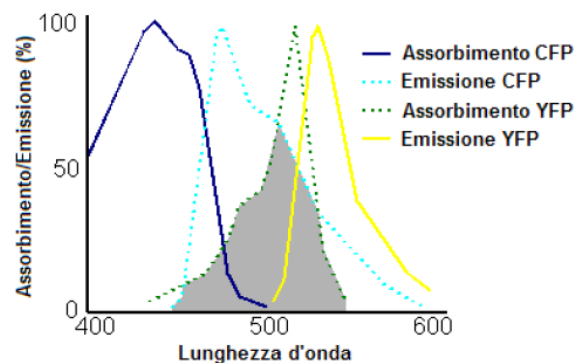


Single cell techniques

Parleremo di sonde basate sulla FRET.

La FRET (fluorescence resonance energy transfer) è il trasferimento di energia per risonanza, che avviene tra due molecole fluorescenti, l'*accettore* ed il *donatore*. Il donatore e l'accettore devono essere ad una breve distanza perché ci sia la fluorescenza FRET. Il donatore viene eccitato da una radiazione elettromagnetica ad una determinata lunghezza d'onda, che è quella di assorbimento del donatore. Il donatore eccitato emette una radiazione luminosa ad una lunghezza d'onda diversa da quella di assorbimento. La luce emessa dal donatore è ad una lunghezza d'onda parzialmente sovrapposta alla lunghezza di assorbimento dell'accettore, che in questo modo viene eccitato. L'accettore eccitato emette una luce ad un'altra lunghezza d'onda, specifica per la molecola accettore, che viene rilevata.



Gli spettri di assorbimento e di emissione di *Cyan Fluorescent Protein* (rispettivamente in blu e azzurro) e di *Yellow Fluorescent Protein* (in verde e giallo). In grigio è evidenziata la regione di sovrapposizione tra l'emissione di BFP e l'assorbimento di YFP

FRET nel lievito

Quando cellule di lievito sono mantenute in coltura in un terreno in assenza di glucosio, all'aggiunta di glucosio si osserva l'aumento del livello di cAMP e viene attivata la PKA.

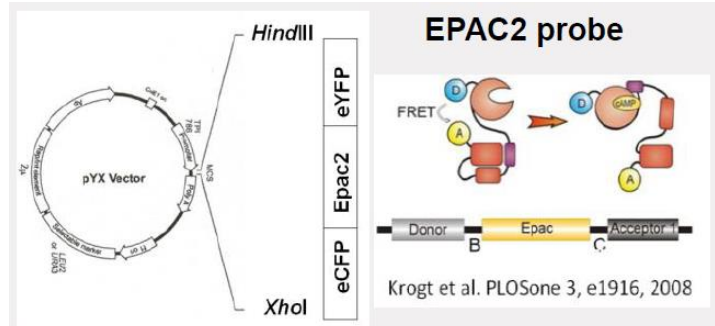
Elemento centrale del pathway di trasduzione è la adenilato ciclasi, codificata dal gene *Cyr1*. Questa proteina è attivata dalla proteina *Gpa2* e dalle proteine *RAS1* e *RAS2*. Le proteine *RAS* sono piccole GTPasi che si alternano tra uno stato attivo quando sono legate al GTP, ed uno stato inattivo quando sono legate a GDP.

L'aumento della quantità di glucosio-6-fosfato nella cellula attiva *Cdc25*, che attiva *RAS*.

Le proteine *RAS* legate al GTP sono attive e legano l'adenilato ciclasi attivandola. L'adenilato ciclasi sintetizza cAMP a partire da ATP. Il cAMP lega le subunità regolatorie della *proteina inibitore delle chinasi cAMP dipendente* *Bcy1* che si dissociano dalle subunità catalitiche della PKA, che in lievito sono *Tpk1*, *Tpk2* e *Tpk3*. Queste subunità attive fosforilano una serie di bersagli a valle, con vasti effetti sulla cellula.

Sonda EPAC2 per dosare cAMP

La sonda EPAC2 è una sonda FRET che permette di dosare il livello di cAMP intracellulare. La sonda EPAC2 è composta dalla sequenza Epac2, che è una GEF (guanosine exchange factor) di mammifero, fiancheggiata dalla eCFP che è il donatore, e da eYFP che è l'accettore. Questo gene di fusione codifica per una proteina di fusione ed è clonato in un vettore pYX, che è un vettore episomico 2μ presente in molte copie all'interno della cellula. Questo gene è posto sotto il controllo di un promotore forte e costitutivo, che è il TPI.



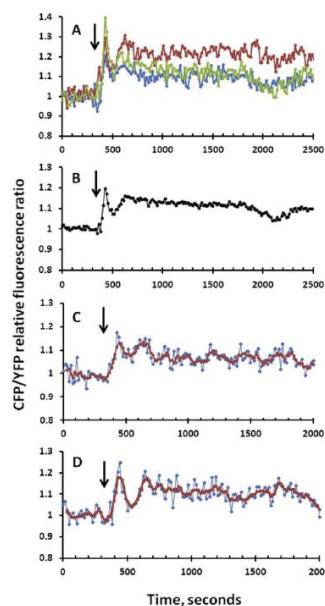
In assenza di cAMP la proteina di fusione è in una conformazione tale per cui donatore ed accettore sono molto vicini, quindi si ha FRET.

Quando il cAMP si lega ad

Epac si ha una modificazione conformazionale che allontana donatore ed accettore determinando una diminuzione della FRET.

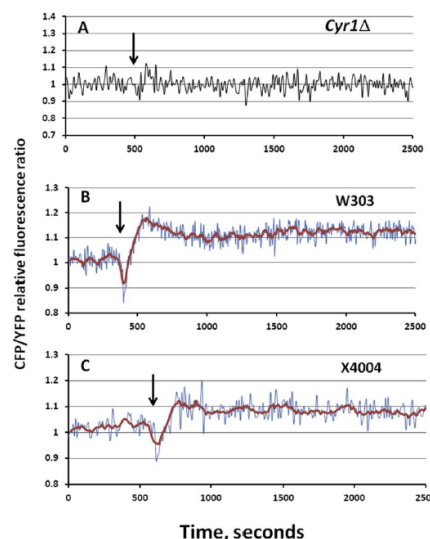
Questa sonda è stata utilizzata anche in *S.cerevisiae* dimostrando che effettivamente l'aggiunta di glucosio a cellule private di glucosio causa l'aumento del rapporto ciano/giallo, che indica una diminuzione della FRET e l'aumento della emissione da parte del donatore

È sempre importante fare dei controlli per essere sicure di avere un risultato effettivo e riproducibile. In questo caso il controllo usato è un ceppo mutante in cui si ha una delezione dell'adenilato ciclasi, ceppo *Cyr1Δ*. (nota che la scala in Y dei controlli è diversa (perché?) e che il grafico *Cyr1Δ* è simile a quello di X4004, seppur con un plateau più ridotto). Il ceppo *Cyr1Δ* è vitale solo insieme ad altre mutazioni accessorie, quali *pde2Δ*, *msn2Δ* e *msn4Δ*.



The arrows indicate the time of glucose addition. The relative fluorescence ratio was normalized to the value of one for cells before the glucose addition.

- A) Signals of three single yeast cells;
- B) Mean of the relative fluorescence ratio of 15 single yeast cells;
- C-D) Raw signals of two yeast cells (blue lines with small squares). The red thick line represents the moving average values ($n \approx 4$) of the raw data.



The arrows indicate the time of glucose addition;

- A. Relative fluorescence ratio for a single GG104 cell bearing a **deletion of adenylate cyclase** (*cyr1Δ pde2Δ msn2Δ msn4Δ*);
- B-C. Raw signals (blue lines) for a single W303-1A and X4004 cell. The red line represents a smoothing (moving average $n \approx 8$) of the raw data.

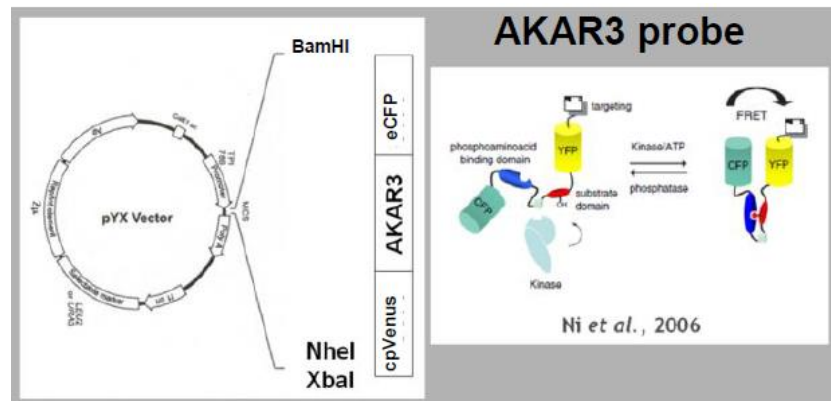
AKAR 3

AKAR3 è una sonda FRET che permette di misurare la quantità di proteina PKA nella cellula di lievito.

La sonda AKAR3 è una proteina ricombinante composta da un dominio di legame per un fosfoaminoacido ed una sequenza contenente un sito di fosforilazione bersaglio della PKA.

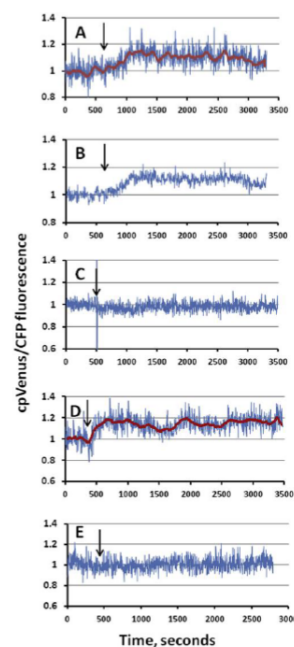
La sequenza AKAR3 è fiancheggiata dal donatore eCFP e dall'accettore cpVenus, che è analoga alla YFP.

Questa sequenza è clonata in un vettore episomico 2μ pYX ed ha un promotore costitutivo forte TPI.



Quando non è presente attività della PKA all'interno della cellula non c'è attività FRET perché accettore e donatore sono lontani.

Quando c'è attività della PKA, questa fosforila la sonda al sito di fosforilazione causando un cambiamento conformazionale della sonda, che comporta l'avvicinamento di donatore ed accettore, con aumento della FRET. Anche in questo caso oltre all'esperimento è bene fare dei controlli.



The arrows indicate the addition of either glucose (in A,B,C and E) or cAMP (in D).

The blue lines report the raw data, while the red lines represent a smoothing (moving average $n = 16$) of the raw data.

- A. Signal of a single **SP1** cells in response to glucose addition;
- B. mean value of 9 single **SP1** cells;
- C. signal of a single GG104 cell (**cyr1D** pde2D msn2D msn4D) in response to **glucose** addition or
- D. to **cAMP** addition;
- E. signal of a single tpk1D tpk2D tpk3D cell in response to glucose addition.

Prima dell'introduzione di questa sonda l'attività della PKA in lievito veniva dosata in modo indiretto, misurando la quantità di *trealosio* o l'attività della *trealsasi*, che è un enzima substrato della PKA.

Le sonde EPAC ed AKAR funzionano bene anche in un fungo patogeno quale *Candida glabrata*.

Recentemente in cellule di mammifero sono stati messi a punto sonde FRET per il glucosio, che hanno consentito di misurare il flusso glicolitico con alta risoluzione spaziale e temporale, ottenendo il profilo metabolico di singole cellule coltivate *in vitro*.