

Lieviti

Il lievito è un microorganismo unicellulare eucariote appartenente al regno dei funghi. Tra i più studiati sono i lieviti della famiglia *Saccharomyces*, i quali vengono usati da millenni nella fermentazione, per la preparazione di bevande alcoliche.

Saccharomyces cerevisiae è usato come organismo modello per studi farmacologici e lo studio di malattie.

S. cerevisiae cresce su substrati semplici. È possibile effettuare esperimenti di genetica classica, e le tecniche di manipolazione genetica disponibili su questo organismo sono molto avanzate.

Questo è un microorganismo non patogeno, GRAS.

Questo microorganismo eucariote è provvisto di una parete cellulare polisaccaridica, costituita principalmente da polisaccaridi. La parete cellulare ha la funzione di fornire resistenza meccanica alla cellula.

In *S. cerevisiae* si ritrovano dei vacuoli intracellulari, che permettono di mantenere una pressione interna, in modo da contrastare le variazioni di pressione osmotica dell'ambiente.

Dal processo di gemmazione che si ha nella replicazione del lievito residuano tracce sulla parete cellulare, sotto forma di anelli di chitina.

S. cerevisiae può vivere come organismo aploide e diploide, e possiede 16 cromosomi. Il suo genoma è formato da circa $1,4 \times 10^7$ bp. La ridotta dimensione del genoma è dovuta all'alta densità di informazione genetica, con pochi introni all'interno dei geni.

Condizioni di crescita

I lieviti necessitano di una fonte di carbonio, quali terreni contenenti zuccheri fermentabili (glucosio) e non fermentabili (etanolo, glicerolo). Necessitano anche di fonti di azoto, ad esempio peptidi nei terreni ricchi, o ammonio sui terreni sintetici. Questi microorganismi necessitano anche di vitamine.

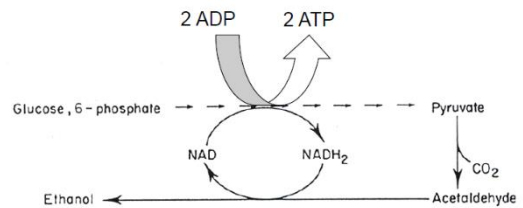
La temperatura ottimale di crescita del microorganismo è intorno ai 30°C, ed il pH è leggermente acido, tra 4,5 e 5,5.

Il lievito cresce sia in ambiente aerobico che in ambiente anaerobico (aerobio facoltativo).

Ha un diametro medio di 5-6 µm.

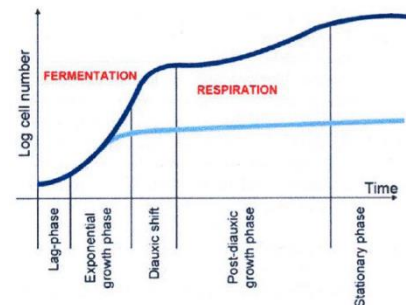
Vie metaboliche

S. cerevisiae è un lievito principalmente fermentativo. Quindi in anaerobiosi fermenta, mentre in aerobiosi può dar luogo a fermentazione a patto che nel terreno di coltura sia presente una concentrazione di glucosio maggiore dell'1 o 2%, per via del cosiddetto effetto Crabtree, o repressione da glucosio.



La respirazione è indotta da livelli molto bassi di glucosio nel terreno di coltura.

Nell'immagine vediamo la tipica curva di crescita di un lievito in un terreno contenente glucosio. Si evidenzia una prima fase di lag, seguita da una fase di crescita esponenziale con metabolismo fermentativo. Quando il glucosio diventa limitante si ha una fase di "Shift diauxico", dove si ha il passaggio da un metabolismo di tipo fermentativo ad un metabolismo di tipo respiratorio.



Quando il glucosio si esaurisce, le cellule iniziano a metabolizzare l'etanolo precedentemente prodotto. Quando anche questa fonte di carbonio si esaurisce le cellule entrano in fase stazionaria.

Proliferazione

Il lievito *S. cerevisiae* è un lievito *gemmante*, poiché quando si deve duplicare fa una gemma, che è una protrusione della membrana che acquisisce un nucleo e poi si separa dalla cellula madre, dando luogo ad una cellula più piccola. Si ha quindi una popolazione eterogenea per dimensioni.

Un altro lievito, come il *Schizosaccharomyces pombe* che è un lievito *a fissione*, presenta una cellula allungata che quando si deve dividere si allunga e poi forma un setto centrale, che darà luogo a due cellule di dimensioni simili.

Le fasi del ciclo cellulare di queste cellule sono comuni alle cellule eucarioti, per questo motivo sono utilizzati come modello per lo studio della regolazione del ciclo cellulare.

Ciclo vitale

S. cerevisiae può avere un patrimonio genetico aploide oppure diploide. Questi organismi sono diversi tra loro. Gli organismi aploidi si possono trovare come tipo cellulare **a** e come tipo cellulare **α**. Questi sono in grado di accoppiarsi e dare origine ad una cellula diploide **a/α**, che non è in grado di accoppiarsi perché deriva dall'accoppiamento dei due tipi cellulari.

Gli aploidi e i diploidi sono diversi			
	<i>MATa</i>	<i>MATα</i>	<i>MATa/MATα</i>
Tipo cellulare	a	α	a/α
Accoppiamento	sì	sì	no
Sporulazione	no	no	sì
Feromone	fattore a	fattore α	nessuno
Recettore	lega il fattore α	lega il fattore a	nessuno

Il diploide è in grado di sporulare, cosa che non sono in grado di fare gli aploidi.

I ceppi aploidi che appartengono al tipo **a** ed al tipo **α** sono in grado di produrre dei feromoni, quindi molecole diffusibili, e producono anche dei recettori cellulari che sono in grado di legare i feromoni

prodotti dal tipo cellulare opposto. Le cellule di tipo **a** producono il *fattore a* ed esprimono il *recettore α*, mentre le cellule di tipo **α** producono il *fattore α* ed esprimono il *recettore a*.

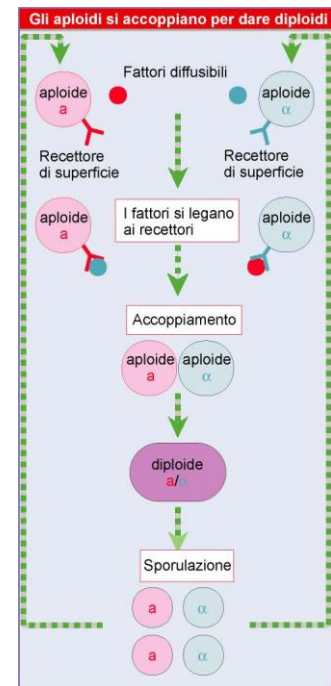
Quando cellule aploidi di tipi diversi si trovano nello stesso terreno di coltura, grazie all'interazione recettore-ligando si potrà avere l'accoppiamento, che darà luogo alla formazione di una cellula diploide **a/α**. La cellula diploide in condizioni di carenza di nutrienti è in grado di sporulare, cioè va incontro a meiosi, dando origine a 4 cellule aploidi, che sono racchiuse in una struttura che prende il nome di **asco**. Queste cellule aploidi vengono chiamate *spore*. Queste rappresentano una forma molto resistente della cellula, che ha un basso contenuto di acqua ed una parete cellulare spessa.

L'asco che racchiude le spore è costituito dalle stesse componenti che costituiscono la parete cellulare, quali *glicani* e *mannani*.

In condizioni ambientali ottimali le spore possono degradare la loro parete e dar luogo a quattro cellule aploidi.

I diploidi sono generalmente più grandi degli aploidi. Gli aploidi gemmano sempre nella stessa posizione, quindi una gemma si forma sempre in prossimità della zona in cui si era formata la gemma precedente.

I diploidi invece spesso gemmano nella posizione opposta a quella della gemmazione precedente.



Genetica classica

Il diploide contiene ogni gene in duplice copia; si possono quindi introdurre mutazioni anche in geni *essenziali*. Nel diploide la mutazione in un gene vitale non influenza il fenotipo, perché il microorganismo avrà ancora l'altro allele sano a compensare la perdita di funzione.

La sporulazione del diploide, con formazione di 4 cellule aploidi, porta alla manifestazione del fenotipo mutante negli aploidi che hanno ereditato l'allele mutato, facilitando quindi la comprensione dell'importanza di un gene per la sopravvivenza del microorganismo.

Gli aploidi permettono di associare due diverse mutazioni. Ad esempio in un ceppo **a** viene mutato il gene *X*, mentre nel ceppo **α** viene mutato il gene *Y*. Dall'accoppiamento di questi aploidi si avrà un diploide **a/α** con mutazione ai geni *X* ed *Y*.

Analisi delle tetradi

L'obiettivo dell'esperimento è determinare se una mutazione in un gene di interesse (VPG: vostro gene preferito) determina la morte del microorganismo.

Le cellule diploidi in questione sono URA3⁻ (URA3 endogeno non funzionante). URA3 codifica per una proteina che partecipa alla sintesi dell'uracile.

Nel diploide ogni gene VPG è presente in duplice copia. Esiste una metodica che permette una agevole delezione di uno specifico gene, che viene sostituito con un gene di selezione, ad esempio URA3.

Le cellule diploidi di partenza non saranno in grado di crescere in un terreno privo di uracile, perché non avranno il gene URA3. Le cellule che hanno subito la delezione di VPG con il gene URA3 saranno invece in grado di crescere sul terreno privo di uracile.

A questo stadio dell'esperimento non è ancora possibile comprendere se il gene VPG deleto sia un gene essenziale o no, perché il diploide lo possiede in due alleli, di cui solo uno è stato sostituito.

Si mettono quindi i diploidi su cui è stata fatta la delezione in un terreno povero di nutrienti, per permetterne la sporulazione.

La cellula diploide darà luogo a quattro spore aploidi. A questo punto viene degradata la parete dell'asco mediante opportuni enzimi (*zimoliasi*). La degradazione della parete non deve essere totale, perché si vuole che le singole spore restino lassamente adese tra loro.

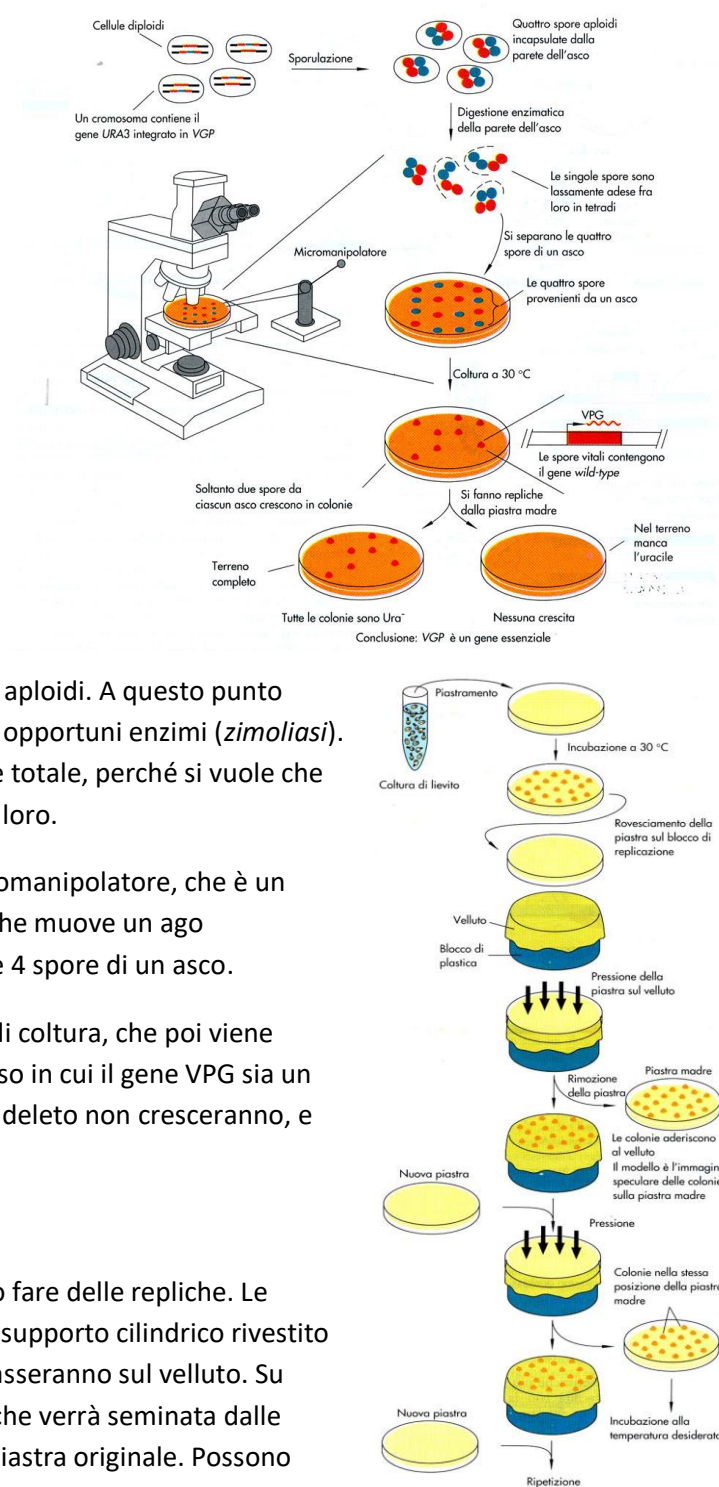
Le 4 spore vengono poi separate con un micromanipolatore, che è un microscopio associato ad un sistema di leve che muove un ago microscopico, il quale permette di separare le 4 spore di un asco.

Le spore vengono posizionate in una piastra di coltura, che poi viene conservata a 30°C per circa due giorni. Nel caso in cui il gene VPG sia un gene essenziale le spore in cui questo è stato deleto non cresceranno, e cresceranno solo quelle con il gene *wild type*.

Per accertarsi di questa condizione si possono fare delle repliche. Le repliche si fanno rovesciando la piastra su un supporto cilindrico rivestito di velluto. Le colonie della piastra originale passeranno sul velluto. Su questo velluto si poggia una piastra vergine, che verrà seminata dalle colonie sul velluto in maniera speculare alla piastra originale. Possono essere fatte più repliche.

Una replica viene fatta su una piastra con terreno completo, mentre l'altra viene effettuata su una piastra con terreno selettivo, senza uracile. Ricordando che il diploide originario è URA3-, sul terreno privo di uracile non cresceranno le cellule che non hanno subito la delezione di VPG con il gene URA3. La piastra con terreno ricco serve come controllo, per capire se la replica è avvenuta.

Le piastre vengono nuovamente incubate.



Se il gene VPG è essenziale, sulla piastra priva di uracile le cellule non sopravviveranno, perché le spore che non hanno subito la delezione di VPG sono URA3-, mentre le spore che hanno subito la delezione di VPG con il gene URA3 mancano adesso del gene essenziale VPG.

Trasformazione

Esistono metodiche che permettono in maniera agevole di trasferire nella cellula di lievito del materiale genetico esogeno, anche proveniente da organismi diversi dal lievito.

Sono stati costruiti vettori plasmidici che sono in grado di replicare sia in lievito che in *E.coli*.

Le cellule trasformate devono essere agevolmente identificate e separate dalle cellule che non hanno integrato il plasmide. Questo è possibile grazie a marcatori genetici che permettono di evidenziare la presenza del plasmide nelle cellule trasformate.

Metodi di trasformazione

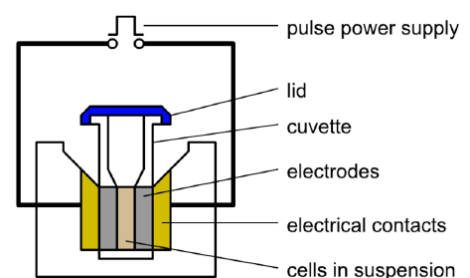
Metodi chimici

I metodi chimici più utilizzati sono 2:

- **Trasformazione con sferoplasti:**
 - Prevede la rimozione enzimatica della parete cellulare. La cellula di lievito priva della parete cellulare prende il nome di *sferoplasto*. Gli sferoplasti vengono trattati con DNA in presenza di una soluzione di *cloruro di calcio* e *polietilen glicole* (PEG). Gli sferoplasti sono delicati, quindi nella soluzione tampone è presente del sorbitolo che serve a creare un ambiente iperosmotico, il quale previene la rottura delle cellule prive di parete cellulare, che sarebbe causata dall'ingresso eccessivo di solvente nella cellula. Dopo il trattamento le cellule vengono seminate in un terreno selettivo solido.
- **Trasformazione con litio acetato**
 - La parete cellulare non viene rimossa e le cellule vengono trattate con Sali di litio (litio acetato), DNA e PEG. Un breve shock termico permette l'ingresso del materiale genetico nelle cellule. Le cellule vengono poi piastrate in un terreno selettivo solido.

Metodi fisici

Il metodo fisico più utilizzato è l'elettroporazione. L'elettroporazione si serve di uno strumento, detto *elettroporatore*. In questo strumento viene inserita una cuvetta che contiene il plasmide (DNA) in sospensione e le cellule. L'elettroporazione consiste nel somministrare delle scariche elettriche alla soluzione, che causano l'apertura temporanea di micropori sulla parete cellulare attraverso cui il DNA in sospensione può entrare.



Plasmidi

Molti ceppi di lievito *S. cerevisiae* contengono un plasmide endogeno, che si chiama 2μ . Questo è un plasmide circolare di dsDNA da 6,3 kb e si trova nel nucleo ceppi che lo presentano. Questo plasmide non è essenziale.

Il plasmide endogeno è stato completamente sequenziato, ed è presente in circa 40-60 copie per genoma aploide. Il plasmide viene replicato una volta per ciclo cellulare, a partire da una origine di replicazione autonoma (ARS, autonomous replicating sequence).

Esistono diversi tipi di vettori plasmidici che possono essere usati per trasformare ceppi di lievito *S. cerevisiae*.

Vettori 2μ - YEp (Yeast Episomal plasmid)

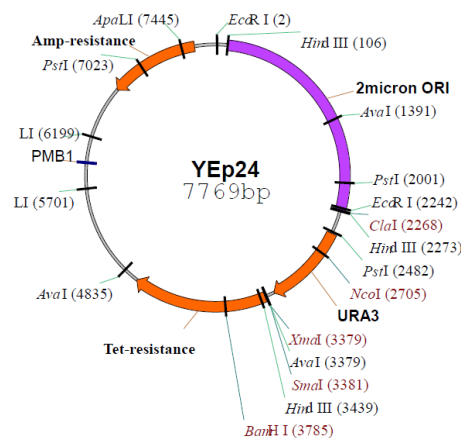
Questi plasmidi derivano dal plasmide naturale di lievito 2μ . Nell'immagine vediamo uno YEp24, che è un plasmide acquistabile. In generale i vettori YEp sono *vettori shuttle*, nel senso che sono in grado di replicarsi sia nelle cellule di lievito che nelle cellule di *E. coli*. Questi vettori contengono una origine di replicazione per *E. coli*, una origine di replicazione per il lievito. Contengono inoltre un marcatore di selezione per *E. coli*, cioè una proteina che da

resistenza ad un antibiotico (es. *ampicillina*), ed un marcatore di selezione per il lievito (es. *trp1*) come una proteina coinvolta nella sintesi di metaboliti essenziali (es. *triptofano*).

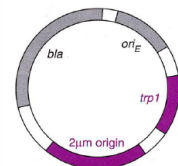
I marcatori di selezioni permettono di discriminare tra cellule trasformate e non, che vengono coltivate su un terreno di selezione che permette la crescita soltanto a cellule trasformate, che contengono il gene del marcatore di selezione.

Nei plasmidi sono inoltre inserite sequenze per il taglio da parte di enzimi di restrizione. Gli enzimi di restrizione tagliano il DNA in corrispondenza di specifiche sequenze. Ne esistono 2 classi: classe I e classe II. Gli enzimi usati per la preparazione dei plasmidi sono spesso enzimi di classe II perché sono enzimi che tagliano all'interno della sequenza riconosciuta (?). Il plasmide deve essere aperto dall'enzima di restrizione nel momento in cui vi si voglia inserire del DNA esogeno. I siti di taglio per gli enzimi di restrizione sono raggruppati in una regione del plasmide detta *polylinker*. Il taglio con uno specifico enzima di restrizione causa la linearizzazione del plasmide, il che permette l'integrazione di frammenti di DNA che presentino delle estremità compatibili.

Il vettore YEp è presente all'interno della cellula trasformata in circa 20-50 copie. Questo plasmide è stabile. La stabilità di un plasmide è determinata dalla percentuale di colonie trasformate che mantengono il



N° copie: elevato (20-50)
Stabilità: relativamente alta



bla = ampicillin resistance
oriE = origine replicazione *E. coli*
trp1 = marcatore selezionabile in *S. cerevisiae*
2 μ = origine replicazione in *S. cerevisiae*

plasmide dopo una coltura overnight in assenza di selezione.

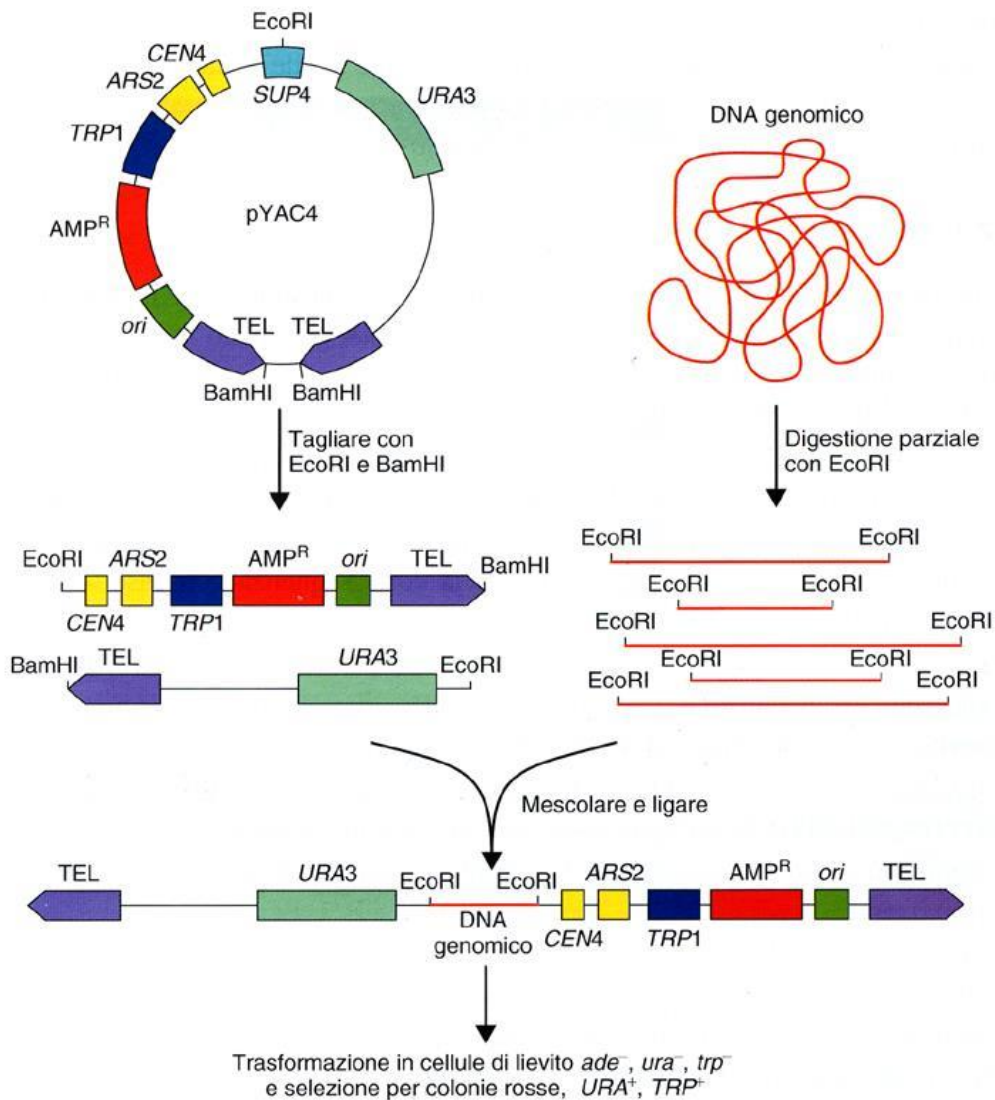


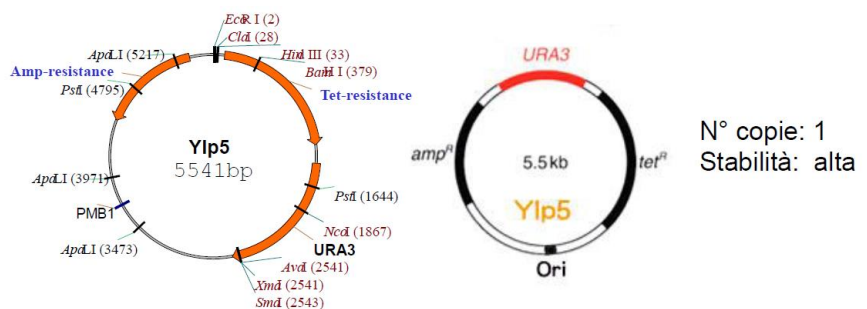
Figura 3.18. Clonaggio di un grosso frammento di DNA in un vettore YAC. Vedi il testo per i dettagli.

Vettori Origin-less - Yip (Yeast Integrative plasmid)

I plasmidi integrativi non possiedono una origine di replicazione, quindi non possono replicarsi in maniera autonoma e devono integrarsi nel cromosoma di lievito. Anche questi sono plasmidi shuttle, con una origine di replicazione per *E.coli*, ma non una origine di replicazione per il lievito.

Anche qui sono presenti i due marcatori di selezione per lievito ed *E.coli*. Sono inoltre presenti siti di taglio per enzimi di restrizione all'interno della regione polylinker.

Questo tipo di plasmidi sono molto stabili, e sono presenti in singola copia per genoma.



N° copie: 1
Stabilità: alta

La ricombinazione tra sequenze omologhe permette l'integrazione di questo tipo di plasmidi al genoma della cellula.

Vettori ARS – YRp (Yeast Replicative plasmid)

I vettori ARS (Autonomously Replicating Sequence) sono dei plasmidi che contengono una origine di replicazione per E.coli e dei marcatori di selezione sia per il lievito che per E.coli. È presente una origine di replicazione per il lievito, che è una ARS. Questo tipo di plasmide ha una bassa stabilità di integrazione, per cui sono poco utilizzati.

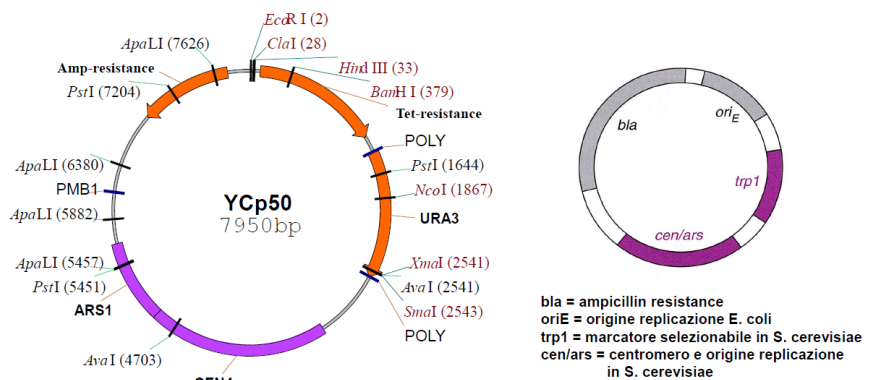
Vettori ARS/CEN – YCp (Yeast Centromeric plasmid)

Sono plasmidi centromerici. Questi vettori hanno i soliti marcatori per E.coli e lievito, una origine di replicazione per E.coli ed una origine di replicazione per lievito, che è una ARS. Contengono anche una sequenza centromerica di lievito.

La sequenza centromerica permette a questo tipo di vettori di segregare correttamente durante la mitosi, per cui la stabilità di questi vettori è alta.

Questo tipo di plasmidi si comportano come piccoli cromosomi circolari. Sono presenti in 1 – 2 copie per cellula.

YCp50 è un vettore centromerico molto utilizzato.



YAC – Yeast Artificial Chromosome

Gli YAC sono cromosomi artificiali di lievito, e sono vettori al cui interno è possibile inserire frammenti di DNA di dimensioni consistenti, fino a circa 600.000 kb.

Componenti essenziali di un vettore YAC:

- Centromero, telomeri e sequenze di replicazione autonoma (ARS)
- Marcatore di resistenza (*Amp*) per stabilire una selezione positiva in E.coli
- Una Origine di replicazione per E.coli
- Marcatori di selezione auxotrofica come *TRP1* ed *URA3* per la selezione nel lievito
- Siti di restrizione unici (es. *EcoRI* e *BamHI*)

Gli YAC possono esistere in due forme: *circolare* in E.coli, e *lineare* nel lievito.

La sequenza bersaglio dell'enzima di restrizione *Bam*HI si trova tra le due sequenze telomeriche dello YAC.

Procedura

Clonare una sequenza di DNA di interesse all'interno di uno YAC così formato è possibile seguendo una specifica procedura.

1. Si digerisce il DNA dello YAC con gli enzimi di restrizione *Bam*HI e *Eco*RI. Da questi tagli si ottengono i due bracci dello YAC. Ognuno dei due bracci lega un marcatore di selezione per il lievito diverso, ed una sequenza telomerica. Uno dei due bracci lega anche una sequenza telomerica ed una ARS.
2. Il frammento o frammenti di DNA che andranno a legarsi al vettore devono avere estremità compatibili a quelle del vettore. In questo caso il sito di clonaggio è il sito *Eco*RI, perché le sequenze telomeriche (sito *Bam*HI) devono stare alle estremità.
3. Si ottiene così una sequenza di DNA lineare che ha alle due estremità una sequenza telomerica.

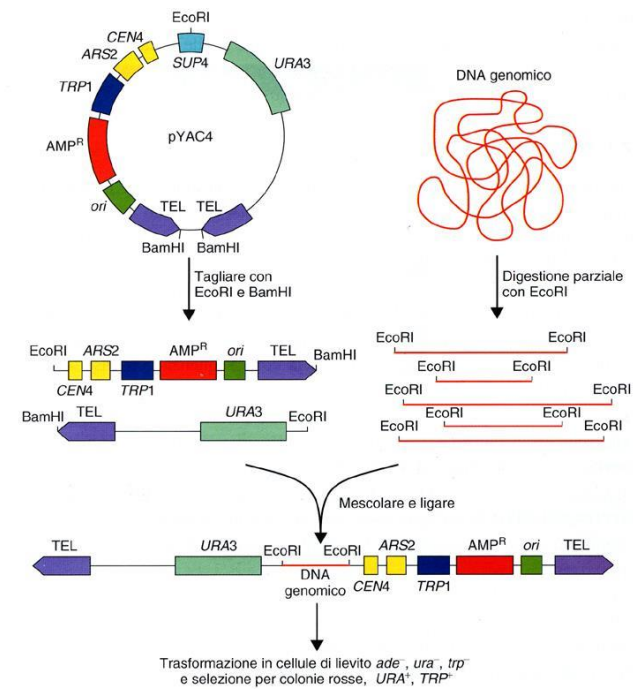


Figura 3.18. Clonaggio di un grosso frammento di DNA in un vettore YAC. Vedi il testo per i dettagli.

Lo YAC si comporta come un cromosoma lineare del lievito, nel quale viene trasferito.

Il lievito in cui viene trasferito lo YAC ha delle mutazioni sui geni *TRP1* e *URA3* che ne annullano la funzione, e sul gene *ADE2*. Questo permette di selezionare le cellule di lievito che contengono lo YAC, che contiene anche una copia funzionante dei geni *TRP1* e *URA3*, ed una copia non funzionante di *SUP4*.

Si utilizzano due marcatori perché dato che l'integrazione del DNA esogeno nello YAC richiede la formazione di 2 bracci, mettendo un marcatore in ogni braccio ci si assicura che vengano selezionate solo le cellule che hanno all'interno uno YAC con due bracci diversi.

Il sito di clonaggio di *Eco*RI si trova all'interno di un altro marcatore, che è *SUP4*. Questo marcatore serve a selezionare le cellule che hanno all'interno uno YAC che ha effettivamente integrato DNA esogeno.

SUP4 è un tRNA soppressore. Quando lo YAC non ha integrato il DNA esogeno, il gene *SUP4* sarà funzionante e produrrà il tRNA soppressore, che è una molecola di tRNA con una mutazione nell'anticodone che gli permette di riconoscere dei codoni di stop, quindi in grado di sopprimere mutazioni non-senso. In questo caso la mutazione non-senso è nel gene *ADE2* della cellula del lievito.

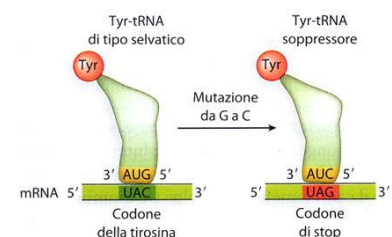


FIGURA 17.10 La struttura di un tRNA soppressore. Il tRNA^{Tyr} con l'anticodone 5'-GUA riconosce il codone UAC. L'anticodone del soppressore tRNA^{Tyr} porta una mutazione che lo trasforma in 5'-CUA, per cui si appaia con il codone nonsenso (stop) UAG, inserendo un residuo di Tyr nella proteina.

Le cellule che hanno una mutazione in ADE2 sono in grado di crescere in assenza di adenina, ma diventano rosse. Le cellule di lievito che hanno YAC senza DNA esogeno esprimono il tRNA soppressore SUP4 e saranno in grado di sopprimere la mutazione sul gene ADE2, saranno quindi bianche, e non rosse.

Se le cellule di lievito hanno uno YAC che ha integrato il DNA esogeno, queste non potranno più sintetizzare il prodotto del gene SUP4, rimosso dall'integrazione di materiale esogeno, e saranno quindi rosse perché avranno il gene ADE2 endogeno non funzionante. Queste sono le cellule che dovranno essere selezionate, perché portano lo YAC in cui si è integrato il DNA esogeno.