

Marcatori di selezione

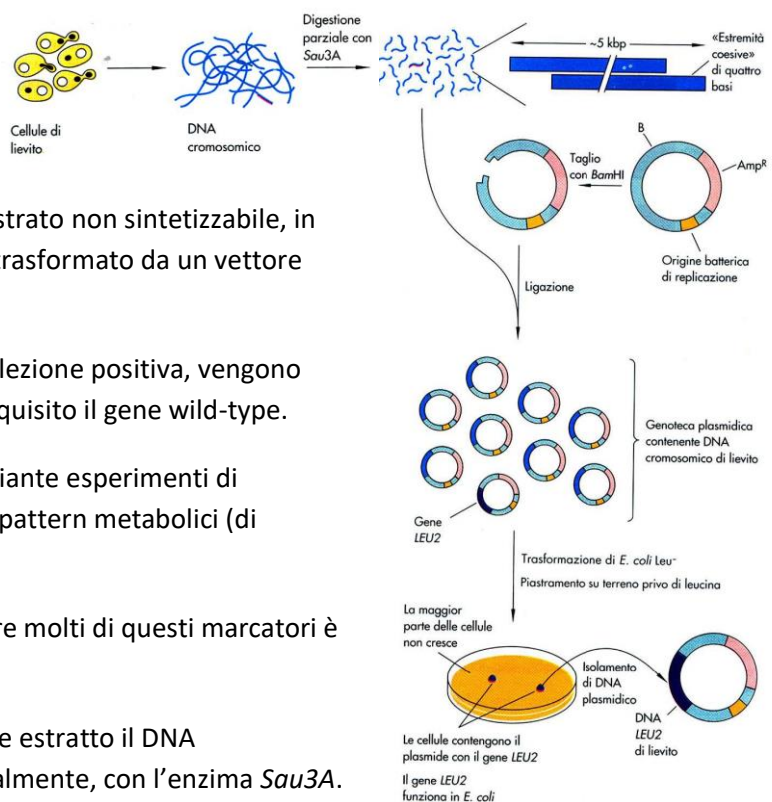
I marcatori di selezione si dividono in due categorie:

Marcatori auxotrofi

Sono geni che codificano per proteine coinvolte in pathway metabolici, come la sintesi di aminoacidi o di basi azotate, come URA3 che codifica per una decarbossilasi, TRP1 che codifica per una isomerasi, ed altri.

Selezione positiva

Questi marcatori si utilizzano per microorganismi auxotrofi, cioè che non sono in grado di sintetizzare una molecola richiesta per la sua crescita. Un microorganismo può ad esempio essere auxotrofo per una mutazione su URA3, e sarà quindi in grado di crescere solo se nel terreno di coltura è presente il substrato non sintetizzabile, in questo caso l'uracile, oppure se viene trasformato da un vettore contenente il gene URA3 wild-type.



Con questi marcatori si effettua una selezione positiva, vengono quindi selezionati i ceppi che hanno acquisito il gene wild-type.

Questi marcatori sono stati isolati mediante esperimenti di complementazione nei corrispondenti pattern metabolici (di *E. coli*??).

La procedura che ha permesso di isolare molti di questi marcatori è la seguente.

Si parte da cellule di lievito, da cui viene estratto il DNA cromosomico, che viene digerito parzialmente, con l'enzima *Sau3A*. La sequenza riconosciuta dall'enzima è GATC.

I frammenti ottenuti vengono clonati in plasmidi digeriti con un enzima che genera estremità compatibili con quelle generate dall'enzima *Sau3A*, ad esempio *BamHI*.

La sequenza riconosciuta da questi due enzimi non è esattamente la stessa, ma il taglio genera delle estremità compatibili. Dalla ligazione del DNA esogeno ai plasmidi si ottiene una libreria plasmidica, che contiene frammenti di DNA che nel loro insieme rappresentano l'intero genoma del lievito. Su alcuni di questi plasmidi sarà presente quindi la sequenza codificante, ad esempio, il gene *LEU2*. Si trasformano quindi cellule di *E. coli* con mutazione *Leu*⁻ e si piastra su terreno privo di leucina.

Si selezioneranno così solo i ceppi che avranno integrato il plasmide contenente LEU2.

Il gene LEU2 funziona in E.coli, per cui è possibile la selezione.

Dalle colture di E.coli si ottiene il DNA plasmidico che poi verrà sequenziato.

Selezione negativa

Nella selezione negativa sopravvivono i ceppi che hanno perso il marcatore.

Un gene come URA3 può funzionare da marcatore sia per la selezione positiva che per la selezione negativa. La selezione negativa avviene quando le cellule contenenti una copia wild-type del gene vengono messe in coltura in presenza di un *agente controselettivo*. Un agente controselettivo è un composto che di per sé non è tossico per la cellula, ma viene convertito in un composto tossico nel momento in cui la cellula ha una via biosintetica completa, in questo caso quella dell'uracile.

Le cellule che contengono il marcatore URA3 vengono poste in presenza di un agente controselettivo quale l'*acido 5-fluoroorotico* 5-FOA. Questo non è un composto tossico, ma in presenza dell'enzima prodotto del gene URA3 si ha la conversione di 5-FOA in un composto tossico. Vengono così selezionati i mutanti *ura3-*, che saranno coltivati in terreni contenenti uracile.

Markeri dominanti

I markeri dominanti sono geni che codificano per proteine in grado di degradare molecole tossiche per la cellula, ad esempio antibiotici.

Un marcatore dominante spesso utilizzato è il prodotto del gene NEO, che codifica per l'enzima *Amino glucoside 3'-fosfotransferasi*. Questa proteina è in grado di permettere alle cellule di crescere in presenza di Geneticina (G418). Questi markeri non richiedono un particolare genotipo dell'ospite, al contrario delle metodiche precedenti.

Agente tossico	Prodotto genico/Marcatore
G418 (Geneticina)	Amino glucoside 3'-fosfotransferasi (Gene NEO)
Igromicina B	Igromicina B Fosfotransferasi (Gene HPT)
Rame	Rametonina (CUP1)

I promotori

I vettori di cui abbiamo parlato non sono vettori di espressione. I vettori di espressione permettono di esprimere il gene clonato all'interno di essi, perché contengono tutti i segnali di trascrizione e traduzione necessari all'espressione di un gene clonato.

I vettori della serie pYX sono molto utilizzati e contengono vari promotori. Per esprimere un gene clonato deve essere presente un promotore endogeno (del gene clonato) oppure deve essere presente un promotore per lievito nella sequenza del vettore.

Una tipica unità di trascrizione contiene un promotore (TATA box). Contiene anche una sequenza attivatrice a monte (UAS) che svolgono in lievito la funzione degli enhancers delle cellule degli eucarioti superiori.

Affinché un gene esogeno possa essere espresso in lievito deve essere presente un promotore che funzioni in lievito. Se il gene è eterologo un promotore adeguato al lievito dovrà essere presente nel vettore.

I promotori si suddividono in promotori costitutivi e promotori inducibili.

I promotori costitutivi sono sempre espressi, non sono regolabili. Comunque esistono condizioni in cui anche i geni costitutivi possono essere più o meno espressi. Tra i promotori costitutivi troviamo quelli degli enzimi glicolitici.

Il lievito è un organismo con metabolismo principalmente fermentativo, quindi i promotori costitutivi per enzimi glicolitici funzionano bene quando il lievito viene fatto crescere su glucosio.

Promotore	Caratteristiche
PGK	Efficiente/glucosio
GAPDH	Efficiente/glucosio
ENO1, ENO2	Efficiente/glucosio
TPI	Efficiente/glucosio
ADH1	moderat. Efficiente/glucosio

I promotori inducibili sono quei promotori che permettono di disaccoppiare la crescita della cellula dalla produzione della proteina. Tra i promotori inducibili troviamo quelli che inducono la trascrizione dei geni GAL, che vengono indotti dalla presenza di Galattosio nel terreno di coltura e vengono soppressi dalla presenza di glucosio.

Promotore	Caratteristiche
GAL1-GAL10	Efficiente/galattosio/Gal4
PHO5	Moderat. Efficiente/basso Pi
CUP1	Moderat. Efficiente/Cu
HSP70	Moderat. Efficiente/T°