

CORSO “LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE” a.a. 2024-2025

Seconda parte

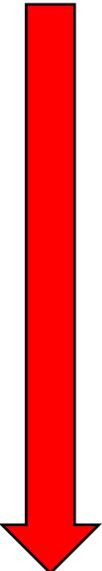
Lezione 3

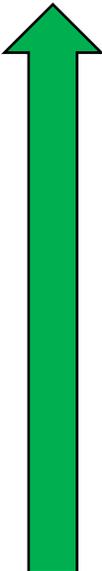
27/11/24

Dott.ssa Melania Eva Zanchetta

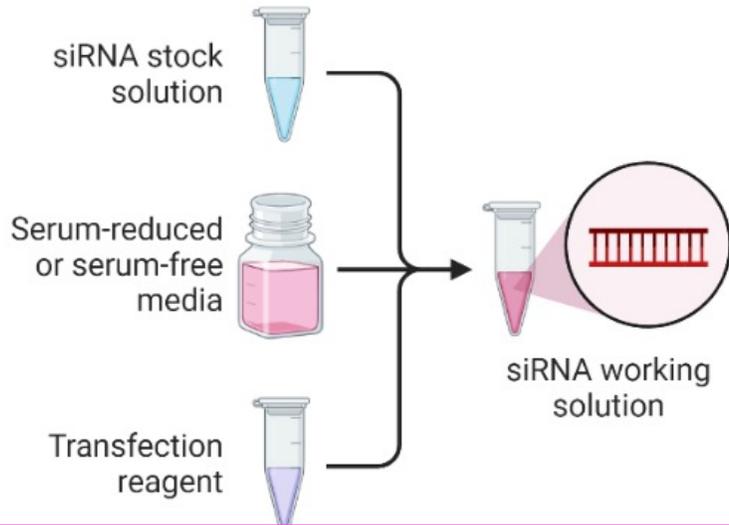
melaniaeva.zanchetta@burlo.trieste.it

Valutazione dell'attivazione della risposta infiammatoria mediante analisi dell'espressione di *CCL5* nelle cellule U2OS dopo knock-down del gene *SFPQ*

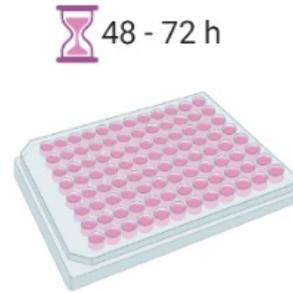
- 
- ***SFPQ*** (Splicing Factor Proline And Glutamine Rich)
 - DNA- and RNA binding protein
 - nuclear protein first identified as a splicing factor, that participates to several cellular activities, including RNA transport, apoptosis, and DNA repair
 - Essential pre-mRNA splicing factor required early in spliceosome formation

- 
- ***CCL5*** (*C-C Motif Chemokine Ligand 5*)
 - Member of the Chemokines superfamily
 - CC subfamily
 - functions as one of the natural ligands for the chemokine receptor chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5)
 - Induced during the later stage of inflammation

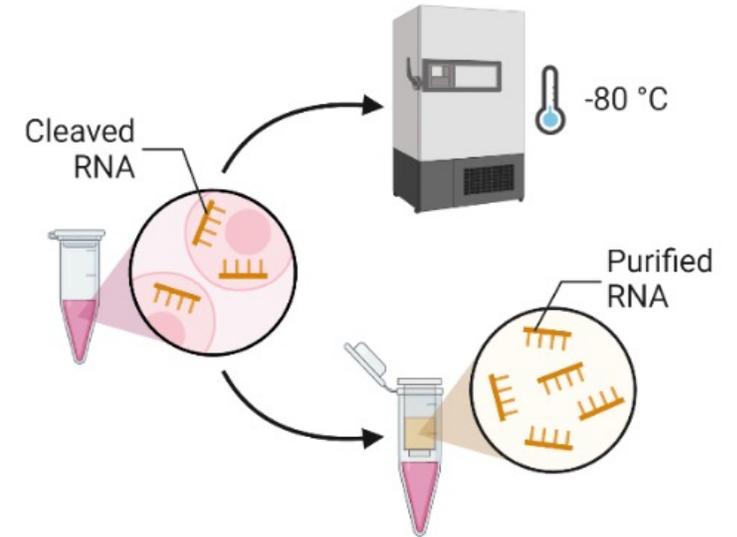
1 Combine siRNA stock solution with media and mix gently



2 Add siRNA working solution to cells and incubate for 48-72 hours

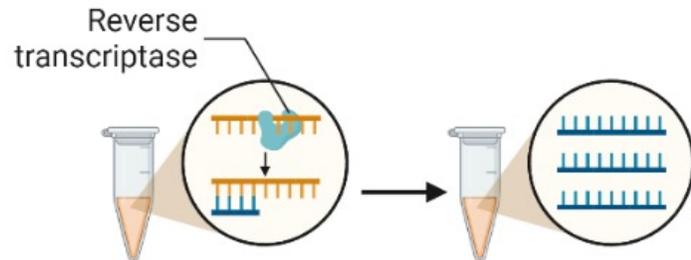


3 Collect cells and store in -80°C or proceed directly to RNA isolation

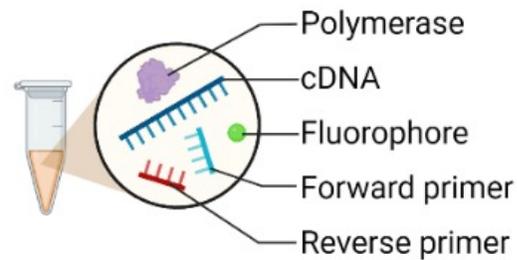


ESERCITAZIONE 3

4 Reverse transcription of purified RNA to cDNA

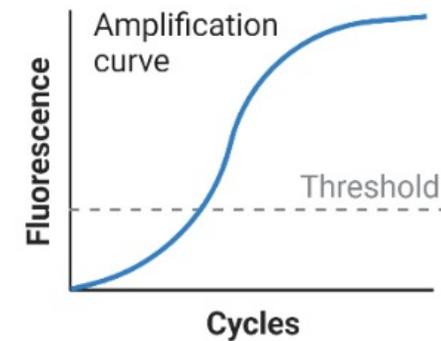


5 Store cDNA in -20°C or amplify directly by qPCR



6 Measure mRNA knockdown with Ct values

5) Measure IFI44 expression



PROGRAMMA SECONDA PARTE PRATICA

- **1- TRASFEZIONE TRANSIENTE PER SILENZIAMENTO GENICO** (Zanchetta)

Metodiche di trasfezione. Trasfezione di siRNA in cellule U2OS con Lipofectamina. Allestimento individuale della reazione.

- **2- ISOLAMENTO DELL'RNA TOTALE DA CELLULE** (Zanchetta)

Estrazione individuale dell'RNA totale da cellule U2OS con l'utilizzo di kit commerciale. Quantificazione mediante spettrofotometria UV e calcolo della concentrazione del campione ottenuto. Valutazione della purezza dell'RNA isolato.

- **3- RETRO-TRASCRIZIONE DA RNA TOTALE** (Zanchetta)

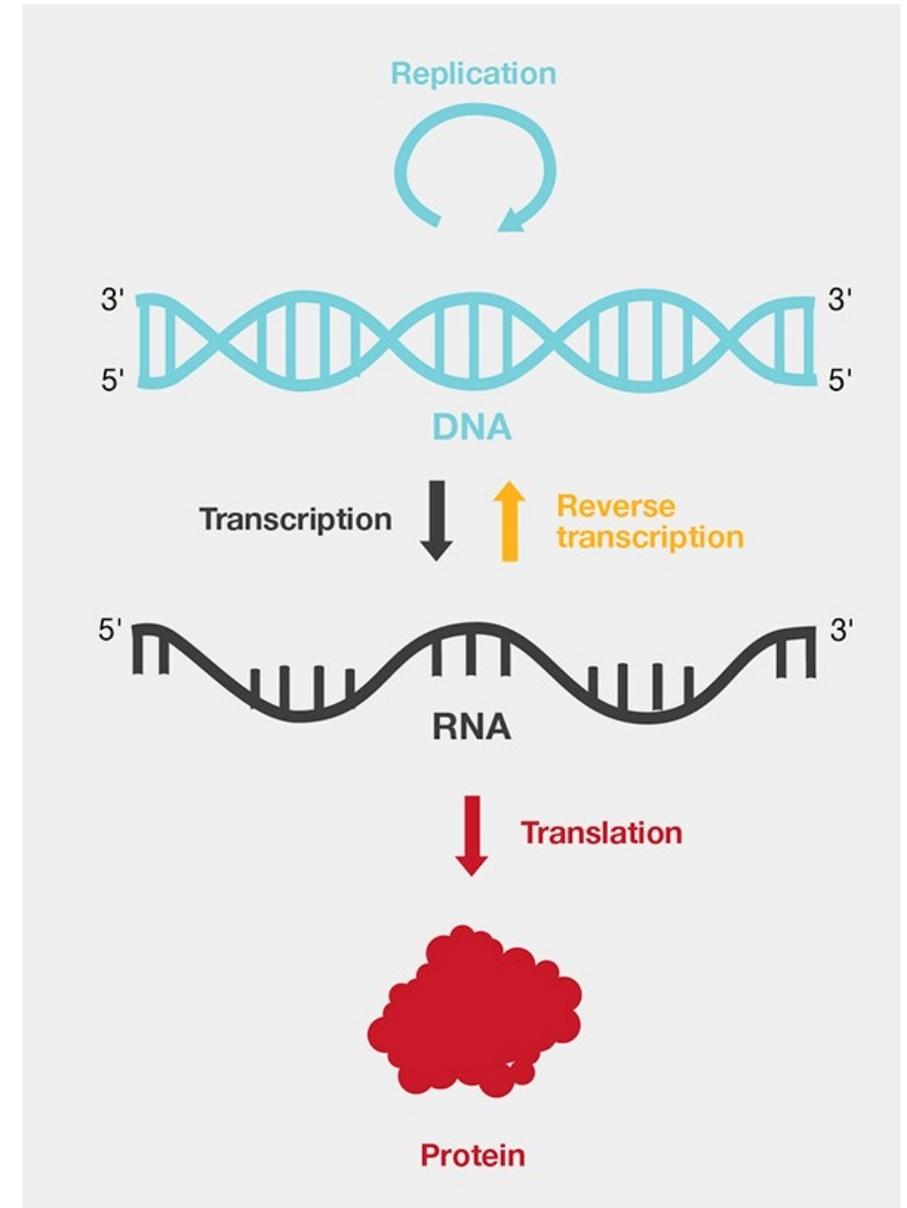
Diluizione del campione di RNA estratto in precedenza. Allestimento individuale della reazione di retro-trascrizione con l'utilizzo di kit commerciale. Diluizione del cDNA sintetizzato. Allestimento delle reazioni di RT-qPCR.

- **4- LA PCR QUANTITATIVA** (Schoeftner)

- Analisi dei dati ottenuti dalla RT-qPCR e quantificazione dell'espressione dei geni amplificati. Analisi qualitativa dei dati.

RETRO TRASCRIZIONE

- La retro trascrizione permette la sintesi di una molecola di DNA a singolo filamento, chiamato complementare (cDNA), a partire da una molecola di RNA utilizzata come stampo.
- Il cDNA è una molecola più stabile e meno sensibile alla degradazione rispetto all'RNA



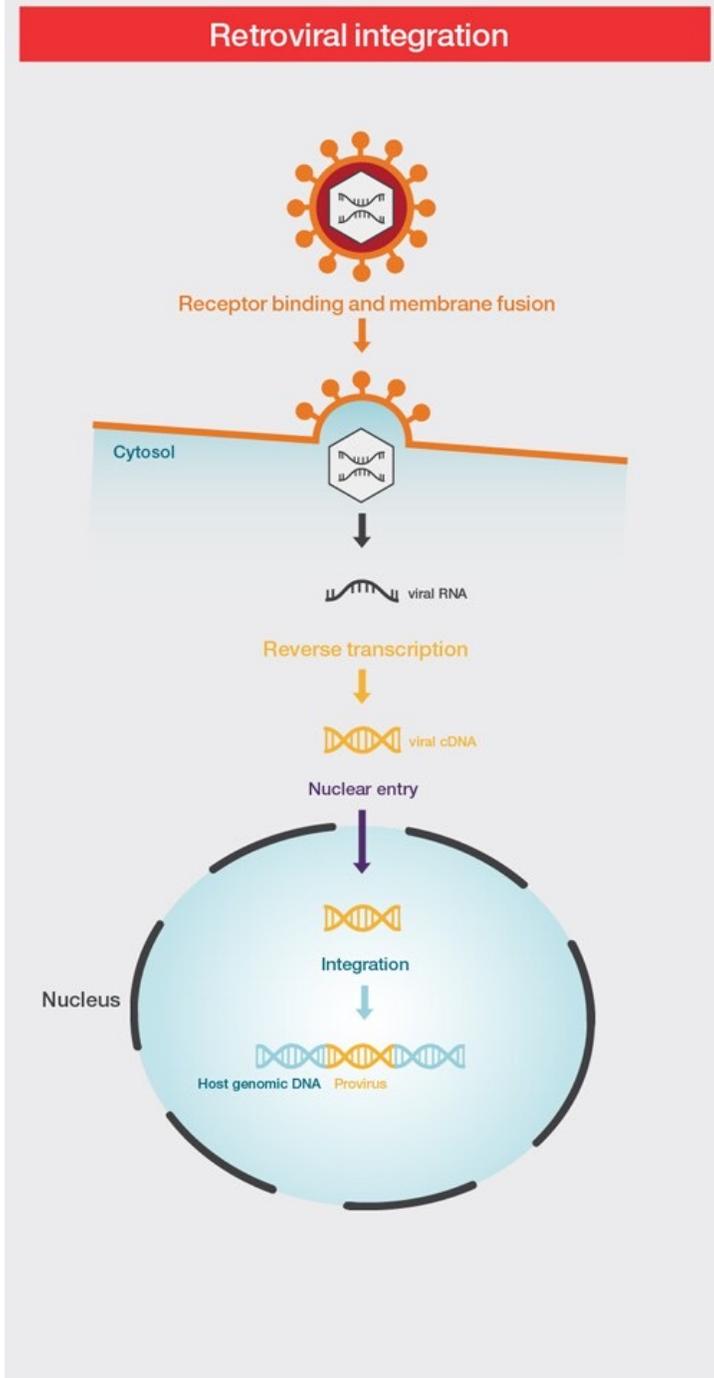
LA SCOPERTA DELLE TRASCRIPTASI INVERSE

- Negli anni '70 due gruppi di ricerca, uno guidato da **Howard Temin** dell'Università del Wisconsin e l'altro da **David Baltimore** del MIT, hanno identificato indipendentemente nuovi enzimi associati alla replicazione dei virus a RNA (**retrovirus**)
- Questi enzimi, chiamati **trascrittasi inversa**, convertono l'RNA virale in una molecola di DNA complementare (cDNA), che poi si integra nel genoma dell'ospite.
- Nel **1975**, Temin e Baltimore hanno ricevuto il Premio **Nobel per la Fisiologia o la Medicina** (condiviso con Renato Dulbecco per un lavoro correlato sui virus che inducono i tumori) per il loro lavoro pionieristico nell'identificazione delle trascrittasi inverse.

Le **trascrittasi inverse** sono state identificate in molti organismi, tra cui batteri, animali, piante e virus. Il ruolo naturale della trascrittasi inversa è quello di convertire sequenze di RNA in sequenze di cDNA che possono essere inserite in diverse aree del genoma.

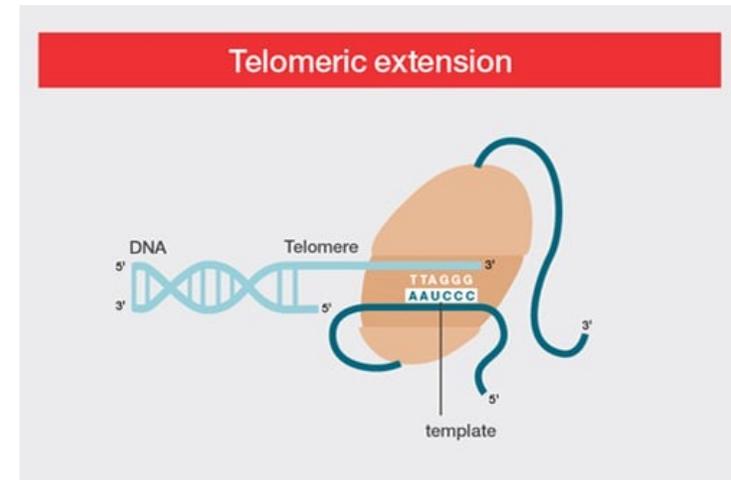
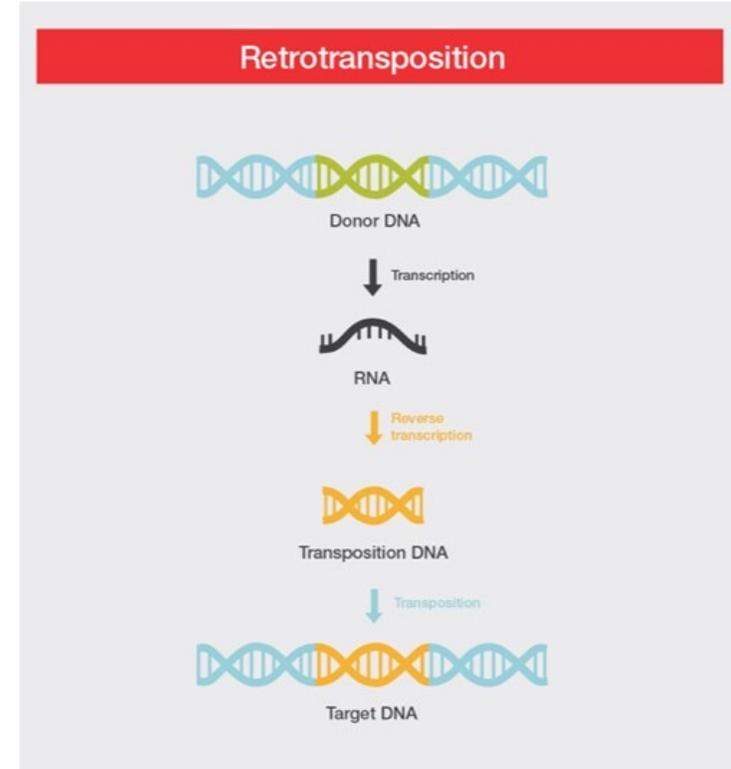
In questo modo, la trascrizione inversa contribuisce a:

- **Propagazione di retrovirus**, come il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), il virus della leucemia murina di Moloney (M-MuLV) e il virus della mieloblastosi aviaria (AMV)



- **Diversità genetica** negli eucarioti attraverso elementi trasponibili mobili chiamati **retrotrasposoni**

- **Replicazione delle estremità cromosomiche** (telomeri)



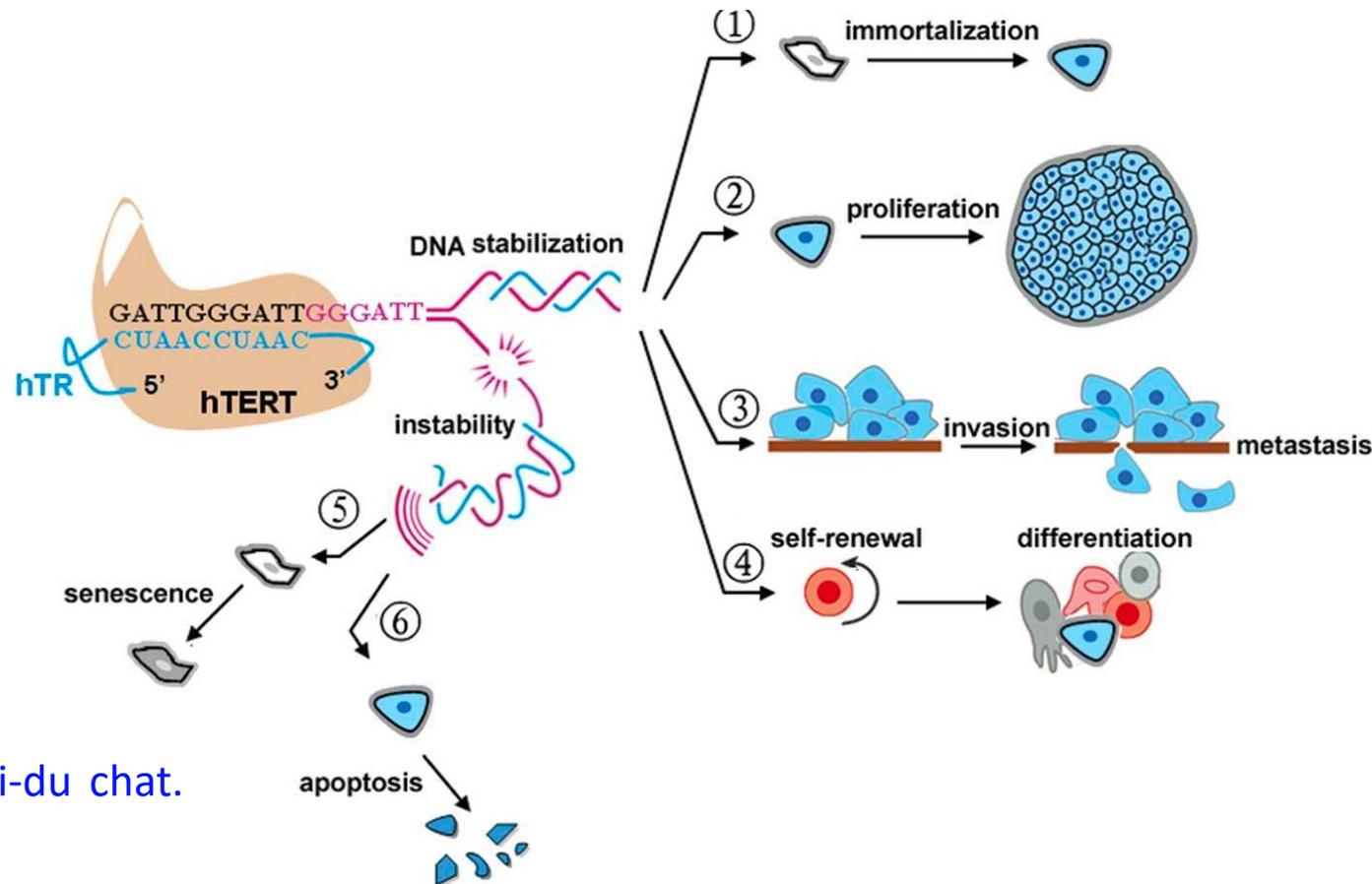
La **Telomerasi trascrittasi inversa (TERT)** è un complesso costituito da una **subunità catalitica**, una **polimerasi RNA-dipendente** e una **componente della telomerasi di RNA (TERC)**, ed è responsabile dell'aggiunta di nucleotidi alle sequenze **TTAGGG** poste alle estremità dei telomeri dei cromosomi, usando la porzione di RNA componente come stampo e innesco della reazione di polimerizzazione per la ripetizione dei telomeri.

Questa aggiunta di ripetizioni di sequenze di DNA previene la degradazione del cromosoma durante i cicli di replicazione cellulare.

Man mano che la cellula diventa senescente e il numero di divisioni cellulari si avvicina al limite di Hayflick (il numero di volte che una popolazione di cellule normali si dividerà) queste regioni cromosomiche diventano instabili, vengono persi dei frammenti durante la divisione e le cellule diventeranno post-mitotiche e apoptotiche.

Quando invece riescono a superare questo limite e continuano a dividersi diventano potenzialmente immortali>>>è il caso delle cellule tumorali

L'assenza dell'enzima hTERT è associata alla malattia Cri-du chat. (del5p)



TRASCRIPTASI INVERSA

Le trascrittasi inverse più utilizzate in lab sono generalmente derivate da retrovirus contenenti RNA come:

- **MMLV**-RT ottenuta dal virus della leucemia murina di Moloney. È un singolo polipeptide di 71 KDa.
- **AMV**-RT ottenuta dal virus della mieloblastosi aviaria. È costituita da due subunità di 64 e 96 KDa.
- RT ottenuta dal virus dell'immunodeficienza umana (**HIV**). (alto tasso di errore)

Le trascrittasi inverse disponibili in commercio (modificate per creare proteine ricombinanti in laboratorio) presentano invece tassi di errore nel range di 1 a 17.000 basi per AMV e 1 a 30.000 basi per M-MLV.

- **Quantiscript Reverse Transcriptase** è un enzima ricombinante eterodimerico

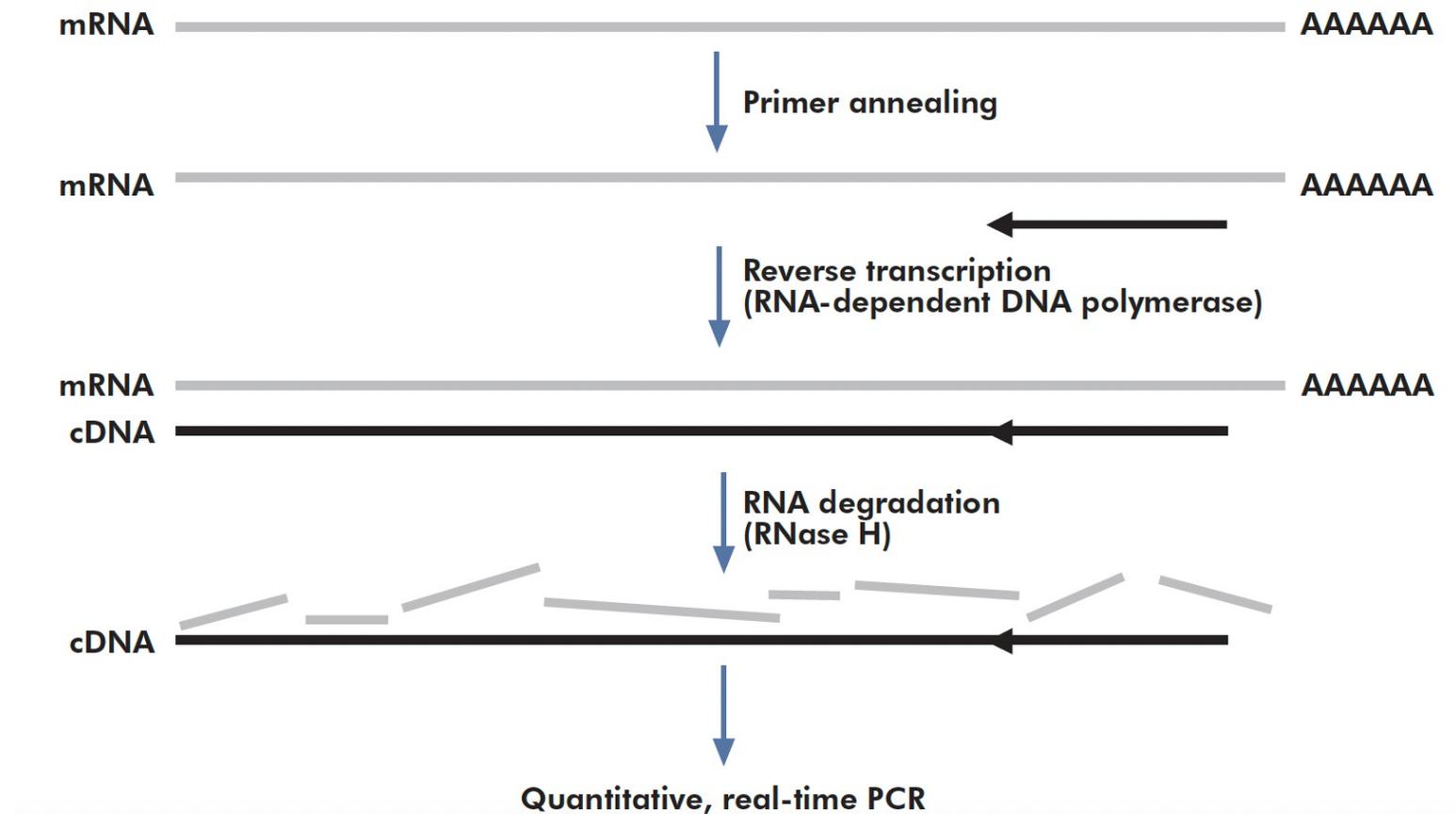
TRASCRIPTASI INVERSA

Enzima multifunzionale con 3 distinte attività:

- 1. DNA polimerasi RNA-dipendente (TRASCRIPTASI INVERSA)** trascrive il cDNA da un template di RNA (5'-3')
- 2. esoribonucleasi ibrido-dipendente (RNasi H)** degrada specificamente solo l'RNA negli ibridi RNA:DNA. Pertanto, l'attività della RNasi H colpisce l'RNA ibridato con il cDNA, ma non ha alcun effetto sull'RNA puro.
- 3. DNA polimerasi DNA-dipendente**
 - *In vivo*, la combinazione di queste 3 attività consente la trascrizione del genoma di RNA a singolo filamento in DNA a doppio filamento per l'infezione retrovirale.
 - Per la trascrizione inversa *in vitro* le prime due attività sono utilizzate per produrre cDNA a singolo filamento

COMPONENTI DELLA REAZIONE DI RETROTRASCRIZIONE *in vitro*

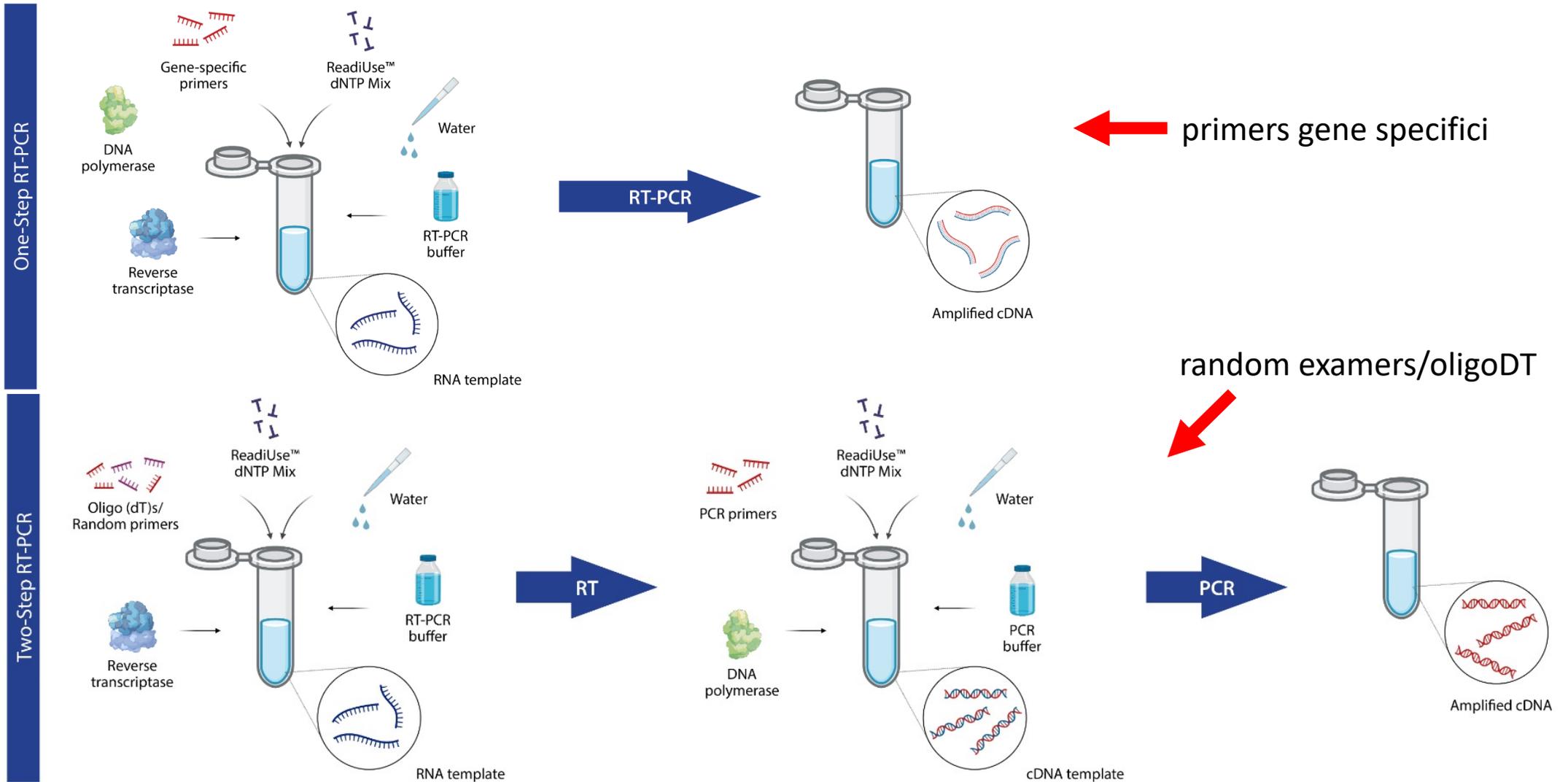
- Trascrittasi inversa
- Primers
- dNTPs
- buffer



PRIMERS per RT

1. **Random primers/ examers:** brevi oligodeossiribonucleotidi con sequenze di basi casuali (di solito [d(N)6]). Sono tipicamente usati per appaiarsi a mRNA con o senza poli(A) per la sintesi di cDNA.
2. **Oligo (dT) primers:** stringa di 12-20 deossi-timidine che riconoscono le code di poli(A) degli mRNA eucariotici. Sono ideali per la costruzione di librerie di cDNA.
3. **Gene specific (sequencing) primers:** utilizzati per amplificare un target specifico o per sequenziare direttamente una regione genetica di interesse.
4. **Primer pools:** utilizzati per generare profili di espressione completi, soprattutto quando la sensibilità del saggio è fondamentale. Migliorano significativamente la capacità di rilevare i microRNA espressi a bassi livelli.

One-step vs Two-step RT-PCR



QuantiTect Reverse Transcription Kit

Mix RNA,
gDNA Wipeout Buffer,
and RNase-free water



Incubate at 42°C for 2 min



Add Quantiscript Reverse
Transcriptase, Quantiscript RT
Buffer, and RT Primer Mix, and mix



Incubate at 42°C for 15 min



Incubate at 95°C for 3 min to
inactivate Quantiscript Reverse
Transcriptase



Add cDNA to real-time
PCR mix and distribute

Quantitative, real-time PCR



QuantiTect Reverse Transcription Kit

- **gDNA Wipeout Buffer, 7x:** buffer for effective elimination of genomic DNA contamination from starting RNA samples.
- **Quantiscript Reverse Transcriptase:** developed for use in real-time two-step RT-PCR. Transcriptase Contains an **optimized mixture** of the QIAGEN products Omniscript Reverse Transcriptase and Sensiscript Reverse Transcriptase, which are **recombinant heterodimeric enzymes** expressed in *E. coli*. Also contains **RNase inhibitor**, a 50 kDa protein that strongly inhibits RNases A, B, and C as well as human placental RNases.
- **Quantiscript RT Buffer, 5x** Buffer optimized for reverse transcription with Quantiscript Reverse Transcriptase; **contains dNTPs**
- **RT Primer Mix** Optimized blend of **oligo-dT** and **random primers** dissolved in water. RT Primer Mix allows high cDNA yields from all regions of RNA transcripts, even from 5' regions.



QuantiTect Reverse Transcription procedure

- 1) Eliminazione del DNA genomico:** Il campione di RNA purificato viene brevemente incubato in gDNA Wipeout Buffer a 42°C per 2 minuti per rimuovere efficacemente il DNA genomico contaminante. A differenza di altri metodi, il campione di RNA viene poi utilizzato direttamente per la trascrizione inversa

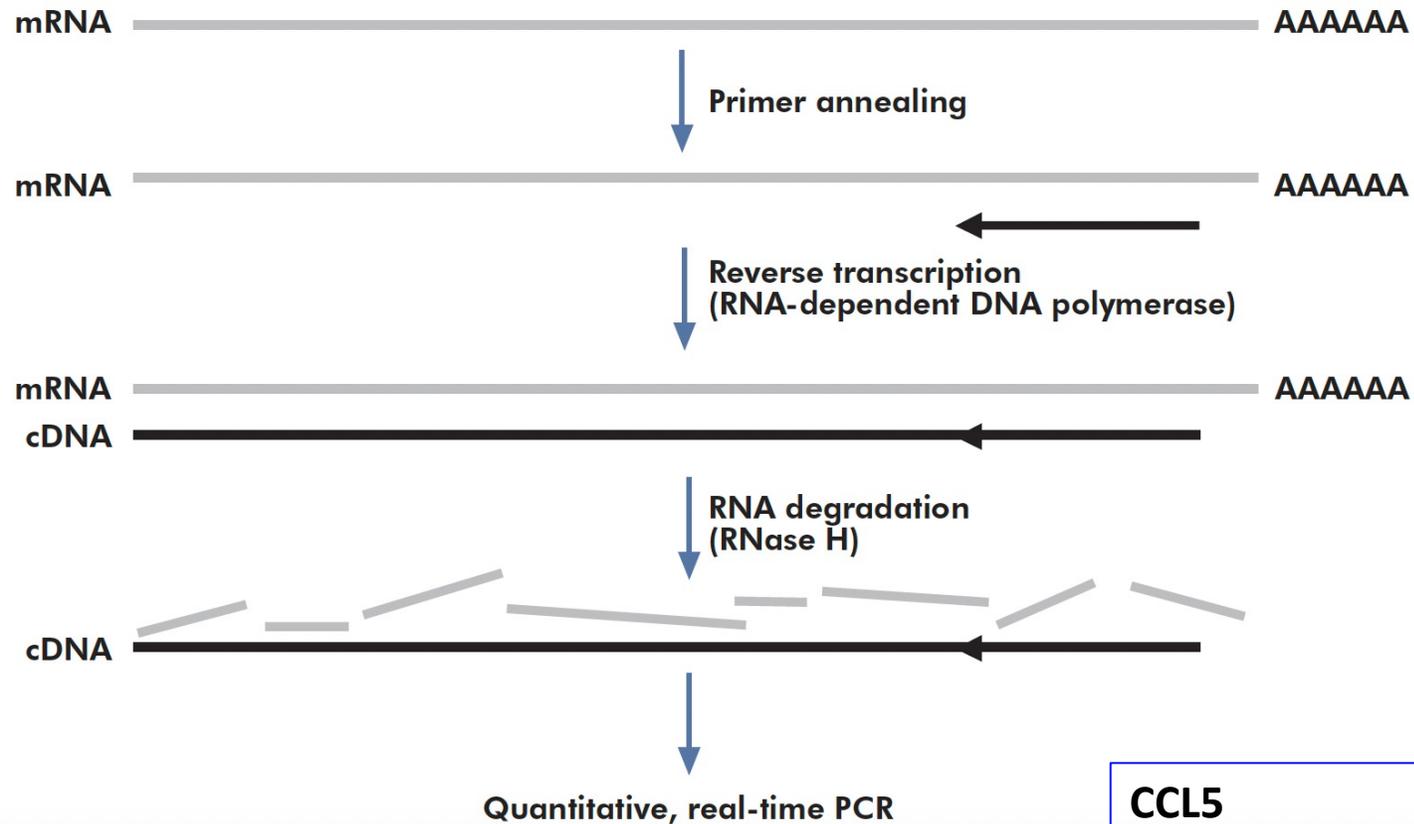
Risultati accurati nella real-time RT-PCR dipendono dall'uso di primer o sonde progettati per eliminare o ridurre al minimo la rilevazione di DNA genomico

QuantiTect Reverse Transcription procedure

2) Trascrizione inversa: dopo l'eliminazione del DNA genomico, il campione di RNA è pronto per la trascrizione inversa utilizzando una master mix preparata con Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer e RT Primer Mix. L'intera reazione avviene a 42°C e viene poi inattivata a 95°C. A differenza di altri metodi, non sono necessari ulteriori passaggi per la denaturazione dell'RNA, il primer annealing e la digestione dell'RNasi H.

- La trascrittasi inversa Quantiscript è ottimizzata per la **sintesi efficiente di cDNA da 10 pg a 1 µg di RNA**. Questa elevata affinità per l'RNA, in combinazione con Quantiscript RT Buffer, consente di ottenere elevate rese di cDNA, anche da templates con elevato contenuto di GC o struttura secondaria complessa.
- L' RT Primer Mix assicura la sintesi di cDNA da tutte le regioni dei trascritti di RNA, anche dalle regioni 5'. Ciò consente di ottenere elevate rese di cDNA per l'analisi qPCR, indipendentemente dalla posizione della regione target sul trascritto.

Reverse Transcription (RT)



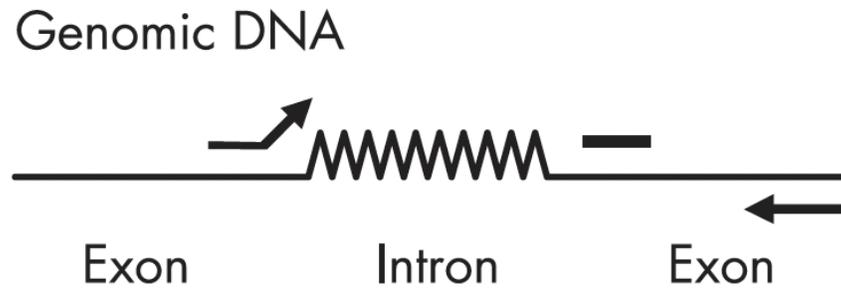
CCL5

SFPQ

ACTIN (reference gene) >> RELATIVE QUANTIFICATION

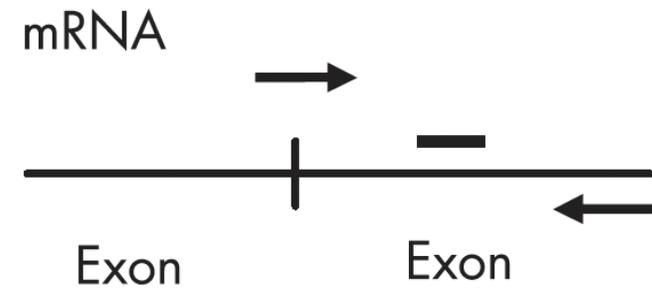
Primer design to eliminate signals from contaminating genomic DNA (qRT-PCR)

Primer spans an intron/exon boundary



↓ RT-PCR

No product



↓ RT-PCR

Product



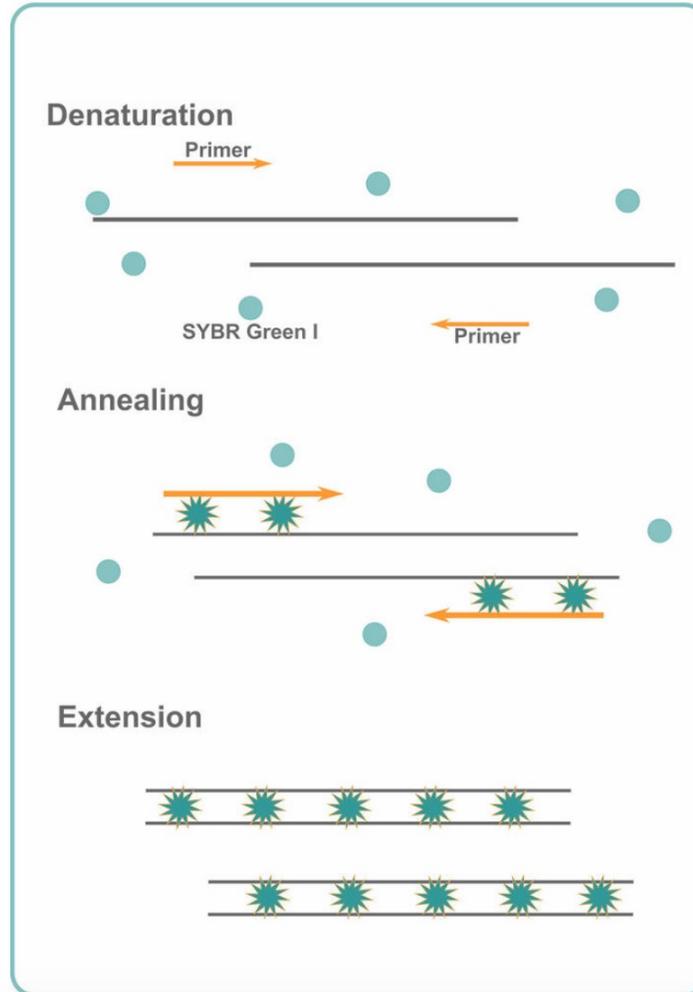
qRT-PCR

- Medium specificity
- No gene-specific assay
- Medium reproducibility
- Less expensive

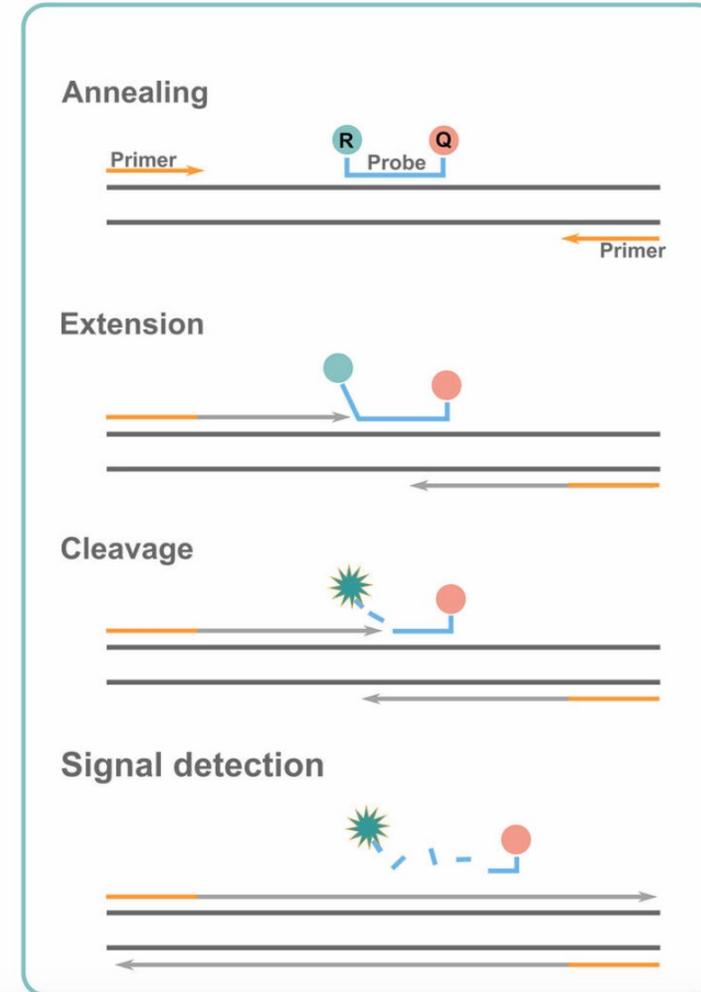
Il SYBR green si lega al dsDNA in maniera sequenza-aspecifica

Con l'accumulo di amplificato aumenta la fluorescenza

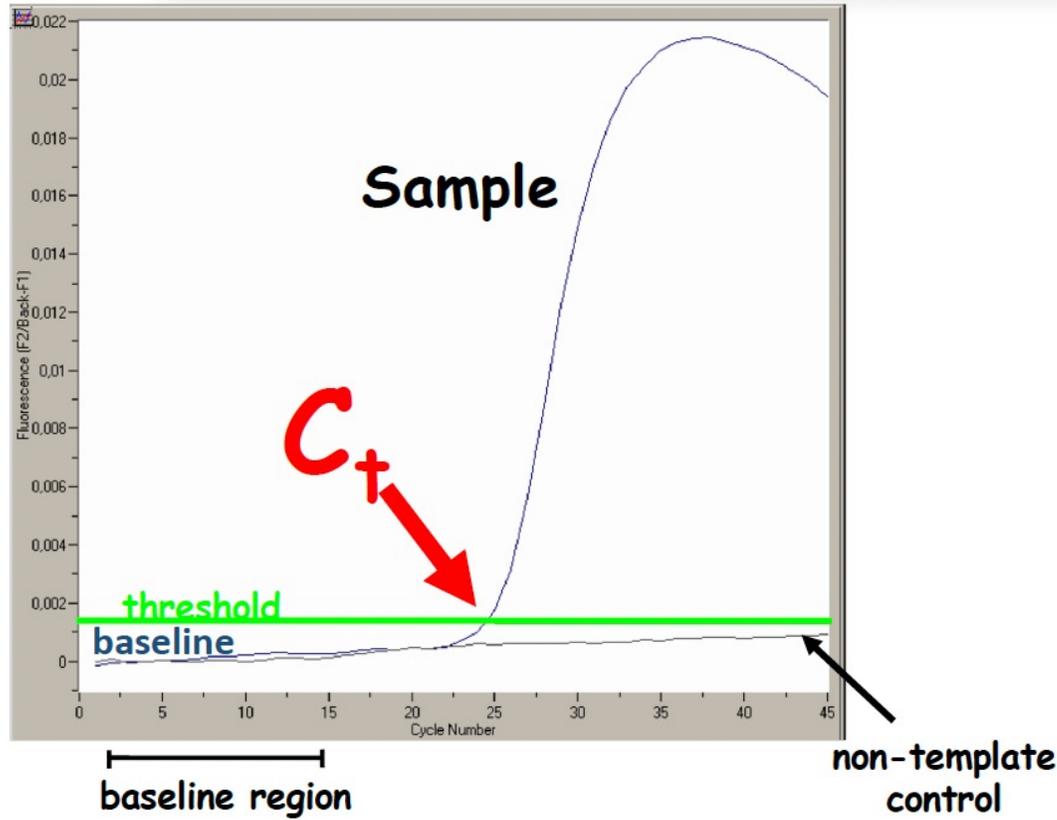
SYBR Green



TaqMan



- high specificity
- Multiplexing
- Pre-designed assays
- High reproducibility



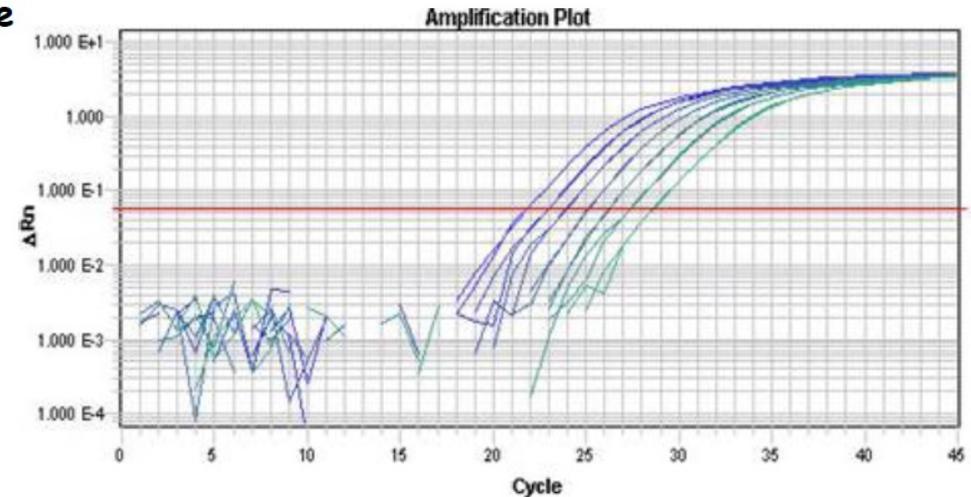
C_t = threshold cycle: è il ciclo della reazione di amplificazione in cui il segnale di fluorescenza del campione è maggiore rispetto a quello della Threshold

Threshold : linea soglia scelta dall'operatore in modo da intersecare tutte le curve dei campioni in fase esponenziale

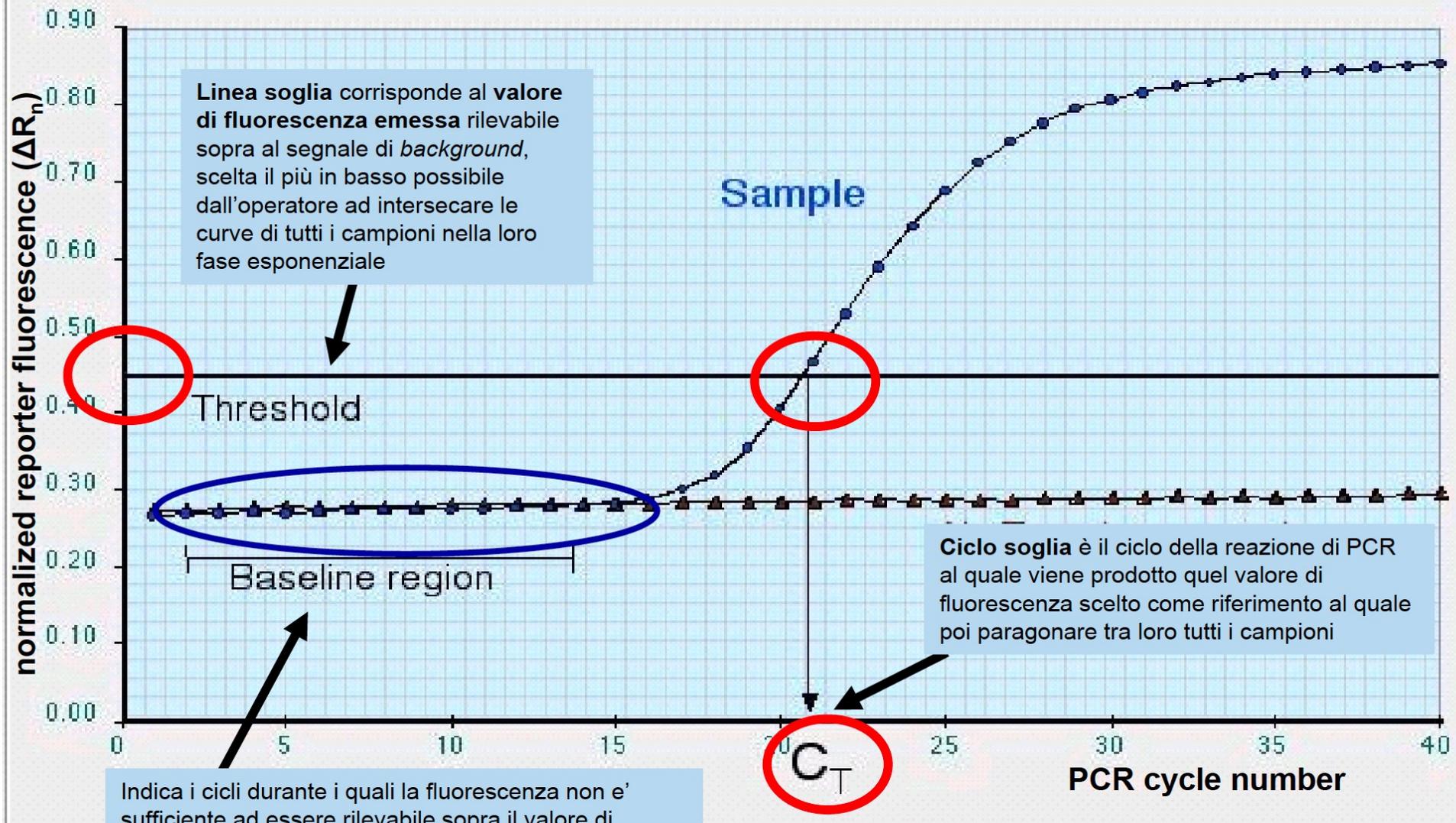
Baseline region: valore al di sopra del quale inizia l'accumulo dell'amplificato

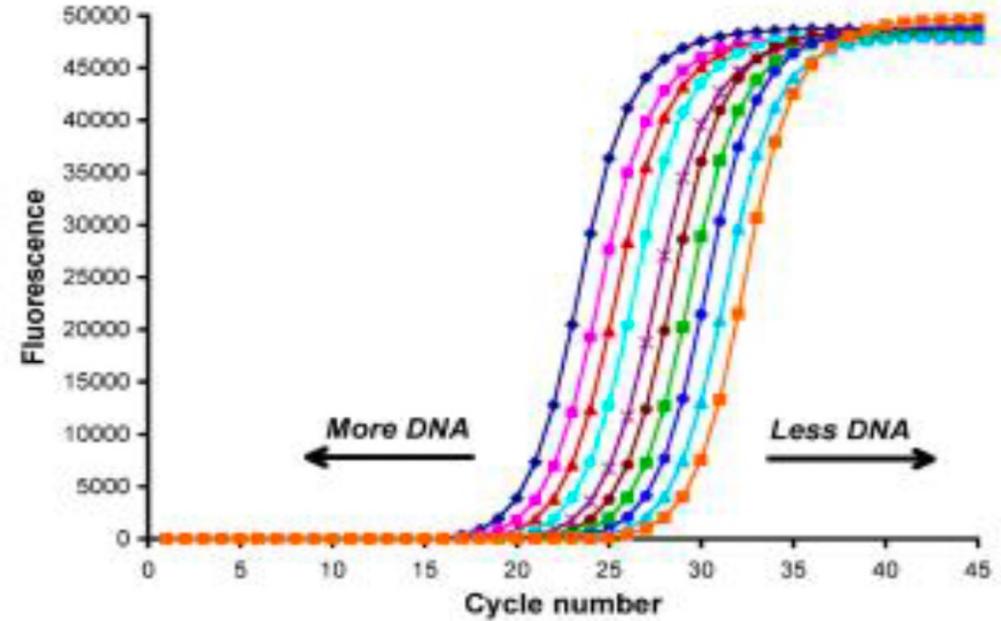
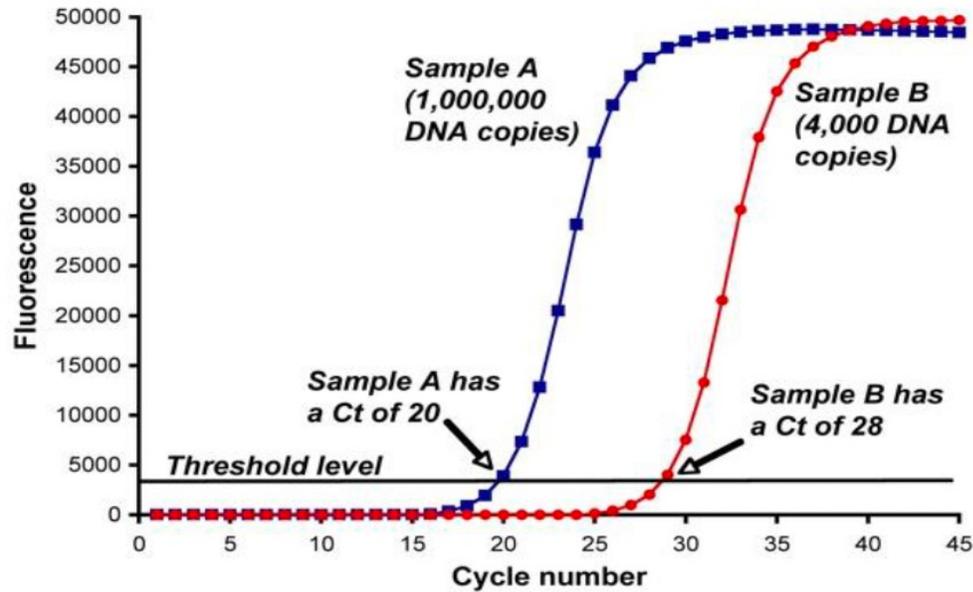
AMPLIFICATION CURVE

plot tra numero di cicli e fluorescenza rilevata (proporzionale alla quantità di amplificato prodotto)



Plot di amplificazione lineare





Per ogni campione si ottiene una curva di amplificazione e (definita una *threshold*) il relativo CT (*Threshold Cycle*) è inversamente proporzionale alla quantità di DNA stampo iniziale contenuto nel campione

SCHEMA SPERIMENTALE

