

**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**

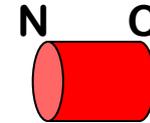
- a) Espressione di proteine di fusione fluorescenti**
- b) Espressione di enzimi reporter**

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

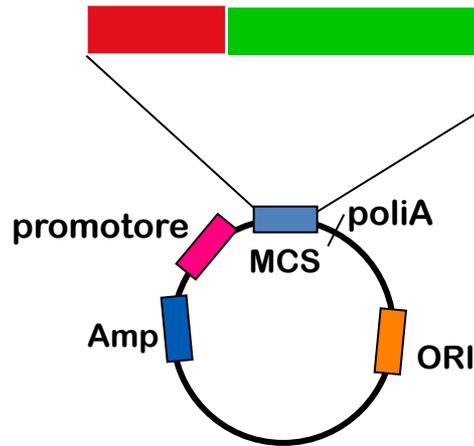
Gene X



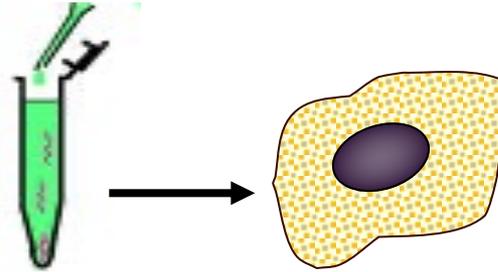
Codifica per la proteina di interesse X



Gene X Reporter - fluo

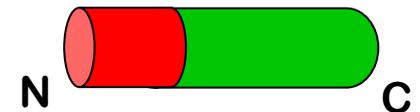


Trasfezione



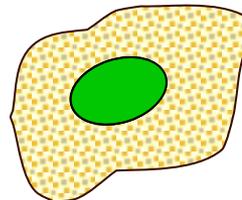
Trascrizione e traduzione:

espressione della proteina di fusione nelle cellule



La proteina X assume la sua tipica localizzazione intracellulare

Visualizzazione in situ

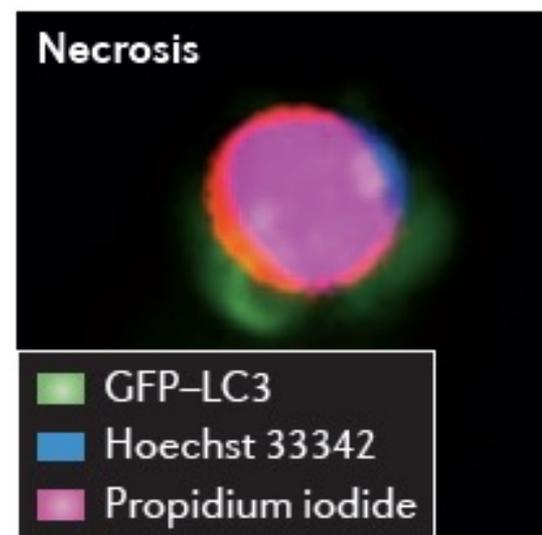
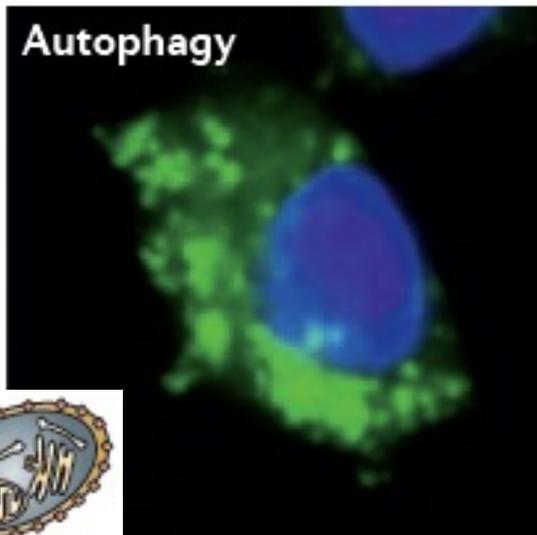
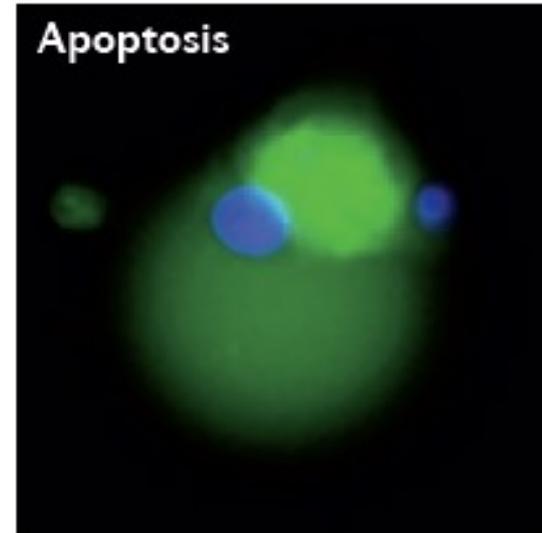
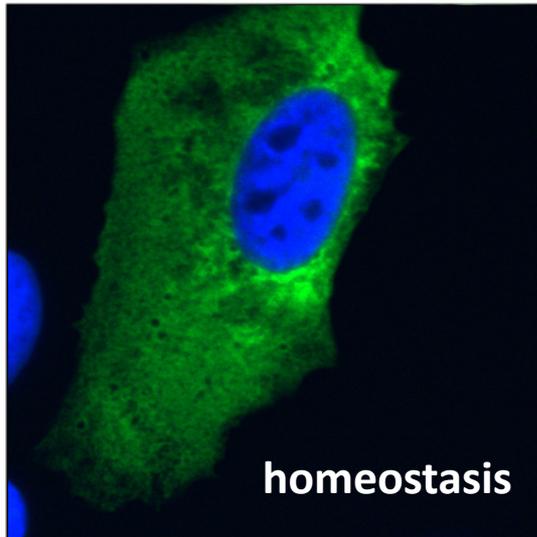


Osservazione al microscopio a fluorescenza

Ex: 475 nm

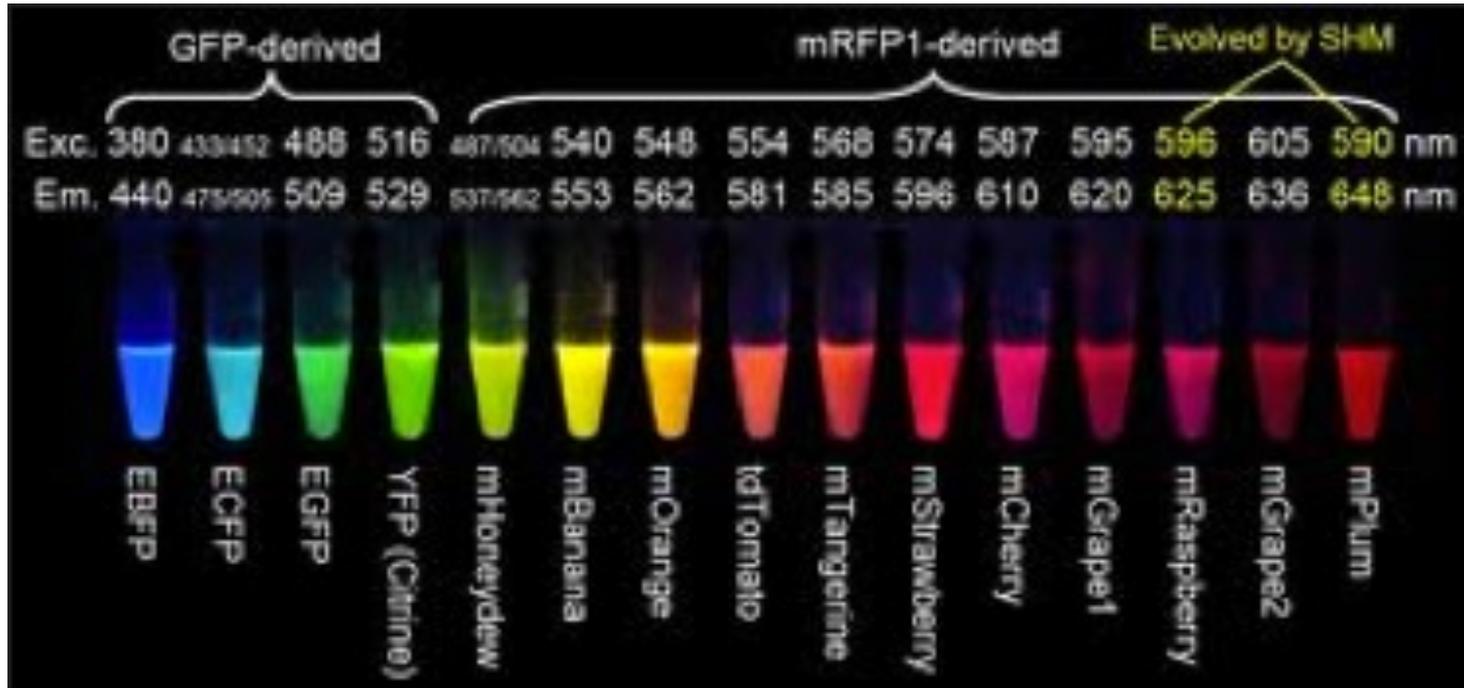
Em: 525 nm

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

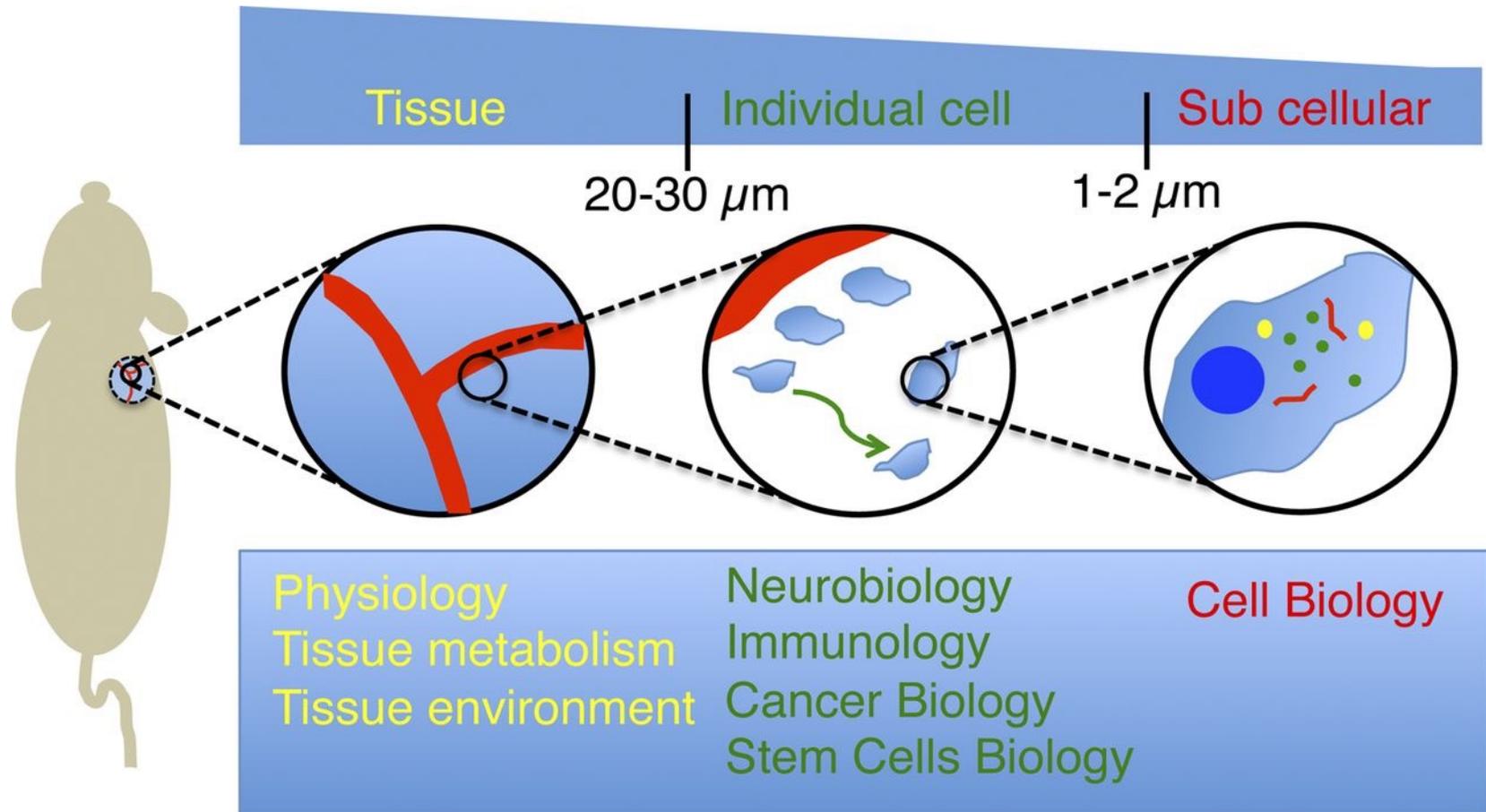


## Applicazioni (II)

# Visualizzazione di proteine o cellule mediante microscopia intravitale

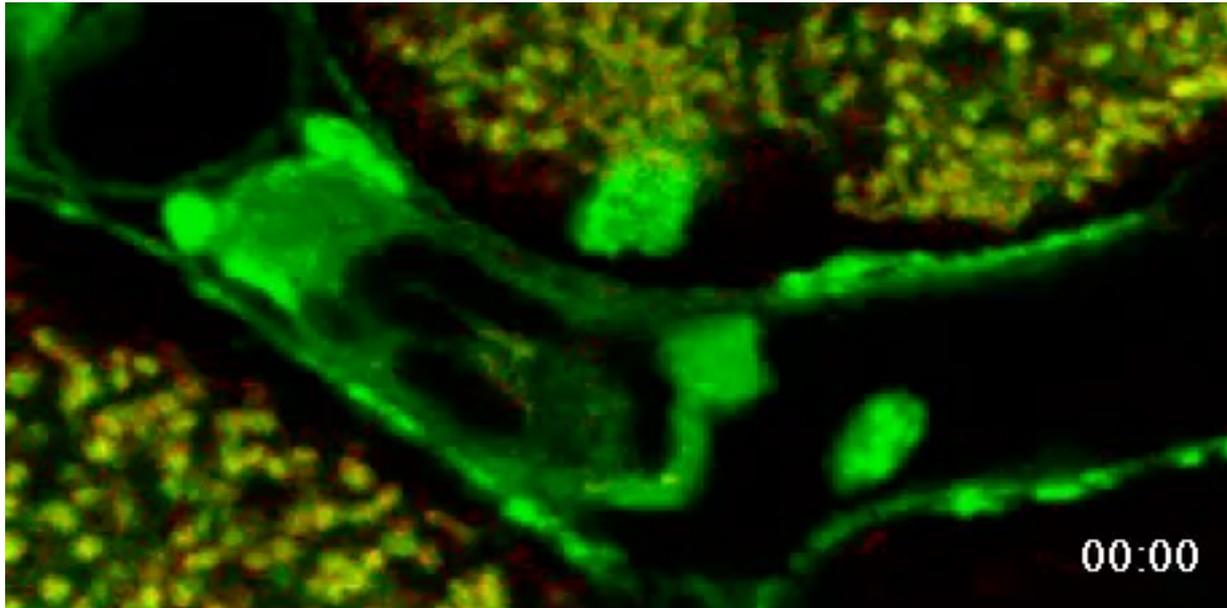


# Imaging in vivo mediante microscopia a fluorescenza intravitale



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).

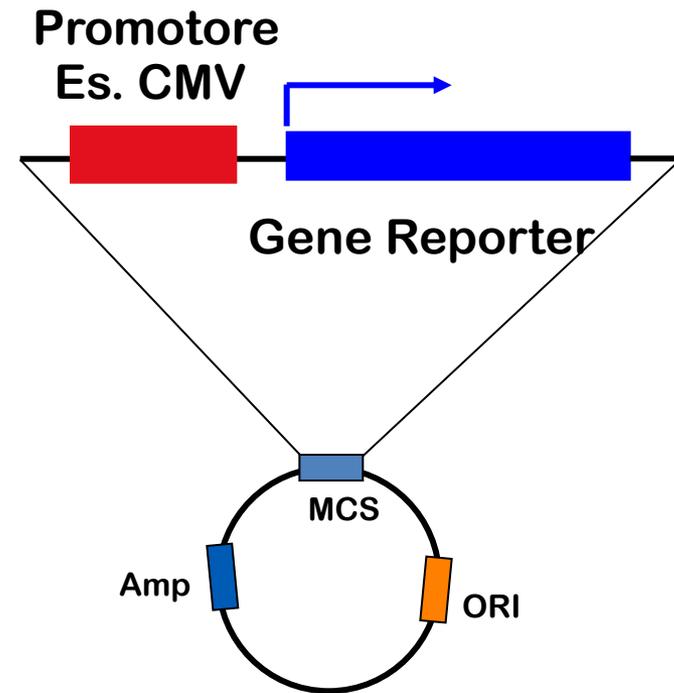
Time lapse was acquired by confocal microscopy.

Excitation wavelengths: 488 nm and 561 nm. Bar, 10  $\mu\text{m}$ .

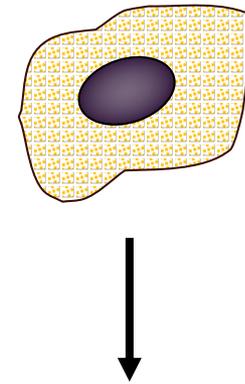
**Analisi NON INVASIVA di trapianti**  
**Es. sviluppo e progressione tumorale**  
**mediante IMAGING IN VIVO**

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

# Gene reporter clonato a valle di un promotore COSTITUTIVO

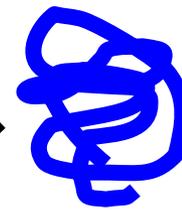
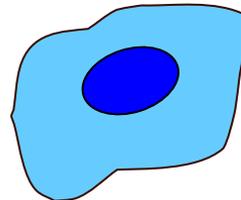


Trasfezione/infezione/CRISPR

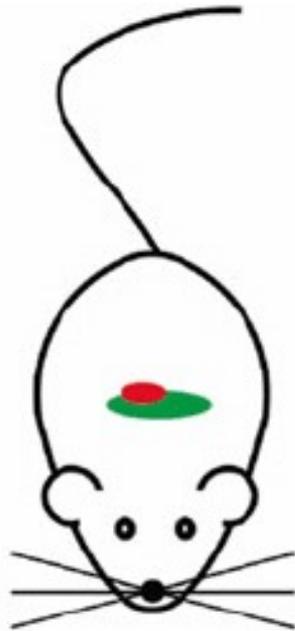


Espressione della  
proteina nelle cellule  
in cui è inserito il  
costrutto reporter

Trapianto delle  
cellule e analisi  
in vivo



# Trapianto di cellule-REPORTER



Orthotopic



Subcutaneous

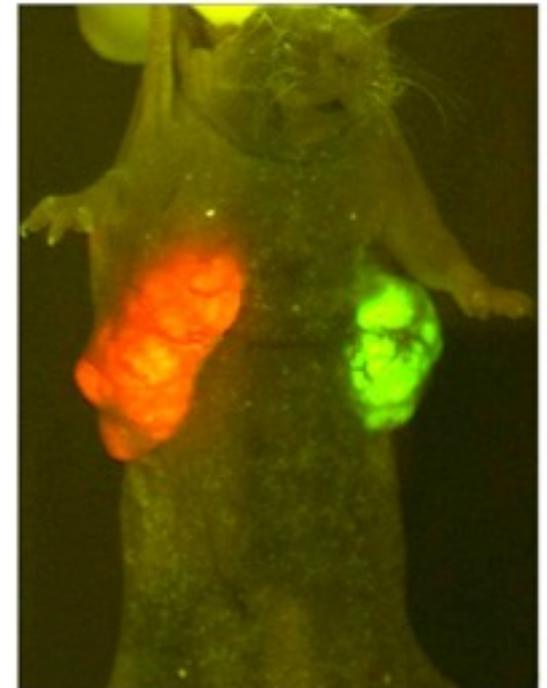
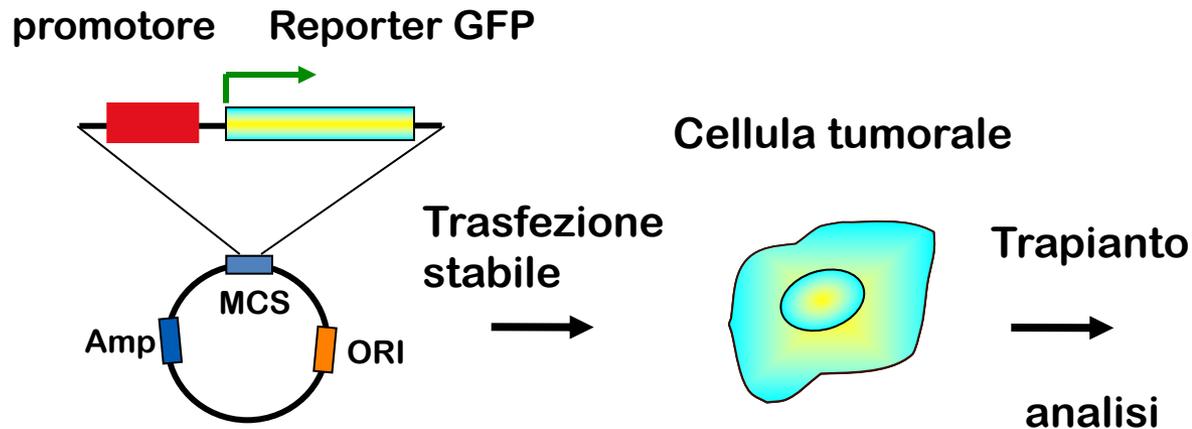
---

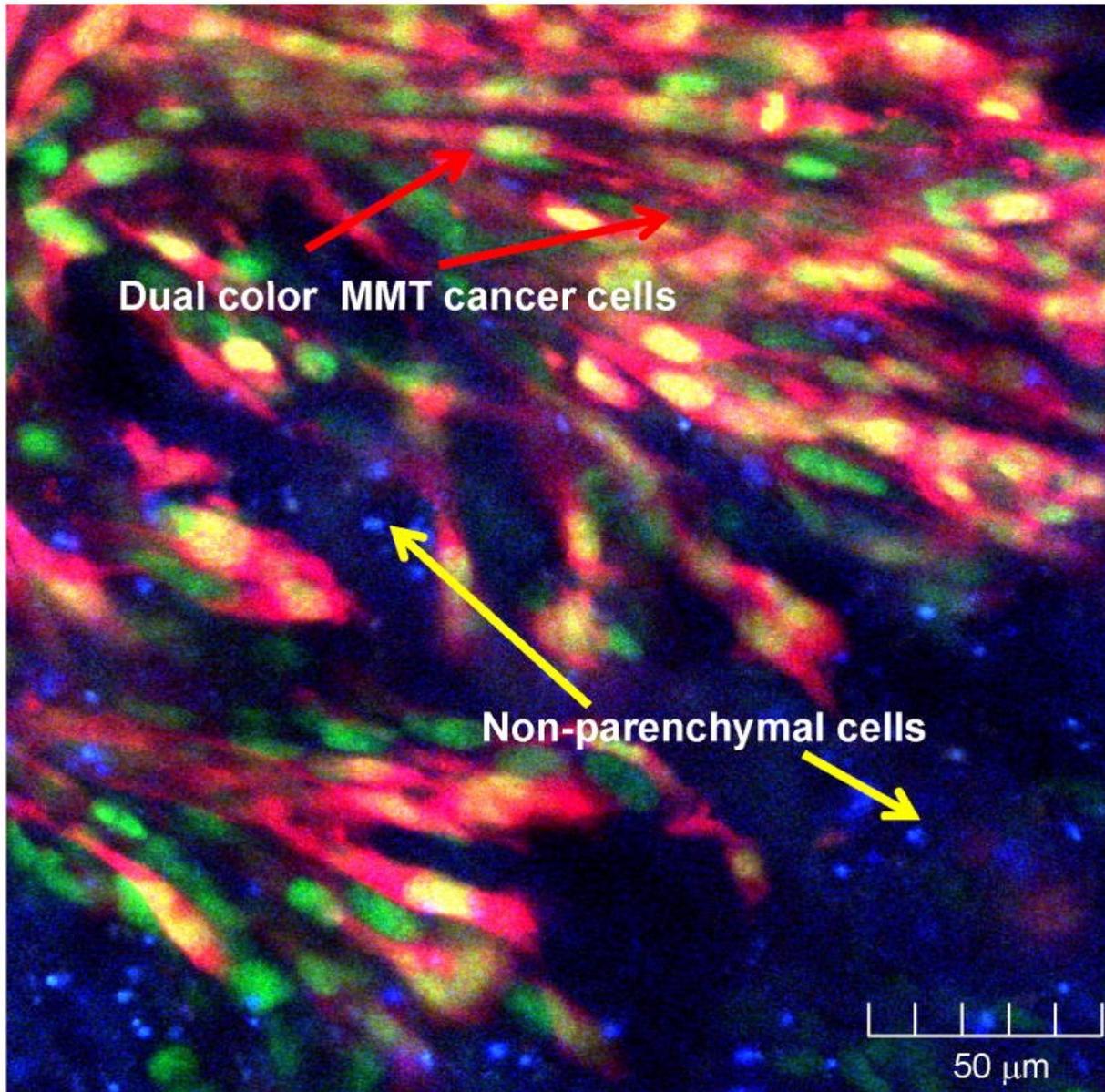
Trapianto di cellule/biopsie  
tumorali



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**

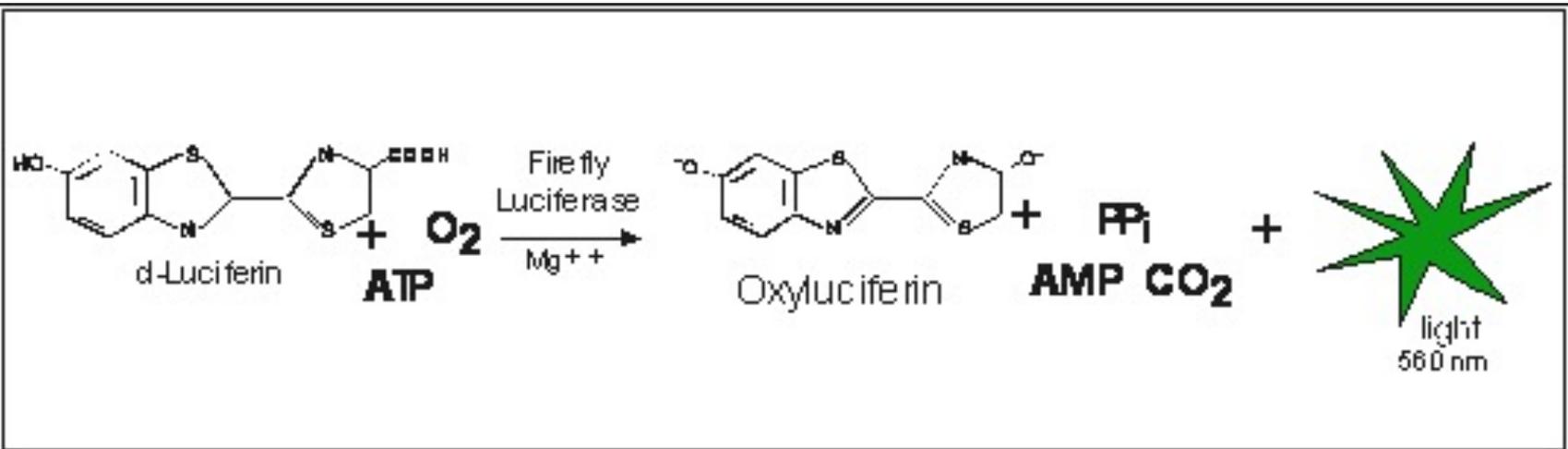
- I saggi di attività enzimatica devono essere **sensibili** e possibilmente **rapidi**
- L'attività deve essere facilmente e univocamente **distinguibile** da altre attività analoghe presenti nelle cellule prima della trasfezione

## 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:

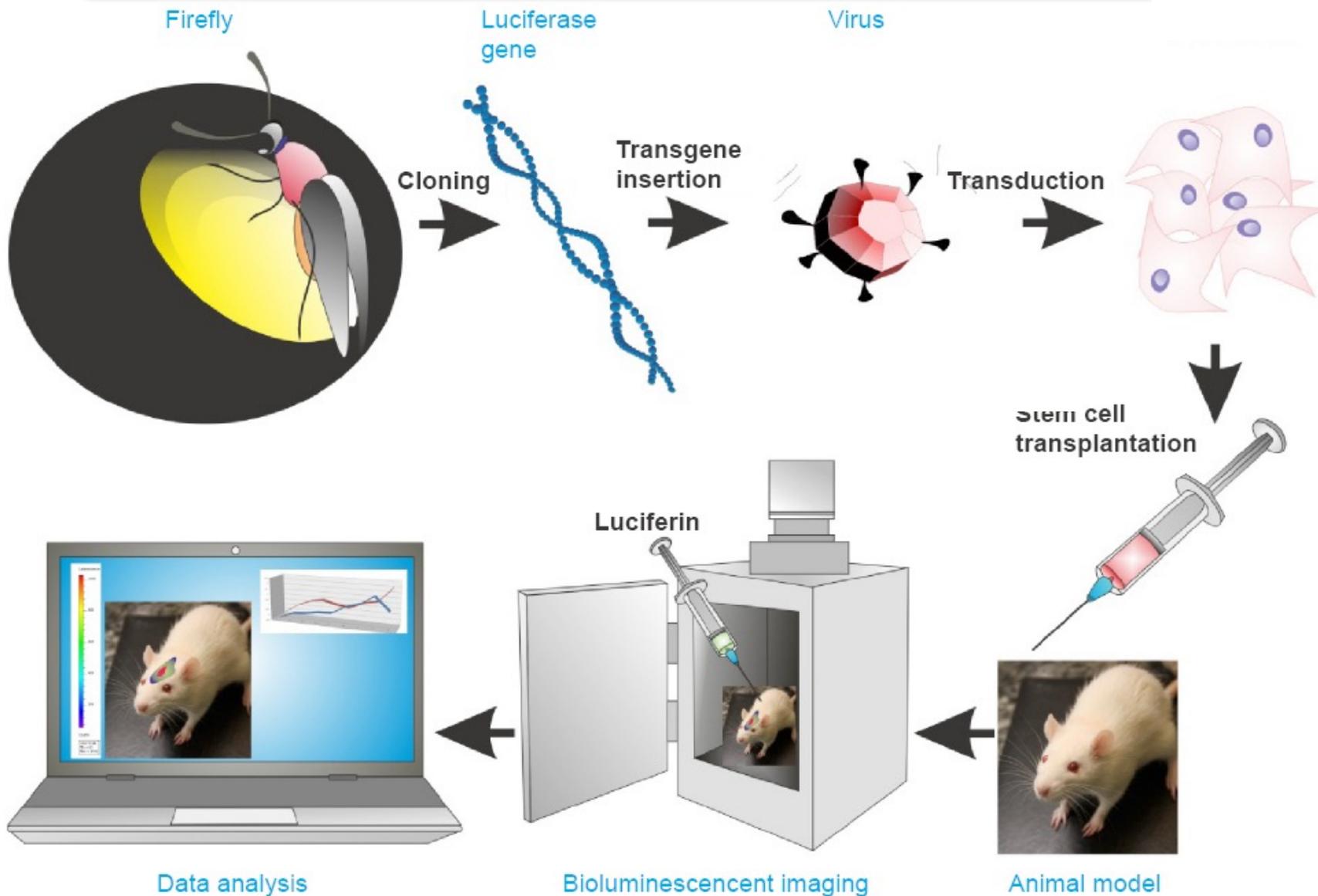
La luciferasi non ha PTMs e ha una breve emivita:

sistema rapido, sensibile con ampio range di linearità.

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

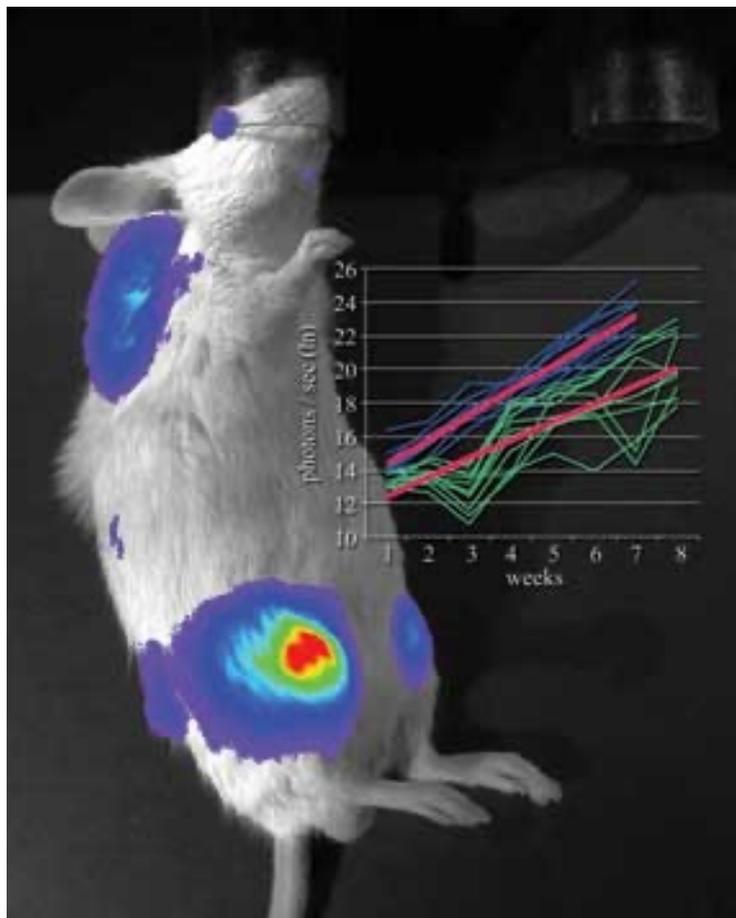
Le misurazioni hanno elevata penetranza (imaging di organi interni)

# 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

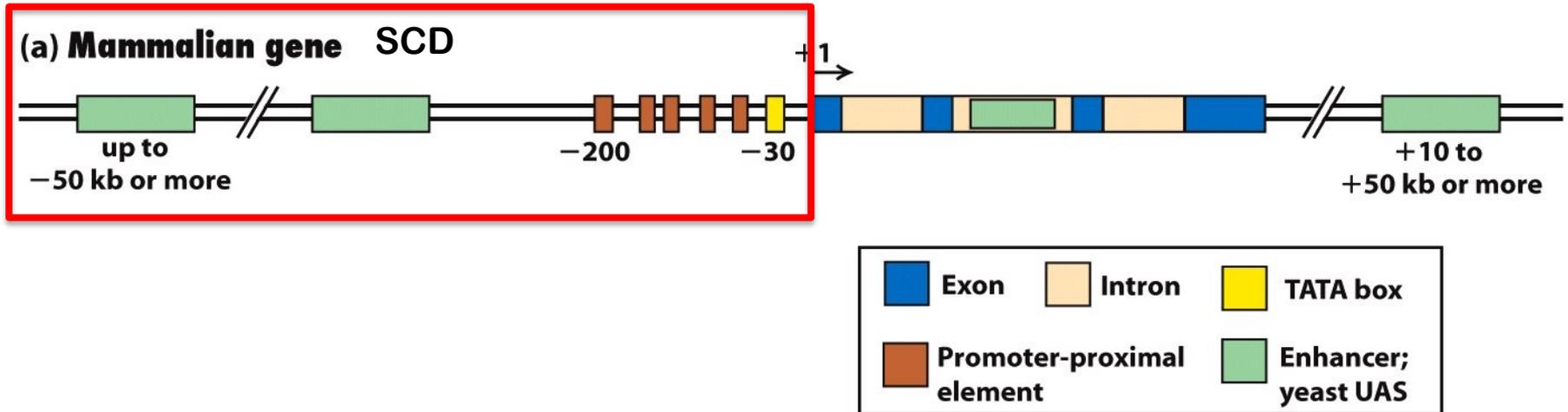
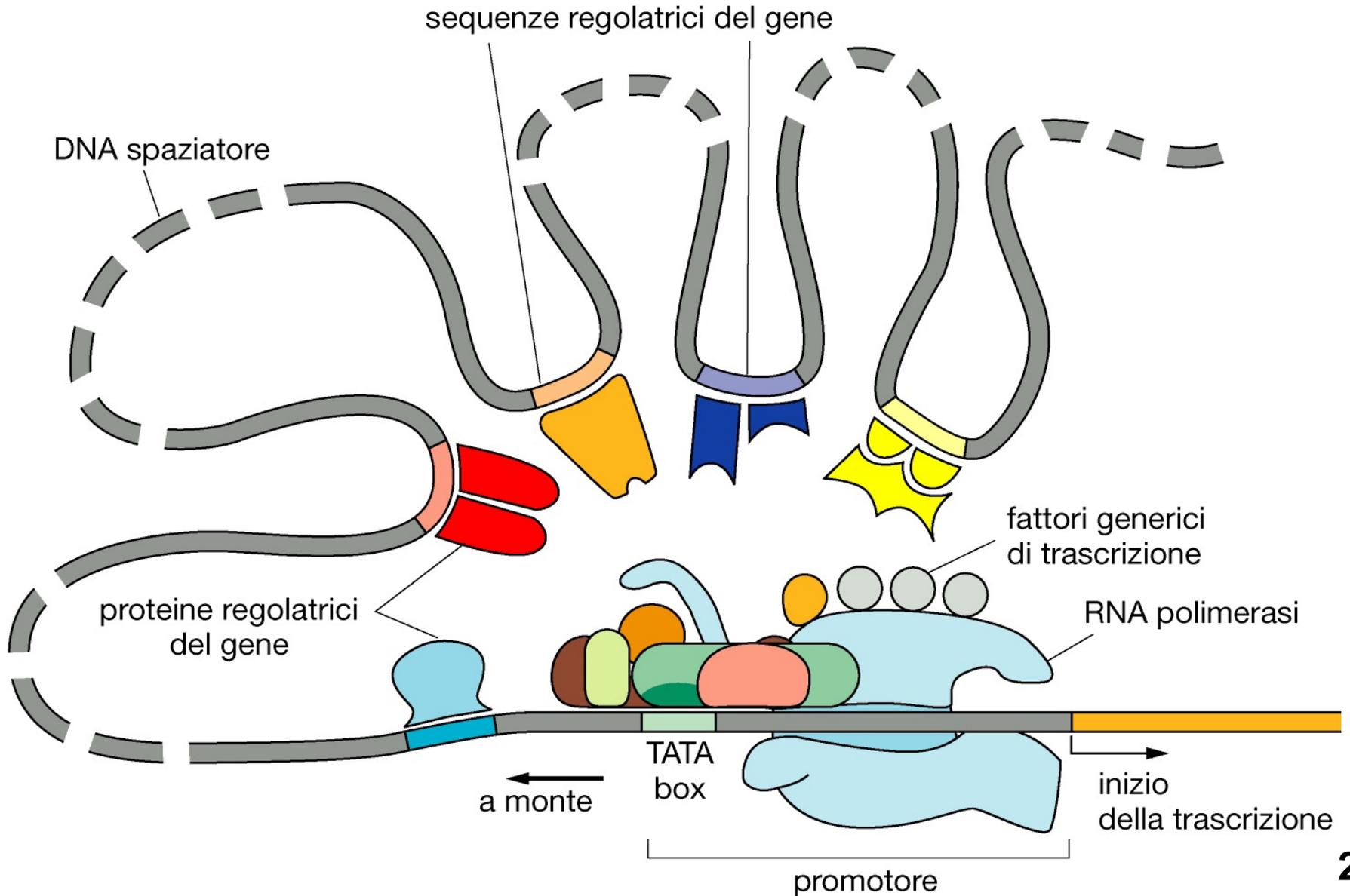
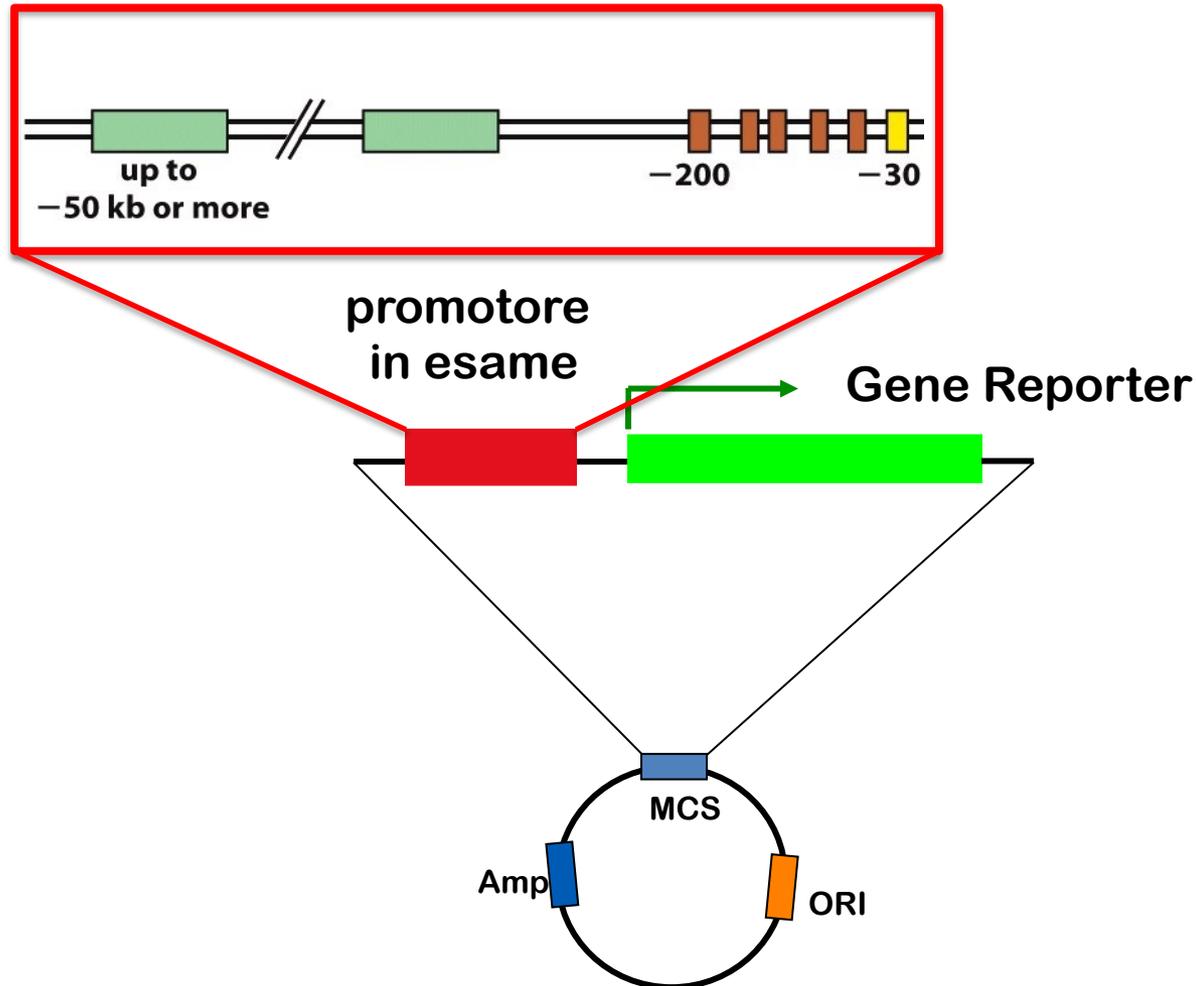


Figure 7-16  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
© 2008 W. H. Freeman and Company

# 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.



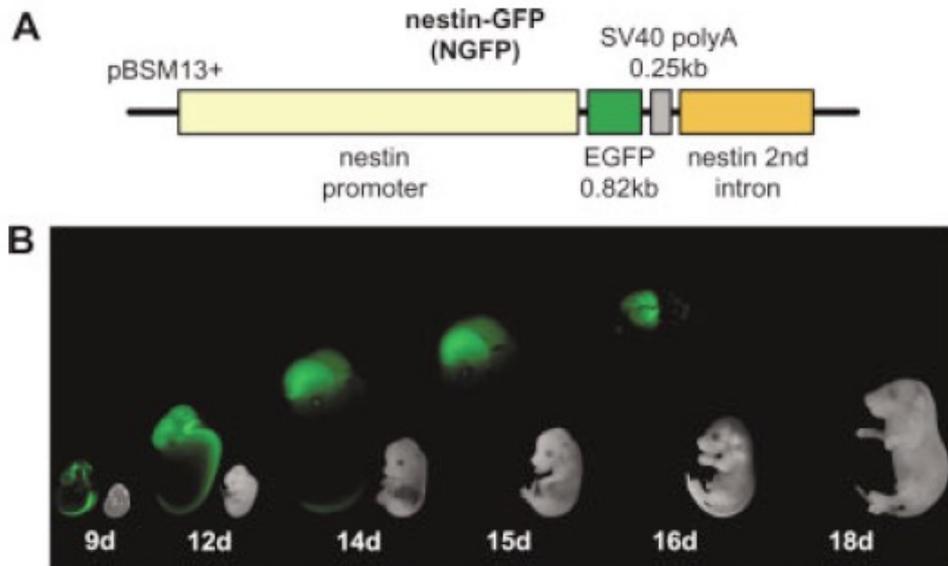
## Applicazioni (I)

### Analisi di espressione genica in vivo

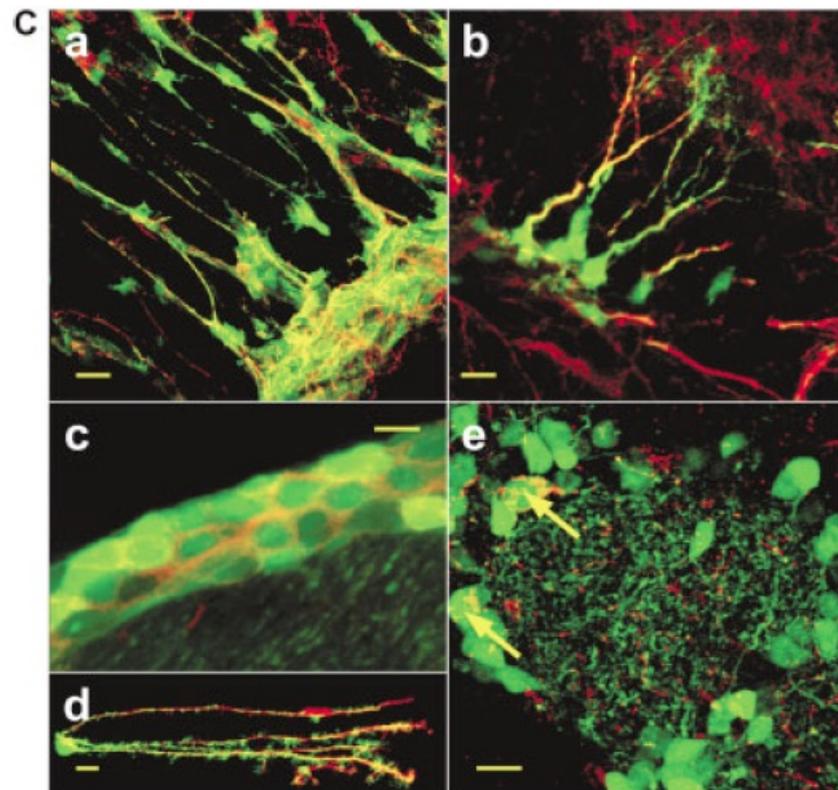
Per saggiare l'attività di un promotore in diversi tessuti o stadi dello sviluppo, si può **clonare il promotore bersaglio** a monte di un **gene reporter, la cui espressione sia visualizzabile (es. fotoproteina)**.

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

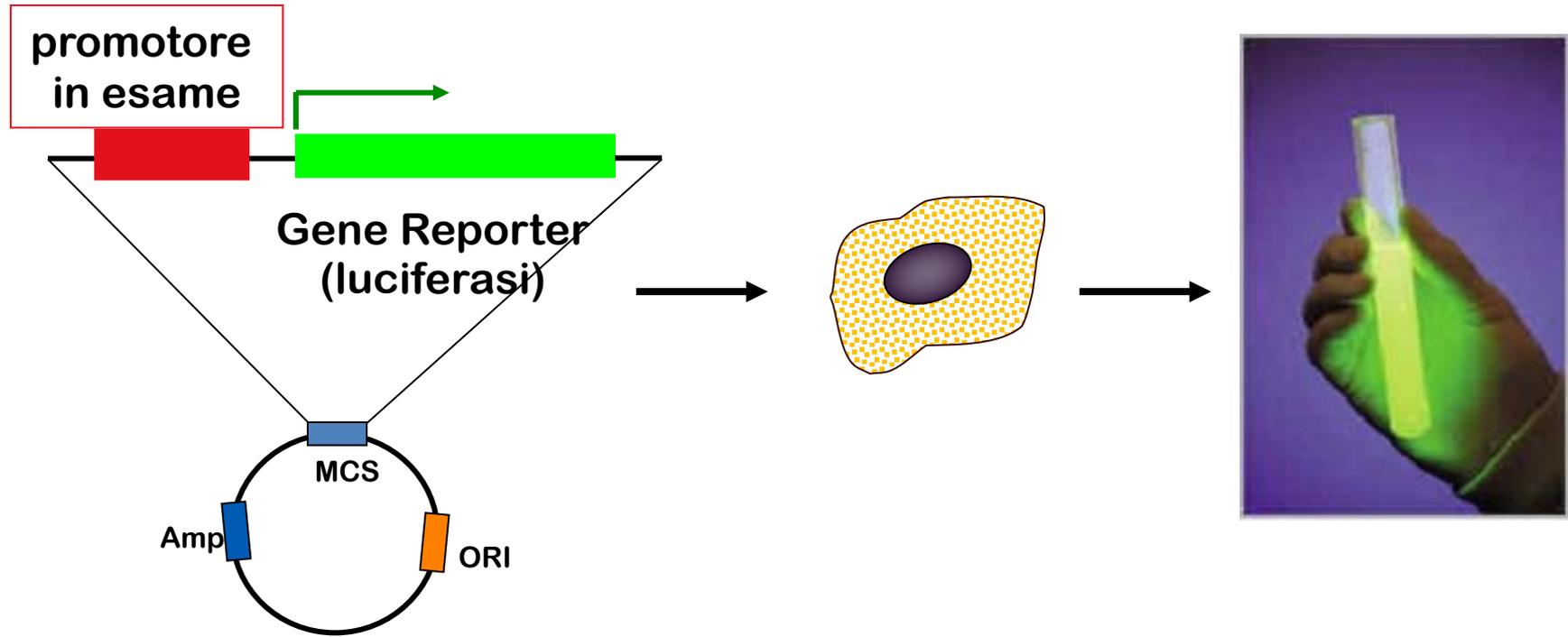
Per saggiare l'attività di un promotore in diverse condizioni sperimentali, si può **clonare il promotore bersaglio** a monte di un **gene reporter, la cui espressione sia misurabile**.

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



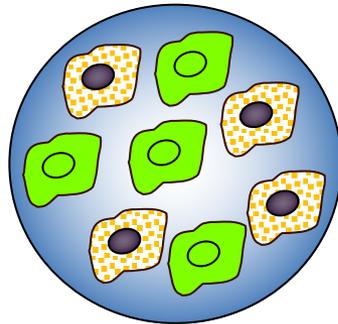
Quanto più attivo sarà il promotore, tanto maggiore la produzione di enzima e quindi l'emissione di luce

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

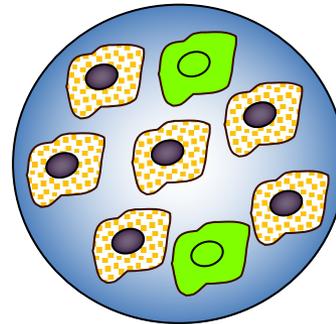
## Confronto di diversi punti sperimentali

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%

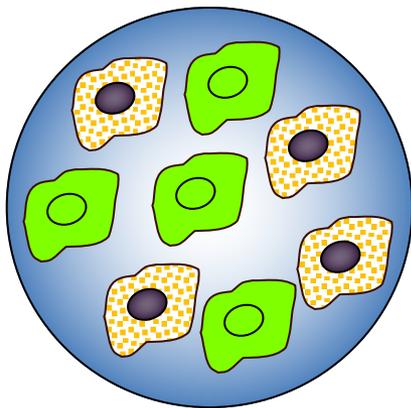


25%

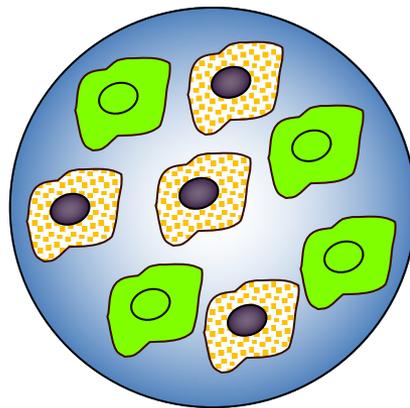
# Confronto di diversi punti sperimentali

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

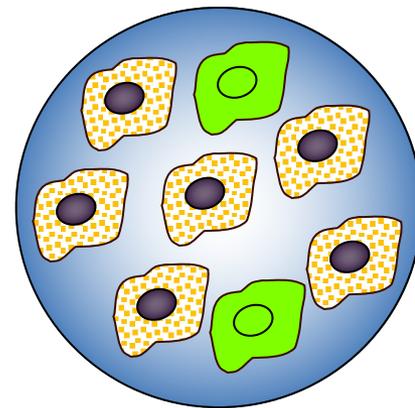
I valori assoluti di attività del reporter misurati nei 3 diversi esperimenti possono essere influenzati dalla diversa **efficienza di trasfezione** = diverso **numero di cellule trasfettate** nei diversi esperimenti.



1 = 50%



2 = 50%



3 = 25%

## **PROBLEMA:**

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

**= Normalizzare i risultati**

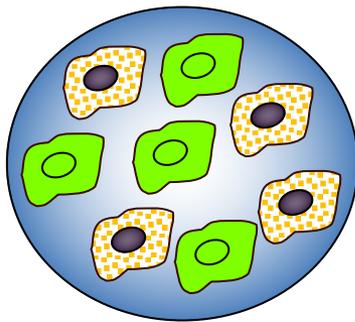
**Come posso confrontare l'efficienza di trasfezione tra diversi punti sperimentali ?**

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

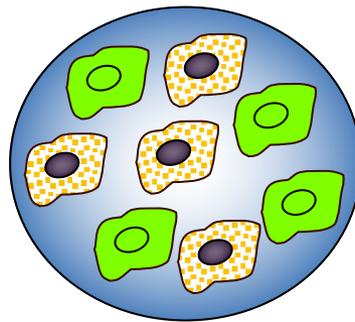
= un **gene reporter DIVERSO** da quello sperimentale sotto il controllo di un **promotore costitutivo**,

**NON INFLUENZABILE DALLE CONDIZIONI SPERIMENTALI**

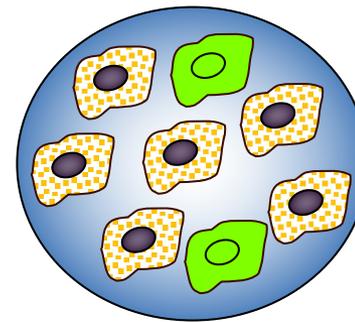
**NB: va bene misurare sia il valore ASSOLUTO dell'efficienza di trasfezione che CONFRONTARE l'efficienza RELATIVA**



1 = 50%  
100

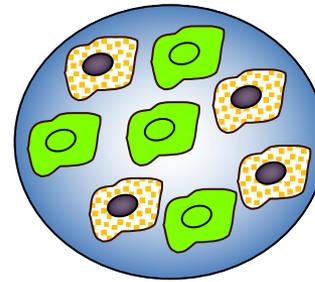
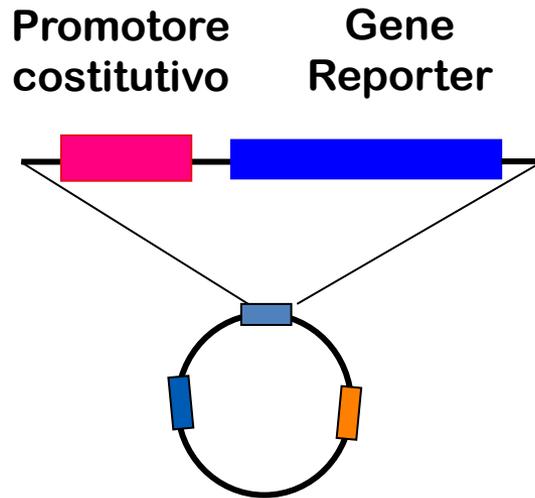


2 = 50%  
100

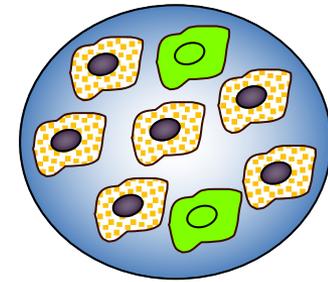


3 = 25%  
50

# 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**.

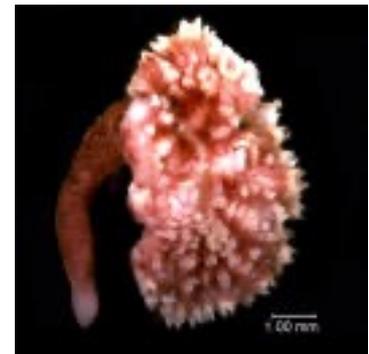
Luciferasi di lucciola: substrato **LUCIFERINA**

Luciferasi di celenterato: “ **CELENTERAZINA**

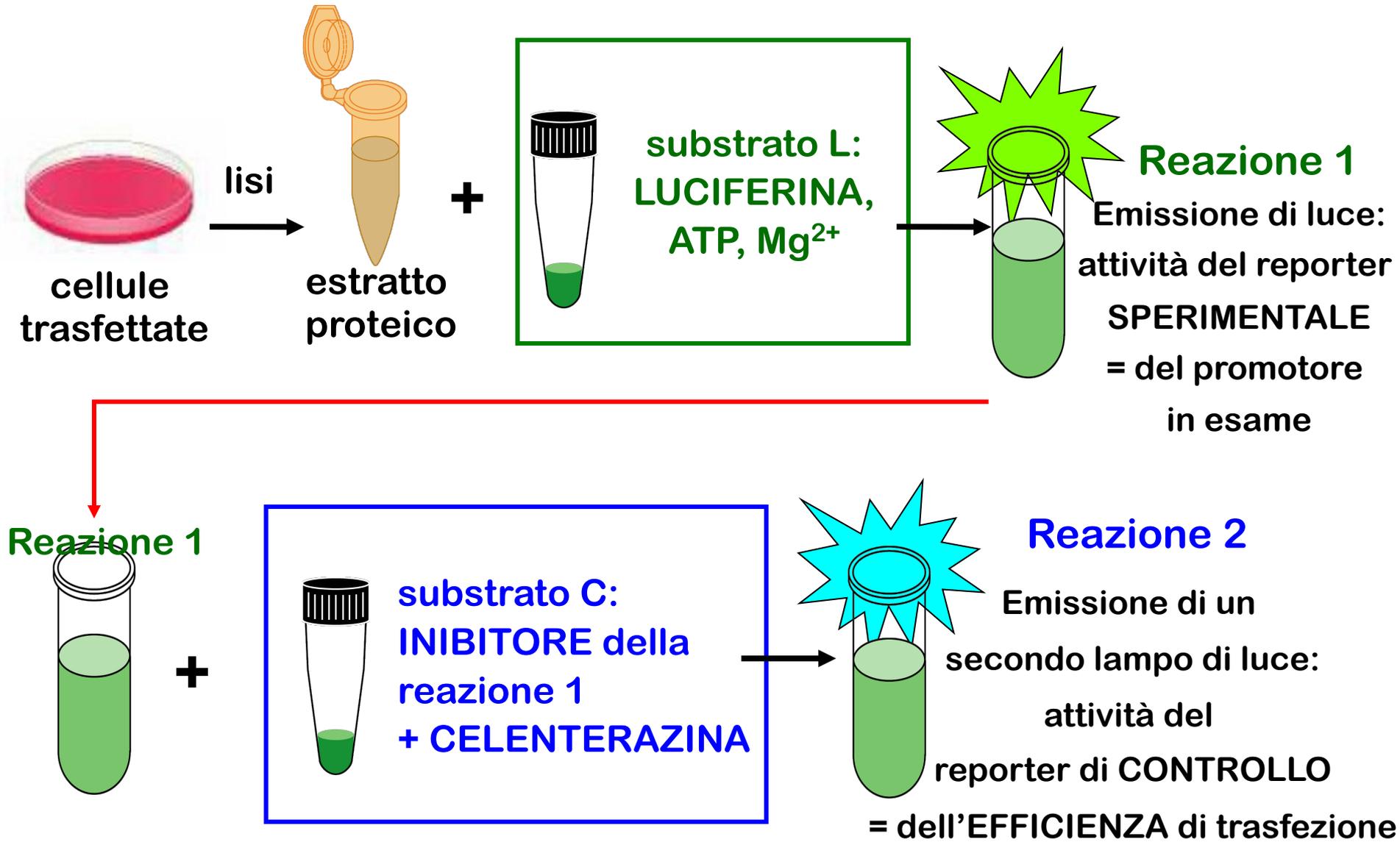
**Deve essere posto a valle di un promotore costitutivo :**

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 = <b>20x</b>
“ “ 3 = 200	“ <b>25%</b> <b>X 2</b>	3 = 400 = <b>40x</b>

**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**