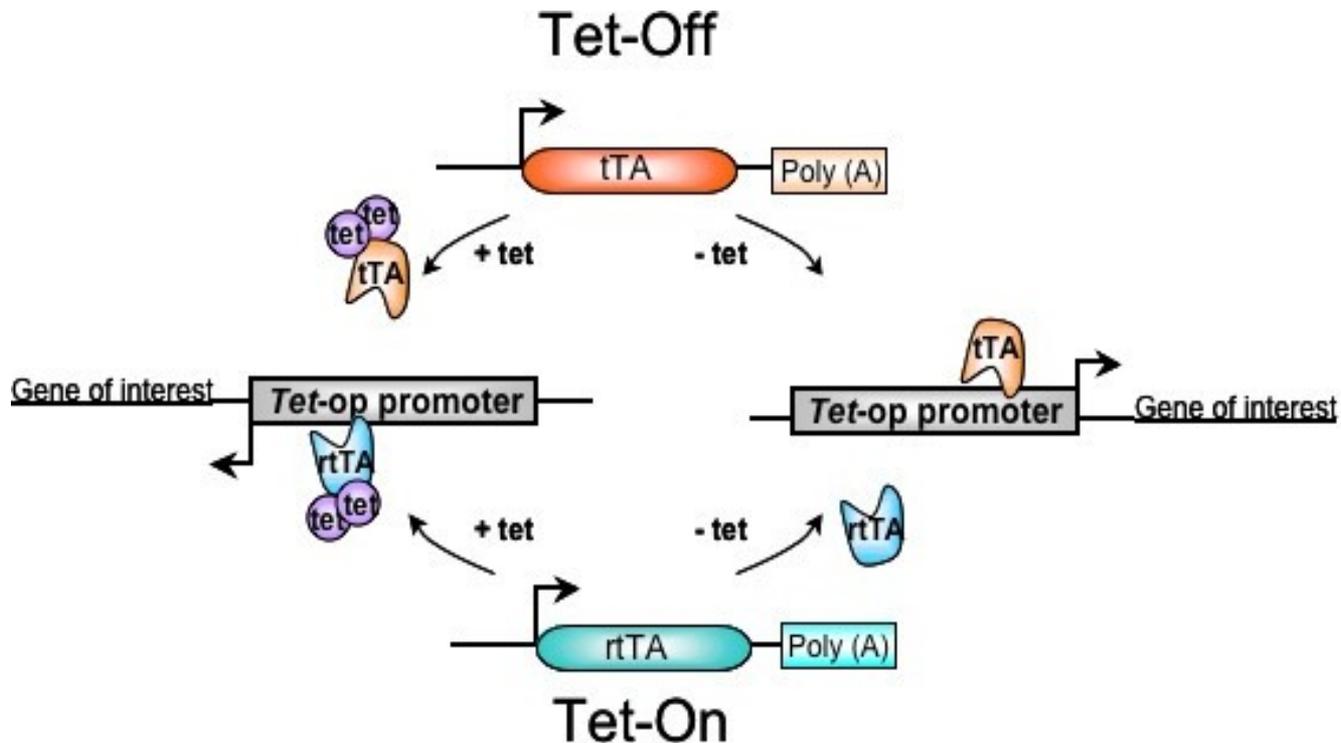
3. Isolamento di **cloni** di cellule che esprimono la proteina

Espressione inducibile



Sistemi tet-on/tet-off

TFs controllati da tetraciclina regolano il promotore Tet-op

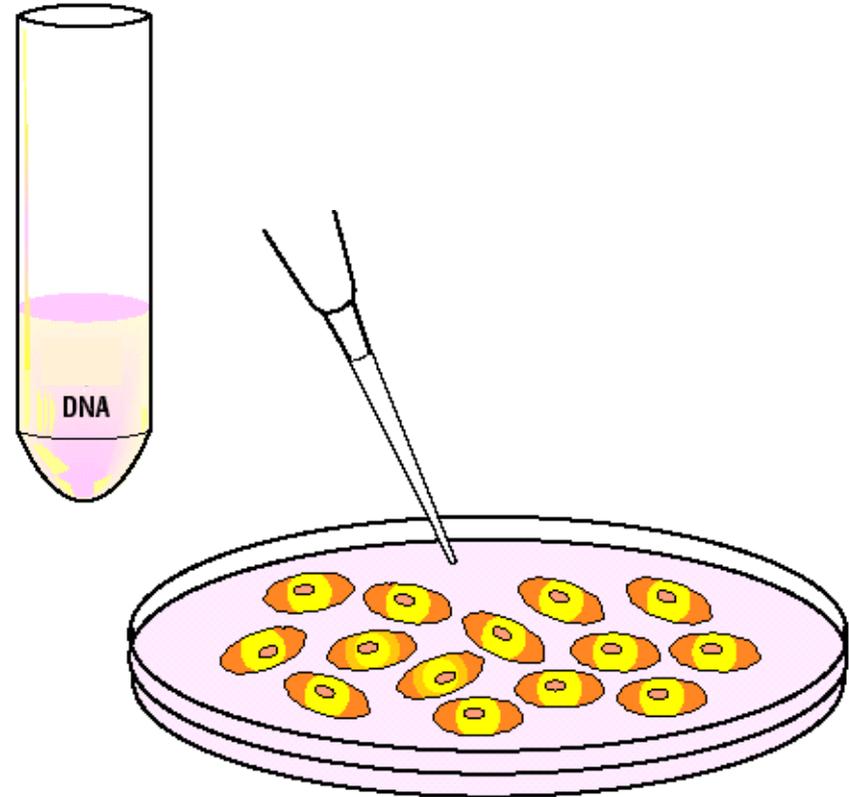


TET-Off system: tetracycline prevents the tTA transcription factor from binding DNA at the promoter. Gene expression is inhibited in the presence of tetracycline.

TET-On system: tetracycline binds the rtTA transcription factor and allows it to bind DNA at the promoter. Gene expression is induced in the presence of tetracycline.

Tecniche di trasfezione

1. Reagenti chimici
2. Liposomi
3. Metodi fisici



Diversi tipi cellulari si trasfettano con efficienza molto diversa!

Tipo cellulare	Tecnica preferita
Cellule che si trasfettano facilmente (linee cellulari)	Reagenti chimici
Cellule che si trasfettano difficilmente (linee cellulari, cellule primarie)	Lipofezione
Cellule che si trasfettano molto difficilmente (cellule primarie, cellule differenziate)	Trasferimento genico mediato da virus
	Metodi fisici

Precipitazione con calcio fosfato

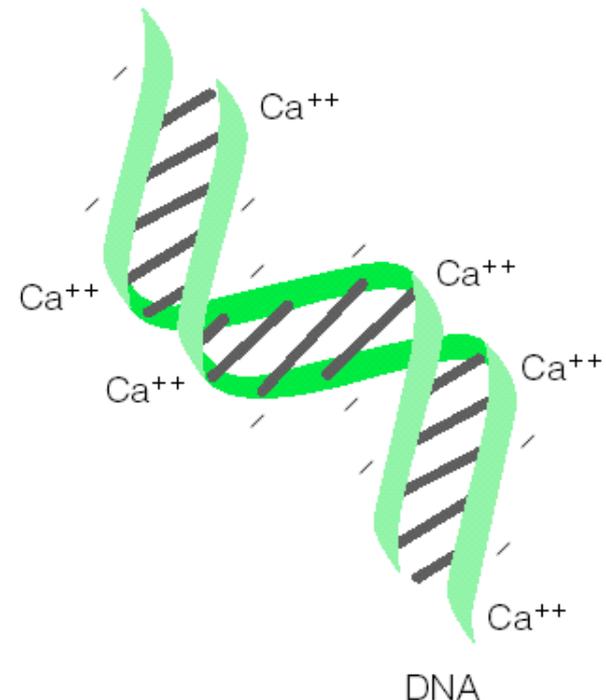
Il DNA viene mescolato a CaCl_2 in un **tampone fosfato** a pH 7.12: si formano dei precipitati insolubili di DNA/ CaPO_4 che vengono poi aggiunti al mezzo di coltura e **precipitano** sulle cellule. Il DNA entra nelle cellule per **endocitosi**.

Tipo di **cellule**: in adesione

Efficienza: bassa

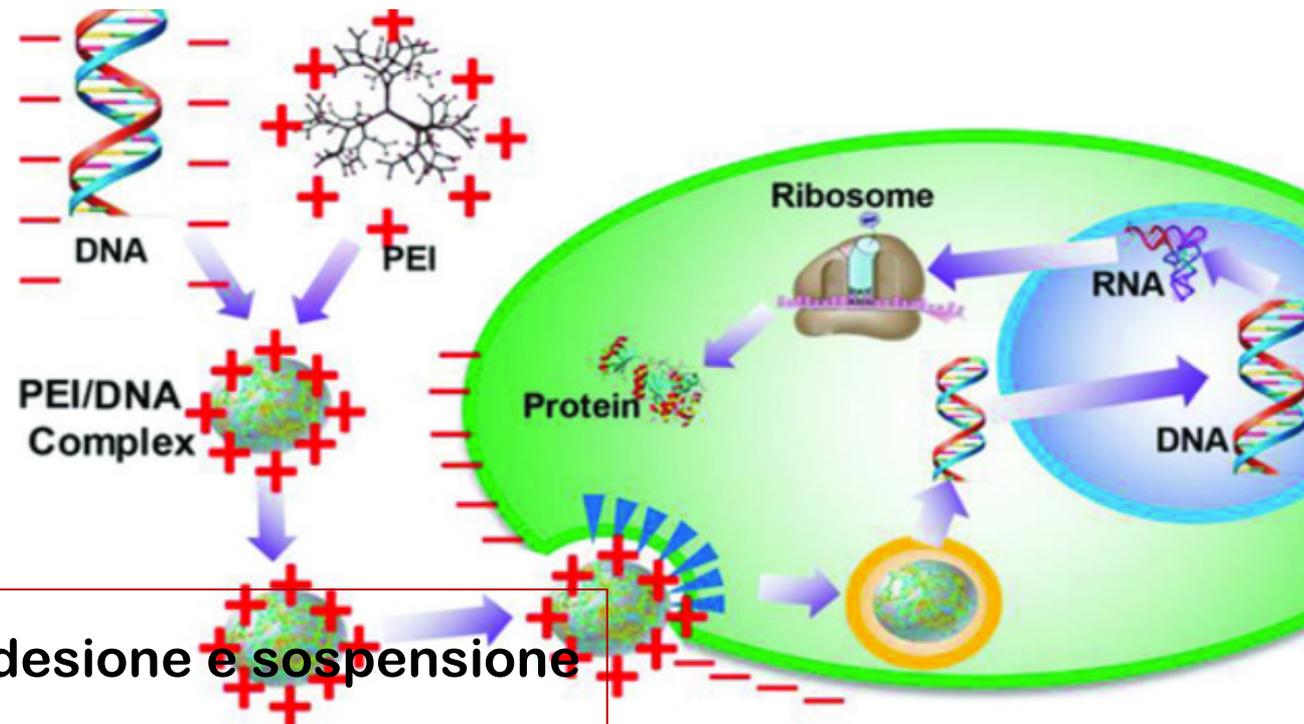
Tossicità: bassa

Tipo di **saggio**: transiente e stabile



Trasfezione con PEI (polietilenimmina)

Il DNA viene mescolato al PEI (cationico), si formano dei complessi che vengono poi aggiunti al mezzo di coltura e entrano nelle cellule per **endocitosi**.



Tipo di **cellule**: in adesione e sospensione

Efficienza: media

Tossicità: bassa

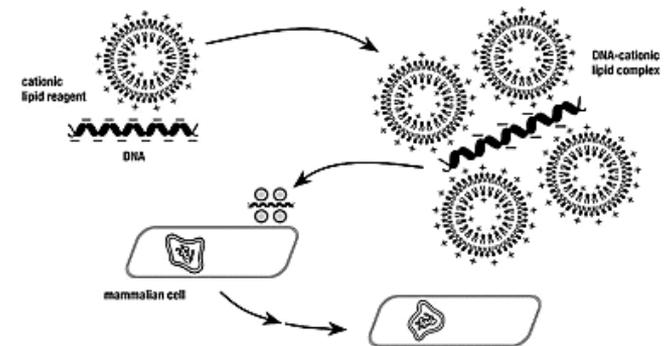
Tipo di **saggio**: transiente e stabile

Lipofezione

Questa tecnica si basa sulla capacità di alcuni **lipidi cationici** di complessare il DNA (carico negativamente) e rilasciarlo nelle cellule fondendosi con la membrana plasmatica/mediante endocitosi.

➤ formazione di **complessi lipide-DNA**

➤ **Liposomi: vescicole a doppio strato lipidico** che possono complessare molecole di DNA (o anche RNA e proteine) = lipidi cationici ed entrare nelle cellule (aiutati da lipidi fusogenici neutri)



Tipo di **cellule**: in adesione e in **sospensione**

Efficienza: alta

Tossicità : media

Tipo di **saggio**: transiente e stabile

Elettroporazione/nucleofezione

La membrana cellulare e quella nucleare sono permeabilizzate mediante l'applicazione di un **campo elettrico**: si formano dei **pori** del diametro di alcuni nm, attraverso i quali può passare il DNA.

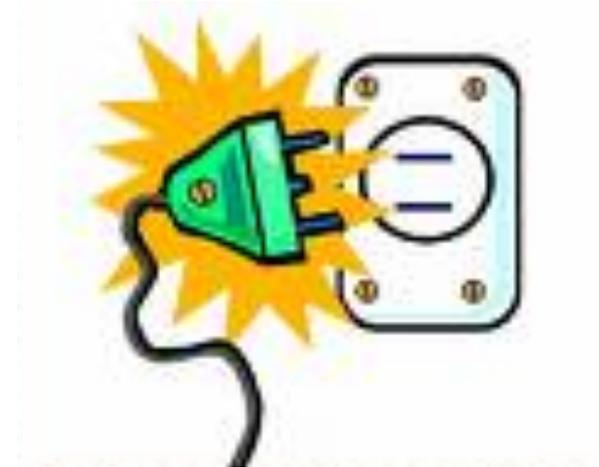
Tipo di **saggio**: transienti e **stabili**

Tipo di **cellule**: in adesione e in sospensione

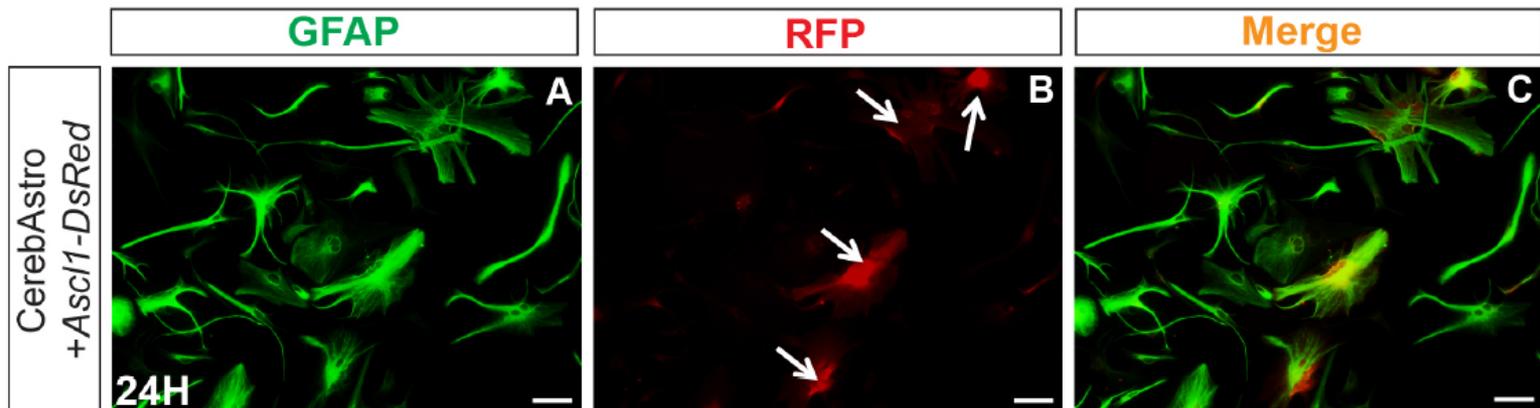
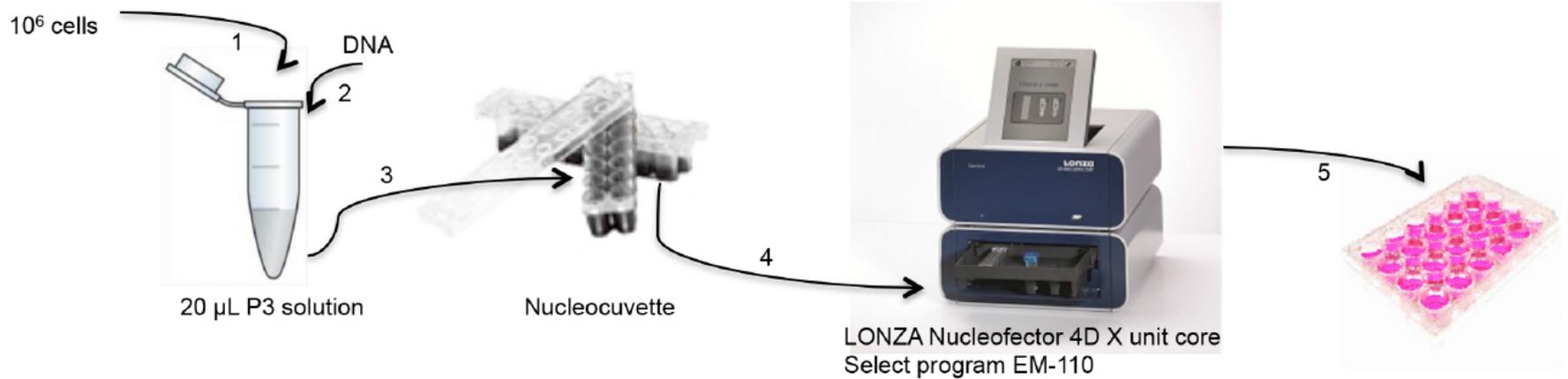
Efficienza: alta

Tossicità : dipende dallo strumento

(la scossa elettrica può causare elevata mortalità)



Nucleofector: tecnica di elettroporazione ottimizzata per diversi tipi cellulari primari



Microiniezione



Microiniezione

Il **DNA** viene direttamente iniettato nel **nucleo** delle cellule con un **capillare** di vetro mediante sistemi automatizzati.

Il metodo permette di ottenere grande affidabilità e riproducibilità, ma **non è rapido**.

Vantaggi: possibilità di **seguire il destino di singole cellule trasfettate**.

Tipo di **saggio**: normalmente utilizzato per saggi **su singole cellule** piuttosto che su una popolazione cellulare.

Tipo di **cellule**: normalmente in **adesione (ma anche in sospensione)**

Efficienza: elevata

Applicazione: trasfezione di cellule Staminali Embrionali per generare **organismi transgenici**

Trasferimento genico mediato da particelle metalliche

Tecnica che utilizza **microproiettili**



il DNA viene precipitato su **microscopiche particelle d'oro o tungsteno**

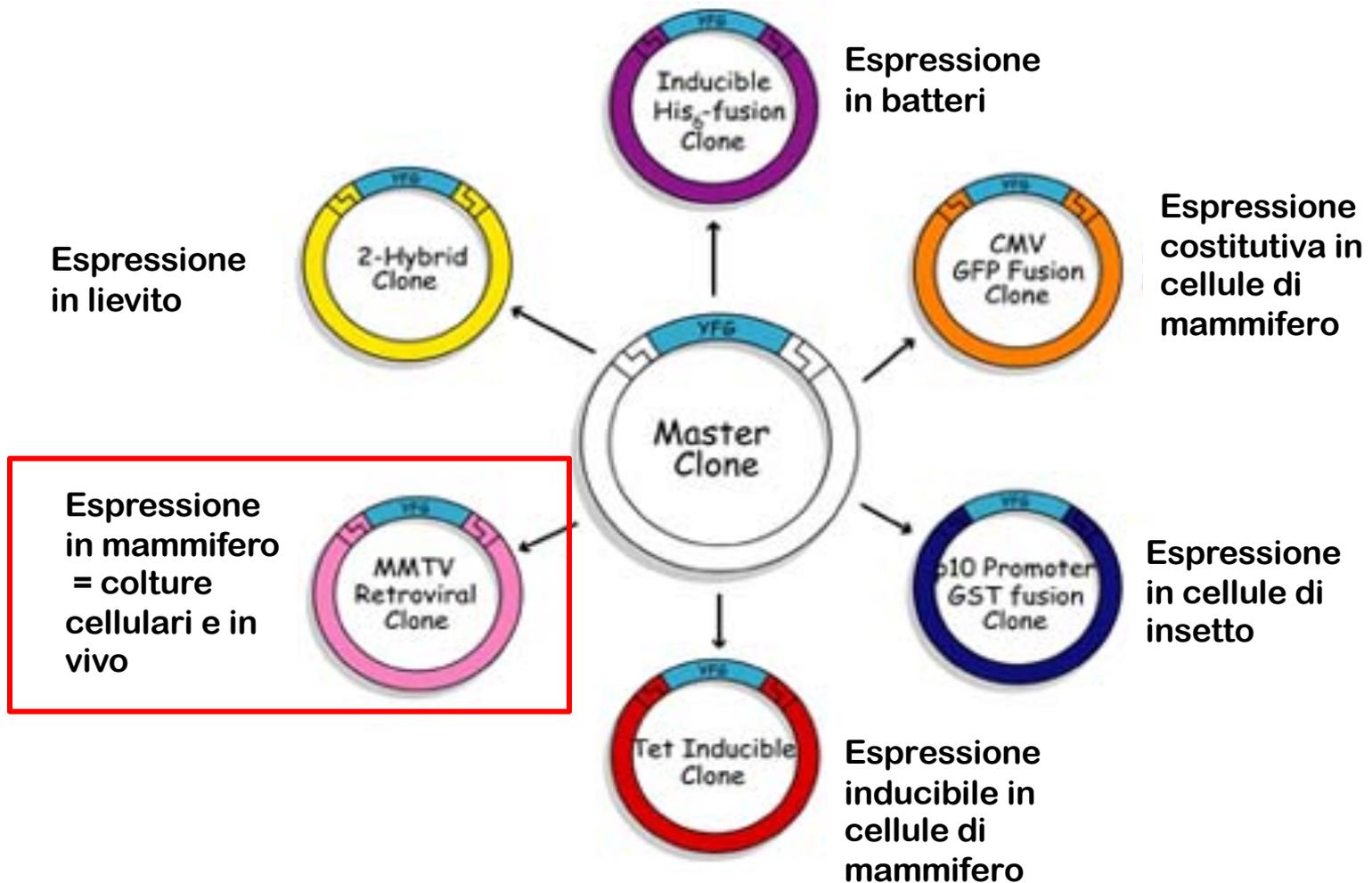
che vengono poi “**sparate**” nelle cellule mediante un'apposita strumentazione che usa **elio** ad alta pressione.

Usato per trasfettare cellule **all'interno di tessuti, anche in vivo.**

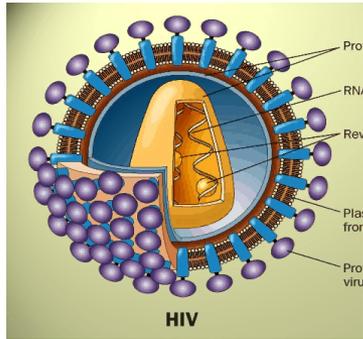
Oppure cellule molto difficili da trasfettare, es. cellule vegetali (dotate di parete).



Metodi biologici I: vettori derivati da virus



Trasferimento genico mediato da virus

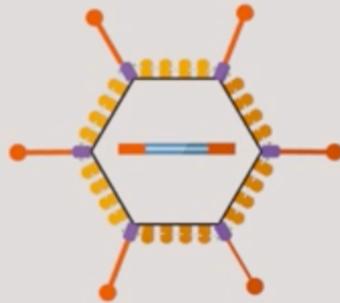


Diversi tipi di **virus** possono essere **modificati** per ottenere **vettori** per il trasferimento di geni non virali mediante l'**infezione** di cellule eucariotiche.

Trasferimento genico mediato da virus



Retrovirus



Adenovirus

**Most
Commonly
Used
Viral Vectors**



Lentivirus



Adeno-associated Virus

Trasferimento genico mediato da virus

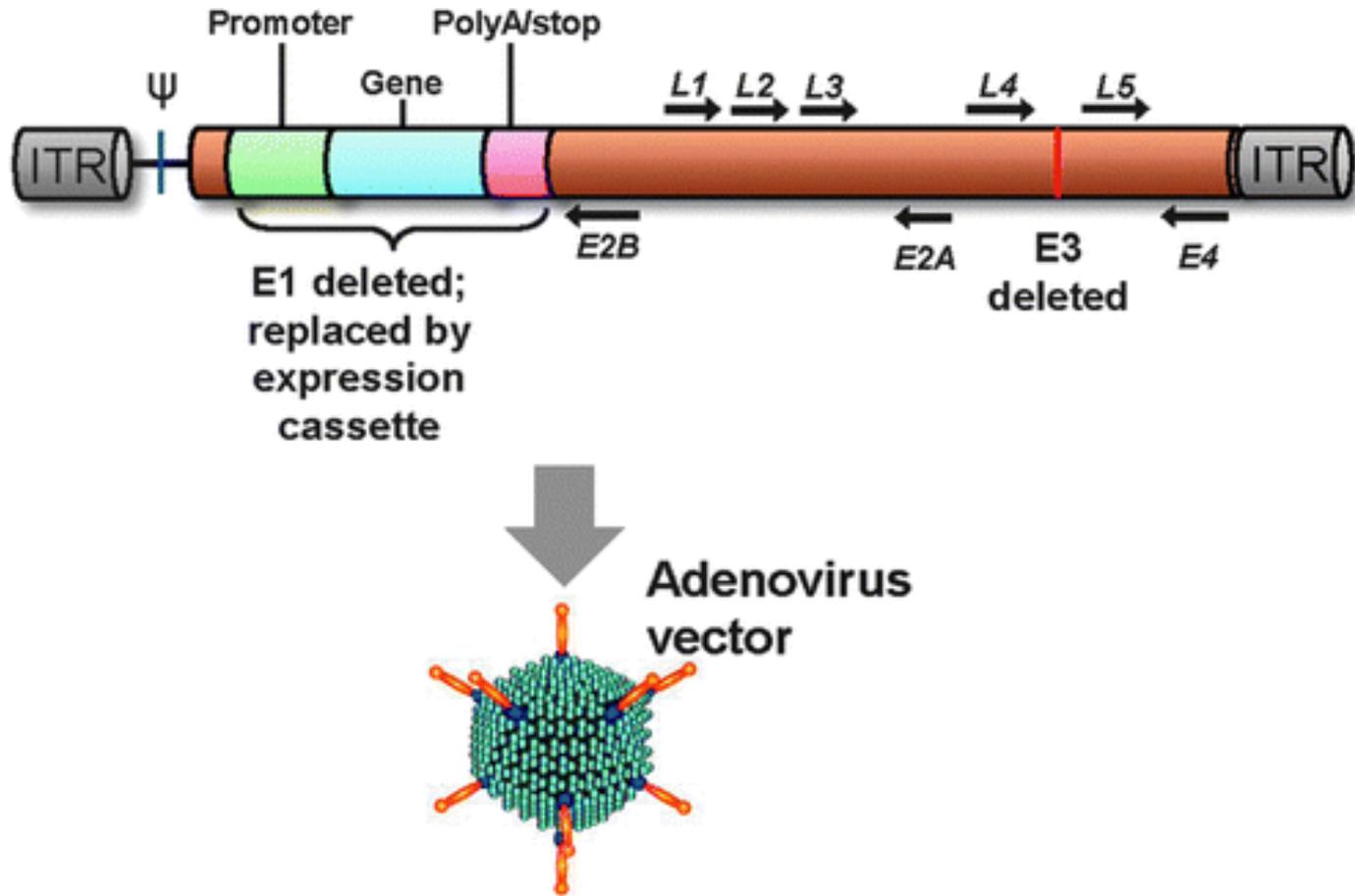
Retrovirus – hanno la capacità di **integrarsi** nel genoma di cellule **proliferanti**

Lentivirus – si integrano anche in cellule **quiescenti**
Utilizzati per cellule primarie in coltura ed anche **in vivo**,
in cellule differenziate. Utilizzati in terapia genica.

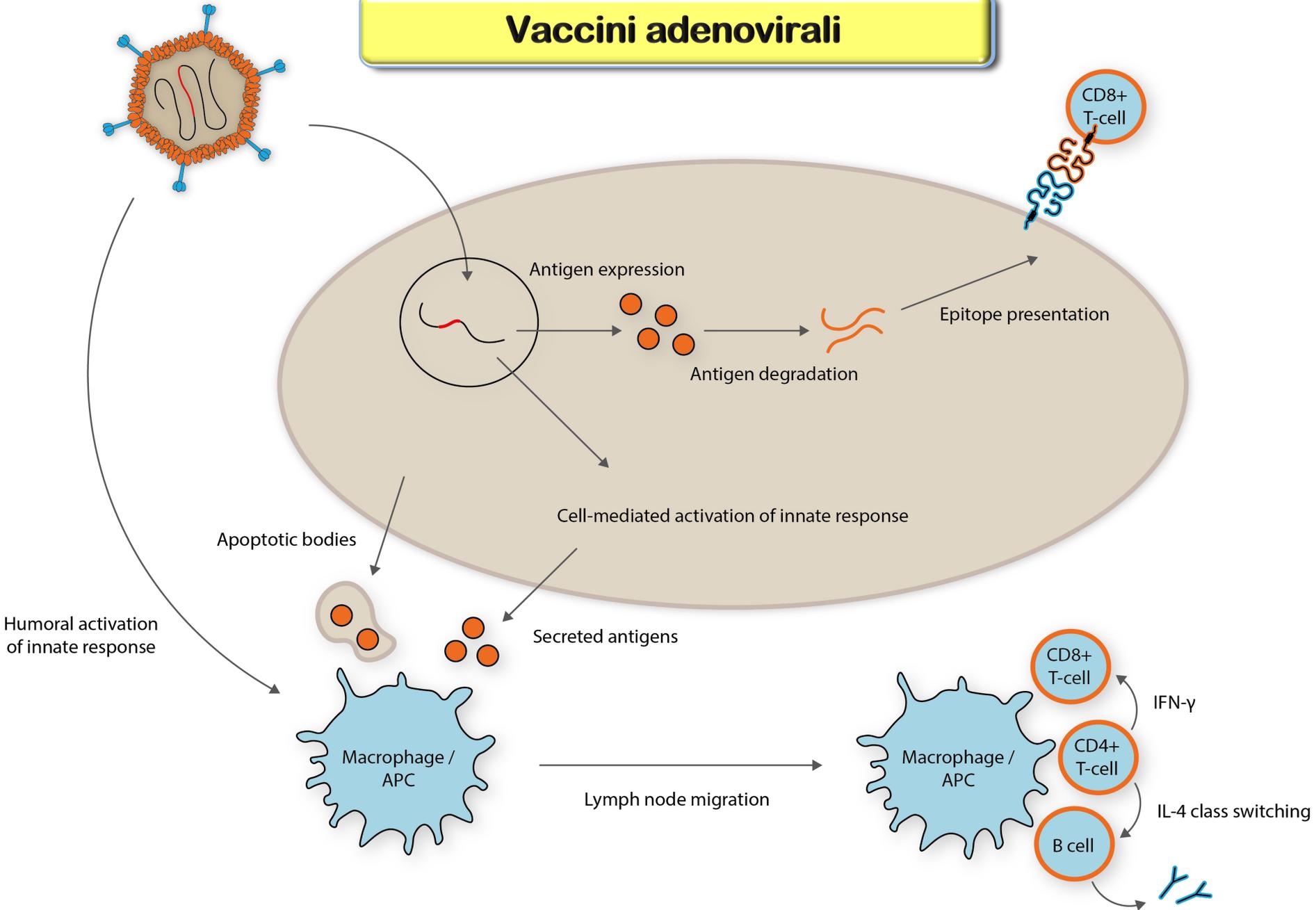
Adenovirus e AAV – infettano anche cellule quiescenti,
ma **non** hanno la capacità di **integrarsi** nel genoma cellulare.

I **virus ricombinanti** possono essere **impaccati in particelle infettive**
in speciali linee cellulari, che esprimono
le proteine del capsido virale (*packaging cell line*).

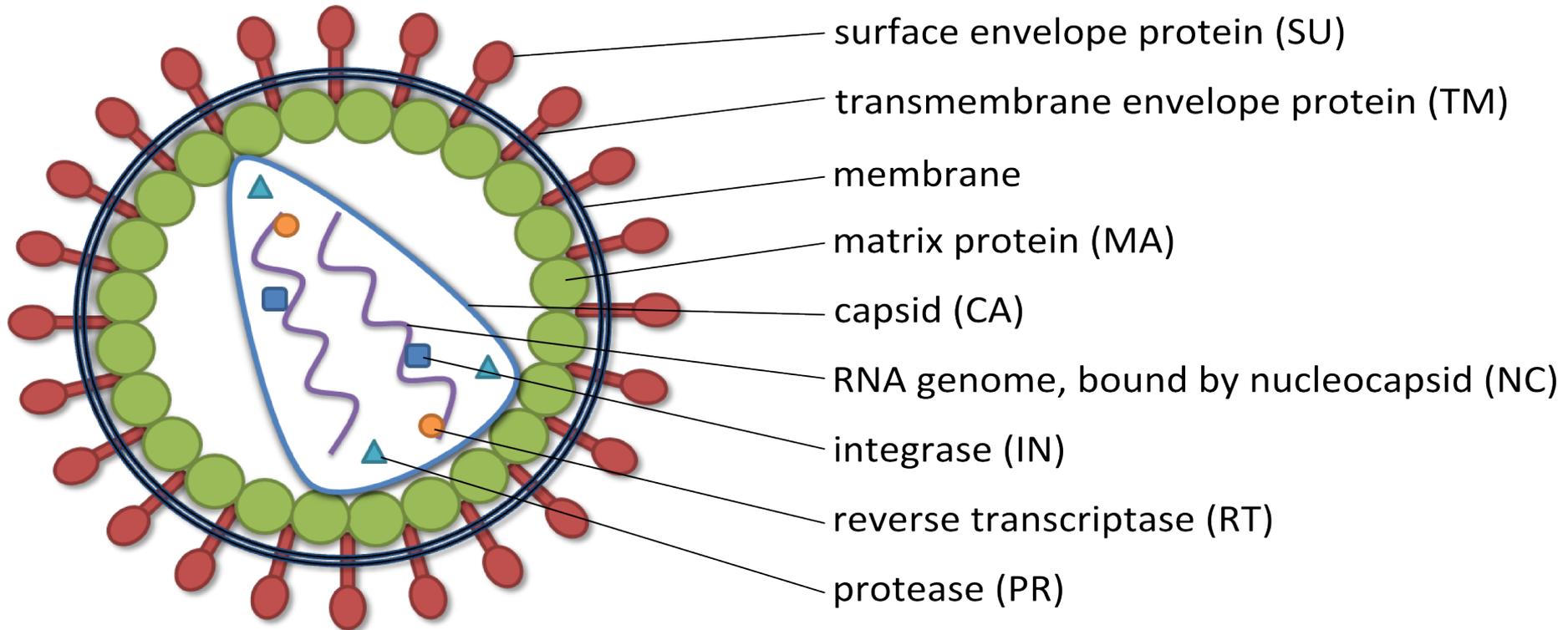
Adenovirus



Vaccini adenovirali



Retrovirus e lentivirus

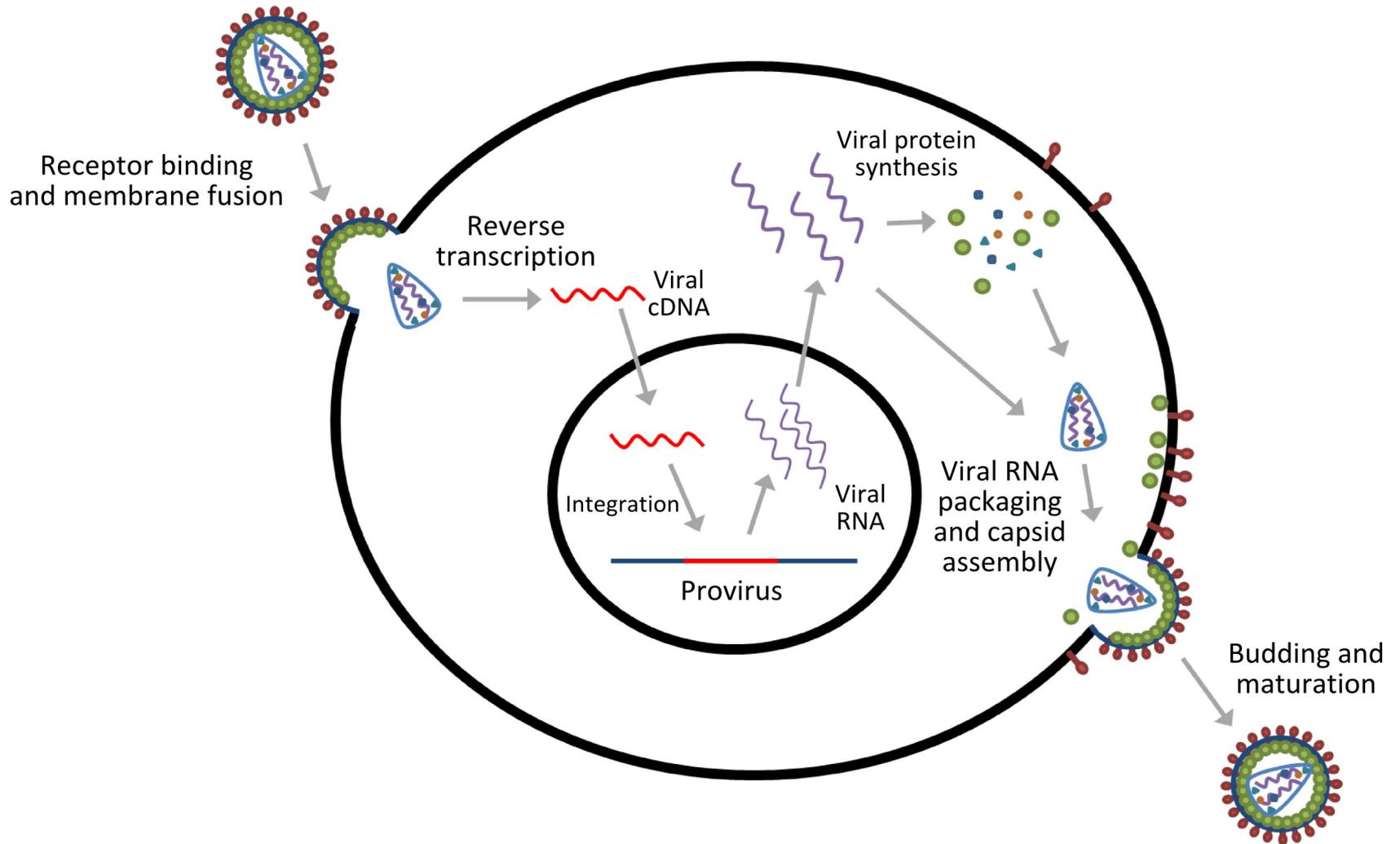


POL codifica per gli enzimi **RT, PR e IN**.

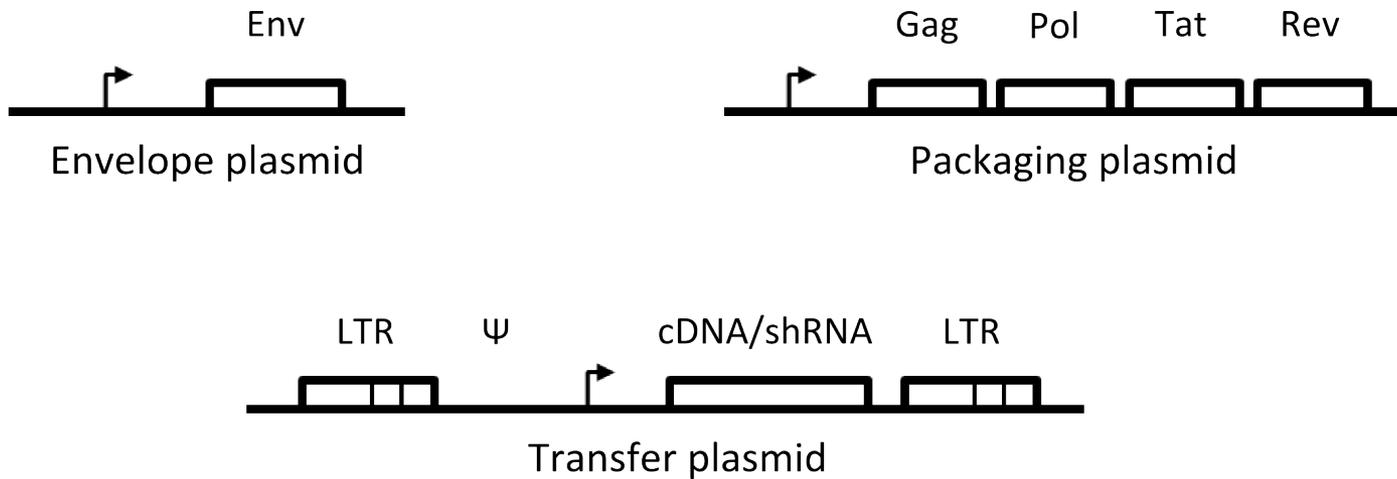
GAG codifica per proteine della **matrice** e **capside** MA CA, NC

ENV codifica per glicoproteine di **superficie** e transmembrana SU e TM

Il ciclo retrovirale



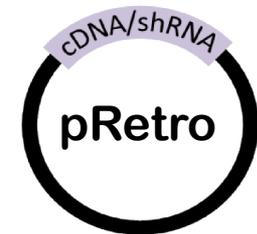
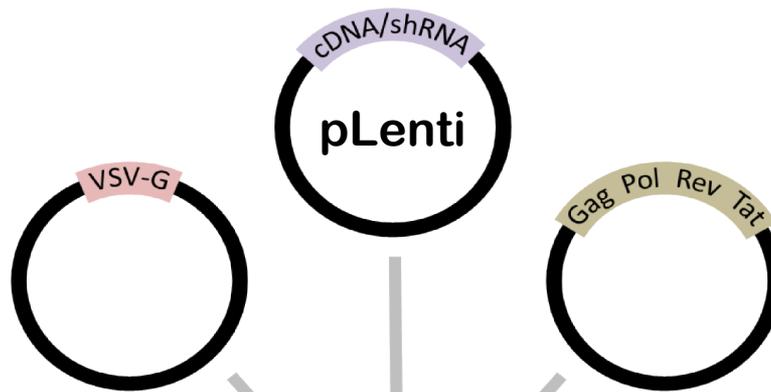
Preparazione di virus ricombinanti per trans-complementazione



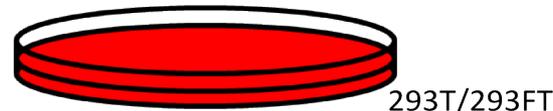
Preparazione di virus ricombinanti per trans-complementazione

Lentivirus

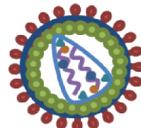
Retrovirus



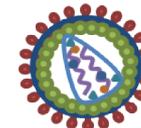
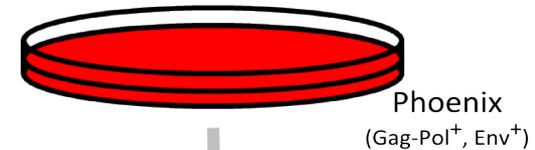
1) Transfect packaging cells



2) Collect virus particles



3) Transduce target cells



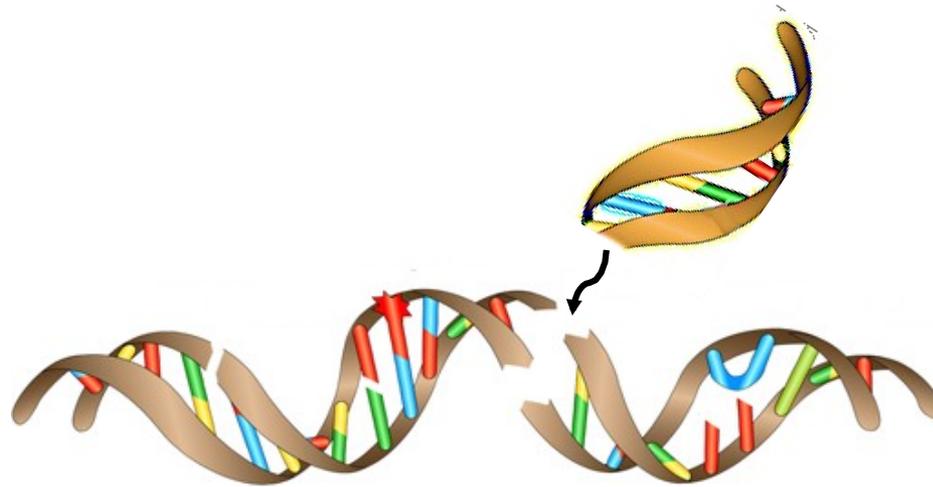


Sicurezza nell'utilizzo dei vettori retro- e lenti-virali

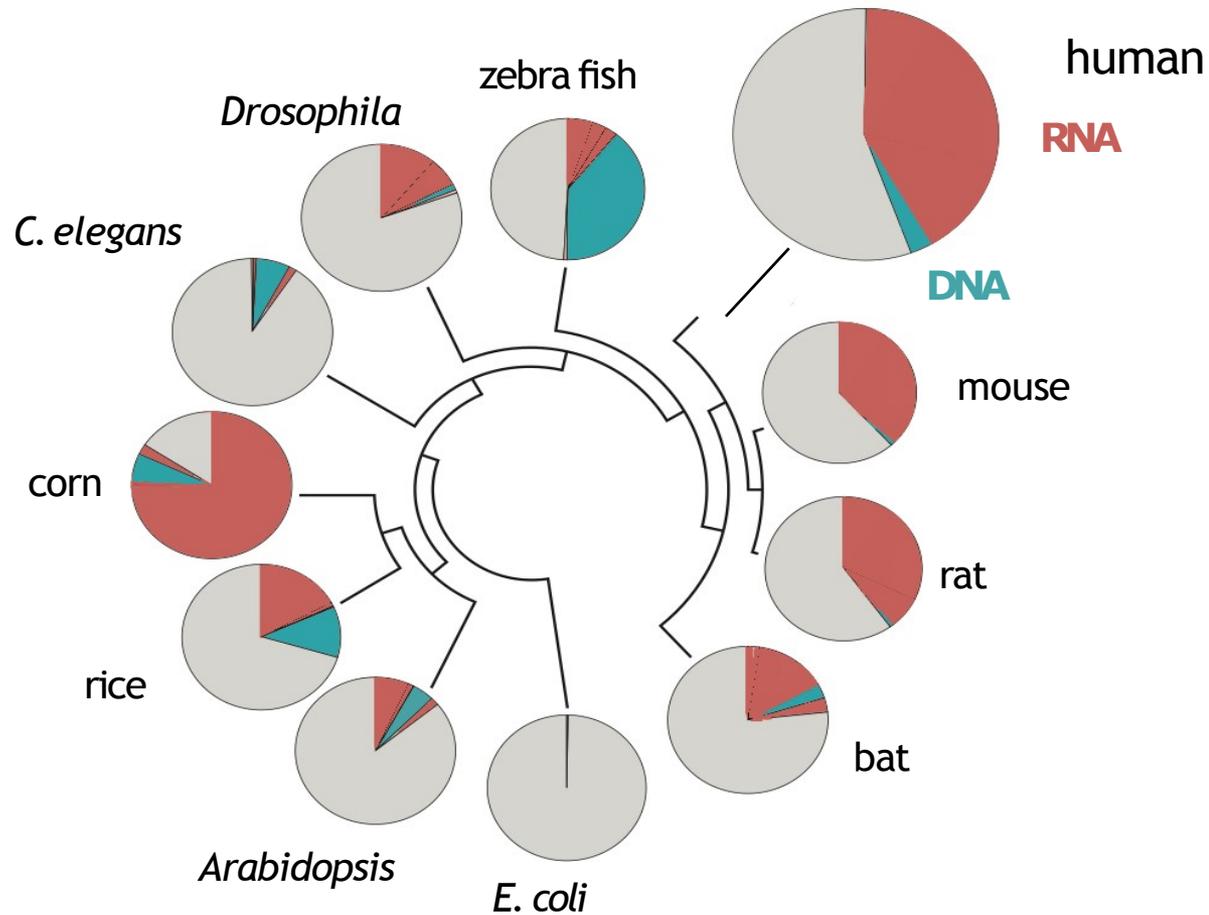
Principali rischi:

1. Generazione di virus contaminanti competenti per la replicazione (ricombinazione con virus endogeni)
 2. Potenziale oncogenico per integrazione random (in vivo)
 3. Potenziale tossicità del transgene.
-
1. I vettori lentivirali di 2 e 3 generazione hanno diverse caratteristiche di sicurezza (vettori separati packaging & enzimatici)
molti sono vettori auto-inattivanti (delezione del 3' LTR)
 2. Vettori lentivirali integration-defective o che si integrano per HR (promotore specifico)

**Utilizzo di TRASPOSONI per l'introduzione di DNA
esogeno in cellule in coltura o in vivo**

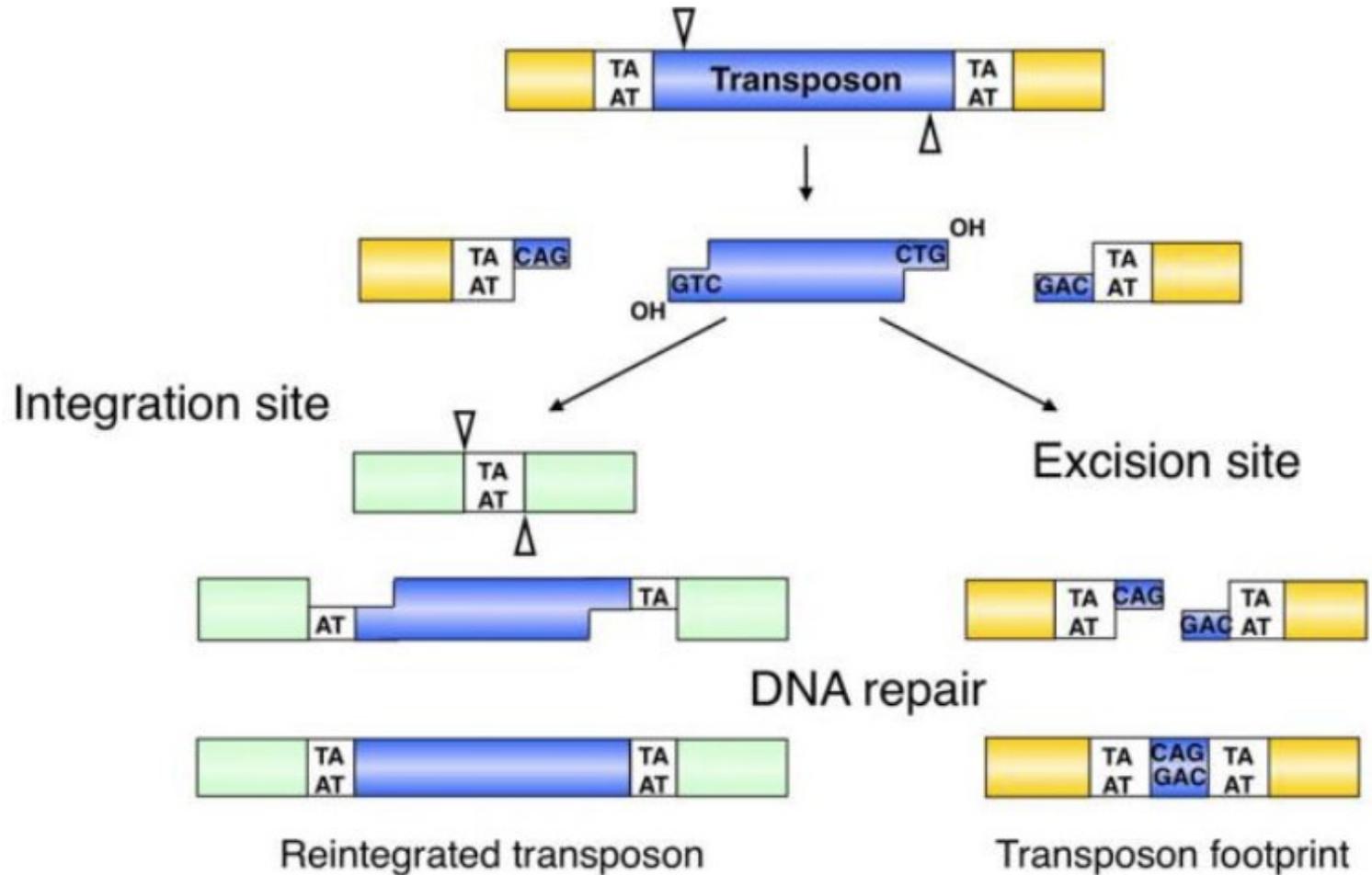


Utilizzo di TRASPOSONI per l'introduzione di DNA esogeno in cellule in coltura o in vivo



Adapted from Huang, Burns, Boeke. Annu Rev Genet. 2012

Meccanismo della trasposizione a DNA “cut and paste”



Vettori derivati da transposoni: SLEEPING BEAUTY

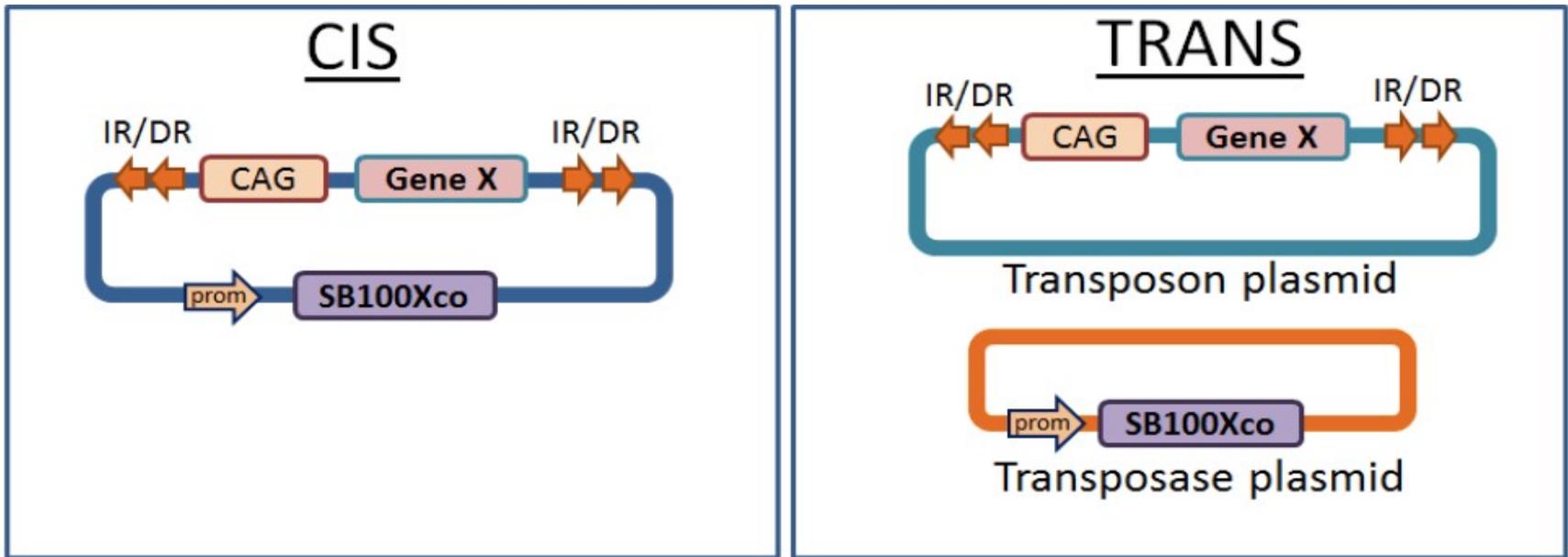


Figure 2: Schematics of Cis and Trans Sleeping Beauty plasmids.