

Životní cyklus kvasinek

Jsou známy dva typy haploidních buněk: α a alfa.

U **heterotalických** kmenů se tyto dva typy pomnožují vegetativně jako stabilní jednotky po řadu generací mitotickým cyklem. Totéž platí pro diploidní zygoty. Za určitých podmínek růstu může však zygota sporulovat a ve vřecku vytvořit čtyři haploidní spory (2α a 2alfa).

U **homotalických** kmenů jsou haploidní buňky nestabilní a spontánně revertují na opačný buněčný typ. Tyto buněčné kmeny jsou proto schopny konjugace a mohou být udržovány a propagovány pouze jako diploidní buňky.

Diploidní kultury za určitých kultivačních podmínek mění mitotický cyklus na meiotický a vznikají čtyři haploidní spory. Ve vřecku jsou pozorovány čtyři haploidní spory (2α a 2alfa). Jednotlivé buňky – spory, lze mikromanipulátorem separovat a propagovat vegetativně aniž ztrácejí svůj původní buněčný typ, tj. α nebo alfa. K získání diploidní buňky se musí smíchat dvě buňky odlišného párovacího typu. Konjugaci se podrobují jen buňky opačných typů.

Byly pozorovány rozdíly ve stabilitě těchto buněčných typů: heterotalické typy jsou stabilní, homotalické nestabilní. **Haploidní buňky heterotalických druhů zůstávají haploidní v kultuře a vždy exprimují stejný buněčný typ.**

U haploidních buněk homotalických druhů se buněčný typ s určitou frekvencí mění z α na alfa a naopak.

Konjugace mezi těmito dvěma typy vede k diploidním buňkám a **homotalické kmeny obsahují proto vždy diploidní buňky α /alfa.**

Buněčný typ je podmíněn jedním **genovým lokusem MAT** (mating type), který je obsazován **transpozicí alelami α nebo alfa.**

Výhodou změny haplotypů je možnost sledovat recesivitu a dominanci alel, a projevy alel sledovat na haploidním pozadí.

Plazmid kvasinek 2 mí

Plazmid je 2μ dlouhý (6.3 kb) a vyskytuje se v **karyoplazmě** u většiny kmenů *S. cerevisiae*. Nemá žádnou známou funkci. Na haploidní buňku se vyskytuje v počtu **50-100 kopií**, což reprezentuje 2-4% celkového genomu kvasinek. Plazmid je rozdělen dokonalými obrácenými repeticemi o délce 599 bp na dvě jedinečné oblasti (tvar činky), každou s párem genů transkribovaných z divergentního promotoru (Obr. 13-2). Jeden z těchto genů, **zvaný FLP**, **zodpovídá za "flipping" aktivitu - kóduje místně specifickou rekombinázu**, která katalyzuje rekombinaci mezi sekvencemi v obrácených repeticích. Když k tomu dojde, je orientace neopakovaných sekvencí obrácena, a plazmid tudíž může existovat ve dvou izomerních formách.

Plazmid má se může **přenášet do jiných druhů kvasinek**. Každá oblast (část) kóduje jeden genový pár, který je transkribován ze vzdálených promotorů.

Popisy obrázků

Klonování kvasinkových biosyntetických genů komplementací v *E. coli*.

Postup byl využit pro vyhledání vhodných selekčních markerů u kvasinek – dochází ke komplementaci analogických biosyntetických genů *E. coli* a kvasinek. Jedná se o defekty v týchž enzýmech.

Obrázek znázorňuje strategii pro klonování genu *Leu2*. Konvenční metodou se zkonstruuje plazmidová genová knihovna kvasinkové chromozomové DNA. Knihovnou se transformuje mutant *leu- E. coli*, deficientní ve stejném enzymu, který kóduje gen *Leu2*. Bakterie, které získají plazmid s genem *Leu2* jsou schopny exprimovat hladinu enzymu umožňující jim růst za nepřítomnosti leucinu. Tyto bakterie lze snadno izolovat výsevem na plotny bez leucinu. Plazmidy se získají z těchto buněk.

Náhrada chromozomálního genu u kvasinek a následná tetradová analýza. Náhrada chromozomálního genu **genem inaktivovaným nebo jinak modifikovaným** je komplikovanějším procesem než jednoduchá integrace - vyžaduje dvojitý crossing-over. K inaktivaci žádaného genu (YFG) se z genu (YFG) klonovaného v plazmidu odstraní restriční fragment a nahradí se markerovým genem (URA3). Tato inserce vyřadí gen YFG a zruší jeho funkci. Z takto připraveného plazmidu je vyčleněn gen YFG s markerem (fragment) a jím je transformován kmen nesoucí *ura3* mutaci. Transformovaný fragment se rekombinuje na každém konci místa začlenění, což vede k náhradě chromozomálního genu za nově upravený. Buňky s touto záměnou jsou selektovány na plotnách bez uracilu. Pokus se provede s diploidními buňkami, takže je nutná tetradová analýza, kterou se zjistí projev mutovaného genu.

Princip - sporulace a separace mutantních a divokých alel. Diploidi jsou indukováni, aby vytvořili spory (deprivace zdroje N). Sporulace vede k tvorbě 4 haploidních spor ve vřecku. Stěna aska je enzymově odstraněna a spory jsou vysety na plotnu (provádí se pomocí mikromanipulátoru). Spory se nachází růst na plotnách. Ze čtyř spor dvě budou nést alelu divokého typu, dvě budou obsahovat gen YFG přerušovaný genem URA3. Pokud je funkce genu YFG nutná pro přežití, vyrostou jen 2 spory, které nebudou schopny růst na plotnách bez uracilu, neboť gen URA3 je součástí pouze přerušovaných - inaktivovaných genů.

Obr. Genetické znázornění že U2 RNA se páruje s intronovou sekvencí.

Nejdříve byl kvasinkový gen pro biosyntézu histidinu *HIS4* upraven mutacemi tak, že jeho exprese vyžadovala sestřih intronu. Tento modifikovaný gen byl integrován do genomu kvasinkového kmene nesoucího mutaci *his4*. Tyto buňky rostly na plotnách postrádajících histidin pokud mohly uskutečnit sestřih (umělého genu). Byl připraven derivát kmene, který nesl jedinou nukleotidovou substituci v intronové sekvenci, o které se předpokládalo, že je rozpoznávána U2 RNA. Buňky nesoucí tento gen nerostly bez histidinu, neboť k sestřihu u nich nedocházelo. K otestování, zda U2 RNA rozpoznává intronovou sekvenci, byl zkonstruován mutantní gen U2, který nesl jedinou nukleotidovou substituci zvolenou tak, že by mělo dojít k obnově párování mezi mutantní intronovou sekvencí obsahující jedinou substituci. Vnesení mutantního genu U2 do kmene nesoucího mutantní intron obnovilo schopnost buněk růst bez histidinu, protože docházelo opět k sestřihu. Prozkoumáním několika různých kombinací mutací v intronu a U2 se ukázalo, že pouze ty kombinace, které umožňovaly správné párování, dovolovaly expresi *HIS4*. Z toho vyplynulo, že rozpoznání musí být přímé - tj. párováním U2 RNA a intronu.

a) kmen A nese integrovaný gen *HIS4* inženýrovaný tak, že jeho exprese je závislá na sestřihu intronu. Jelikož sekvence u intronu divokého typu a U2 RNA jsou komplementární, je RNA správně sestřižena, což umožňuje buňkám růst na plotnách bez histidinu.

b) jestliže je do intronové sekvence vnesena jediná substituce (kmen B), není stabilně vázána U2 RNA, což interferuje se sestřihem, a buňky na plotnách nerostou.

c) kmen B je transformován plazmidem nesoucím gen U2 s nukleotidovou substitucí, která obnoví párování mutantního intronu s U2 RNA. Toto nové párování obnoví sestřih HIS4 RNA, a buňky zase mohou růst na plotnách bez histidinu. Pokus tak prokazuje, že U2 RNA se přímo páruje s intronem při sestřihu.

Obr. Genetický průkaz interakcí protein-protein. Transkripční faktor GAL4 je složen ze dvou funkčních domén, aminoterminální doménu, která se váže na GAL1 promotorovou upstream-aktivující sekvenci (UASG) a karboxyterminální doménu, která aktivuje transkripci (kap. 9). Aby se prokázalo, že tento systém může být použit k identifikaci interakci mezi dvěma cizími proteiny, genový segment kódující DNA-vazebnou oblast GAL4 byl fúzován k genu SNF1, a genový segment kódující aktivační oblast GAL4 byl fúzován k genu SNF4. Je známo, že proteiny SNF1 a SNF4 asociují, vytvářejíc komplex, který má proteinkinázovou aktivitu. Tyto dva fúzní geny, každý na samostatném plazmidu, byly transformovány do kvasinkového kmene nesoucího gen lacZ z E. coli, který kóduje B-galaktozidázu, pod kontrolou GAL1 promotoru. Buňky, které získaly oba fúzní geny, se barvily modře, když byly pěstovány za přítomnosti X-gal, což je chromogenní substrát konvertovaný B-galaktozidázou na modré barvivo. Kontrolní buňky, které obdržely plazmid, který produkoval konstitutivně protein divokého typu GAL4 se také barvily modře. Naproti tomu, buňky, které obdržely pouze jeden z fúzních genů zůstávaly bílé za přítomnosti X-gal (není zobrazeno). Výsledek ukazuje, že funkční transkripční faktor se tvořil spojením SNF1 a SNF4 proteinů. Tento jednoduchý skrínig na plotnách tak může být použit pro klonování genů pro proteiny, které navzájem interagují.

Obr. Plazmid shuffle. (česky: záměna plazmidů) Je to obecná technika pro studium funkce mutantních nebo cizích genů. Pokus popsán zde ukazuje, že savčí cAMP-dependentní protein kináza může nahradit kvasinkový ekvivalent, kódovaný genem TPK1. Kvasinky mají tři funkčně ekvivalentní TPK geny, TPK1, 2 a 3. Byl zkonstruován kmen, u něž byly tyto tři geny knockovány integrací URA3, TRP1 a HIS3. Aby kvasinka mohla růst, musí mít alespoň jeden TPK gen. Proto byl tento kmen udržován při životě genem TPK1 neseným na ADE8 plazmidu. (gen ADE8 umožňuje růst na mediu bez adeninu). cDNA kódující myší protein kinázu byla umístěna na LEU2 plazmid a transformována do téhož kmene. **Buňky byly vysety na medium postrádající jak leucin tak adenin, aby bylo možné selektovat kolonie nesoucí oba plazmidy.** Dalším krokem bylo pěstování jednotlivých kolonií neselektivně na kompletním mediu (YPD), obsahujícím leucin i adenin. Za těchto podmínek buňky nepotřebují uchovávat markerové geny a plazmidy ztrácejí. Protože je však vyžadován alespoň jeden protein kinázový gen pro růst buněk, musí si udržet alespoň jeden ze dvou plazmidů. Pro stanovení, který z plazmidů si buňka udržela, byly nejdříve vysety na neselektivní medium YPD a pak replikovány na plotny bez leucinu a plotny bez adeninu. Výsledek, že některé buňky rostly na plotnách postrádajících leucin ale ne na plotnách bez adeninu ukázaly, že myší cDNA kódující myší protein kinázu (nesený na LEU2 plazmidu) může udržet buňky naživu. Že tyto buňky obsahovaly pouze myší proteinkinázu bylo potvrzeno biochemicky.

Gal systém

U kvasinek podobně jako u jiných je **galaktoza** konvertována na glukóza-6-fosfát enzymy Leloir – ovy dráhy. Každý ze strukturních genů této dráhy (zvaných GAL geny) je exprimován na vysoké hladině, s hladinou mRNA 0,5-1%, ale jen pokud jsou kvasinky pěstovány na půdě s galaktozou jako jediným zdrojem uhlíku. **Každý z genů GAL obsahuje ve svém promotoru alespoň jedno, ale obvykle více vazebných míst pro transkripční aktivátor Gal4p.** Vazba Gal4p na tato místa a jeho transkripční aktivita po jeho navázání je regulována zdrojem uhlíku

dostupného buňce. Když buňka roste na **glukóze (ne galaktoze!)** jejím preferenčním zdroji uhlíku, transkripce z GAL4 promotoru (regulujícím tvorbu Gal4p) je snížena, takže v buňce je méně Gal4p a tudíž je snížena hladina aktivátoru vázajícího se na promotor GAL strukturních genů. Na jiných zdrojích uhlíku, např. rafinóze, je Gal4p produkován a váže se na GAL promotory, avšak represor Gal80p inhibuje jeho aktivitu. Gal80p se váže přímo na Gal4p a asi maskuje jeho aktivační doménu takže ten pak není schopen aktivovat transkripci. Inhibiční efekt Gal80p je snížen jen za přítomnosti galaktozy, což vede k silné inducibilní hladině exprese cílového genu.

K produkci cílového proteinu v *S. cerevisiae* za použití **indukce galaktozou, klonovaný gen kodující protein musí být začleněn pod kontrolu GAL promotoru**. Nejčastěji je používán promotor genu pro galaktokinázu GAL1, **avšak jsou dostupné i syntetické promotory obsahující více vazebných míst pro Gal4p**. Po jeho konstrukci je expresní vektor přenesen do buněk a tvorba proteinu je iniciována přenosem buněk na půdu s galaktozou. Proteiny připravené tímto způsobem málokdy dosahují hladin jako u *E. coli*, a obvykle to bývá jen 1-5%, nelze použít barvení Coomassie, ale Western blot nebo jiné imunometody. Další obtíž vyplývá z toho, že aktivátoru genů GAL, tj. Gal4p, bývá v buňkách jen nízké množství. Proto jestliže expresní vektor obsahuje mnohonásobná vazebná místa pro Gal4p, jako jsou mnohokopiové vektory, pak může být hladina Gal4p nízká – nedostatečná pro aktivaci všech cílových genů na maximální hladinu.

K obejití tohoto problému byly zkonstruovány kvasinky, u nichž byla kódující sekvence genu GAL4 zařazena za promotor GAL1. To má za následek zpětnou vazbu při níž indukce galaktozou vede k tvorbě Gal4p, takže může být exprimováno více genů.

Pichia pastoris

Metanotrofní kvasinka metabolizující metanol jako jediný zdroj uhlíku.

První krok metabolismu metanolu je oxidace metanolu na formaldehyd pomocí molekulárního kyslíku O₂ enzymem **alkoholoxidázou**. Alkoholoxidáza má jen slabou afinitu ke kyslíku a kvasinka proto vytváří velká množství enzymu. Promotor regulující tvorbu alkoholoxidázy (AOX1) může být využit k řízení exprese cizích proteinů, protože je přísně řízen a indukován metanolem na velmi vysokou hladinu.

P.p. obsahuje expresní vektor, který je obvykle integrován do genomu buď jako jedna nebo více kopií, a buňky se nechají růst na glycerolu (růst na glukóze reprimuje transkripci AOX1, a to i za přítomnosti metanolu) do **extrémně vysokých hladin před přidáním metanolu**. Po indukci se cílový protein tvoří ve vysokých koncentracích, často 0,5 až desítky gramů proteinu na litr kultury.

Např. exprese genu kodujícího **rekombinantní povrchový antigen viru hepatitidy B** se vytváří v množství až **1 g/litr, což je mnohem více než u *S. cerevisiae***.

Kromě toho má *P.p.* výhodu před *S.c.* v tom, že **glykozyluje sekretované proteiny – a glykozylované proteiny mají charakter glykozylace jako u vyšších eukaryot**.