

PRODUZIONE DI PROTEINE RICOMBINANTI IN CELLULE EUCARIOTICHE: I MICETI

eucarioti
immobili
eterotrofi

uni o pluricellulari
si riproducono per mezzo di spore
aerobi (facoltativi)

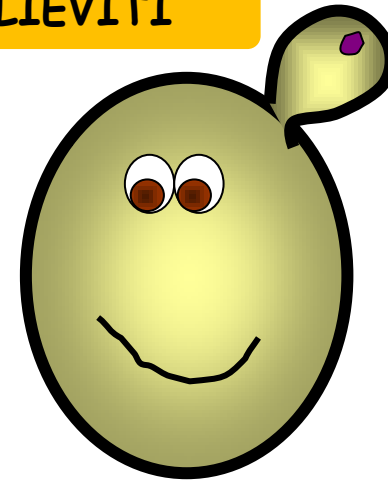
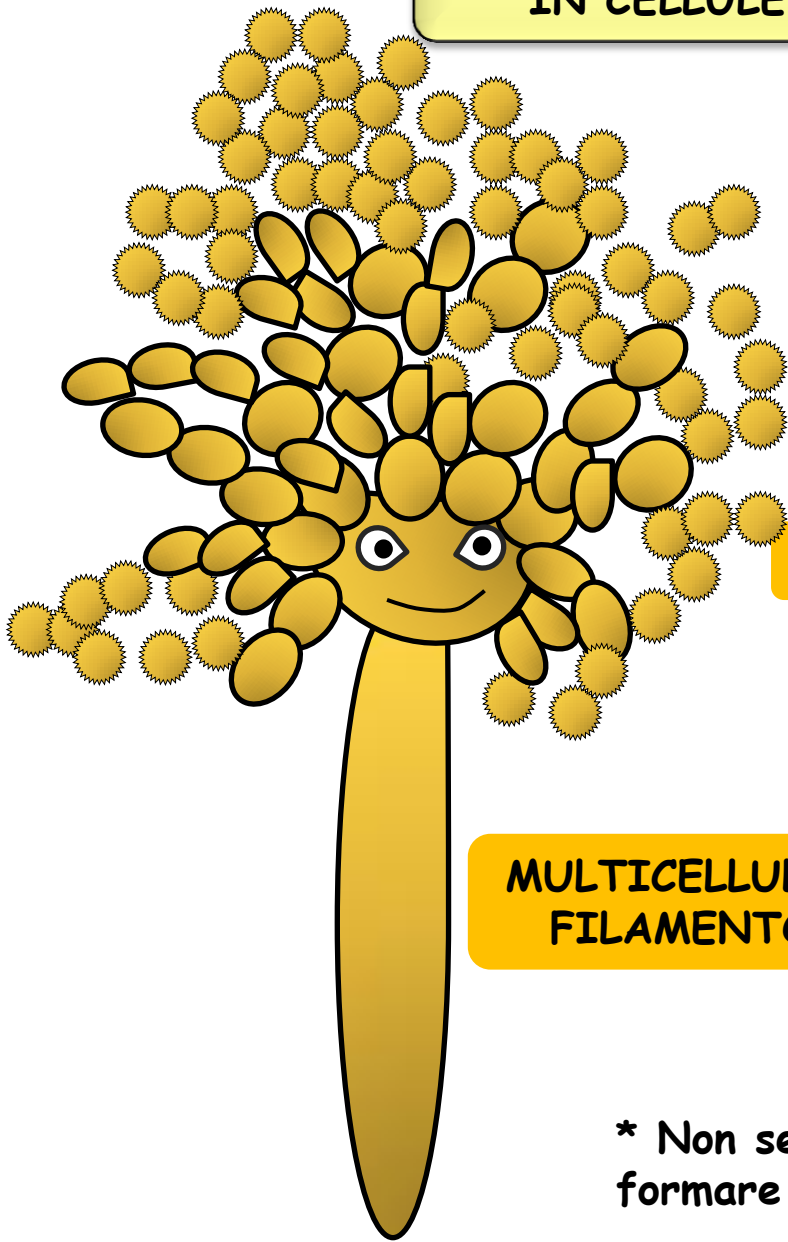
Ubiquitari in natura:

negli strati superficiali del suolo
come commensali di animali e piante

UNICELLULARI* :LIEVITI

MULTICELLULARI : MICETI
FILAMENTOSI (MUFFE)

* Non sempre: alcuni possono
formare pseudomiceli o miceli veri



I LIEVITI

Nella maggior parte dei casi sono unicellulari

ma possono formare pseudomiceli o miceli veri

La maggior parte si divide per gemmazione

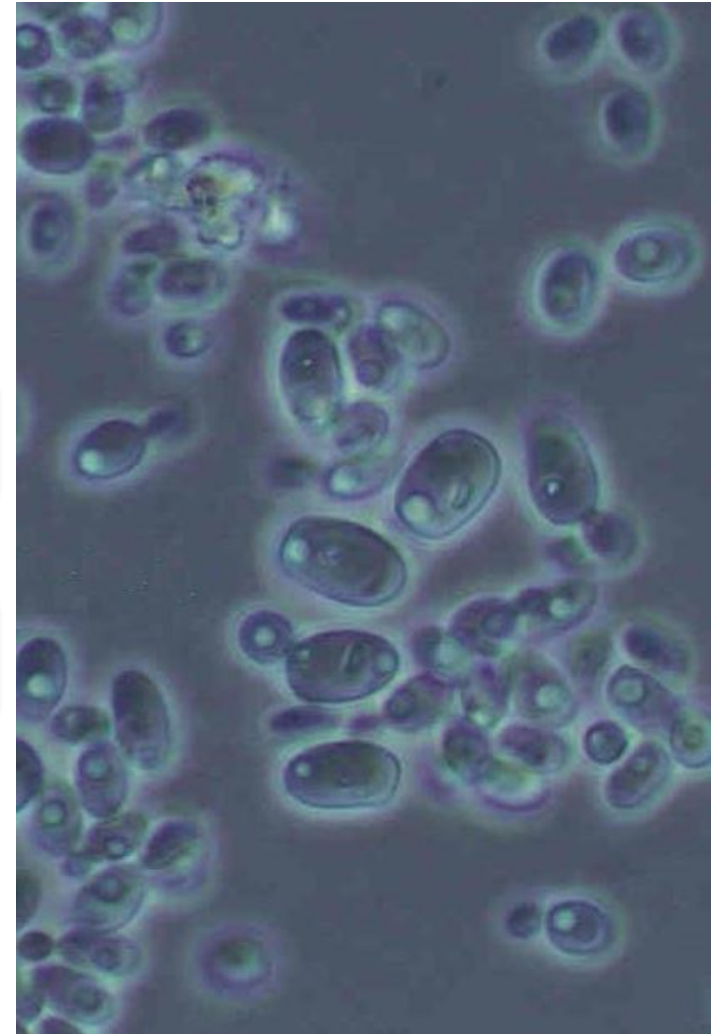
ma alcune specie si replicano per scissione

La maggior parte ha un metabolismo fermentativo

ma alcune specie non sono in grado di fermentare

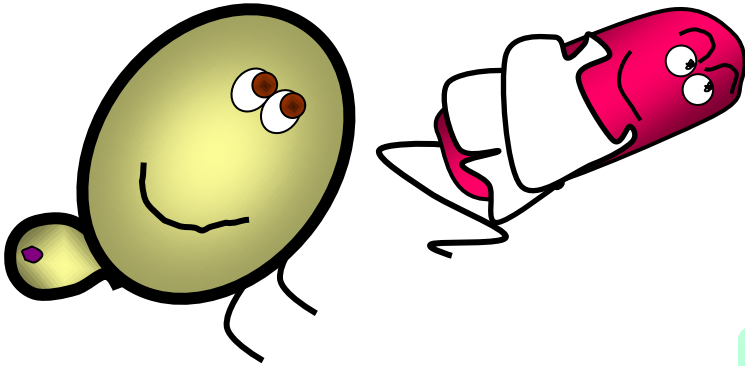
Sono in genere ovoidali con cellule di 5-30 μm in lunghezza e 1-5 μm di larghezza

Si trovano soprattutto su substrati naturali ricchi di zuccheri



VANTAGGI

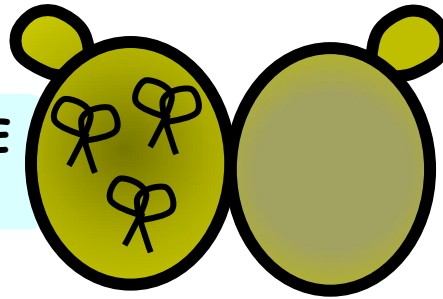
CRESCITA RIGOGLIOSA-DI TIPO MICROBICO



FOLDING CORRETTO

TAGLIO PROTEOLITICO DA PRECURSORE

FACILE MANIPOLAZIONE
GENETICA



TARGETING: possibilità di indirizzare il
prodotto eterologo in compartimenti cellulari diversi

L'uso del lievito come ospite permette di ottenere
modificazioni post traduzionali che i batteri non operano

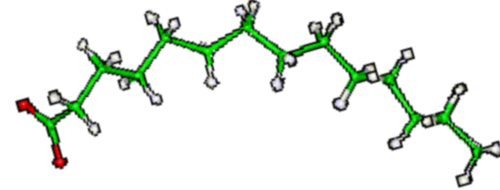
ALTRE MODIFICAZIONI

FOSFORILAZIONE

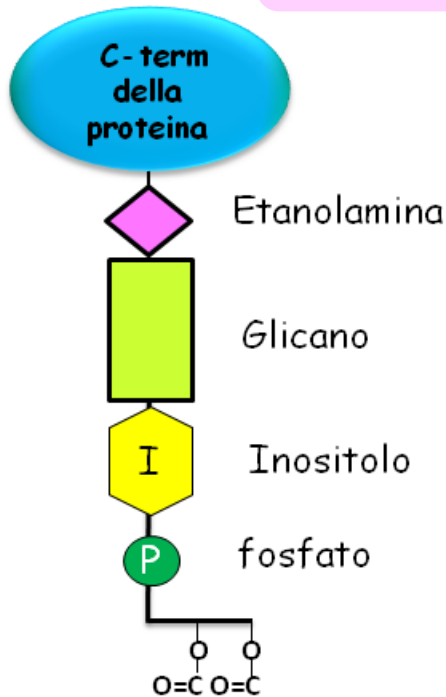
ACETILAZIONE

MIRISTILAZIONE:

attacco di un ac.miristico, in genere in N-term



ACILAZIONE : aggiunta di un gruppo $CO-X$ al C-term
Avviene nel RE e nell'apparato di Golgi



GIPILAZIONE : aggiunta di un'ancora GPI (Glicosil Fosfatidil Inositolo) al C-term di proteine da cui è stata rimossa una SP idrofobica. La gipilazione è tipica delle proteine di parete associate ai glicani

NOMENCLATURA

I geni di lievito sono indicati da sigle di tre lettere, seguite da numeri (fino a 3)

GPD1, HSP12, SUC1...

I geni wildtype sono scritti in maiuscolo corsivo

TPS1, RHO1, CDC28

I geni mutanti recessivi in minuscolo corsivo:

tps1, rho1, cdc28

Gli alleli mutanti si indicano con un trattino e un numero

tps1-1, rho1-23, cdc28-2

Se una mutazione è stata costruita (es. per delezione) si indica precisando il marcatore usato

tps1D::HIS3

Il prodotto genico (proteina) si indica con l'iniziale maiuscola e non in corsivo

Tps1, Rho1, Cdc28

A volte viene anche aggiunta una "p" minuscola dopo il nome

Tps1p, Rho1p, Cdc28p

Sigle del tipo *YDR518C*, *YML016W*

Indicano geni rivelati dal sequenziamento sistematico
e la cui funzione non è ancora stata scoperta

Y sta per "yeast"

La seconda lettera indica il cromosoma (*D=IV*, *M=XIII*....)

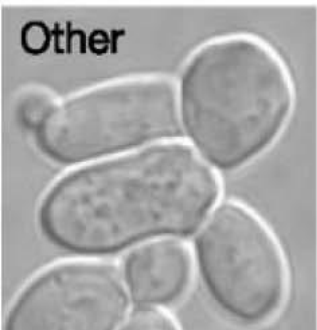
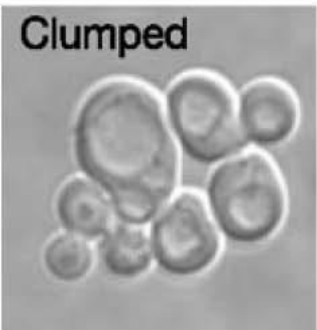
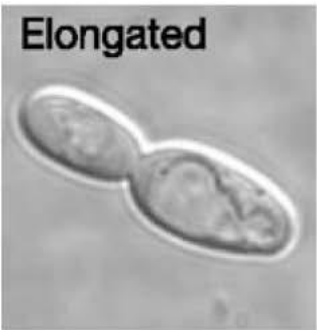
L o R sta per il braccio sinistro o destro del cromosoma

il numero a *tre cifre* indica la posizione della ORF a partire dal
centromero su quel braccio del cromosoma

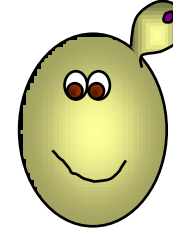
C o W sta per "Crick" o "Watson", indica cioè il filamento o la
direzione della ORF

Le eccezioni confermano le regole...

Alcuni geni hanno nomi non convenzionali (es. HO ; MAT α ; MAT α)
(es. HO ; MAT α ; MAT α)



S. cerevisiae



Ascomicete lieviforme,
fermentante di forma ovalare*

*Più o meno

È per gli eucarioti quello che
E. coli è per i procarioti

può essere manipolato con molta facilità

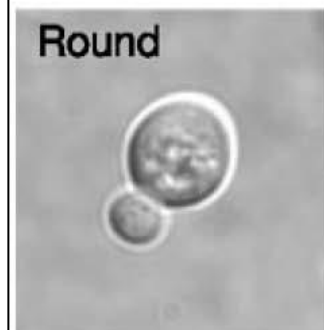
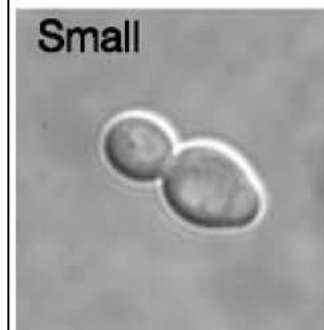
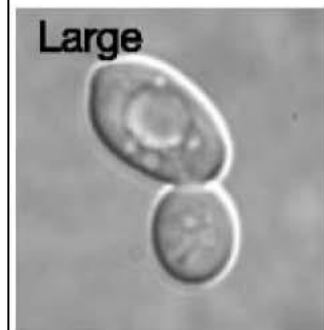
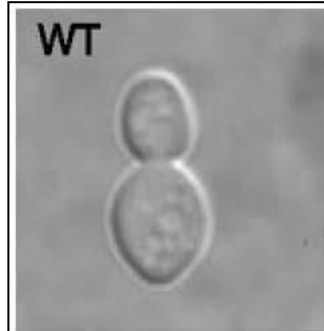
Ha notevoli capacità di fermentazione e
di tolleranza a pH ed etanolo

Le sue varietà si usano per vinificazione,
brassaggio e panificazione (GRAS)

le tecniche di fermentazione sono avanzate

Sopporta bene l'essiccamento
(può essere conservato in questo stato)

I ceppi di laboratorio sono molto diversi tra
loro e diversi dai ceppi wild o da quelli
usati per vinificazione e brassaggio



La struttura cellulare è eucariotica con
dimensioni > batteri < cellule animali

Sotto il profilo evolutivo è lontana dalle cellule
animali ma più simile a queste che a quelle vegetali

La parete è molto spessa; la membrana
citoplasmatica che contiene ergosterolo

CITOPLASMA

RIBOSOMI

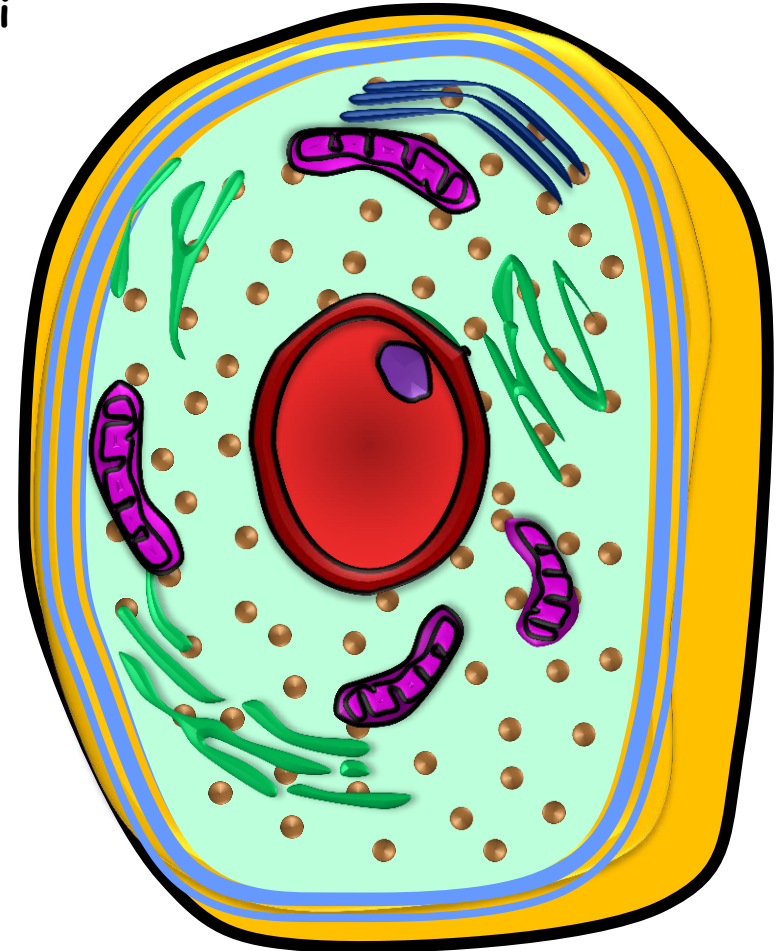
MITOCONDRI

RETICOLO
ENDOPLASMICO

APPARATO DI GOLGI

Il NUCLEO è delimitato da una
membrana trilaminare ricca di pori

Nel nucleo si trovano un NUCLEOLO
e cromosomi lineari, in numero
variabile con la specie



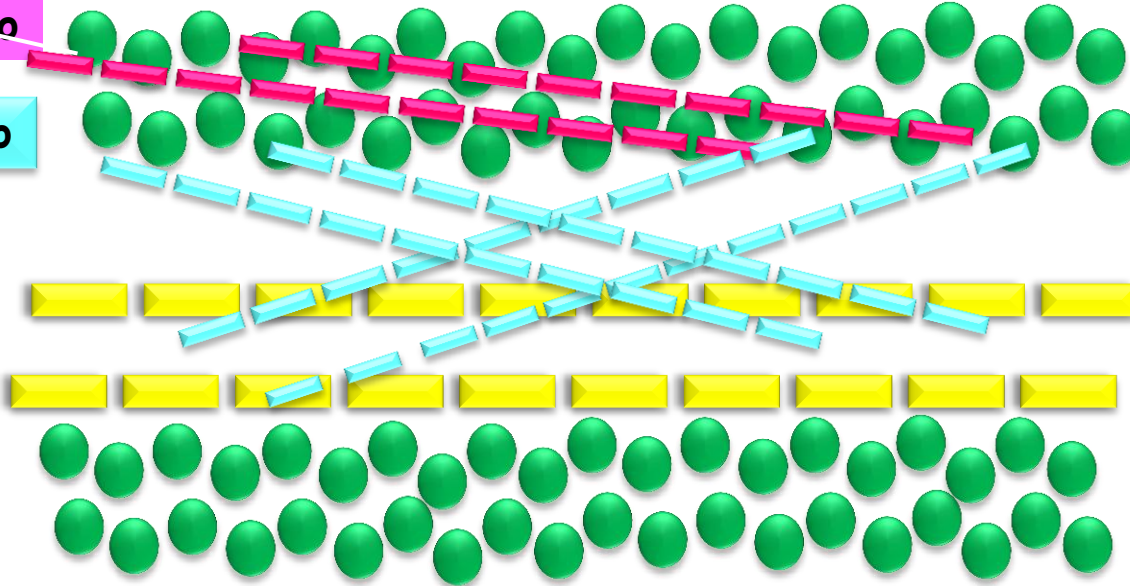
La parete cellulare è formata da glucani (>50%)
mannoproteine (~ 40%) e chitina (2%)

Mannoproteine

β - (1,6)-glucano

β - (1,3)-glucano

Chitina
(poli-NAG)



Rappresenta il 30% del peso secco
Può essere digerita da β -glucanasi di varia origine

I lieviti non hanno membrana esterna e quindi non possiedono un periplasma: con questo nome però è indicata una regione sottile (35-45 Å) associata esternamente alla membrana e interna alla parete

Contiene soprattutto proteine secrete (mannoproteine) che non passano la parete ma agiscono su substrati che non passano la membrana: alcuni esempi la invertasi (saccarosio $\rightarrow$ glucosio + fruttosio) e fosfatasi acida

La parete interviene nell'aggregazione delle cellule, alla base del processo di flocculazione

La flocculazione è la formazione di aggregati che tendono a depositarsi sul fondo del recipiente

Il fenomeno è legato alla distribuzione delle cariche di superficie, dipendenti dalla mannoproteine

La disposizione delle cariche cambia nel corso della crescita

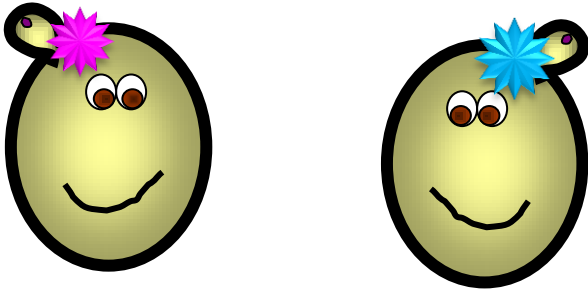
La capacità a flocculare varia da ceppo a ceppo

È molto importante, per esempio, nei processi di brassaggio

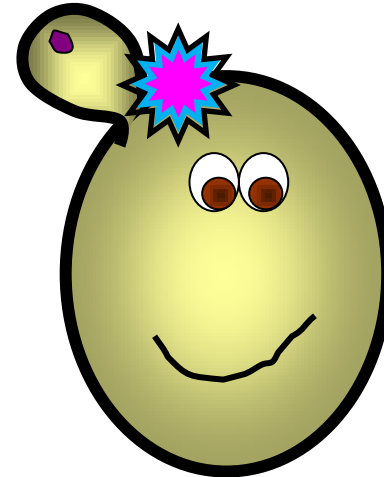


Le cellule di lievito possono trovarsi in diversi stati

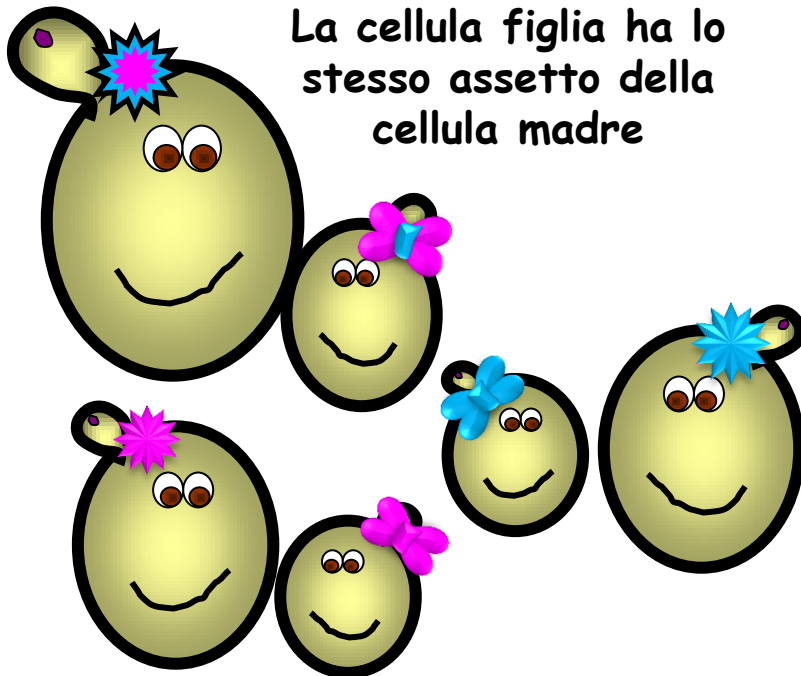
Aploidi (1n)



Diploidi (2n)

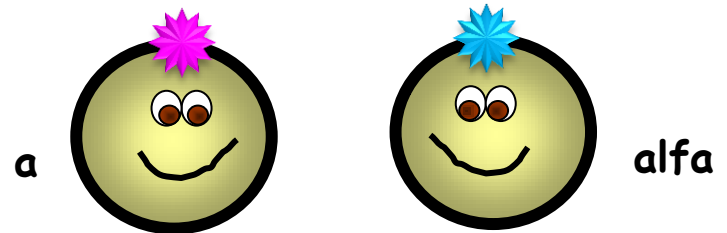


La cellula figlia ha lo stesso assetto della cellula madre

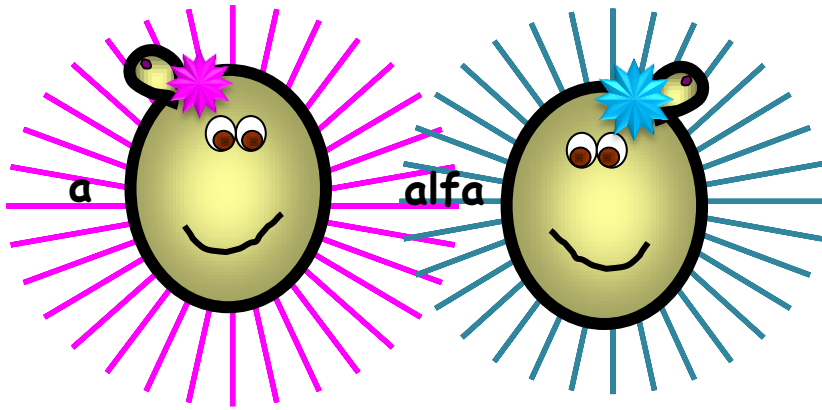


Le cellule diploidi hanno dimensioni maggiori (1-2 volte)

spore



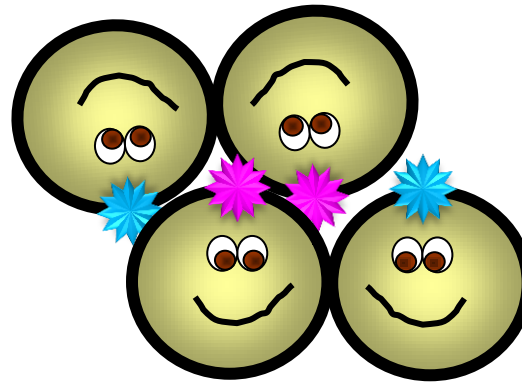
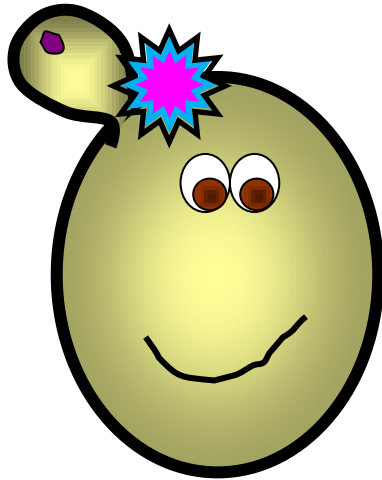
Le cellule aploidi possono essere di tipo sessuale (mating type) diverso: a o alpha (α)



Due cellule aploidi possono unirsi per formare uno zigote diploide

Il processo è innescato dai "mating factors" peptidi che inducono modificazioni morfologiche nel tipo sessuale opposto

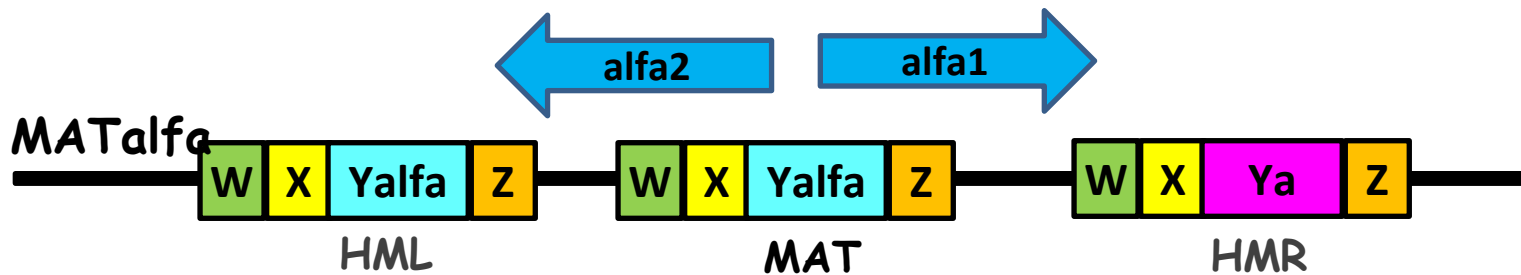
Lo zigote diploide può originare solo da due cellule di tipo sessuale diverso



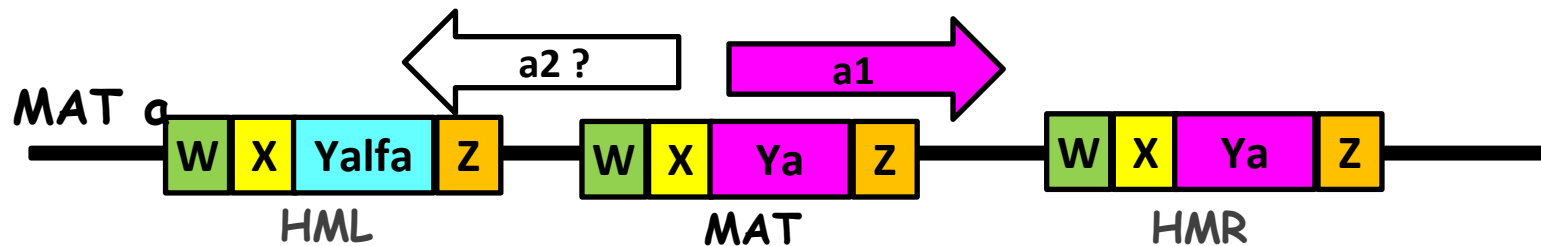
Le spore, aploidi, si formano da una cellula diploide per meiosi e in condizioni di stress

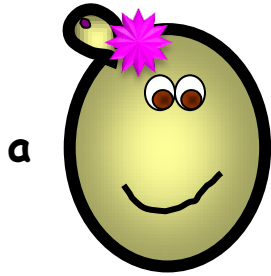
Il mating type è determinato dal locus MAT sul cromosoma 3

MAT_{alfa} codifica l'attivatore trascrizionale $\alpha 1$ e il repressore $\alpha 2$



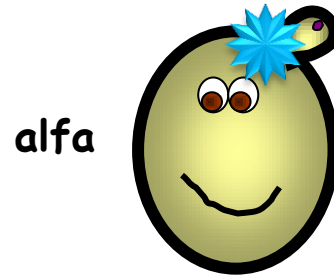
MAT_a codifica l'attivatore trascrizionale $a 1$ ($a 2$ ha funzioni ignote)





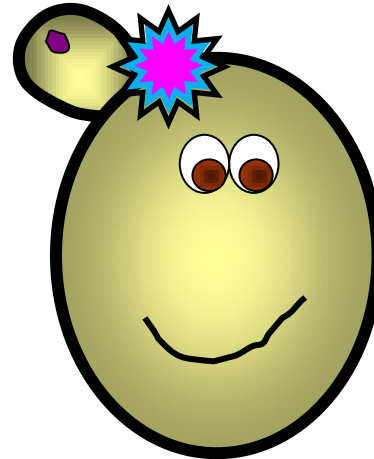
a

i geni alpha-specifici sono
inattivi, i geni a-specifici
non sono repressi



alfa

alfa1 stimola i geni alfa-
specifici, alfa2 reprime i
geni a-specifici

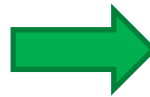


il repressore eterodimerico a1/alpha2
reprime l'espressione dei geni

a -specifici

alpha-specifici

Tipici della
fase aploide

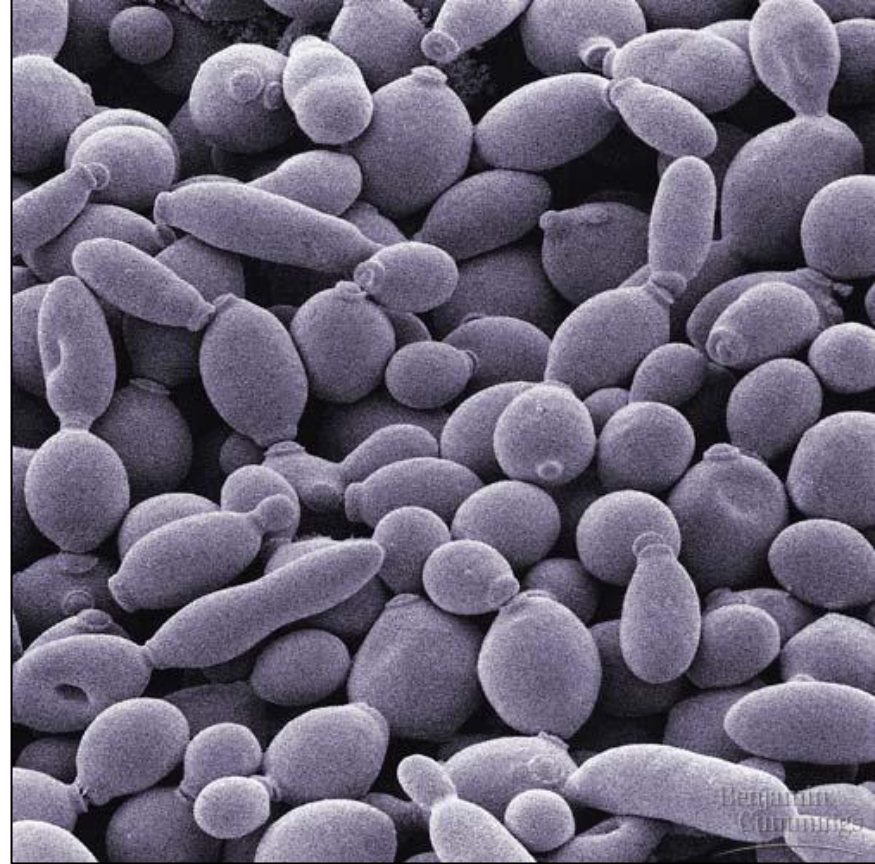
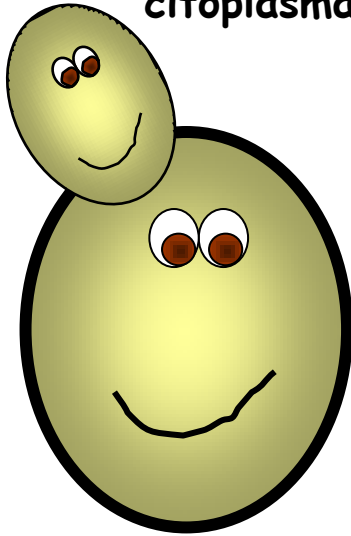


Tra cui RME che codifica
il repressore della meiosi

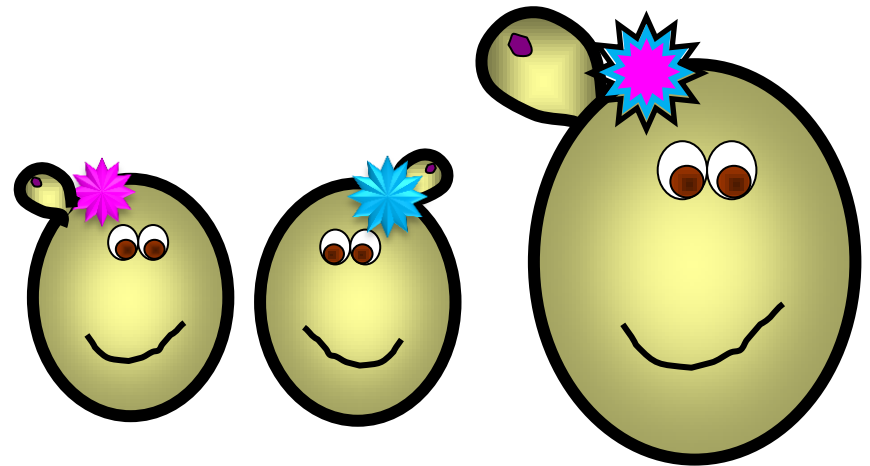
RME non è espresso nelle cellule diploidi
ma la meiosi e la sporulazione iniziano solo
con l'esaurimento dei nutrienti

Con l'eccezione di *Schizosaccharomyces pombe*, i lieviti si replicano per gemmazione

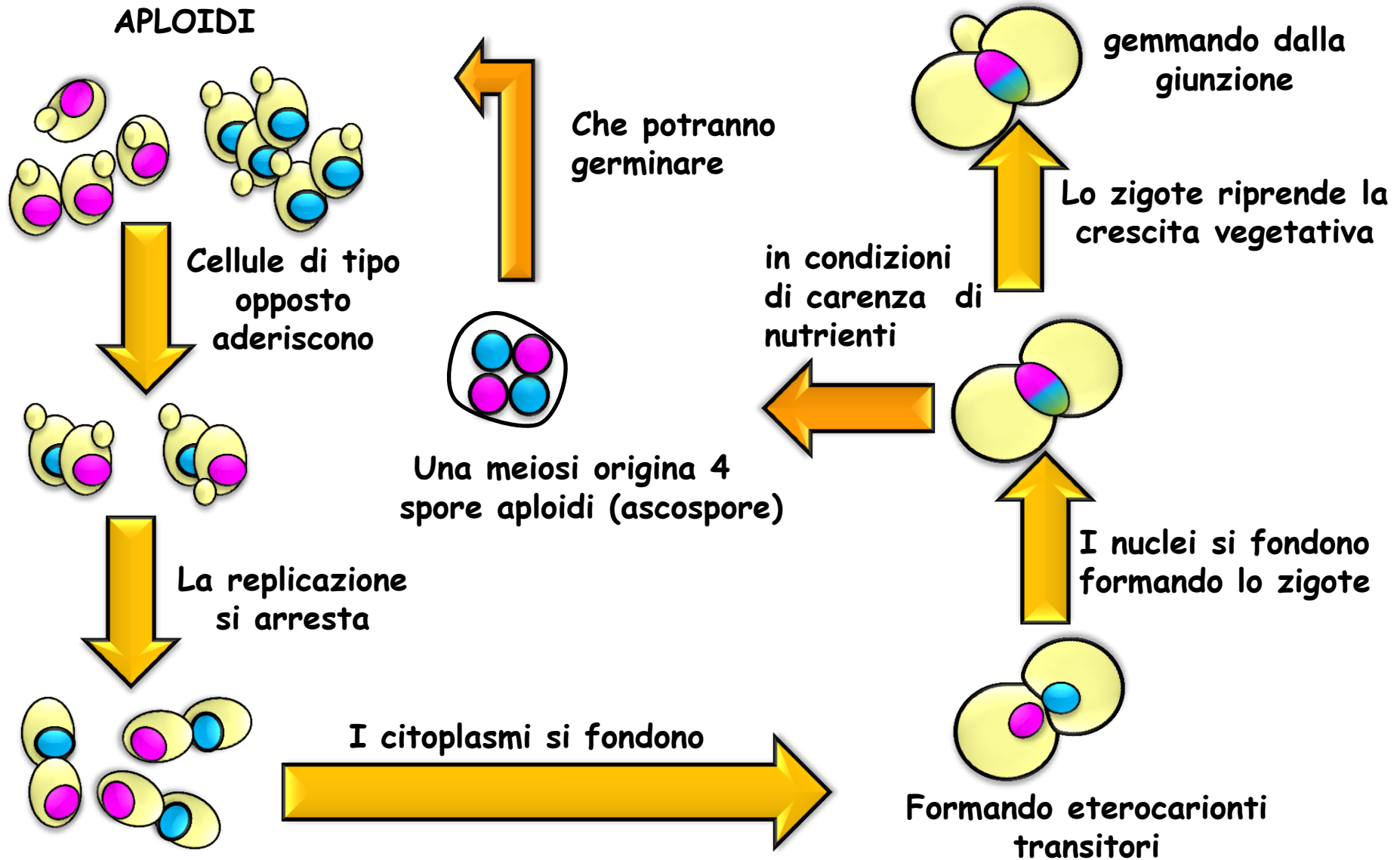
Un processo in cui la divisione del citoplasma è ineguale



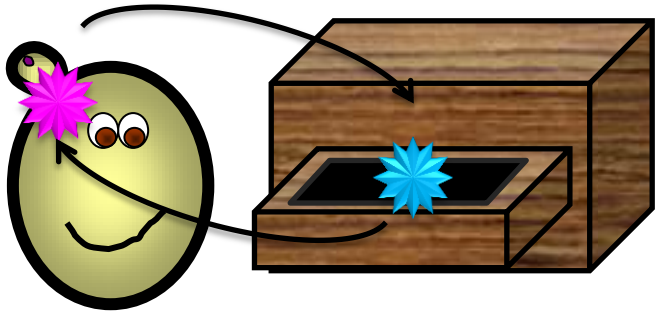
La gemmazione può essere svolta sia dalle cellule aploidi sia dalle cellule diploidi



LIEVITO GEMMANTE: CICLO CELLULARE

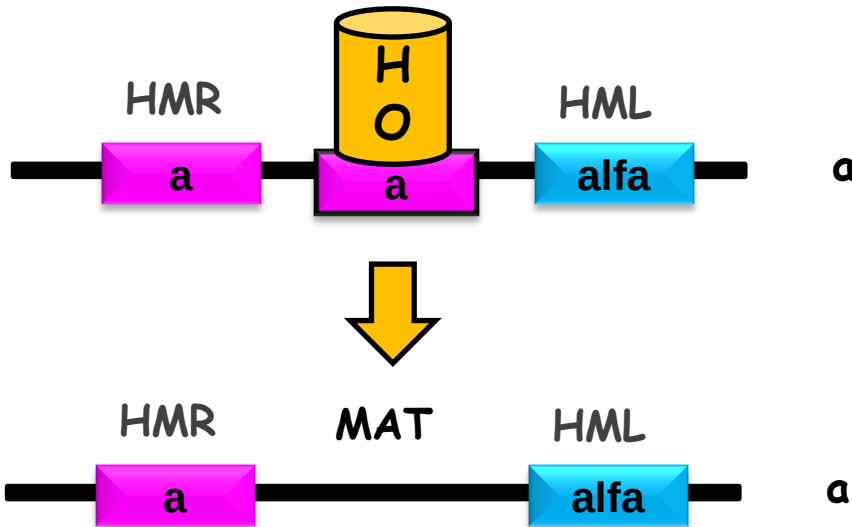


LE CELLULE APLOIDI POSSONO CAMBIARE MATING TYPE



Il locus MAT può essere sia "a" che "α" e deve poter cambiare dall'uno all'altro

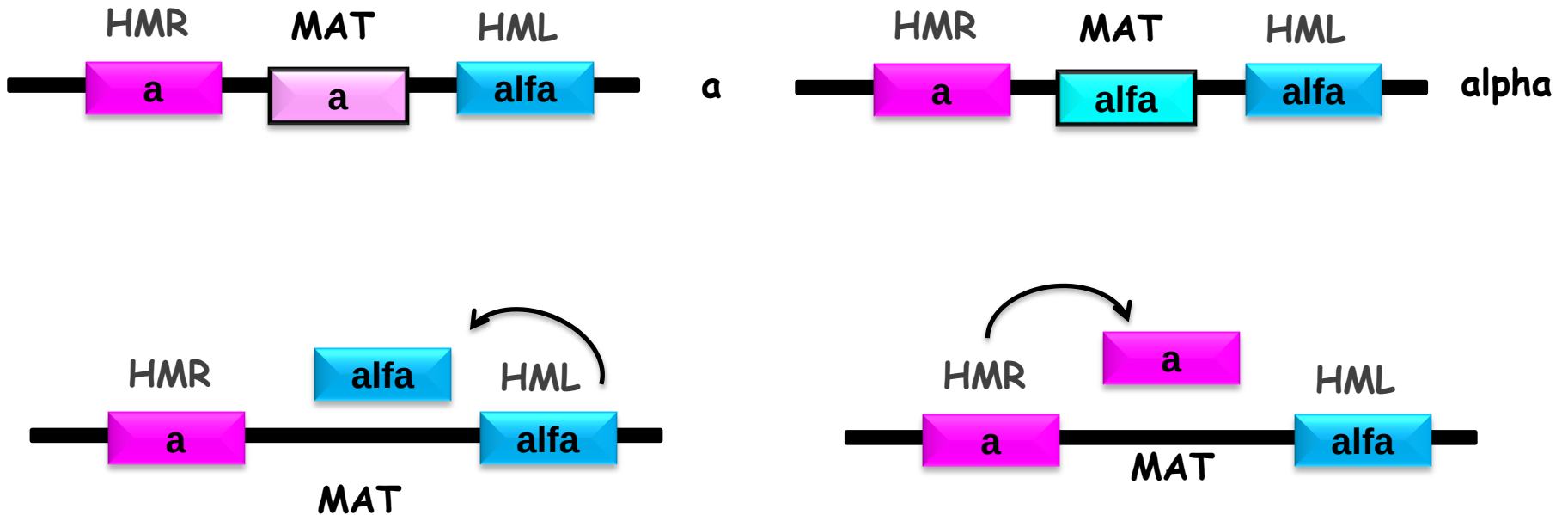
Due siti silenti adiacenti al sito MAT (HML e HMR) fanno da serbatoio per geni a (HMR) o alfa (HML)



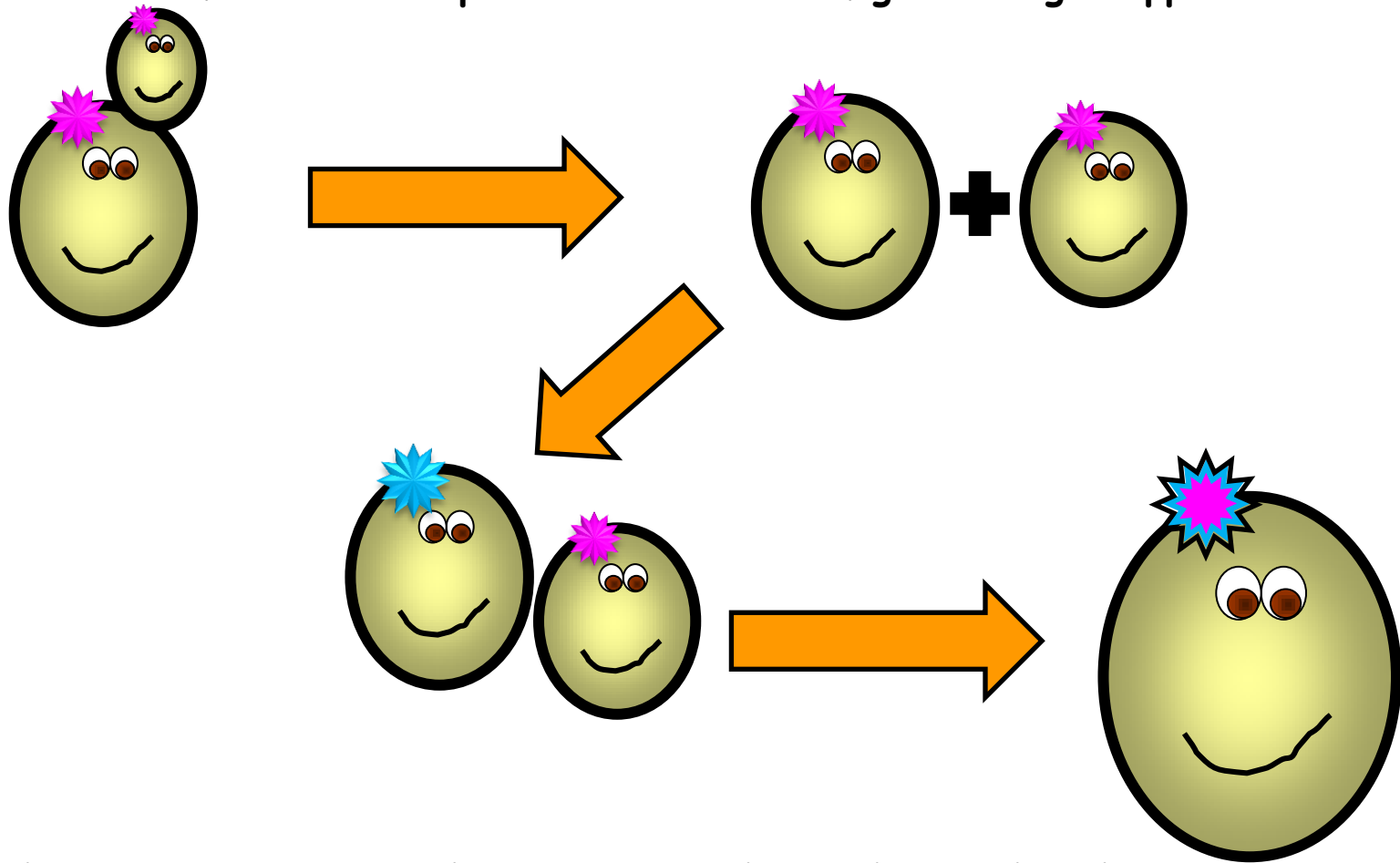
la nucleasi HO, che taglia il mating site attivo, inizia il processo di inversione

I ceppi di laboratorio mancano del gene HO e formano quindi aploidi stabili

La traslocazione del determinante opposto nel locus MAT, iniziata dalla nucleasi HO, che taglia il mating site attivo, determina l'inversione del tipo sessuale

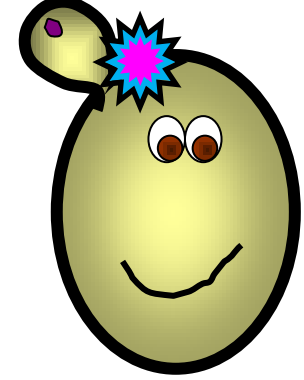


Una cellula "madre" aploide può quindi invertire il proprio tipo sessuale e formare un diploide con la cellula figlia di segno opposto



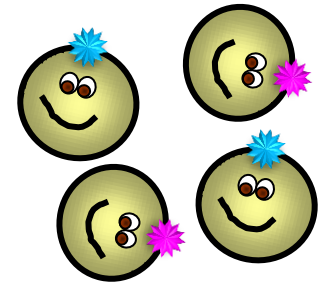
Il meccanismo assicura la coesistenza di tipi diversi dopo la divisione cellulare garantendo la possibilità di entrare in stato diploide anche a popolazioni che originano da una spora

In natura, il lievito vive prevalentemente nello stato diploide che protegge la cellula da possibili mutazioni dannose



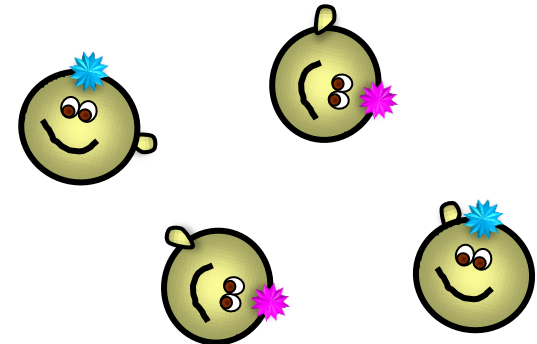
Lo stato aploide si instaura in genere per carenza di azoto, attraverso la formazione delle spore

le spore sopravvivono in condizioni sfavorevoli e si originano mediante la meiosi creando nuove combinazioni alleliche



E' molto probabile che non tutte le cellule di una tetradе possano germinare, ma è possibile che almeno una possieda un assetto idoneo alla sopravvivenza

In laboratorio, in terreno ricco, tutte le spore possono germinare

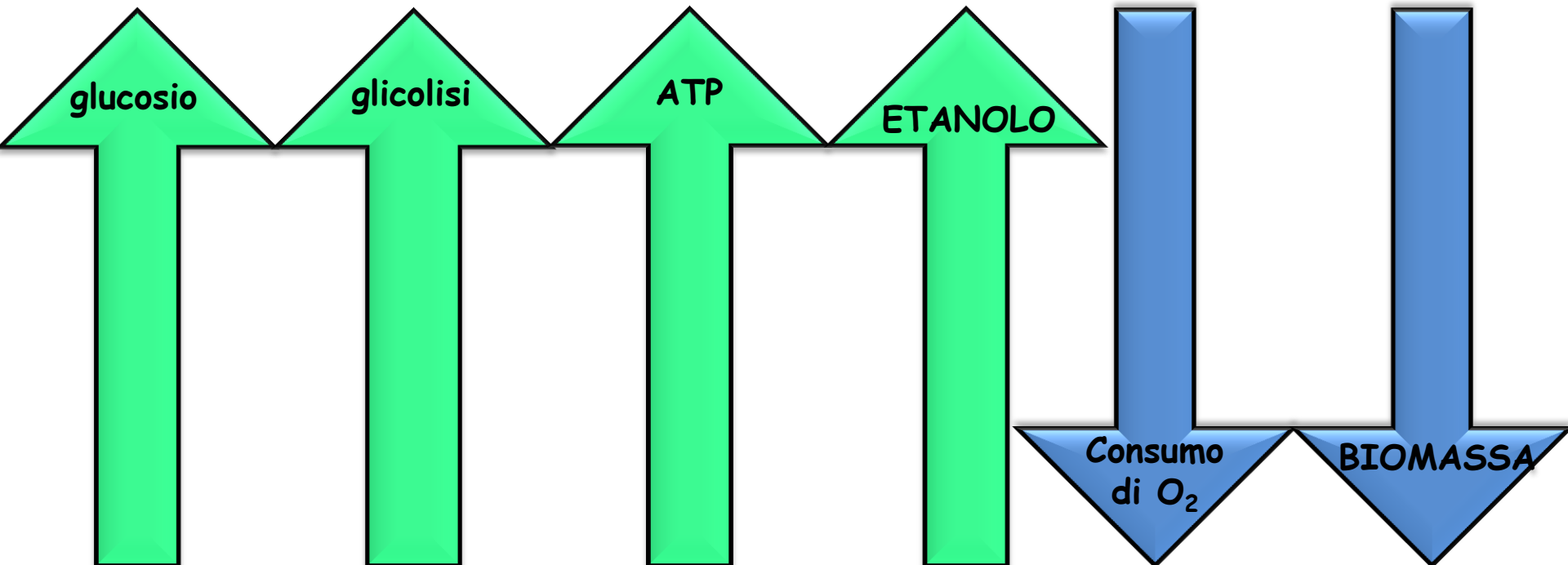


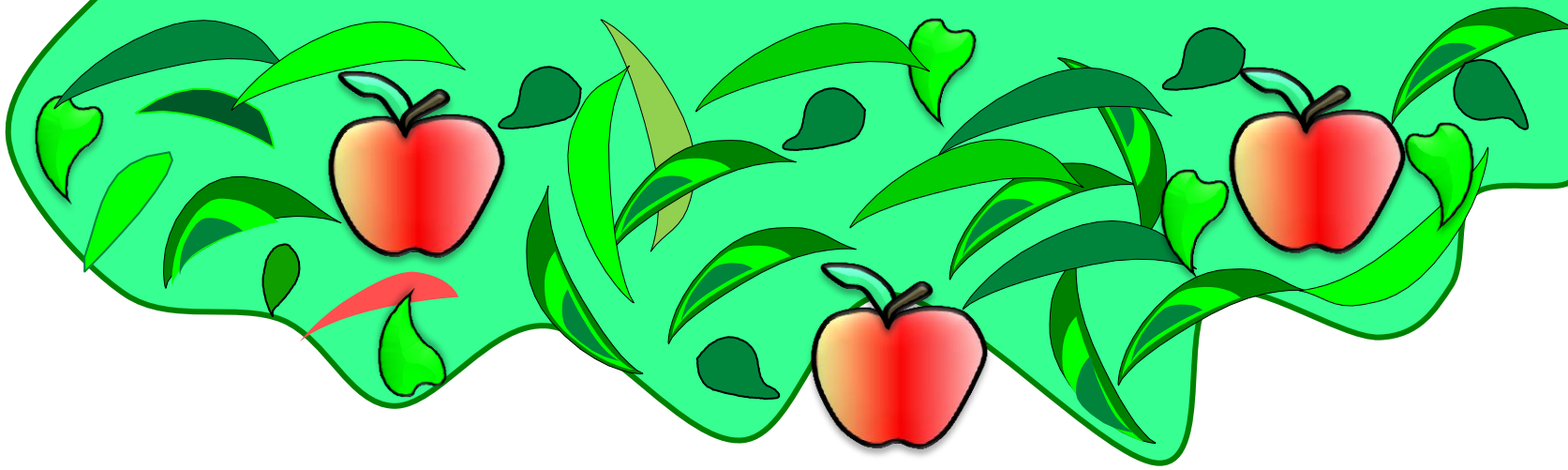
la sporulazione è un buon mezzo per studiare la genetica del lievito utilizzando l'assetto aploide

Sotto il profilo metabolico, *S. cerevisiae* fa parte
dei lieviti "Crabtree-positivi"

In presenza di forti concentrazioni di glucosio, la fermentazione
predomina sulla respirazione anche in aerobiosi

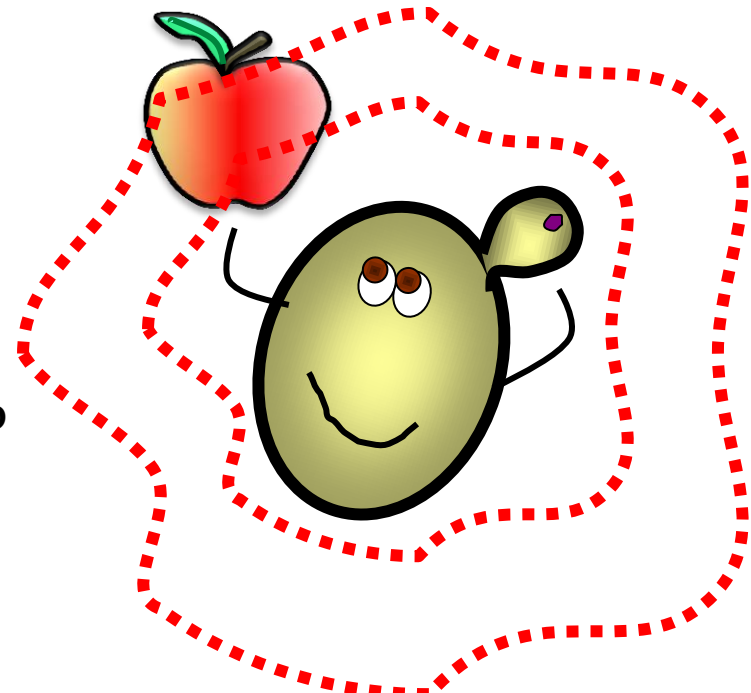
La produzione di ATP per fosforilazione a livello del
substrato permette un risparmio di O_2





**Il fenomeno è interpretato come
probabile meccanismo di competizione**

**Si ritiene che si sia originato con la comparsa delle
piante da frutto e il rilascio di zuccheri nel terreno**



Il genoma di *Saccharomyces cerevisiae*

sequenziato nel 1996
(primo genoma eucariotico)

Ha un'organizzazione
genica più complessa

16 cromosomi, ognuno con un
centromero e due telomeri

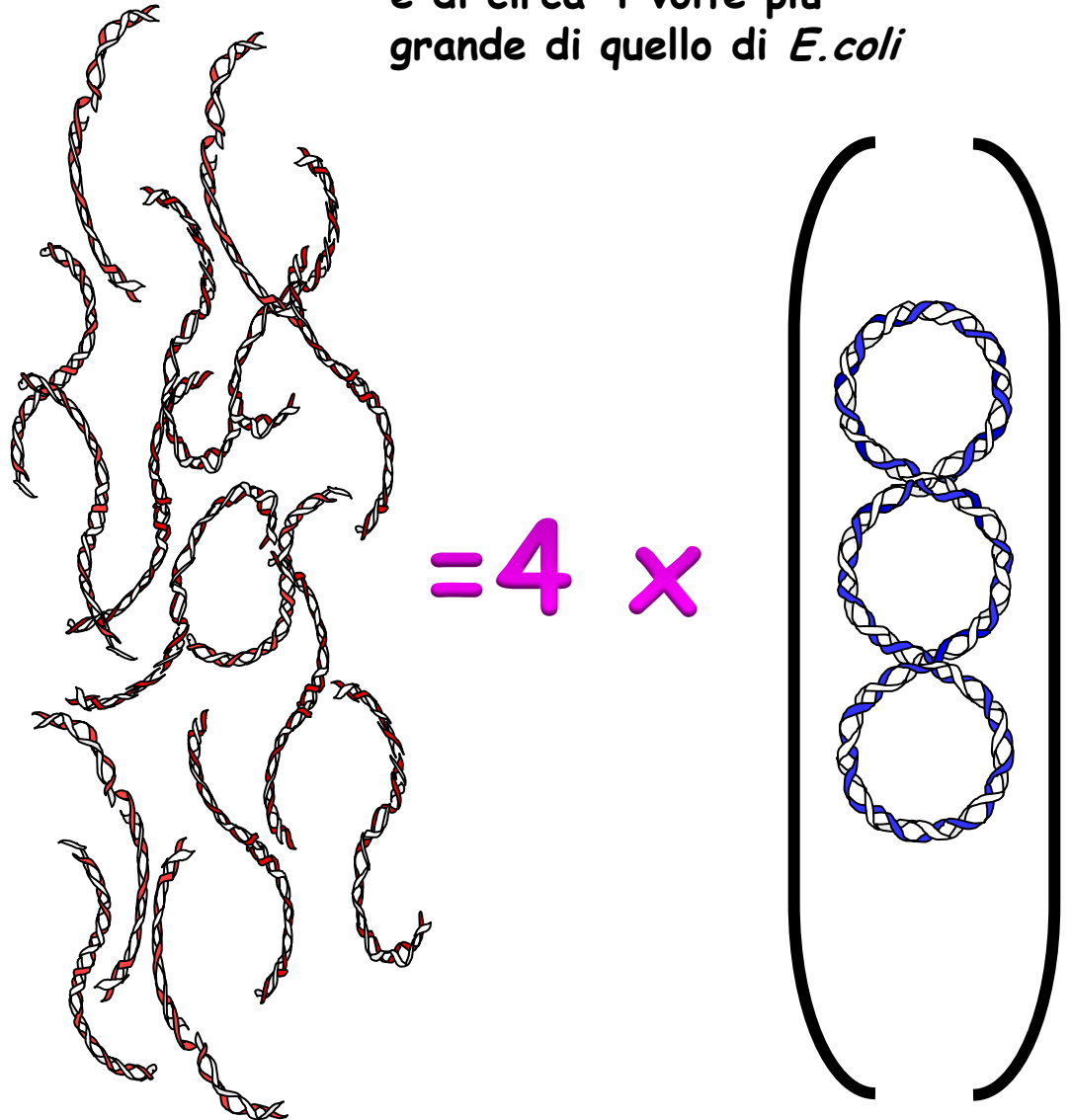
un maggior numero di regioni
ripetute e non codificanti

I geni sono molto ravvicinati (200
- 1000 bp) con promotori singoli

Pochi hanno un introne e
pochissimi ne hanno più di uno

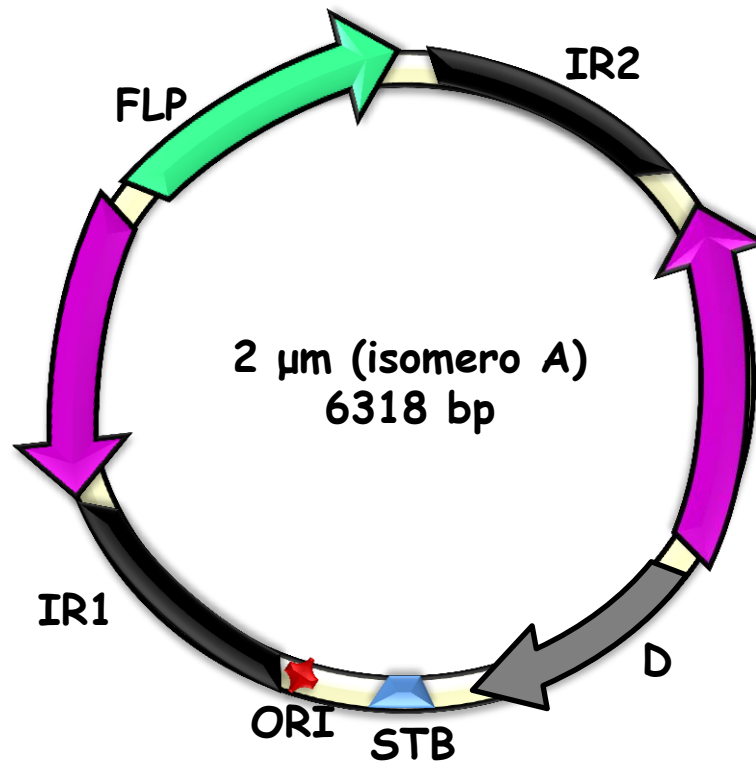
I geni sono interspersi con
elementi trasponibili

è di circa 4 volte più
grande di quello di *E.coli*



Il genoma mitocondriale è simile al corrispettivo umano, codifica per i propri tRNA e rRNA e possiede introni di tipo self-splicing

possiede il plasmide 2 μ m, con un'origine di replicazione autonoma, utilizzata per alcuni vettori di uso biotecnologico



2 μ m porta solo geni implicati nella propria replicazione

STB
stabilità

REP1 REP2
(replicazione)

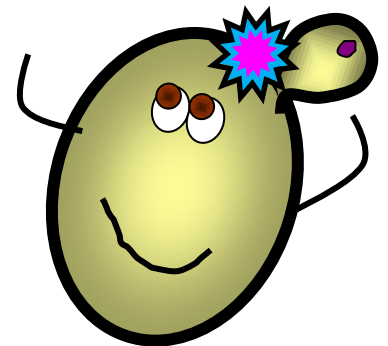
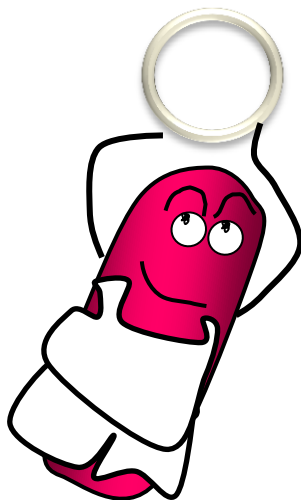
FLP
Ricombinazione endomolecolare
(formazione degli isomeri A e B)

S. cerevisiae si trasforma con una frequenza di almeno di 3 ordini di grandezza inferiore a quella di *E. coli*

può mantenere plasmidi che si replicano ma il numero di copie è molto inferiore a quello che si può ottenere in *E. coli* (max. 50)

Le procedure di clonaggio possono essere difficoltose, quindi *E. coli* viene utilizzato come intermedio nella produzione dei plasmidi ricombinanti, attraverso l'uso di vettori shuttle

- I plasmidi vengono assemblati *in vitro*
- trasformati, manipolati, modificati e propagati in *E. coli*
- e poi trasformati in lievito



MARCATORI DI SELEZIONE

I lieviti sono naturalmente resistenti agli antibiotici

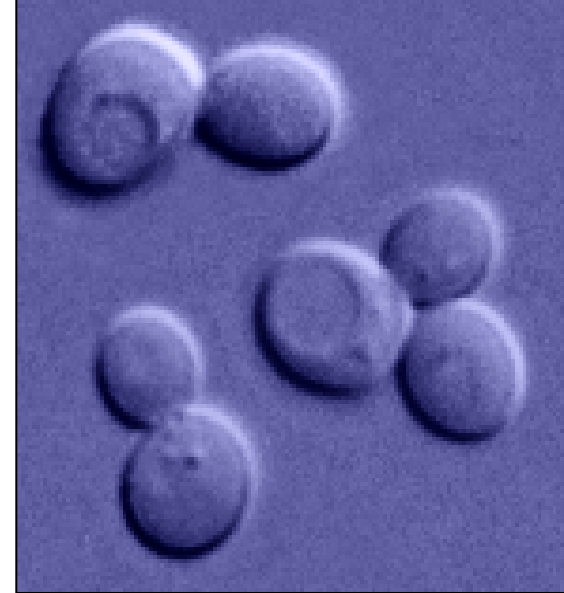


i geni di resistenza non sono marcatori idonei
per la selezione dei trasformanti

In lievito si usano marcatori genici
basati su auxotrofie

HIS3, URA3, TRP1, LEU2, LYS2, ADE2

Alcuni di questi marcatori (URA3, LYS2)
hanno il vantaggio di poter essere usati per



SELEZIONI POSITIVE	basate sulla complementazione auxotrofica delle corrispondenti mutazioni
-----------------------	---

SELEZIONI NEGATIVE	Basate su inibitori specifici che prevengono la crescita dei ceppi prototrofici ma non quella dei mutanti auxotrofi
-----------------------	--

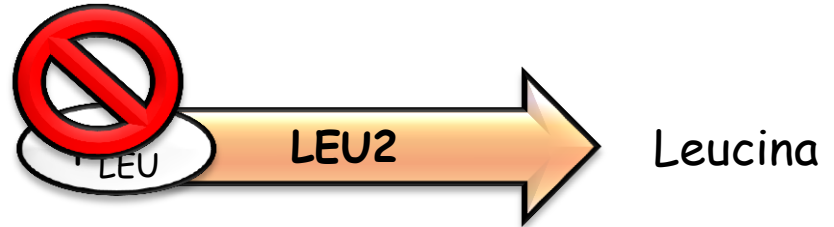
SELEZIONE POSITIVA

LEU2 e URA3
sono i più usati

Sono marcatori dominanti selezionabili quando il lievito ricevente ha una mutazione recessiva nella corrispondente copia del gene

LEU2 codifica la β -isopropimalato (β -IPM) deidrogenasi, che catalizza il (3° passo della biosintesi di Leu)

l'espressione di LEU2 è repressa da concentrazioni elevate di leucina



leu2-d è un allele di LEU2
poco espresso, con

Una mutazione $C \rightarrow T_{863}$, che non altera il senso dei codoni

Una delezione della regione fiancheggiante 5' che lascia solo 29 bp prima del codone di inizio di LEU2

quando *leu2-d* è presente su un plasmide YEp richiede un numero di copie molto alto per conferire al ceppo un fenotipo *Leu+*

in condizioni non selettive aumenta la stabilità dei vettori derivati da 2 μ m

In assenza di leucina il numero di copie dei plasmidi *leu2-d* aumenta tanto da curare il plasmide 2- μ m endogeno

leu2-d è scarsamente selezionabile nelle trasformazioni su cellule preparate con litio



spesso si aggiunge anche *URA3*

Il gene *leu2-d* clonato può anche complementare le mutazioni in *leuB6* di *E. coli* semplificando la costruzione dei plasmidi

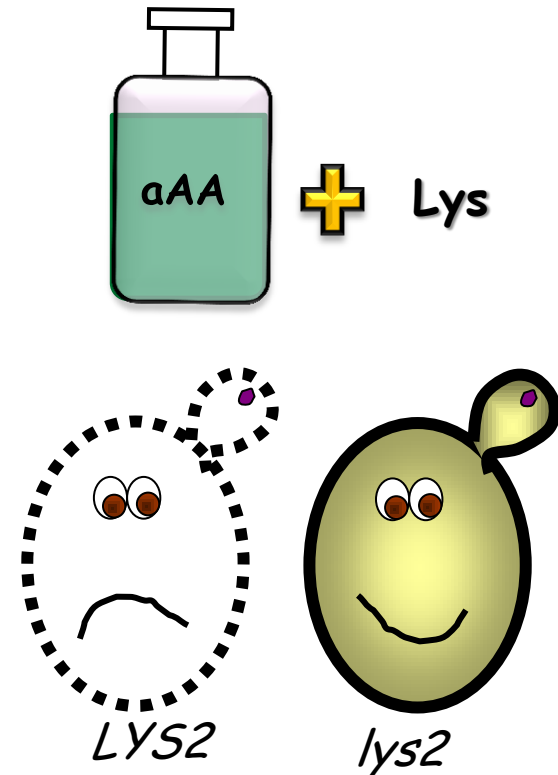
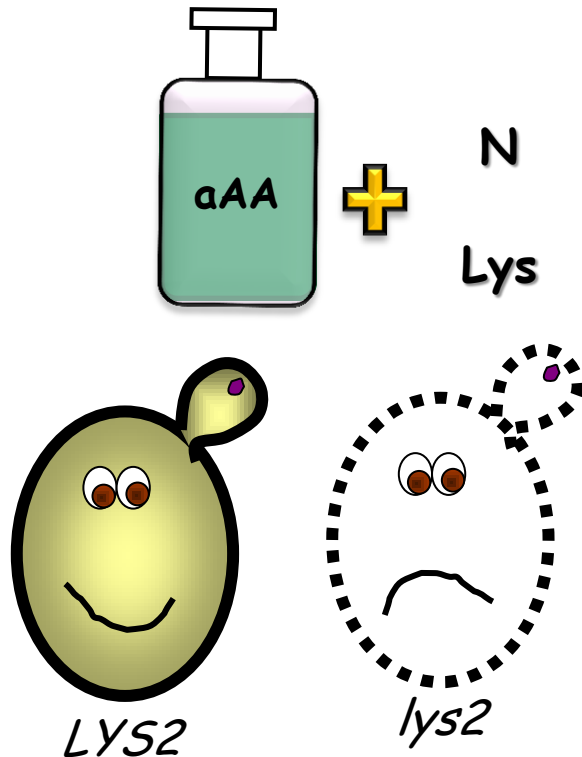
SELEZIONE NEGATIVA LYS2

LYS2 codifica una α -aminoadipato reduttasi necessaria per la sintesi della lisina

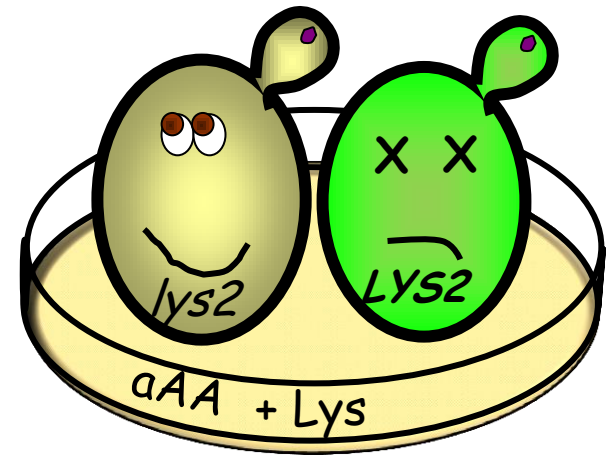
A differenza dei ceppi wild, i mutanti *lys2*⁻ and *lys5*⁻ possono crescere su terreni con lisina e α -aminoadipic acid (aAA) ma privi di fonti di azoto

Ad alte concentrazioni di aAA le mutazioni *lys2* e *lys5* causano l'accumulo di un intermedio tossico

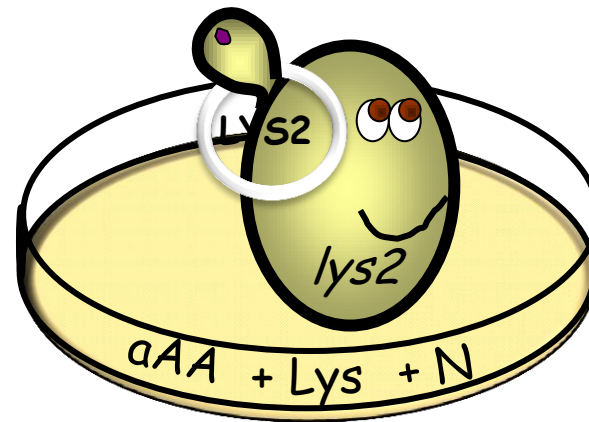
ma possono usare aAA come fonte di azoto



E' possibile isolare mutanti *lys2* (*lys5* con frequenza minore) seminando quantità elevate di cellule su terreni con aAA e lisina ma senza azoto



In queste condizioni le cellule *lys2*, complementate da un plasmide con *LYS2* lo espellono con alta frequenza



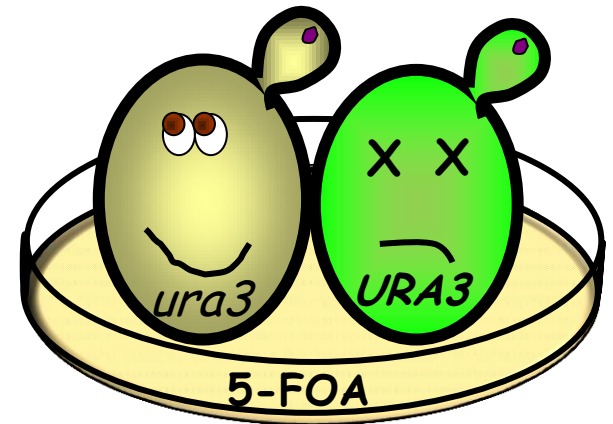
Le grandi dimensioni del gene *LYS2* (che contiene anche numerosi siti di restrizione) hanno determinato un maggior uso dei plasmidi con selezione *URA3*

SELEZIONE NEGATIVA URA3

URA3 codifica la orotidina-5'fosfato decarbossilasi, un enzima richiesto per la biosintesi dell'uracile

I mutanti *ura3-* (o *ura5-*) possono essere selezionati su terreni contenenti 5-FOA (acido 5-fluoroorotico)

Il prodotto di *URA3* converte il 5-FOA in un prodotto tossico che uccide le cellule wild type che lo esprimono



5-FOA è molto discriminante
e può essere usato

per produrre marcatori *ura3*
per mutazione in ceppi aploidi

Per eliminare plasmidi con
URA-3 (YCp, YEp e YIp)

Le piccole dimensioni del gene e la facilità della selezione negativa hanno fatto di *URA-3* uno dei marcatori in assoluto più popolari per i lieviti

Nell'allele impiegato *ura3-52* è inserito un trasposone Ty1, questo evita l'integrazione di plasmidi Yip-*URA3* nel locus *URA3* nella maggior parte dei ceppi di lievito

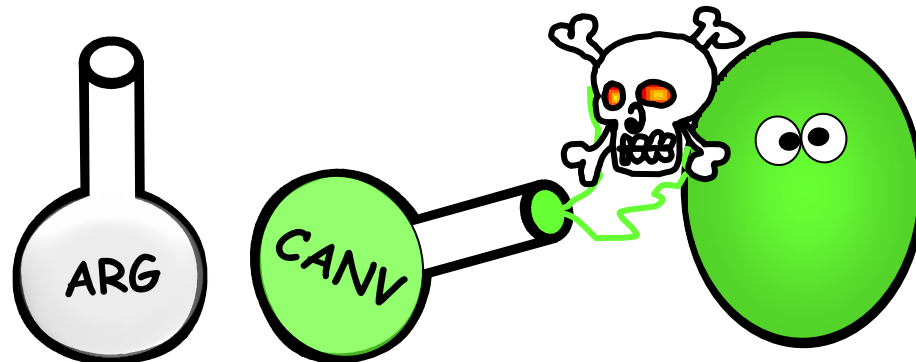
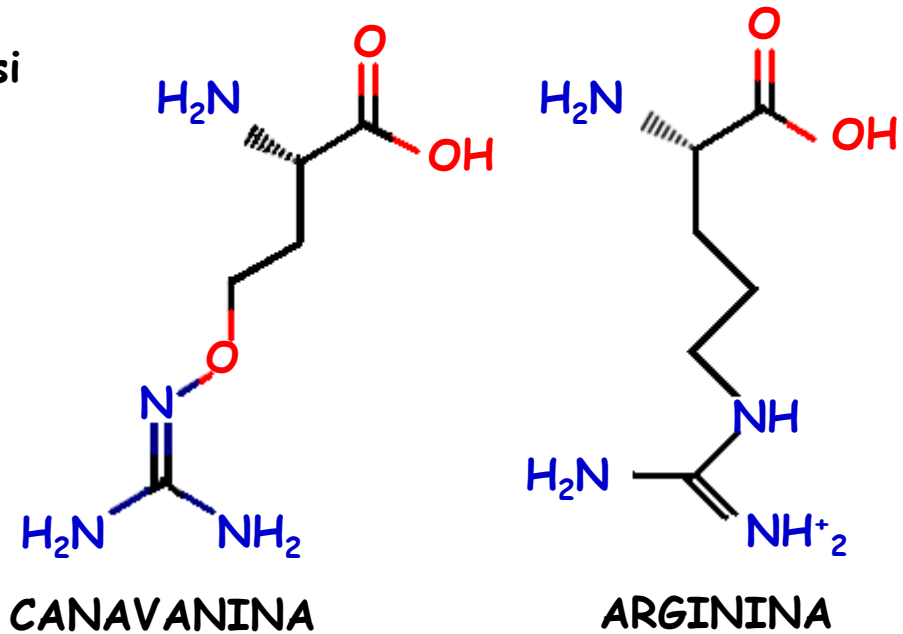
SELEZIONE NEGATIVA CAN1

il gene *CAN1* codifica un'arginina permeasi

la canavanina è un analogo dell'arginina

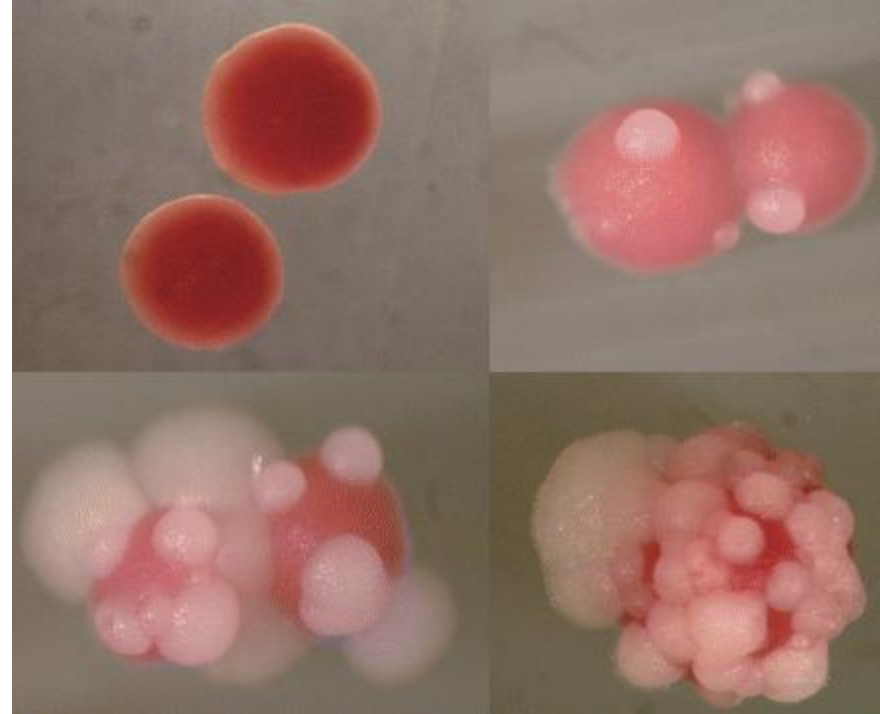
Aggiunta a terreni
sintetici privi di arginina

viene incorporata nelle proteine,
con conseguenze letali



I geni ADE1 e ADE2 codificano 2 enzimi della via biosintetica dell'adenina

Le mutazioni *ade1* e *ade2* causano la produzione di un pigmento rosso dovuto alla polimerizzazione dell'intermedio AIR (fosforibosilamino-imidazolo)



Le colonie rosse e quelle a settori sono facilmente individuabili a occhio nudo: è quindi agevole individuare

La complementazione della mutazione (incolori)

o la perdita del plasmide (rosse)

PROMOTORI

TATA box riconosciuto da TATA-Binding-Protein-TBP essenziale per la trascrizione

TATA(T/A)A(T/A)A

La distanza tra TATA box e start è di 40 -120 bp
(25-30 negli altri eucarioti)

UAS
(Upstream Activating Sequence)



Riconosciute dai fattori di
trascrizione

URS
(Upstream- Repression-Sequence)



Legame per i repressori

SEQUENZE OMOPOLIMERICHE dA/dT: facilitano
l'espressione costitutiva grazie alla loro struttura: non
interagiscono con DNA binding Proteins

Anche i promotori di lievito possono essere costitutivi o inducibili, forti o deboli

I promotori costitutivi che sono stati impiegati sono principalmente quelli delle vie glicolitiche (enolasi..)

Ma per gli stessi motivi considerati per i procarioti, è meglio scegliere promotori inducibili

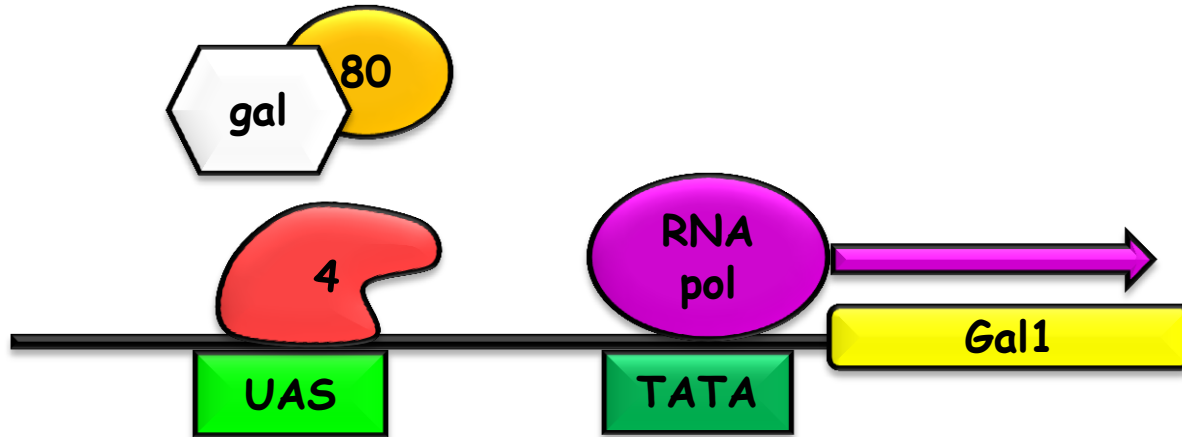
PGAL1 è uno dei promotori regolati più usati con *Saccharomyces*

le proteine Gal4p e Gal80p regolano la trascrizione dei geni strutturali

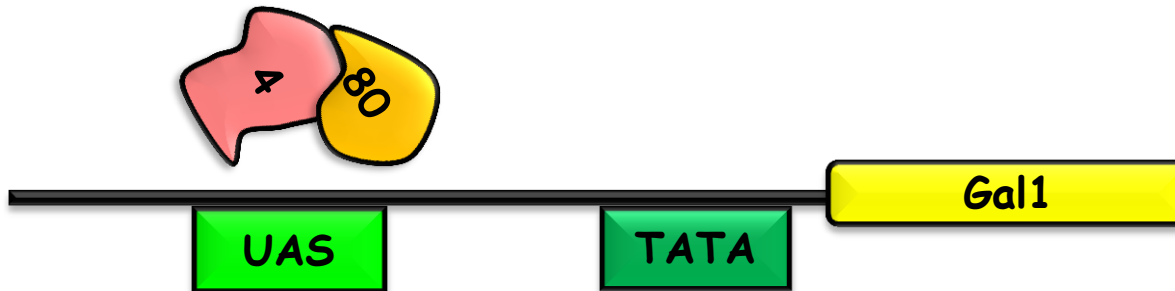
GAL1, (kinasi);
GAL2, permeasi;
GAL7, transferasi;
GAL10, epimerasi e
MEL1, galattosidasi,

Gal3p è necessaria per sintetizzare l'induttore intracellulare a partire dal galattosio

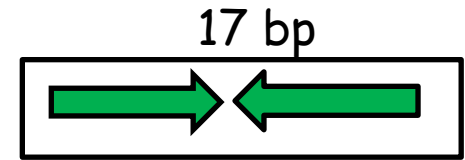
In presenza dell'induttore, Gal4p si lega ai siti di riconoscimento nella UAS (upstream activation sequence) e attiva la trascrizione



In assenza dell'induttore Gal80p si lega al C-terminus di Gal4p e maschera il dominio di attivazione



Le UAS dei geni strutturali *GAL* hanno una o più sequenze palindromiche di 17 basi a cui si lega Gal4p



I differenti livelli di trascrizione sono determinati dal numero e dalle combinazioni delle palindromi

La UAS dei geni *GAL1* e *GAL10* è compresa in un frammento di 365-bp chiamato P_{GAL1}



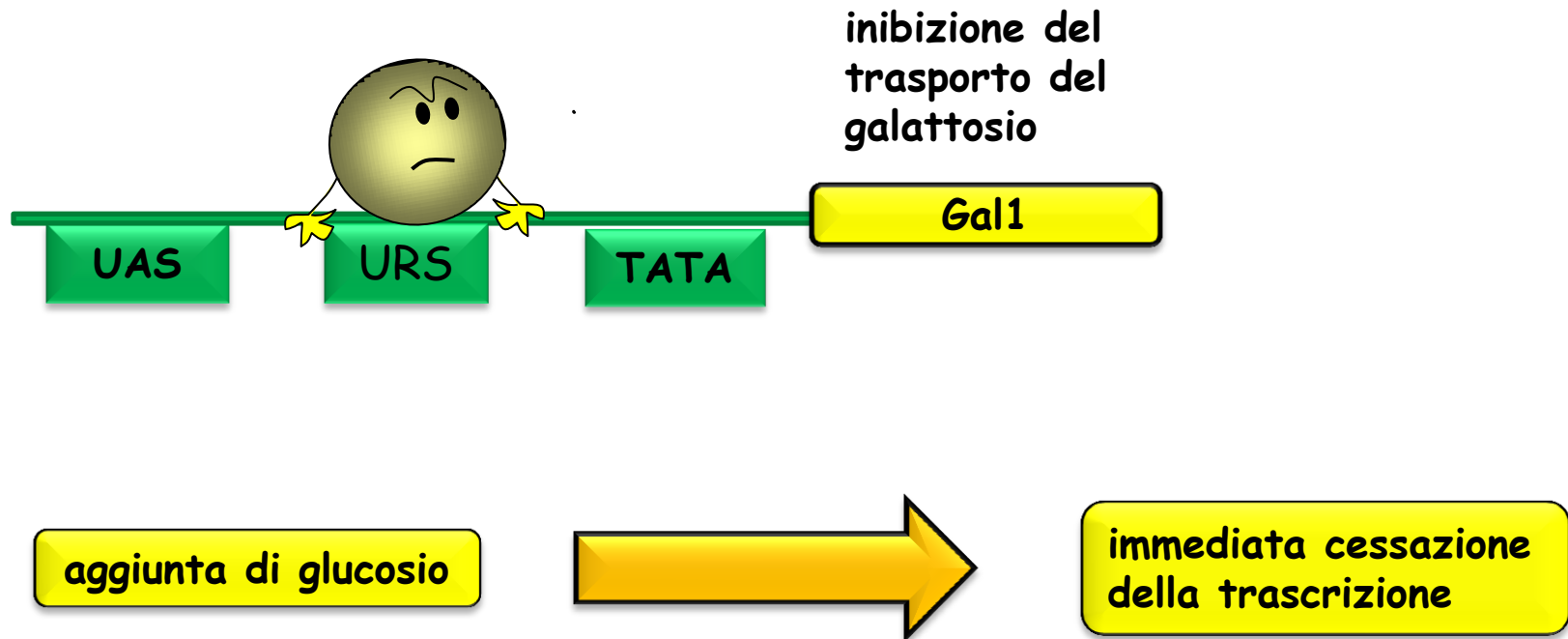
UAS *GAL* 1-10 è sufficiente per ottenere la massima espressione e la completa repressione dei geni

P_{GAL1} dirige rapidamente l'espressione di geni clonati a valle (1000 x con aggiunta di Gal in terreni privi di carboidrati)

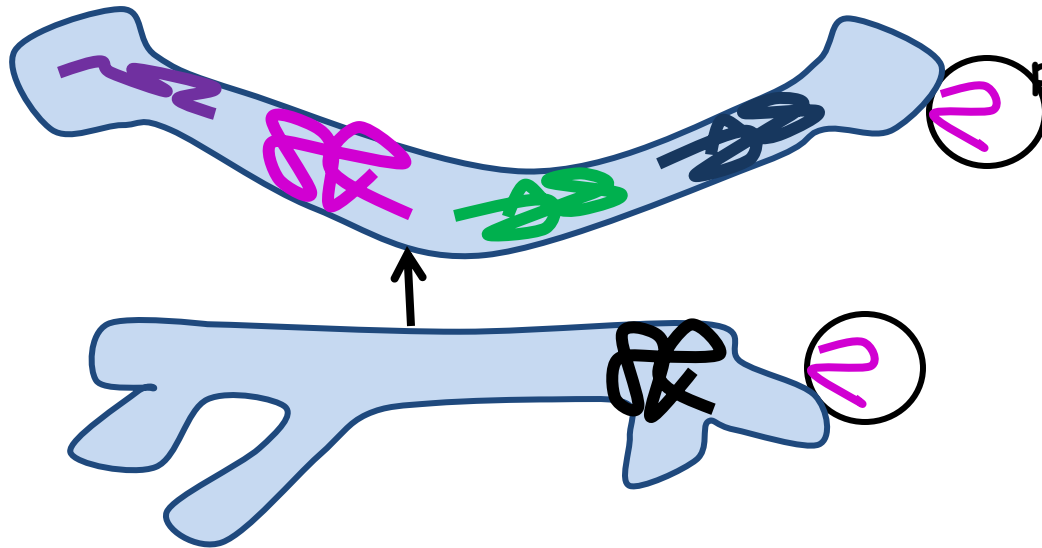
P_{GAL1} è stato usato in moltissimi studi e
nella produzione eterologa di proteine

Un ulteriore vantaggio è la possibilità di repressione
mediante glucosio anche in presenza di galattosio

Mediata dall'azione di repressori in corrispondenza
di URS localizzati tra UAS e TATA



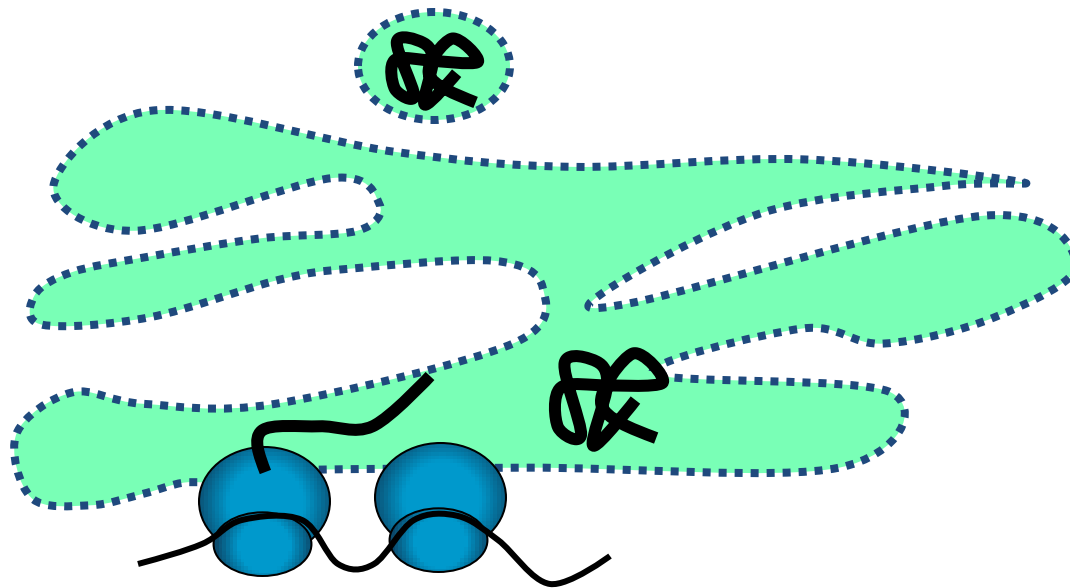
LA SECREZIONE



Da stadi più avanzati alcune vescicole tornano a quelli precedenti, con proteine destinate a quei comparti

Passaggio attraverso
cis- medio e trans
Golgi → modificazioni

Fusione delle
vescicole con il
reticolo di Golgi
(→ cis-Golgi)

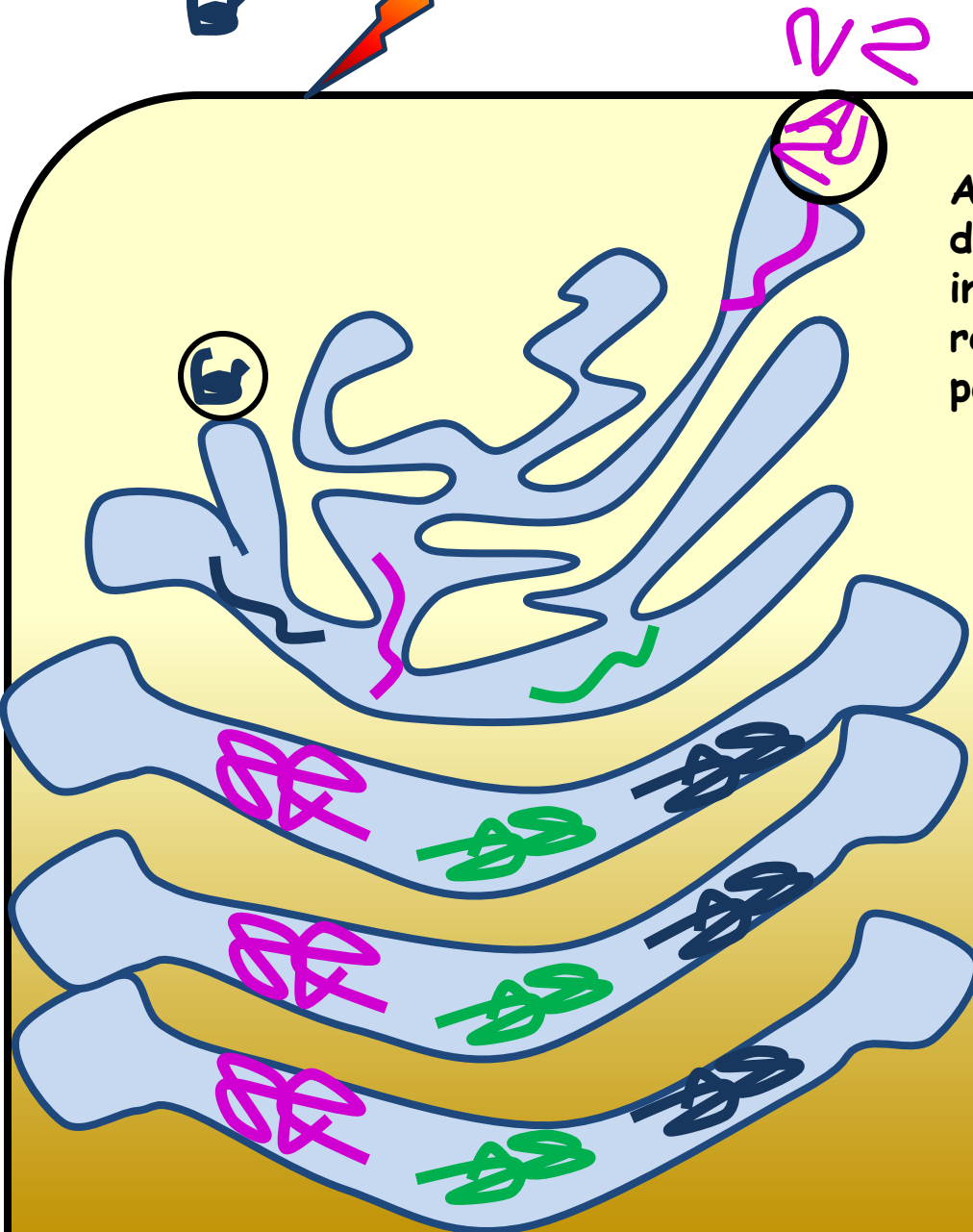


Passaggio alle
vescicole

(modificazioni)

Passaggio dal ribosoma a RE
durante la sintesi

Il passaggio per la via di secrezione favorisce il folding: nel reticolo si trovano chaperonine

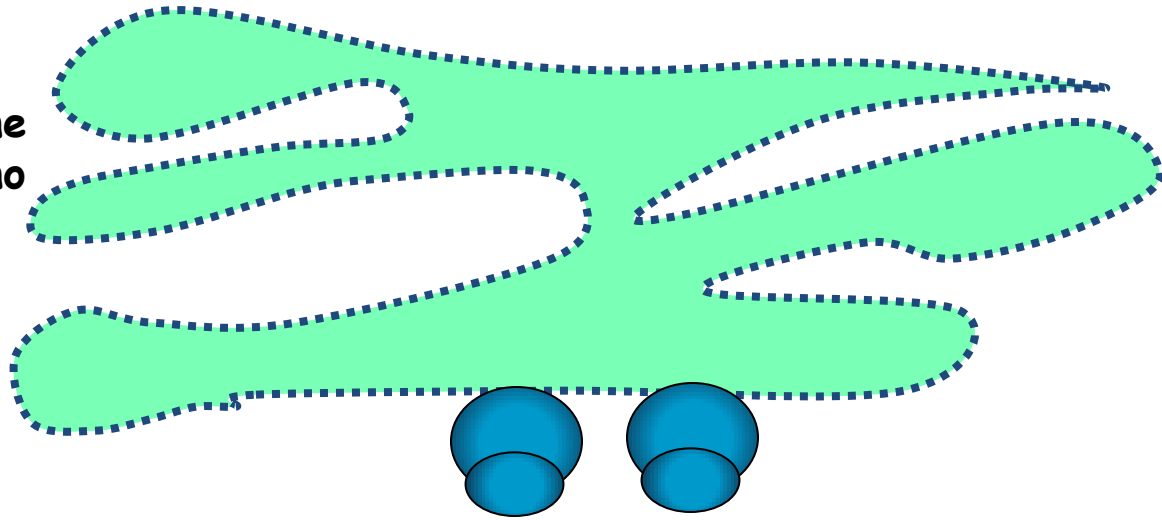
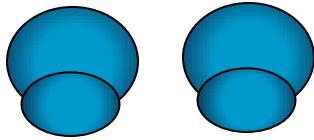


Altre proteine sono secrete in modo discontinuo: una volta nel trans-Golgi sono immagazzinate in vescicole secretorie che restano in attesa dello stimolo necessario per la secrezione

Alcune proteine sono secrete di continuo (costitutivamente)

Le cisterne, con il contenuto di proteine, si spostano verso la faccia trans del Golgi

I ribosomi che sintetizzano proteine destinate alla secrezione aderiscono alla faccia citosolica del RE

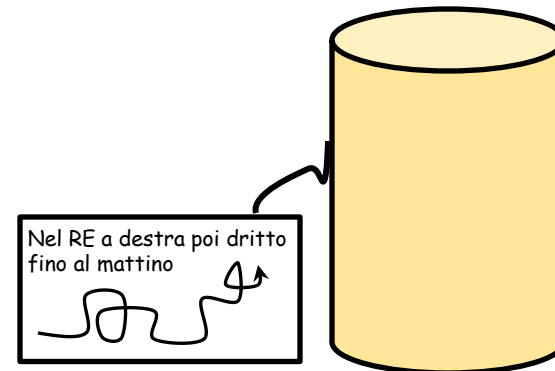


Quelli che sintetizzano le proteine citosoliche restano liberi nel citoplasma

I ribosomi liberi hanno una costante di sedimentazione diversa da quelli legati

Ma le proteine, gli rRNA e la funzionalità dei due gruppi sono indistinguibili

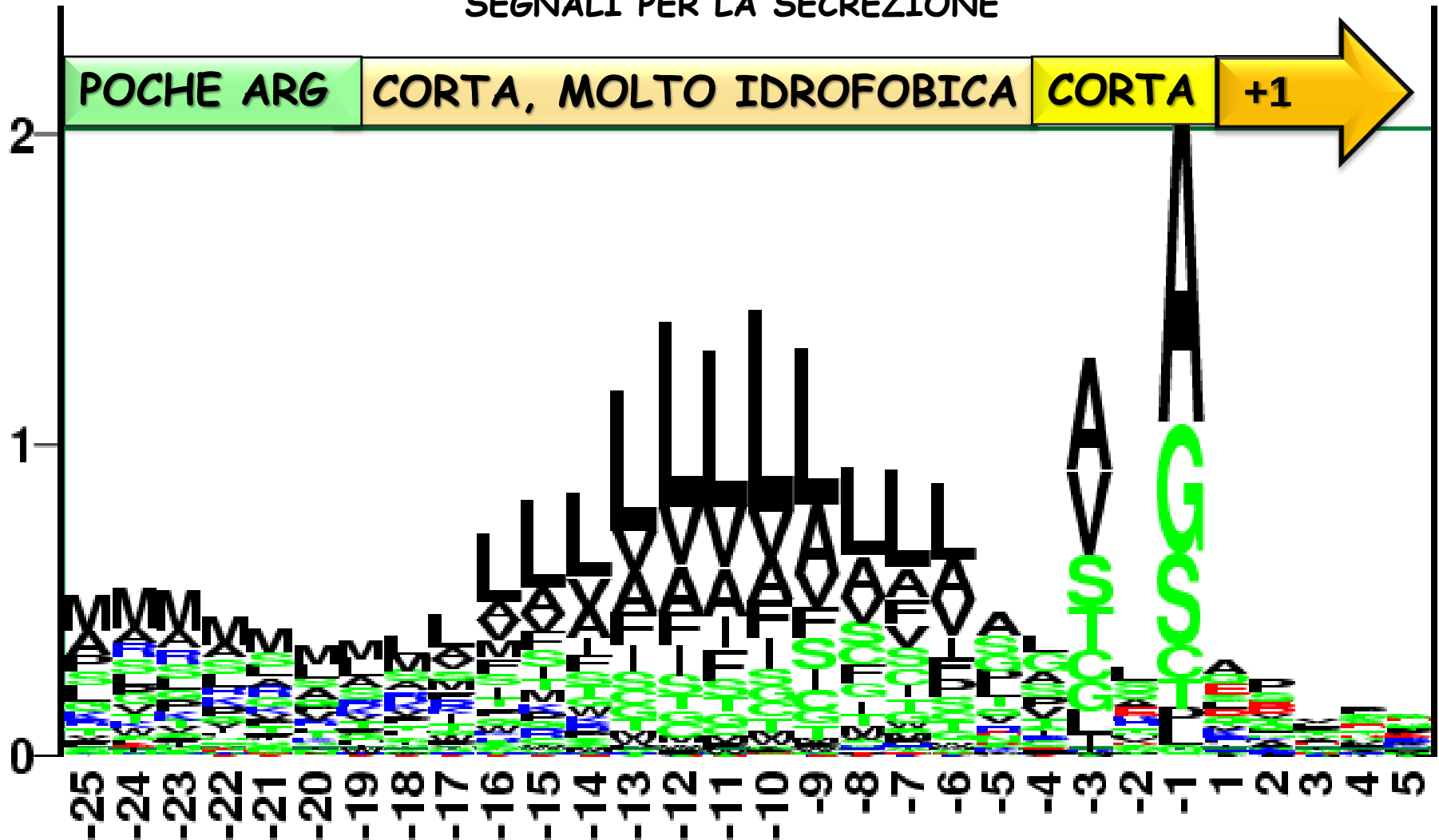
l'informazione sulla destinazione delle proteine all'interno della cellula è contenuta nella sequenza della proteina stessa



Nel RE a destra poi dritto fino al mattino

SEGNALI PER LA SECREZIONE

bits



Lunghezza media 22 aa

N- moderatamente ricca in arg

H- corta e molto idrofobica (carattere più accentuato che nei batteri)

C- corta senza caratteristiche definite

-3, -1 residui piccoli e neutri

PLASMIDI DI LIEVITO

I vettori disponibili per *Saccharomyces* rientrano in quattro categorie

YIp (INTEGRATIVI) YRp (REPLICATIVI) YEp (EPISOMALI) YCp (CENTROMERICI)

	YIp	YEp	YRp	YCp
Geni o frammenti di <i>E. coli</i> (ori, Bla, tet..)	+	+	+	+
URA3; HIS3; LEU2; TRP1; LYS2; etc.	+	+	+	+
<i>Leu2-d</i>	0	+	+	0
2 μ m; 2 μ m-ori, REP3	0	+	0	0
ARS1; ARS2; ARS3; etc.	0	0	+	+
CEN3; CEN4; CEN11; etc	0	0	0	+
Stabilità	++	+	±	+

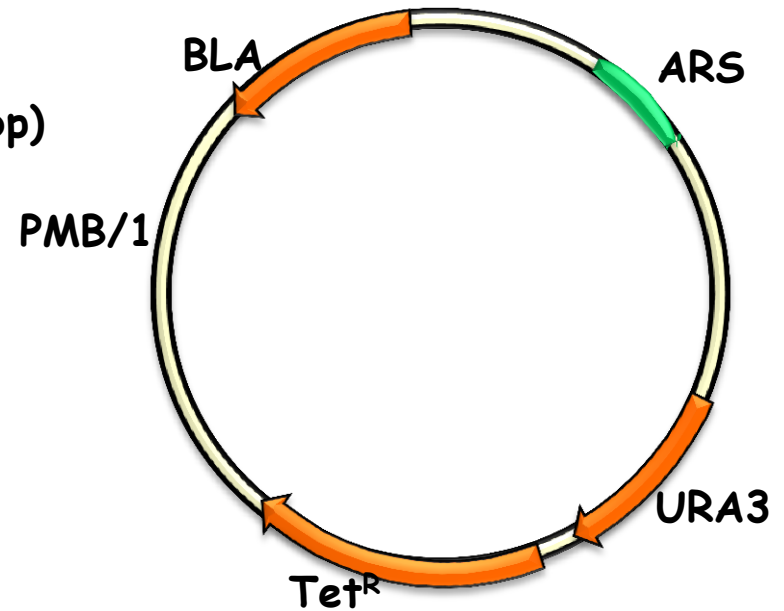
Calcolata come % di colonie con il plasmide dopo una coltura over-night (~10 divisioni cellulari) in assenza di selezione

Le ARS (Autonomous Replication Sequence) sono state individuate proprio per la loro capacità di supportare la replicazione di minicromosomi o di plasmidi

la regione essenziale che recluta le proteine coinvolte nella replicazione è molto corta (~ 11 bp) sui vettori se ne mettono ~ 100 bp

I vettori YRp raggiungono un buon numero di copie (5-50) ma sono estremamente instabili

In assenza di selezione vengono persi dalle cellule al ritmo di circa 1/10 per generazione



PER QUESTO MOTIVO NON VENGONO IMPIEGATI E LA MAGGIOR PARTE DEI VETTORI SHUTTLE RIENTRA IN UNA DELLE ALTRE CATEGORIE

YIp (VETTORI INTEGRATIVI)

Si integrano a bassa frequenza
per ricombinazione omologa

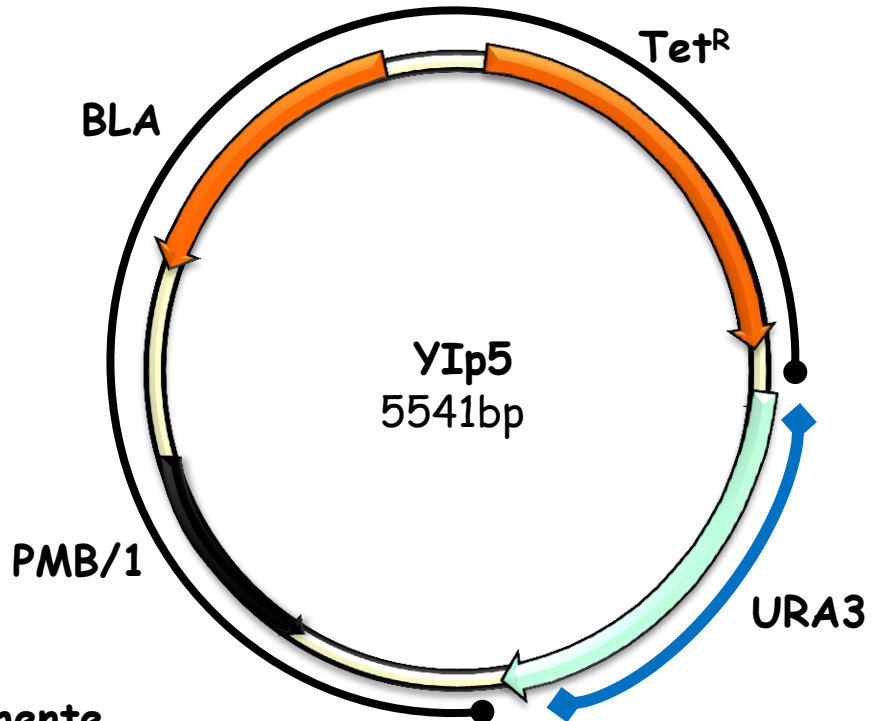
scheletro di un vettore di clonaggio di
E. coli (pBR322, pUC19, BLUESCRIPT)



marcatore selezionabile di lievito
(*URA3*, *HIS3*, *TRP1*, *LEU2*)

Non sono in grado di replicarsi autonomamente
in lievito: vengono mantenuti solo se si
integrano nei cromosomi della cellula ospite

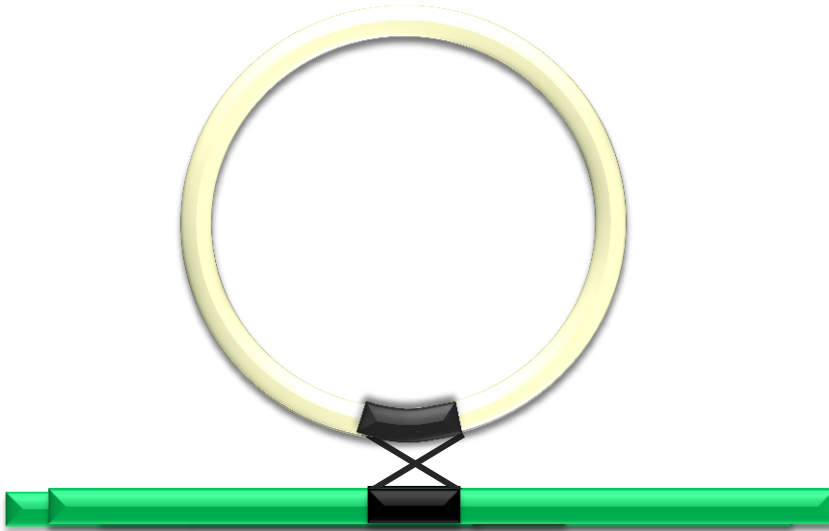
Normalmente si integrano in singola copia, ma
eccezionalmente possono verificarsi integrazioni multiple



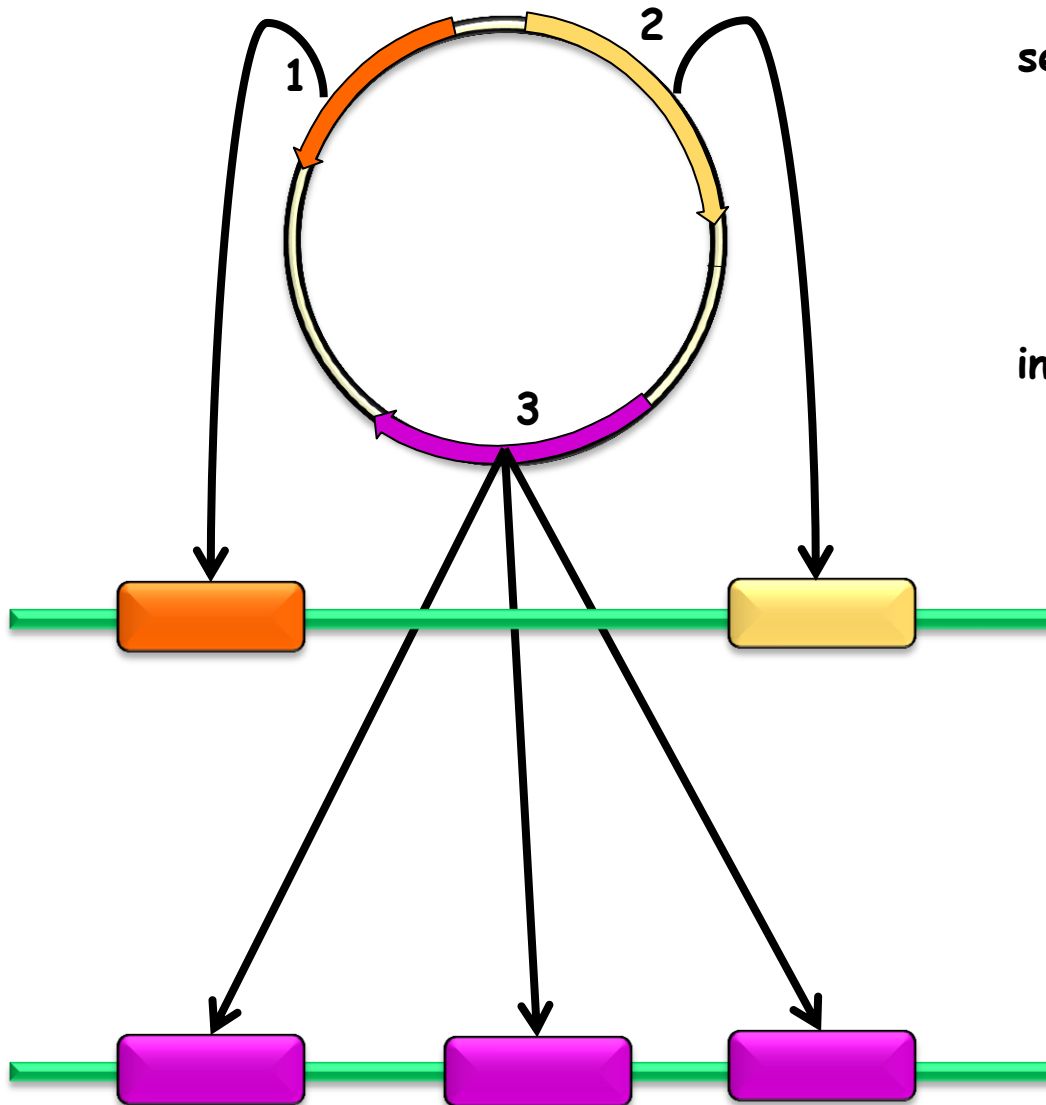
L'integrazione avviene mediante ricombinazione omologa
(per esempio attraverso il marcatore selezionabile)

La sequenza target, che fiancheggia il
vettore integrato, si duplica

I plasmidi integrati sono generalmente
stabili nel corso delle generazioni



occasionalmente (frequenza 10^{-3} - 10^{-4}) possono ristaccarsi
per ricombinazione omologa tra le sequenze duplicate



Se nel plasmide sono presenti più
sequenze di lievito (es. due marcatori)



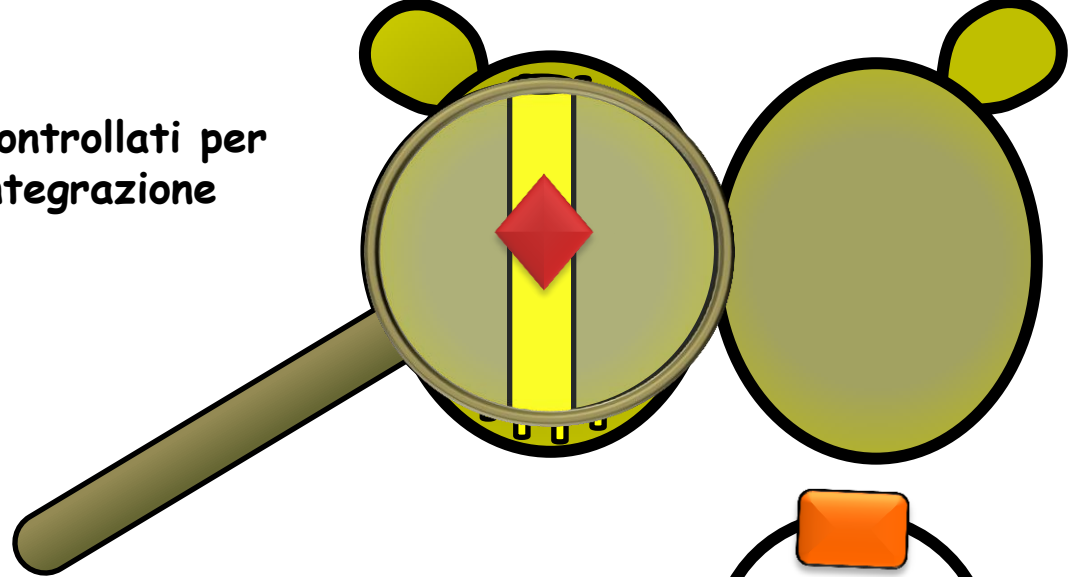
l'interazione può avvenire
indifferentemente in una delle regioni
omologhe

Se è presente una sequenza che è
ripetuta nel genoma



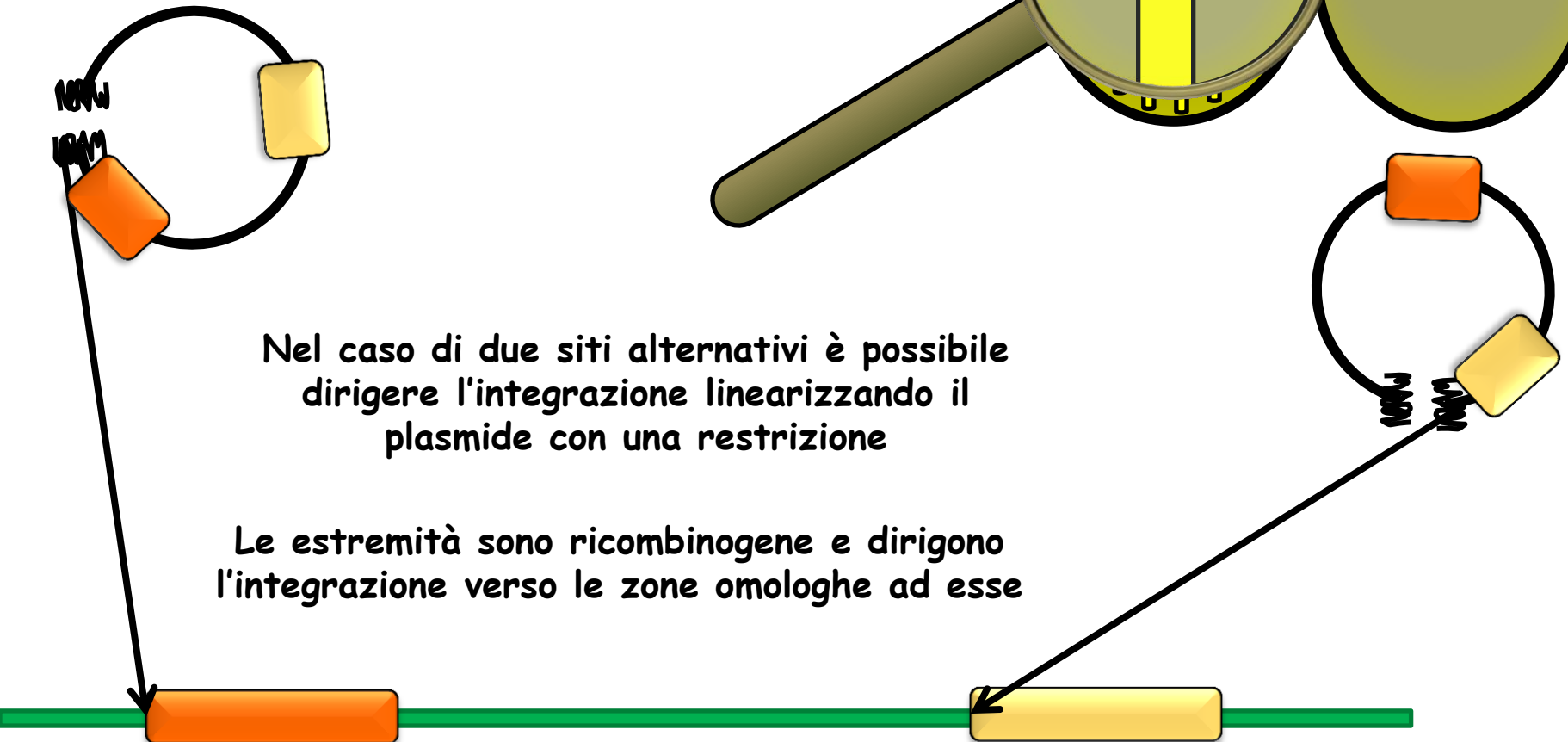
l'integrazione può avvenire
indifferentemente in una delle
ripetizioni

I ceppi integranti vanno quindi controllati per PCR per verificare il sito di integrazione



Nel caso di due siti alternativi è possibile dirigere l'integrazione linearizzando il plasmide con una restrizione

Le estremità sono ricombinogene e dirigono l'integrazione verso le zone omologhe ad esse



la linearizzazione del plasmide aumenta l'efficienza di ricombinazione (circa 50 x)

YCp (REPLICATIVI CENTROMERICI)

scheletro di un vettore di clonaggio di
E. coli (pBR322, pUC19, BLUESCRIPT)



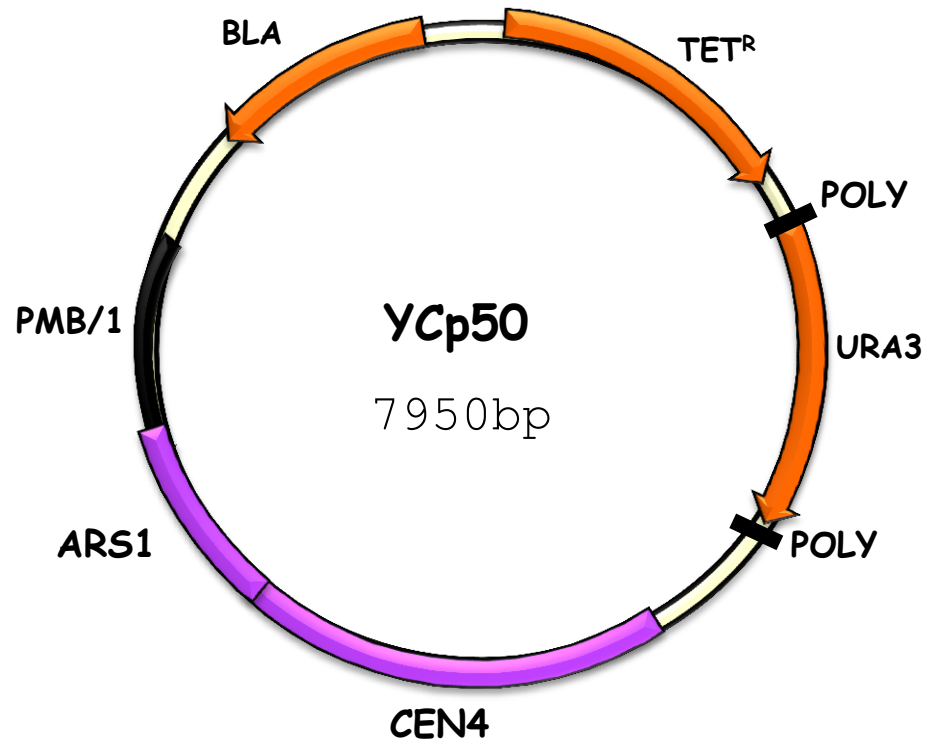
marcatore selezionabile di lievito
(*URA3*, *HIS3*, *TRP1*, *LEU2*)



un'origine di replicazione
cromosomica di lievito ARS



Il centromero CEN di
un cromosoma di lievito



Si propagano stabilmente con basso
numero di copie (generalmente una)

YE_p (REPLICATIVI EPISOMALI)

scheletro di un vettore di clonaggio di
E. coli (pBR322, pUC19, BLUESCRIPT)



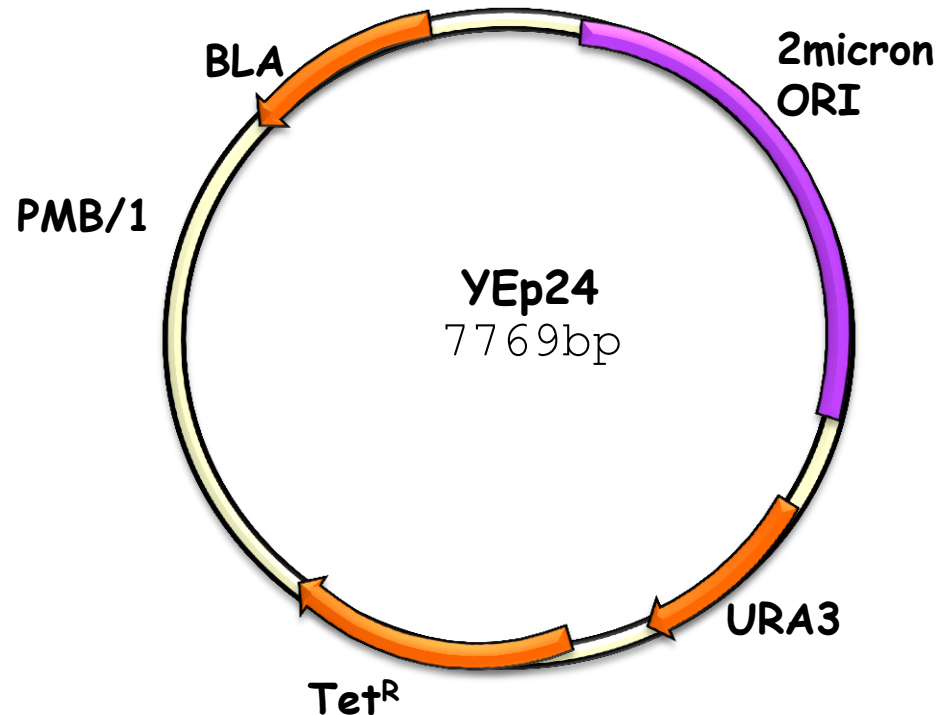
marcatore selezionabile di lievito
(*URA3*, *HIS3*, *TRP1*, *LEU2*)



l'origine di replicazione del plasmide
naturale di lievito 2micron

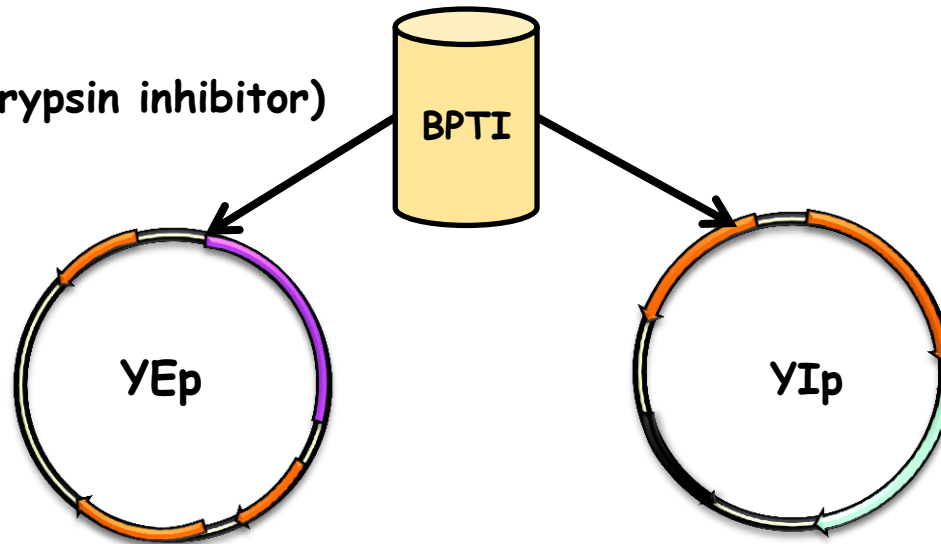
Vengono replicati stabilmente e mantenuti
in circa 20-50 copie per cellula

Il numero di copie può essere aumentato fino a 200 usando come
marcatore selezionabile un gene *LEU2* difettivo



L'instabilità intrinseca dei vettori multicopie può essere alla base di una secrezione difettosa

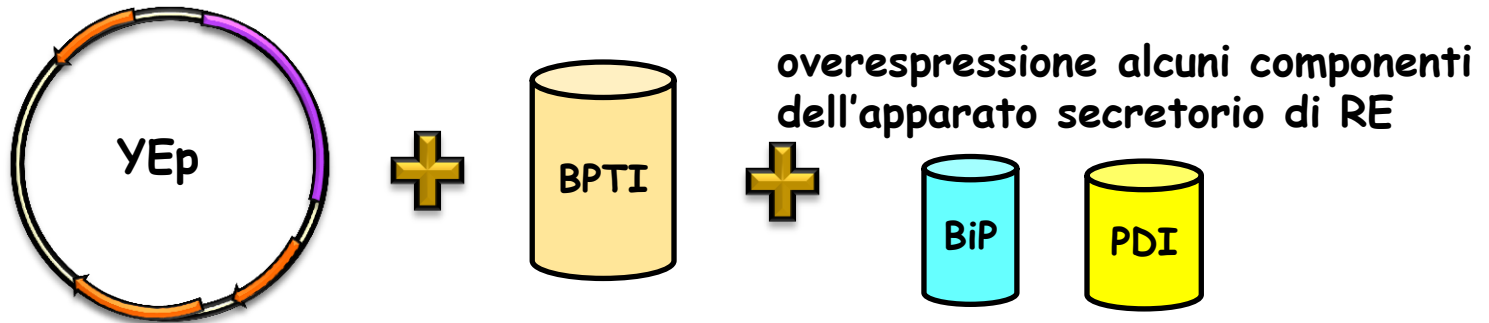
(bovine pancreatic trypsin inhibitor)



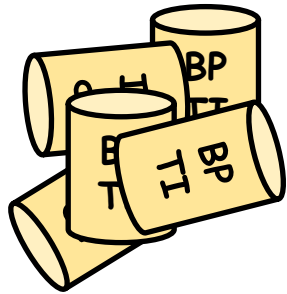
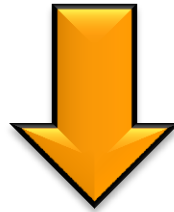
Accumulo di proteine non ripiegate nel RE, aggregazione e collasso di RE, blocco della secrezione

Migliore resa e secrezione già con una sola copia: ottimale 10 copie

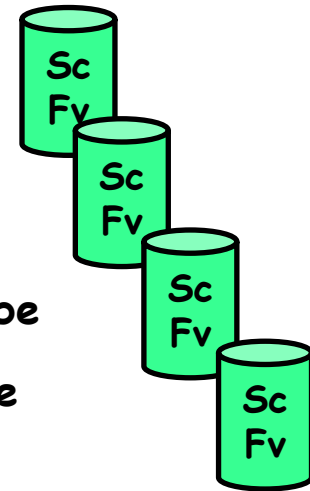
Strategia alternativa



BiP chaperonina : lega i polipeptidi nel RE durante la traslocazione e
PDI disolfuro-isomerasi : catalizza formazione e isomerizzazione dei ponti S-S in RE



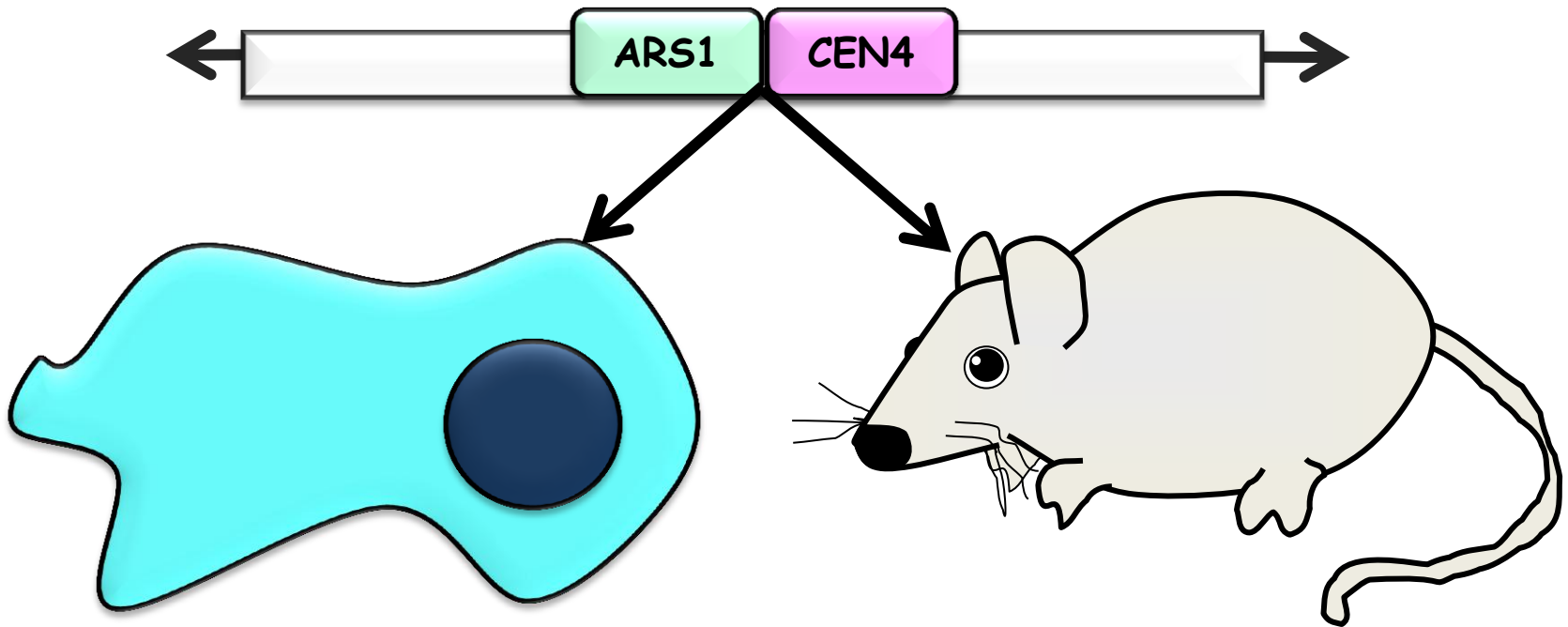
L'espressione di BPTI non migliora
quella di altre molecole (ScFv) migliora:
2x con le singole componenti, 8x con entrambe
E' importante anche la struttura: BPTI tende
ad aggregare spontaneamente



CROMOSOMI ARTIFICIALI DI LIEVITO (YAC)

I plasmidi YAC possono reggere frammenti eterologhi di 200 - 800 kb

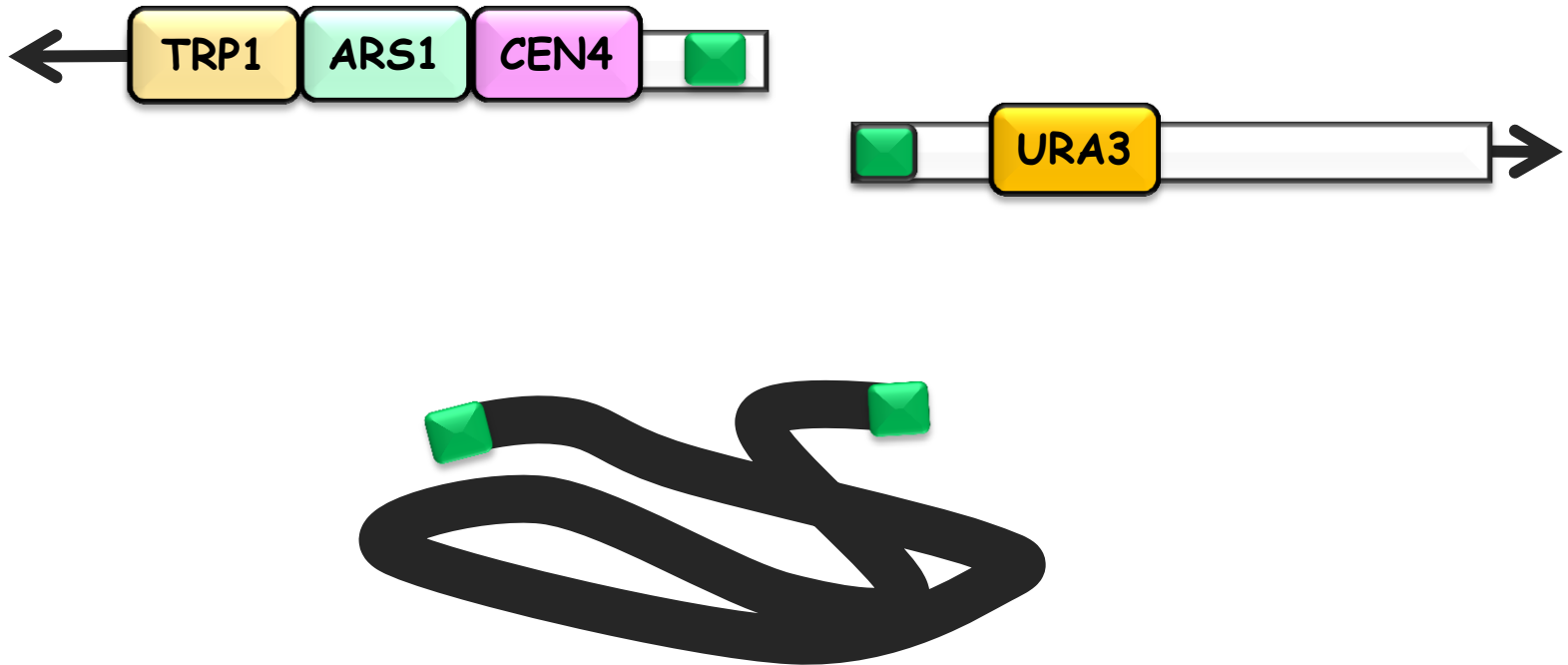
si basano su plasmidi lineari di lievito (YLp) con un segmenti ARS e CEN e con sequenze (omologhe o eterologhe) che *in vivo* assumono le funzioni di telomeri



L'importanza degli YAC è aumentata di recente grazie ai metodi messi a punto per trasferirli a cellule in coltura e a linee germinali di animali da esperimento

Clonaggio con ricombinazione specifica *in vivo* con un vettore YAC

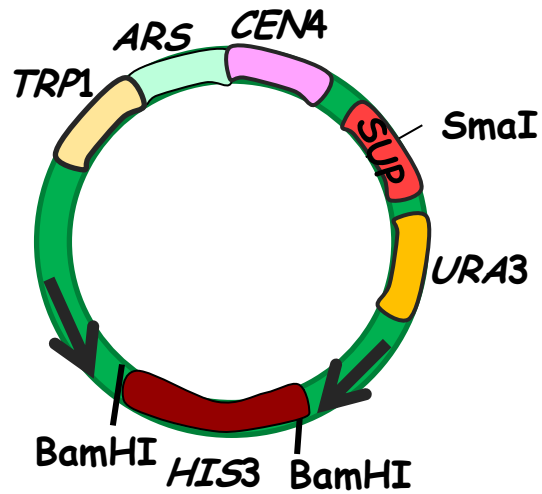
Il lievito viene trasformato con le due braccia di un vettore YAC e frammenti di DNA eterologo di grandi dimensioni



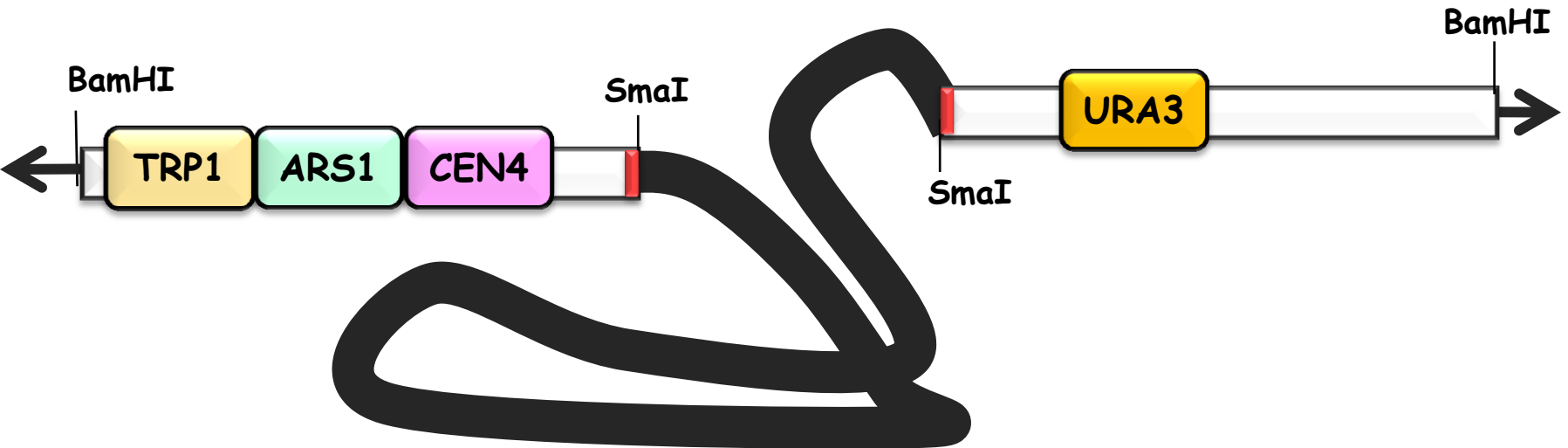
La ricombinazione *in vivo* risulta nella formazione di un clone YAC specifico

Le due braccia del vettore YAC sono derivate da plasmidi linearizzati che contengono segmenti omologhi alle estremità del DNA da clonare

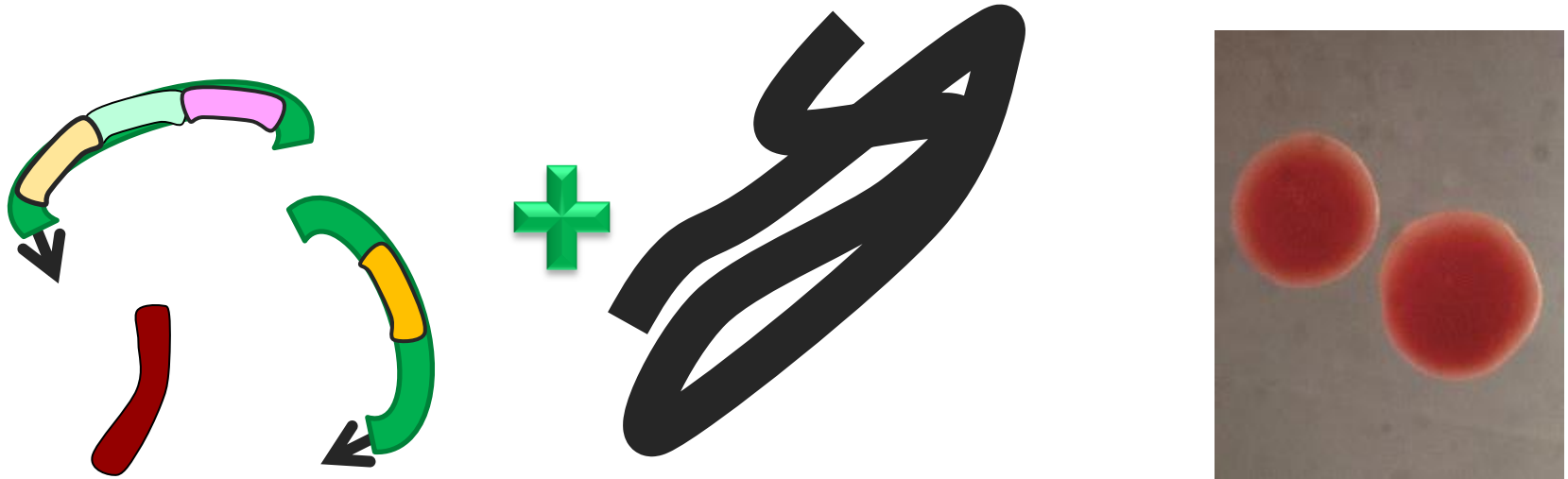
Es: clonaggio in YAC per ligazione *in vitro*
Il ceppo ospite è *ade2*, *ura3*, *trp1*, *his3*



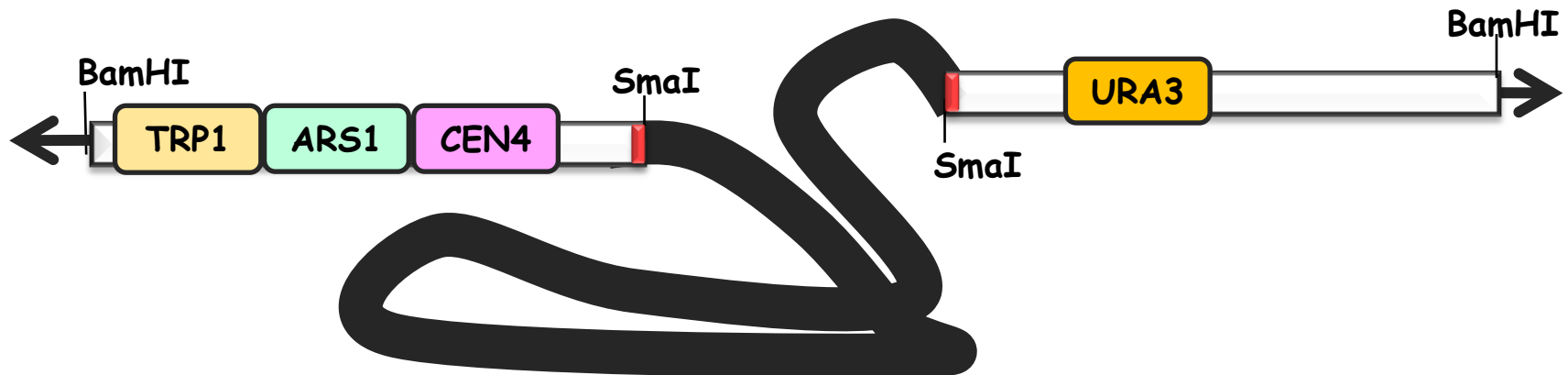
Il sito *Sma*I si trova all'interno del gene *SUP4* che sopprime la mutazione *ade2* presente nel ceppo



I frammenti della digestione *Bam*HI+*Sma*I, defosforilati, sono legati con DNA eterologo digerito *Sma*I



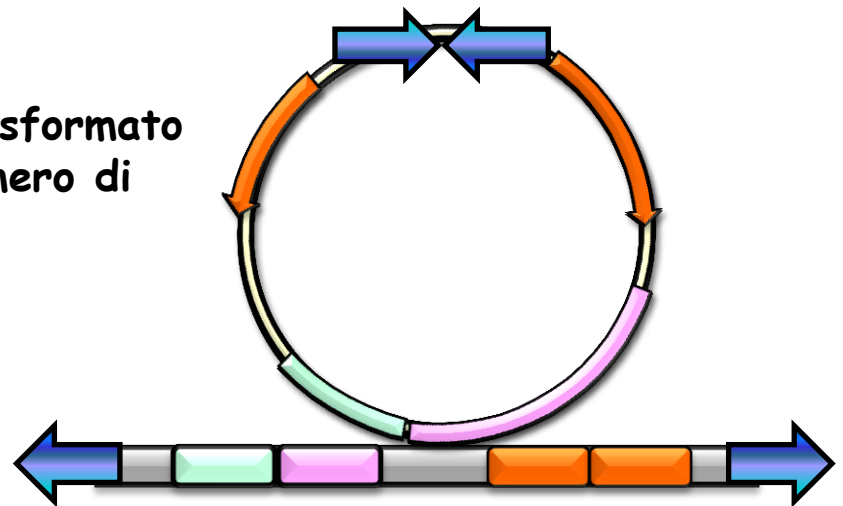
I trasformanti dovranno essere *Ura*⁺, *Trp*⁺ e mantenere l'auxotrofia per *His*. Le colonie saranno rosse per via dell'inattivazione di *SUP4* che non controlla più *ade2*



La manipolazione degli YLp è disagiata per via della loro incapacità di essere propagati in *E. coli*

Ma è possibile ottenere vettori YAC circolari in *E. coli* ma lineari in lievito (in vivo)

un vettore YCp circolare può essere trasformato in YAC inserendovi un dimero di telomero di *Tetrahymena* o di lievito



dopo la trasformazione in lievito questo plasmide sarà risolto in una molecola lineare con le estremità libere terminate da un telomero funzionale

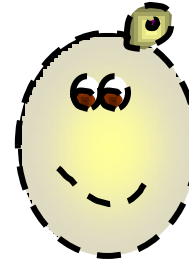
TRASFORMARE IL LIEVITO

SFEROPLASTI

LITIO

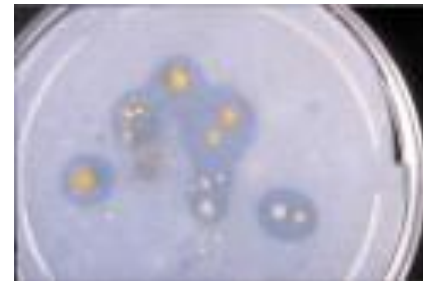
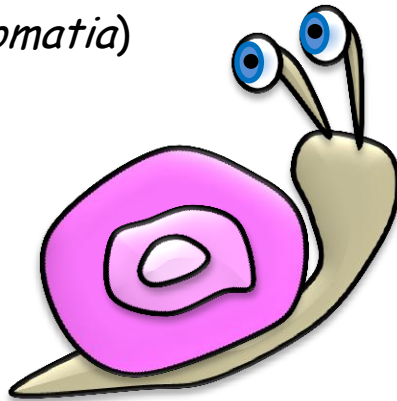
ELETTROPORAZIONE

SFEROPLASTI



Le cellule vanno trattate, in presenza di stabilizzatori osmotici (sorbitolo 1M) con enzimi idrolitici

glusulasi (estratto dall'intestino della lumaca *Helix pomatia*)



Zymolyasi: un enzima prodotto da *Arthrobacter luteus*

Si aggiunge il DNA agli sferoplasti

Si co-precipita la mistura con
una soluzione di PEG e Ca^{2+}

Si sospendono le cellule in una soluzione di sorbitolo mischiato con agar
sciolto e si allestisce un overlay su piastre selettive con sorbitolo



Questa tecnica è laboriosa e lunga ma
permette di ottenere buoni risultati



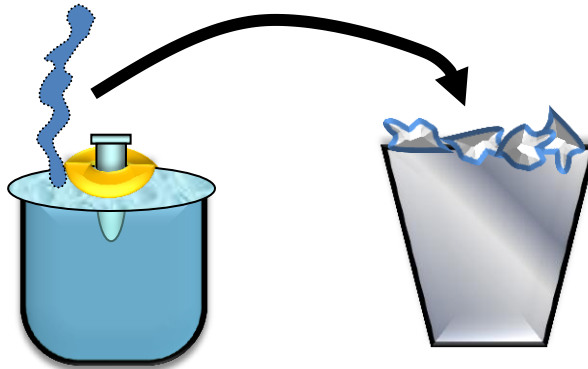
ACETATO DI LITIO

L'acetato di litio si usa per permeabilizzare le cellule

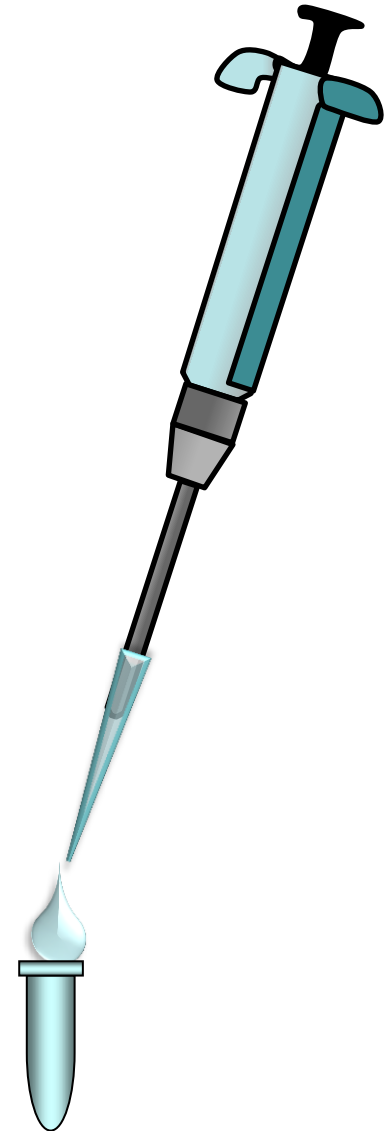


aggiungere DNA e coprecipitare con il PEG

Dopo un breve shock termico

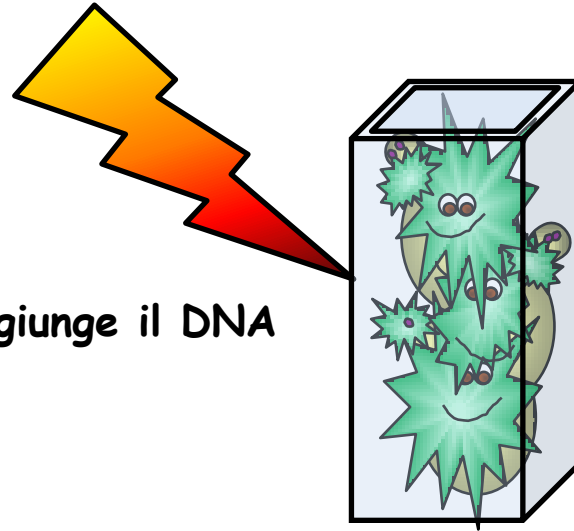


si lava senza PEG e senza acetato di litio e si semina per spatolamento su piastre di terreno selettivo



le cellule per l'elettroporazione si preparano raccogliendole da una coltura fresca , lavandole e sospendendole in sorbitolo

si aggiunge il DNA



si sottopone la sospensione all'impulso elettrico in un elettroporatore

In seguito si semina per spatolamento su terreni selettivi



L'efficienza di trasformazione può essere aumentata oltre 100 volte

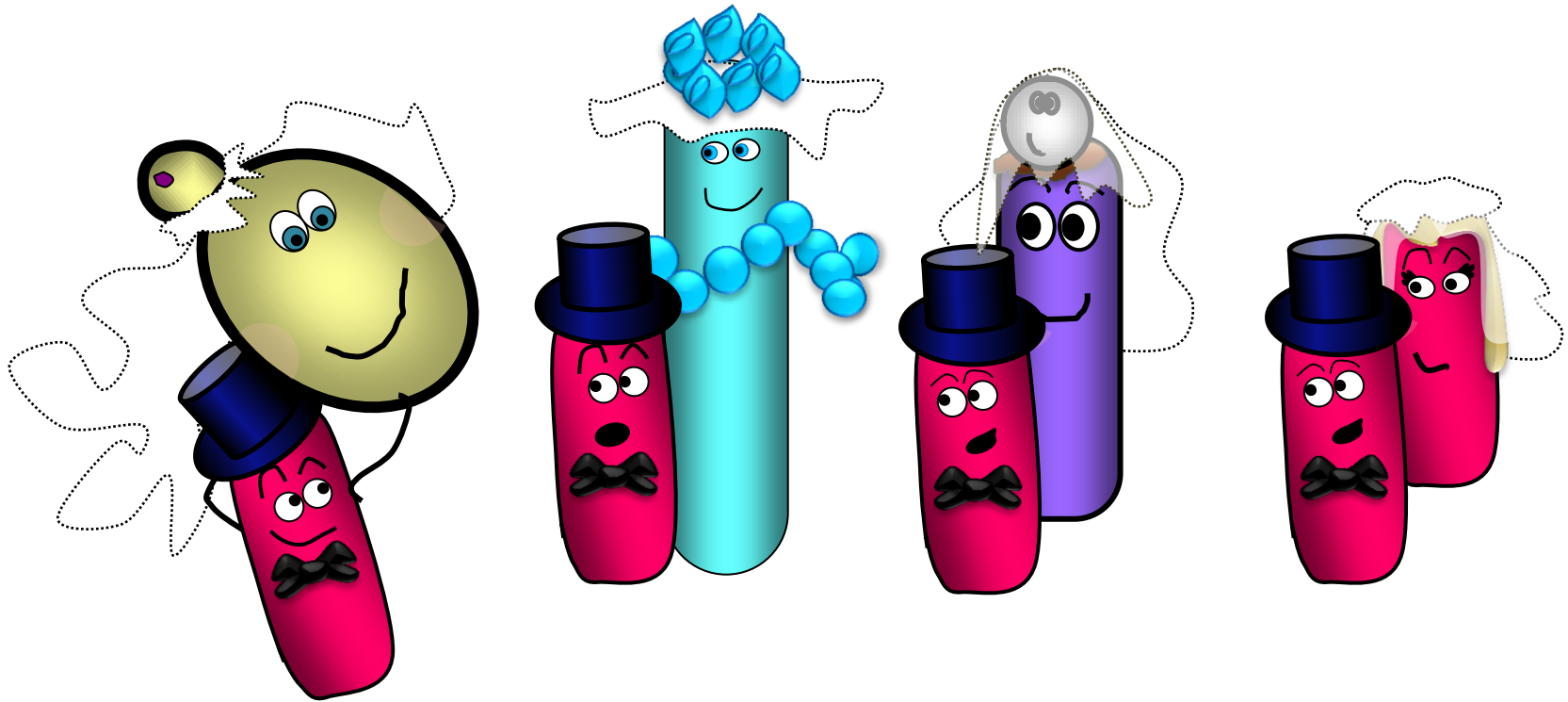
cellule in tarda fase logaritmica

ssDNA carrier

PEG

CONIUGAZIONE *E. coli* - *S. cerevisiae*

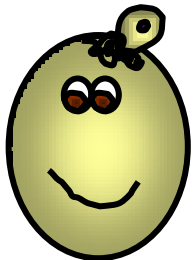
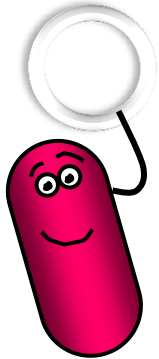
La possibilità di una coniugazione "Trans-Kingdom" è stata osservata già nel 1989



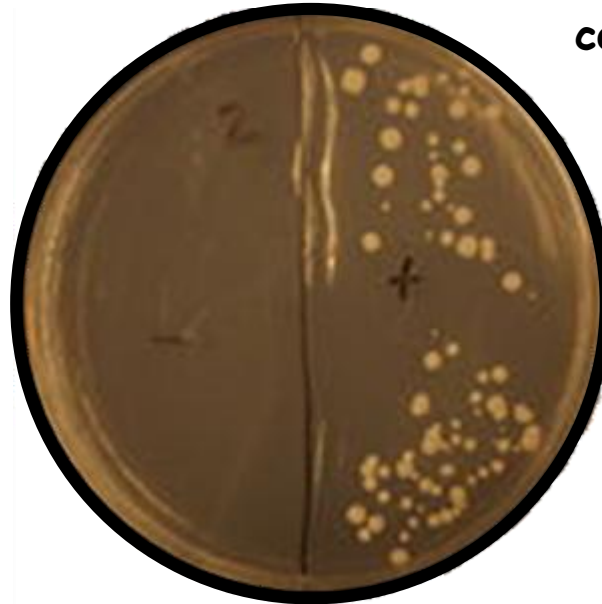
Alcuni plasmidi coniugativi IncP "promiscui" possono operare un TGO non solo tra batteri diversi ma anche tra batteri e lieviti

Questo fenomeno è naturale

Batteri con il solo
plasmide shuttle

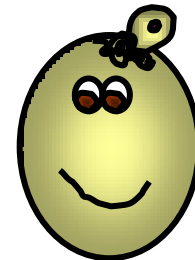
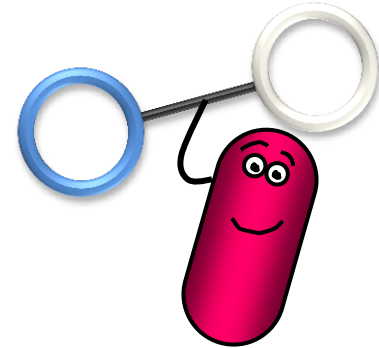


Lievito *leu2*



TERRENO PER LIEVITI CON
AMPICILLINA E LEUCINA

Batteri con 2 plasmidi:
coniugativo e shuttle

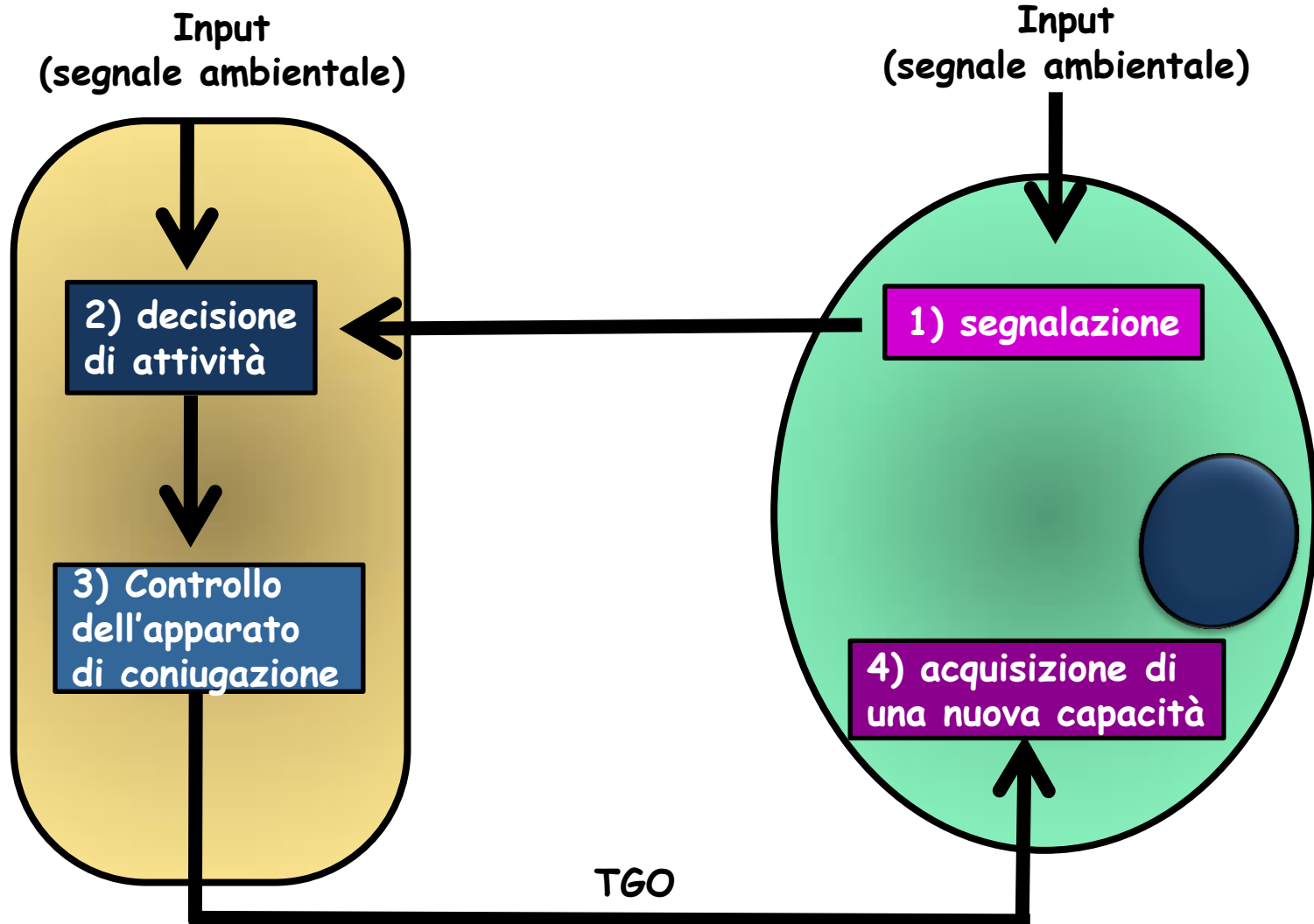


Lievito *leu2*

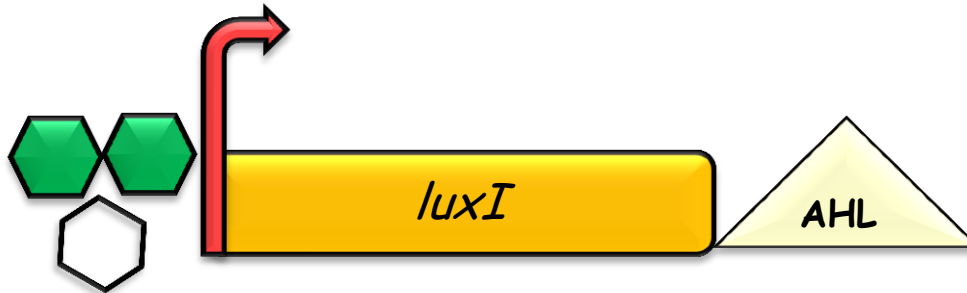
Ma può essere controllato per farne uno
strumento biotecnologico utile

Come nel progetto di un gruppo
dell'Università di Washington

che ha messo a punto un sistema a
moduli destinati a interagire



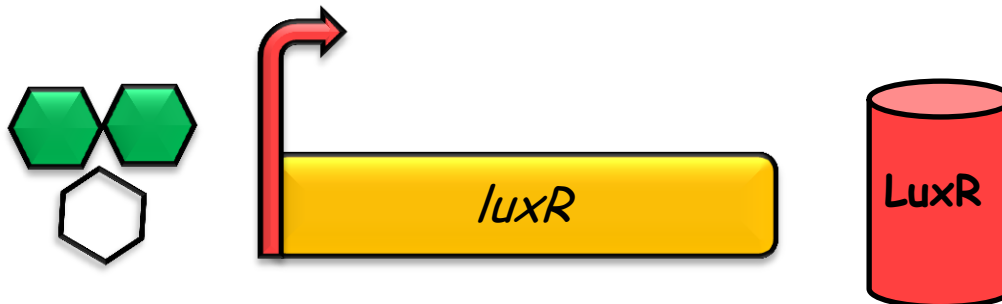
Il gene batterico per la sintesi di AHL (*luxI*) è stato messo sotto il controllo di un promotore naturale di lievito attivato dal lattosio e represso dal glucosio



II° MODULO (*E.coli*): DECISIONE DI AZIONE

Il gene che codifica LuxR è posto sotto il controllo di Plac wild-type e integrale (attivato dal lattosio - represso dal glucosio)

AHL entra liberamente nella cellula di *E. coli* e si complessa con LuxR



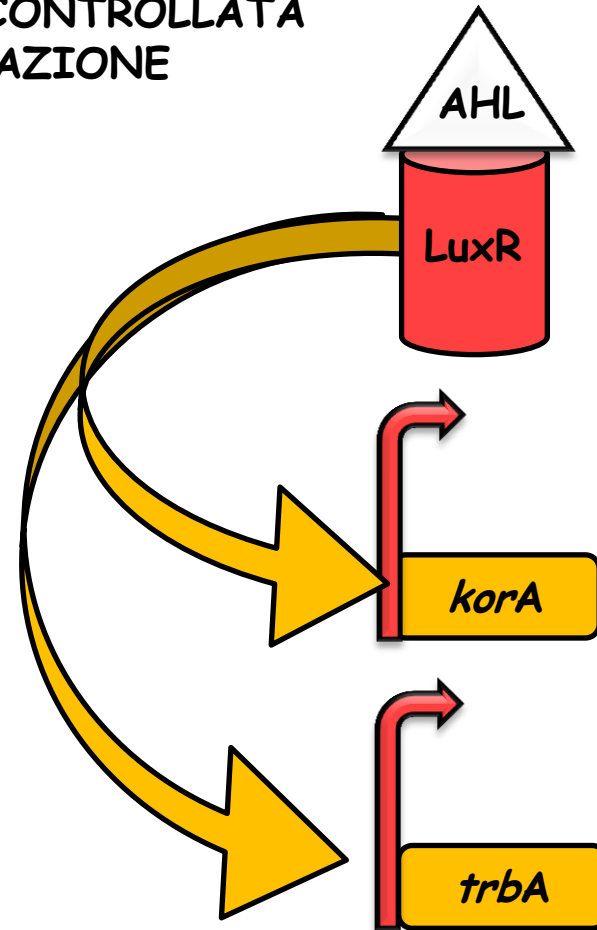
III° MODULO (*E. coli*): SINTESI CONTROLLATA DELL'APPARATO DI CONIUGAZIONE

Il complesso AHL+ luxR attiva il promotore PLux

I geni essenziali per il trasferimento sono stati messi sotto il controllo di questo promotore

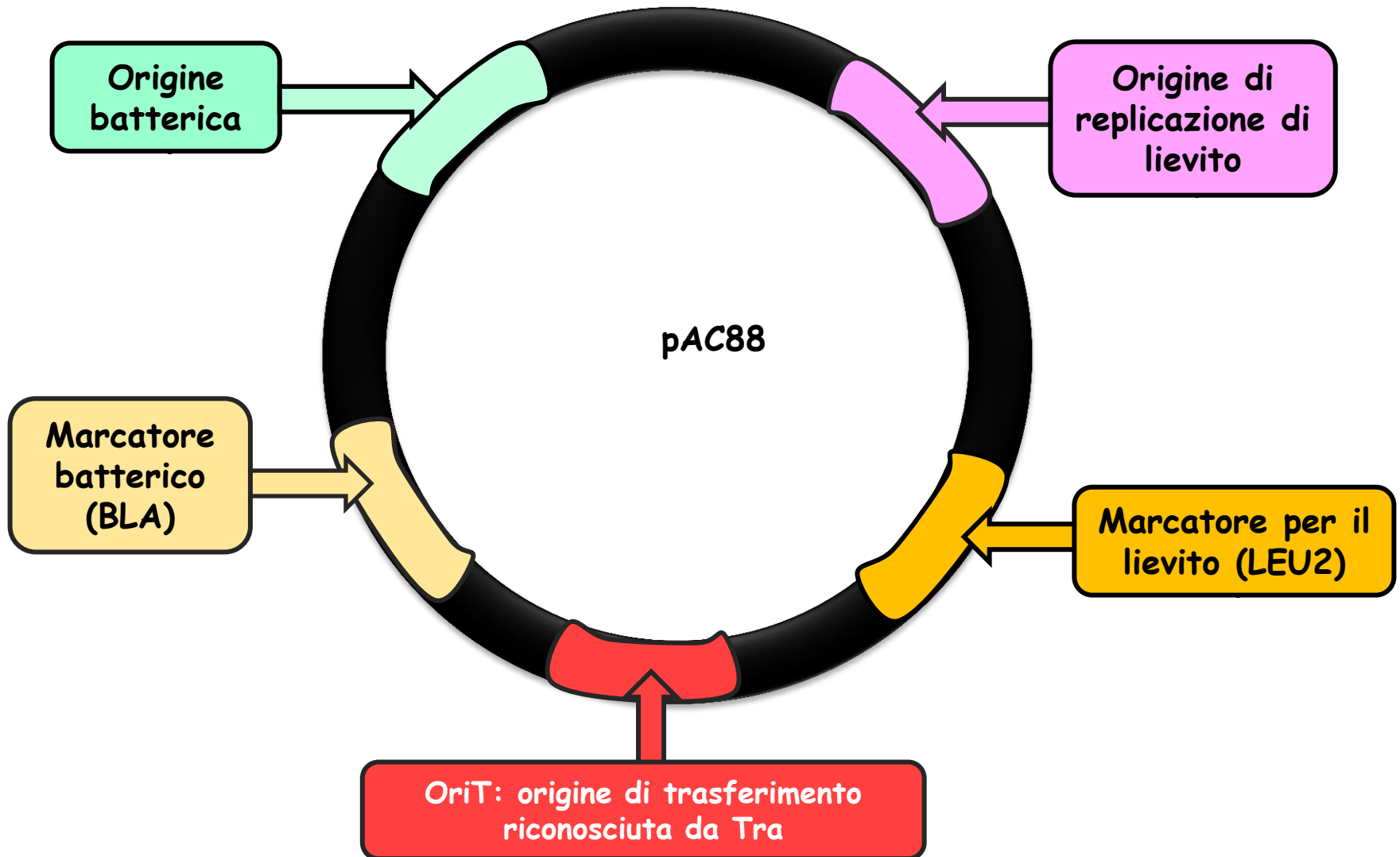
TrbA: regolatore trascrizionale per l'operone TraII

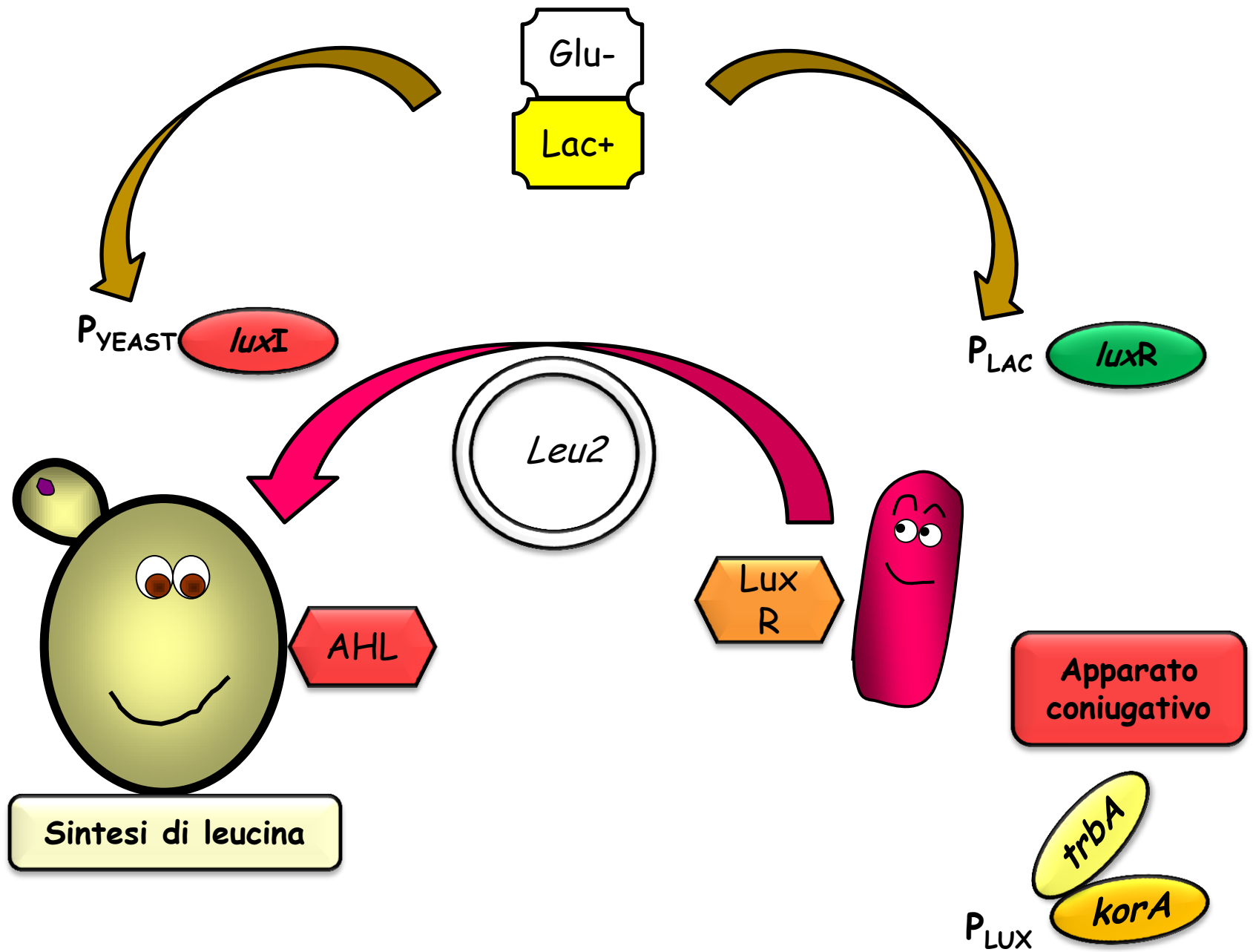
KorA: esprime una proteina di regolazione globale con siti di legame multipli lungo la sequenza del plasmide coniugativo



L'apparato coniugativo si mette in moto in risposta al segnale del lievito, emesso a seguito delle condizioni imposte

Il plasmide shuttle che ne viene trasferito ha

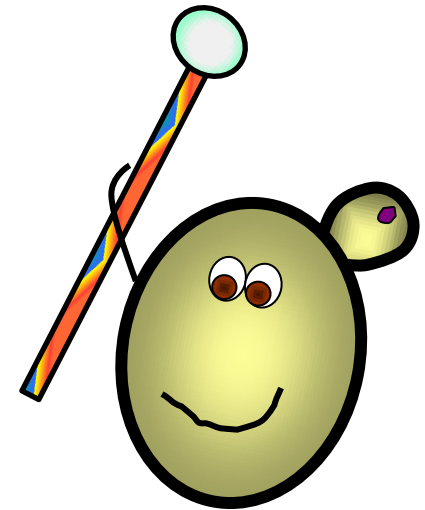
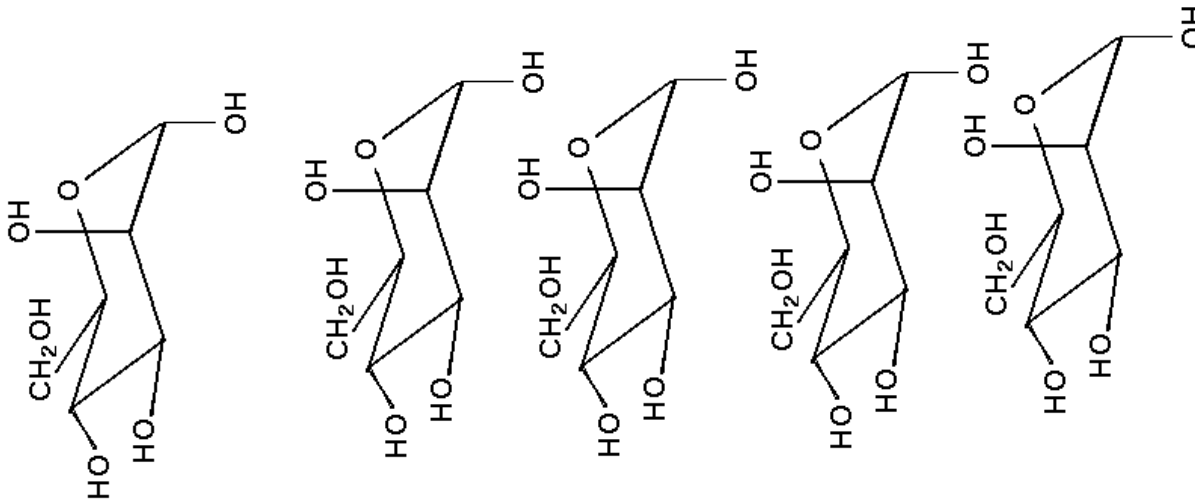




Per quanto *S. cerevisiae* abbia degli indubbi vantaggi, alcuni svantaggi ne limitano l'uso

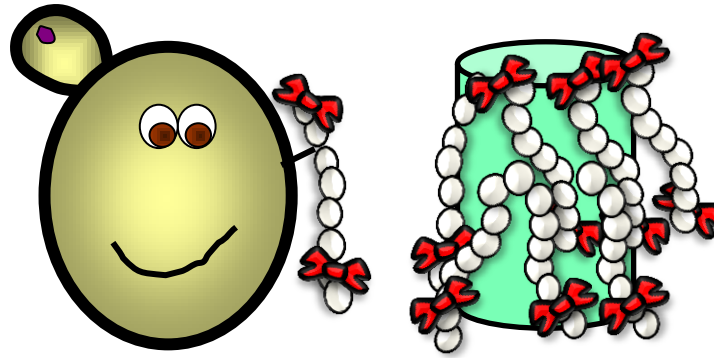
Uno di questi riguarda la glicosilazione: il pentasaccaride comune (core) è conservato negli eucarioti ma variano e molto le catene laterali

In *Saccharomyces* le catene laterali sono formate solo da mannosì



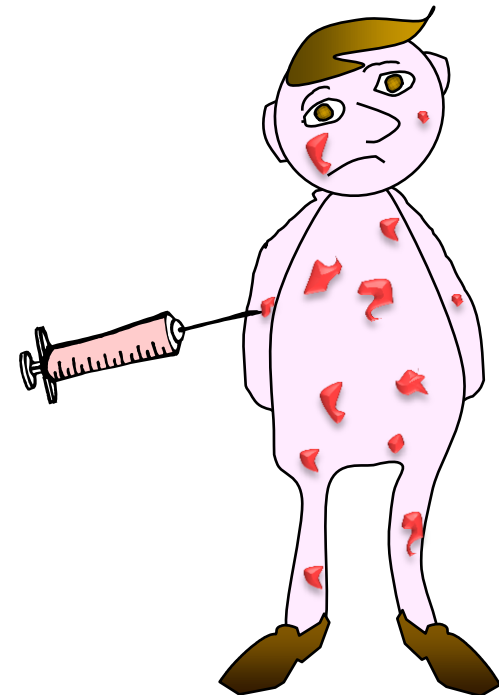
in altri eucarioti si trovano invece oligosaccaridi complessi: la glicosilazione operata dal lievito, è inadatta per proteine con funzionalità connessa alla struttura della porzione glucidica

Saccharomyces, inoltre, ha la tendenza a glicosilare le proteine in ogni sito disponibile e, quindi, nasce un problema di iperglicosilazione

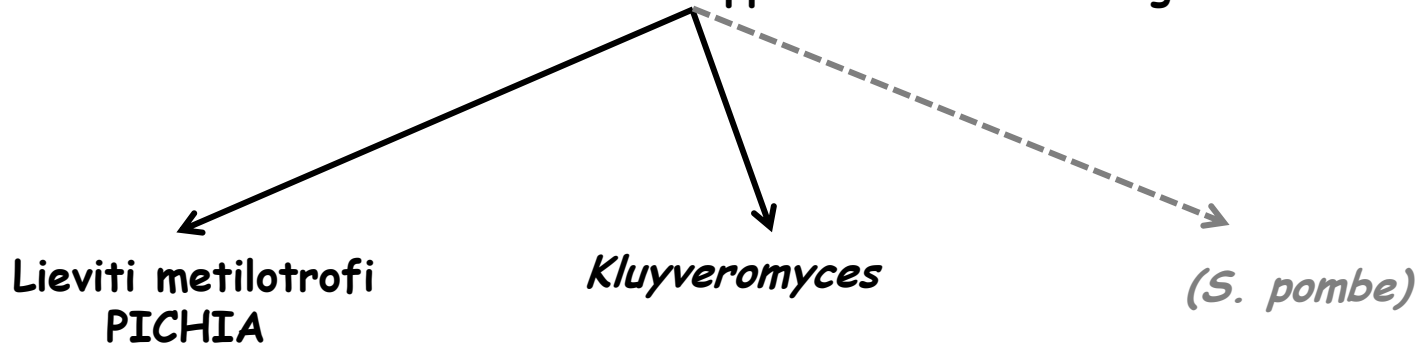


Le catene laterali glucidiche determinano l'antigenicità: un'errata o eccessiva glicosilazione interferisce con la possibilità di impiego terapeutico

può anche accadere che il plasmide ricombinante sia perso con frequenza relativamente elevata e che ci siano errori nella secrezione delle proteine prodotte



Per ovviare a questi inconvenienti sono stati presi in considerazione lieviti appartenenti ad altri generi



promotori forti per espressione eterologa

possibilità di integrare
stabilmente i plasmidi

ottima secrezione
di proteine

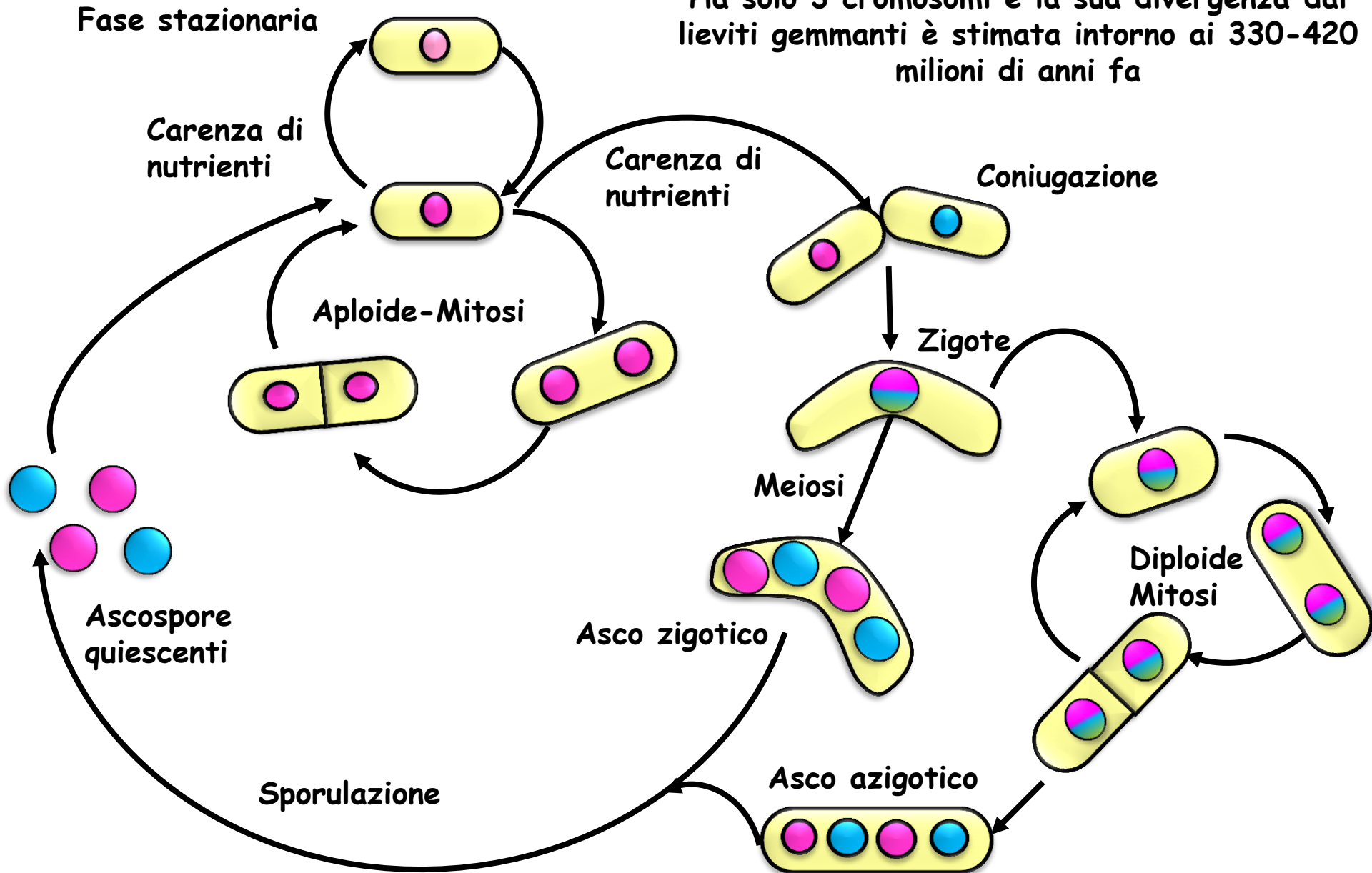
integrità delle
proteine prodotte

meno marcatori
selezionabili

solo vettori
integrativi

Schizosaccharomyces pombe, un importante organismo modello per la biologia cellulare e molecolare, si divide per fissione binaria

Ha solo 3 cromosomi e la sua divergenza dai lieviti gemmanti è stimata intorno ai 330-420 milioni di anni fa



I LIEVITI METILOTROFI

Candida boidinii, *Hansenula polymorpha* (*P. angusta*),
Pichia methanolica e *Pichia pastoris*

Gruppo emergente di ospiti eucariotici per la
produzione di proteine ricombinanti

offrono prospettive migliori per le
produzioni di uso farmaceutico

Sono insensibili
all'effetto "Crabtree"

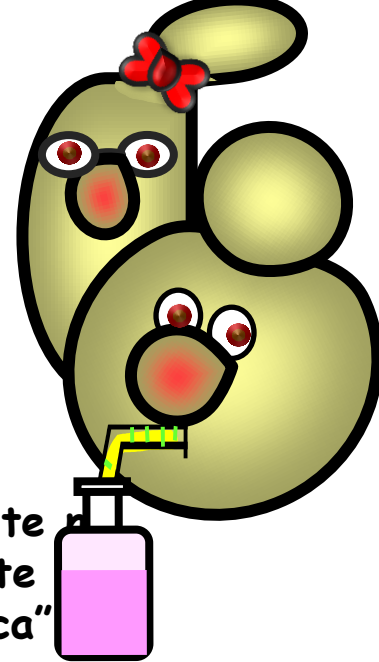


la produzione di etanolo in
aerobiosi è molto limitata



La biomassa e la resa
di prodotto sono più alte

le proteine sono secrete
terreno e non trattenute
zona "periplasmatica"



L'ipermannosilazione
è meno frequente



Le catene sono più corte e mancano
di legami α -1,3, (immunogeni)



sono stati creati ceppi di *P. pastoris*
che N-glicosilano come l'uomo

LA VIA DELL'ASSIMILAZIONE DEL METANOLO (MUT-pathway)

Il metabolismo del metanolo inizia all'interno dei perossisomi

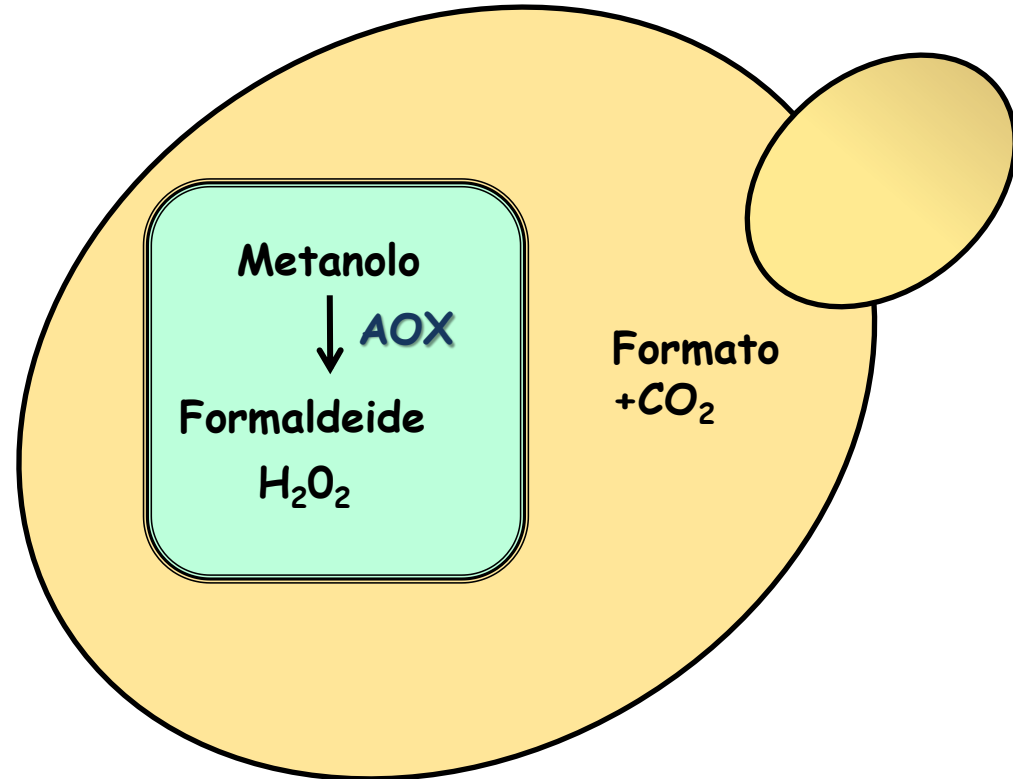
Dove l'alcool ossidasi lo converte in formaldeide e H_2O_2

Una parte della formaldeide è condensata per via assimilativa

Il resto passa al citoplasma dove è ossidata con produzione di energia

Le alcool ossidasi hanno una bassa affinità per l' O_2 : la loro espressione è quindi molto elevata

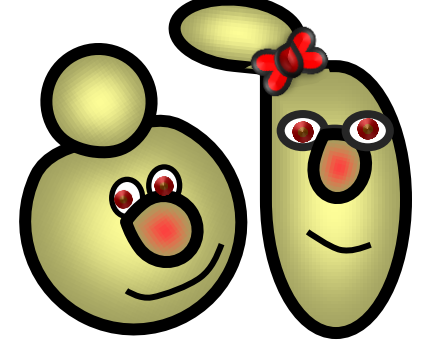
I promotori più impiegati per i sistemi di espressione derivano da enzimi chiave della via MUT



ALCOOL-OSSIDASI

FLD e FDH
(formaldeide- e formato-deidrogenasi)

Pichia pastoris - *Pichia angusta* (*Hansenula polymorpha*)

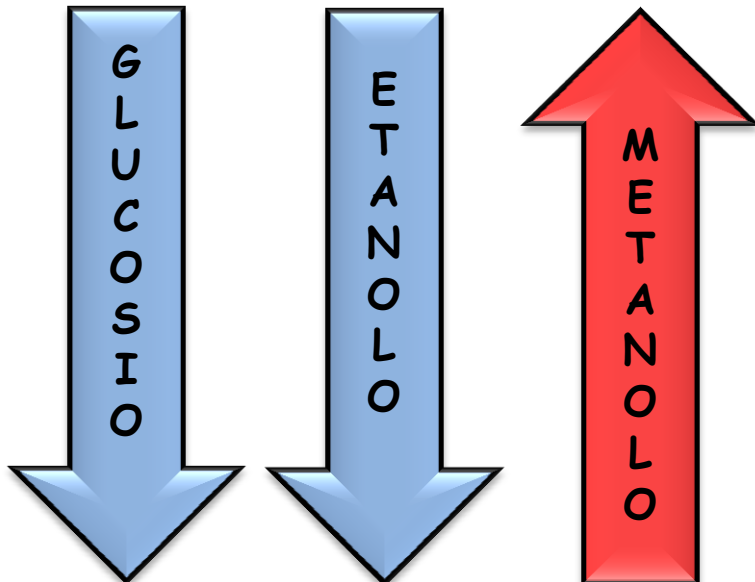


Sono i lieviti metilotrofi maggiormente studiati dal punto di vista dell'espressione eterologa

In *P. pastoris* esistono due geni che codificano alcool-ossidasi: **AOX1** e AOX2
In *P. angusta* c'è il solo gene MOX

AOX1 è responsabile della maggior parte dell'attività e il significato fisiologico di AOX2 non è chiaro

L'omologia tra AOX1 e 2 è elevata, il profilo di repressione-induzione lo stesso, anche se la regione di promozione non è omologa



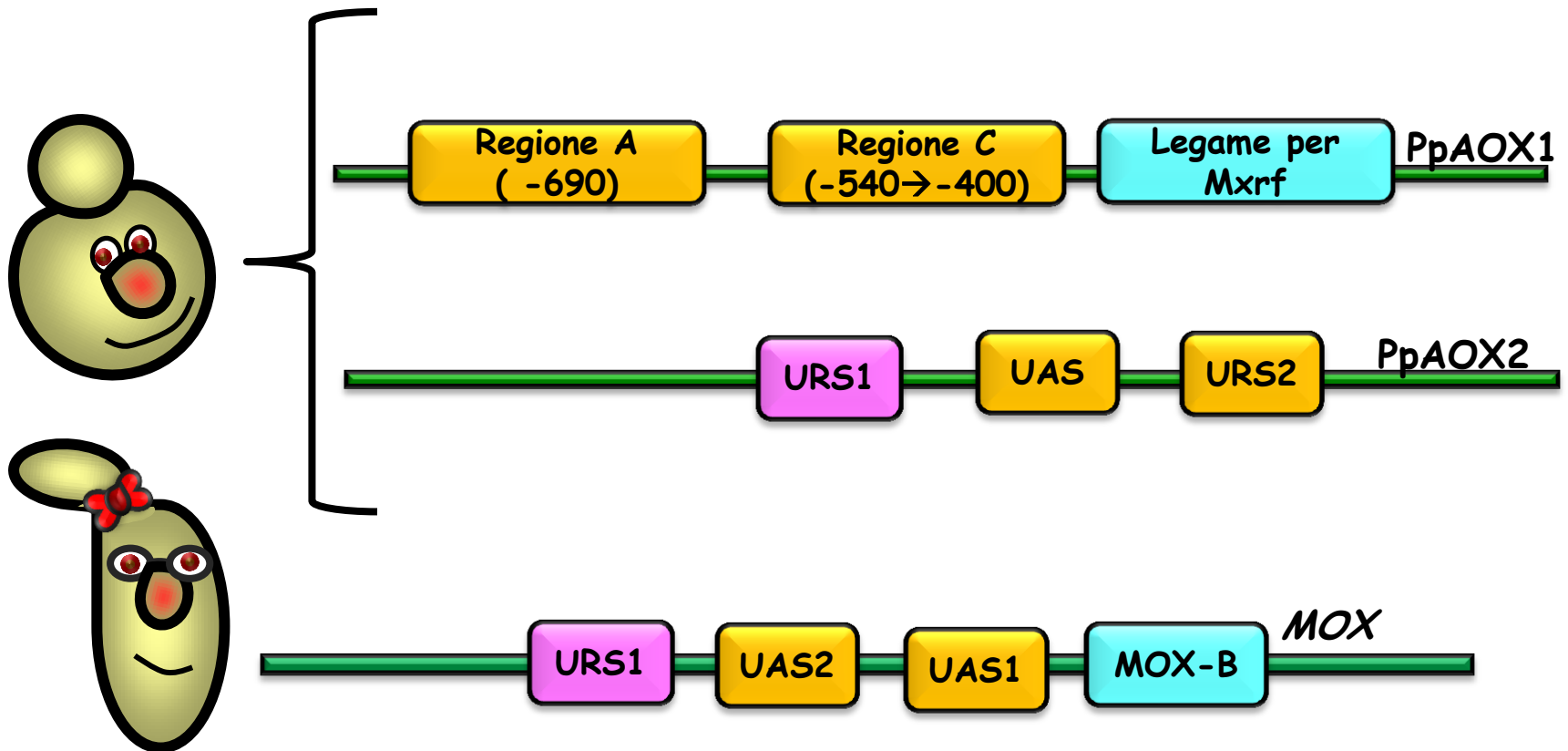
In generale, questi geni sono strettamente repressi da etanolo e glucosio e fortemente indotti dal metanolo

Le regioni importanti per l'attività dei promotori sono state identificate attraverso lo studio di delezioni e l'allineamento di sequenze

I fattori trascrizionali che agiscono in trans non sono stati per la maggior parte identificati

Con l'eccezione della regione tra -415 e -172 di P-AOX1 dove è stato individuato un elemento che contiene un IR e a cui si lega Mrxf

Una struttura analoga è presente nel promotore di MOX (MoxB)

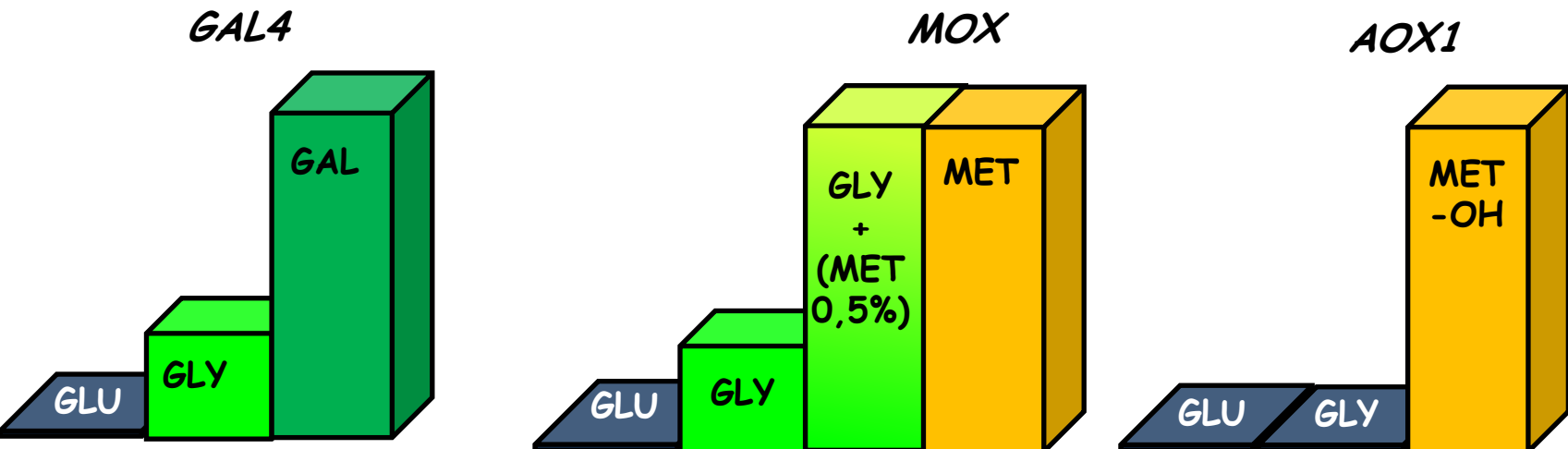


AOX1 ha probabilmente un funzionamento analogo a quello di GAL4, (repressione/derepressione + induzione)

Ma a differenza di GAL4, la derepressione non è sufficiente a garantire un livello apprezzabile di espressione

AOX1 (e AOX2) non si attivano se i lieviti sono coltivati su glicerolo, a differenza di MOX

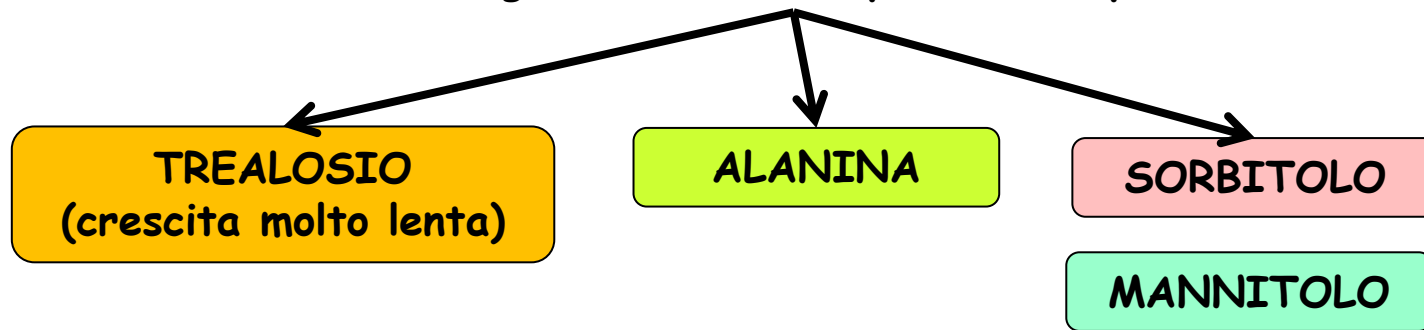
MOX si dereprime in assenza di glucosio e una piccola quantità di metanolo (0,5%) aggiunto quando la crescita è già buona, ottiene gli stessi livelli di espressione del metanolo usato come sola fonte di carbonio



Queste caratteristiche tuttavia sembrano essere legate più alla natura dell'ospite che alla struttura del promotore

È un dato importante perché il metanolo è tossico e infiammabile e ne va limitato l'uso ai livelli necessari per l'induzione

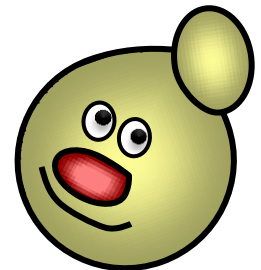
possibili fonti di carbonio su cui coltivare i lieviti inibiti dal glicerolo senza reprimere l'espressione



A crescita avviata l'aggiunta di una moderata quantità di metanolo attiva un'espressione molto forte

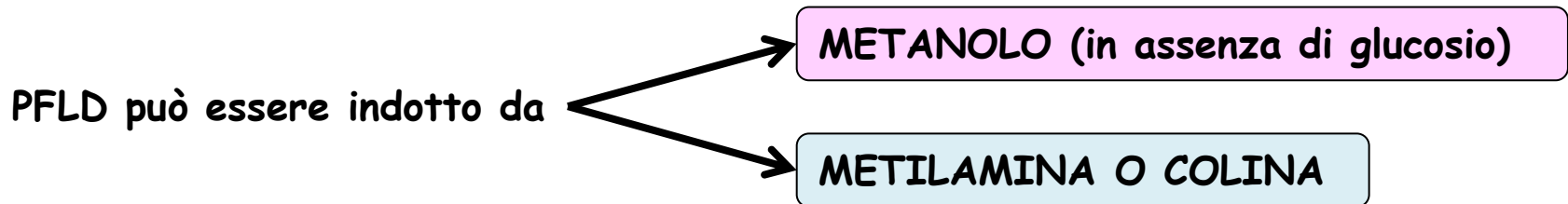
Il trascritto può arrivare a rappresentare anche il 5% del poli(A)+mRNA presente nelle cellule indotte

Il glicerolo può essere usato anche con *Pichia methanolica*, uno dei lieviti metilotrofi più recentemente preso in considerazione, che si comporta come *P. angusta*



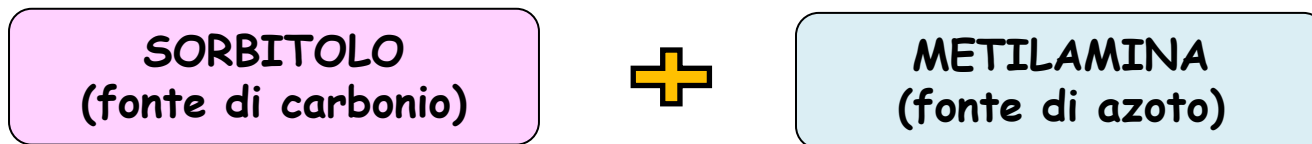
Un'altra valida alternativa è quella offerta
dal promotore di FLD

Oltre che nel metabolismo del metanolo FLD è coinvolto nell'assimilazione di alcune C1-amine come la metilamina, come fonte di azoto



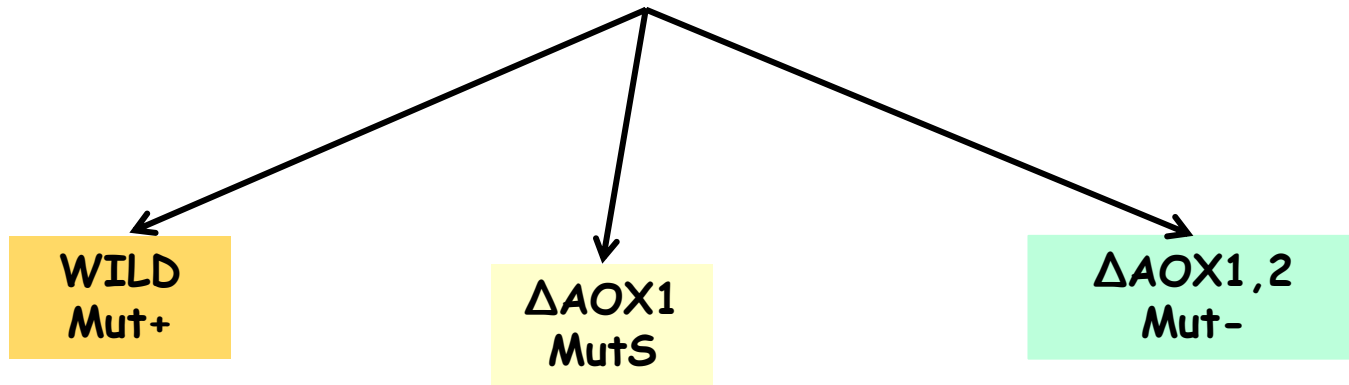
Il sorbitolo non reprime la sintesi dei geni del metabolismo del metanolo e non interferisce con l'induzione di PFLD da parte della metilamina

per fermentazioni ad alta densità senza l'uso di
metanolo si possono combinare



I CEPPI

I ceppi di laboratorio di *P. pastoris* derivano da NRRL-Y 11430
(Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Ill)



I ceppi con delezioni in uno o entrambi i geni AOX possono dare migliori risultati nella produzione di proteine

Necessitano di una minore quantità di metOH per l'induzione, particolare che limita il rischio di incendio per i fermentatori di grandi dimensioni

Il ceppo più usato tuttavia è quello WT o la sua variazione GS115 (his4), che crescono bene su metanolo (FENOTIPO MUT+)

FENOTIPO MutS

KM71 (*his4 arg4 aox1Δ::ARG4*)

AOX1 è in gran parte deleta e rimpiazzato dal gene ARG4 di *S. cerevisiae*

cresce lentamente su metanolo perché dipende dal solo AOX2

Il fenotipo MutS si può ottenere con molti vettori di espressione per *P. pastoris* con la contemporanea inserzione della cassetta di espressione e la delezione del gene AOX1 da un ceppo Mut+

FENOTIPO Mut-

MC100-3 (*his4 arg4 aox1Δ::SARG4 aox2Δ::Phis4*)

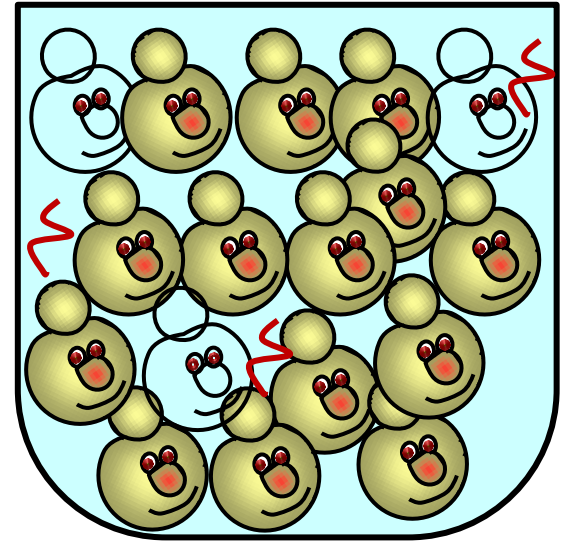
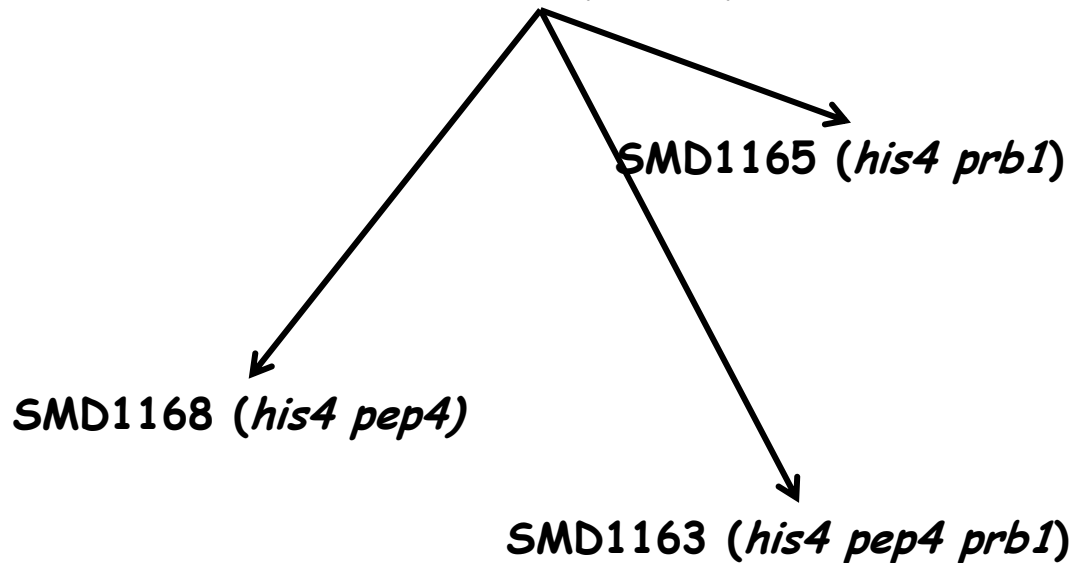
entrambi i geni AOX sono stati deleti; il ceppo NON cresce su MetOH

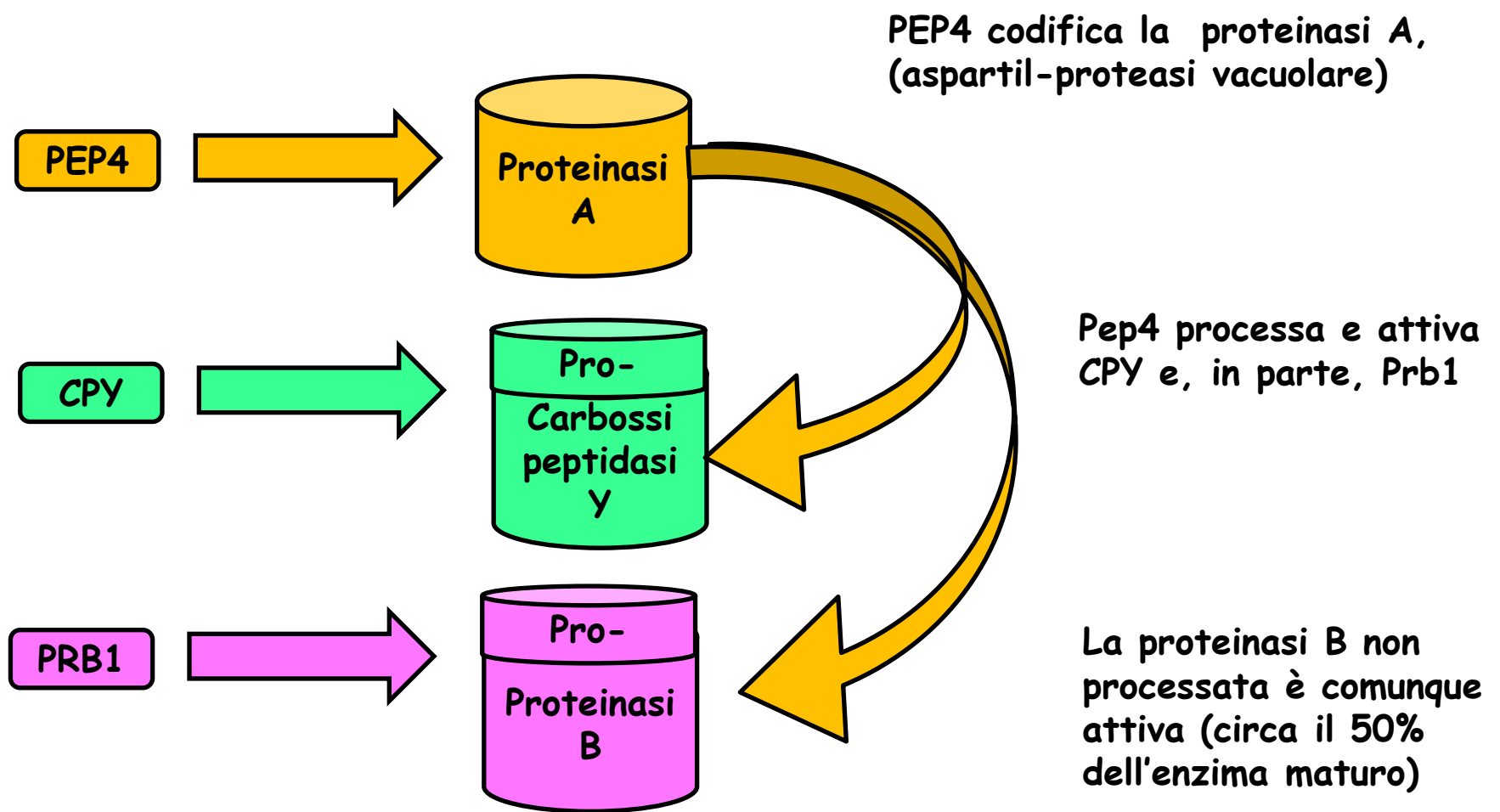
Alcune proteine eterologhe prodotte da *Pichia* si degradano con relativa facilità

Questo effetto è causato in gran parte dalle proteasi vacuolari

Il problema è particolarmente evidente nei fermentatori a causa della elevata densità di cellule e della lisi di una piccola parte di esse

L'uso di ospiti deficienti per le proteasi si è rivelato utile nel limitare questo problema





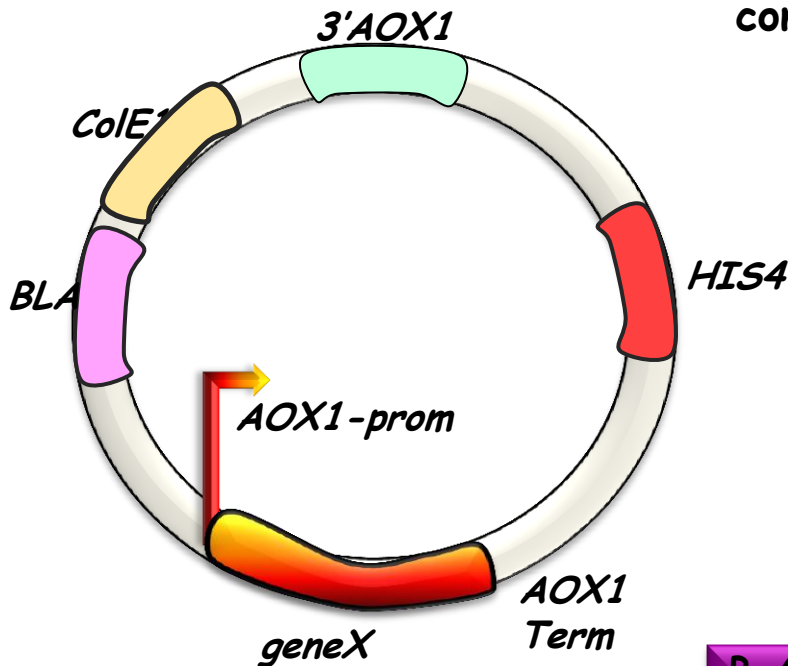
Mutanti *pep4*: manca l'attività di Pep4 e di Cpy; quella di Prb1 è ridotta

Mutanti *prb1* manca solo la proteinasi B

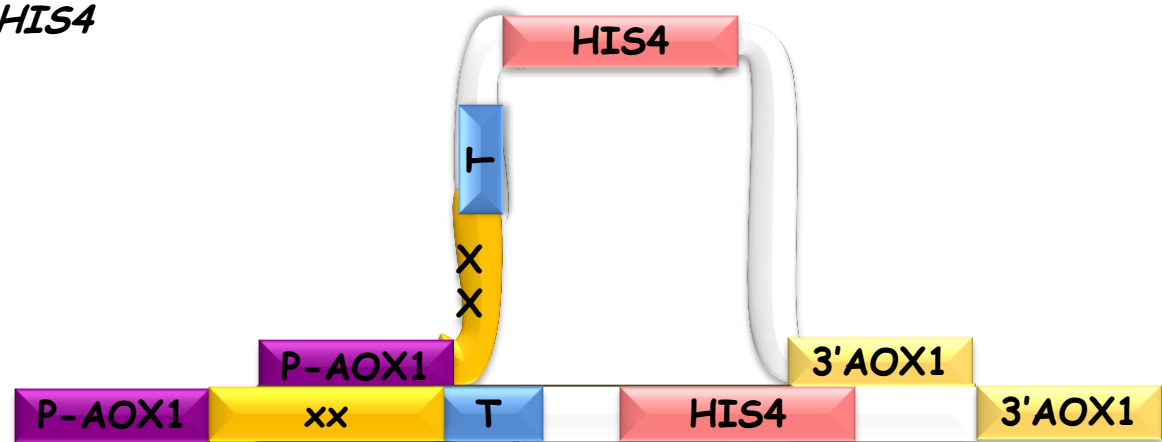
Mutanti doppi mancano tutte queste attività proteasiche

Pichia non possiede plasmidi naturali utilizzabili per l'espressione ectopica
e i plasmidi con origine 2 μ m in *Saccharomyces* non vi si replicano

è possibile trasformarla solamente con integrazioni,
con efficienze di trasformazione inferiori



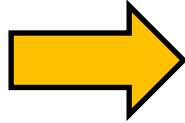
Un sito di integrazione usato
spesso è al 3' di *AOX1*



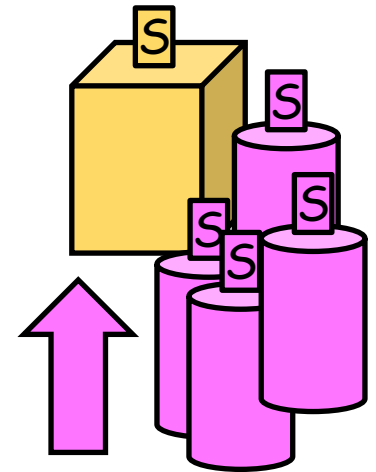
Molti vettori sono progettati per ottenere contemporaneamente
l'eliminazione di *AOX1* per doppio cross-over

Ma è possibile ottenere integrazioni con un cross-over singolo,
come per *Saccharomyces*

P. pastoris secerne
poche proteine endogene

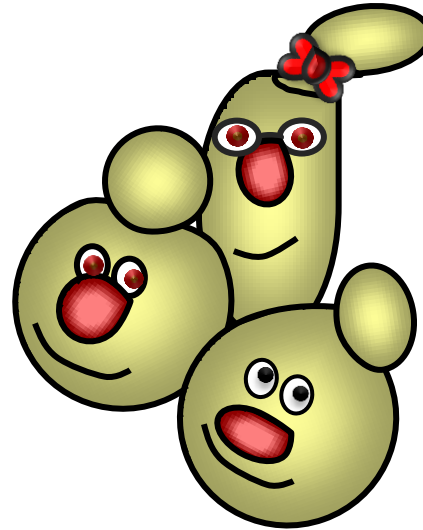


Le proteine secrete sono
più facili da purificare

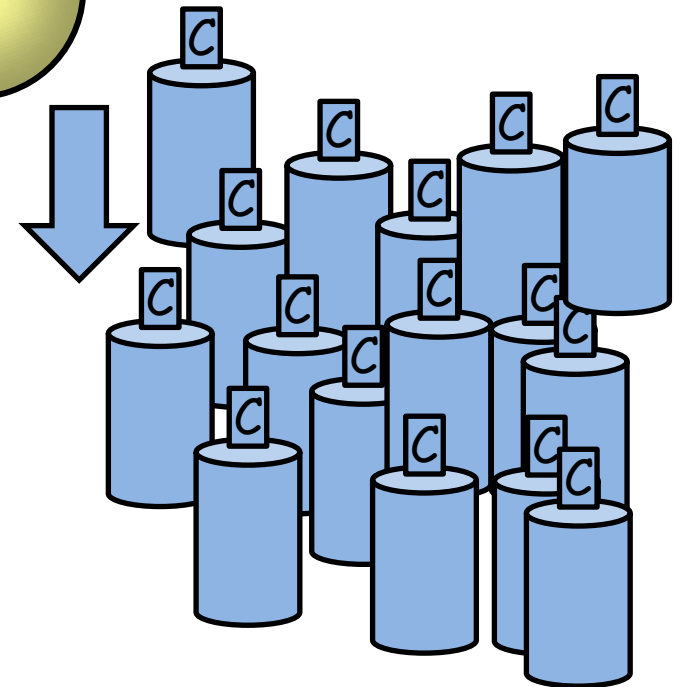


La secrezione però ha
successo con le proteine che
sono normalmente secrete
dall'organismo che le produce

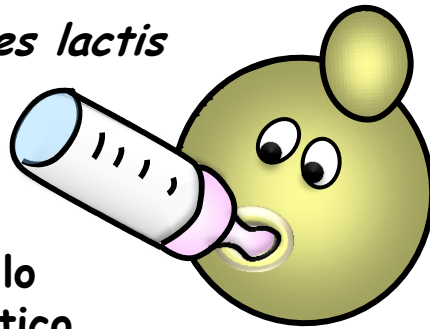
Dipende dalla sequenza segnale
usata e non ha sempre successo



La SP con il maggior numero di successi
è quella del pre-propeptide dell' α -factor
di *S. cerevisiae*



Kluyveromyces lactis



assimila il lattosio e lo converte in acido lattico

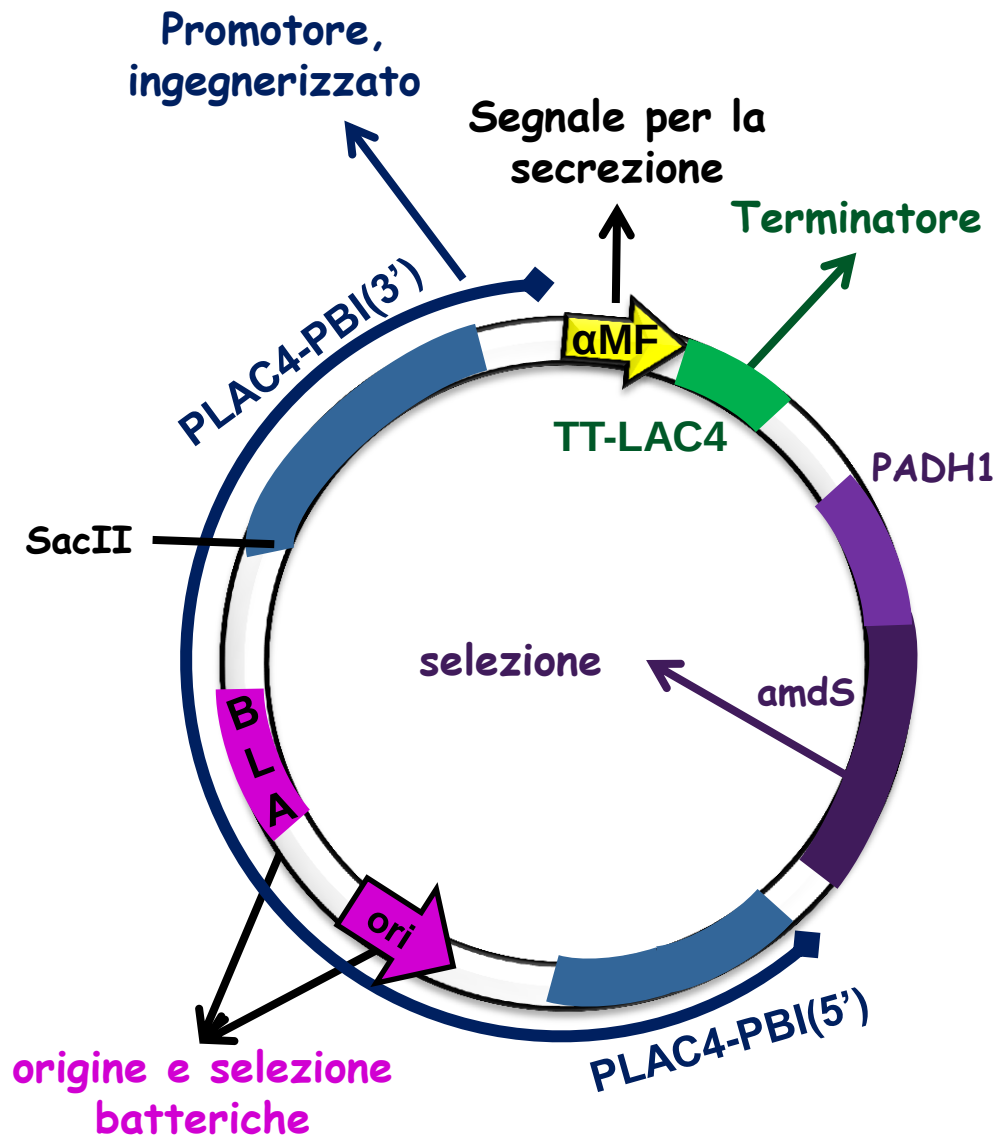
Cresce rapidamente, raggiunge buone densità cellulari

è facile da manipolare perché è eterotallico e il suo ciclo cellulare è principalmente aploide

è usato soprattutto per la secrezione di proteine

esistono sistemi commerciali dedicati che impiegano il plasmide pKLAC2

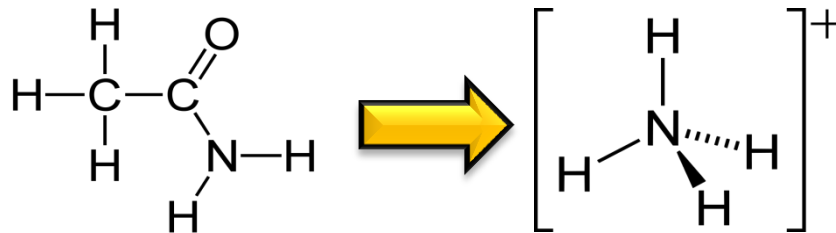
L'integrazione avviene nel locus LAC4 dopo trasformazione con il plasmide linearizzato (SacII)



SELEZIONE

il gene che codifica l'acetoamidasi fungina (amdS) permette al ceppo di crescere su un terreno privo di fonti di azoto libere ma contenente acetamide

L'acetamide può essere utilizzata come fonte di azoto solo dai ceppi che ricevono amdS e possono degradarla ad ammonio



Si aggiunge al terreno YCB (Yeast carbon base) che contiene tutti i nutrienti necessari tranne la fonte di azoto

è molto economica

arricchisce la popolazione di cellule con una integrazione di copie multiple della cassetta di espressione

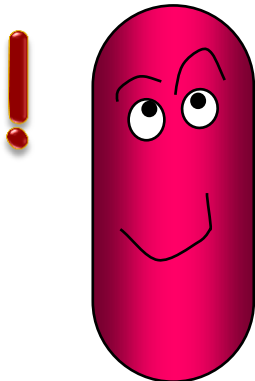
PROMOTORE

Il promotore P_{LAC4} dirige l'espressione della lattasi

Nella forma nativa esistono tre regioni
con omologia alla Pribnow batterica

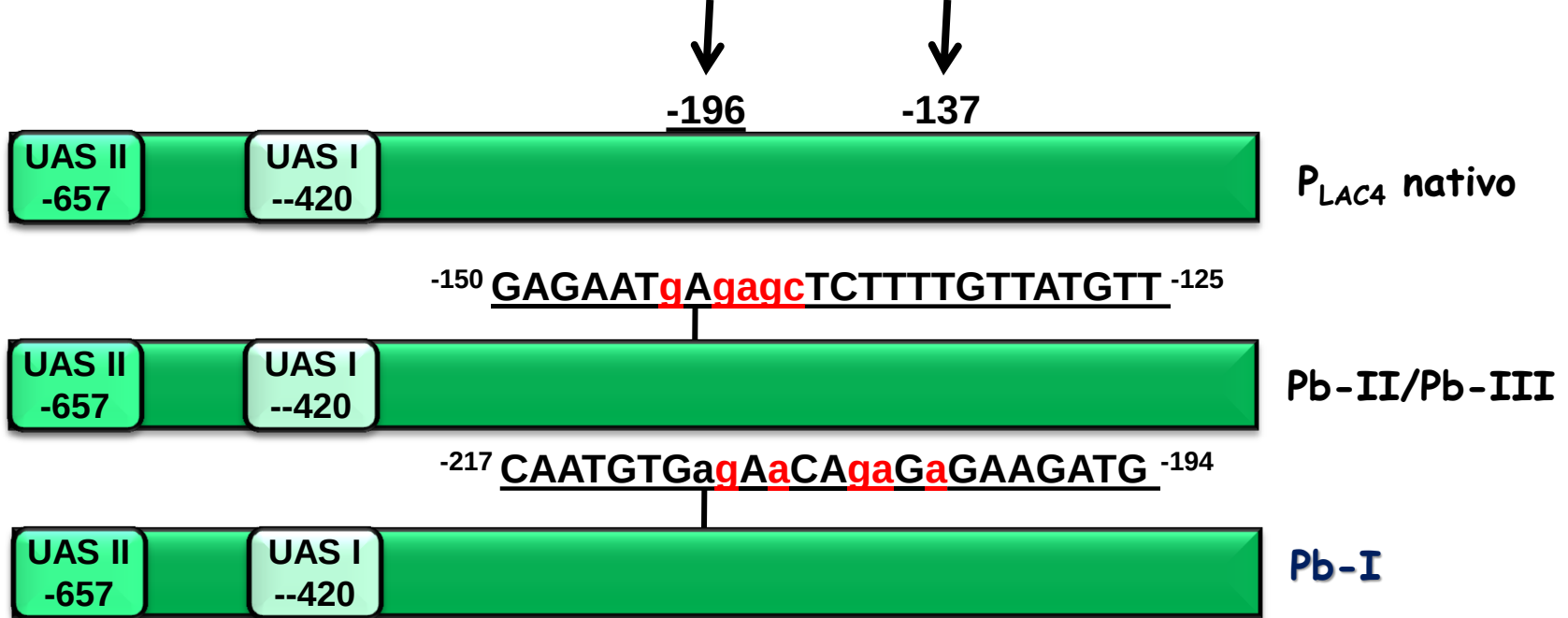
PB-I	-217	CAATGTGTT	TATCAT	TGTGAAGATG	-194
PB-II	-150	GAGAATTATT	TATTCT	TTGTTATGTT	-125
PB-III	-150	GAGAATT	TATTAT	CTTTTGTTATGTT	-125

Queste sequenze avviano
indebitamente l'espressione in *E. coli*



L'espressione in *E. coli* potrebbe
ostacolare le prime fasi della
preparazione del plasmide ricombinante

E la resa delle preparazioni plasmidiche



La trascrizione in *E. coli* parte da due siti alternativi uno maggiore (-196) e l'altro minore (-137)

mutazioni operate nelle tre regioni hanno dimostrato che l'espressione si mantiene eliminando PB-II e PB-III

La mutagenesi su PB-I, invece, elimina del tutto la trascrizione

L'eliminazione della funzionalità in *E. coli* permette di preparare costrutti anche con geni potenzialmente tossici per le cellule batteriche e di ottenere la quantità di DNA necessaria a trasformare il lievito