

UNIVERSITATEA din BUCUREȘTI
FACULTATEA de BIOLOGIE
Departamentul de Genetică

***Vectori și strategii de clonare
la microorganisme eucariote (drojdii)***

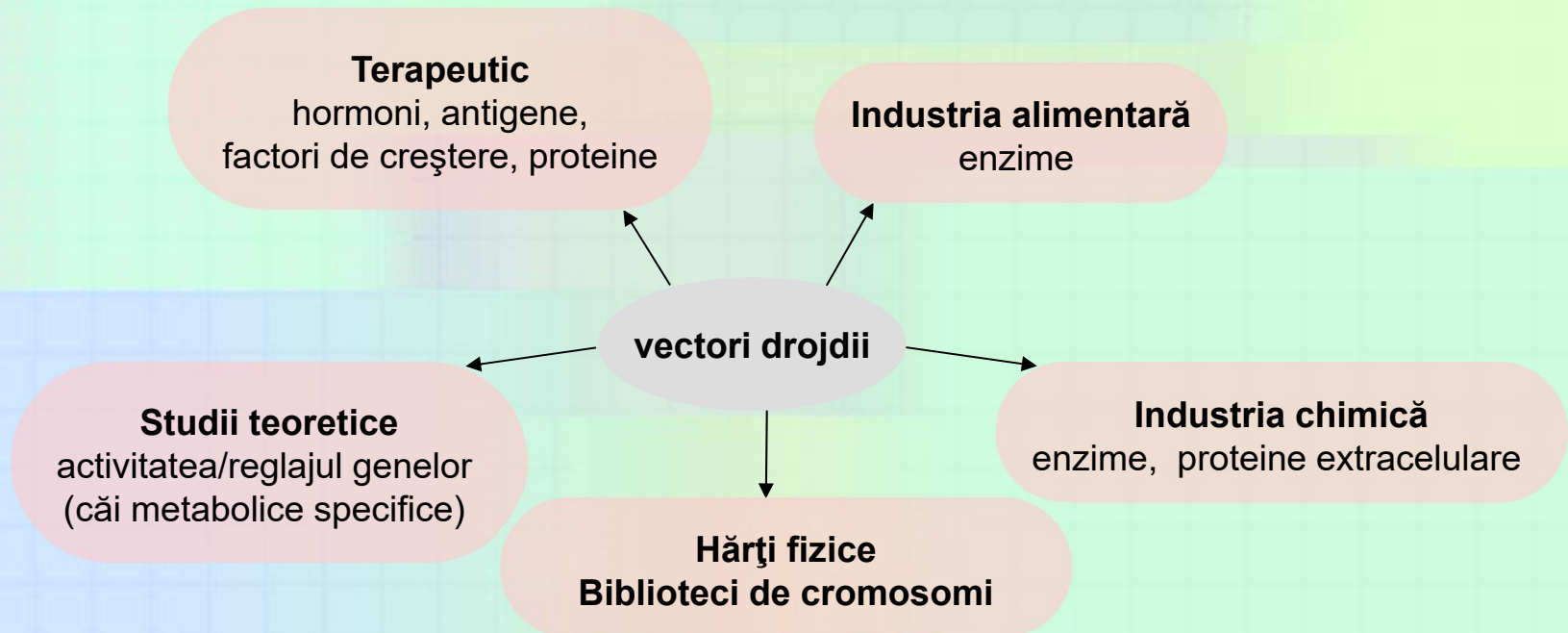
Prof. dr. Ortansa CSUTAK

1978 - J. D. Beggs

- A. Hinnen și colab. - clonarea și exprimarea genelor heterologe (*S. cerevisiae*)

Avantaje

- ▣ mediu de cultură simplu și cu un cost relativ scăzut;
- ▣ obținerea unei biomase importante în timp scurt;
- ▣ posibilitatea exprimării genelor heterologe clonate și secreției extracelulare a proteinelor sintetizate;
- ▣ manipulare genetică / posibilitatea selectării relativ ușoare a celulelor recombinante;
- ▣ mecanisme de maturare a proteinelor asemănătoare celulelor mamaliene;
- ▣ lipsa sintezei de endotoxine



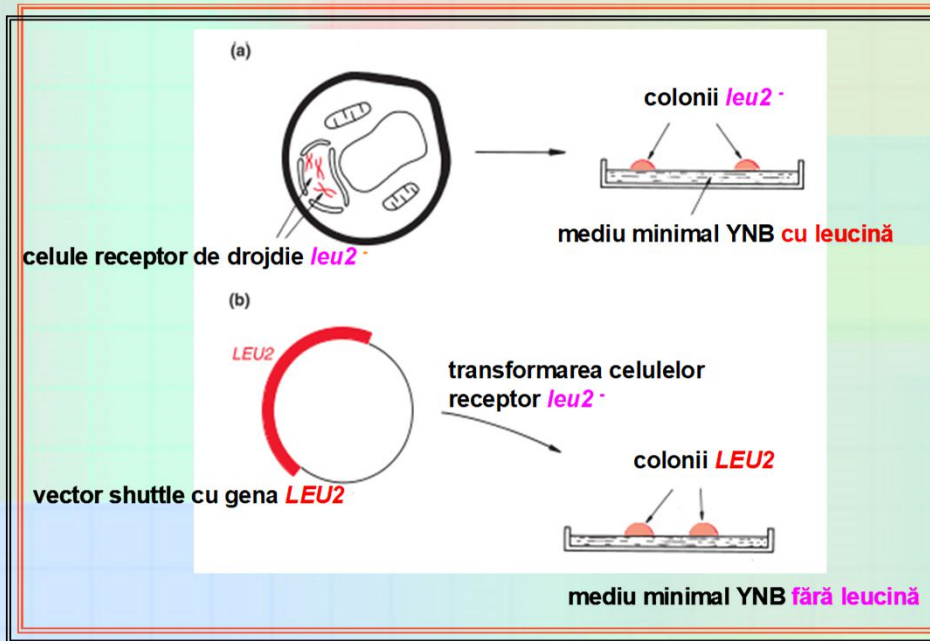
vectori *shuttle* (navetă)

celula bacteriană:

- originea replicării dintr-o plasmidă bacteriană (*ori* ColE1, *ori* pMB1)
- una sau mai multe gene pentru rezistență la antibiotice (Ap^R, Tc^R)

celula de drojdie:

- gene *marker* - enzime din metabolismul
- ♦aminoacizi : *LEU2* (β -izopropilmalat dehidrogenaza), *LYS2* (α -aminoacidat reductaza), *TRP1* (N -5'fosforibozil-antranilat izomeraza), *HIS3* (imidazol glicerofosfat dehidrogenaza)
- baze azotate : *URA3* (orotidin-5'-fosfat decarboxilaza), *ADE2* (fosforibozil aminoimidazol carboxilaza).



Selecția transformanților obținuți prin utilizarea vectorilor *shuttle* la drojzii

Celulele de drojdie receptor

- auxotrofe (*leu2*, *lys2*, *trp1*, *his3*, *ura3*, *ade2*)

Celule transformante

- prototrofe (*LEU2*, *LYS2*, *TRP1*, *HIS3*, *URA3*, *ADE2*)

Tehnici de transformare genetică utilizând vectori *shuttle*

Transformarea chimică: soluții de acetat sau clorură de litiu (Li⁺ destabilizează legăturile H din structura proteinelor din membrana celulară)

Electrotransformare: formarea unor pori la nivelul membranei celulare sub acțiunea impulsurilor electrice, prin care ADN vector poate intra în celula gazdă

VECTORI DE CLONARE

Vectori integrativi (YIp)

**Vectori cu replicare
autonomă**

episomali (YEp)
replicativi (YRp)
centromerici (YCp)
lineari (YLp)

**VECTORI DE EXPRESIE
(EXPRIMARE)**

**prezintă în structura lor
un Promotor**

constitativ
inductibil
hibrid inductibil/constitativ

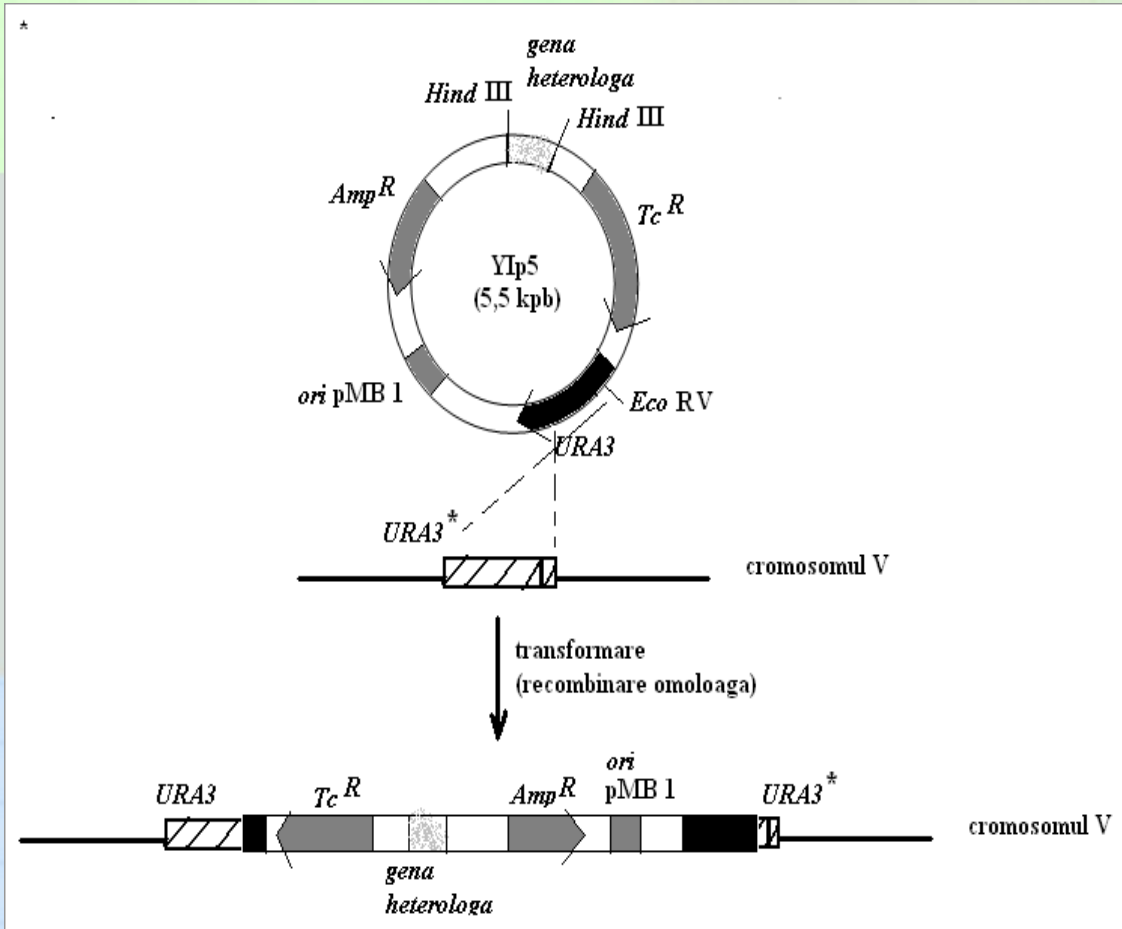
VECTORI DE SECREȚIE

**prezintă în structura lor
secvențe care codifică
pentru**

factor de împerechere (α , α)
toxina killer
proteine extracelulare

Vectori de clonare

Vectori integrativi (*YIp* = Yeast Integrating plasmids)

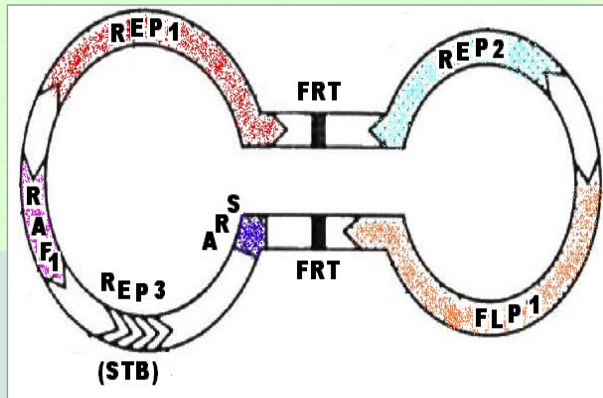


➤ integrare la nivelul cromozomului de drojdie purtător al genei auxotrofe pentru marker de selecție;

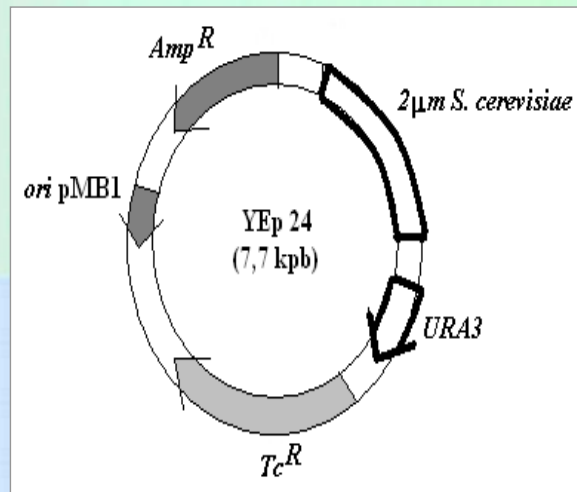
➤ 1 copie/celulă;

➤ 1-10 transformanți/ μg ADN

Vectori episomali (YE_p = Yeast Episomal plasmids)



Plasmida 2 μm (*Saccharomyces cerevisiae*)
 ↪ genele **REP1** și **REP2** (*replication*) - proteinele Rep1 și Rep2 - stabilitatea și segregarea plasmidelor;
 ↪ **ARS** (*autonomously replicating sequence*) - originea replicării;
 ↪ **STB** (*stability*) sau **REP3** - segregarea stabilă a plasmidei în mitoză; situsul de acțiune pentru proteinele Rep1 și Rep2 .



2 μm *S. cerevisiae*

- **ori pMB**, **Amp^R** și **Tc^R** : fragment din vectorul pBR322, pentru replicare și selecția transformanților în celule bacteriene;
 - **2 μm** și **gena URA3**: un fragment extins din plasmida 2 μm și markerul de selecție **URA3**, care permit replicarea autonomă a vectorului în celula de drojdie, respectiv, selecția transformanților prin cultivarea produșilor transformării pe mediu minimal.

20 - 50 copii/celulă; 10⁴ – 10⁵ transformanți / μg ADN

Vectori replicativi (YRp = Yeast Replicative plasmids)

ORI (ARS) cromosom de drojdie

ARS1, ARS3... nr. cromosom

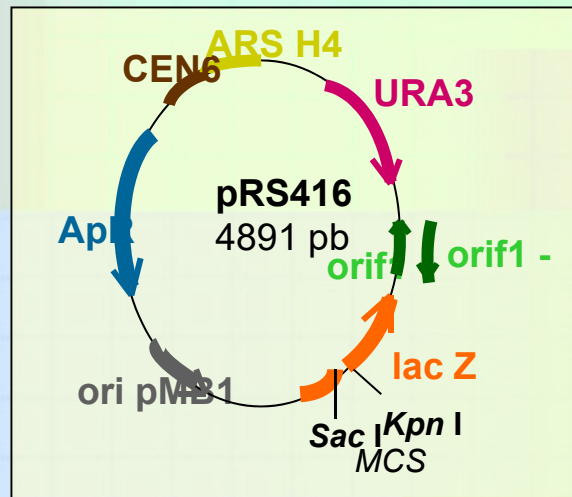
ORI3018.....cromosom 3

1 – 3 copii/ celulă

$10^3 - 10^4$ transformanți/ μg ADN

Vectori centromerici (YCp = Yeast Centromeric plasmids)

Vector	Dimensiune totală (pb)	Genă marker de selecție	Situs multiplu de clonare (MCS)	
			Număr de situsuri	Prima și ultima endonuclează
pRS413	4970	<i>HIS3</i>	15	<i>Apa</i> I – <i>Sac</i> I
pRS414	4788	<i>TRP1</i>	16	<i>Kpn</i> I – <i>Sac</i> I
pRS415	6021	<i>LEU2</i>	15	<i>Apa</i> I – <i>Sac</i> I
pRS416	4891	<i>URA3</i>	17	<i>Kpn</i> I – <i>Sac</i> I



1 – 2 copii/ celulă
5000 transformanți/ μg ADN

- fragmentul provenit din fagimidul pBluescript SK +/-:

ori pMB1, Amp^R - permite replicarea autonomă în celula bacteriană (în lipsa unui fag helper pentru f1), respectiv, rezistență la ampicilină celulelor bacteriene purtătoare a vectorului;

ori f1 - originea replicării fagului filamentos f1; prin co-infecția celulei bacteriene gazdă cu un virus helper pentru f1 se declanșează replicarea ADN de la *ori f1* cu obținerea ADN monocatenar sens sau antisens în funcție de orientarea ori f1 (+ / -);

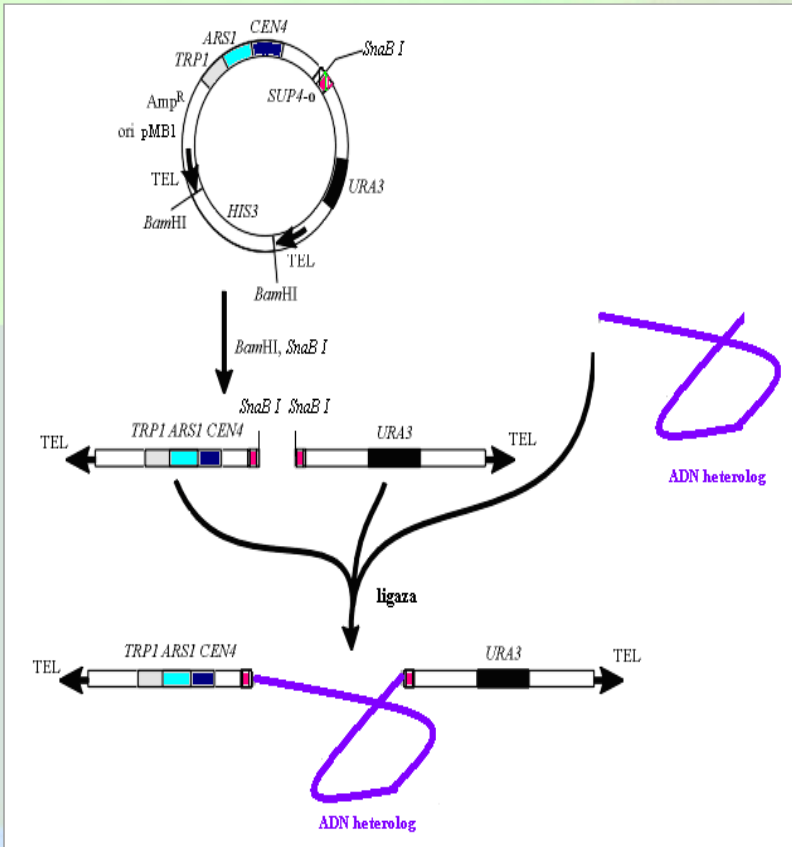
lacZ - gena care codifică pentru capătul amino-terminal al β -galactozidazei și permite, prin complementație intraalelică, selecția histochimică a vectorilor recombinanți. Prezența unui promotor inductibil *upstream* de gena *lacZ* permite obținerea de proteine de fuziune;

- fragmentul provenit din drojdi:

URA3 - permite selecția celulelor de drojdie transformante prin reversia la starea de prototofie;

casetă CEN6/ARS H4 - permite replicarea autonomă și asigură stabilitatea mitotică a vectorilor în descendență.

Vectori lineari (YLP = Yeast Linear plasmids) YAC (Yeast Artificial Chromosomes)



- celule receptor de drojdie: *trp1 ura3 ade2*
- celule transformante de drojdie cu vectorul YAC purtator al unui ADN heterolog: *TRP1 URA3 ade2*

Clonarea ADN heterolog: YAC3 este digerat în paralel cu *SnaB I* și *Bam* HI, obținându-se două fragmente lineare (brațe), care prezintă la câte un capăt, o jumătate din gena *SUP4-o*, delimitată de situsul de restricție pentru *SnaB I*. Clonarea ADN heterolog se realizează la nivelul acestui situs, cu formarea unui vector linear care conține ambele brațe ale vectorului inițial și ADN heterolog.

Celulele receptor de drojdie: *trp1 ura3 ade2*, iar **selecția transformanților** se face pe medii minimale, celulele transformante devenind *TRP1 URA3 ade2*, cu colonii de culoare roz-roșie, datorate inactivării genei *SUP4-o* prin integrarea ADN heterolog.

Vectorii de tip YAC permit clonarea unor fragmente mari de ADN cu dimensiuni cuprinse între 400 kpb și 1 Mb, fapt pentru care sunt utilizați intensiv în obținerea, menținerea și studiul băncilor de cromozomi, precum și în realizarea hărților fizice. Primii vectori de tip YAC (notați YAC 3, 4 și 5), au fost descriși în 1987, de *Burke și colab.*, ca fiind constituiți pornindu-se de la vectori *shuttle* lineari, care prezentau secvențe *ARS* și *CEN*.

Vectorii de tip YAC, exemplificați prin YAC3 (11,4 kpb), prezintă o regiune ce permite replicarea autonomă în celula bacteriană (*ori pMB1*) și gene de rezistență la antibiotice (*Amp^R*).

În structura vectorilor YAC se regăsesc: originea replicării din unul din cromozomii de drojdie (*ARS1*), o secvență centromerică (*CEN4*), gene de prototrofie pentru selecția celulelor de drojdie transformante (*TRP1* și *URA3*), precum și două secvențe telomerice (*TEL*). Gena *HIS3* este denumită "stuffer", are rol numai în menținerea formei circulare a vectorului.

Clonarea ADN heterolog, se realizează la nivelul situsului endonucleazei de restricție *SnaB I* situat în mijlocul genei *SUP4-o*, supresoare a mutației *ochre ade2*. Prezența mutației *ade2* determină virarea culorii coloniilor de *S. cerevisiae* de la alb-crem la roz-roșu. Prezența vectorului YAC cu gena *SUP4-o* activă, supresează mutația, astfel încât coloniile formate din celule transformante care conțin vectorul fără ADN heterolog clonat, revin la culoarea normală, alb-crem.

Vectori de expresie (exprimare)

exprimarea genelor heterologe clonate

prezintă în structura lor o casetă care cuprinde:

- secvențele reglatoare și un promotor puternic;
- situs pentru 1 sau mai multe endonucleaze de restricție unde se clonează gena heterologă;
- secvența terminator al transcrierii.

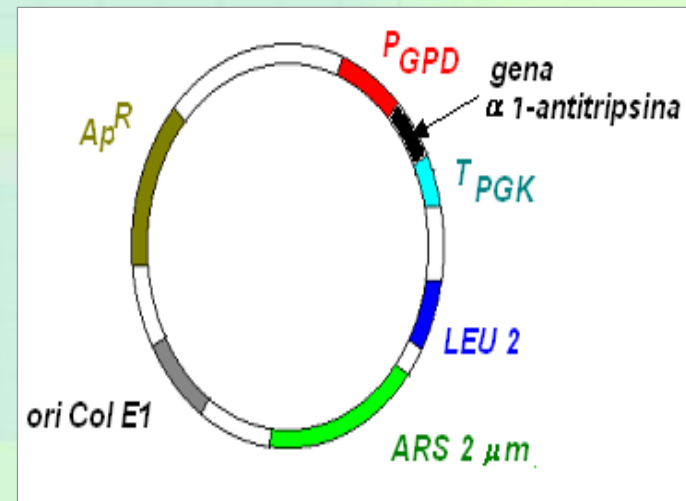
vectori de expresie cu promotori constitutivi

vectori de expresie cu promotori inductibili

vectori de expresie cu promotori hibridi constitutivi/inductibili

Vectori cu *P* constitutivi

Specia de drojdie	Promotor constitutiv
<i>S. cerevisiae</i>	<i>GPD (TDH) 1, 2, 3</i> (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza 1, 2, 3) <i>PGK1</i> (fosfo-glicerat kinaza) <i>PYC1</i> (piruvat kinaza) <i>ADH1</i> (alcool dehidrogenaza 1)
<i>K. marxianus</i>	<i>PCPL3</i> (purin-citozin permeaza)
<i>K. lactis</i>	<i>LAC4</i> (lactaza, β -galactozidaza) <i>GAP</i> (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza)
<i>Y. lipolytica</i>	<i>ICL1</i> (izocitrat liază) – în prezența glucozei
<i>S. pombe</i>	<i>ADH</i> (alcool dehidrogenaza)
<i>P. pastoris</i>	<i>GAP</i> (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza)
<i>H. polymorpha</i>	<i>FLD1</i> (formaldehid dehidrogenaza glutation-dependentă)
<i>H. polymorpha</i>	<i>PMA1</i> (H^+ -ATP aza pentru membrana plasmatică)

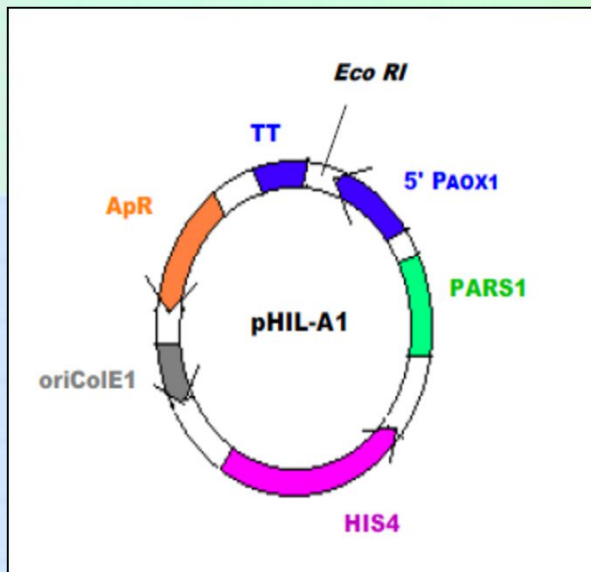


P_{GPD} - Bitter și Egan, 1984

α 1-antitripsină – 5% totalul proteinelor celulare

Vectori cu *P inductibili*

Specia de drojdie	Promotor inductibil	Factor inductor
<i>S. cerevisiae</i>	<i>ADH2</i> (alcool dehidrogenaza 2)	concentrația de etanol
	<i>CUP1</i> (metalotioneina)	concentrația ionilor Cu ²⁺
	<i>GAL10</i> (galactopimeraza) <i>GAL1</i> (galactokinaza) <i>GAL7</i> (galactozo-1-fosfat uridiltransferaza)	prezența galactozei ca unică sursă C
<i>K. lactis</i>	<i>ADH4</i> (alcool dehidrogenaza)	concentrația de etanol
	<i>K1 PHO5</i> (fosfataza acidă)	prezența fosforului anorganic
<i>Y. lipolytica</i>	<i>MTPI-II</i> (metalotioneina 1 și 2)	concentrația ionilor Cu ²⁺
	<i>POX2</i> (acil gras-CoA oxidaza)	prezența acizilor grași
<i>P. pastoris</i> <i>H. polymorpha</i>	<i>AOX1</i> (alcool-oxidaza) / <i>MOX</i>	metanolul unică sursă de carbon
	<i>FMD</i> (formiat-dehidrogenaza)	

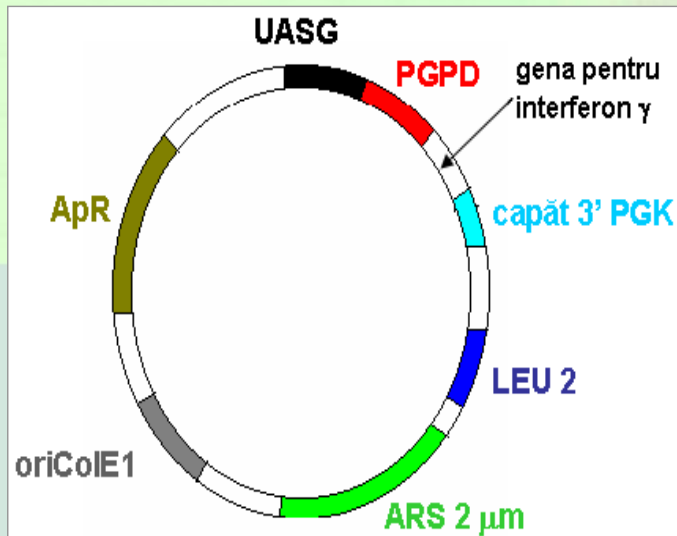


Vectorul exprimare cu replicare autonomă având promotor inductibil P_{AOX1} (drojdia metilotrofă *Pichia pastoris*)

- gena heterologă clonată la nivelul *Eco RI*
- originea replicării autonome PARS1 (cromozomală)

Promotorul P_{AOX1} este considerat "puternic", cantitatea de enzimă sintetizată prin activarea sa putând atinge circa 35% din totalul proteinelor celulare. Procesul este intens exploatat în construirea de vectori de exprimare specifici drojdiilor metilotrofe (capabile să asimileze metanolul ca unică sursă de carbon) denumiți "a doua generație de vectori de clonare".

Vectori cu *P* hibridi (inductibil/constitutiv)



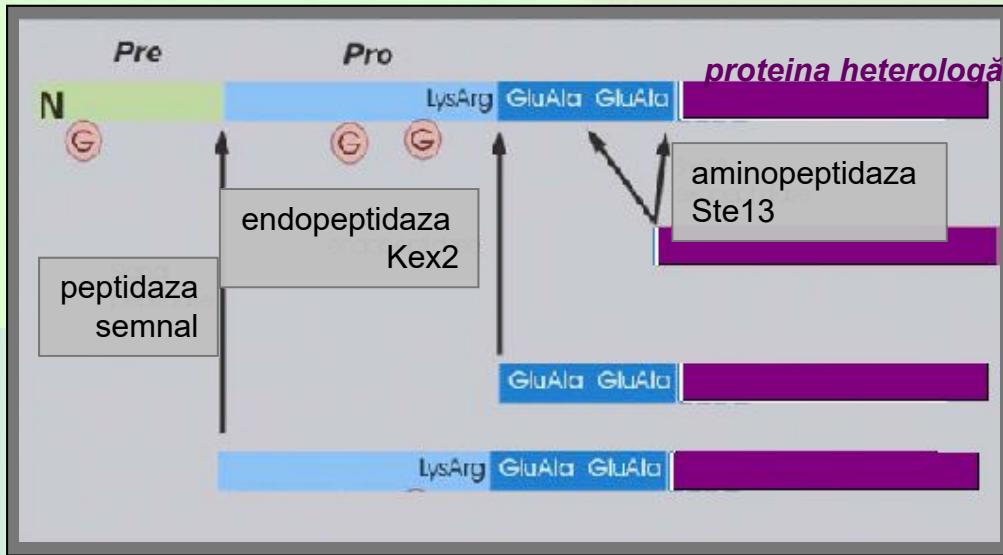
Vector episomal (ARS 2 μ m) *S. cerevisiae*

Interferon γ – nr. mic de copii plasmidă/celulă
stabilitate redusă a plasmidei în descendență

✓ UASG – upstream activating sequence *GAL10* (UDP-galactose epimerase)

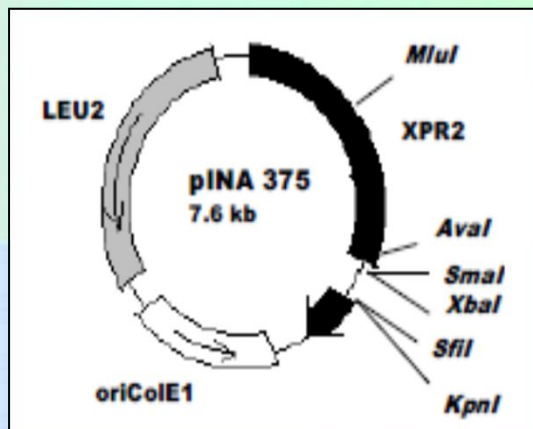
activitatea Promotorului indusă cu peste 150 – 200X față de activitatea normală în prezența galactozei ca unică sursă de carbon din mediu – se obțin 2 g Interferon γ /l cultură

Vectori de secreție



- secvențe derivate din propeptide ale proteinelor care sunt secretate natural de celulele de drojdie gazdă (factori de împerechere, toxina killer, proteaze extracelulare)

- gena heterologă este clonată la nivelul unui situs construit artificial in secvența derivată existentă



Vectorul de secreție integrativ (*Yarrowia lipolytica*)

- integrare în cromozom la nivelul *LEU2*;
- gena heterologă colnată la nivelul situsurilor din *XPR2*
- ✓ utilizat pentru obtinerea de: interferon α porcin, factor de coagulare uman XII, activator plasminogenic tisular uman

Y. lipolytica prezintă capacitatea de a secreta **protează alcalină extracelulară (AEP)**, codificată de gena *XPR2*. Derepresia promotorului genei *XPR2* este declanșată la pH=5,5 în medii lipsite de surse de carbon și azot consumate preferențial și necesită prezența unei cantități mari de peptona.

Vectorul **pINA 375** prezintă situsuri de restricție (clivare) downstream de pre-pro-secvența genei *XPR2*: *Aval*, *Sfil*, *Smal*, *Xbal* și *KpnI*.

Pre-pro-secvența genei *XPR2* a fost conservată până la nivelul situsului de clivare reprezentat de aminoacizii bazici Lys – Arg (situs de acțiune pentru Xpr6p echivalent al Kex2). ADN heterolog este integrat în vector la nivelul unuia dintre situsurile recunoscute de enzimele de restricție menționate mai sus.

Proteinele heterologe sunt secretate ca proteine mature după îndepărtarea predomeniului AEP prin clivare cu endoproteinaza bazică Xpr6p a celulei gazdă.