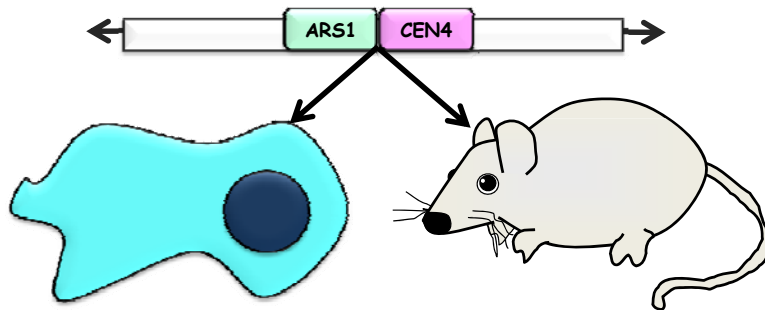


CROMOSOMI ARTIFICIALI DI LIEVITO (YAC)

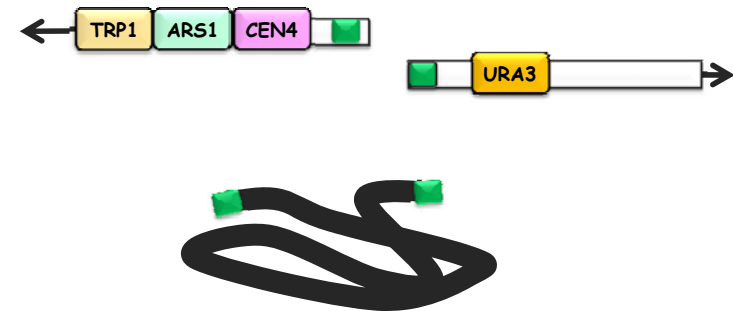
I plasmidi YAC possono reggere frammenti eterologhi di 200 - 800 kb
 si basano su plasmidi lineari di lievito (YLp) con un segmento ARS e CEN e con
 sequenze (omologhe o eterologhe) che *in vivo* assumono le funzioni di telomeri



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

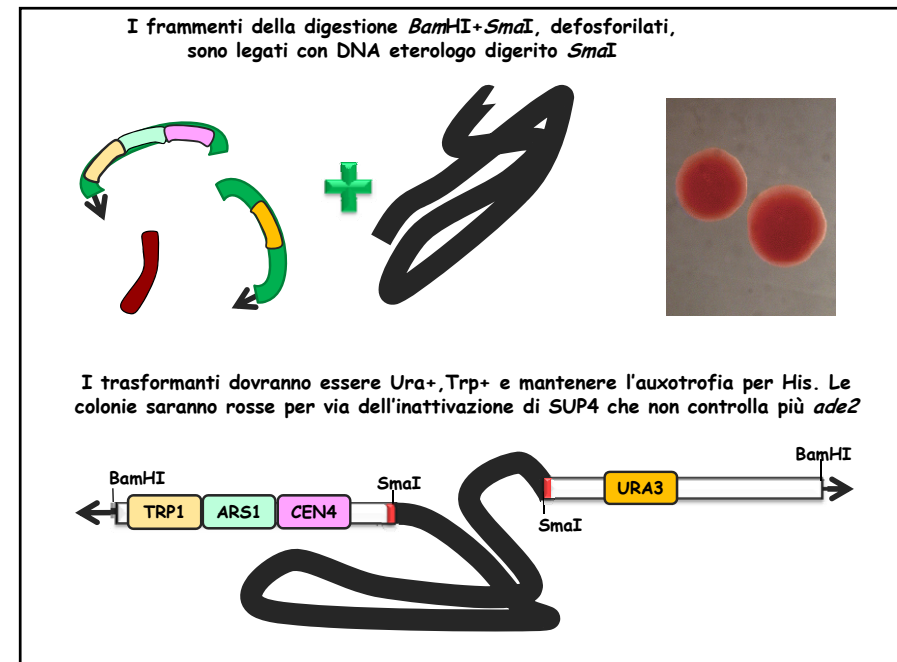
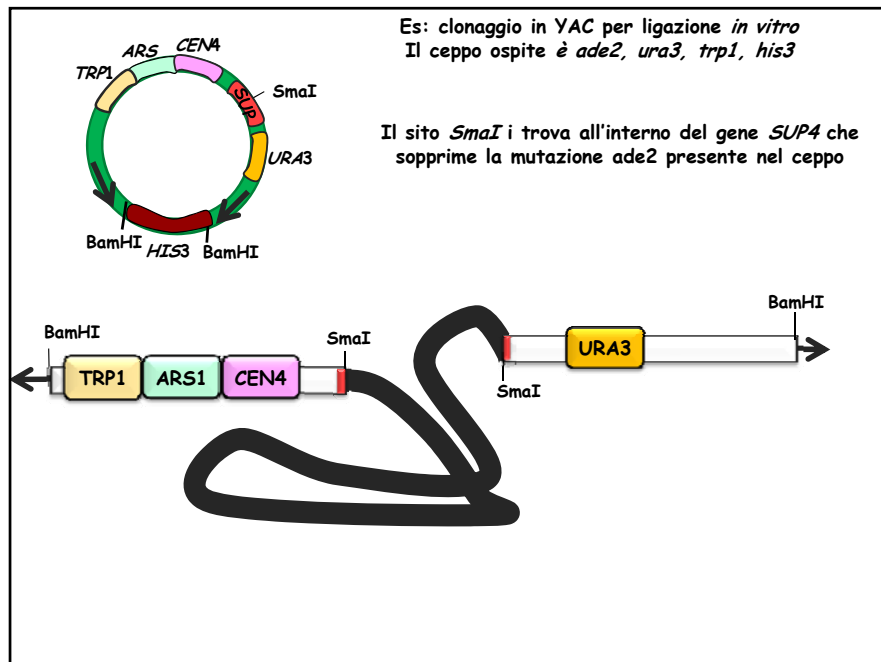
Clonaggio con ricombinazione specifica *in vivo* con un vettore YAC

Il lievito viene trasformato 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

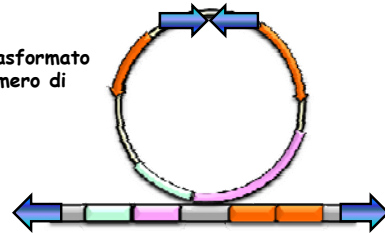
Le due braccia del vettore YAC sono derivate da plasmidi linearizzati che
 contengono segmenti omologhi alle estremità del DNA da clonare



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



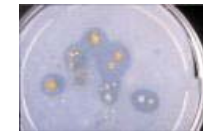
dopo la trasformazione in lievito questo plasmide sarà risolto in una molecola lineare con le estremità libere terminate da un telomero funzionale



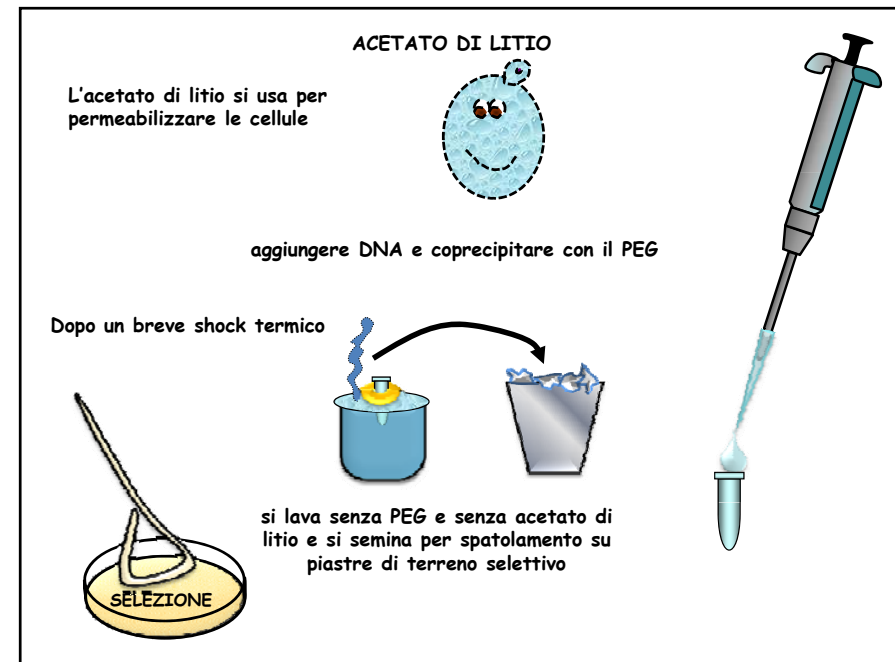
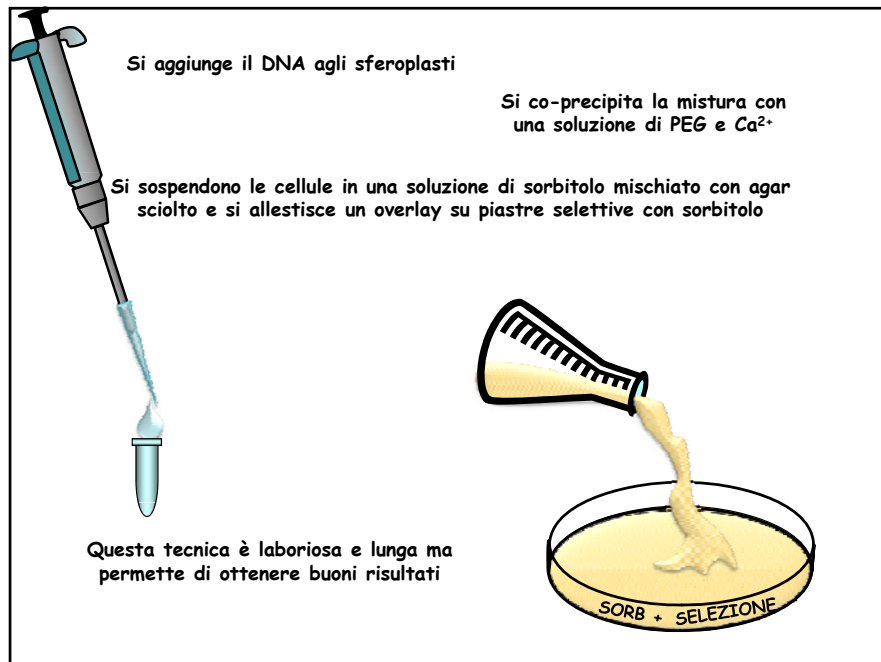
SFEROPLASTI

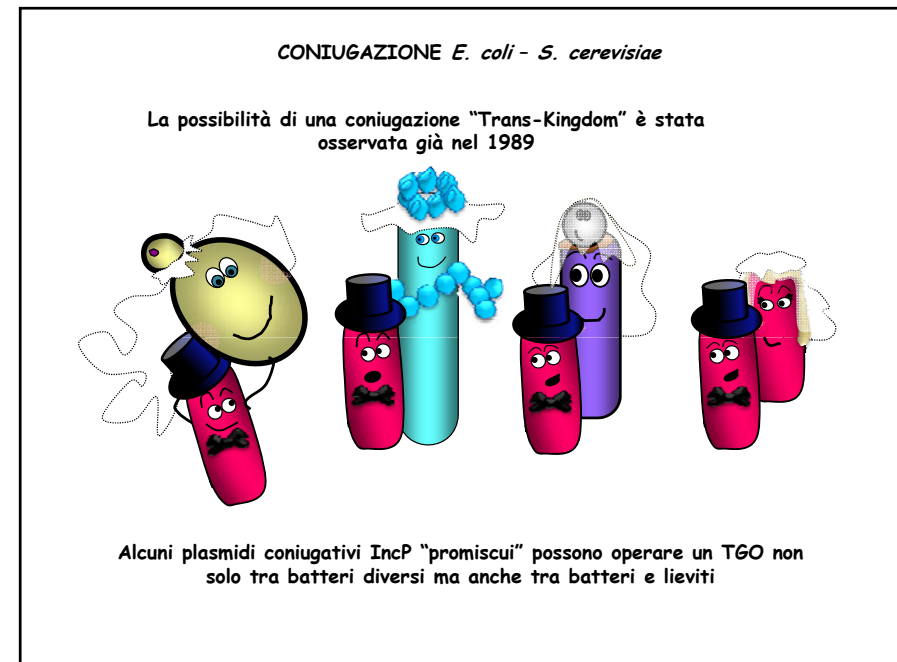
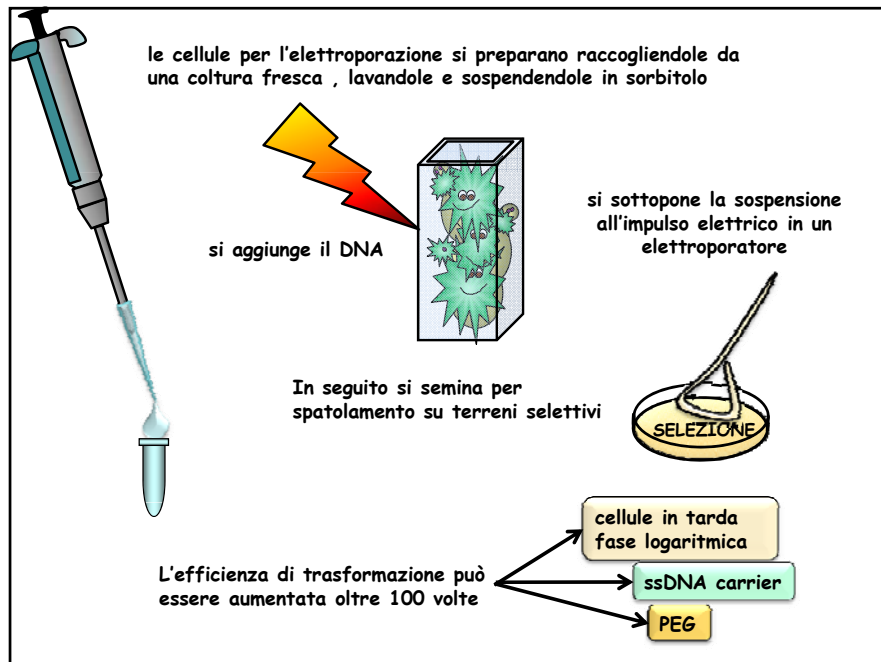
Le cellule vanno trattate, in presenza di stabilizzatori osmotici (sorbitolo 1M) con enzimi idrolitici

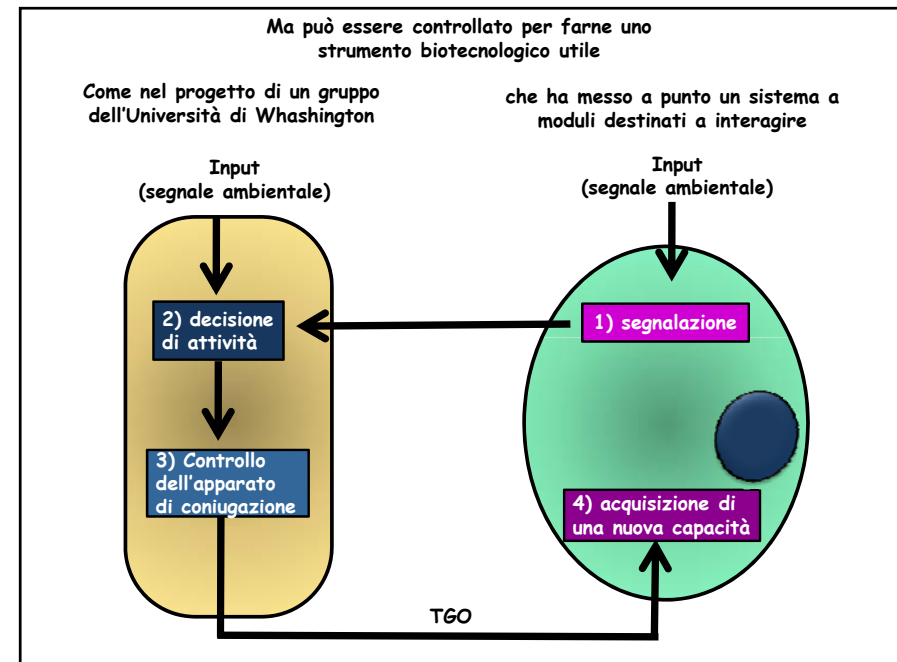
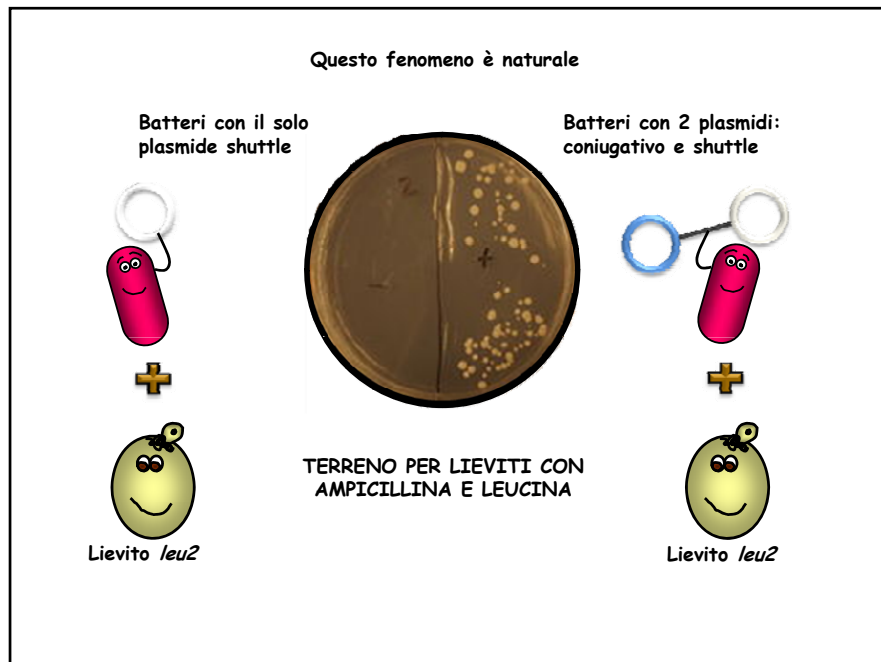
glusulasi (estratto dall'intestino della lumaca *Helix pomatia*)



Zymolyasi: un enzima prodotto da *Arthrobacter luteus*







Modello sperimentale I° MODULO (LIEVITO): SEGNALE

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

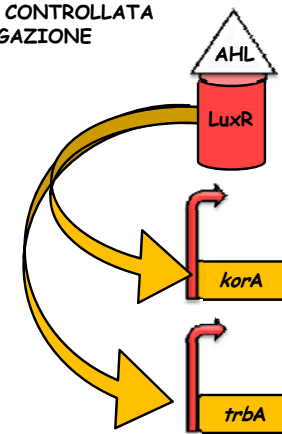
III° MODULO (E. coli): SINTESI CONTROLLATA DELL'APPARATO DI CONIUGAZIONE

Il complesso AHL+ luxR attiva il promotore PLux

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

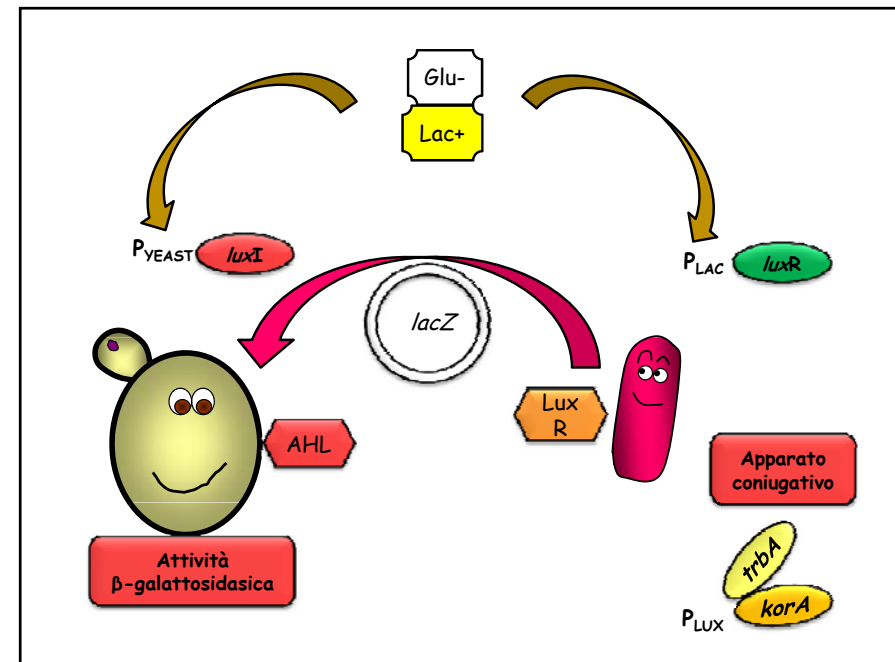
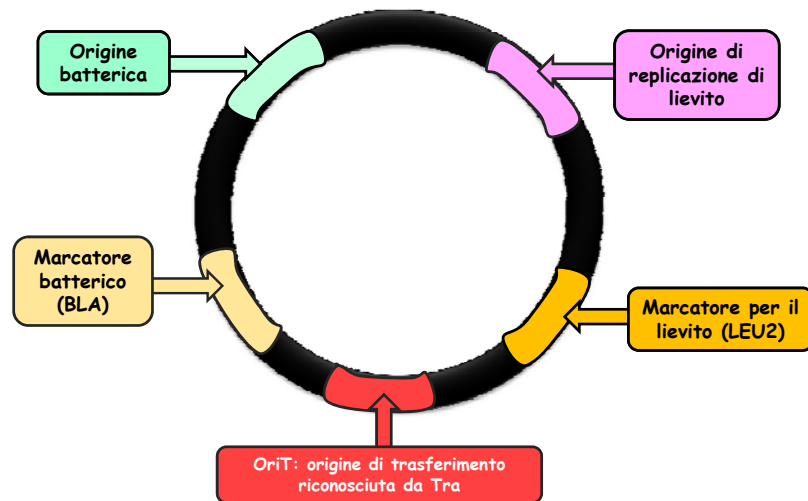
TrbA: regolatore trascrizionale per l'operone TraII

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

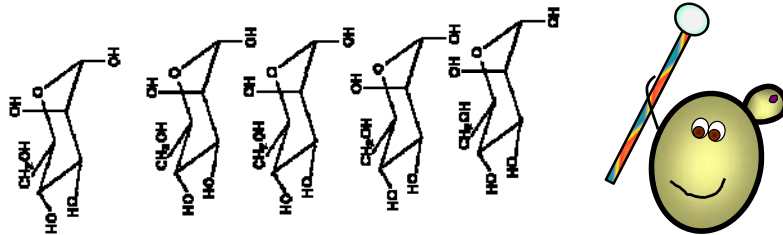
Il plasmide shuttle che ne viene trasferito ha



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

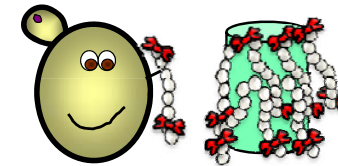
Uno di questi riguarda la glicosilazione: il pentasaccaride comune (core) è conservato negli eucarioti ma variano e molto le catene laterali

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



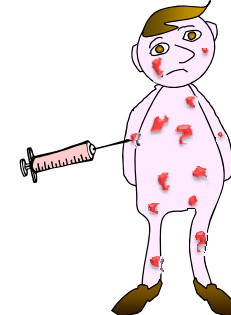
in altri eucarioti si trovano invece oligosaccaridi complessi: la glicosilazione operata dal lievito, è inadatta per proteine con funzionalità connessa alla struttura della porzione glucidica

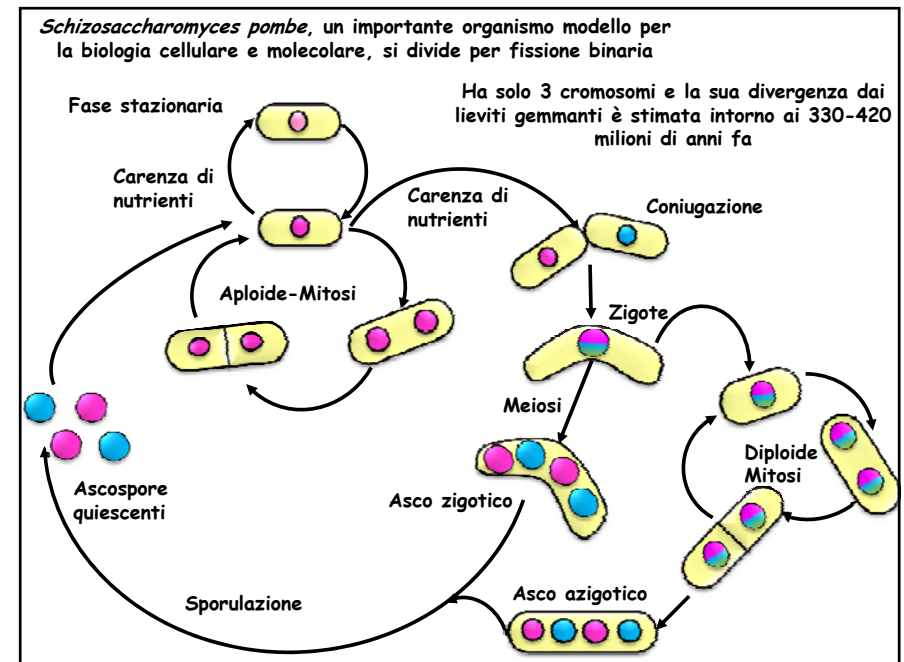
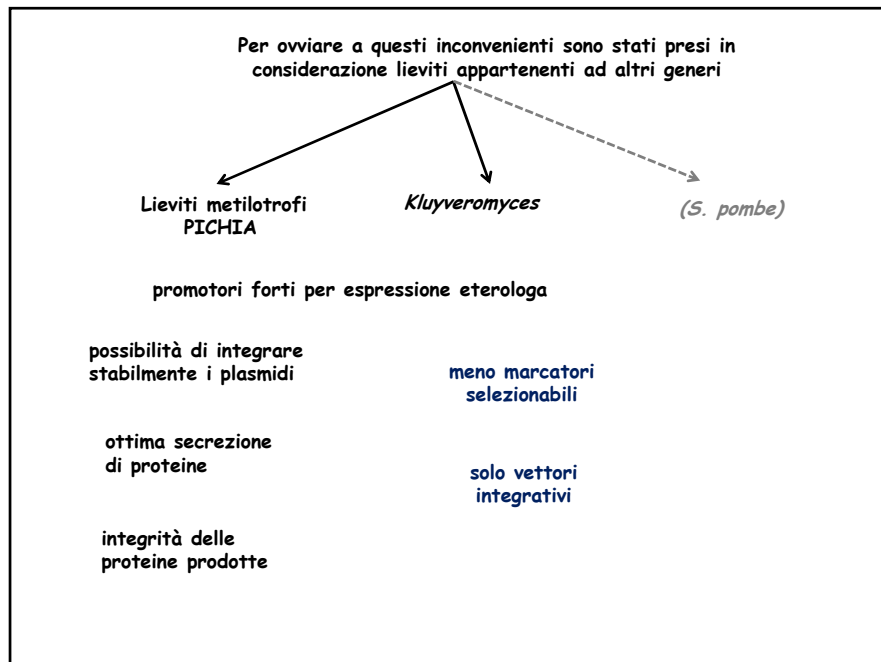
Saccharomyces, inoltre, ha la tendenza a glicosilare le proteine in ogni sito disponibile e, quindi, nasce un problema di iperglicosilazione



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





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

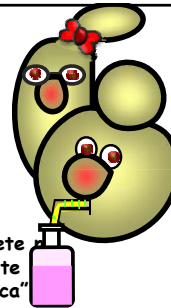
La biomassa e la resa
di prodotto sono più alte

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

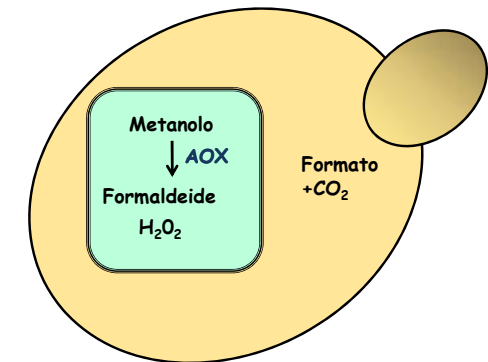
Il resto passa al citoplasma dove è
ossidata con produzione di energia

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

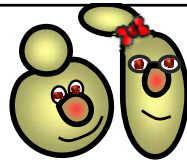
ALCOOL-OSSIDASI

FLD e FDH
(formaldeide- e formato-deidrogenasi)



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

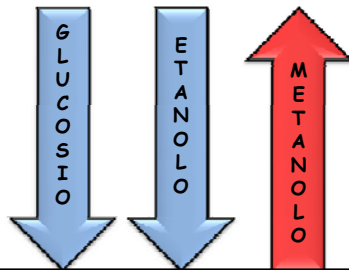
Sono i lieviti metilotrofi maggiormente studiati dal punto di vista dell'espressione eterologa



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



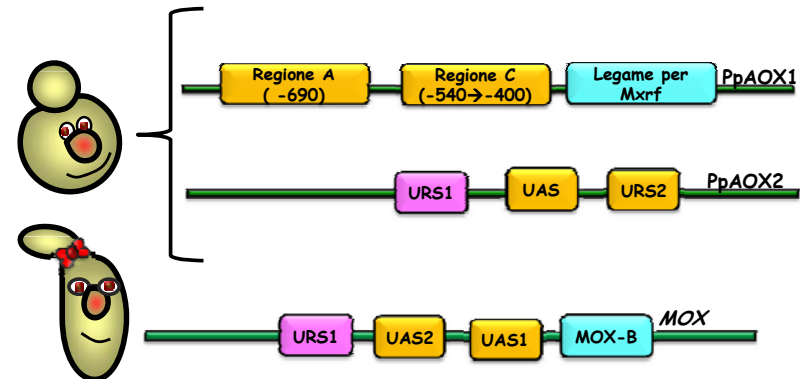
In generale, questi geni sono strettamente repressi da etanolo e glucosio e fortemente indotti dal metanolo

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**)

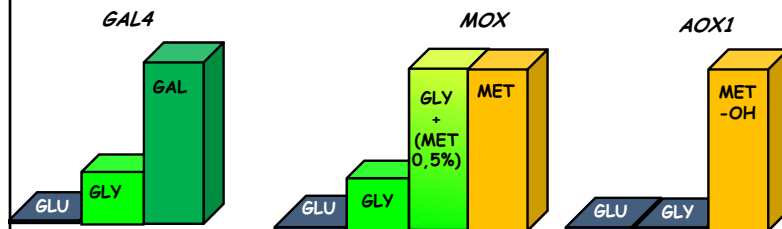


AOX1 ha probabilmente un funzionamento analogo a quello di *GAL4*, (repressione/derepressione + induzione)

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*

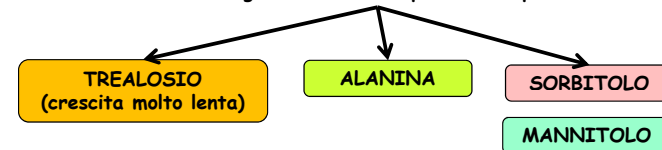
MOX si dereprime in assenza di glucosio e una piccola quantità di metanolo (0,5%) aggiunto quando la crescita è già buona, ottiene gli stessi livelli di espressione del metanolo usato come sola fonte di carbonio



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

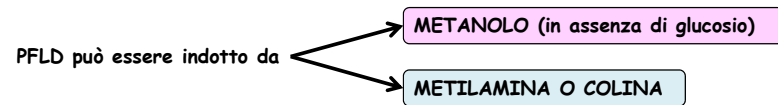
Il trascritto può arrivare a rappresentare anche il 5% del poli(A)+mRNA presente nelle cellule indotte

Il glicerolo può essere usato anche con *Pichia methanolica*, uno dei lieviti metilotropi 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

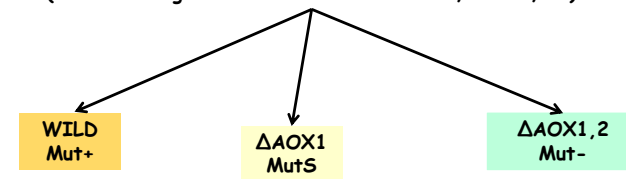
SORBITOLO
(fonte di carbonio)



METILAMINA
(fonte di azoto)

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-

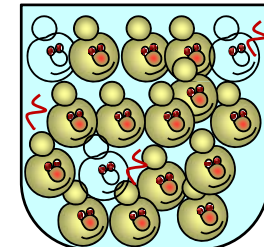
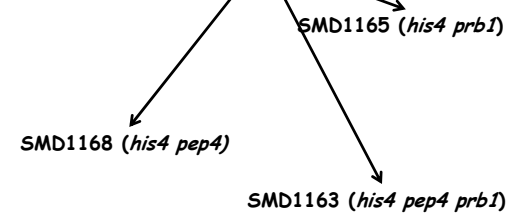
MC100-3 (*his4 arg4 aox1Δ::SARG4 aox2Δ::Phis4*)
entrambi i geni AOX sono stati deleti; il ceppo NON cresce su MetOH

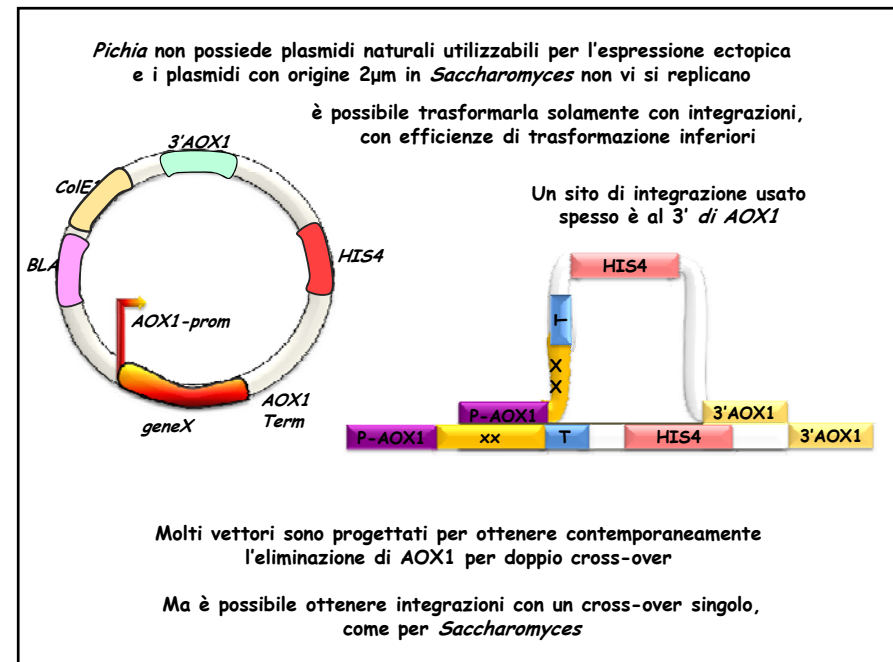
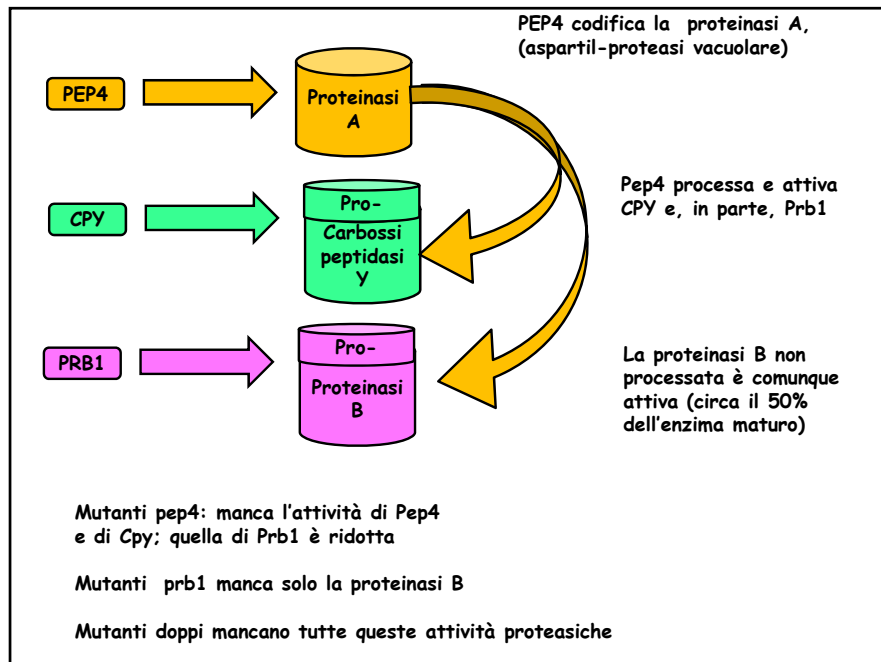
Alcune proteine eterologhe prodotte da *Pichia* si degradano con relativa facilità

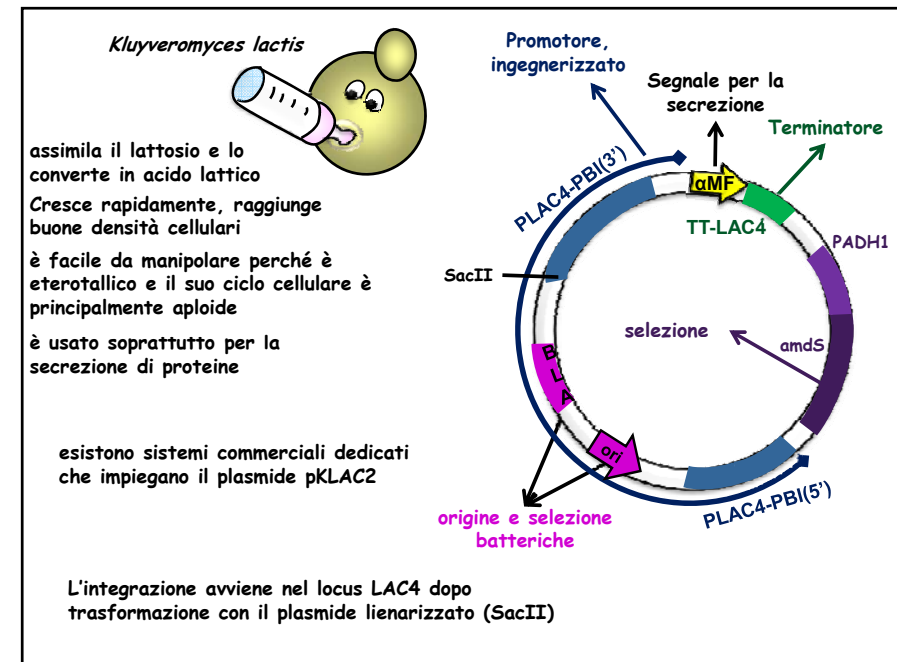
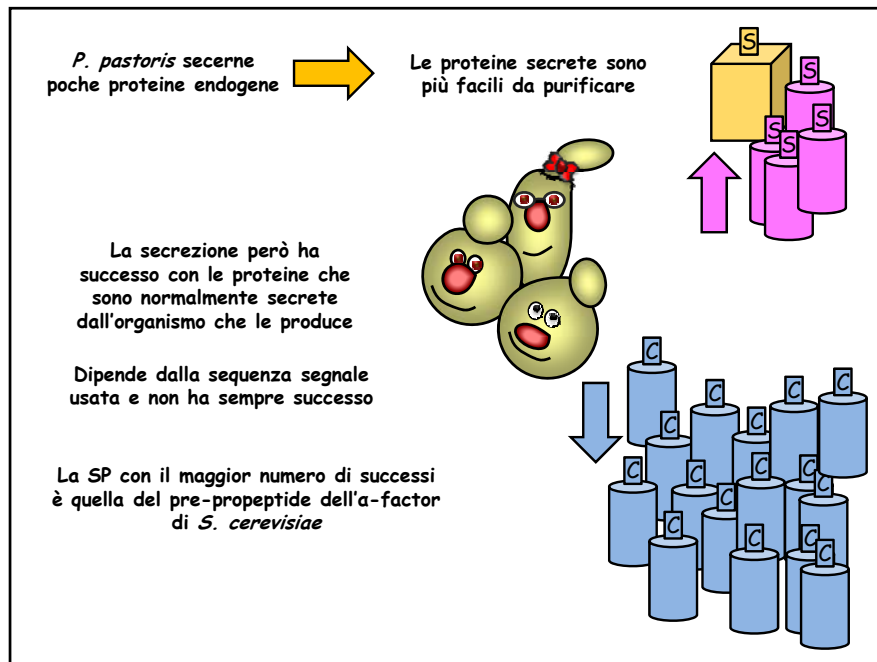
Questo effetto è causato in gran parte dalle proteasi vacuolari

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



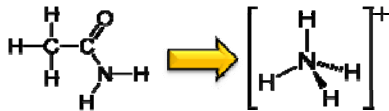




SELEZIONE

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	CAATGTGT	TATCAT	GTGAAGATG	-194
PB-II	-150	GAGAATTAT	TATTCT	TTGTTATGTT	-125
PB-III	-150	GAGAAT	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

