

Cds in Scienze e Tecnologie Biologiche

AA 2020-2021

Corso di Laboratorio di Biologia Cellulare

Lezione 11

SISTEMI REPORTER

GENI REPORTER:

Geni la cui espressione ectopica può essere facilmente visualizzata o misurata in cellule e tessuti

L'imaging di geni reporter in vivo

**permette l'analisi non invasiva di processi fisiologici
e patologici**

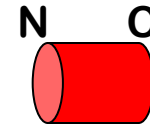
- a) Espressione di proteine di fusione fluorescenti**
- b) Espressione di enzimi reporter**

Utilizzo di geni reporter per visualizzazione di una proteina di fusione mediante live cell imaging

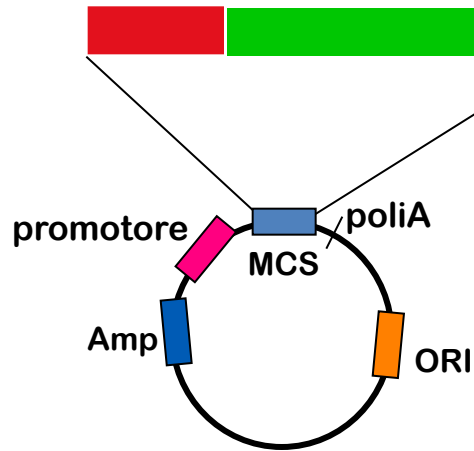
Gene X



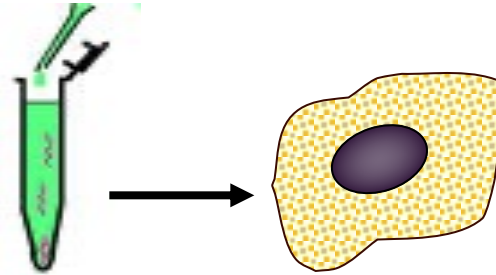
Codifica per la proteina di interesse X



Gene X Reporter - fluo

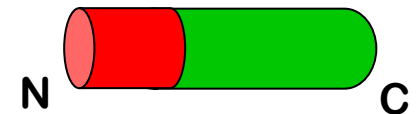


Trasfezione



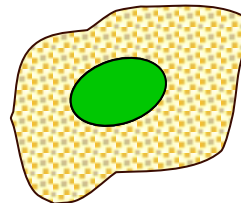
Trascrizione e traduzione:

espressione della proteina di fusione nelle cellule



La proteina X assume la sua tipica localizzazione intracellulare

Visualizzazione in situ

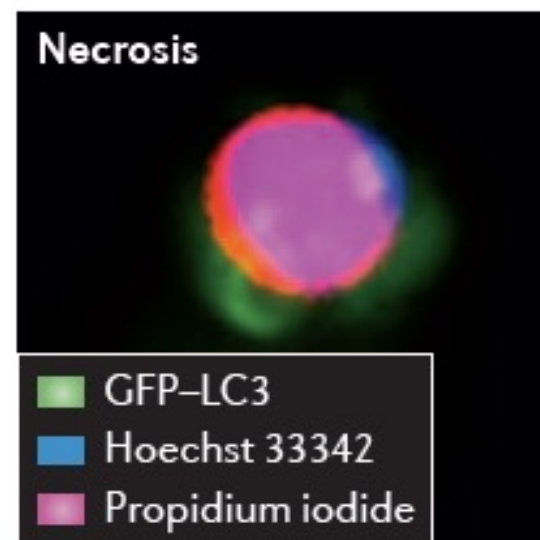
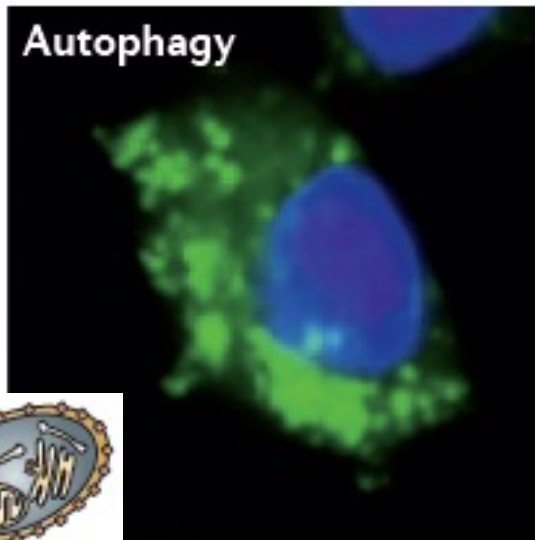
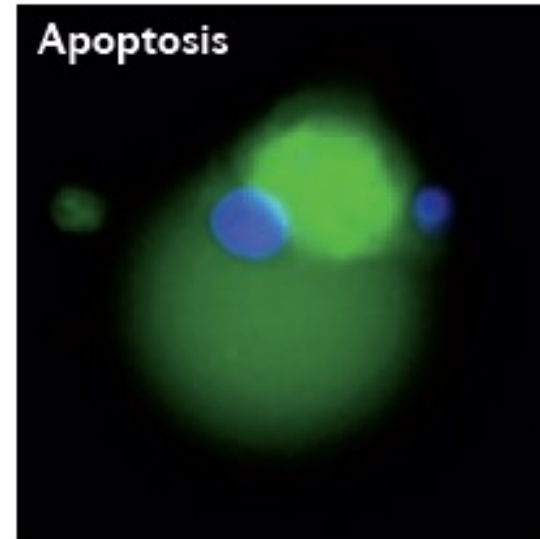
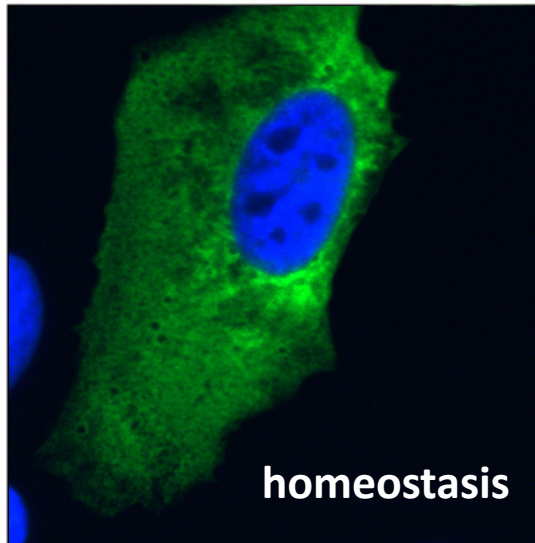


Osservazione al microscopio a fluorescenza

Ex: 475 nm

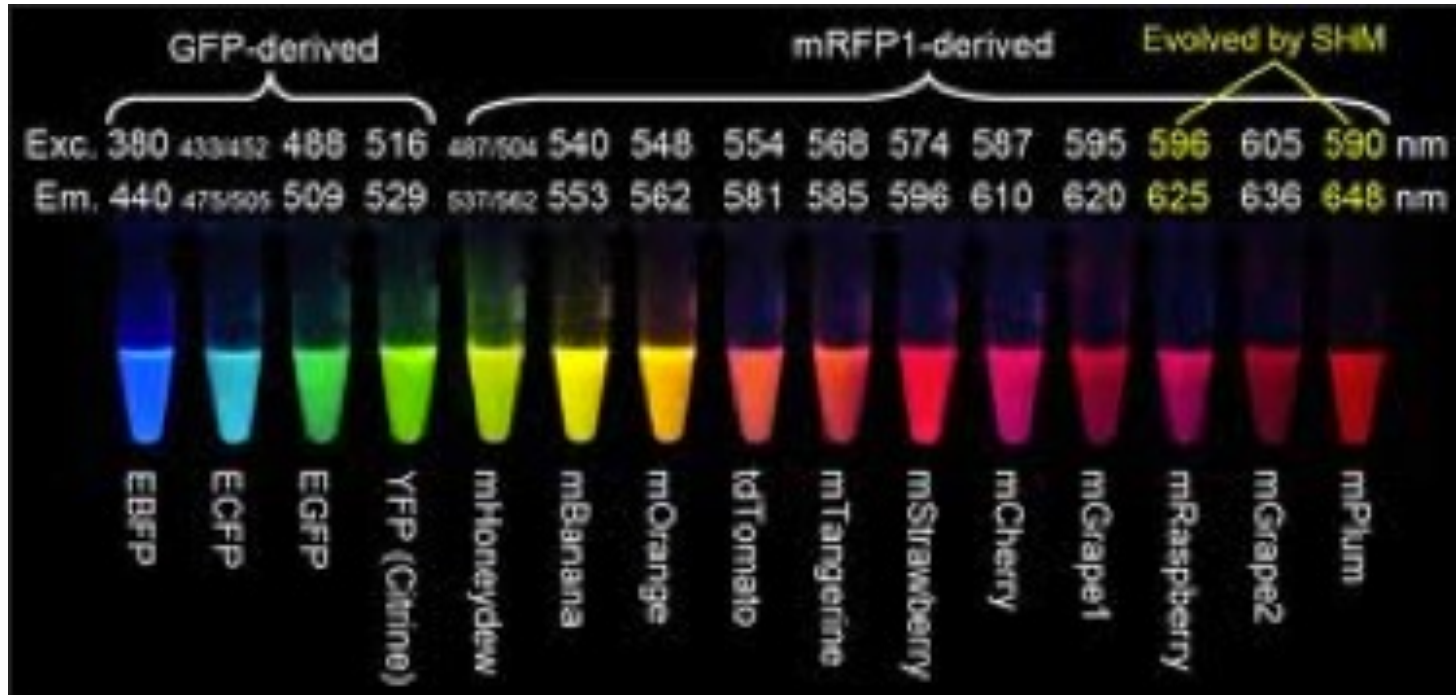
Em: 525 nm

Applicazione (I) Visualizzazione di diversi tipi di morte mediante sistemi reporter e live cell labeling

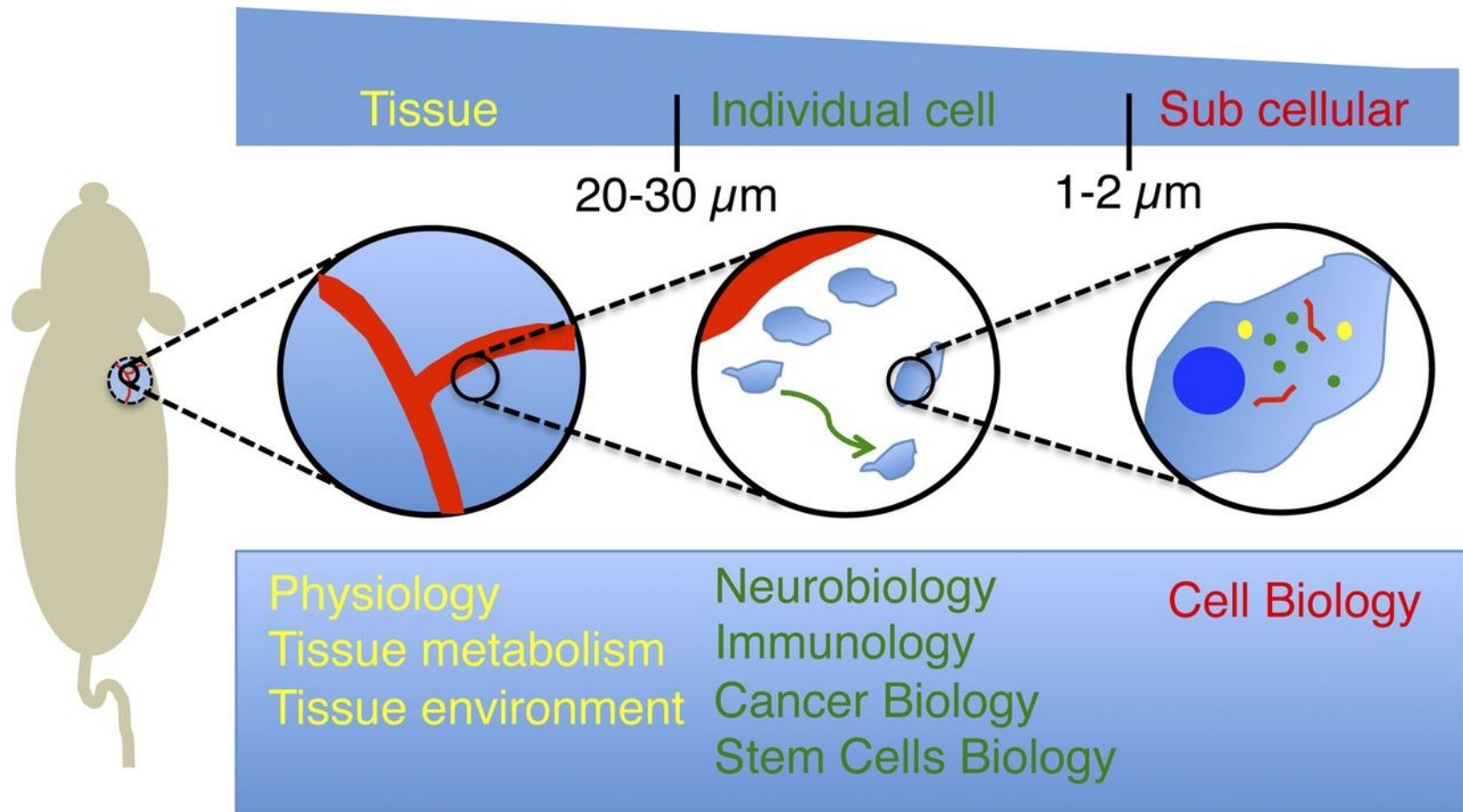


Applicazioni (II)

Visualizzazione di proteine o cellule mediante microscopia intravitale

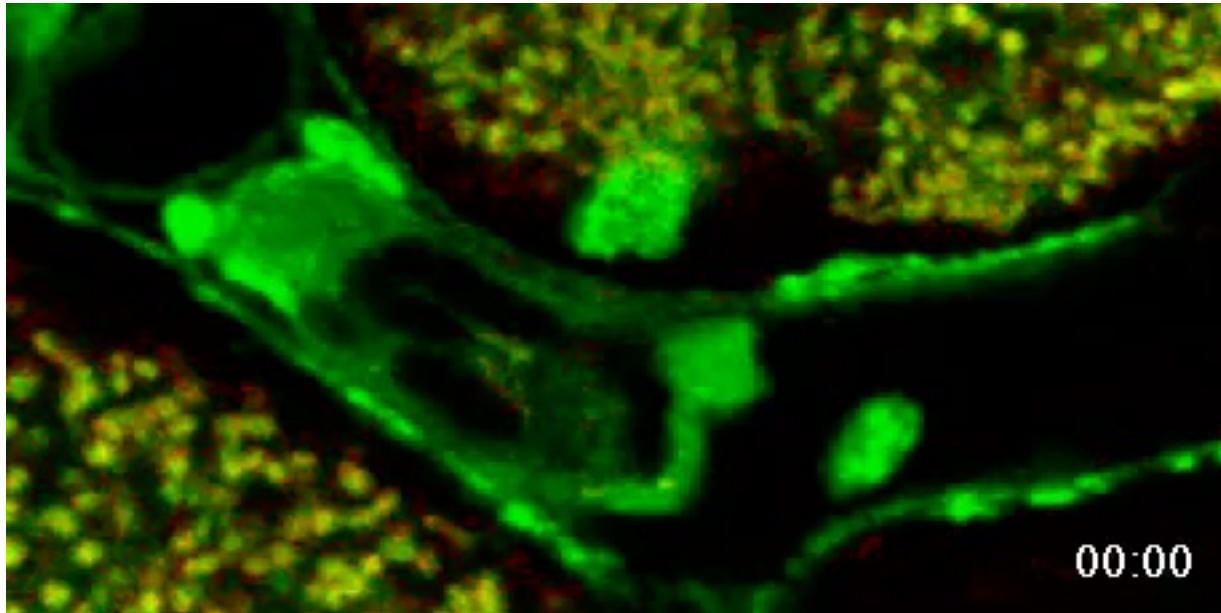


Imaging in vivo mediante microscopia a fluorescenza intravitale



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

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).

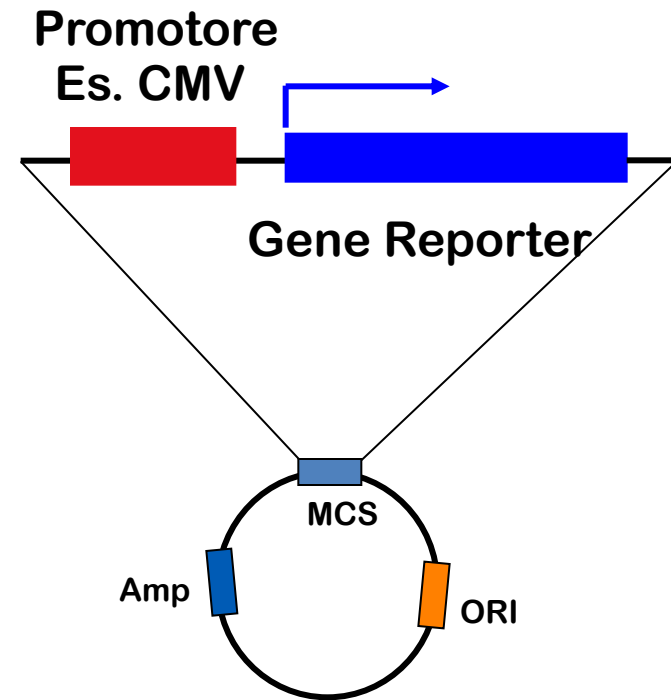
Time lapse was acquired by confocal microscopy.

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

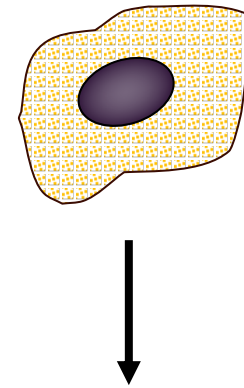
Analisi NON INVASIVA di trapianti
Es. sviluppo e progressione tumorale
mediante IMAGING IN VIVO

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

Gene reporter clonato a valle di un promotore COSTITUTIVO

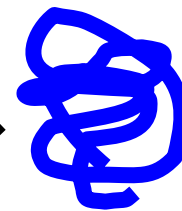
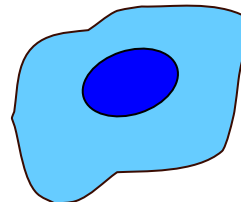


Trasfezione/infezione/CRISPR

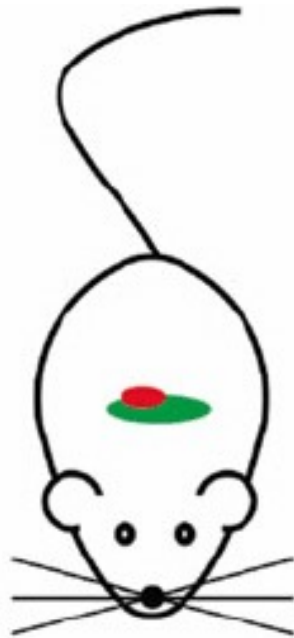


Espressione della
proteina nelle cellule
in cui è inserito il
costrutto reporter

Trapianto delle
cellule e analisi
in vivo



Trapianto di cellule-REPORTER



Orthotopic



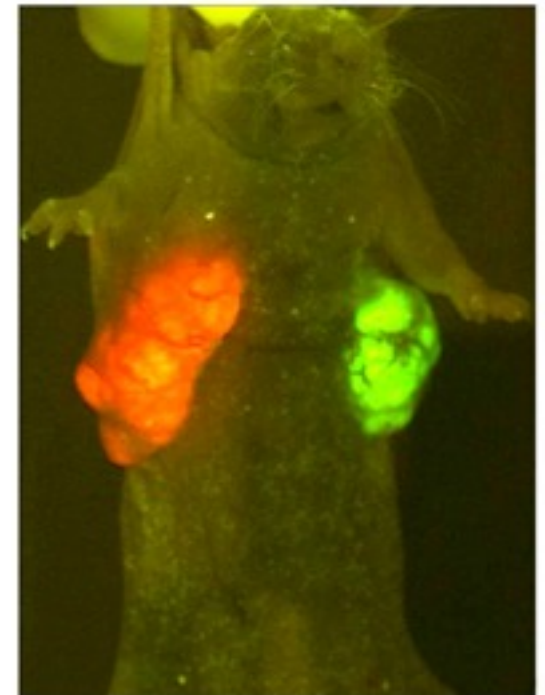
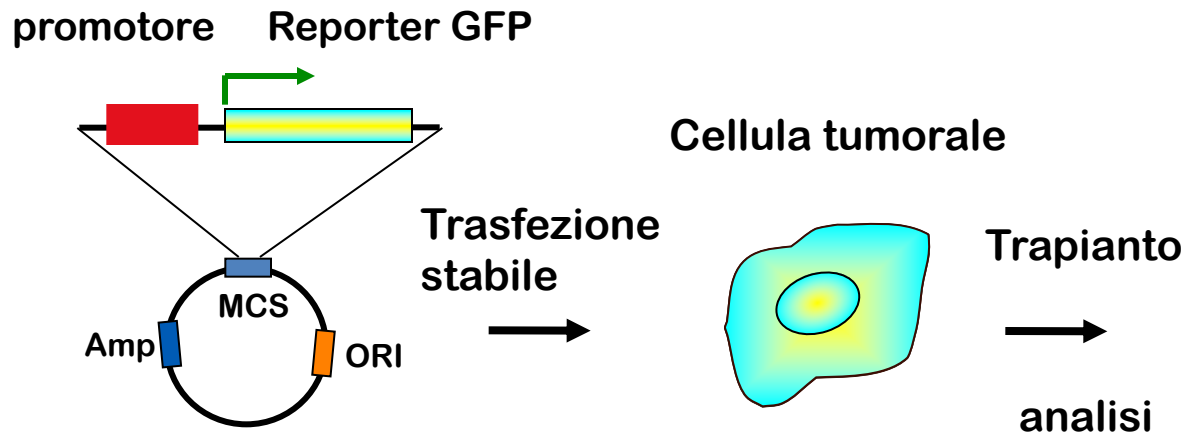
Subcutaneous

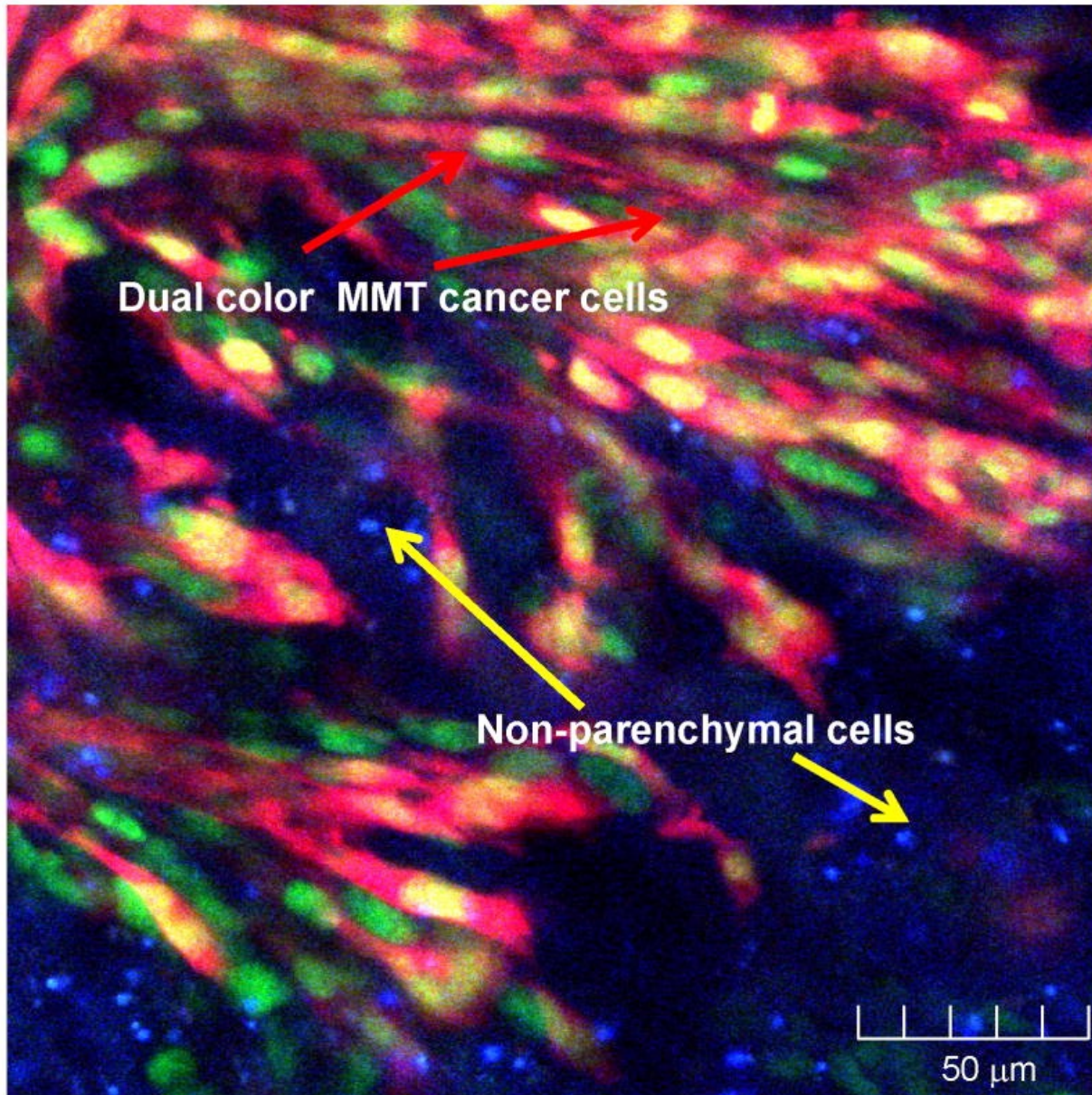
Trapianto di cellule/biopsie tumorali



Disseminazione metastatica
Iniezione iv

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





Utilizzo di geni 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**

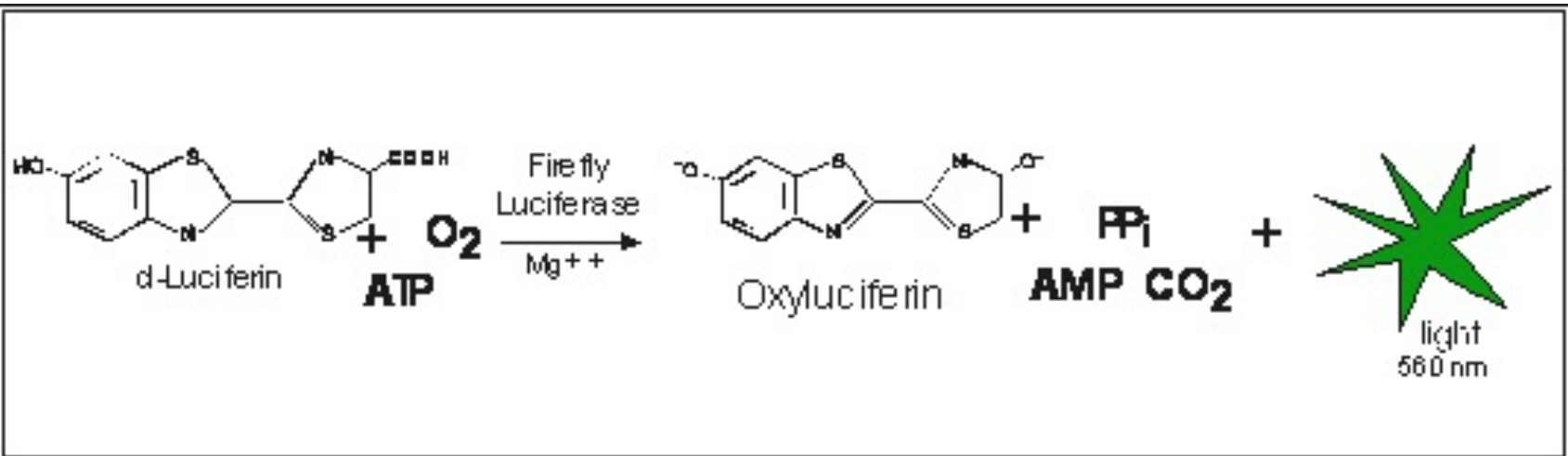
- I saggi di attività enzimatica devono essere **sensibili** e possibilmente **rapidi**
- L'attività deve essere facilmente e univocamente **distinguibile** da altre attività analoghe presenti nelle cellule prima della trasfezione

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:

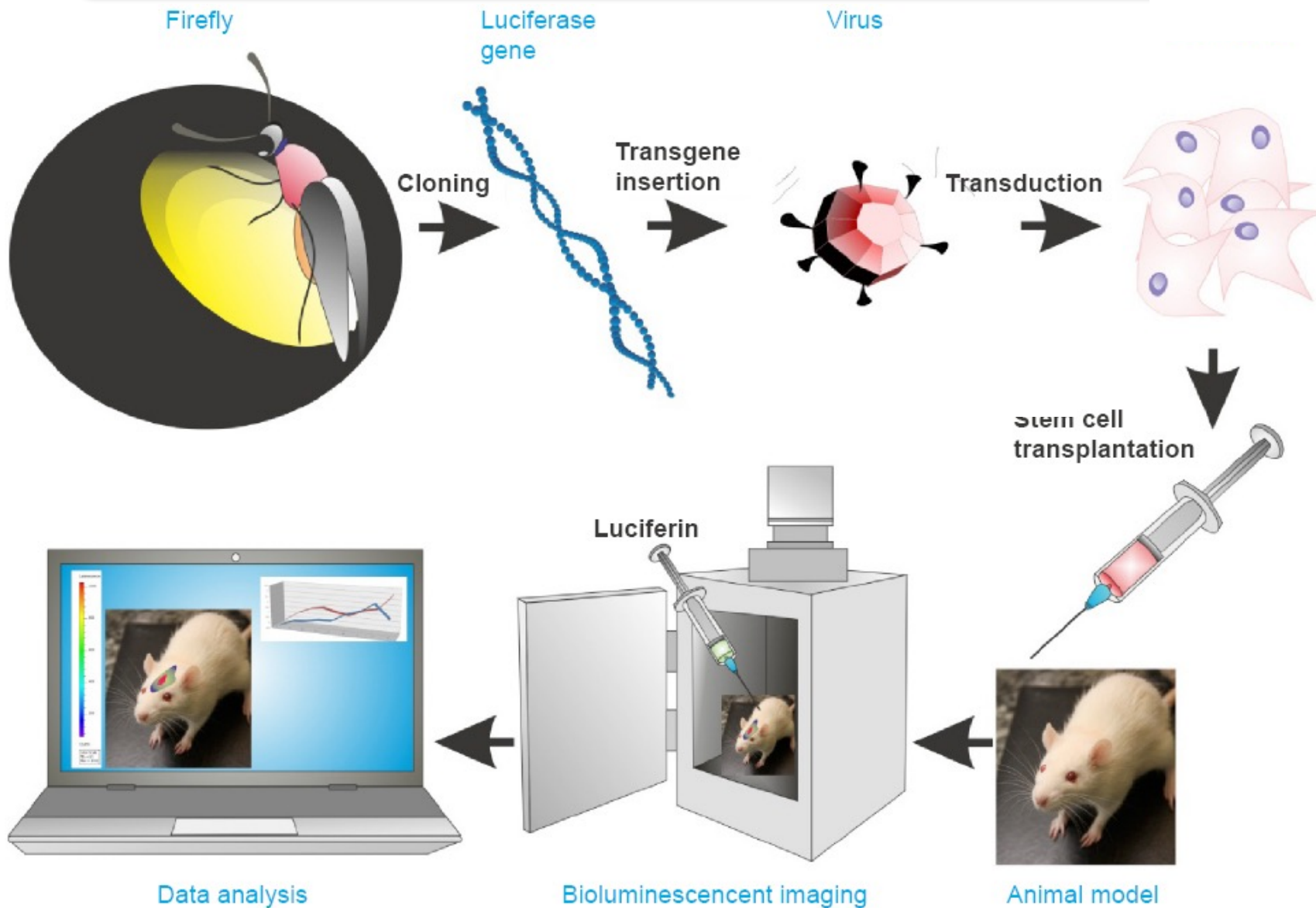
La luciferasi non ha PTMs e ha una breve emivita:

sistema rapido, sensibile con ampio range di linearità.

Cellule e tessuti di mammifero hanno bassa luminescenza intrinseca:
ridotto background;

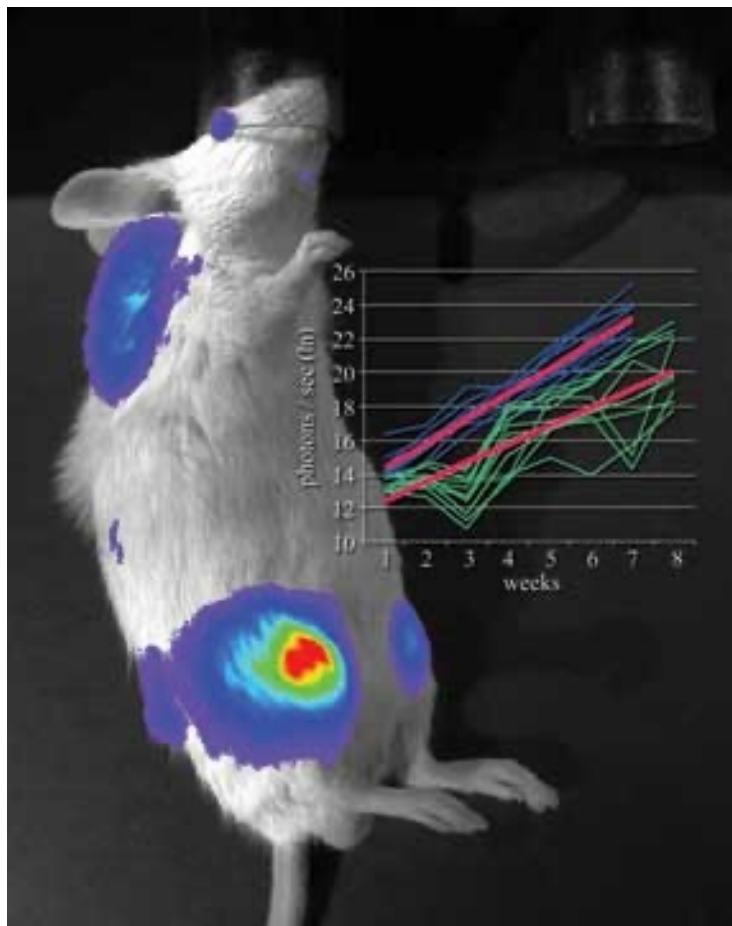
Le misurazioni hanno elevata penetranza (imaging di organi interni)

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



Saggi di attività trascrizionale mediante sistemi reporter

Struttura dei geni di mammifero

Promotore/enhancer

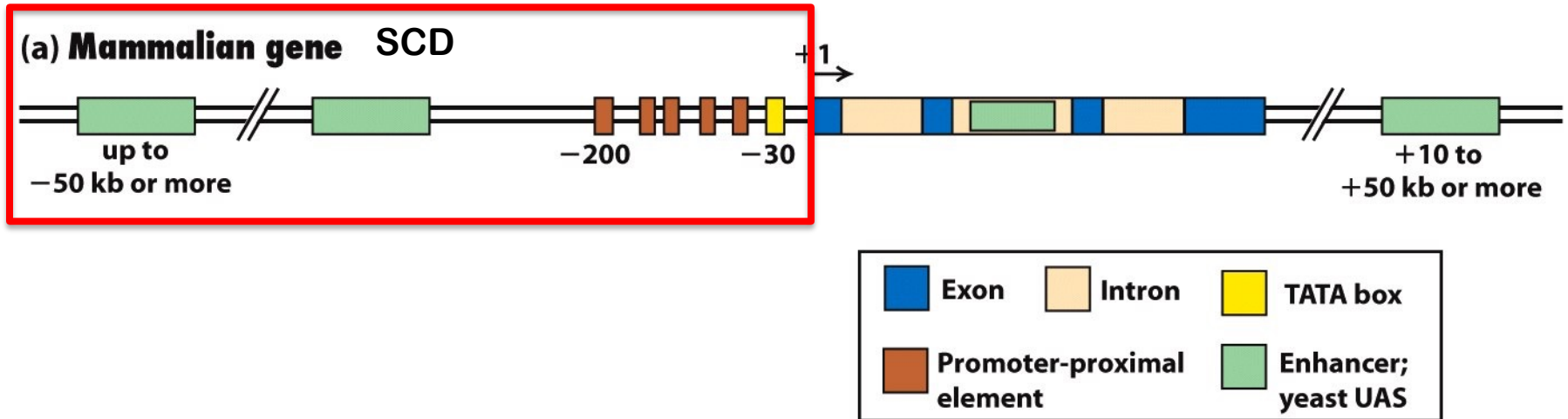
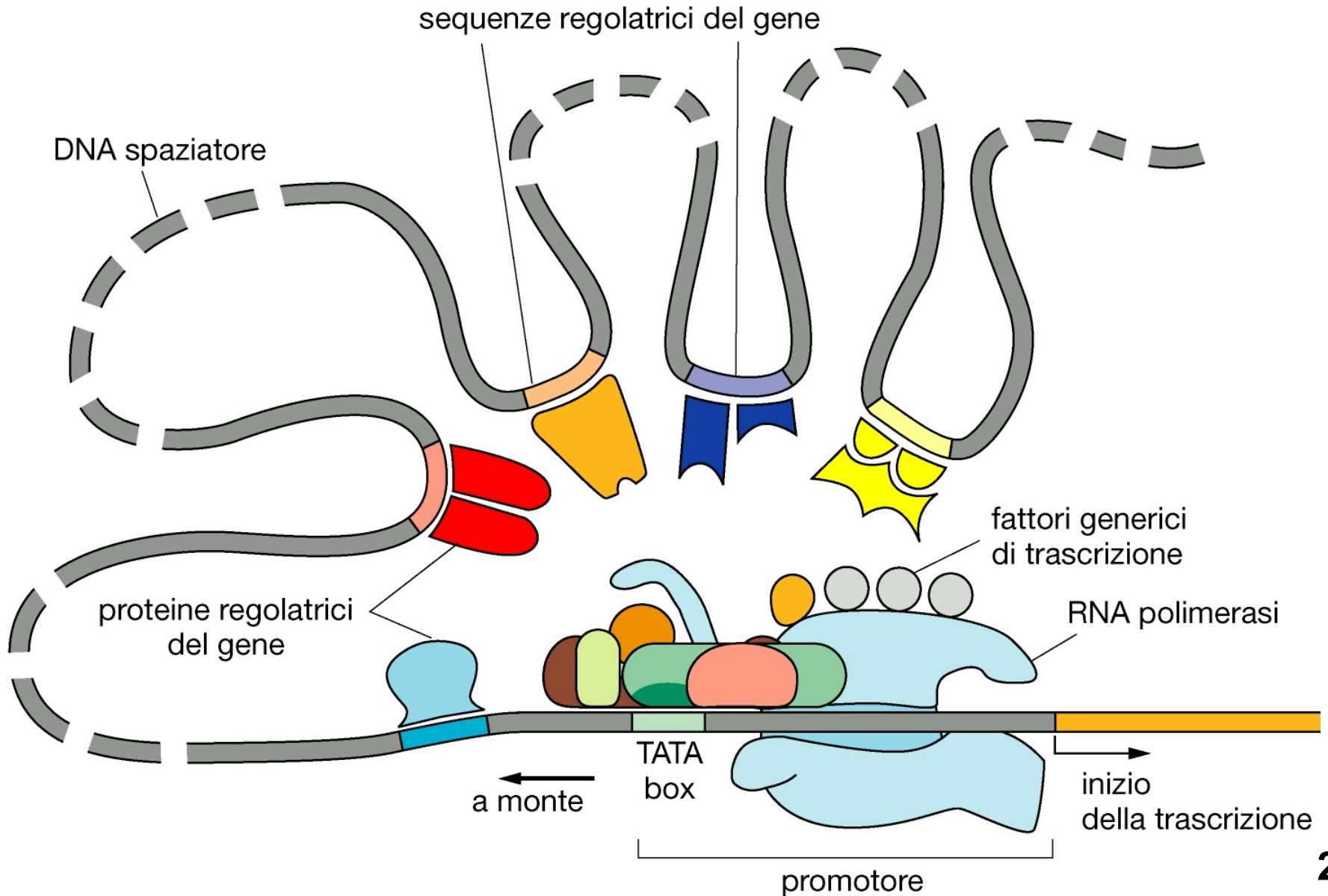
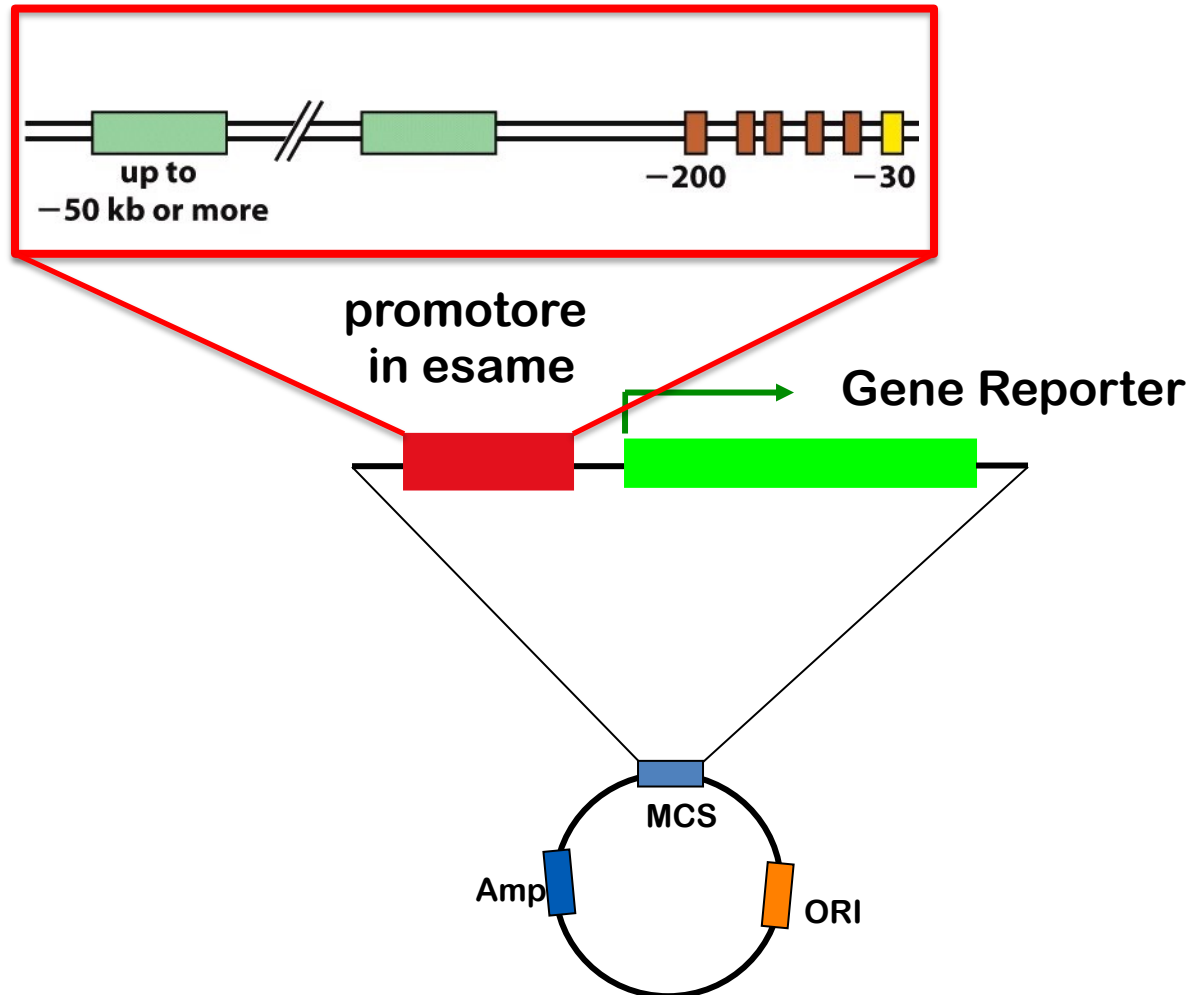


Figure 7-16
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W. H. Freeman and Company

Regolazione della trascrizione



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, oppure si genera un animale transgenico.



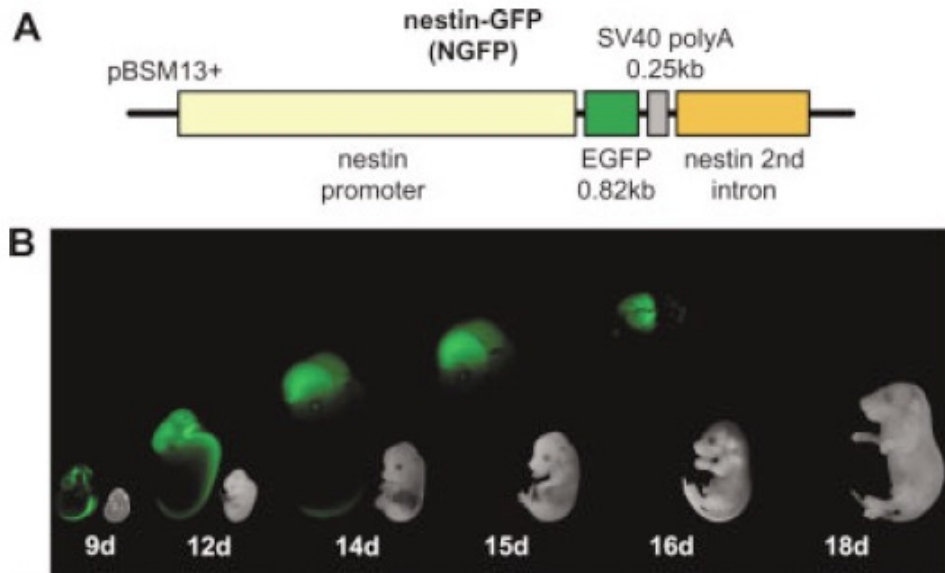
Applicazioni (I)

Analisi di espressione genica in vivo

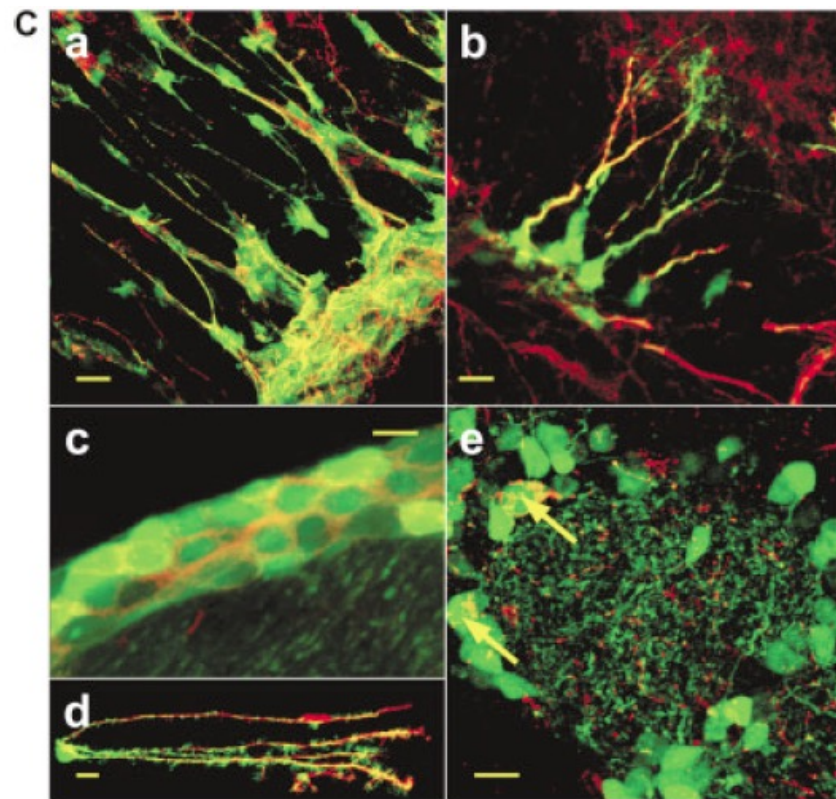
Per saggiare l'attività di un promotore in diversi tessuti o stadi dello sviluppo, si può **clonare il promotore bersaglio** a monte di un **gene reporter, la cui espressione sia visualizzabile (es. fotoproteina)**.

Nei tessuti in cui il promotore è attivo, si potrà osservare la produzione della proteina codificata dal gene reporter .

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

Applicazioni (II)

Analisi di espressione genica in cellule in coltura

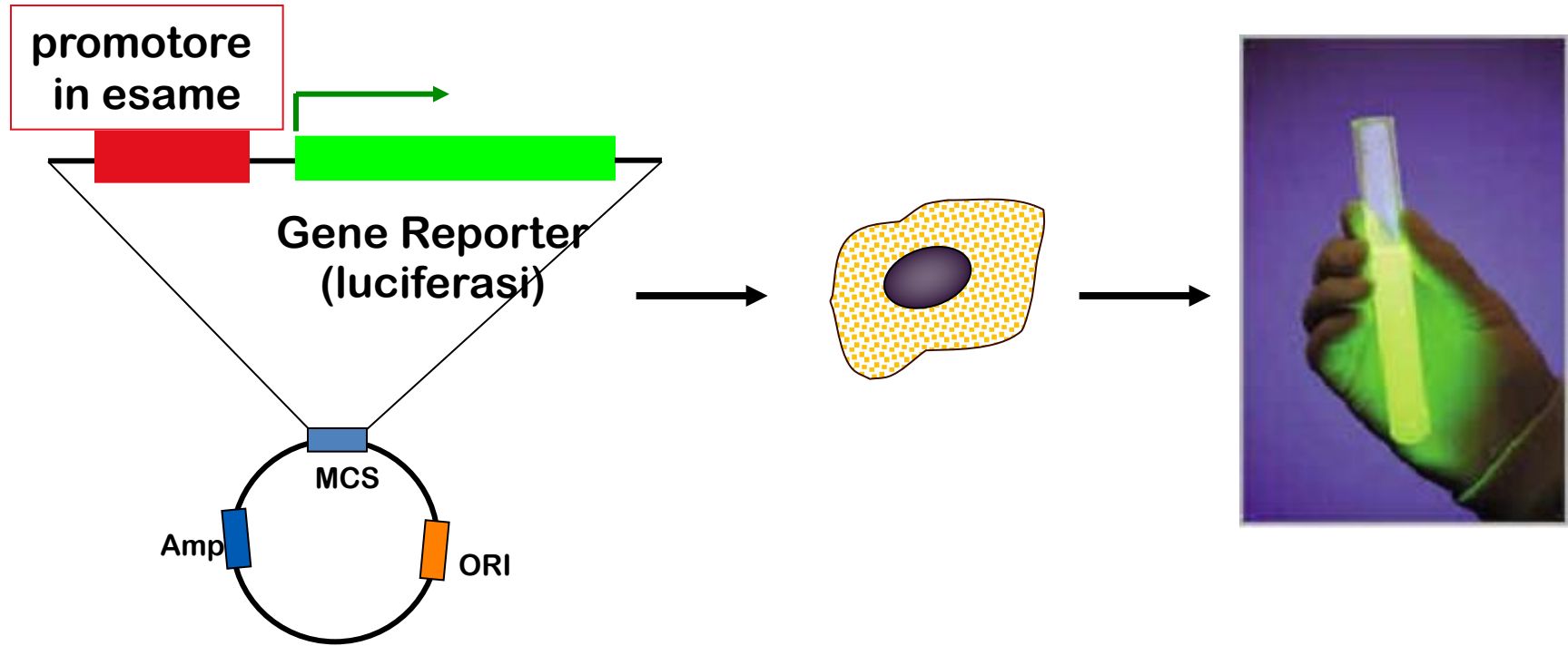
Per saggiare l'attività di un promotore in diverse condizioni sperimentali, si può **clonare il promotore bersaglio** a monte di un **gene reporter, la cui espressione sia misurabile**.

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**.

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



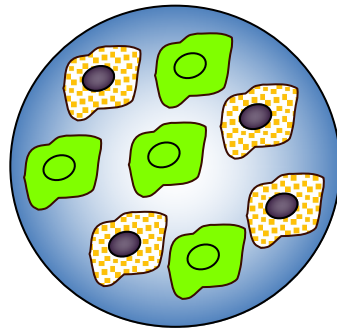
Quanto più attivo sarà il promotore, tanto maggiore la produzione di enzima e quindi l'emissione di luce

La quantità di luce emessa è proporzionale all'attività del promotore

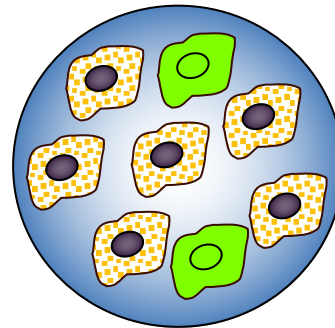
Confronto di diversi punti sperimentali

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%

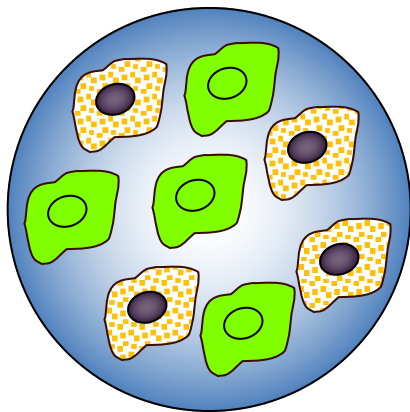


25%

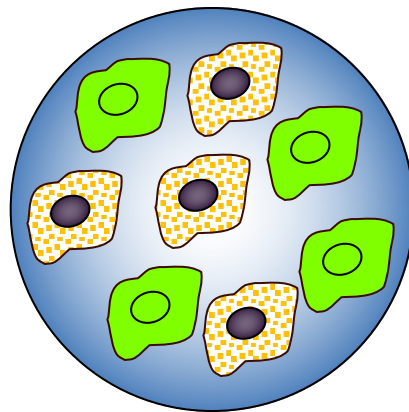
Confronto di diversi punti sperimentali

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

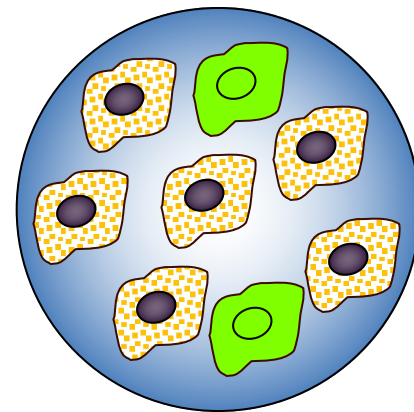
I valori assoluti di attività del reporter misurati nei 3 diversi esperimenti possono essere influenzati dalla diversa **efficienza di trasfezione** = diverso **numero di cellule trasfettate** nei diversi esperimenti.



1 = 50%



2 = 50%



3 = 25%

PROBLEMA:

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

= Normalizzare i risultati

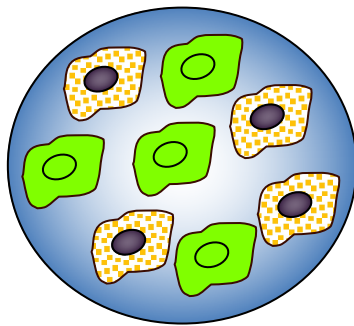
Come posso confrontare l'efficienza di trasfezione tra diversi punti sperimentali ?

Per calcolare l'efficienza di trasfezione di ciascun esperimento si include un **CONTROLLO INTERNO**

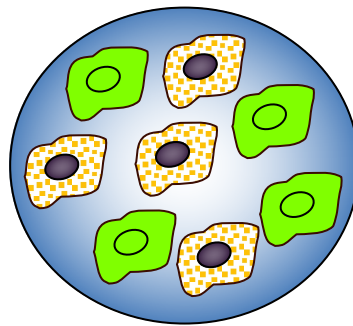
= un **gene reporter DIVERSO** da quello sperimentale sotto il controllo di un **promotore costitutivo**,

NON INFLUENZABILE DALLE CONDIZIONI SPERIMENTALI

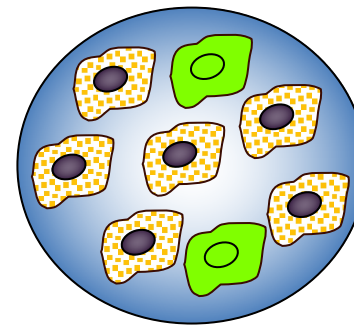
NB: va bene misurare sia il valore ASSOLUTO dell'efficienza di trasfezione che CONFRONTARE l'efficienza RELATIVA



1 = 50%
100

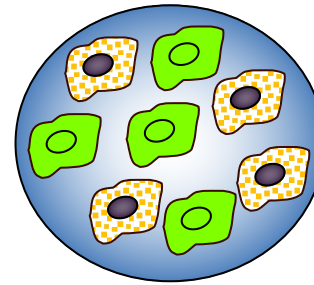
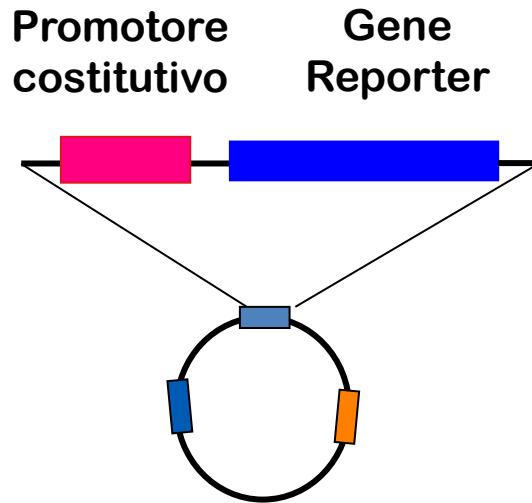


2 = 50%
100

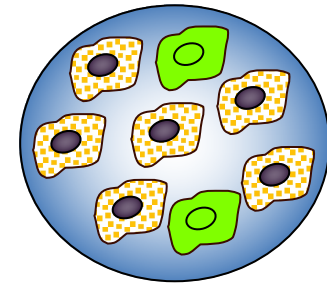


3 = 25%
50

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



50%



25%

Vettore di espressione

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

Soluzione 2:

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

Firefly luciferase



+

Renilla luciferase



Doppio sistema reporter F-luc/R-luc

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

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**

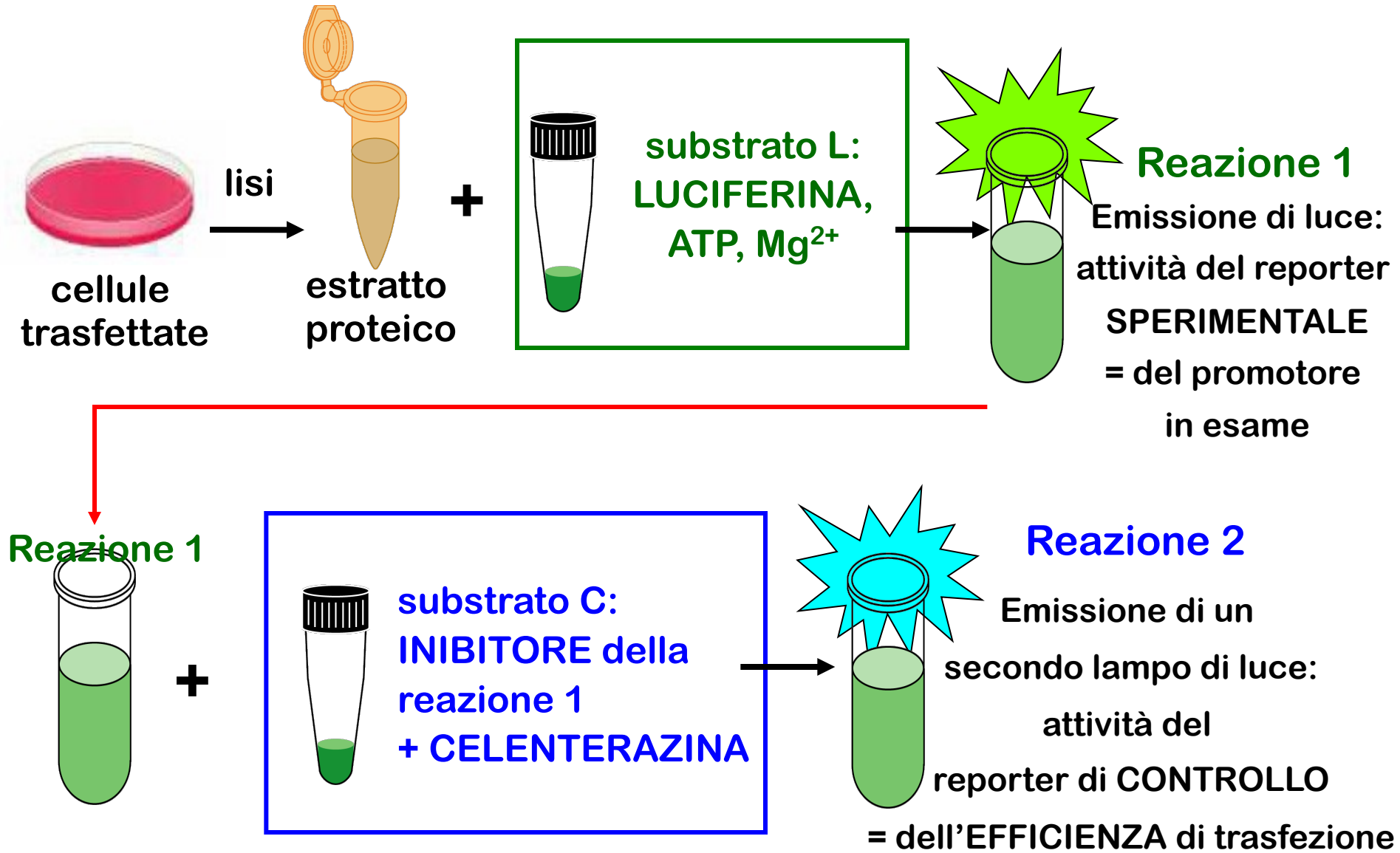
Deve essere posto a valle di un promotore costitutivo :

Es. CMV

pCON-luc = pCMV Rluc



Doppio sistema reporter F-luc/R-luc: 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 = 40 x

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: nella condizione 2 il promotore aumenta la trascrizione
del reporter di **20 volte rispetto alla condizione 1**

nella condizione 3 aumenta la trascrizione del reporter di **40 volte**