

Analisi dei promotori
Geni Reporter
Interazione DNA-proteine

**Se non so nulla
dell'espressione di YFG,
ma ho gene e cDNA,.....
COSA FACCIIO?????**

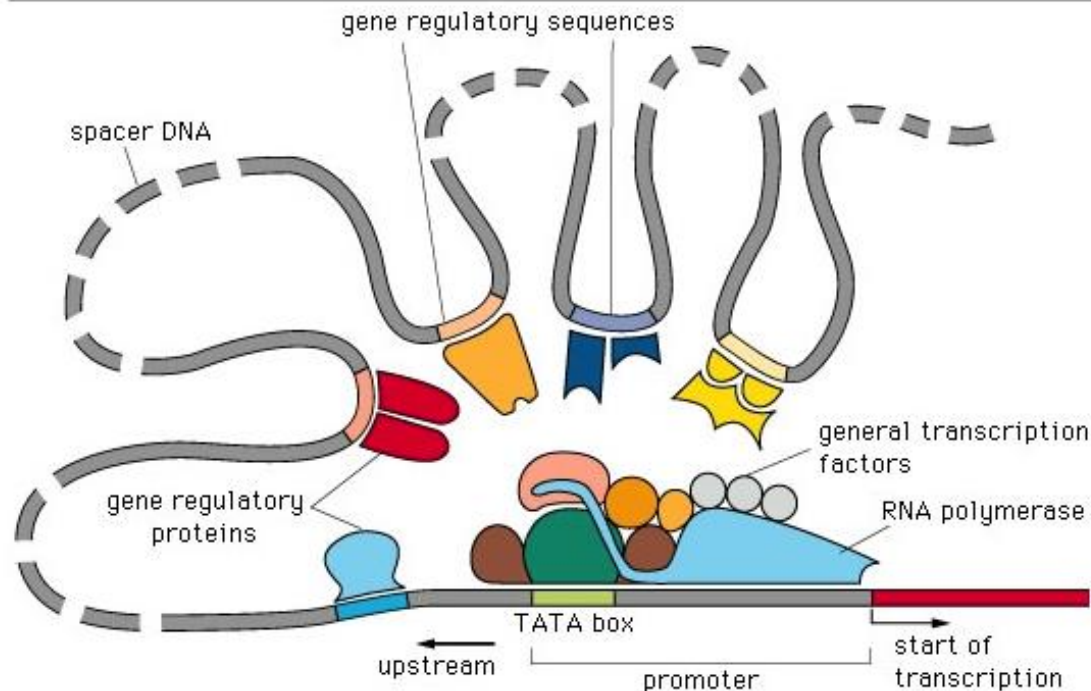
Studio il suo Promotore

Regolazione espressione organismi eucarioti

A differenza dei procarioti, la **trascrizione *in vitro*** in presenza di RNA polimerasi ed una regione di DNA contenente un promotore eucariotico **NON è possibile**.

Negli eucarioti infatti l'RNA polimerasi ha bisogno di numerosi fattori di trascrizione.

Infatti, i **promotori eucariotici sono costituiti da diversi domini riconosciuti da specifici Fattori di Trascrizione (TF-BS), in aggiunta al promotore basale**



Geni Reporter

Reporter genes are genes that enable the detection or measurement of gene expression. They can be fused to regulatory sequences or genes of interest to report expression location or levels. Reporter genes include genes that code for fluorescent protein and enzymes that convert invisible substrates to luminescent or coloured products.

The ideal reporter gene should be absent from the cells used in the study or easily distinguishable from the native form of the gene, assayed conveniently, and have a broad linear detection range. It is also important that the presence of the reporter gene does not affect the normal physiology and general health of the transfected cells/organisms.

- Sono privi del loro promotore
- Sono facilmente identificabili/quantificabili
- Non sono presenti nel genoma della specie ospite
- Non alterano metabolismo/fisiologia/sviluppo dell'ospite

- **CAT (Cloramfenicolo Acetil Transferasi)**

catalizza il trasferimento di gruppi acetile (radioattivi) al cloranfenicolo rivelati mediante cromatografia e autoradiografia

- **β -GAL (β -galattosidasi)**

catalizza idrolisi di galattosidi incolori in prodotti colorati

- **GUS (β -glucuronidasi)**

catalizza idrolisi di glucuronidi incolori in prodotti colorati

- **β -lactamase**

catalizza idrolisi di cefalosporine monitorate da una variazione dell'emissione di fluorescenza

- **Firefly luciferase**

catalizza l'ossidazione della luciferina con emissione di fotoni

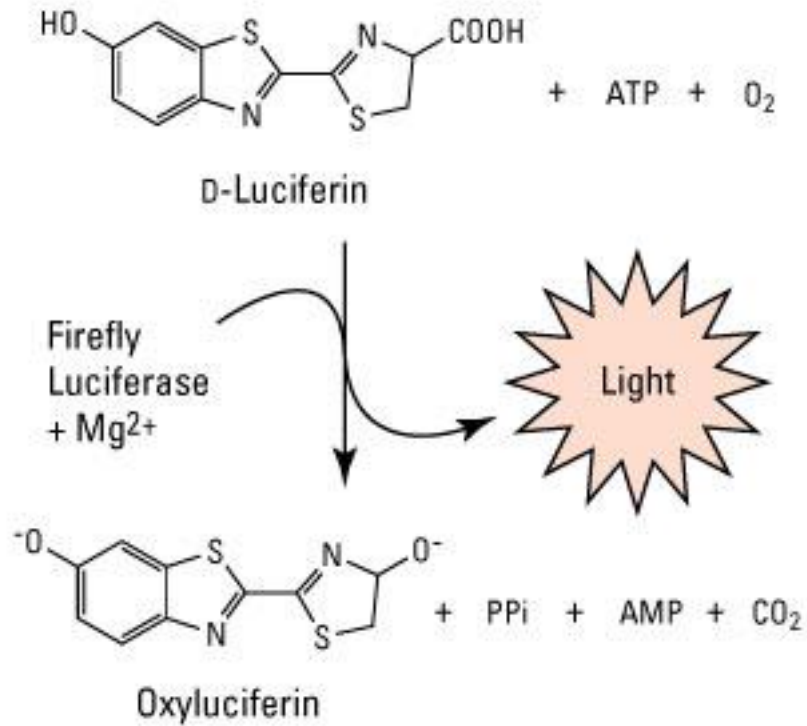
- **Renilla luciferase**

catalizza l'ossidazione della celentrazina con emissione di bioluminescenza

- **Green Fluorescent Protein (GFP)**

emissione di fluorescenza a seguito di irradiazione e trasferimento energia

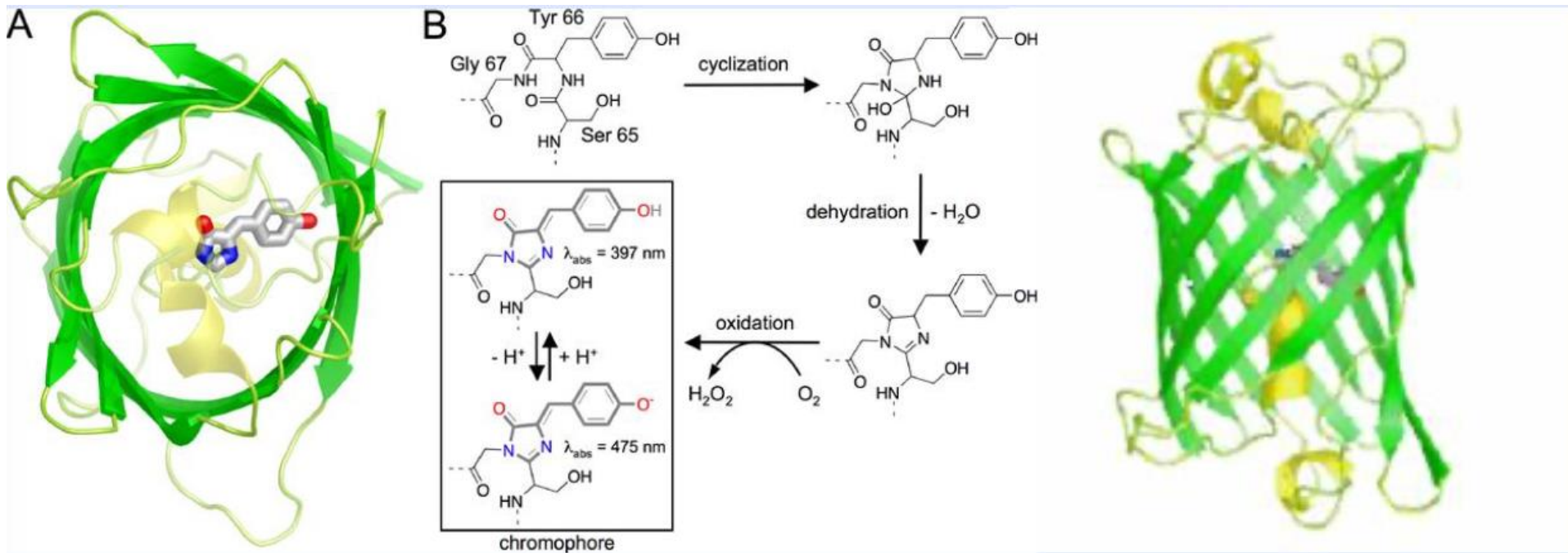
Reazione della luciferasi



GFP

(*Aequorea victoria*)

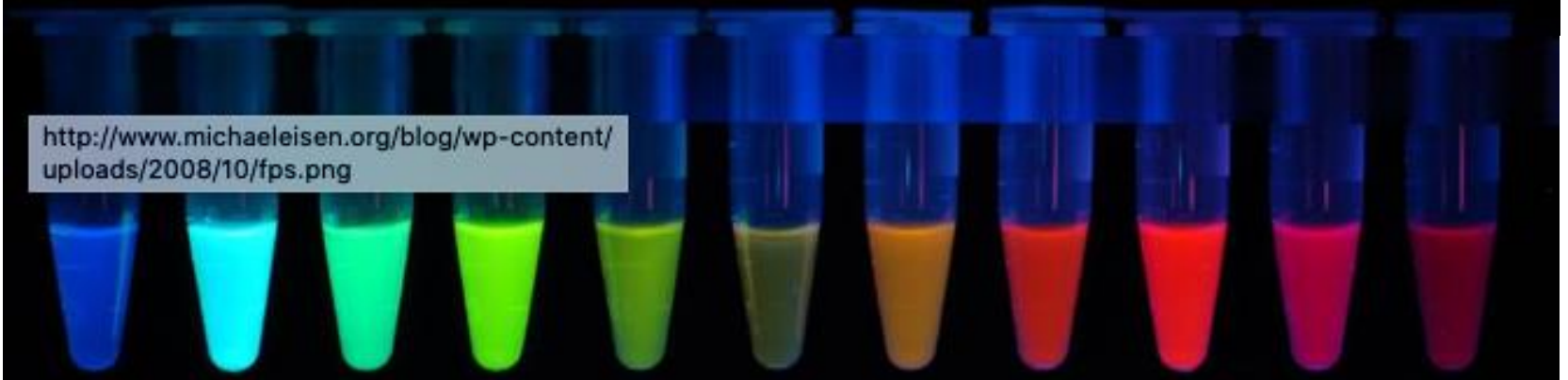
Proteina composta di 238aa la cui struttura spaziale determina la formazione di una struttura a forma di «lattina di birra» al cui interno risiede il cromoforo (un tripeptide formato da serine 65, tyrosine 66, glycine 67). L'emissione è a $\lambda = 504\text{nm}$

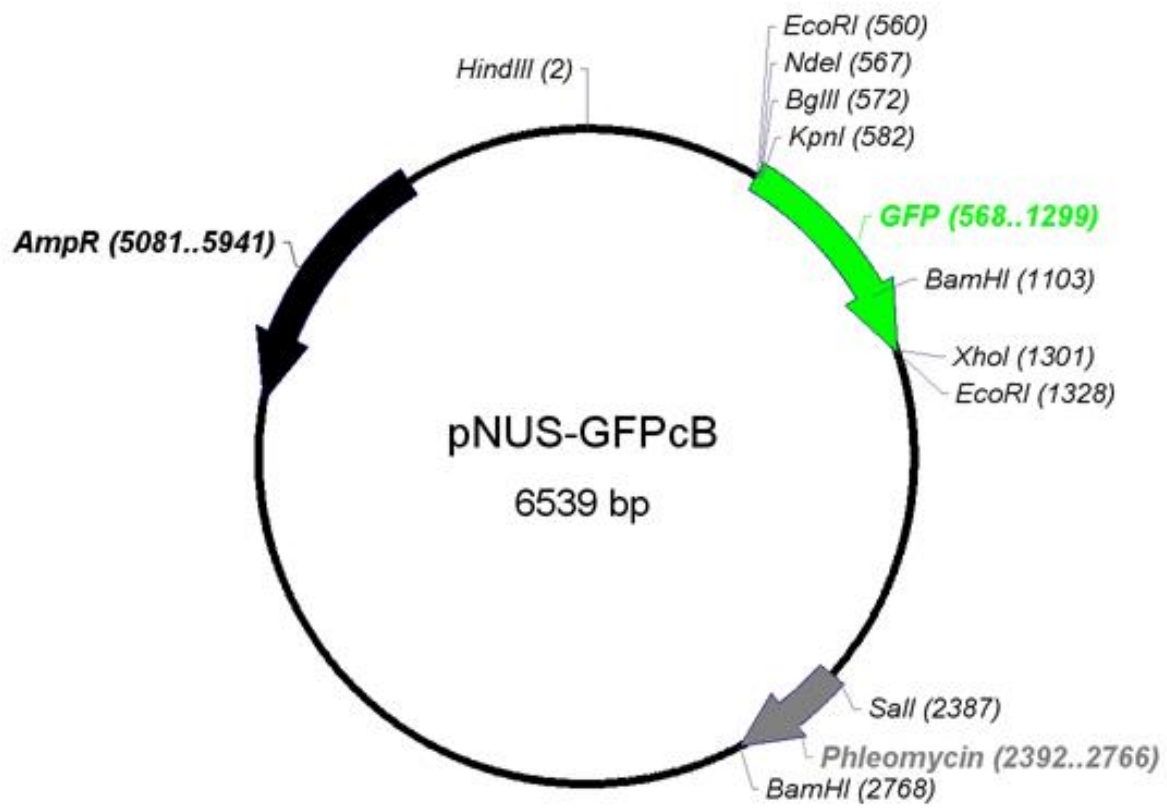


GFP sintetiche



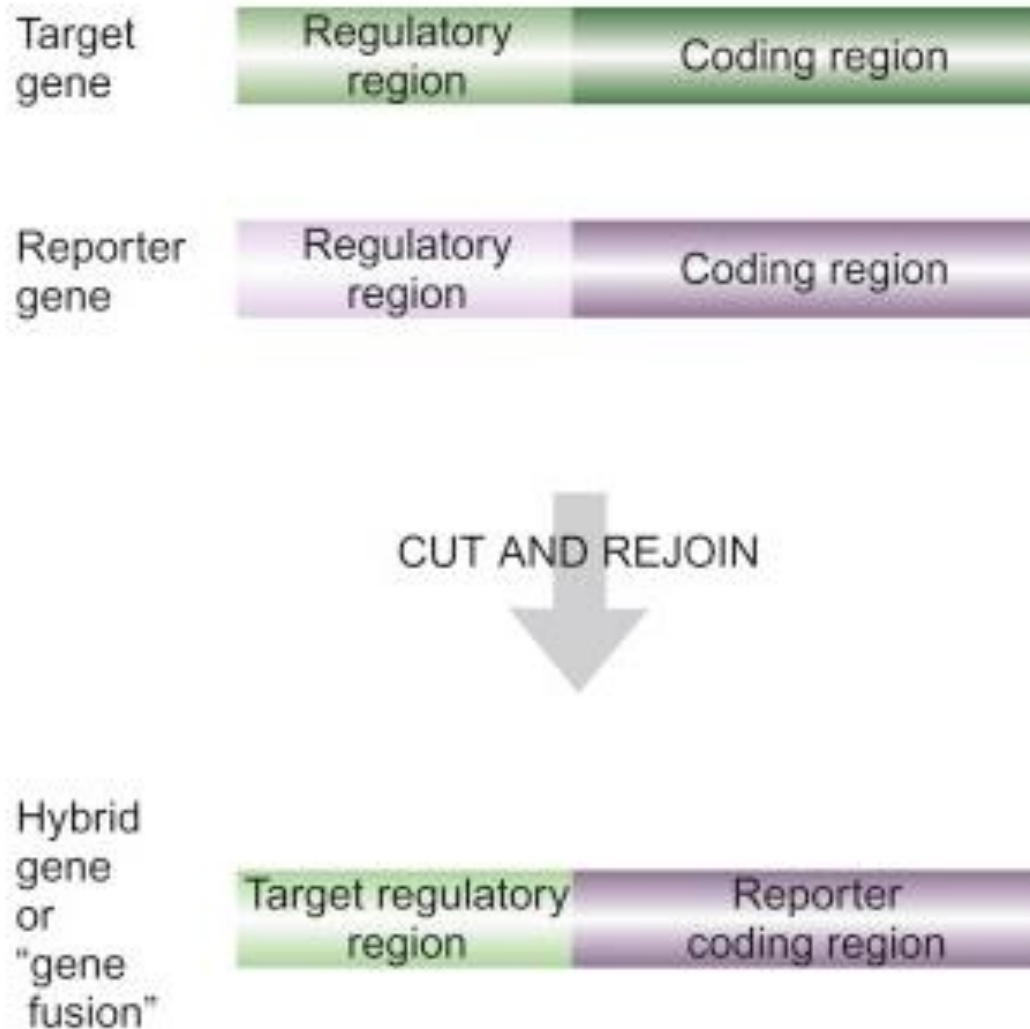
<http://www.michaeleisen.org/blog/wp-content/uploads/2008/10/fps.png>





Reporter Gene Fusions

I geni reporter, utilizzati privi del proprio promotore, dipendono interamente, quanto a specificità e forza, da quella del promotore a cui vengono fusi, come **fusione trascrizionale**



Reporter Gene Fusions



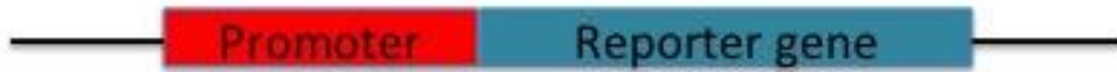
The gene of interest does not have any effect that is easily detected and quantified



The product of reporter gene generates a signal that is easy to detect by luminescence, fluorescence or absorbance

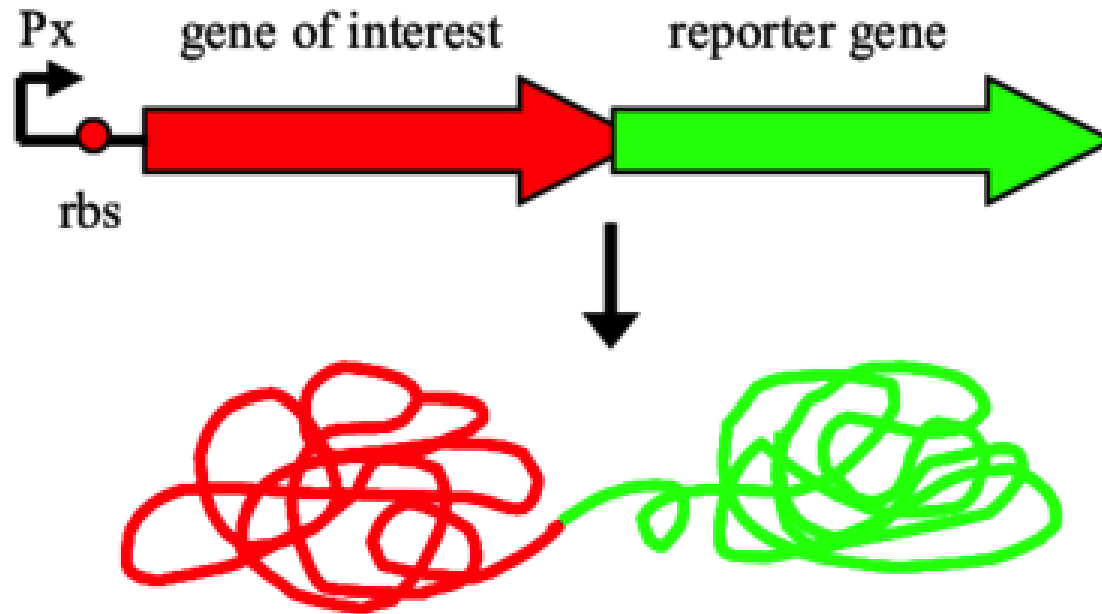


Putting the reporter gene under the control of the promoter of the gene of interest makes it easy to follow how its expression changes in response to different conditions

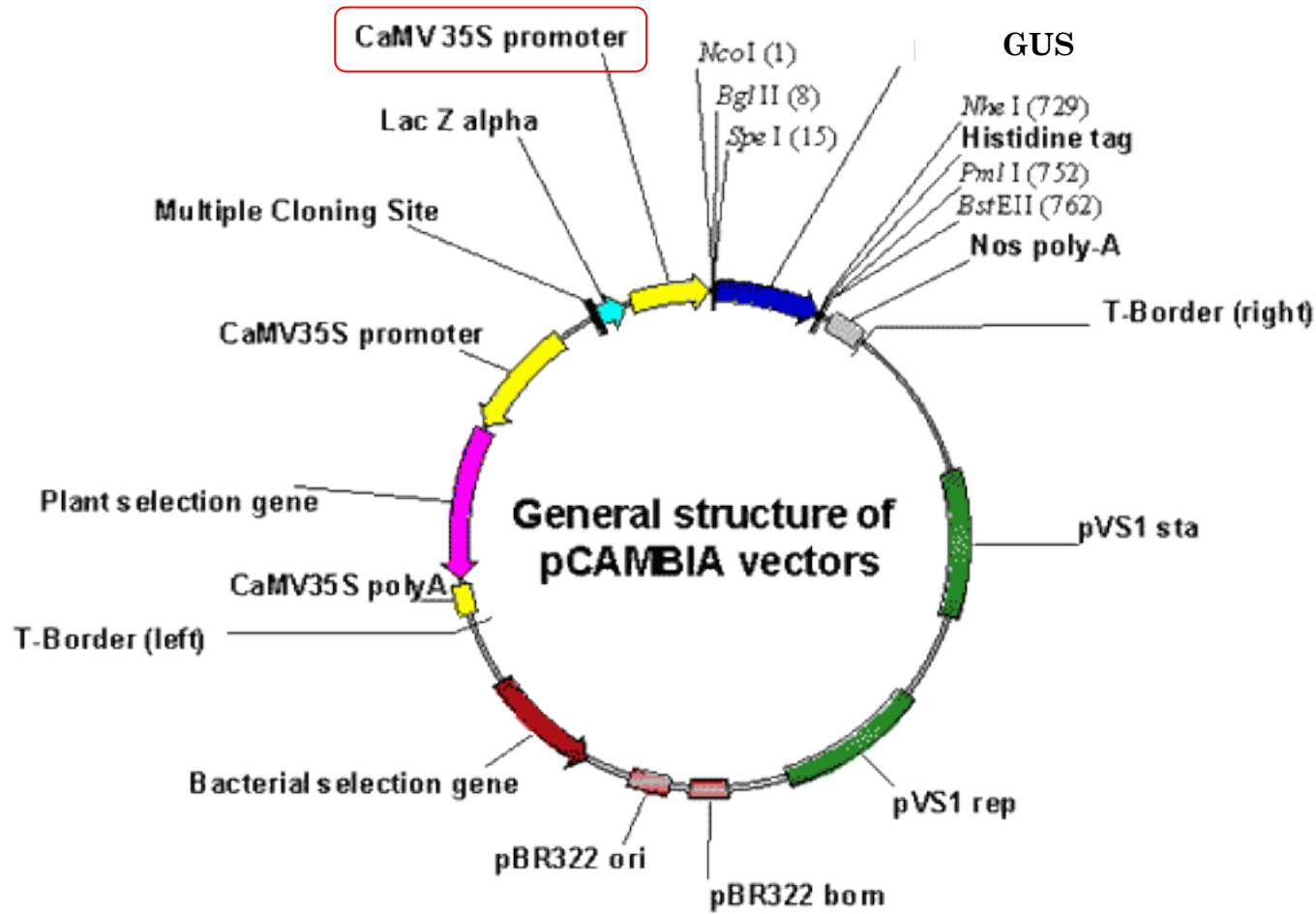


**Prodotto della
reazione enzimatica
colorato o misurabile**

Nel caso di *fusione tradizionale* il gene reporter dipende non solo dal promotore, e dalle sequenze regolative ivi contenute, ma anche dalla sequenza genica ed eventuali sequenze regolative contenute in introni e/o esoni



Fusione tradizionale



pCAMBIA è un vettore binario di circa 10 kb che contiene il gene *uidA* (GUS) privo di promotore. Al suo posto è presente un polylinker dove va clonato il promotore. *uidA* codifica per l'enzima β -glucuronidasi. La reazione avviene in presenza del substrato x-gluc, un β glucuronide che rilascia un composto di colore blu quando idrolizzato.

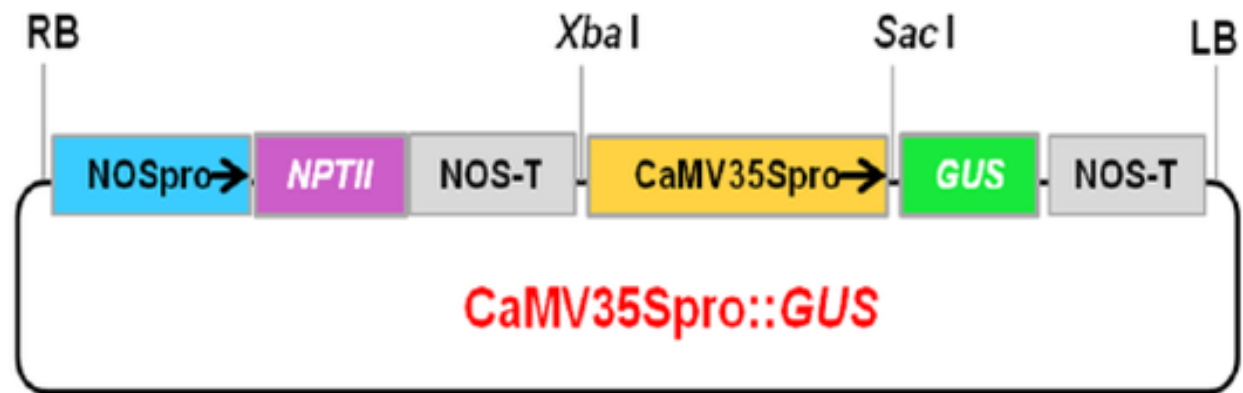
GUS (*uidA*)

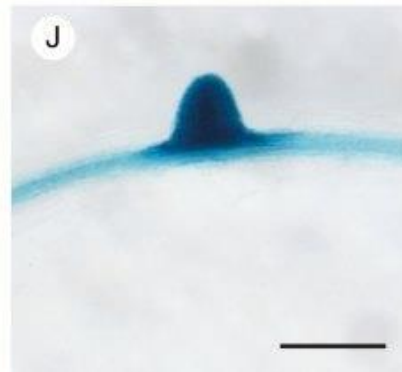
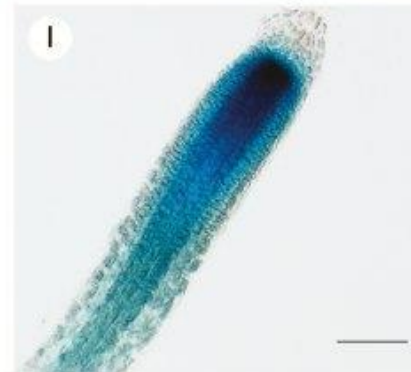
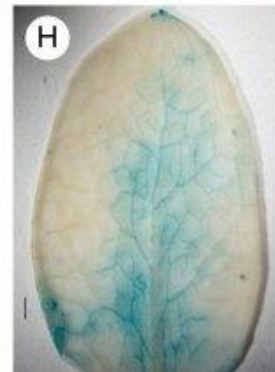
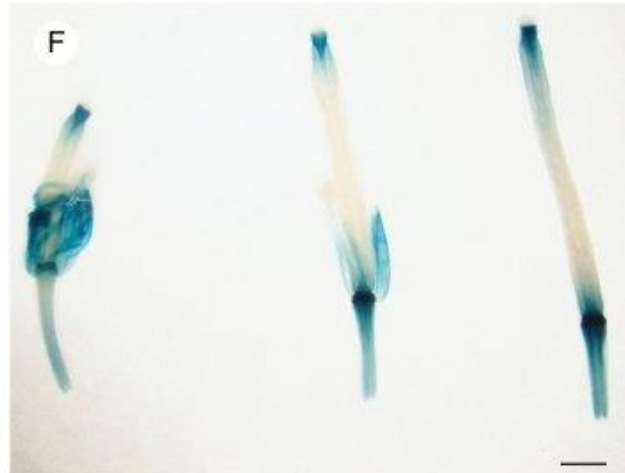
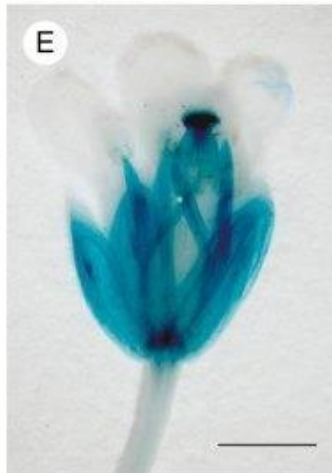
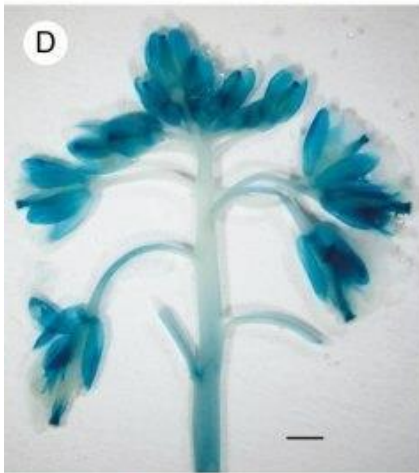
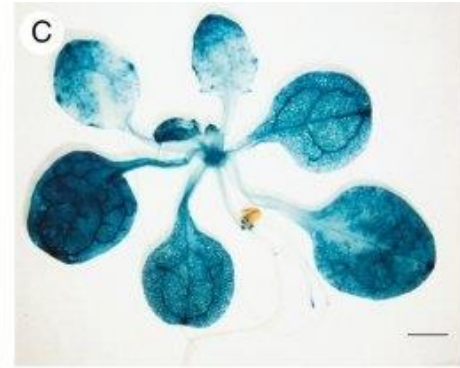
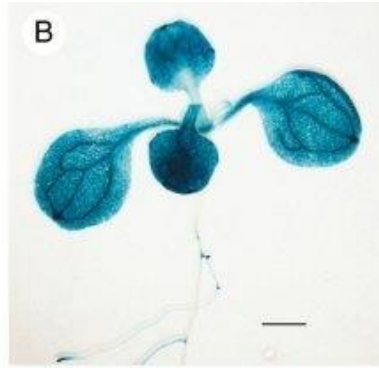
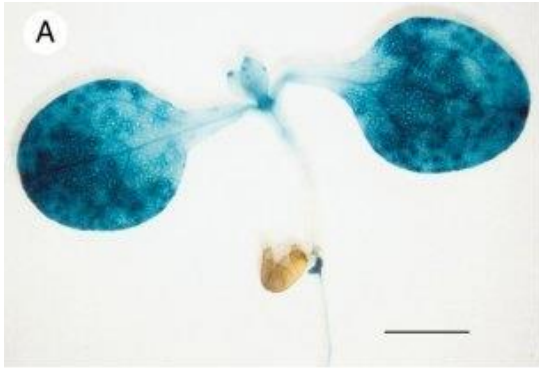
usato principalmente nelle cellule vegetali

analisi istochimiche (qualitative)

fluorimetriche (quantitative)

analisi “**invasiva**”

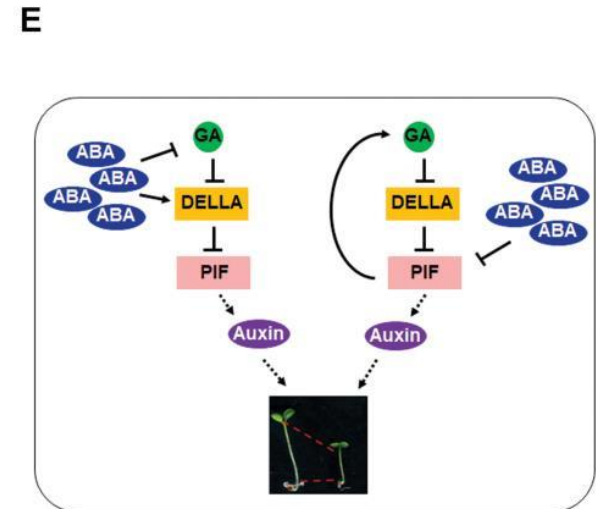
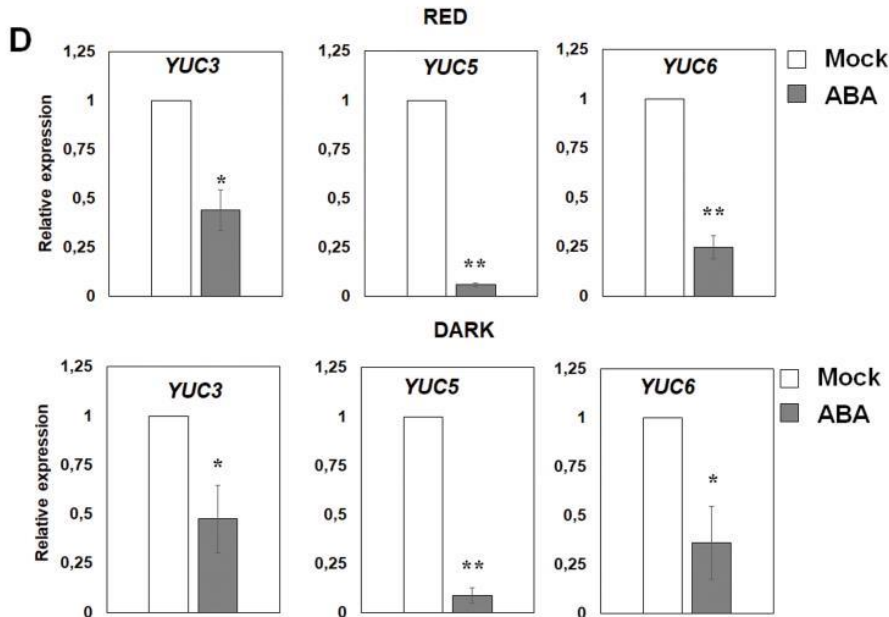
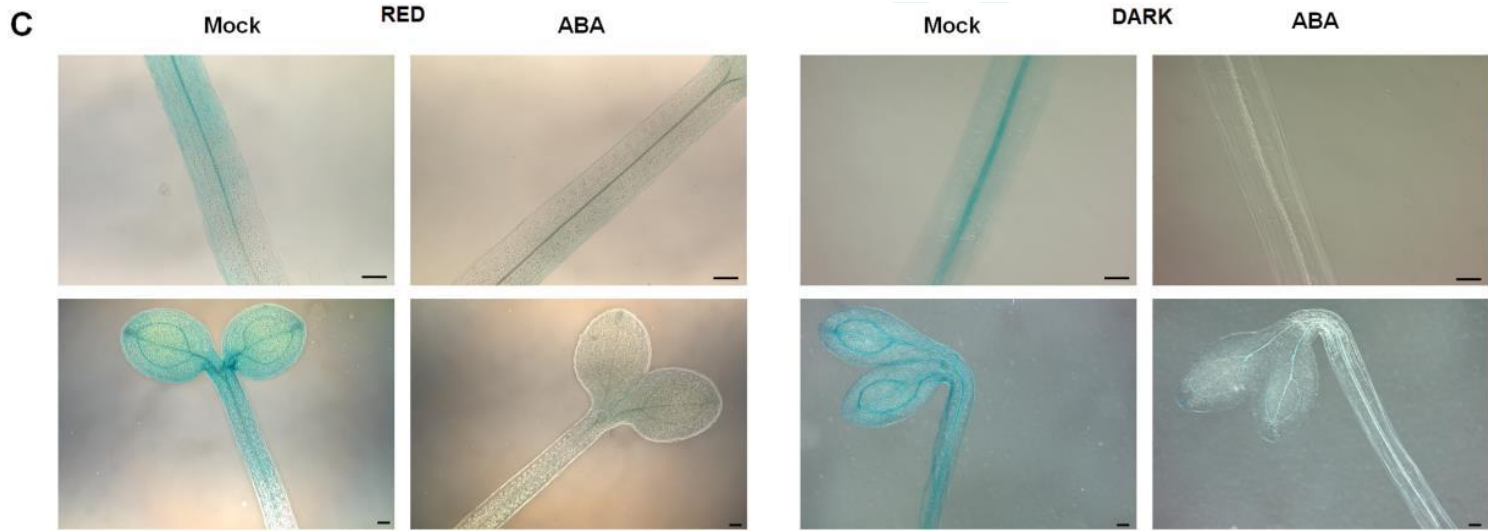




AUX-RE
synthetic promoter

GUS

AUX-RE: Auxin Responsive Element



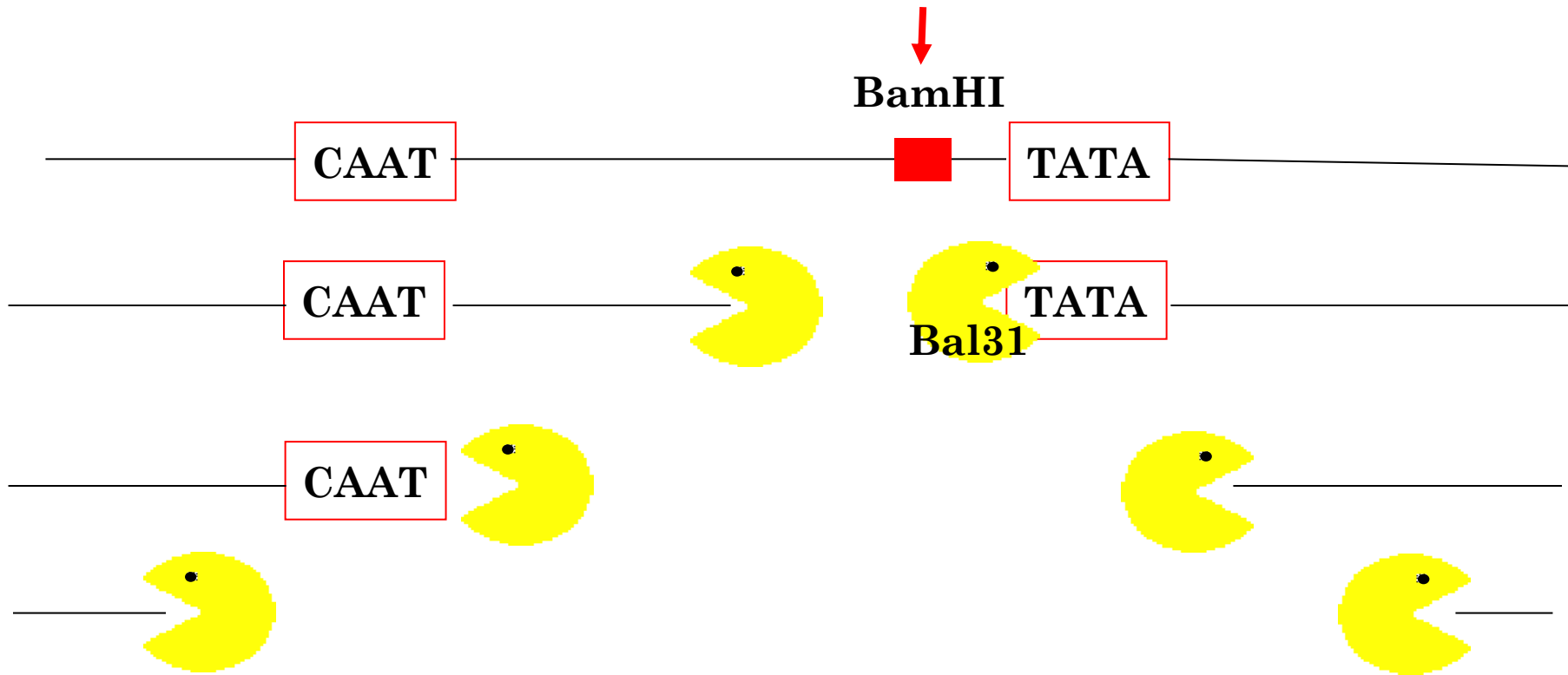
Delezioni con Bal31

L' utilizzo degli enzimi di restrizione per creare delezioni è molto semplice ma limitato dalla presenza di siti di restrizione adatti. Un' alternativa è quella di utilizzare esonucleasi che rimuovono nucleotidi dalle estremità di molecole lineari, come ad esempio **Bal31**, capace di degradare il DNA in modo bidirezionale



Digerendo, per esempio con BamHI e trattando con Bal31 per tempi progressivamente più lunghi e ligando (dopo aver fillato le estremità ed inserito un linker) avremo una popolazione di frammenti deleti

Bal31 catalizza l'idrolisi di DNA a doppia elica, sia a partire dall'estremità 3' che da quella 5'



Trattando con Bal31 per periodi di tempi progressivamente crescenti si ottengono delezioni progressivamente più estese ad entrambe le estremità

Esempio di analisi per delezione di un Promotore con Bal 31

Promotore clonato con enzimi A-B

Digestione con enzima A

Digestione con esonucleasi

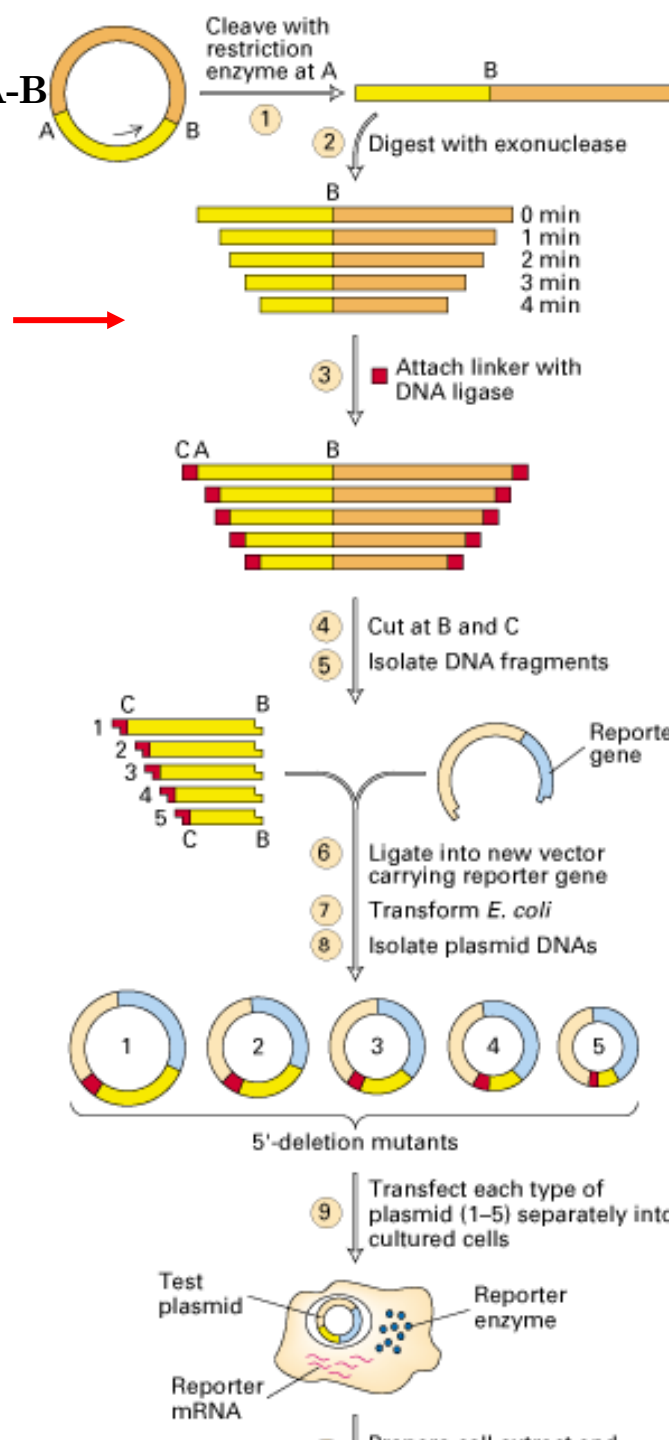
Fill in (Klenow)

Linker C

Digestione con B e C

Isolamento dei frammenti di promotore

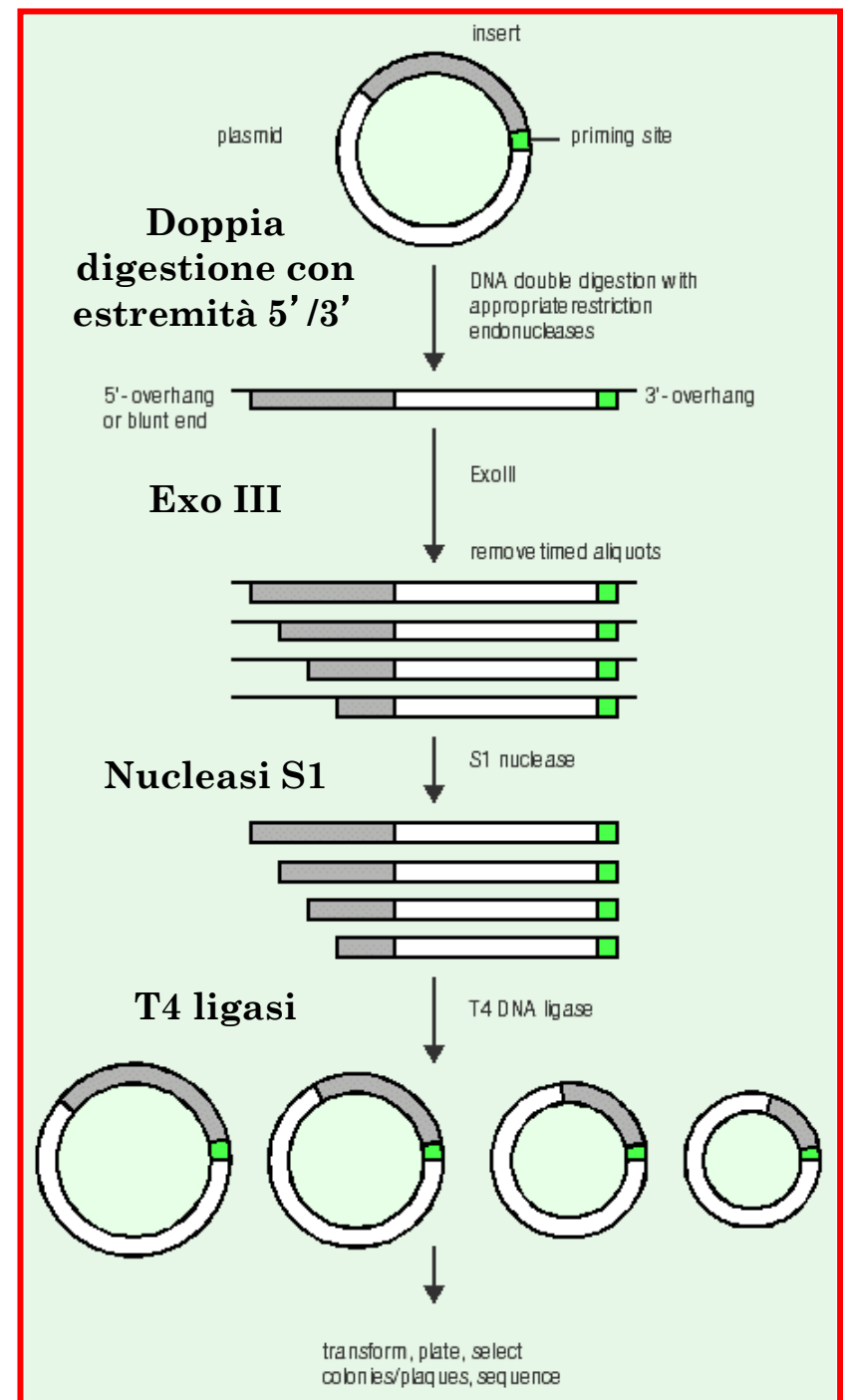
Estrazione ed analisi dei plasmidi: 5 delezioni



Ligazione in un nuovo vettore con gene reporter
Trasformazione di *E. coli*

Trasfezione di ogni plasmide in cellule in coltura

**Con ExoIII,
un'esonucleasi specifica
per le estremità 5'
protruding si producono
delezioni unilaterali**



Ma, nell'era della Genomica, i promotori si studiano anche così.....

PLACE
A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements

What's new? PLACE Web Signal Scan

Signal Scan Search

Homology Search

Keyword Search by SRS

FAQs

Release note, History, Access logs and Updates...

Please enter the sequence in any of the [formats](#) accepted by Readseq and press submit button.
(Here is a [Sample](#) for Copy & Paste).

NOTE: Length of submitting sequence must be less than 4,356. Otherwise, you will get empty result.

Options: GROUP SIGNAL SCAN, LINEAR SIGNAL SCAN or MAP SIGNAL SCAN?

grouped by signal (Output sample)

mapped to sequence scan (Output sample)

by sequence order (Output sample)

Group Signal Scan groups the results of the search by signal, so that all of the signal groups are together. Linear scan lists the different signals present in your sequence as it moves along your sequence. Map scan shows your sequence and displays signals below it. The choice of output produces the same result, the preference is up to you. Note that in map scan, the signals reported begin in your sequences directly above the (+) or (-) symbols (for + or - strand). The first bp of a signal begins directly above the + in (+) strand signals.


If you use this program in published research, please cite:

Higo, K., Y. Ugawa, M. Iwamoto and T. Korenaga (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. [Nucleic Acids Research Vol.27 No.1 pp. 297-300.](#)

Prestridge, D.S. (1991) SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. [CABIOS 7, 203-206.](#)

This Web interface for Signal Scan was kindly provided by Ms. Meena Sakharkar at [Bioinformatics Centre, NUS, Singapore.](#)



Welcome to Promomer! Promomer is a tool for exploring and identifying potential cis-elements within the promoters of your gene or genes of interest. 

Please select the data set you'd like to search in, choose one of the following four options, input the required info, and click on Submit:

- TAIR7_upstream_1000
 TAIR7_upstream_500
 TAIR7_downstream_1000
 TAIR7_downstream_500
 (TAIR6 sets are [here](#); see [TAIR](#) for more info)

1. Identify a statistically over-represented element in your gene of interest

← Enter the AGI ID of your gene of interest.

← Enter the # of base pairs in the element.

← Enter the minimum # of occurrences of the element in your gene.

2. Identify a statistically over-represented element in a group of genes

Enter the AGI IDs of your genes of interest, each on a new line

← Enter the # of base pairs in the element.

← Enter the minimum percentage of genes in which the identified element should occur.

3. Identify genes in the genome that contain my element of interest

← Enter the element (2-10 bp). Wobbles in any position are allowed.

Please indicate the wobble using any of the following standard IUPAC wobble codes:

M A or C **V** A or C or G **X** A or C or G or T
R A or G **H** A or C or T
W A or T **D** A or G or T
S C or G **B** C or G or T
Y C or T
K G or T

4. Identify your element of interest in a group of genes

Enter the AGI IDs of your genes of interest, each on a new line

← Enter the element (2-10 bp). Wobbles in any position are allowed.

Please indicate the wobble using any of the following standard IUPAC wobble codes:

M A or C **V** A or C or G **X** A or C or G or T
R A or G **H** A or C or T
W A or T **D** A or G or T
S C or G **B** C or G or T
Y C or T
K G or T

Plant CARE

Plant CARE
cis-Acting Regulatory Element



This web site and its data can be used freely by Academic users.
For more details see the [data access agreement](#)

In exchange we would appreciate if those having nice data resulting from experiments after usage of the database would [submit it to our database](#) and share it with everyone.

For non-Academic users please read the [terms of usage](#) or [contact us](#).

A referential database with:

435 different names of plant transcription sites

- 149 from monocots
- 281 from dicots
- 5 from other plants

describing more than 159 plant promoters

The possibility to store all plant transcription sites, consensus and matrices described in the literature into the database

Run sophisticated queries on the data, like looking for sites linked to a specific function,...

Submitting a sequence to a program which will look for transcription sites known by PlantCARE

PlantPAN 3.0



The Plant Promoter Analysis Navigator (PlantPAN; <http://PlantPAN.itps.ncku.edu.tw>) provides an informative resource for detecting transcription factor binding sites (TFBSs), corresponding TFs, and other important regulatory elements (CpG islands and tandem repeats) in a promoter or a set of promoters in plants. The current PlantPAN release (version 3.0) contains 17,230 TFs and 4,703 matrices of TF binding sites among 78 plant species.

For optimal use of this database, we recommend to use Google Chrome or Firefox browser and above at 1680 x 1050 resolution. [Other resolution](#)
Notification: PlantPAN system will shut down on February 26th - March 1st 2021 (GMT+8) due to scheduled maintenance.

★★★★★ PlantPAN 3.0 TF position weight matrix download is available. ★★★★★

[Go To Download](#)

Citation:

Chi-Nga Chow, Tzong-Yi Lee, Yu-Cheng Hung, Guan-Zhen Li, Kuan-Chieh Tseng, Ya-Hsin Liu, Po-Li Kuo, Han-Qin Zheng, and Wen-Chi Chang "PlantPAN3.0: a new and updated resource for reconstructing transcriptional regulatory networks from ChIP-seq experiments in plants" *Nucleic Acids Res.* 2019.

Gene Search



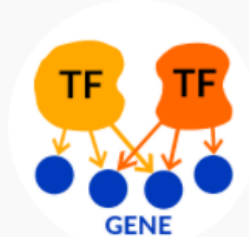
1. Identification of cis- and trans-elements of input gene.
2. Construction of gene regulatory networks by using coexpression analysis.

TF/TFBS Search



Access TF/TFBS information by ID, matrix, and keyword search (or browse by TF family and species)

Gene Group Analysis



1. Determine co-occurrence TF and their binding sites within the promoters of input gene group.
2. Regulatory network construction of co-occurrence TFs based on protein-protein interaction.

Promoter Analysis



TFBS scanning in the promoter sequence.

Cross Species



Search conserved TFBSs in promoters of similar genes or user-customized promoter pairs.

ChIP-seq Search



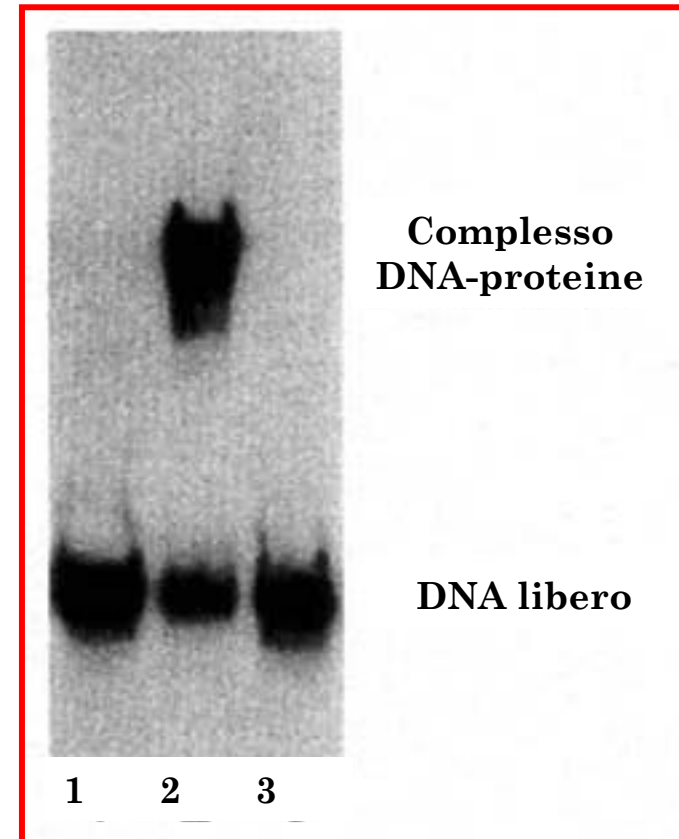
A resource that collects and utilizes plant ChIP-seq experimental data derived from GEO and SRA under various conditions to infer transcription binding sites.

Saggio di ritardo elettroforetico (EMSA)

Per **verificare** la presenza di una regione di legame al DNA uno dei metodi più immediati è quello noto come gel shift o **EMSA** (electrophoretic mobility shift assay) o gel di ritardo elettroforetico.

E' una tecnica semplice con un potere di risoluzione modesto. Consiste nella preparazione di un estratto nucleare/proteina che viene incubato, in vitro, con un frammento marcato contenente la putativa regione di legame (sonda).

Se una o più proteine dell'estratto si legano al frammento di DNA marcato, la sua mobilità elettroforetica in un gel di poliacrilammide diminuirà. Il ritardo elettroforetico viene evidenziato comparando la mobilità elettroforetica del frammento sonda.



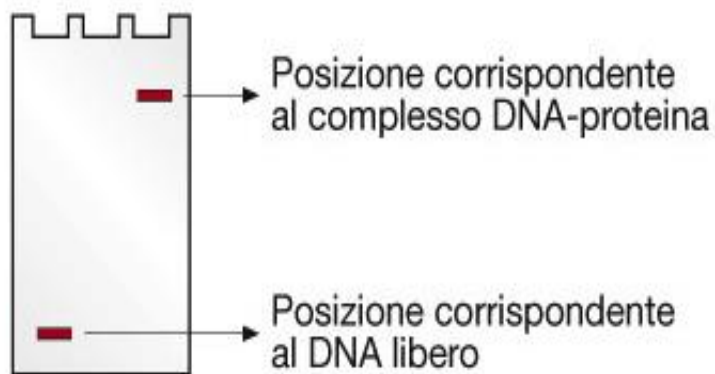
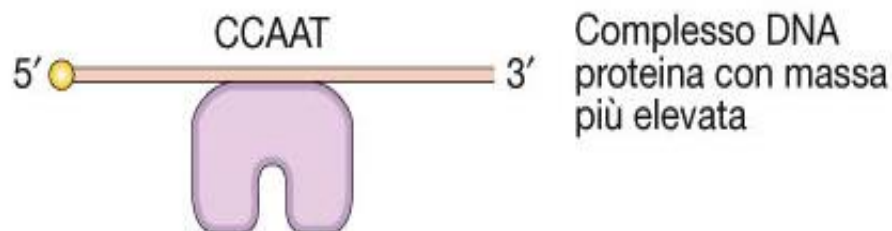
Esperimenti di controllo:

Competitori freddi specifici:

la presenza dello stesso frammento di DNA target non marcato ridurrà il segnale in quanto il frammento freddo competerà con quello marcato

Competitori freddi aspecifici: la presenza di un qualsiasi frammento di DNA non target non marcato non modificherà il segnale in quanto il frammento non competerà con quello marcato

Mutazione della sequenza: se si conosce l'esatta sequenza di legame la si può modificare per verificare se il legame è specifico per quella sequenza

A

Autoradiografia dopo elettroforesi su gel

B

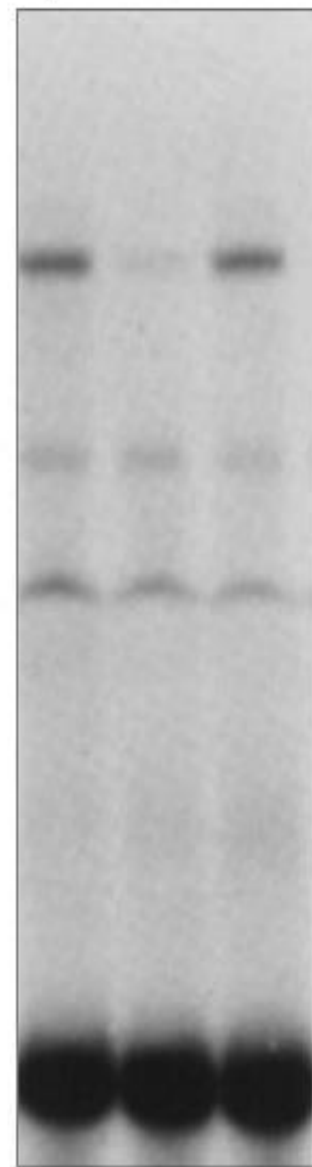
DNA competitore (100x)

Niente CCAAT CCGAT

Complesso DNA proteina specifico

Complessi DNA-proteina aspecifici

Segmento di DNA radioattivo libero



Esperimenti di controllo:

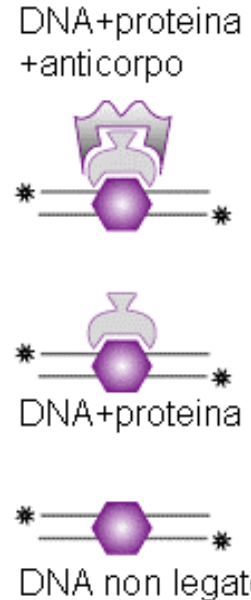
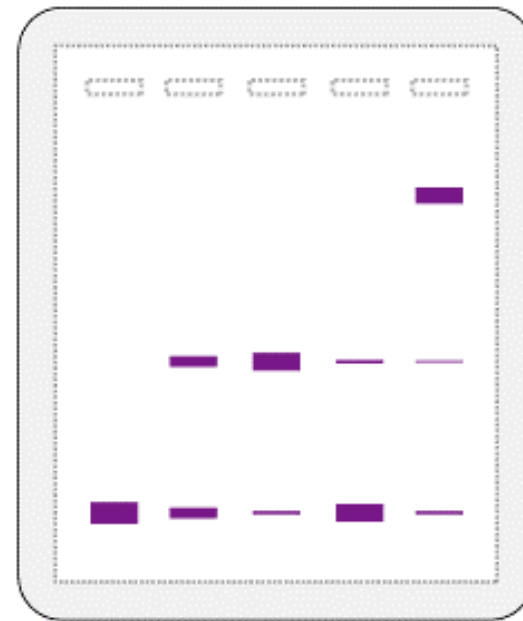
Competitori freddi specifici:

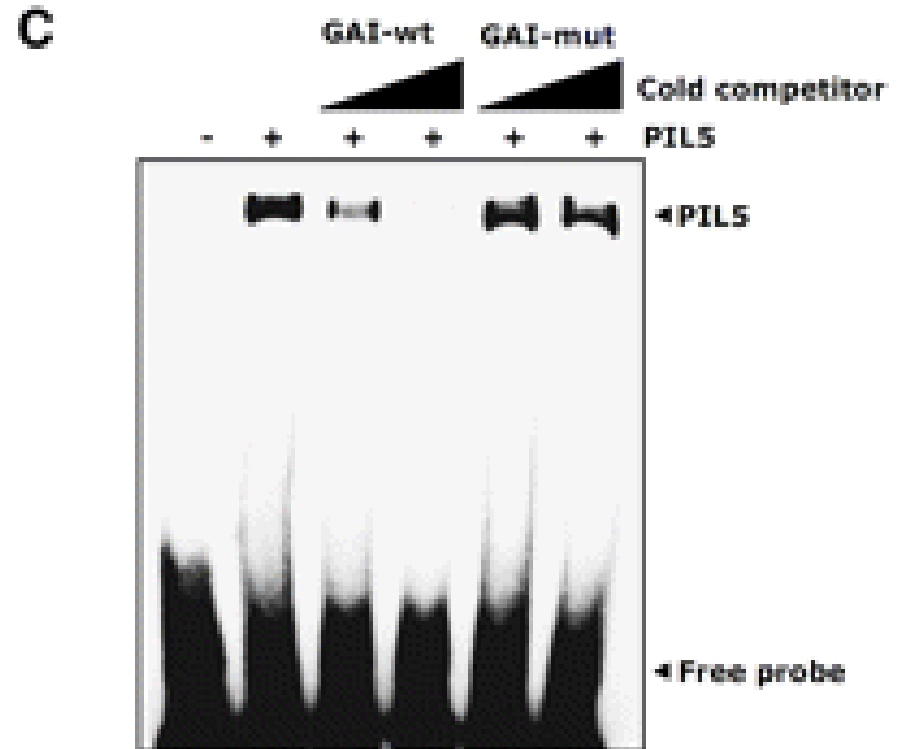
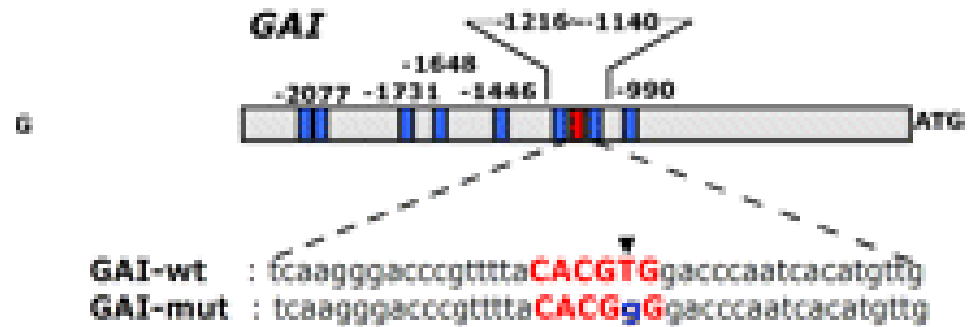
la presenza dello stesso frammento di DNA target non marcato ridurrà il segnale in quanto il frammento freddo competerà con quello marcato

Anticorpo:

Incubando ulteriormente la nostra miscela proteina/DNA con l' anticorpo specifico, questo si legherà alla proteina. Se, a sua volta questa era legata al DNA, risolvendo per elettroforesi, il segnale radioattivo apparirà ulteriormente ritardato (**supershift**)

anticorpo specifico	-	-	-	-	1x
oligo non marcati	-	-	-	10x	-
proteina	-	1x	10x	1x	10x
DNA	1x	1x	1x	1x	1x





Esperimenti di controllo:

Probe mutato: la sequenza di DNA target viene mutata in uno o più nucleotidi

Se:

- l'analisi del promotore ha rivelato una regione di controllo
- la sequenza di legame di tale regione non è nota in banca dati
- l'analisi EMSA con estratti nucleari ha confermato la presenza di un'interazione DNA-proteina/e

ALLORA

Screening per identificare il/i fattore/i

- South-Western
- One-hybrid

Ricapitolando...

Analisi attività promotore YFG

fusione trascrizionale/traduzionale Promotore::Reporter
 trasformazione cellule/organismo
 analisi espressione

Caratterizzazione Promotore YFG (dissezione)

delezioni progressive del Promotore
 trasformazione cellule/organismo
 analisi espressione
 identificazione domini regolativi

Studio *in vitro* dell'interazione TF (trans)-Binding Site (cis)

EMSA con estratti proteici e dominio regolativo marcato (sonda)
 identificazione/isolamento del TF (South western – One hybrid)
 identificazione della sequenza riconosciuta/legata dal TF (Footprinting)

Studio *in vivo* Chromatin Immuno Precipitation

South Western

Per identificare il TF che lega la sequenza regolativa di interesse

In Escherichia coli

Abbiamo identificato una regione regolativa e verificato che nell'estratto nucleare esiste una proteina che la lega. Vogliamo clonare il gene che la codifica. In questo caso lo screening viene effettuato impiegando un oligonucleotide a doppia elica marcato radioattivamente, la cui sequenza contiene la sequenza di controllo identificata.

Si usa una **libreria di espressione**.

La libreria si piastra ad alta densità e si induce l'espressione dei cDNA clonati.

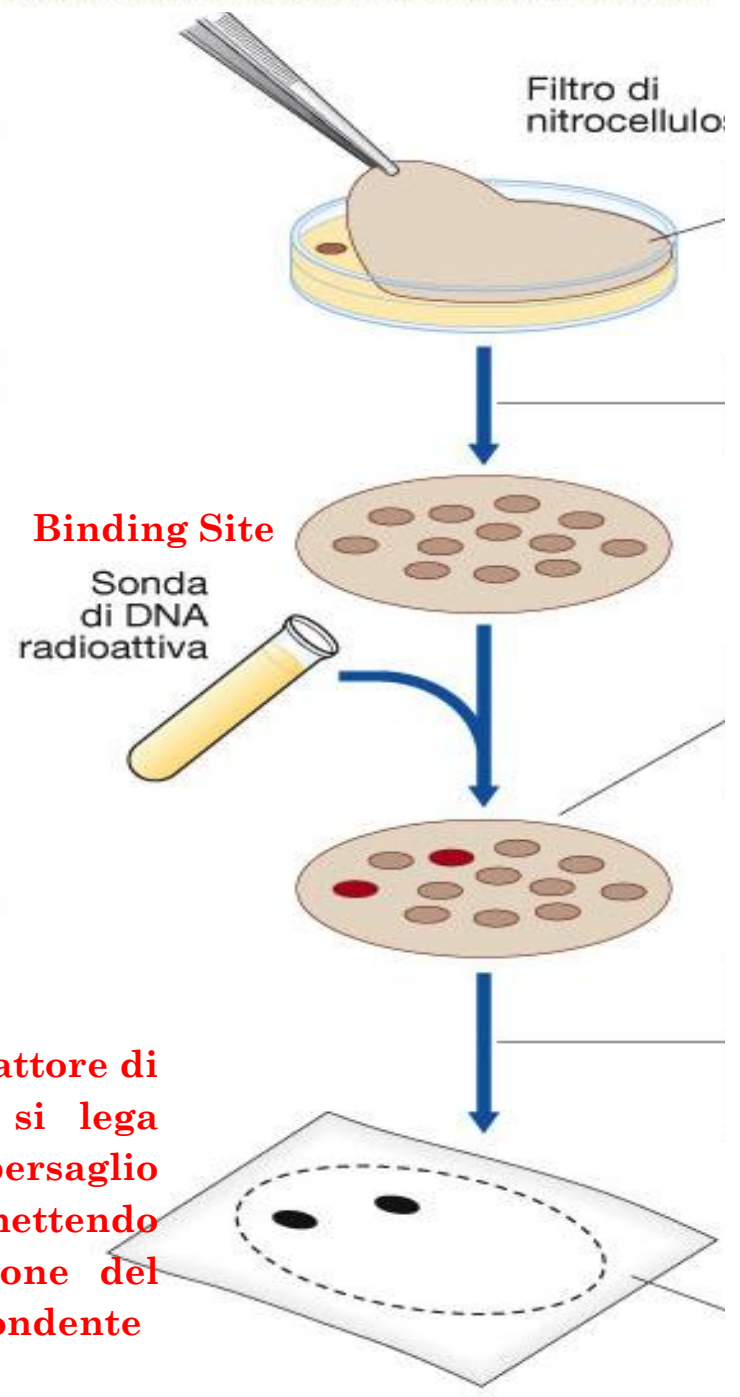
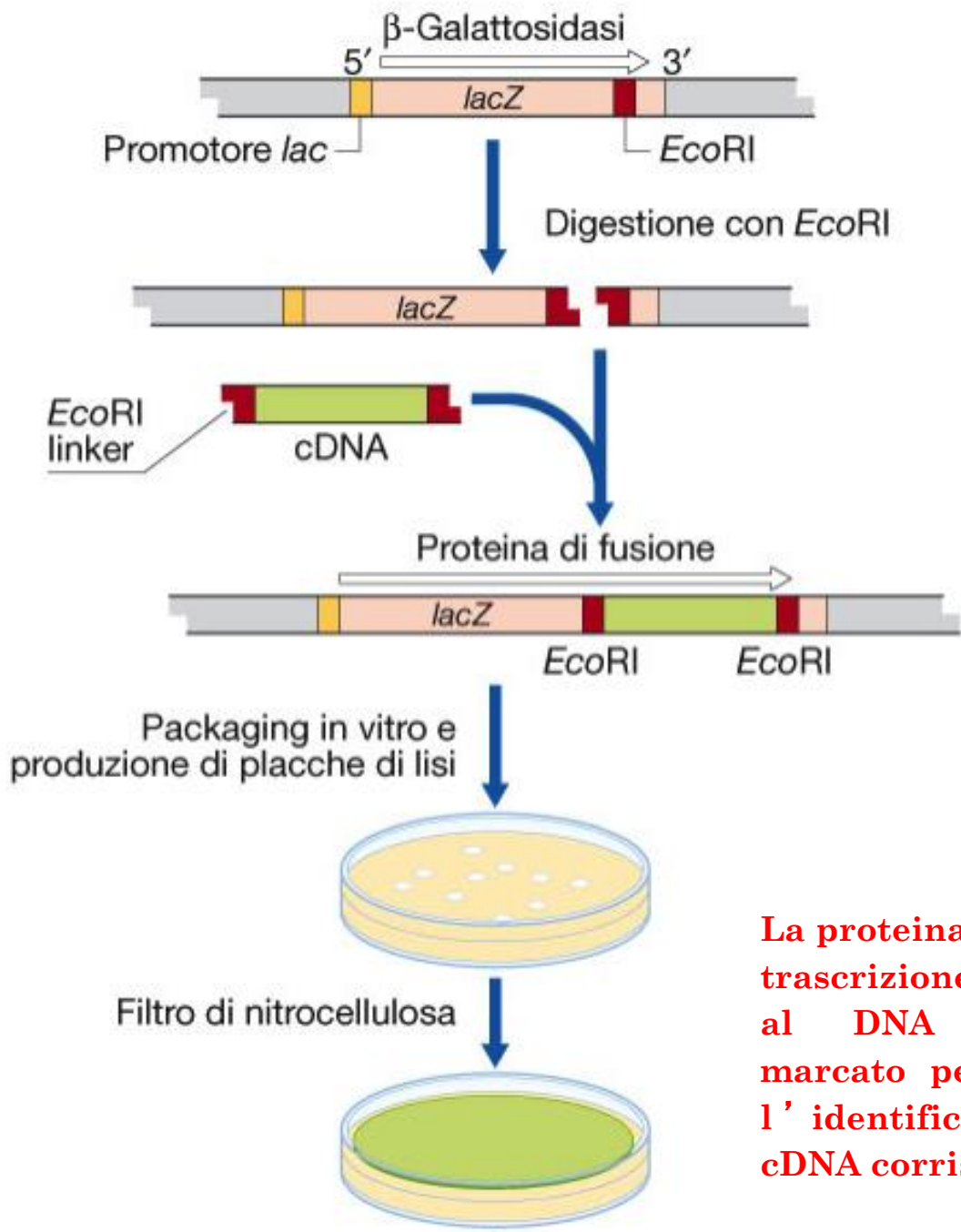
La libreria non si analizza con gli anticorpi ma **con una sonda a DNA**.

La sonda a DNA non si ibriderà con un bersaglio a DNA ma andrà ad **interagire con una proteina**.

La regione di DNA che si lega al fattore viene marcata radioattivamente e viene ibridata con la libreria espressa in condizioni di legame.

Troubleshooting:

- condizioni di legame (necessità di cofattori...)
- cDNA non integro (manca del BD) o non in frame



La proteina (fattore di trascrizione), si lega al DNA bersaglio marcato permettendo l'identificazione del cDNA corrispondente

One-Hybrid

Per identificare il TF che lega la sequenza regolativa di interesse In *Saccharomyces cerevisiae*

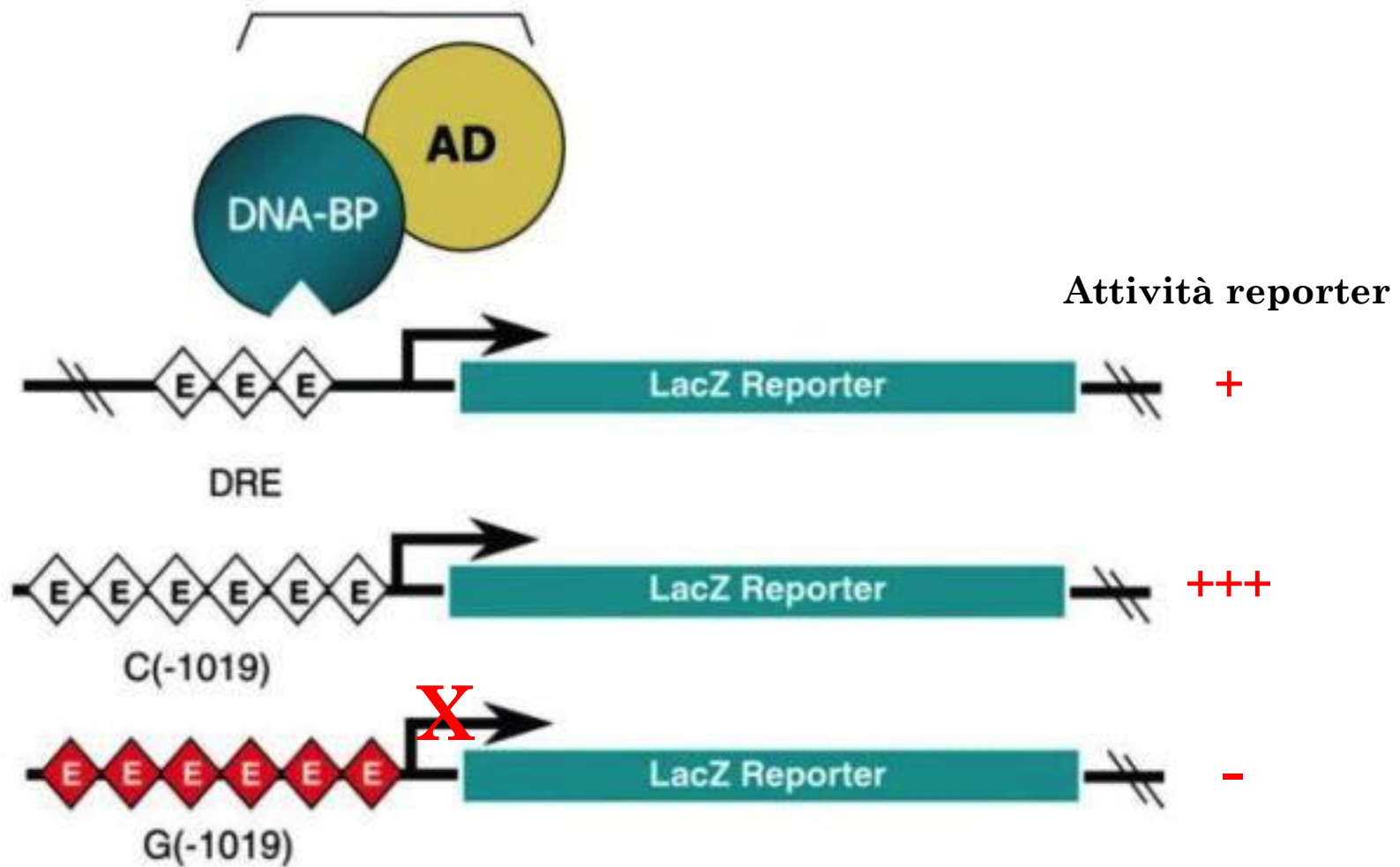
Si realizza un costrutto in cui il gene “reporter” è posto sotto il controllo della regione regolativa di interesse rappresentata da almeno 3 ripetizioni della sequenza di legame (copie multiple della sequenza di legame aumentano la sensibilità e la specificità dell’ analisi).

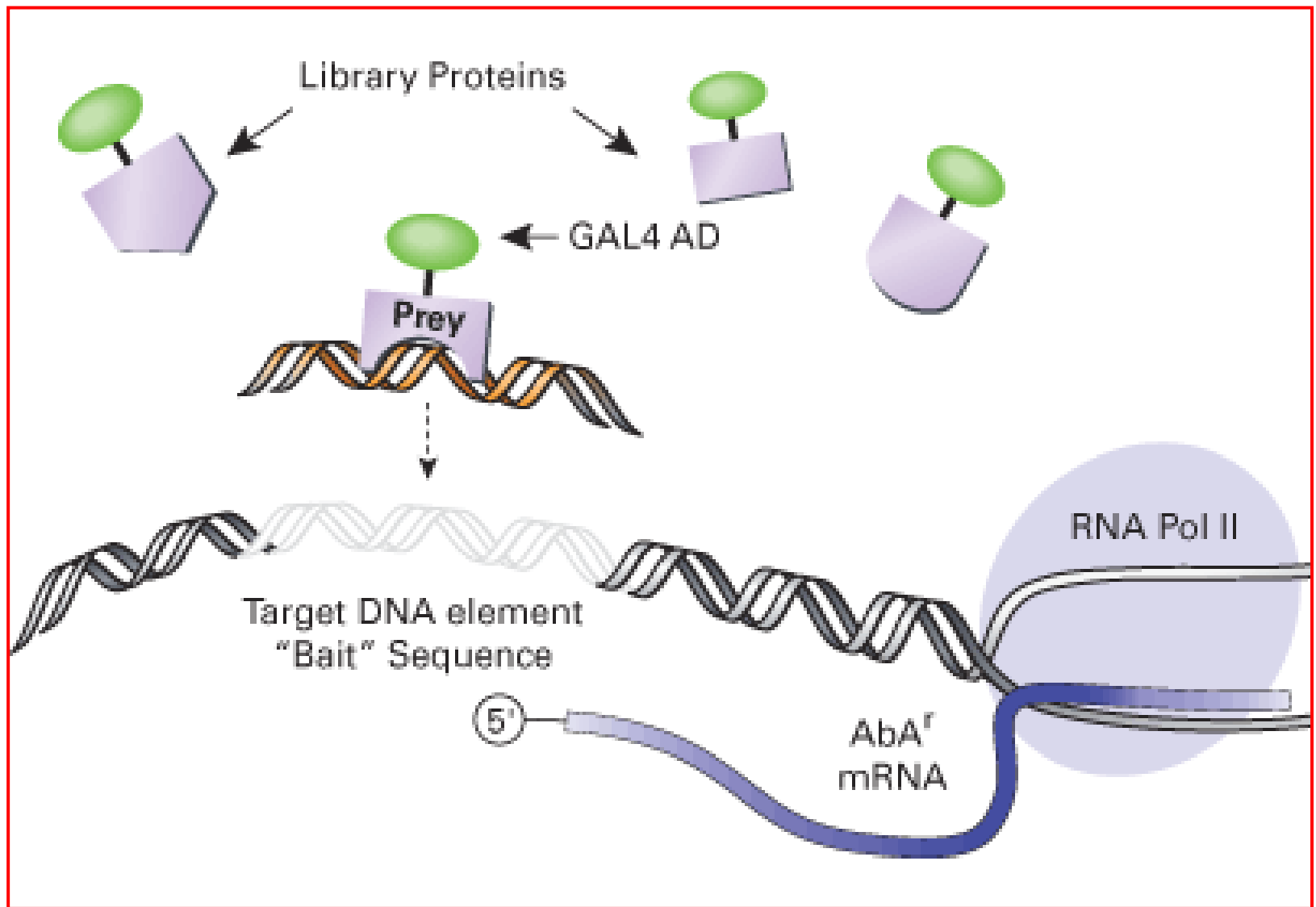
Si usa una libreria d’espressione prodotta con i cDNA in fusione traduzionale con l’ Activation Domain (AD) di GAL4.

Normalmente vengono usati più di un gene reporter, uno per screening colorimetrico (lacZ) e uno per auxotrofia (His). La prima selezione è fatta su terreno minimo, i cloni che crescono sono poi testati per l’attività galattosidasi.

Poi si estrae il DNA del clone positivo per ritrasformare il ceppo di lievito (controllo). I cloni positivi sono poi sequenziati anche per verificare che l’ ORF del cDNA positivo sia **in frame con GAL4-AD**.

Libreria di cDNA fusa con GAL4-AD





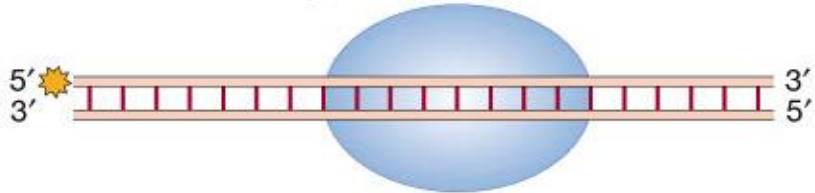
**A questo punto per definire esattamente
la sequenza di legame sul DNA.....**

FOOTPRINTING

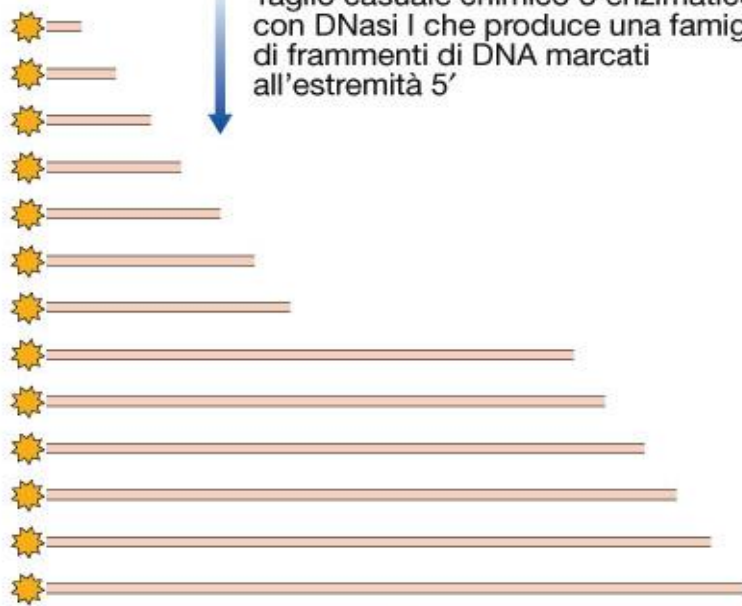
DNA footprinting

Il DNA footprinting è una tecnica che riesce a determinare **l'esatta posizione sul DNA di una proteina legata**. Un frammento di DNA, che si presume contenga una regione di legame, viene marcato terminalmente, incubato con la proteina in esame, e digerito parzialmente con la DNasi I. L'eventuale legame alla proteina proteggerà la regione di legame dalla degradazione endonucleasica.

A Regione di DNA protetta dal legame con una proteina



Taglio casuale chimico o enzimatico con DNasi I che produce una famiglia di frammenti di DNA marcati all'estremità 5'

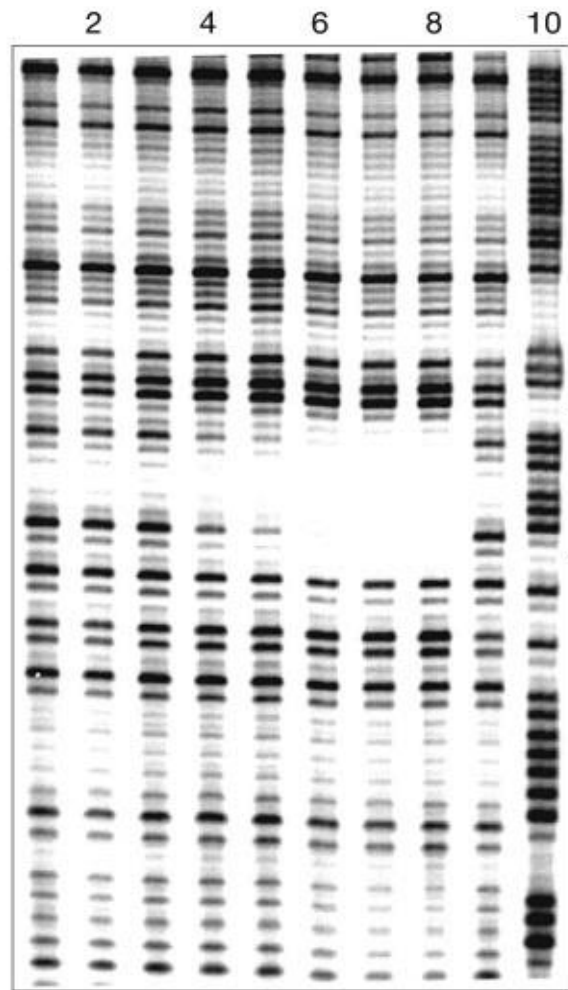


Separazione mediante elettroforesi su gel

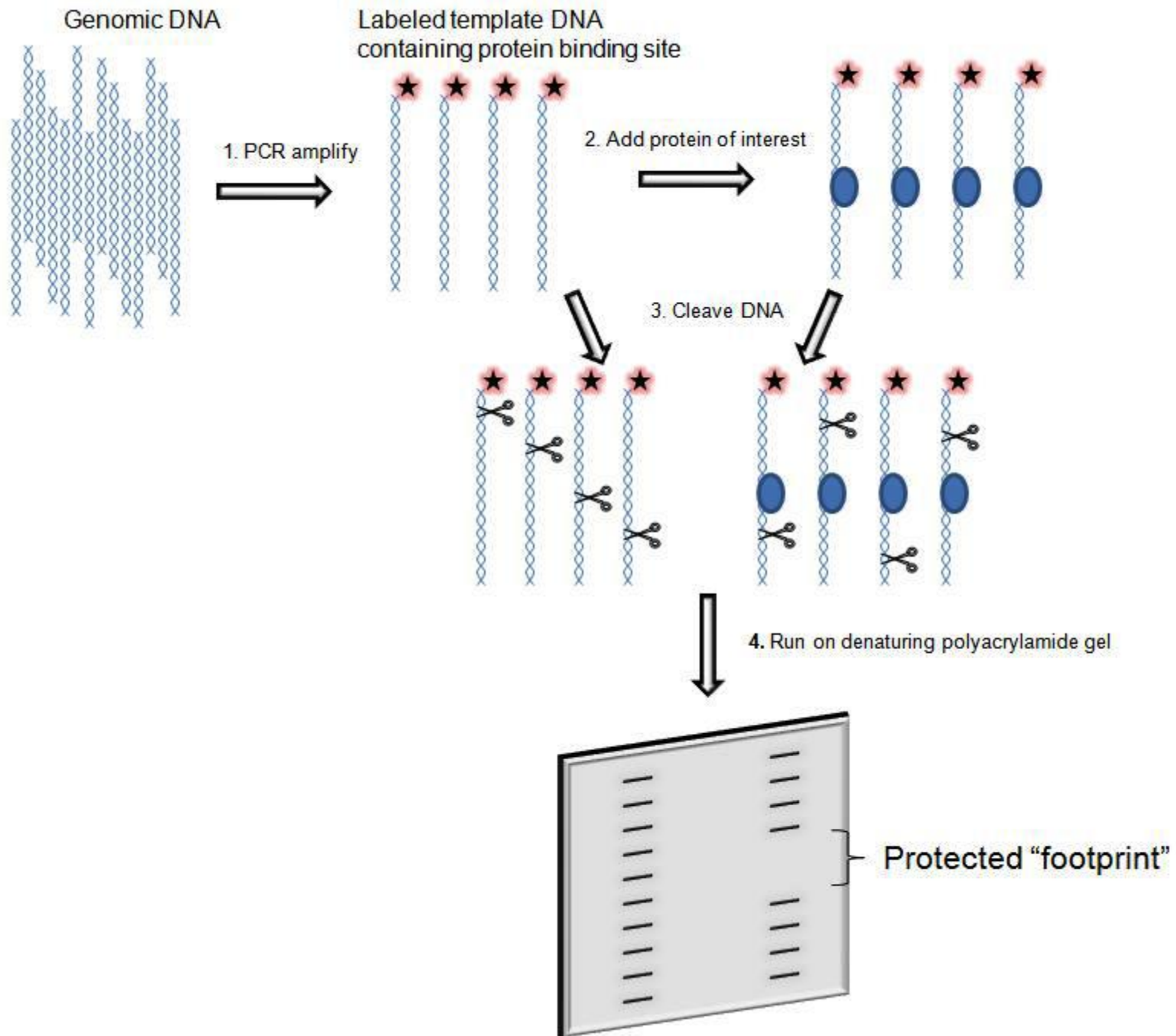


Regione dove non si osservano frammenti di DNA marcati perché protetta dal legame della proteina

B



Zona del "footprint"



E poi....analisi *in vivo*

ChIP

Chromatin Immunoprecipitation