

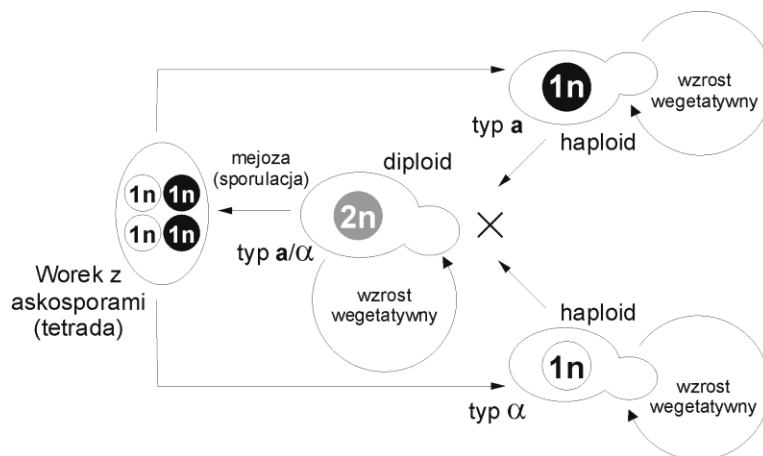
Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* jako modelowy organizm eukariotyczny

Materiały do zajęć Genetyka z inżynierią genetyczną

Drożdże z rodzaju *Saccharomyces*, a szczególnie *S. cerevisiae* stanowią jeden z podstawowych modelowych organizmów eukariotycznych współczesnej genetyki i biologii molekularnej. Są to jednokomórkowe, heterotalliczne organizmy, należące do klasy workowców (*Ascomycetes*).

Cykl życiowy

W cyklu życiowym drożdży można wyróżnić **fazę haploidalną i diploidalną**. Zarówno komórki haploidalne, jak i diploidalne mogą rozmnażać się na drodze podziałów wegetatywnych (pączkowanie) i stabilnie rosnać w hodowlach laboratoryjnych. Haploidalne komórki drożdży mogą mieć dwa typy płciowe – **a** i **α**. Poprzez zlanie się dwóch haploidalnych komórek o przeciwnych typach płciowych powstaje komórka diploidalna **a/α**. Komórka w fazie diploidalnej może przechodzić normalne podziały wegetatywne, ale nie może się krzyżować z innymi komórkami. W niekorzystnych warunkach środowiskowych komórka diploidalna może przejść mejozę, co w efekcie prowadzi do wytworzenia worka z czterema haploidalnymi zarodnikami (askosporami). Taką strukturę nazywa się **tetradą**. Cykl życiowy drożdży *S. cerevisiae* przedstawiono schematycznie na poniższym rysunku.



Drożdże a genetyka klasyczna.

Z punktu widzenia genetyki klasycznej drożdże stanowią idealny organizm badawczy. Są **prototrofami wykazującymi wszystkie cechy mikroorganizmów** – można je hodować na podłożach płynnych i stałych, kompletnych i minimalnych; na podłożach stałych tworzą kolonie; dają się łatwo hodować w dużych ilościach i stosunkowo krótkim czasie (czas generacji na podłożu pełnym wynosi średnio 80 min.). Dodatkowo, drożdże można łatwo poddawać mutagenzie (np. poprzez naświetlanie UV), a w szczepach haploidalnych stosunkowo prosto uzyskuje się mutanty (np. pokarmowe).

Jak opisano powyżej, bez trudu przeprowadza się krzyżowanie szczepów haploidalnych. Wykorzystując metody mikromanipulacji można izolować i analizować pojedyncze haploidalne askospory drożdży powstałe w workach po mejozie komórki diploidalnej. Analiza segregacji markerów genetycznych dla czterech askospor tetrazy pozwala na badanie sprzężeń pomiędzy genami. Co ciekawe, odległości na mapie genetycznej u drożdży są bardzo proporcjonalne do odległości fizycznej: średnio 1 cM to 3 kb.

Dodatkowo, cechą drożdży istotną dla badaczy zajmujących się genetyką i funkcjonowaniem mitochondriów jest fakt, że są one fakultatywnymi tlenowcami. Oznacza to, że mogą żyć bez funkcjonujących mitochondriów, przeprowadzając fermentację, gdy w środowisku obecne jest odpowiednie (fermentowalne) źródło węgla, np. glukoza. Dzięki tej właściwości, można izolować jądrowe i mitochondrialne mutanty związane z procesami oddychania wewnątrzkomórkowego. Podczas selekcji takich mutantów wykorzystuje się ich niezdolność do wzrostu na podłożach zawierających niefermentowalne źródła węgla, np. glicerol czy etanol. Mutanty nie oddychające rosną na pożywce z glukozą wolniej niż szczepy oddychające, tworząc na podłożu stałym mniejsze kolonie (tzw. *petite*).

Drożdże a biologia molekularna

Znane są od dawna proste i skuteczne techniki wydajnej transformacji i selekcji. Dostępnych jest bardzo wiele szczepów drożdżowych niosących różne **markery auktotroficzne** i oporności na związki chemiczne. Opracowano szereg dogodnych wektorów bifunkcyjnych, replikujących się autonomicznie w komórkach drożdży i bakterii, łatwych do izolacji i pozwalających na regulowanie w pewnym zakresie liczby kopii w komórce. Opracowano również wiele protokołów izolacji kwasów nukleinowych i białek, czy też struktur i organelli komórkowych (np. jąder i mitochondriów).

Poza łatwością stosowania standardowych technik biologii molekularnej na szczególne podkreślenie zasługuje **wysoka częstość rekombinacji homologicznej**, wykorzystywana na przykład do ukierunkowanej inaktywacji genów i badania efektów inaktywacji *in vivo*.

Jądrowy genom *S. cerevisiae* ma 12,8 Mb (czyli jest ok. 200 x mniejszy od genomu człowieka i ok. 4 x większy od genomu *E. coli*) i jest podzielony na 16 chromosomów mających od 250 kb do >2500 kb. Kolisty genom mitochondrialny ma wielkość 75 kb. Od 1996 roku **znana jest pełna sekwencja genomowego DNA drożdży**. Po przeprowadzeniu analizy strukturalnej genomu podjęto drugi etap badań, mający na celu scharakteryzowanie nieznanych dotąd otwartych ramek odczytu, stanowiących około jedną czwartą z ponad 6000 genów drożdżowych. W ramach tego programu charakteryzuje się podstawowe fenotypy poszczególnych szczepów uzyskanych w wyniku systematycznej inaktywacji wszystkich genów drożdżowych. Obecnie prowadzone są również prace polegające na charakteryzowaniu interakcji białkowych (sieci interakcji) w komórkach drożdży przy zastosowaniu systemów *in vivo* np. systemu dwuhybrydowego i analizy biochemicznej (np. czyszczenia kompleksów białkowych).

Drożdże *S. cerevisiae* i człowieka dzieli miliard lat ewolucji. Duża część genów drożdży wykazuje jednak nadal znaczącą homologię z genami ssaków. Podstawowe mechanizmy funkcjonowania komórki są na tyle podobne, że doświadczenia na drożdżach przyczyniły się nie tylko ich poznania na najprostszym poziomie, lecz również dostarczyły modeli pozwalających na badanie problemów tak szczególnych, jak niektóre choroby genetyczne u ludzi. Jednym z przykładów może tu być pełniący podobne funkcje u drożdży i u człowieka gen (zwany, odpowiednio *SGS1* i *WRN*) kodujący enzym o właściwościach helikazy DNA, którego mutacje powodują u ludzi występowanie zespołu Wernera, choroby o charakterze progerii (przedwczesne starzenie). Wspomniany powyżej drożdżowy system dwuhybrydowy wykorzystuje się również do badania oddziaływań między białkami z innych organizmów, w tym człowieka.