

Yeast as a Tool

È possibile utilizzare il lievito come strumento.

Si possono fare esperimenti di genetica classica per determinare se un gene è essenziale o meno, associando due diverse mutazioni nel diploide.

Il lievito può essere usato con la tecnica del doppio ibrido per valutare l'interazione tra due proteine note.

Il lievito è usato come organismo modello per lo studio dell'invecchiamento, dell'apoptosi, di malattie neurodegenerative, per patologie disfunzionali mitocondriali, e per molto altro.

Il lievito può essere usato per la produzione di proteine eterologhe.

Doppio Ibrido

Il metodo del doppio ibrido si basa sulla struttura modulare degli attivatori trascrizionali della RNA polimerasi II degli eucarioti.

Uno degli attivatori più noti e studiati è Gal4, che una proteina attivatore trascrizionale che funziona nell'attivazione dei geni collegati al metabolismo del galattosio. Gal4 è formato da una regione che si lega al DNA ed una regione attivatrice.

Il gene *lacZ* è sotto il controllo del promotore trascrizionale Gal4. Gal4 si lega con il suo dominio legante il DNA alla sequenza promotore specifica, mentre il dominio attivatore attiva la trascrizione del gene *lacZ*. Se nella proteina Gal4 è presente solo il dominio di legame e non la regione attivatrice, non si avrà l'attivazione della trascrizione sul gene *lacZ*.

I due domini di Gal4 possono quindi funzionare in maniera indipendente. È possibile quindi esprimere una proteina di fusione in cui il dominio di legame al DNA è rappresentato ad esempio dalla sequenza di legame di LexA, mentre la regione promotrice è quella di Gal4.

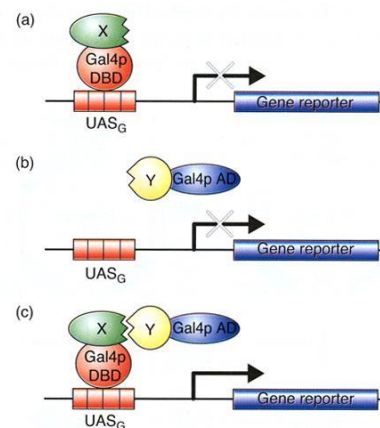
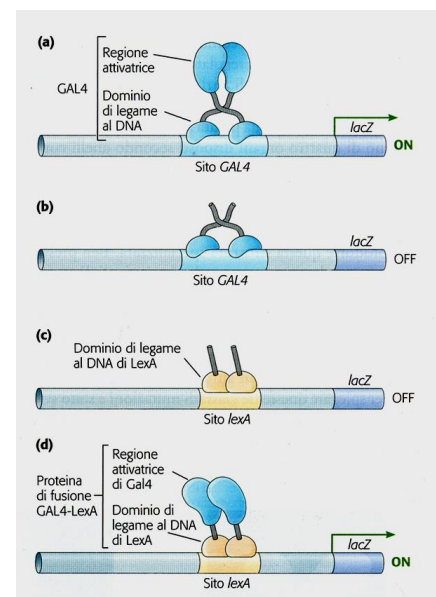


Figura 6.8. Lo screening two-hybrid. (a) Una proteina ibrida composta dal dominio di legame al DNA (DBD) di Gal4p e da una proteina esca (X) è in grado di legare il promotore del gene reporter ma non di attivarlo. (b) Una proteina ibrida composta dal dominio di attivazione (AD) di Gal4p e di una proteina preda (Y) non può attivare la trascrizione perché non è in grado di legare il DNA. (c) L'espressione di entrambe le proteine ibride può risultare nella ricostituzione di un attivatore trascrizionale funzionale e, quindi, nell'espressione del gene reporter, se le proteine esca e preda interagiscono tra loro.

Questo principio si può utilizzare nel saggio *two-hybrid*. Il dominio legante il DNA di Gal4 viene fuso ad una proteina esca X. Il dominio attivatore di Gal4 viene fuso ad una proteina preda Y. Se la proteina X e la proteina Y interagiscono tra loro si avrà un attivatore trascrizionale funzionale che darà luogo alla trascrizione di un gene reporter.

Per fare esprimere le proteine di fusione al lievito, questo può essere trasformato con plasmidi. Nel caso specifico si possono usare dei plasmidi episomici. In ognuno dei due plasmidi ci deve essere un marcatore di selezione diverso, per permettere di selezionare le cellule che hanno integrato entrambi i plasmidi. Si usa un promotore costitutivo forte come quello della alcol deidrogenasi ADH1.

In certi sistemi l'espressione delle proteine di fusione può essere fatta con un promotore inducibile, il che può essere utile quando si esprimono proteine tossiche per l'ospite.

Si selezionano le cellule che hanno integrato entrambi i plasmidi in un terreno di coltura selettivo.

Per vedere se le proteine X ed Y interagiscono si fa un saggio di attività della beta-galattosidasi (gene *lacZ* promosso dall'attivatore trascrizionale ibrido). Questo può essere fatto nel terreno di coltura se è presente XGal, che è un substrato cromogenico della beta-galattosidasi che assume un colore blu quando oggetto dell'attività enzimatica.

È importanti che vengano effettuati dei controlli. Il controllo negativo è dato dai vettori vuoti, per cui non ci deve essere attività beta-galattosidasi.

Il controllo positivo può essere dato da un ceppo trasformato con vettori che contengono proteine X ed Y di cui si è certi dell'interazione.

Devono essere anche effettuati test con cellule trasformate con uno solo dei due plasmidi, per accertarsi che una sola delle due proteine di fusione non sia in grado di attivare da sola la trascrizione del gene reporter *lacZ*.

Doppio Ibrido per librerie di cDNA

La tecnica del doppio ibrido può essere utilizzata per effettuare uno screening di librerie di cDNA. In questo caso il plasmide del DNA binding domain legherà un gene X *target*. Nel plasmide con l'activation domain

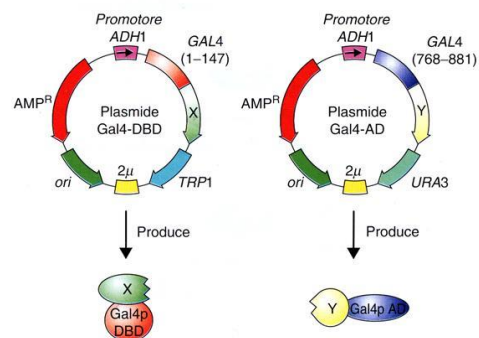


Figura 6.9. Plasmidi per la produzione delle fusioni con il dominio di legame al DNA e con il dominio di attivazione, necessarie per lo screening two-hybrid. Un plasmide produce l'ibrido con la fusione con il DBD e l'altro produce l'ibrido con la fusione con l'AD. Entrambi i geni per le proteine ibride sono espressi da un promotore costitutivo forte (ADH1) e sono contenuti su un plasmide ad alto numero di copie che porta la sequenza 2 μ. Diversi geni nutrizionali (TRP1 e URA3) permettono la selezione nelle cellule di lievito.

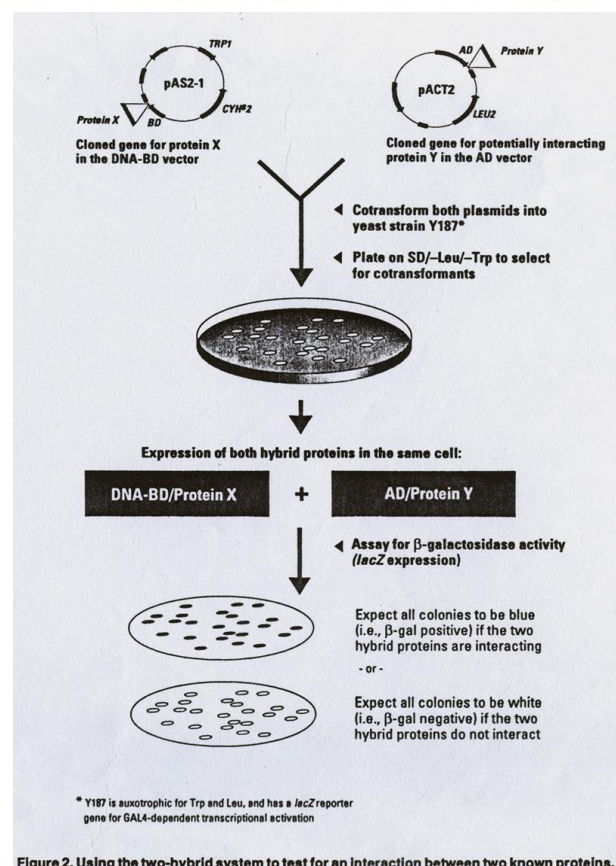


Figure 2. Using the two-hybrid system to test for an interaction between two known proteins.

legherà invece un inserto Y di DNA proveniente da una libreria genomica, del cui prodotto verrà testata l'interazione con la proteina X.

Si selezionano sempre i ceppi in un terreno di coltura che seleziona solo le cellule che hanno integrato entrambi i plasmidi. I cloni selezionati vengono saggiati per vedere se si ha attivazione dell'attività enzimatica beta-galattosidasi.

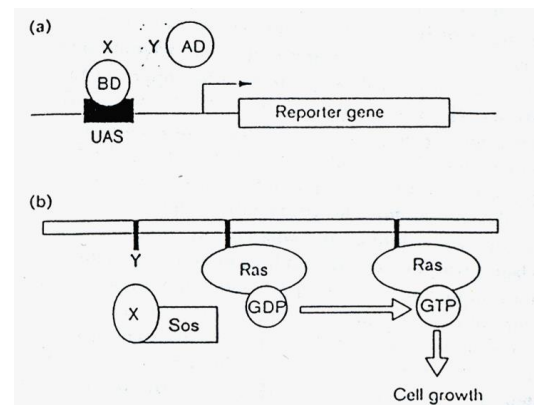
La presenza di reporter sotto il controllo di promotori diversi limita l'ottenimento di falsi positivi. Specialmente nel caso di screening di librerie genomiche, possono essere presenti frammenti di DNA che codificano per proteine che legano direttamente il DNA, per questo vanno usati controlli adeguati.

Sistema di reclutamento di Sos

Il sistema di reclutamento di Sos è un sistema a doppio ibrido che permette di analizzare interazioni proteina-proteina al livello della membrana plasmatica delle cellule di lievito.

All'interno delle cellule del lievito vengono fatte esprimere proteine di fusione. Sos è un fattore di scambio dei nucleotidi, mentre X è la proteina esca, cioè la proteina per cui si sta cercando una interazione con le proteine Y di una libreria. Sos lega X, mentre Y viene espressa come proteina di membrana.

Sos complementa la funzione di cdc25 nel lievito. I ceppi di lievito utilizzati per l'esperimento sono cdc25 termosensibili, con il gene cdc25 che non funziona oltre i 37°C. Sos complementa cdc25 solo se è reclutata in membrana. Sos viene reclutata in membrana quando cdc25 non funziona per via dell'aumento di temperatura, e continua a promuovere la crescita cellulare.

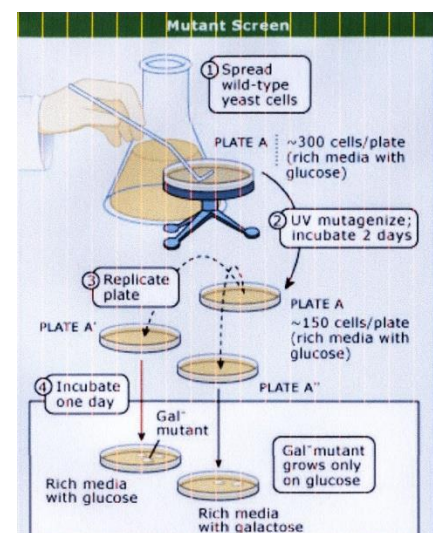


Molte proteine sono strutturalmente e funzionalmente conservate tra lievito ed organismi superiori. Questo permette l'uso del lievito come modello del funzionamento di cellule di organismi superiori, come i mammiferi.

Clonaggio di un gene per complementazione funzionale

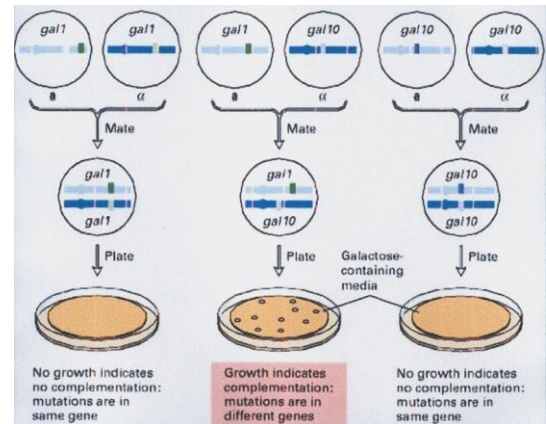
Ipotizziamo di dover studiare dei geni coinvolti nel metabolismo del galattosio. Bisogna avere dei mutanti che abbiano perso la capacità di crescere su galattosio. Vanno quindi cercati ed isolati questi mutanti.

Cellule aploidi wild type vengono seminate su una piastra ricca, contenente glucosio, e successivamente mutagenizzate con somministrazione di raggi UV o metodi chimici, ed incubate per 2 giorni. Lo scopo è quello di isolare mutanti che non crescono su galattosio.



Dopo l'incubazione sarà cresciuto un certo numero di colonie sulla piastra. Si fanno quindi 2 replica plates su due piastre, una con un terreno ricco di *glucosio* ed una con terreno ricco di *galattosio*.

Se ci sono colonie che crescono sulla piastra contenente glucosio e che non sono invece cresciute sulla piastra contenente galattosio, vorrà dire che queste colonie hanno acquisito una mutazione su uno dei geni correlati al metabolismo del galattosio.

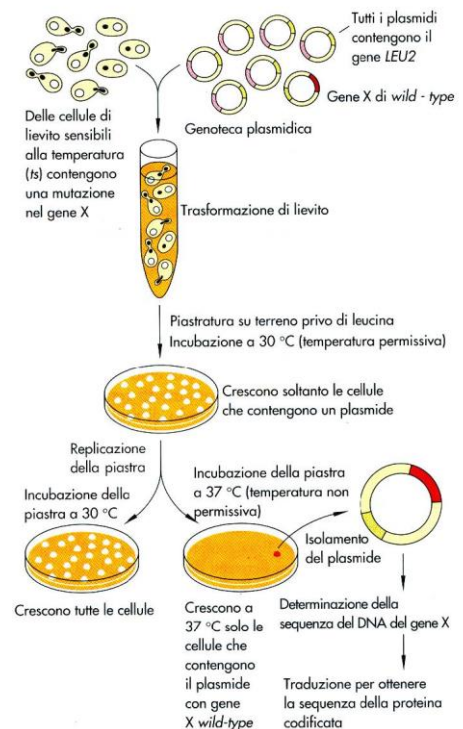


Queste cellule che metabolizzano glucosio ma non galattosio vengono trasformate con una libreria genomica di lievito, e vengono successivamente selezionate su terreno contenente galattosio, per vedere se uno degli inserti della libreria genomica complementa la mutazione su uno dei geni per il metabolismo del galattosio. Le colonie che cresceranno in seguito a questa seconda selezione verranno poi sequenziate per comprendere quale inserto genomico ha complementato la mutazione, rendendo nuovamente le cellule capaci di crescere su galattosio.

Dopo la fase di mutagenesi e selezione si possono trovare più colonie che crescono sul glucosio e non crescono su galattosio. Queste colonie *potranno avere acquisito una mutazione sullo stesso gene* oppure *una mutazione su un gene diverso* che partecipa al metabolismo del galattosio. Per comprendere se il locus della mutazione è lo stesso tra due coloni, è possibile creare un diploide dalla fusione di due mutanti aploidi, e poi selezionare il diploide su un terreno di selezione contenente galattosio. Se i due aploidi hanno una mutazione nello stesso gene le cellule diploidi non cresceranno perché non avranno nel loro genoma nemmeno una sequenza funzionante. Se invece si osserva la crescita di colonie diploidi in terreno selettivo vuol dire che si ha complementazione, vuol dire che le mutazioni sui due aploidi originali sono in geni diversi, e quindi il diploide risultante avrà almeno una copia wild type funzionante di ognuno dei due geni nel proprio genoma.

La tecnica della complementazione si può usare anche trasformando il lievito, che ha una mutazione specifica per un gene di interesse, mediante una libreria genomica di un altro organismo. In questo modo si può comprendere se una proteina di un altro organismo complementa la funzione di una proteina mutata in lievito. Questa tecnica è stata utilizzata per identificare GEFs (Guanoside Exchange Factor) di altri organismi in lievito.

La tecnica della complementazione può essere usata anche con mutazioni termosensibili (ts), in cui l'attività della proteina codificata dal gene con mutazione ts si annulla con l'aumento di temperatura. In questa tecnica dopo la trasformazione e la selezione dei trasformati su terreno di selezione si fanno due replica plates: una incubata a temperatura permissiva (30°C) a cui la proteina ts funziona, ed una incubata a temperatura non permissiva (37°C) a cui la proteina ts non funziona, e l'attività deve essere compensata dal plasmide proveniente dalla libreria genomica che si vuole testare.



Organismo modello

Il lievito può essere utilizzato come modello per comprendere i meccanismi cellulari, perché questi processi sono ben conservati tra il lievito e gli eucarioti superiori, compresi i mammiferi.

Invecchiamento

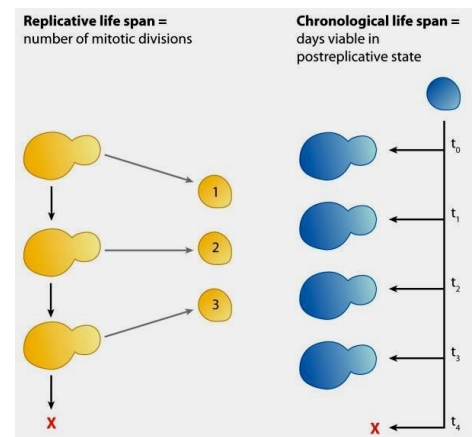
Il lievito viene utilizzato per studiare l'invecchiamento. I metodi utilizzati sono principalmente due:

Replicative life-span (RLS)

È la longevità replicativa, cioè il numero di divisioni mitotiche che una cellula può fare prima di morire. La cellula viene fatta replicare su un supporto solido, e le cellule figlie vengono rimosse mediante un micromanipolatore ad ogni divisione cellulare. In questo modo si riescono a contare le replicazioni della singola cellula.

Chronological life-span (CLS)

È la longevità cronologica. È il metodo più usato. Rappresenta il periodo di tempo in cui una cellula in fase stazionaria (che non si divide) è in grado di restare vitale. Le cellule di lievito vengono messe in coltura in un terreno povero di nutrienti. Ad intervalli successivi di circa due giorni le cellule vengono contate per vedere quante ne restano ??? un po' confuso, meglio cercare altrove.



Questi studi hanno permesso che ci sono diversi fattori che influiscono sulla longevità, come ad esempio i ROS, le mutazioni, l'accorciamento dei telomeri, la carenza di nutrienti.

Invecchiamento ed apoptosi

Si è visto che l'invecchiamento è correlato ad una progressiva morte cellulare per apoptosi. L'apoptosi aumenta con l'invecchiamento delle cellule.

Partendo da un numero noto di cellule seminate su una piastra, si mette la coltura in incubazione e ad intervalli di tempo regolari si prende un campione e si controlla la percentuale di cellule sopravvissute. Si osserva che la percentuale di sopravvivenza diminuisce col passare del tempo.

Dei ricercatori hanno usato questo metodo per cercare di comprendere in che modo morivano le cellule che invecchiavano, se per necrosi o apoptosi. Sul campione al giorno 6 sono stati testati i marcatori di apoptosi ed i marcatori di necrosi.

Le cellule che muoiono per apoptosi hanno caratteristiche specifiche, quale il DNA frammentato. Questa caratteristica può essere messa in evidenza mediante il colorante TUNEL. Le cellule in apoptosi presentano anche condensazione della cromatina, che può essere messa in evidenza mediante la colorazione DAPI.

Le cellule in apoptosi risultano positive alla colorazione con *annessina V*. L'*annessina V* è una proteina calcio-dipendente che si lega alla fosfatidilserina. La fluorescenza è data dal fluoroforo coniugato all'*annessina*, che è la FITC (fluorescein isothiocyanate).

L'*annessina* è in grado di legare la fosfatidilserina, e di dare fluorescenza con il fluoroforo coniugato. La fosfatidilserina è un fosfolipide che si trova normalmente nel lato interno della membrana cellulare. Durante l'apoptosi la fosfatilserina viene a localizzarsi anche sul versante esterno della membrana plasmatica, permettendo all'*annessina V* di legarsi ad essa ed emettere fluorescenza.

Il legame può avvenire anche in assenza di apoptosi ed in presenza di necrosi, perché con la rottura della membrana cellulare causata dalla necrosi si ha rilascio della fosfatidilserina, che legherà *annessina V* generando fluorescenza.

Per questo motivo quando si effettua una colorazione con *annessina V* in genere si effettua anche una colorazione con un altro fluoroforo che permette di verificare

l'integrità della membrana. Questo fluoroforo è il PI, Ioduro di Propidio, che è un intercalante del DNA, che si lega al DNA ed emette fluorescenza nel rosso nel momento in cui la parete cellulare non è integra.

Quando la cellula non emette fluorescenza né all'*annessina V* che al PI, starà ad indicare che la membrana è integra e la cellula è vitale.

Cellule che risultano positive all'*annessina V* e negative al PI saranno cellule in fase precoce di apoptosi.

Cellule che saranno negative all'*annessina V* e positive al PI saranno cellule in necrosi.

Le cellule positive sia all'*annessina V* che al PI saranno cellule in fase avanzata di apoptosi o cellule all'inizio della fase di necrosi.

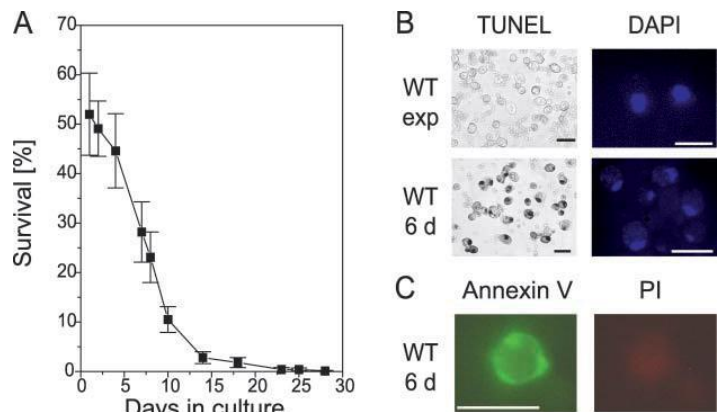
L'apoptosi nel lievito è interessante perché questo è un organismo unicellulare, per cui l'apoptosi della cellula equivale alla morte dell'organismo. Si è visto che l'apoptosi è una risposta che si è evoluta perché il lievito è un microorganismo che si sviluppa in colonie, e quindi l'apoptosi diventa un meccanismo di sopravvivenza della colonia a discapito della singola cellula.

Malattie degenerative: α -synucleopatie

Le α -sinucleopatie sono caratterizzate dalla formazione di aggregati della proteina α -sinucleina nelle regioni colpite dell'encefalo, come ad esempio la malattia di Parkinson.

Queste patologie possono essere studiate nel lievito anche se il lievito non ha un sistema nervoso. Per far ciò è possibile trasformare cloni di lievito con vettori contenenti il gene mutato della α -sinucleina.

L'espressione di questa proteina in lievito causa la formazione di aggregati simili a quelli presenti nelle cellule di pazienti umani che hanno la malattia di Parkinson.



Su queste celle è stato misurato il chronological life-span, che ha dimostrato come le cellule che esprimono α -sinucleina hanno una minore CLS rispetto alle cellule di controllo.

Si è anche cercato se nelle cellule trasformate c'è un aumento dei ROS. Si è visto che le cellule trasformate hanno una produzione maggiore di ROS (però sia quelle con α -syn WT che quella modificata...).

Usando il lievito come modello di patologie neurodegenerative si è visto come vari tipi di stress causino diverse risposte da parte della cellula.

Possono essere fatti diversi test per valutare la risposta delle cellule di lievito a degli stress, che prevedono una procedura specifica.

Le cellule di lievito, sia WT che con mutazioni in geni di vie di trasduzione importanti, vengono trasformate con la proteina oggetto di studi, ad esempio l' α -sinucleina. Si contano le cellule e si valuta se l'espressione della proteina determina un effetto sulla crescita o meno. Di solito il gene clonato ha un promotore inducibile, che permette di discriminare l'effetto della proteina neurotossica.

