

Sono stati studiati tre tipi di eventi di integrazione che possono avvenire nelle cellule di lievito.

**Tipo I:** integrazione per ricombinazione mediante singolo crossingover nel locus omologo (gene targeting).

**Tipo II:** integrazione per ricombinazione mediante singolo crossingover in un locus non omologo. Poco usato perché se vogliamo integrare del DNA esogeno nel genoma del lievito, vogliamo sapere dove si andrà ad integrare.

**Tipo III:** integrazione per ricombinazione mediante doppio crossingover nel locus omologo (sostituzione genica).

### Integrazione di Tipo I

Si usa un plasmide integrativo, con *ori* per E.coli, un marker di selezione per E.coli come il gene *bla* che codifica per una beta-lattamasi che conferisce resistenza per l'*ampicillina*, un marcatore di selezione per il lievito come URA3, ed un inserto di materiale genetico che si vuole integrare nel genoma di lievito.

Un evento di ricombinazione tra il gene URA3 del plasmide e lo stesso gene (mutato) sul cromosoma del lievito permette l'integrazione del plasmide nel genoma del lievito, che presenterà ora la copia del gene marker URA3 funzionante.

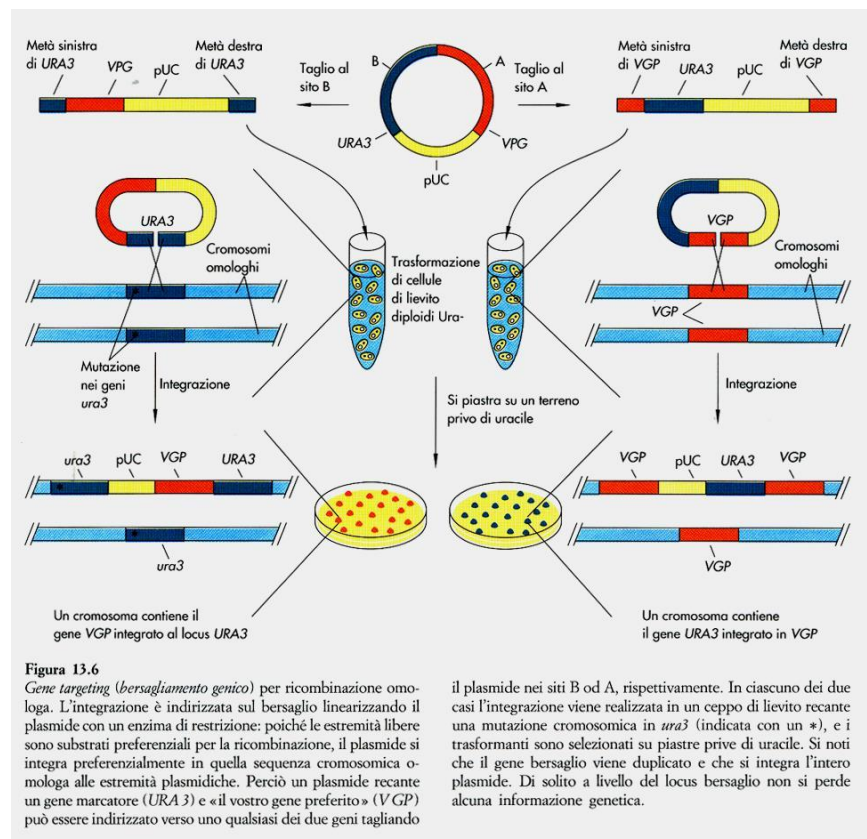
Il plasmide quindi si inserisce nel locus del gene URA3, in un

evento di integrazione di tipo I, anche detto di *Gene Targeting*. La probabilità di integrazione nel lievito è più alta con frammenti di DNA lineari. L'integrazione si effettua eseguendo un taglio sul DNA mediante un enzima di restrizione. L'integrazione è facilitata dal fatto che le estremità libere sono substrati preferenziali per la ricombinazione, e ricombinano preferenzialmente con sequenze cromosomiche omologhe a quelle delle estremità libere. Un taglio all'interno della sequenza plasmidica del gene bersaglio, URA3, ne facilita l'integrazione nel locus *ura3* presente nel genoma della cellula.

La selezione dei cloni che contengono il plasmide avviene su un terreno privo di uracile, dove cresceranno solo i cloni con una copia del gene URA3 funzionante.

La stessa procedura può essere fatta tagliando sul gene VPG presente nel plasmide, per fare integrare il plasmide nel locus VPG del genoma della cellula. Questo solo se la regione VPG è presente nel genoma.

Nella cellula in cui si integrerà il plasmide ci sarà una duplicazione del gene target dopo l'integrazione.



## PCR

Grazie all'utilizzo della PCR è possibile effettuare varie procedure di manipolazione genetica, come il gene targeting, gene replacement, rimozione di un gene, gene tag ecc...

La PCR è una metodica di amplificazione del DNA che prevede la ripetizione ciclica di 3 passaggi. Il campione di DNA da amplificare è inserito in un termostato, nel quale la variazione ciclica di temperatura permette di effettuare cicli di replicazione del DNA campione.

Il primo passaggio è quello della denaturazione, in cui la soluzione contenente il DNA template viene riscaldato a circa 95°C ed avviene la separazione delle due eliche di DNA.

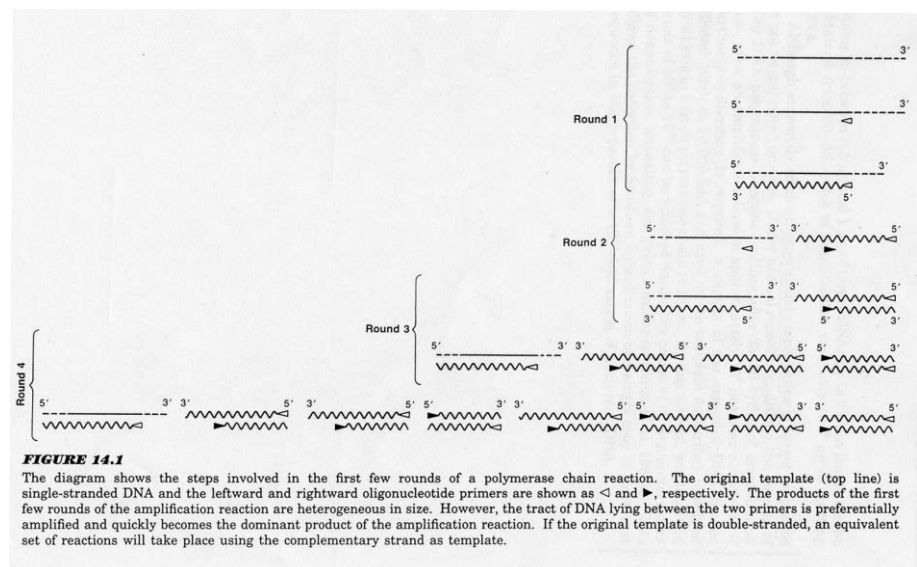
Il secondo passaggio è l'annealing, in cui primer specifici si legano a sequenze complementari sul DNA template.

Il terzo passaggio consiste nell'allungamento, o primer extension, in cui si ha la replicazione del DNA tra i due primer.

Il tempo in cui viene mantenuta la temperatura di allungamento dipende dalla dimensione del materiale genetico tra i due primer.

Questi tre passaggi si ripetono ciclicamente amplificando il materiale

genetico. Vediamo come già al terzo passaggio iniziano ad esserci sequenze amplificate di dimensione corretta.



Al 5' dei primer è possibile aggiungere sequenze non presenti sul template, che verranno poi integrate nel frammento amplificato.

## Delezione di un gene di lievito mediante PCR

Per rimuovere un gene dal genoma di lievito è possibile utilizzare il meccanismo di ricombinazione di tipo III, che usa un doppio crossing over per inserire un plasmide. In questo caso si usano *cassette di delezione* che contengono alle estremità delle regioni di omologia con quelle confinanti a monte e a valle del gene da rimuovere. L'omologia delle estremità permette l'integrazione della cassetta nel genoma e l'escissione della regione di genoma che contiene il gene target. La cassetta contiene anche un marcatore di selezione (con promotore e terminatore inclusi) che permette successivamente di selezionare solo i cloni di lievito che hanno integrato il plasmide.

In una PCR tradizionale i primer hanno una lunghezza di 18-20 nucleotidi. In questo caso avranno una lunghezza compresa tra i 50 ed i 60 nucleotidi, e sono bipartiti.

Un primer di questo tipo contiene due sequenze: una sequenza da 20 nucleotidi che si appaia al vettore, ad una delle estremità del gene marcatore di selezione come LEU2, ed una sequenza di 30-40 nucleotidi che si appaia al genoma di lievito. Questo permetterà di creare delle cassette di selezione specifiche per il gene che vogliamo sostituire.

La selezione dei ceppi trasformati viene fatta su terreni di selezione, in questo caso terreni privi di leucina.

Non è detto però che in tutti i cloni la ricombinazione sia avvenuta sul gene target. Potrebbe succedere che la ricombinazione si verifichi al livello del gene marcatore di selezione, quale LEU2, anche se in misura minore rispetto alla integrazione nelle sequenze omologhe a quelle delle estremità del plasmide.

La cassetta potrebbe anche integrarsi in un locus non omologo.

Si effettua quindi un PCR di controllo.

Se l'integrazione è avvenuta nel locus del gene target, si rileverà che il gene target è stato sostituito dal marcatore di selezione. In altre colonie la potrebbe esserci una situazione diversa. Ad esempio se il plasmide si integra in un locus non omologo si ritroverà il gene target ancora nel suo locus.

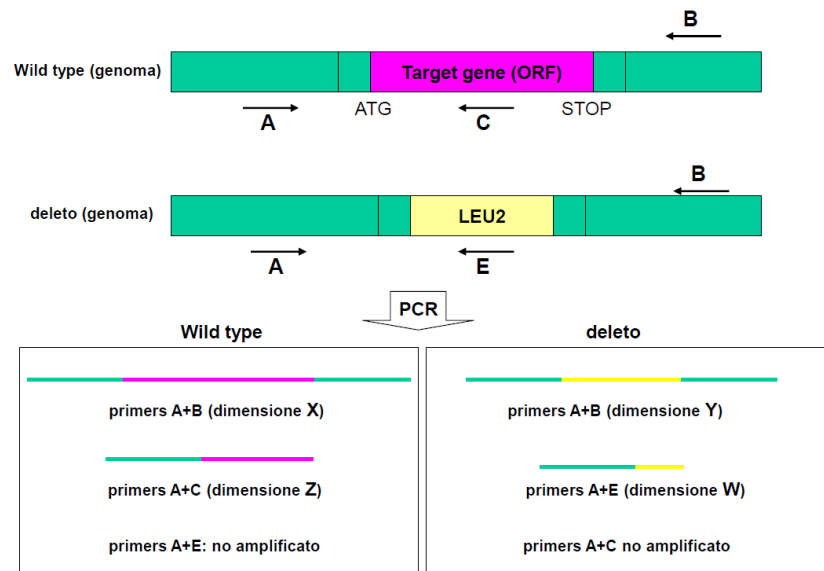
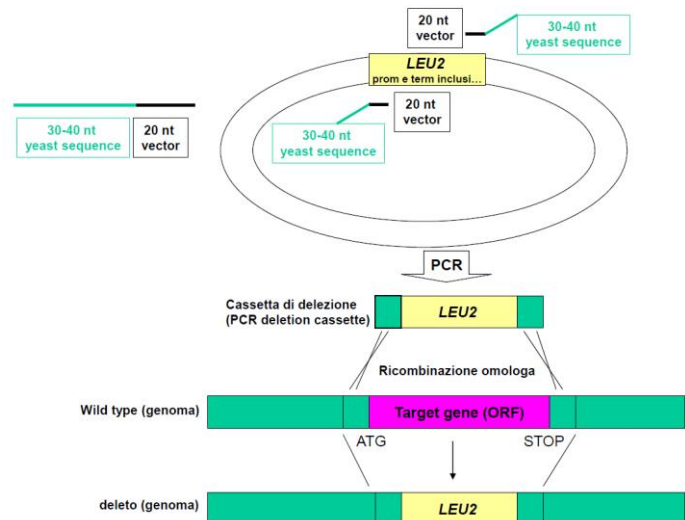
Per vedere l'avvenuta integrazione si utilizzano coppie di primer:

A : si trova a monte della sequenza ATG del gene target.

B : si trova a valle della sequenza stop del gene target.

C : si trova sul gene target

E : si trova sul gene marker di selezione



Utilizzando i primer A e B si potrà verificare se si è avuta l'integrazione o meno, grazie alla differenza di dimensioni del frammento nei due eventi.

I primer A e C daranno un amplificato solo se non è avvenuta l'integrazione.

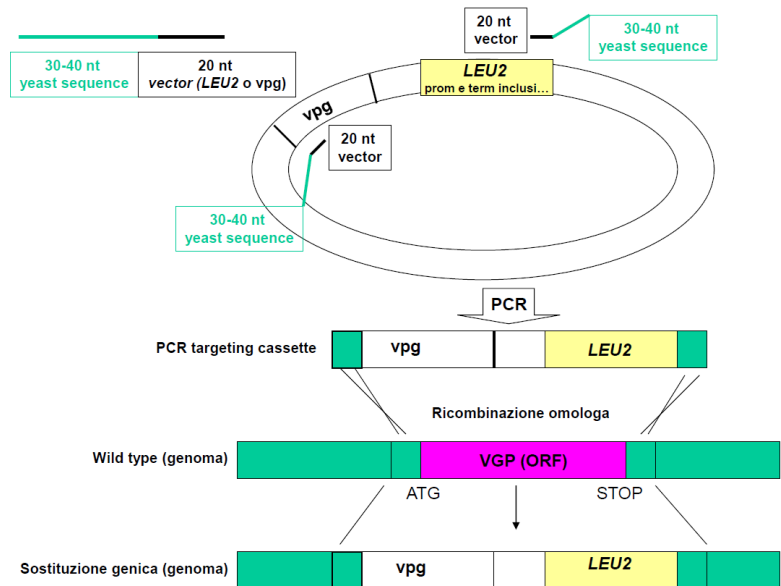
I primer A ed E daranno un amplificato solo se si è avuta l'integrazione della cassetta di delezione.

## Gene Replacement tramite PCR

Le cassette di targeting possono anche essere utilizzate per la sostituzione di un gene con la sua versione mutata. Vanno sempre creati gli stessi primer bipartiti con sequenze omologhe al lievito ed al vettore. Nella casetta va sempre inserito un marcatore di selezione, oltre alla versione mutata del gene oggetto di studio.

Le cellule che hanno integrato il plasmide verranno poi selezionate in un terreno di selezione.

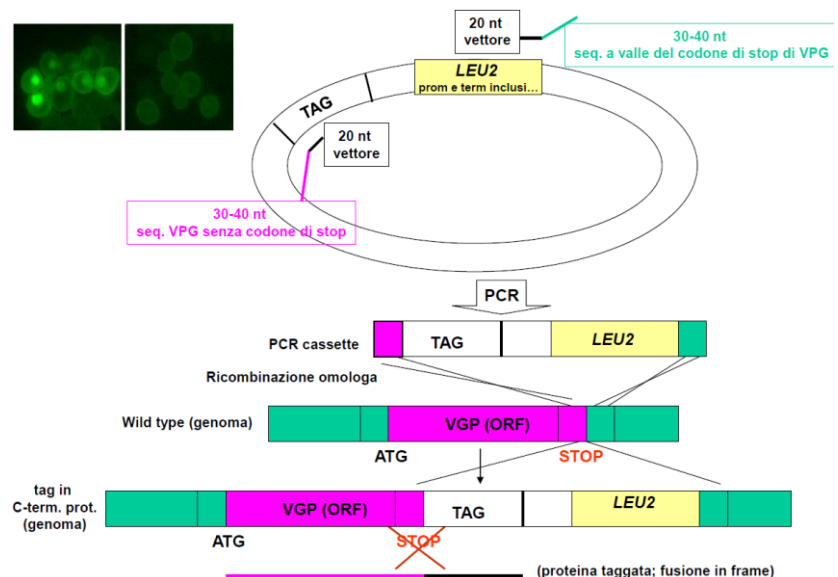
Il plasmide può anche integrarsi in un locus non omologo, va quindi fatta una PCR di controllo per verificare l'integrazione nel locus corretto.



## Yeast Gene Tagging mediante PCR

Mediante PCR è possibile aggiungere sequenze tag ad una delle estremità del gene oggetto di studio. Un tag è ad esempio la sequenza di una proteina fluorescente, oppure una sequenza NES, una sequenza di trasporto verso l'esterno del nucleo.

Meglio attaccare il tag all'estremità 3' del gene, perché alla estremità 5' c'è il promotore. Si usano i primer bipartiti per creare una casetta adeguata, che è così formata.



Per permettere l'integrazione della casetta di tag, la sequenza tag del vettore deve avere alla sua estremità 5' una porzione complementare a quella del VPG, senza il codone di stop perché la trascrizione deve dar luogo ad una proteina di fusione in frame che comprende il tag.

Il marker di selezione del vettore deve essere fiancheggiato a 3' di un frammento complementare al genoma a 3' del gene da taggare, a valle del codone di stop originario.

Anche in questo caso si devono coltivare i cloni in un terreno di selezione per selezionare i cloni che hanno integrato il plasmide. Si deve poi controllare con PCR che il plasmide si sia integrato nel locus corretto.