

**Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche**

**AA 2020-2021**

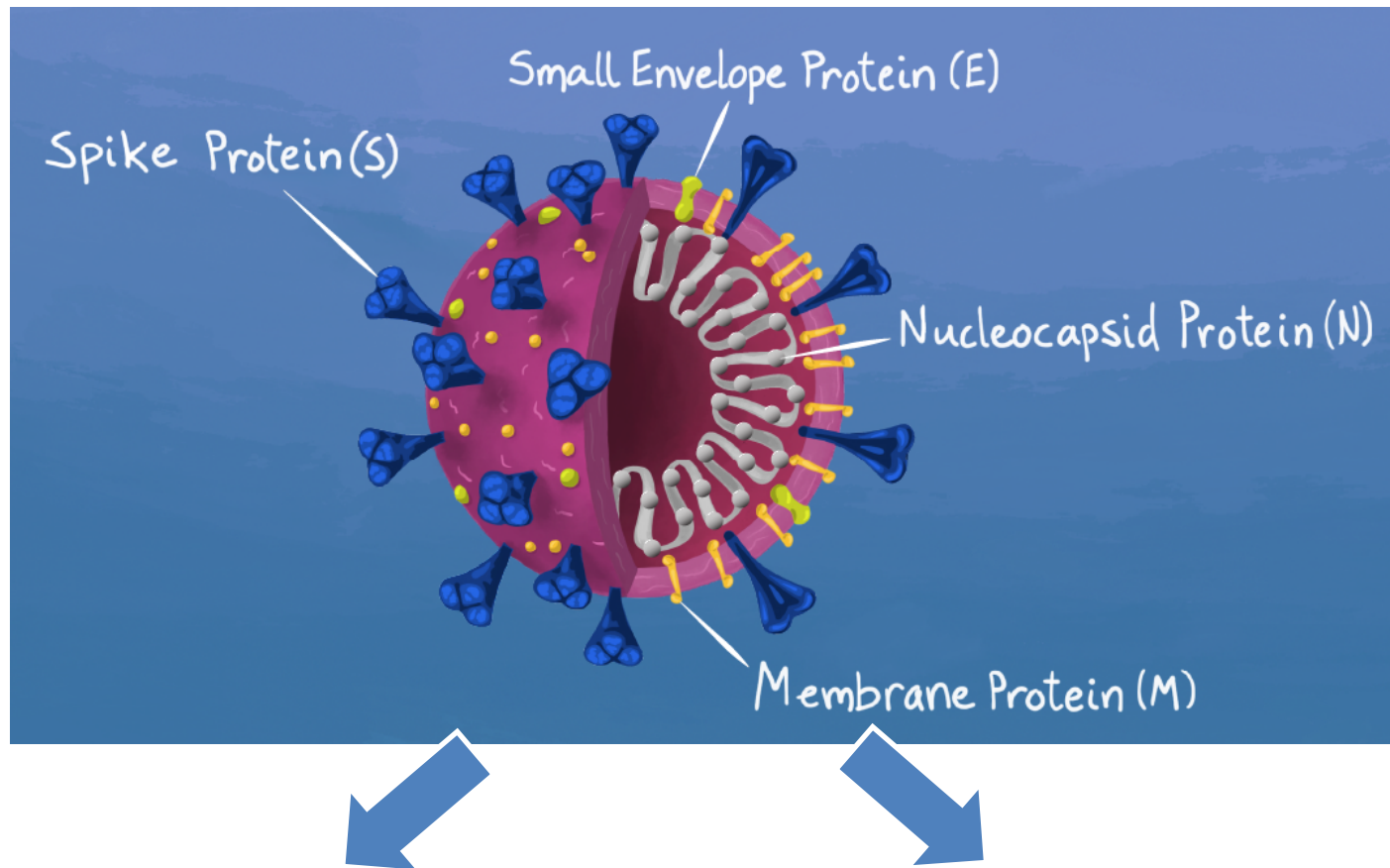
**Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare**

**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**

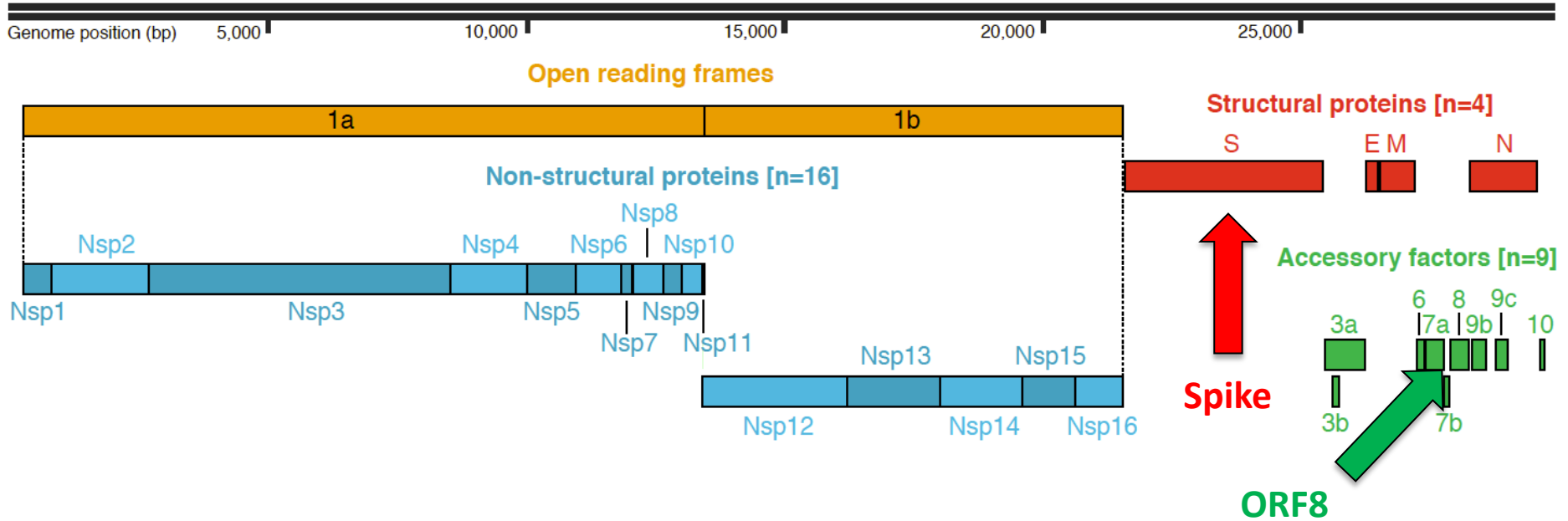
**Interazione con proteine cellulari**

# 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)

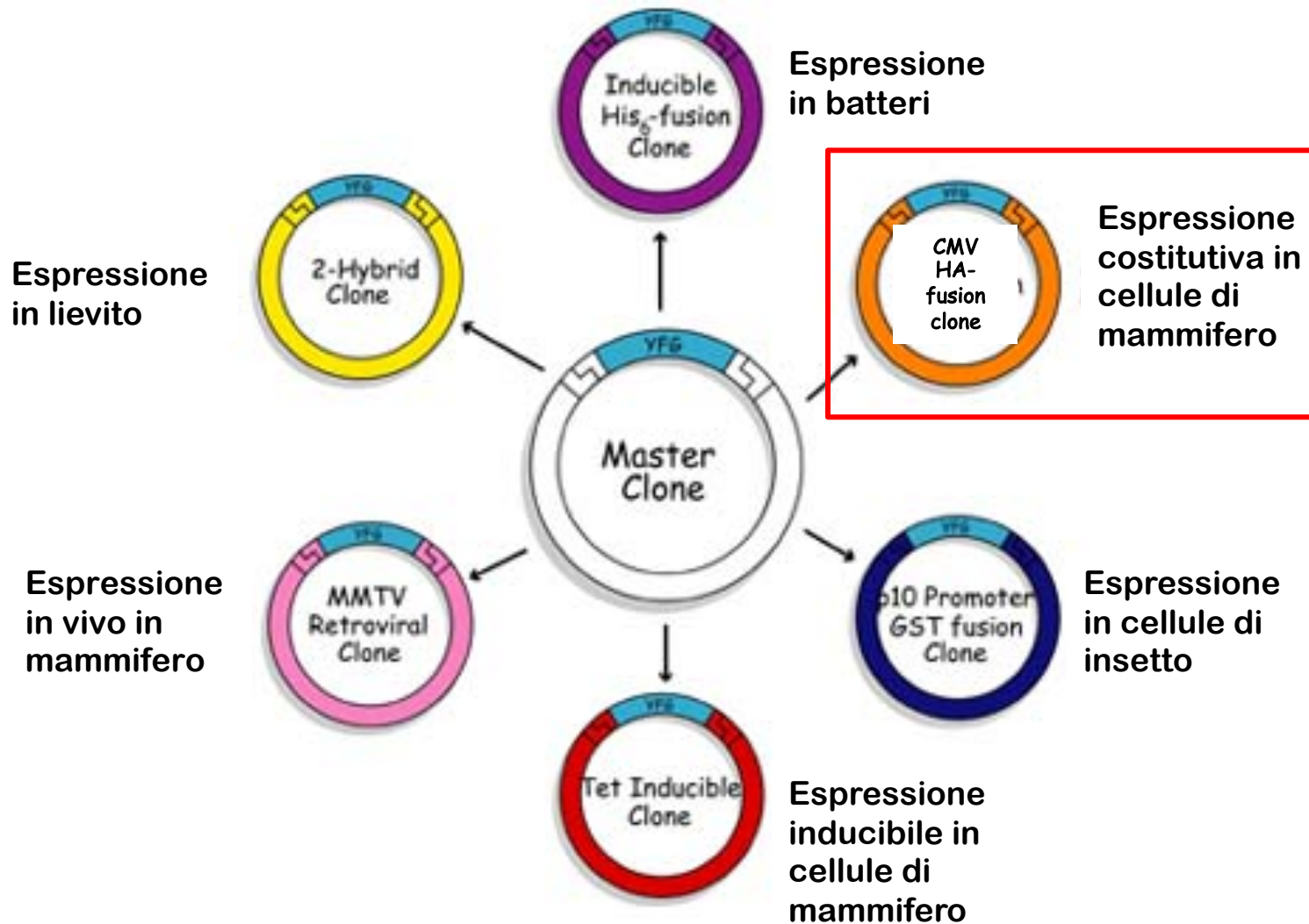
# SARS-CoV-2 Genome



## 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

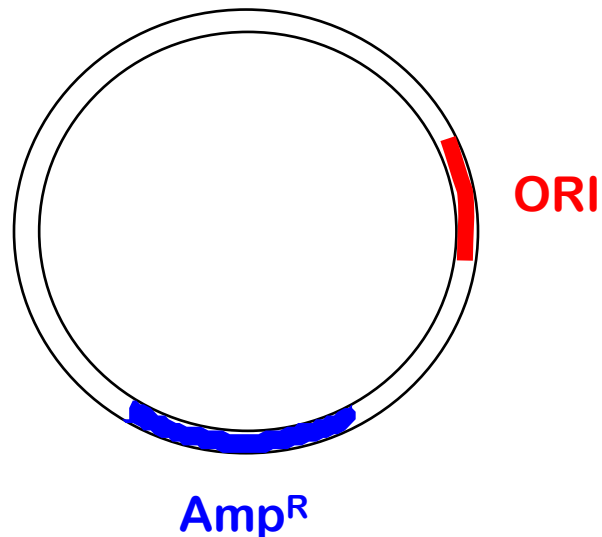
# Subclonaggio del master clone da un vettore shuttle



# Caratteristiche dei vettori plasmidici di espressione per cellule eucariotiche

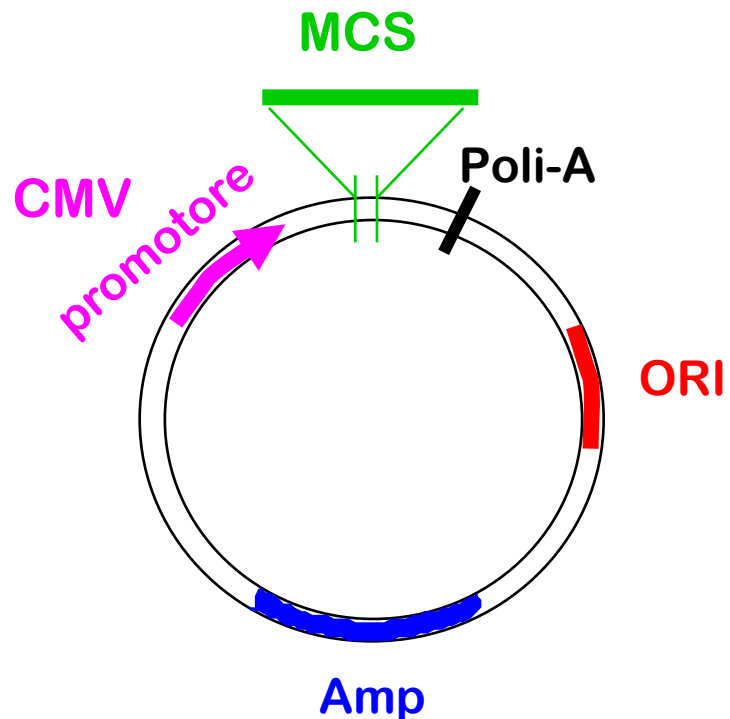
1) Sequenze necessarie per il mantenimento e l'amplificazione in **batteri**

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



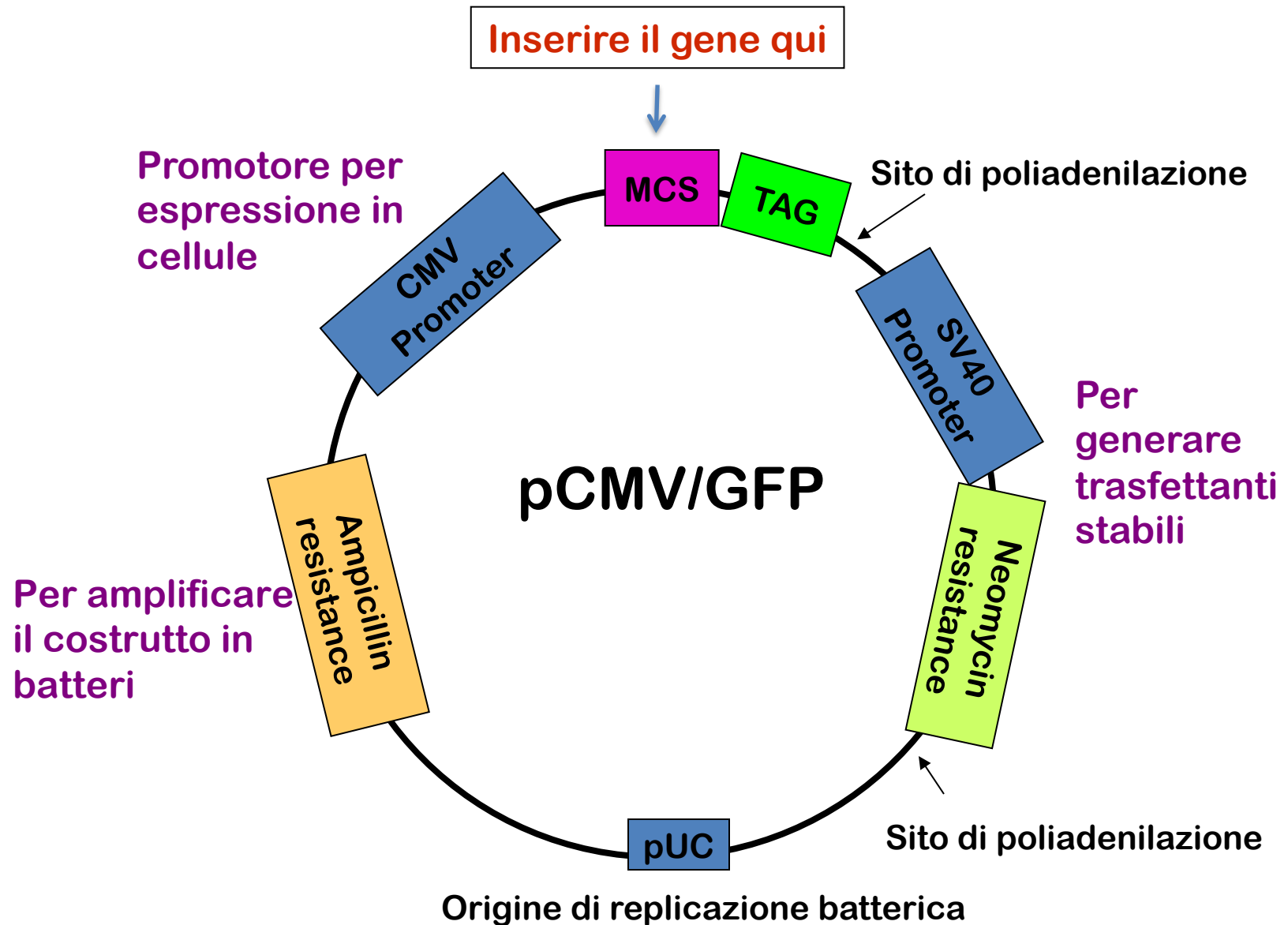
2) Sequenze necessarie al **clonaggio** del gene e alla sua **espressione** in cellule **eucariotiche**:

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

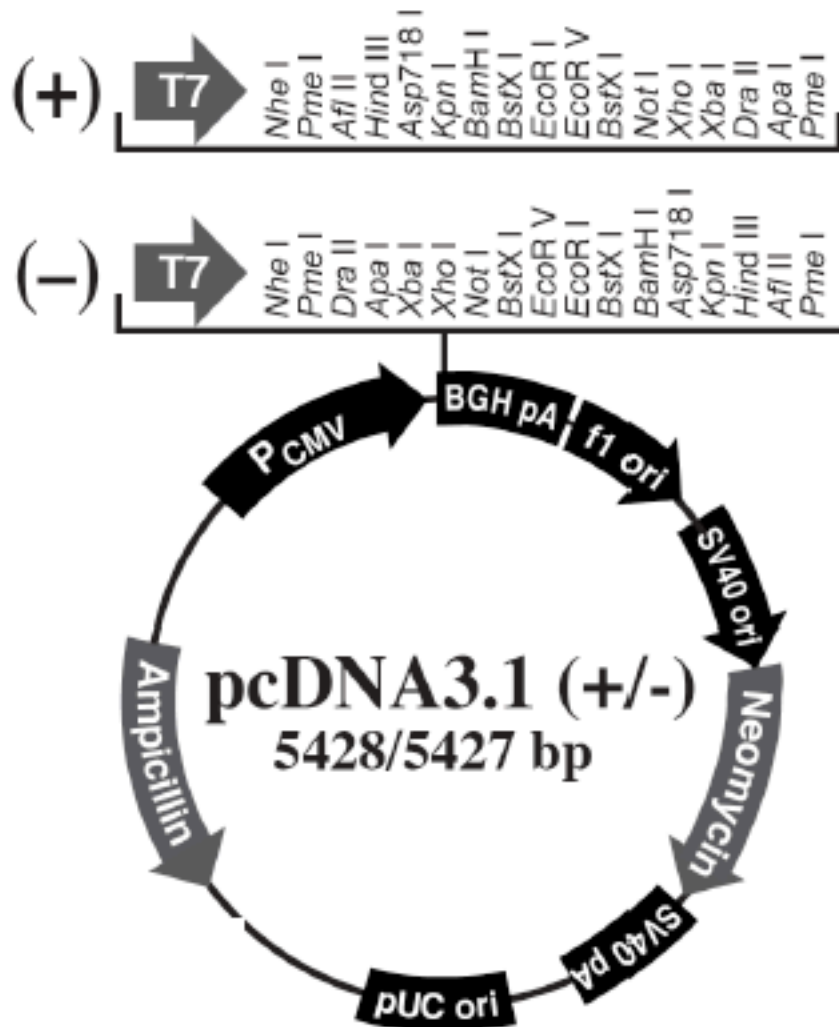




# Vettore per espressione di cDNA



## Il vettore pCDNA3



P<sub>CMV</sub>: 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

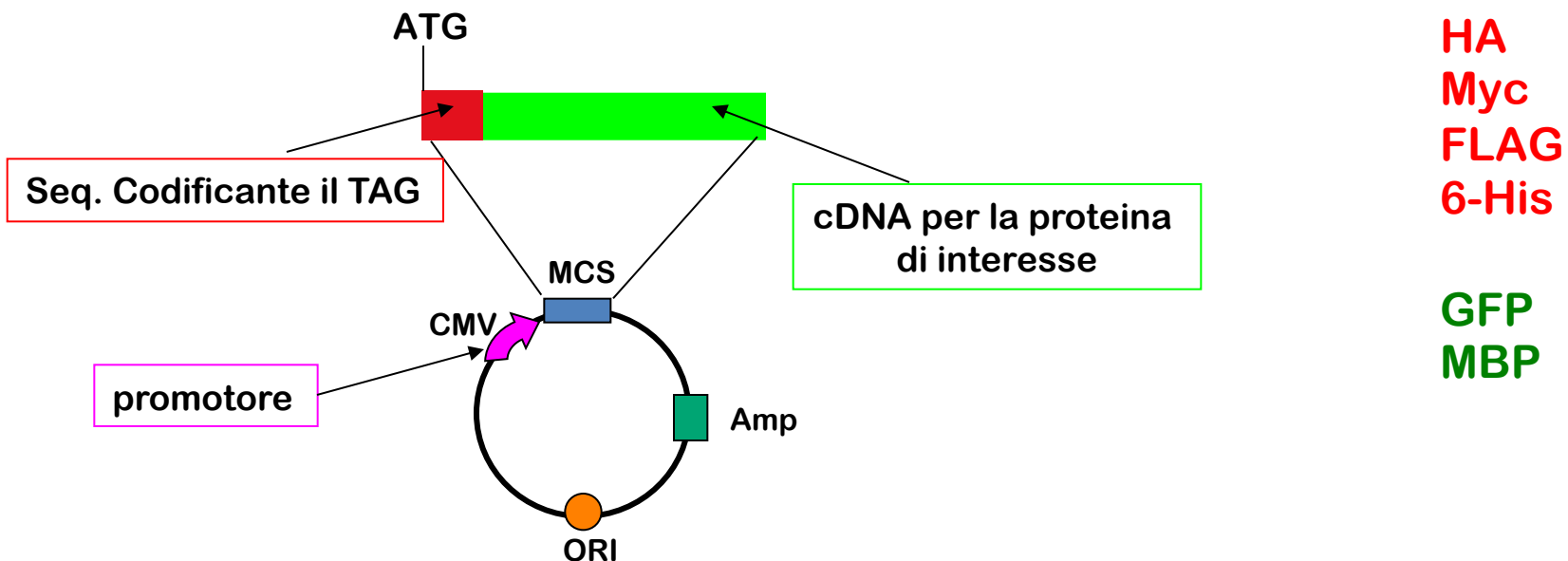
Allo scopo di VISUALIZZARE, RECUPERARE O PURIFICARE una proteina sovraespressa,

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

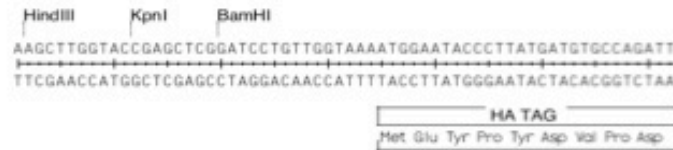
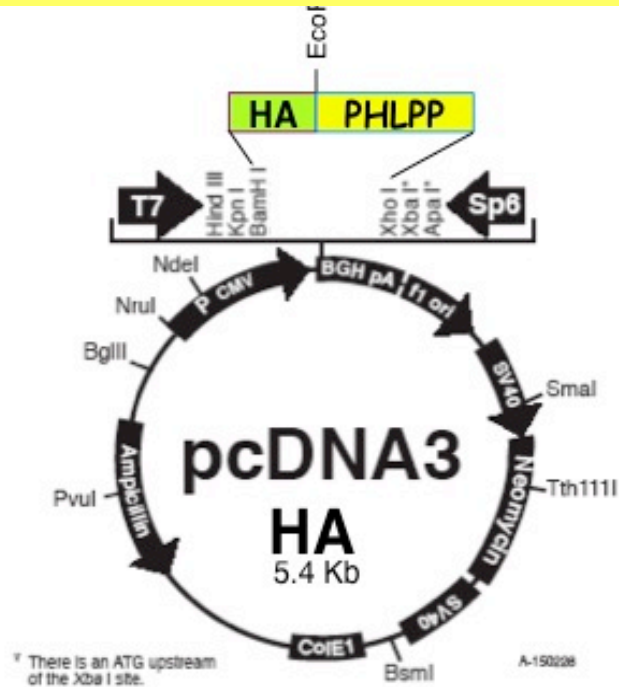
La sequenza codificante il TAG è inserita in un **vettore di espressione** e **clonata nella stessa cornice di lettura (in frame)** al **cDNA** codificante la proteina, a monte o a valle.

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

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



# Human Influenza hemagglutinin (HA) aa 98-106 TAG largamente utilizzato come epitopo in vettori di espressione

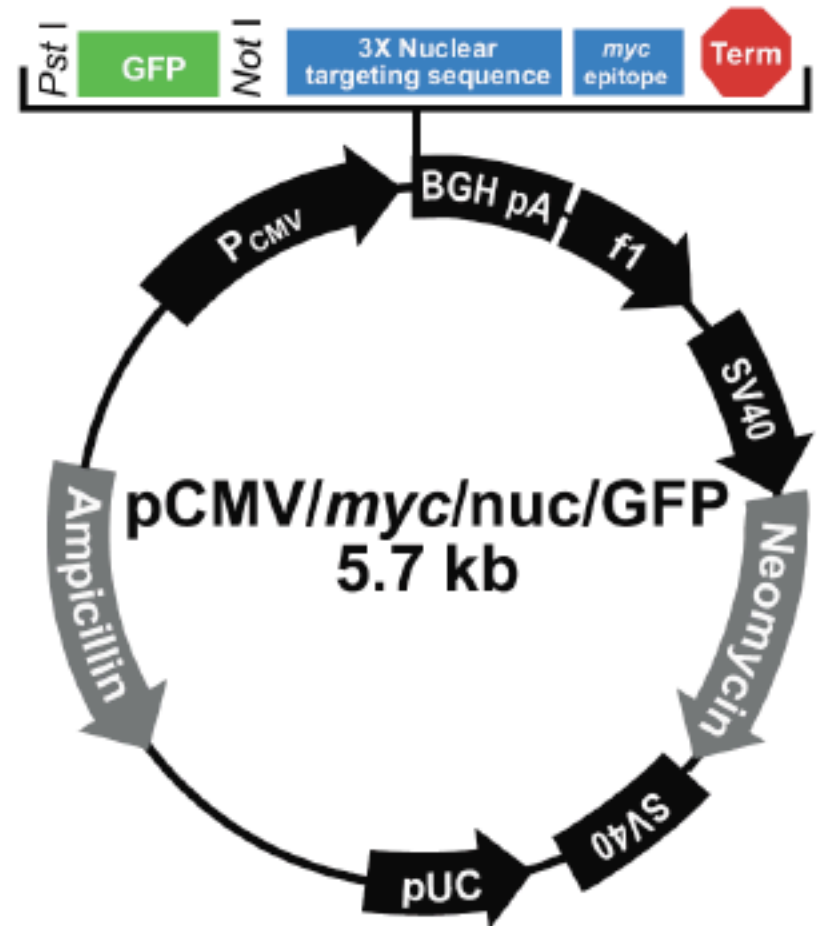
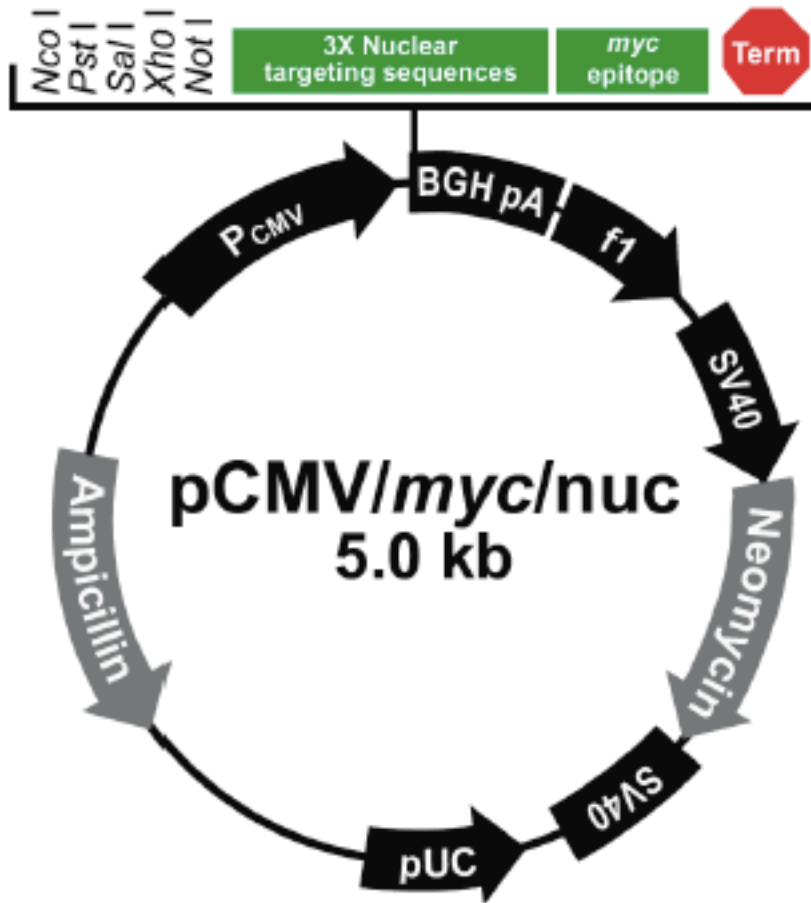


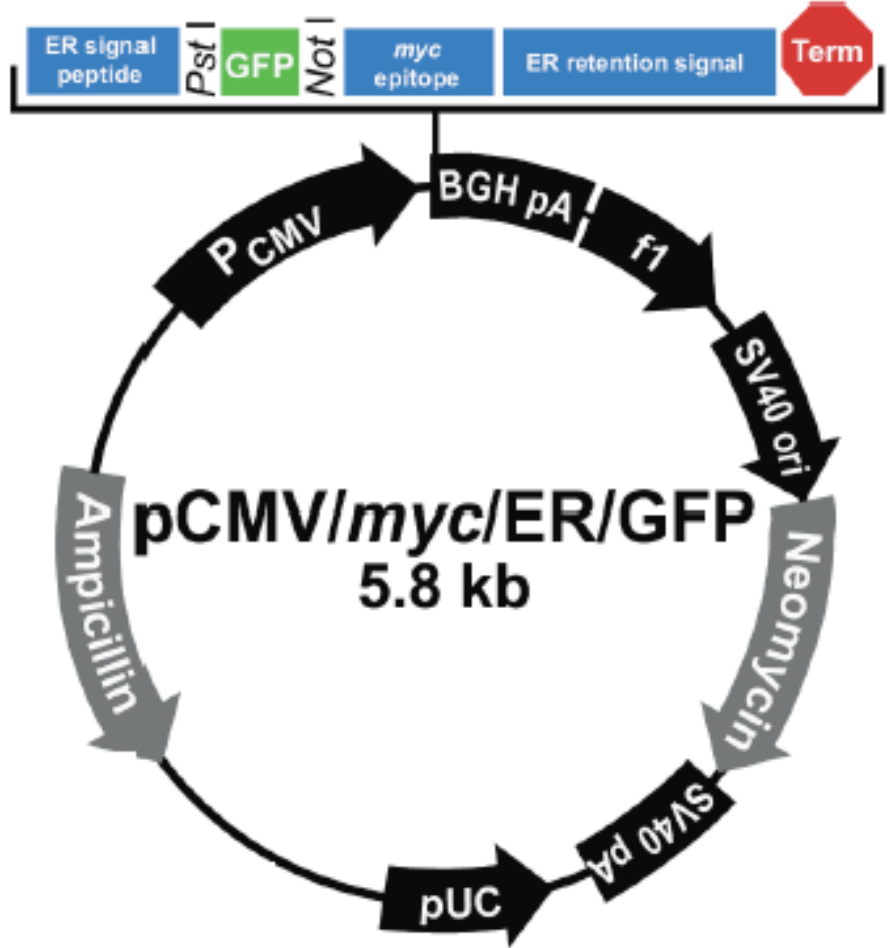
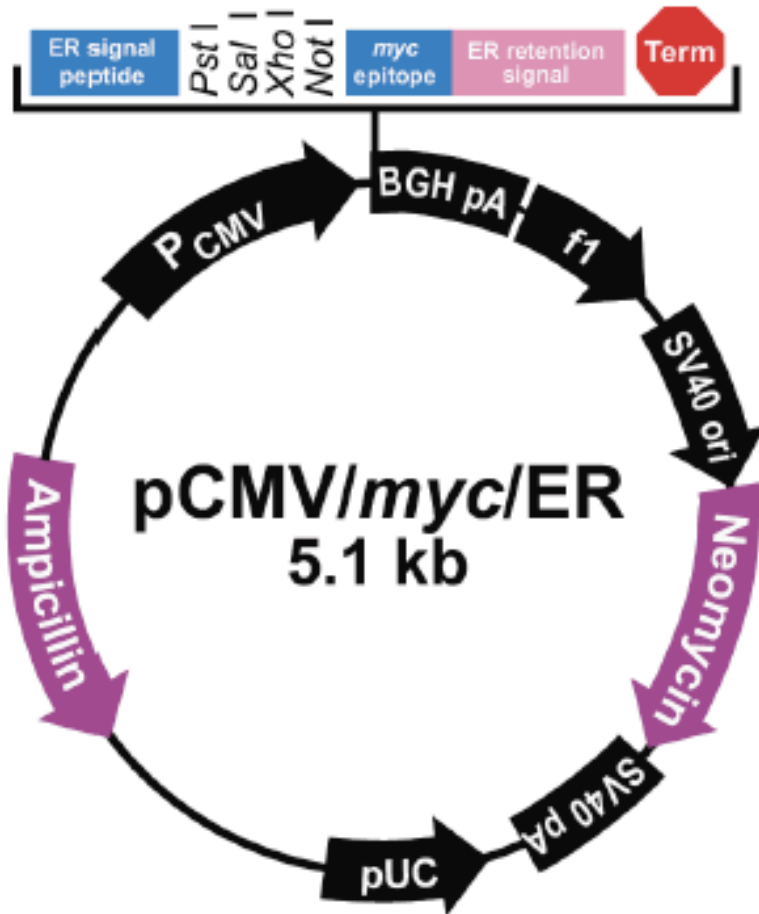
**Problema:**  
**dirigere l'espressione di una proteina ectopica a  
una specifica localizzazione subcellulare**

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

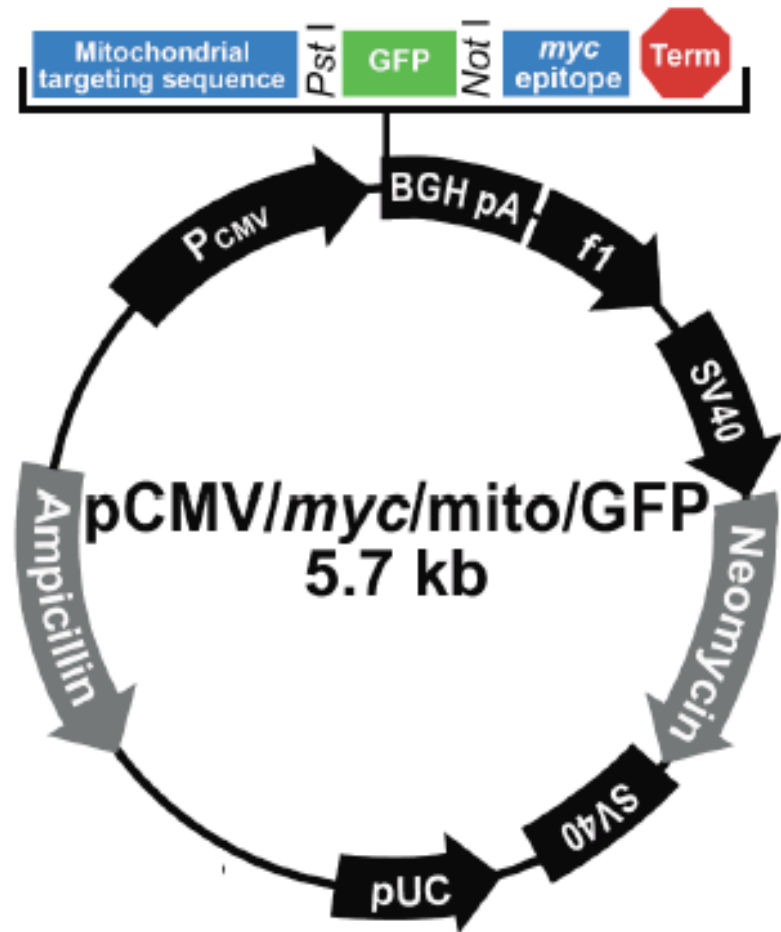
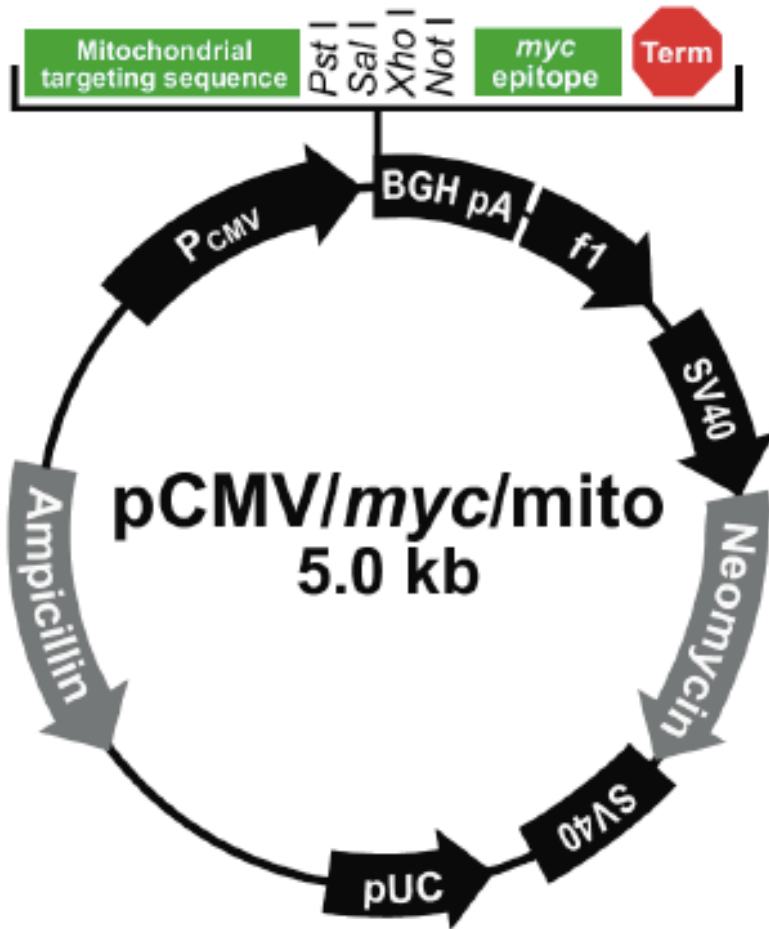
**Soluzione: vettori di espressione che contengono  
sequenze SEGNALE**

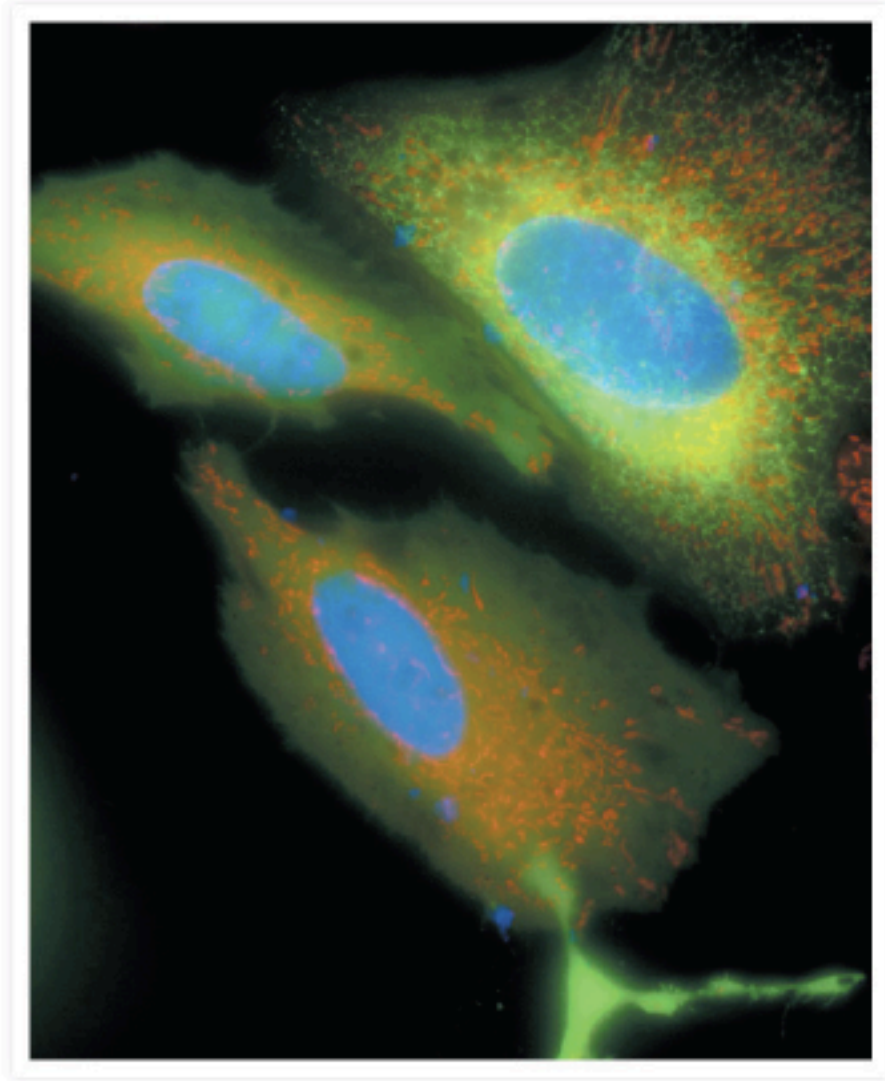
## Localizzazione subcellulare di proteine di fusione



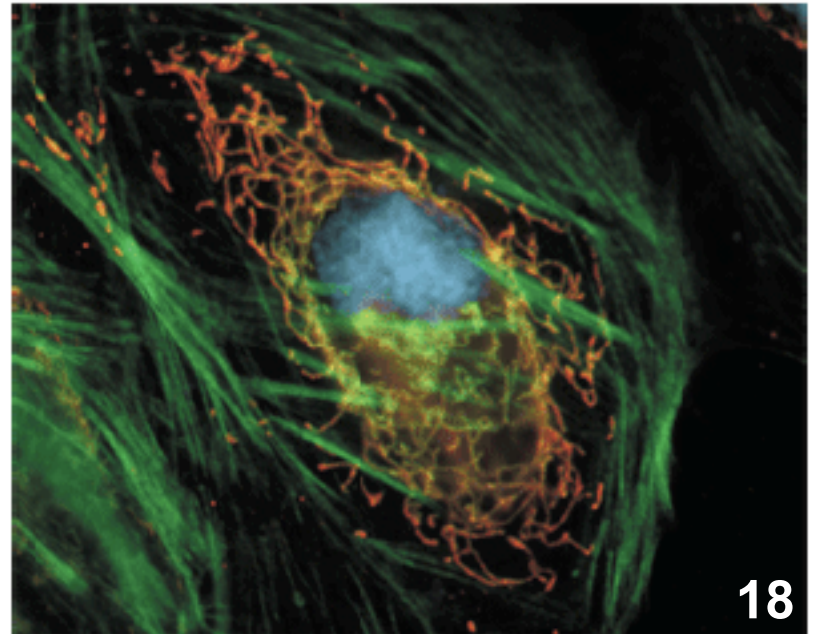
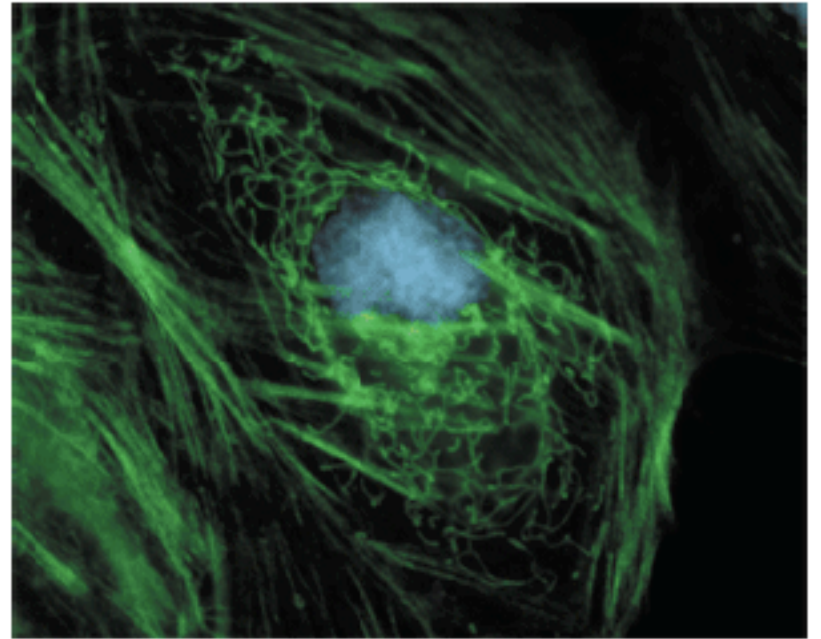








pShooter (ER)

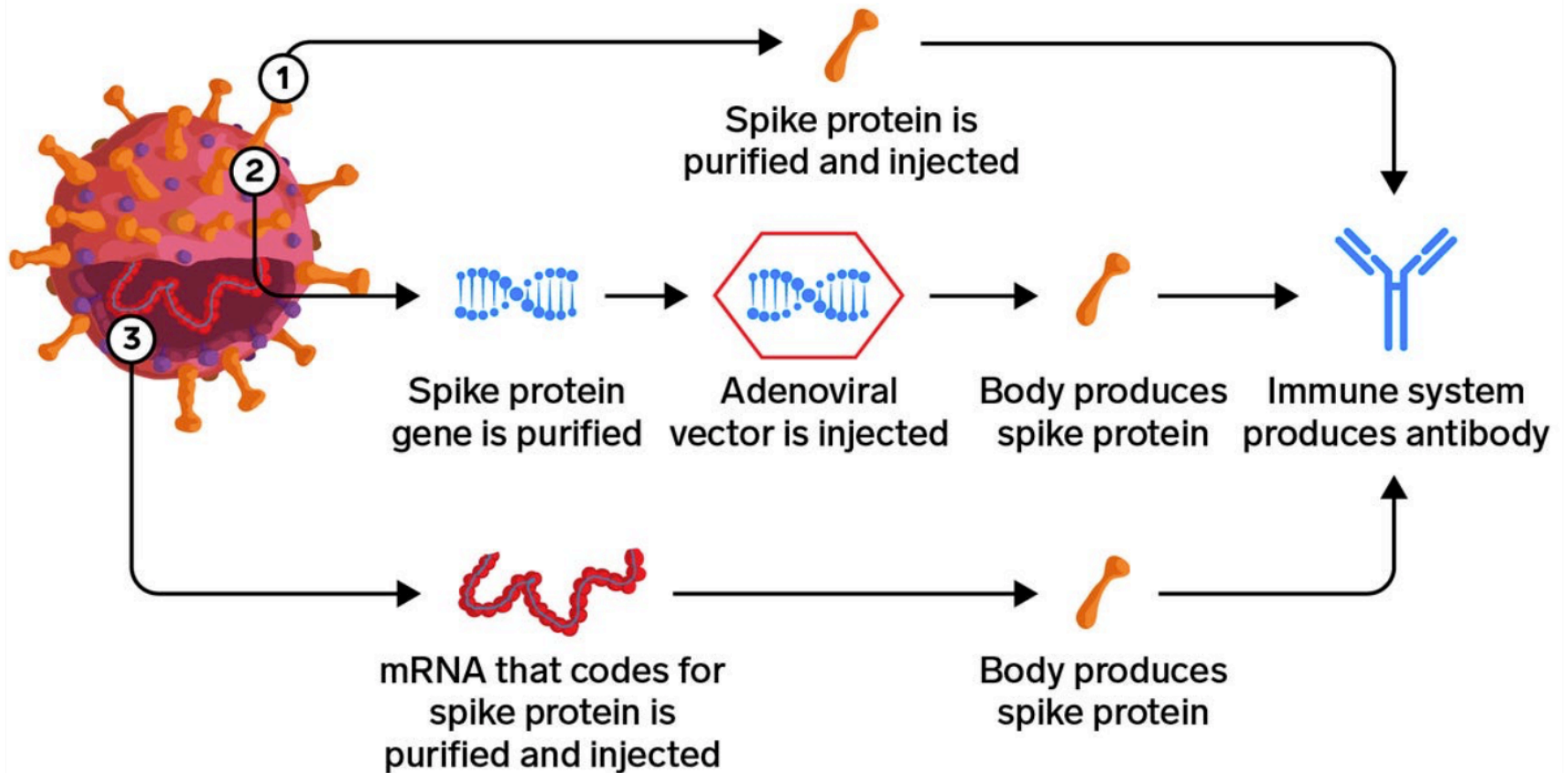


pShooter (mito)

**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](#)

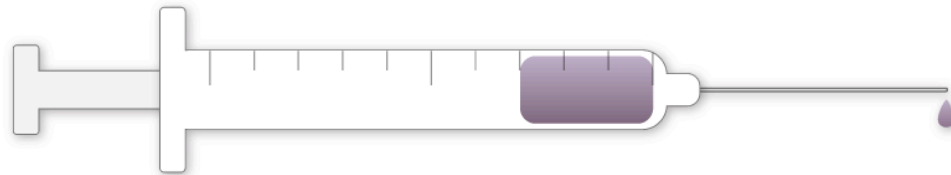
[Answers to Your Vaccine Questions](#)

[11 Things to Know](#)

[How Pfizer](#)

# How the Pfizer-BioNTech Vaccine Works

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

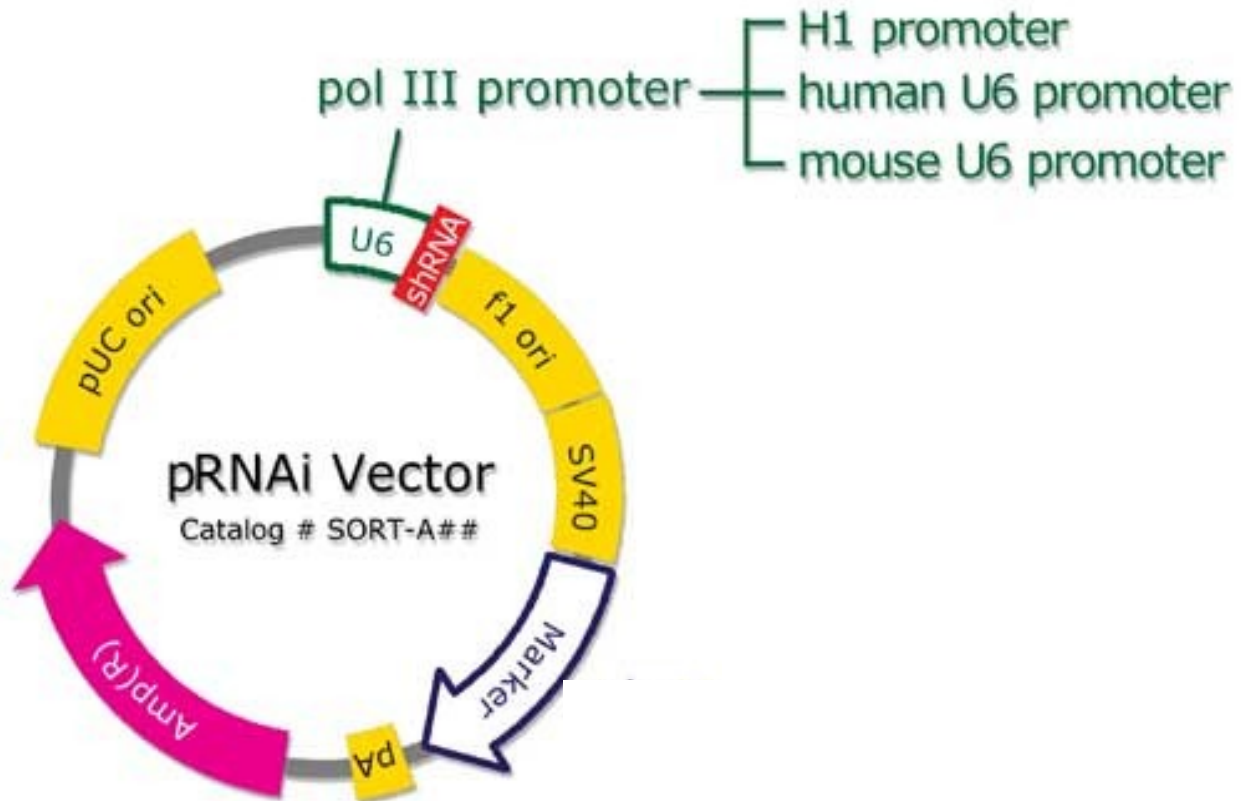


**Problema:  
ridurre l'espressione di una proteina endogena**

**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**

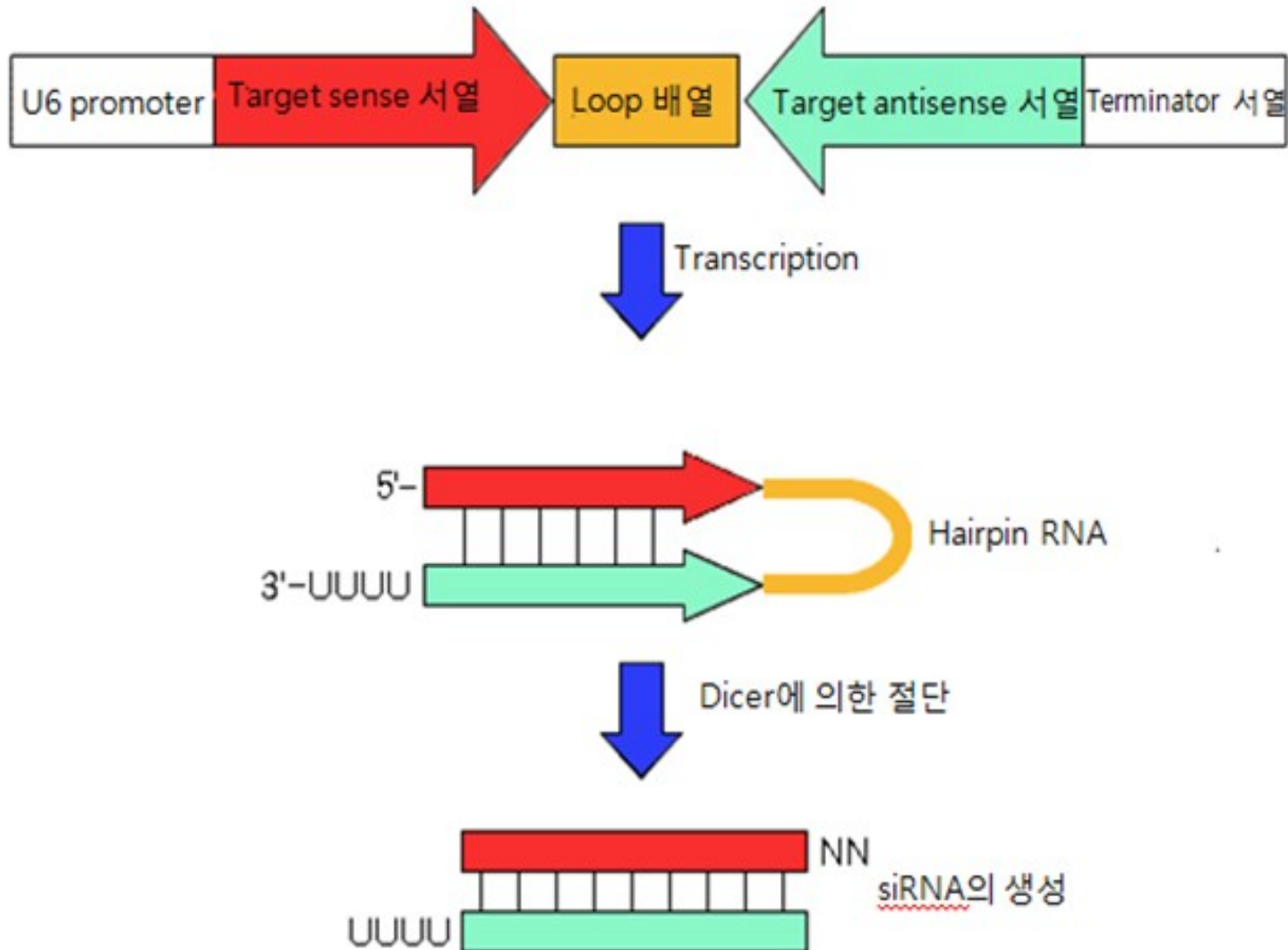
**Soluzione 2: gene editing mediante CRISPR-Cas9**

## Espressione di shRNA

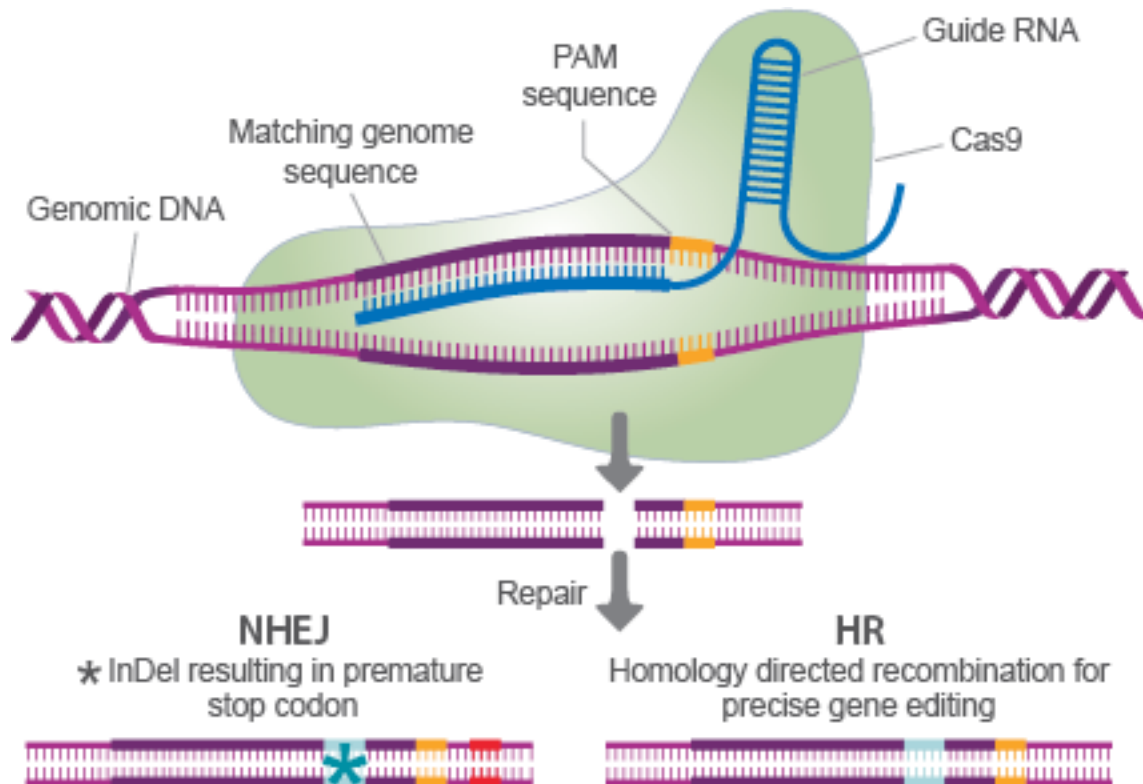




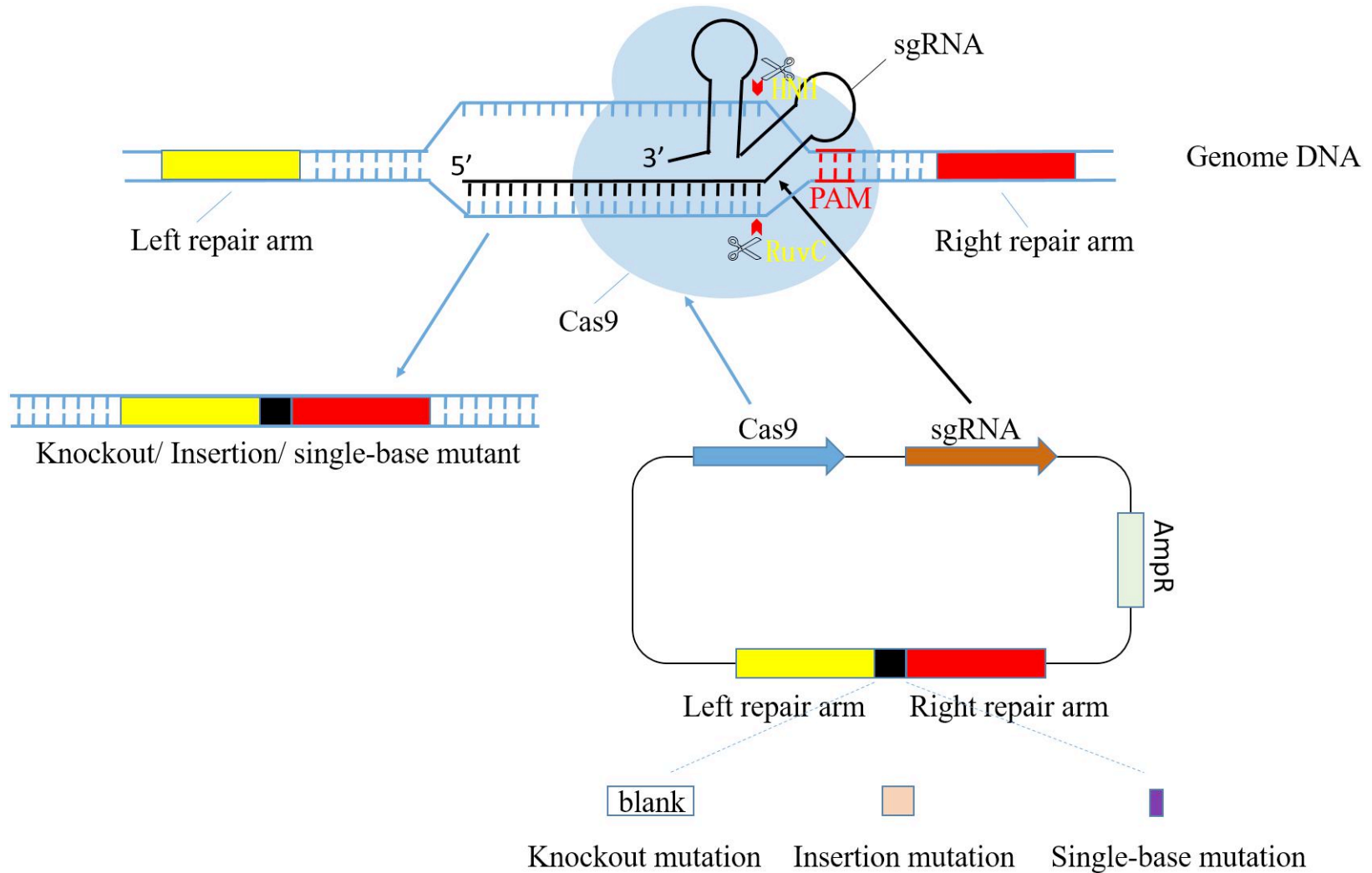
## Espressione di shRNA



# Gene editing mediante CRISPR-Cas9



# Vettori per gene editing mediante CRISPR-Cas9



## Espressione transiente

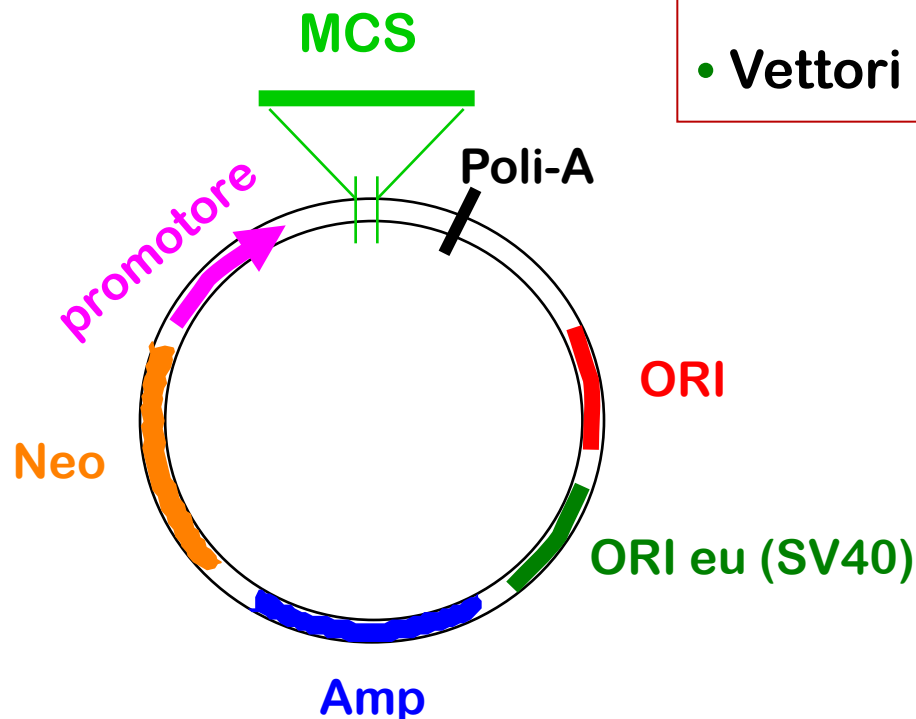
- Il DNA trasfettato rimane in forma di **episoma** ma non può essere replicato, e **viene perso** dopo qualche divisione
- **n° di copie** del plasmide nella cellula trasfettata: elevato e variabile
- **Eterogeneità** di espressione in diverse cellule
- **Esperimenti brevi** (24-72 ore)

## 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:

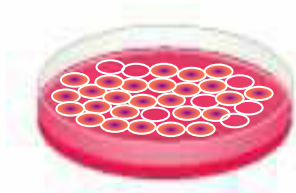
- Marker di **selezione** (geni per la resistenza a Neomicina –G418, Puromicina, Hygromicina) per l'ottenimento di cloni stabili
- Sequenze per la **replicazione autonoma** in cellule eucariotiche (**origine virale**)



- Vettori ad integrazione
- Vettori episomiali

## Ottenimento di trasfettanti stabili

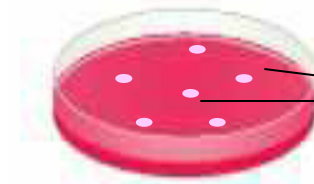
Per ottenere cellule trasfettate stabilmente è necessario **subclonare** il cDNA di interesse in un **vettore** di espressione per cell eucariotiche che contenga un **gene codificante** per un **marcatore selezionabile**, ad es. **resistenza ad un antibiotico** (es. Neomicina).



1. **Trasfezione**



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

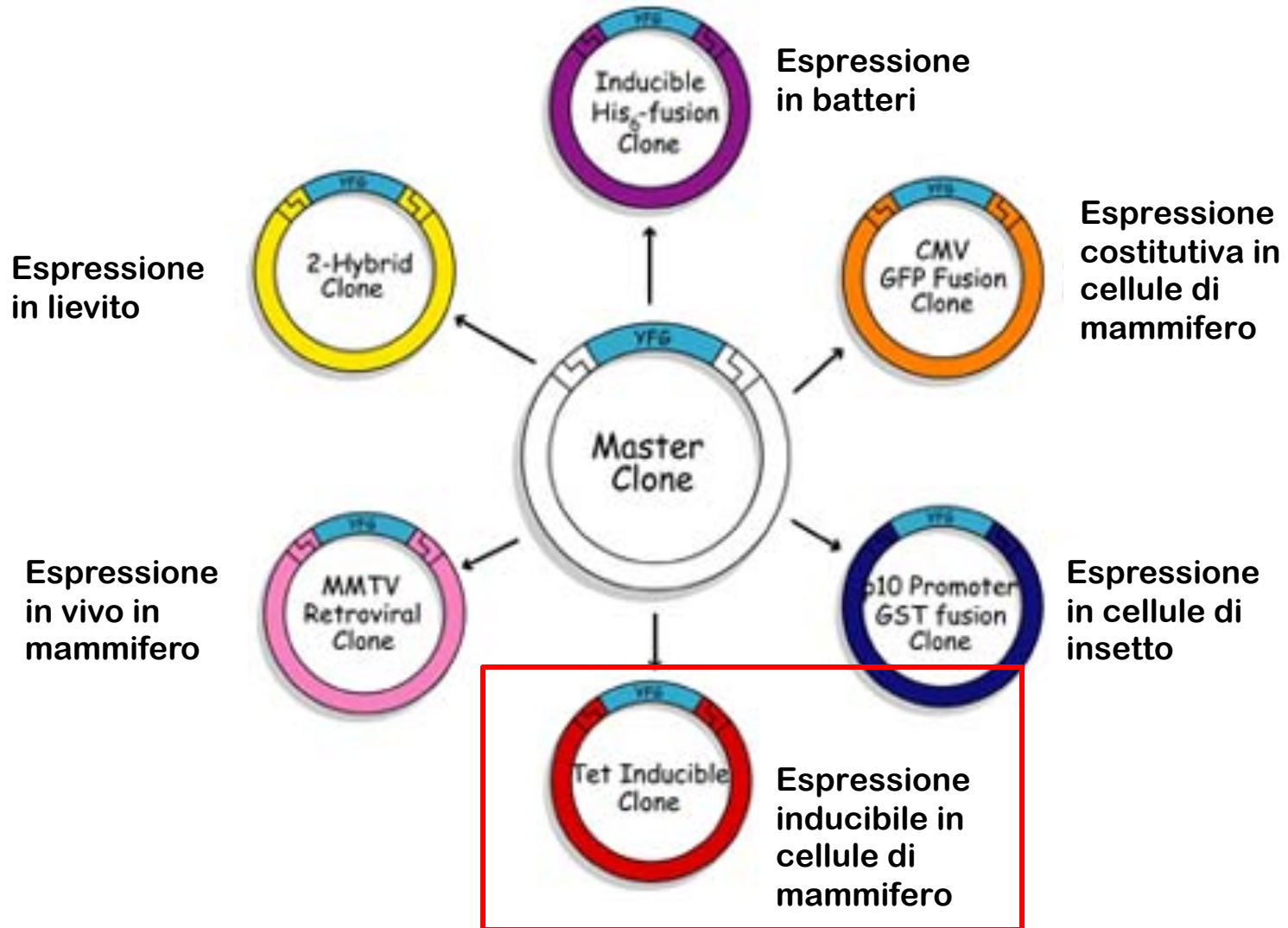


Cloni

Dopo 2 o più settimane...

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

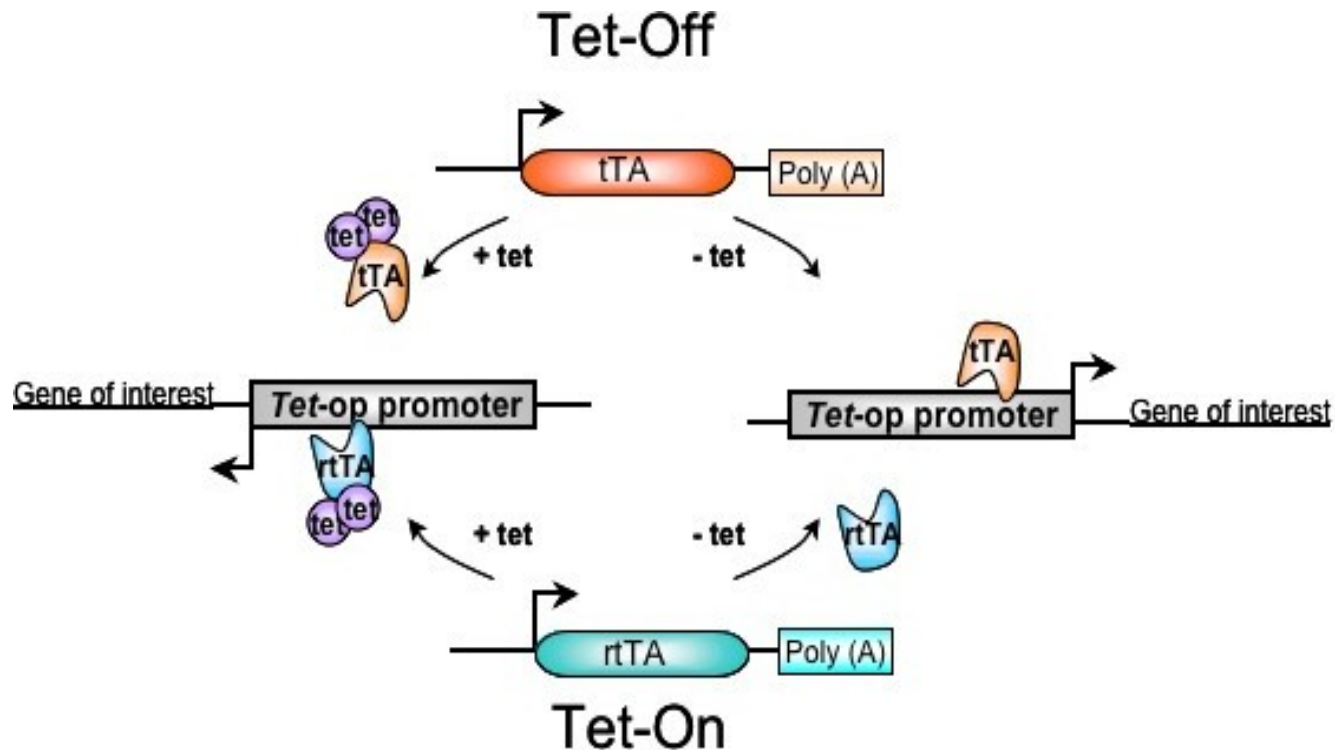
# Espressione inducibile





## Sistemi tet-on/tet-off

TFs controllati da tetraciclina regolano il promotore Tet-op

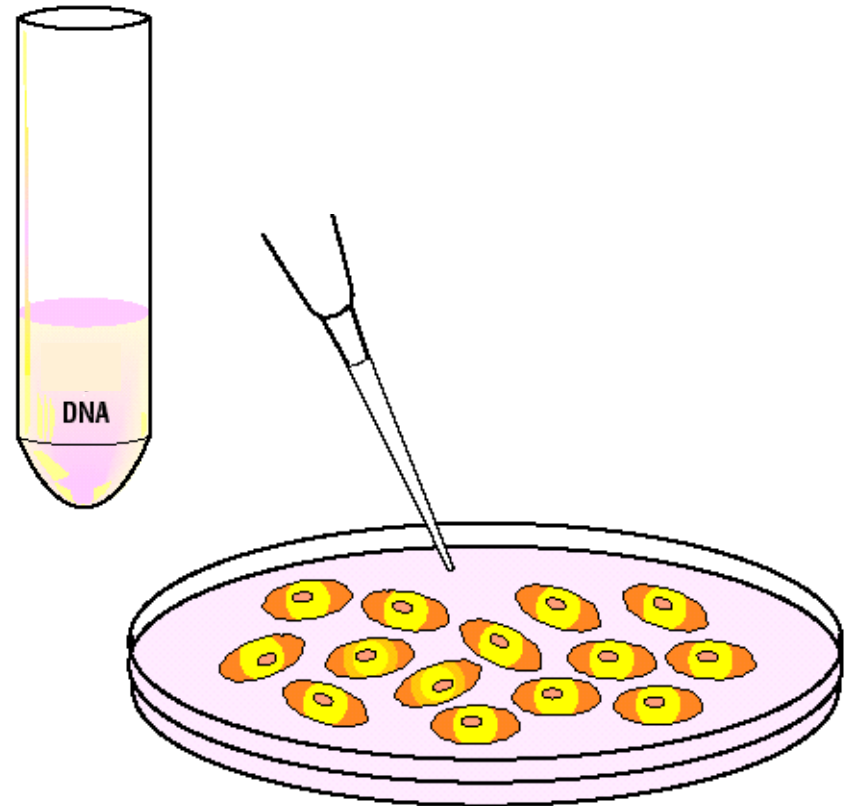


**TET-Off system:** tetracycline prevents the tTA transcription factor from binding DNA at the promoter. Gene expression is inhibited in the presence of tetracycline.

**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
<b>Cellule che si trasfettano facilmente</b> (linee cellulari)	Reagenti chimici
<b>Cellule che si trasfettano difficilmente</b> (linee cellulari, cellule primarie)	Lipofezione
<b>Cellule che si trasfettano molto difficilmente</b> (cellule primarie, cellule differenziate)	Trasferimento genico mediato da virus
	Metodi fisici

## Precipitazione con calcio fosfato

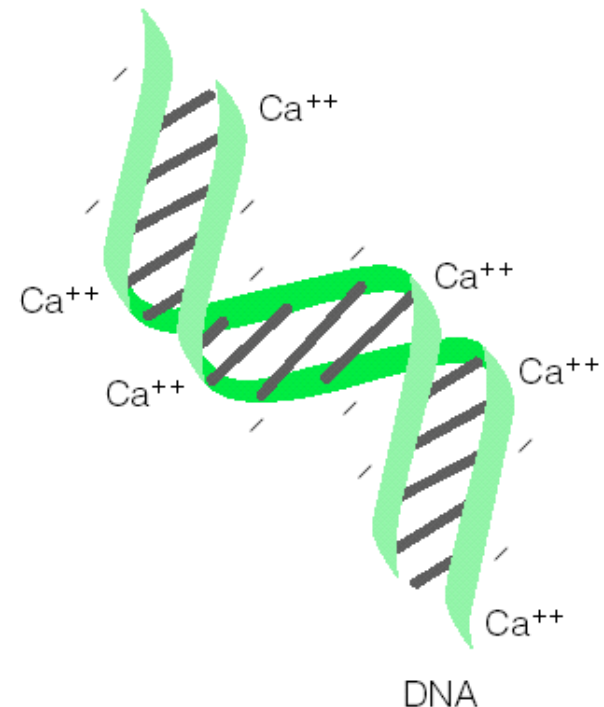
Il DNA viene mescolato a  $\text{CaCl}_2$  in un **tampone fosfato** a pH 7.12: si formano dei precipitati insolubili di  $\text{DNA}/\text{CaPO}_4$  che vengono poi aggiunti al mezzo di coltura e **precipitano** sulle cellule. Il DNA entra nelle cellule per **endocitosi**.

Tipo di **cellule**: in adesione

**Efficienza**: bassa

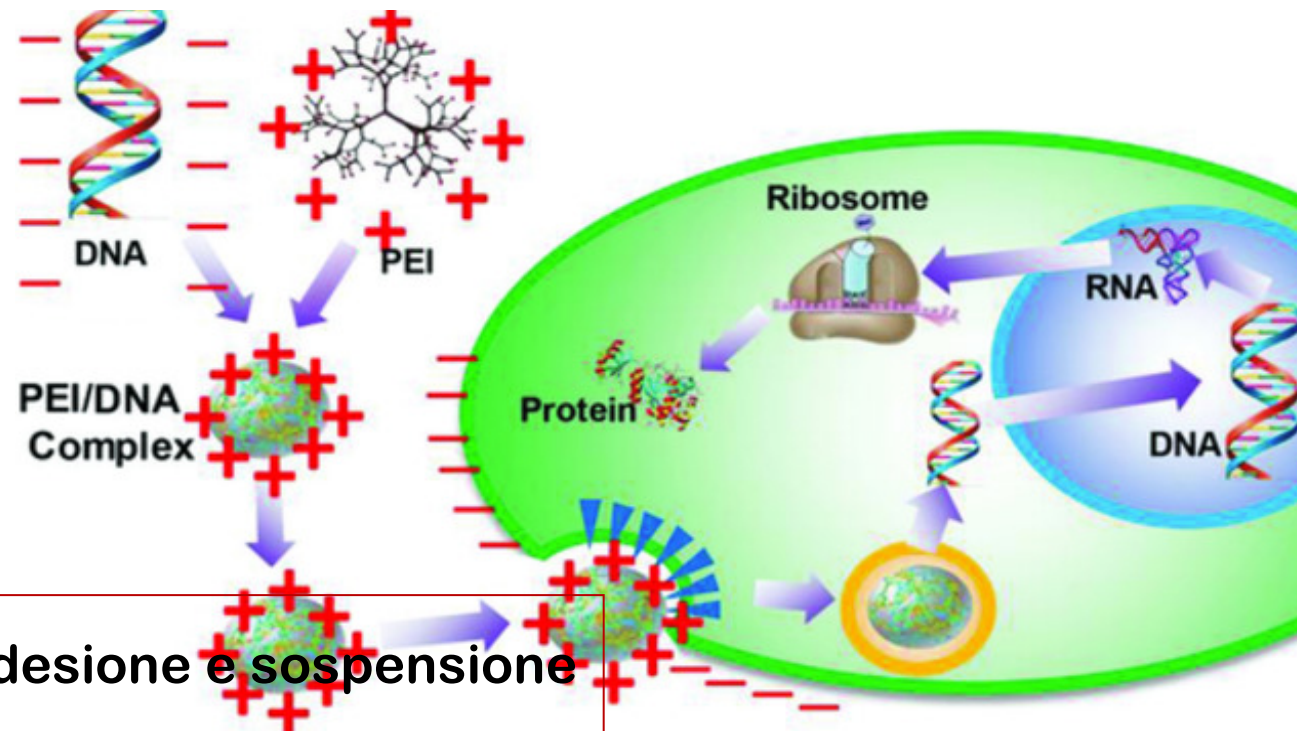
**Tossicità**: bassa

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

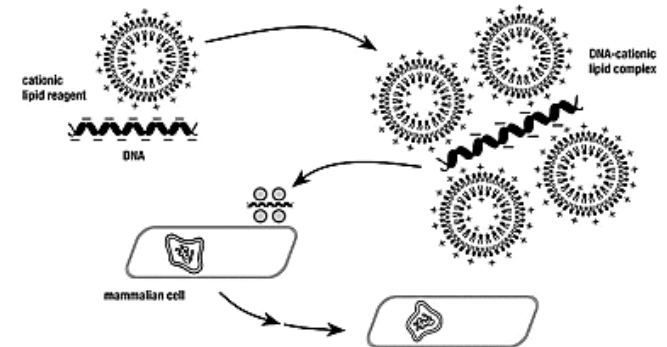
Tipo di **saggio**: transiente e stabile

# 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.

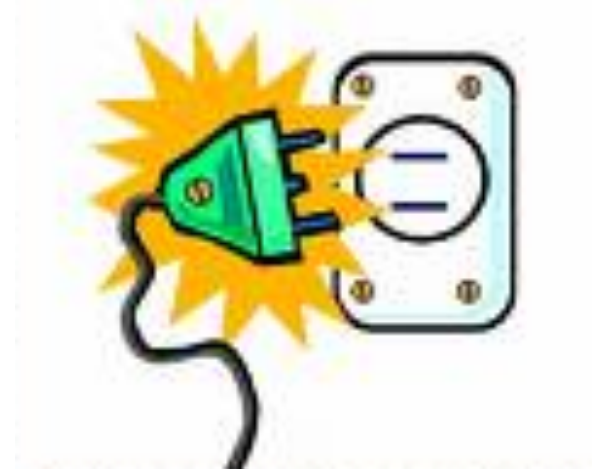
Tipo di **saggio**: transienti e **stabili**

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

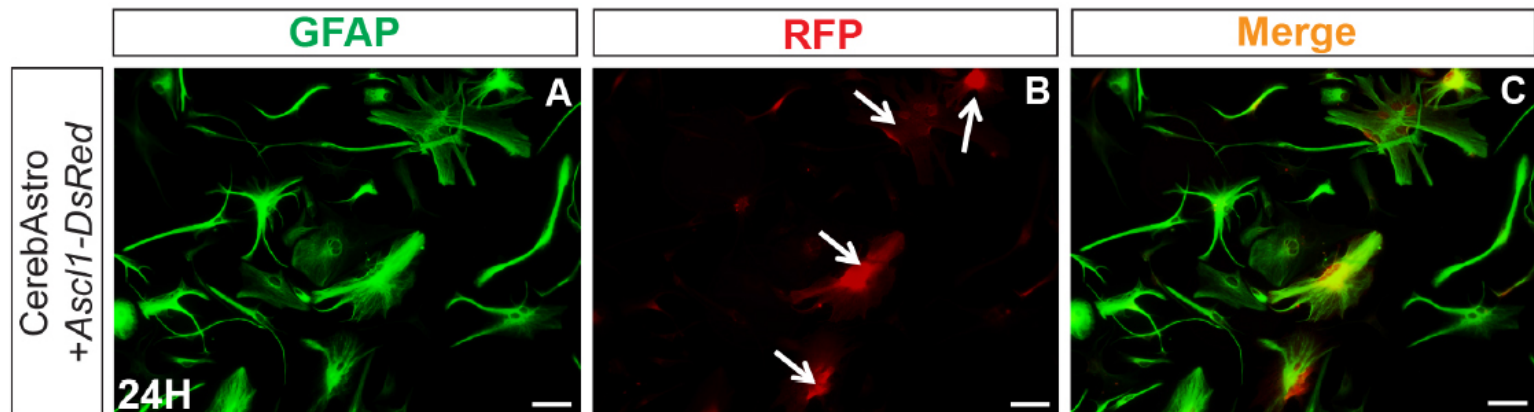
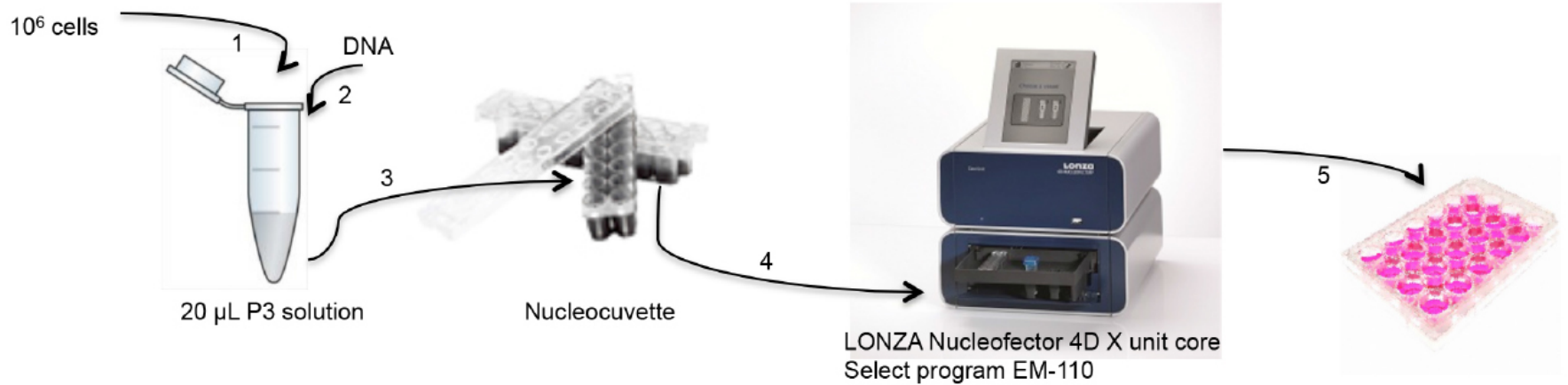
**Efficienza**: alta

**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**

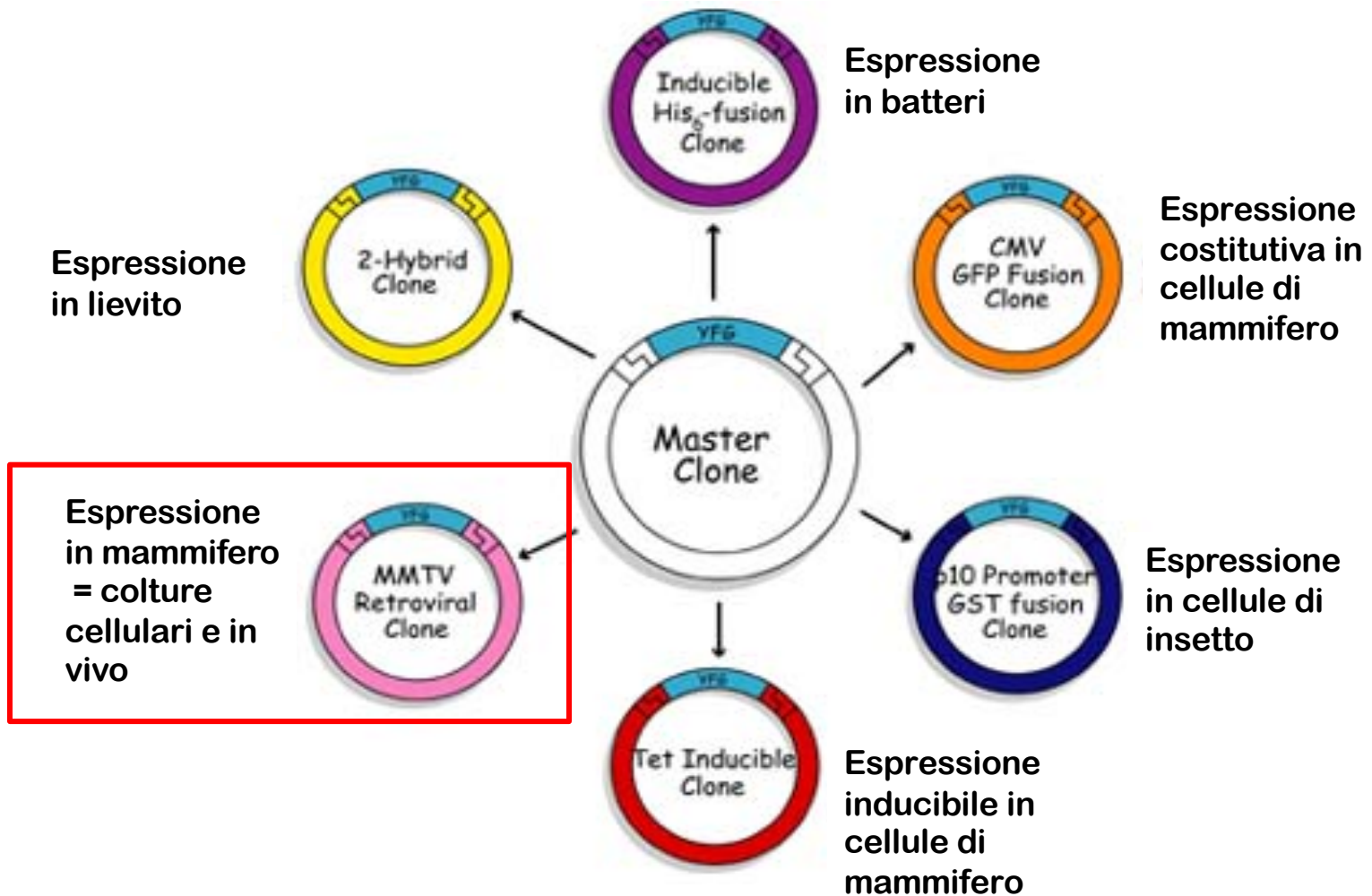
che vengono poi “**sparate**” nelle cellule mediante un'apposita strumentazione che usa **elio** ad alta pressione.

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

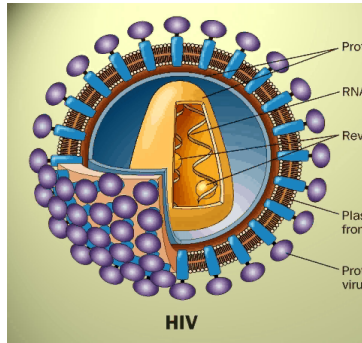
Oppure cellule molto difficili da trasfettare, es. cellule vegetali (dotate di parete).



# Metodi biologici I: vettori derivati da virus



## Trasferimento genico mediato da virus

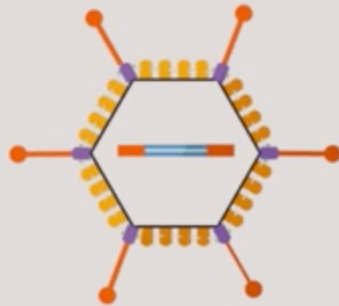


Diversi tipi di **virus** possono essere **modificati** per ottenere **vettori** per il trasferimento di geni non virali mediante l'**infezione** di cellule eucariotiche.

# Trasferimento genico mediato da virus



Retrovirus



Adenovirus

**Most  
Commonly  
Used  
Viral Vectors**



Lentivirus



Adeno-associated Virus

## Trasferimento genico mediato da virus

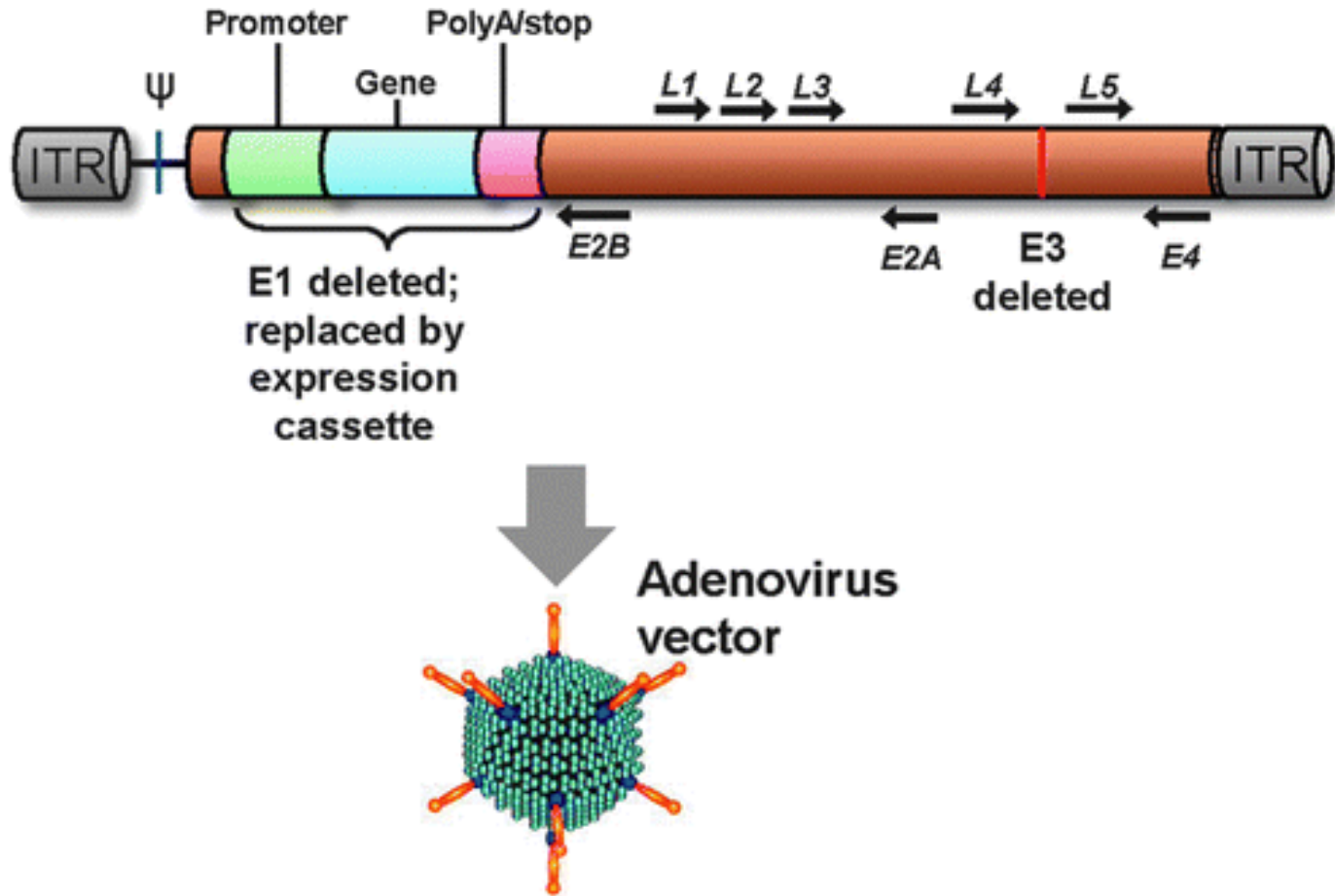
**Retrovirus** – hanno la capacità di **integrarsi** nel genoma di cellule **proliferanti**

**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.

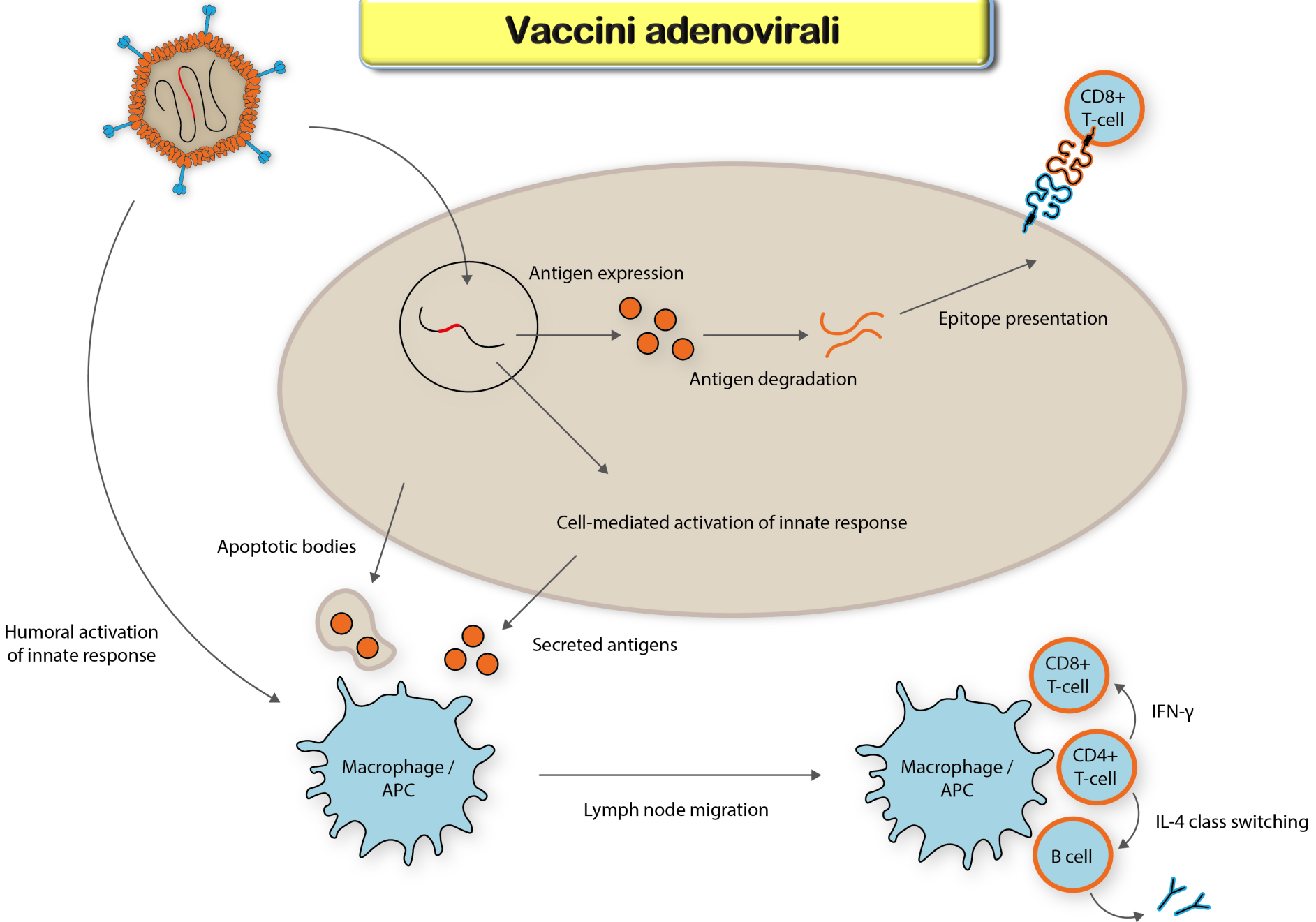
I **virus ricombinanti** possono essere **impaccati in particelle infettive** in speciali linee cellulari, che esprimono le proteine del capsido virale (*packaging cell line*).

# Adenovirus

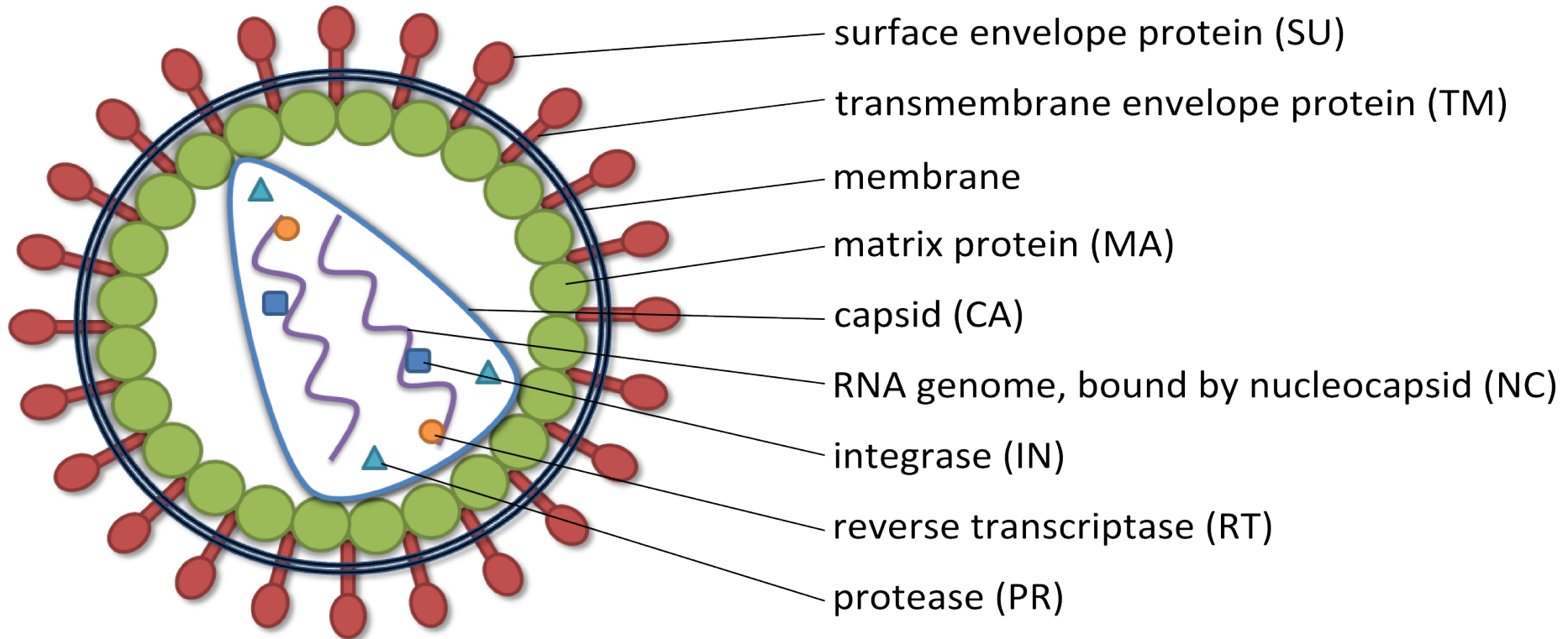




# Vaccini adenovirali



## Retrovirus e lentivirus

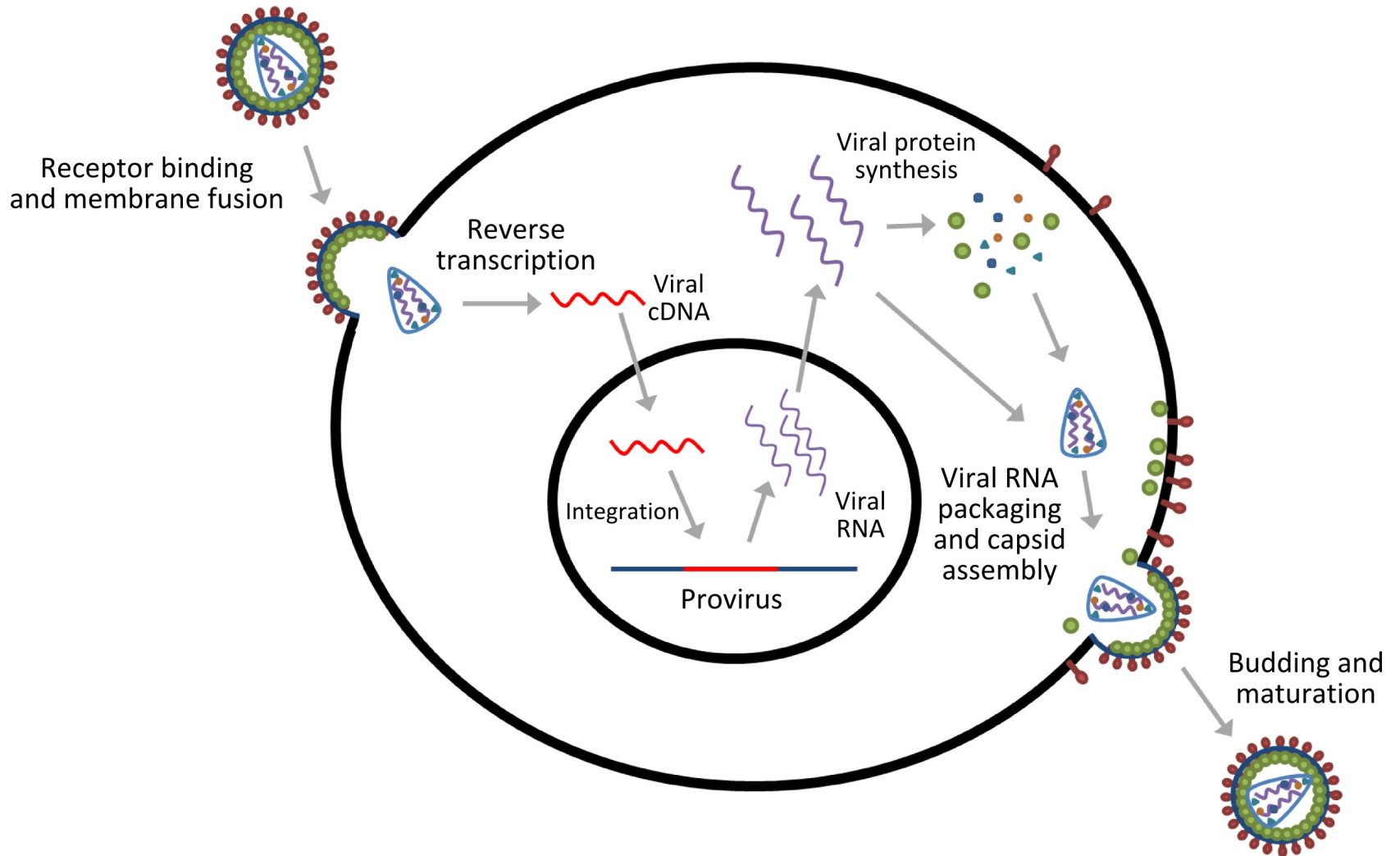


**POL** codifica per gli enzimi **RT, PR e IN**.

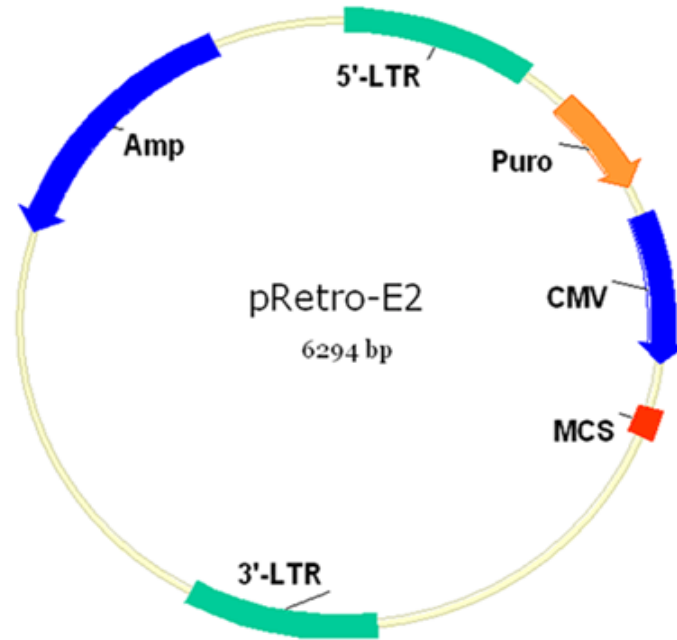
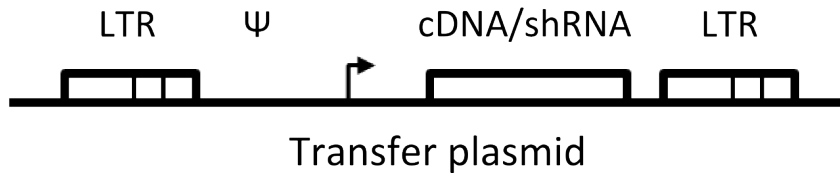
**GAG** codifica per proteine della **matrice** e **capside** MA CA, NC

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

# Il ciclo retrovirale



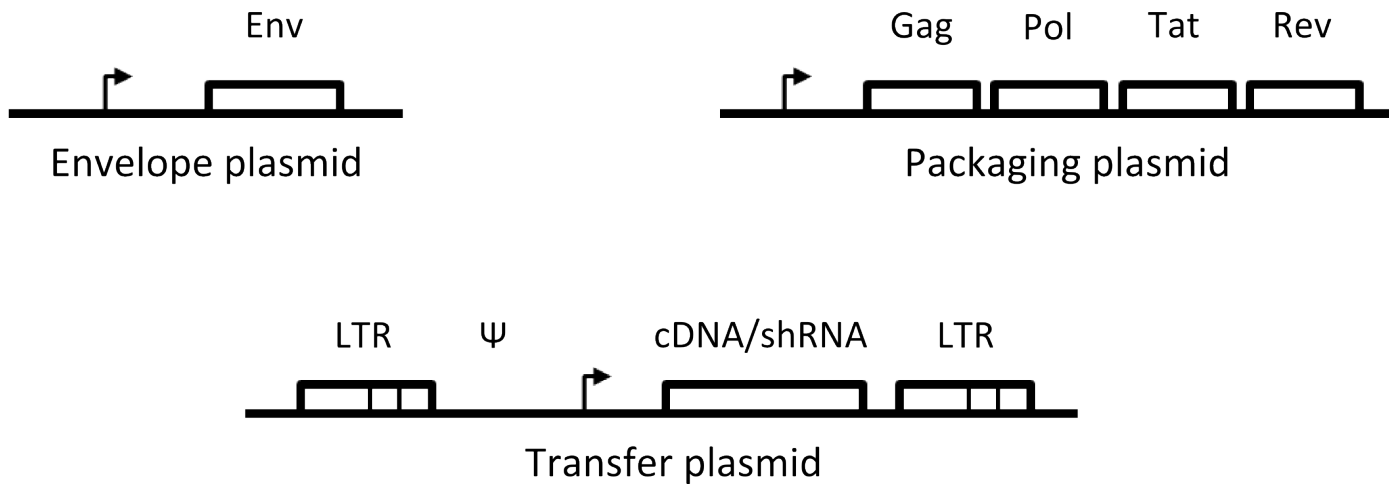
# Esempio di un vettore retrovirale



*Xho I*   *Apa I*   *BamH I*   *Hpa I*   *Sph I*   *Swa I*   *Hind III*  
5'- A GAT CTC GAG GGG CCC GGA TCC GTT AAC GCA TGC ATT TAA ATA AGC TTC  
● 2900   ● 2910   ● 2920   ● 2930

*EcoR I*   *Sal I*   *Not I*   *Cla I*  
GAA TTC GTT AGG CCA TTA AGG CCT GTC GAC AAG CGG CCG CCT CGG CCA AAC ATC GAT -3'  
● 2940   ● 2950   ● 2960   ● 2970   ● 2980   ● 2990

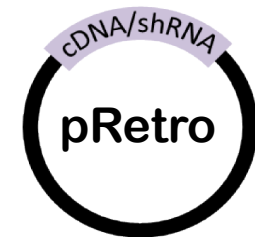
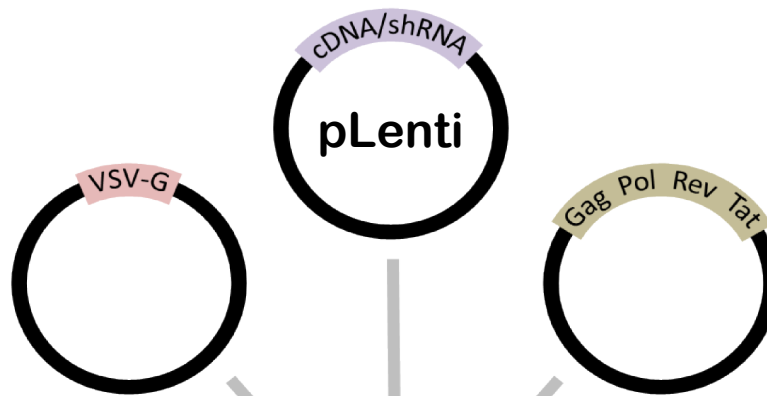
## Preparazione di virus ricombinanti per trans-complementazione



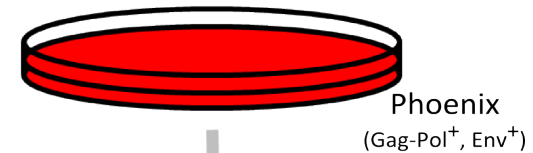
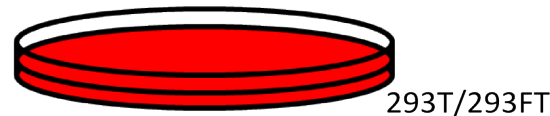
# Preparazione di virus ricombinanti per trans-complementazione

## Lentivirus

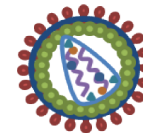
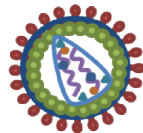
## Retrovirus



1) Transfect packaging cells



2) Collect virus particles



3) Transduce target cells



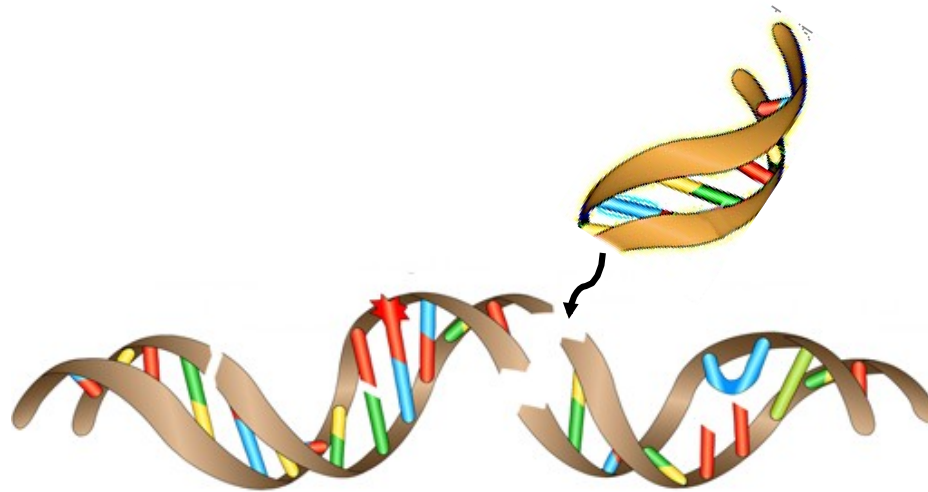


## Sicurezza nell'utilizzo dei vettori retro- e lenti-virali

### Principali rischi:

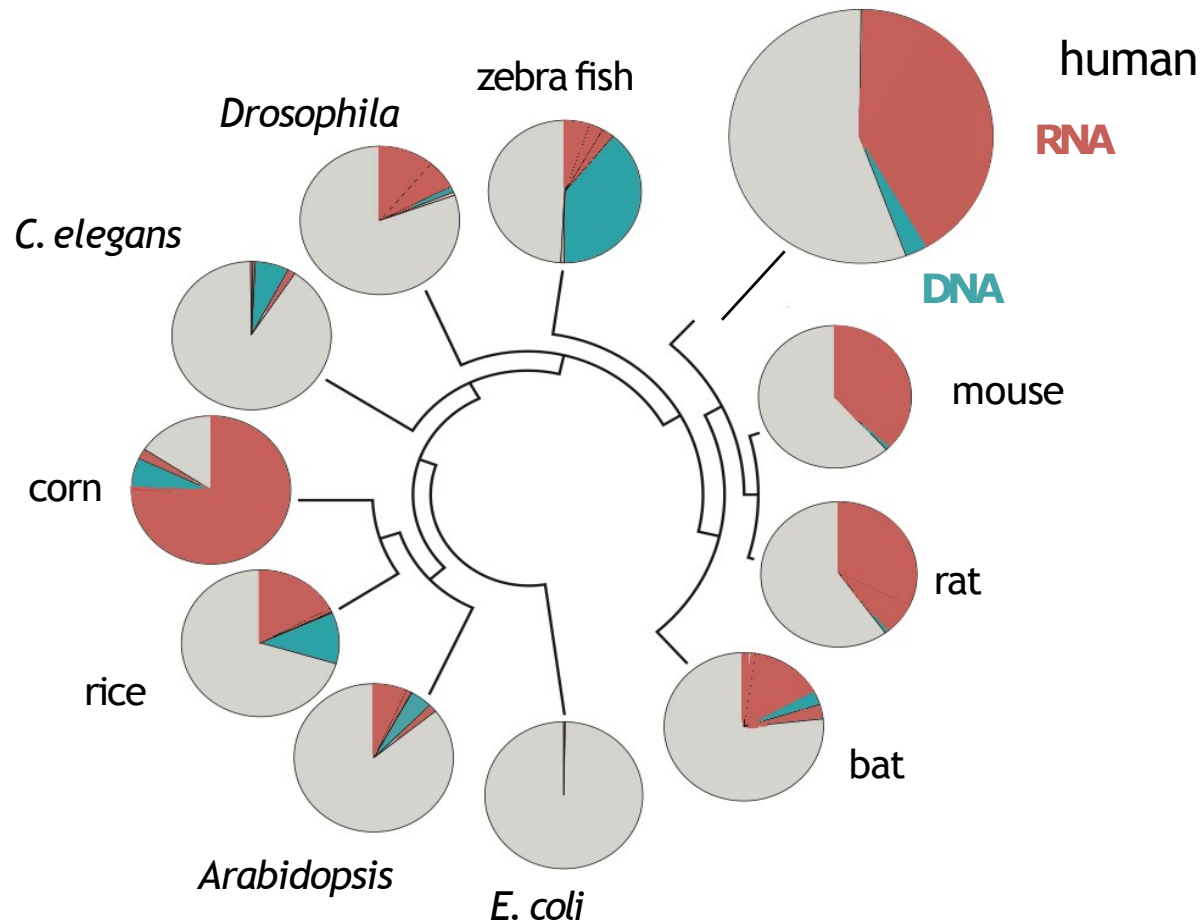
1. Generazione di virus contaminanti competenti per la replicazione (ricombinazione con virus endogeni)
  2. Potenziale oncogenico per integrazione random (in vivo)
  3. Potenziale tossicità del transgene.
- 
1. I vettori lentivirali di 2 e 3 generazione hanno diverse caratteristiche di sicurezza (vettori 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**



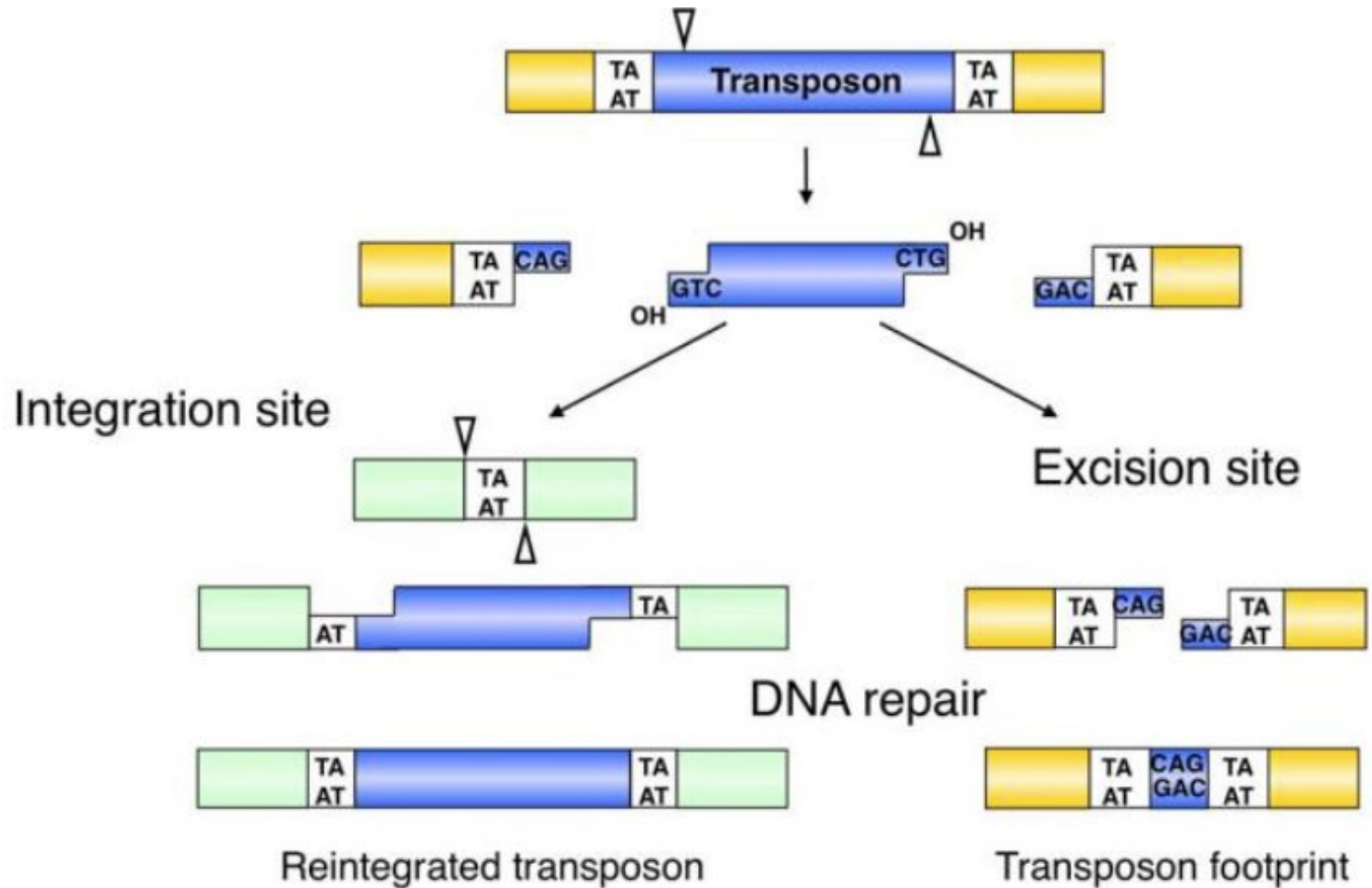


## Utilizzo di TRASPOSONI per l'introduzione di DNA esogeno in cellule in coltura o in vivo



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

## Meccanismo della trasposizione a DNA “cut and paste”



## Vettori derivati da transposoni: SLEEPING BEAUTY

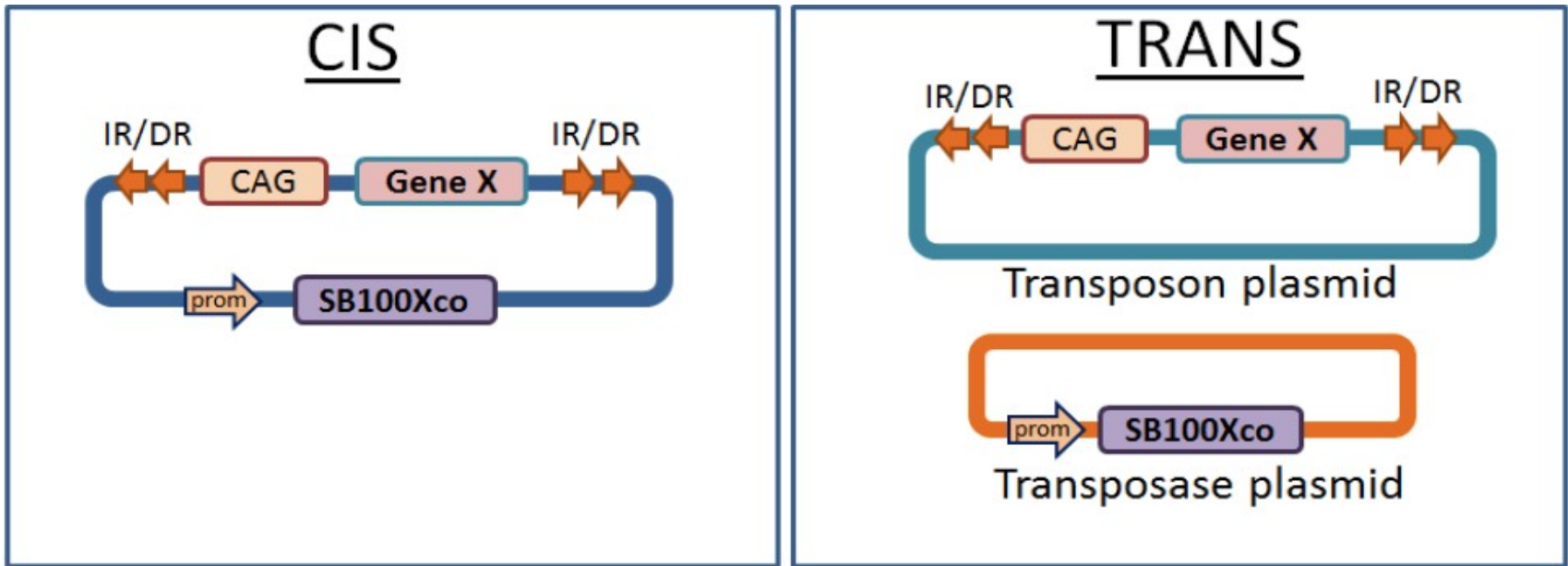


Figure 2: Schematics of Cis and Trans Sleeping Beauty plasmids.