

Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

Lezione 28

Lievito *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae è un organismo eucariote unicellulare che si divide per gemmazione. La cellula figlia si stacca dalla madre, ed è più piccola rispetto a quest'ultima. La gemmazione lascia un anello di chitina sulla regione da cui si è prodotta la cellula figlia.

S.cerevisiae può formare pseudoife, con le cellule che mantengono un collegamento.

Il lievito *S. cerevisiae* si può trovare in forma aploide o in forma diploide, ed ha 16 cromosomi. Il lievito contiene anche il genoma mitocondriale ed un plasmide 2 μ .

I cromosomi del lievito contengono centromero e telomeri, e sono più semplici di quelli degli eucarioti superiori.

S.cerevisiae è stato il primo organismo eucariote sequenziato. Non è patogeno e cresce velocemente.

Ha un sistema di ricombinazione omologa molto efficiente e quindi può essere trasformato agevolmente.

Mating Type

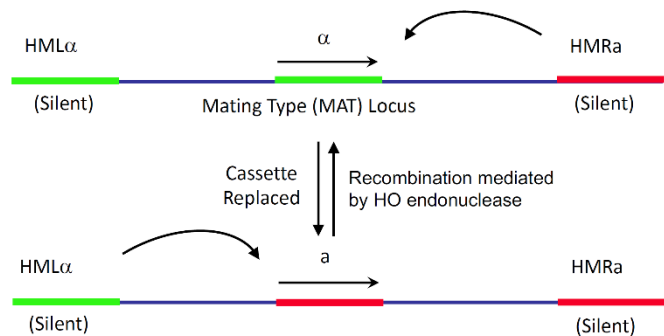
Il lievito può trovarsi in forma **a** o in forma **α** . Cellule **a** e cellule **α** possono unirsi a formare il diploide. Il diploide si divide per mitosi, e può originare cellule aploidi mediante meiosi.

I ceppi di lievito si dividono in omotallici ed eterotallici. *S. cerevisiae* in natura è un ceppo omotallico, cioè che è in grado di cambiare tipo sessuale, scambiando il gene MATa con il gene MAT α .

In laboratorio si usano per lo più ceppi eterotallici, con mutazioni che impediscono di fare lo switch di mating-type.

L'enzima HO endonucleasi si occupa di fare un taglio endonucleolitico ad una sequenza specifica sul locus MAT, che permette la ricombinazione con uno dei due geni HMRa e HML α , effettuando lo switch di mating type.

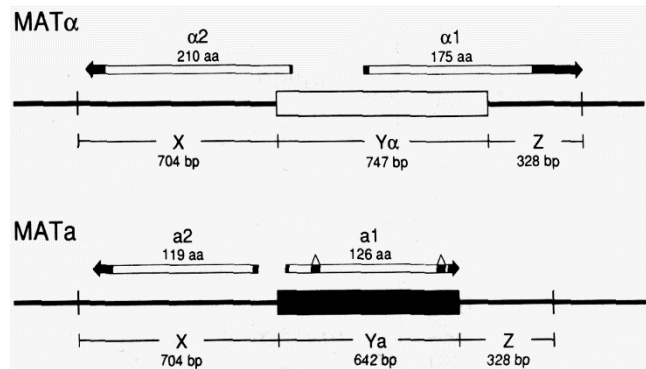
Le cellule **a** producono il *fattore-a* e rispondono al *fattore- α* . Le cellule **α** producono il *fattore- α* e rispondono al *fattore-a*. Questa interazione causa una serie di risposte cellulari che portano alla fusione delle cellule.



Le cellule aploidi esprimono geni specifici, come RME1 che è un repressore della meiosi.

Il gene *MAT α* codifica per la per le proteine $\alpha 1$ ed $\alpha 2$.

- La proteina $\alpha 1$ è un attivatore della trascrizione dei geni α specifici.
- La proteina $\alpha 2$ è un repressore trascrizionale e reprime l'espressione dei geni a specifici.

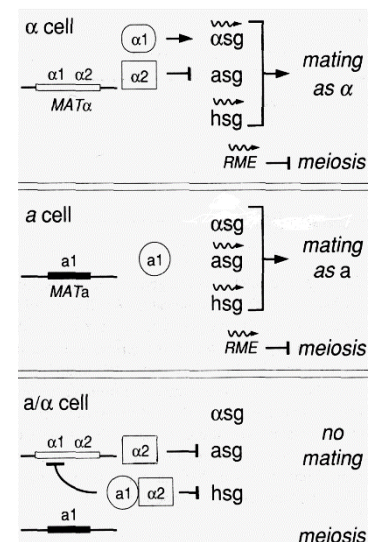


Il gene *MATa* ha l'informazione che codifica per le proteine $a 1$ ed $a 2$.

- Non si conosce bene la funzione della proteina $a 2$
- La proteina $a 1$ (non dice la funzione)

Nel ceppo *MATa* i geni α non sono espressi perché non viene espresso l'attivatore $\alpha 1$. Allo stesso modo i geni a vengono espressi perché non c'è il repressore $\alpha 2$.

Nella cellula diploide l'espressione di $a 1$ ed $\alpha 2$ fa sì che queste due proteine interagiscano, con inibizione dei geni aploide specifici e del gene $\alpha 1$. I geni a specifici vengono repressi da $\alpha 2$, mentre i geni α non vengono prodotti perché l'attivatore $\alpha 1$ è inibito.



Markers e ceppi

Il lievito è un organismo sensibile a vari antibiotici, come la *kanamicina*.

Ci sono diverse strain di laboratorio, come W303-1A, S288C, SK1 (utile per lo studio della meiosi).

Nomenclatura geni del lievito

I geni WT si scrivono con lettere maiuscole. Di solito sono formati da tre lettere ed un numero, ad esempio TPS1, RHO1, CDC28.

Geni mutati con mutazioni recessive si scrivono in minuscolo corsivo (italics), ad esempio *tps1*, *rho1*, *cdc28*.

L'allele mutante in un gene mutato è definito da un trattino ed un numero dopo il nome del gene, ad esempio *tps1-1*, *rho1-23*, *cdc28-2*.

Se la mutazione è stata costruita, ad esempio attraverso delezione, si indica ad esempio con *tps1Δ::HIS3*. La presenza dei due punti indica che il gene *tps1* è stato sostituito da *HIS3*.

Le proteine si scrivono con la prima lettera maiuscola e le altre minuscole, non in corsivo. A volte viene messa la lettera 'p' alla fine del nome della proteina, ma questa usanza non è sempre rispettata.

Questo per quanto riguarda i geni di lievito con un nome. Ci sono poi tutti gli altri geni in cui tramite sequenziamento si è prevista la presenza di un *open reading frame*, ma che non sono mai state studiate. Il nome di questi geni è quello che viene dal sequenziamento, ad esempio:

YDR518C, che significa:

- Y : Yeast
- D : è il cromosoma su cui si trova, D sta per il cromosoma 4
- R : significa 'right', può anche essere L, 'left'. Indica il lato in cui si trova il gene rispetto al centromero. Il lato destro o sinistro rispetto al centromero è stato definito dai ricercatori che hanno sequenziato il lievito.
- 518 : è il numero dell'ORF rispetto al centromero.
- C : 'Crick', può anche essere W 'Watson', indica la direzione (quale strand) della ORF.

Alcuni geni non seguono la nomenclatura precedente, come HO oppure MAT α e MAT α .

Si possono usare vari marker di selezione in lievito, alcuni sono correlati al metabolismo, come HIS3, LEU2, LYS2, TRP1, URA3. Il ceppo in cui questi vengono usati come marker di selezione deve avere le copie WT di questi geni non funzionanti.

Altri marcatori sono detti dominanti, e codificano per proteine di resistenza a farmaci, come KANMX per la resistenza alla kanamicina, NATMX per la resistenza alla nurseotricina e HPHMX, per la resistenza alla igromicina.

Vettori

Il lievito può essere trasformato con dei plasmidi, che possono essere di diverso tipo.

Ci sono plasmidi *integrativi*, che devono integrarsi nel genoma di lievito per essere propagati, e plasmidi *replicativi*, che hanno una origine di replicazione.

Ci sono plasmidi con un centromero, che quindi possono segregare durante la replicazione cellulare.

I ceppi trasformati con plasmidi replicativi non sono esattamente stabili, quindi è preferibile ad uso industriale utilizzare ceppi trasformati integrando l'informazione genetica nel genoma.