

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Matyáš Štěpánek**

Kvasinky jako nástroj syntetické biologie  
Yeast as a tool for synthetic biology

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: RNDr. Michal Čáp, Ph.D.

Praha, 2024

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 7.8.2024

.....

Matyáš Štěpánek

## Abstrakt

Syntetická biologie je multidisciplinární obor využívající prvků zejména molekulární biologie, genového inženýrství a bioinformatiky. Mezi její hlavní cíle řadíme mimo jiné design nových, v přírodě se nevyskytujících živých systémů s novými vlastnostmi, například produkci léčiv či jiných průmyslově významných molekul a design a standardizace prvků biologických systémů a setů nástrojů pro práci s nimi.

Kvasinky, mezi nimi hlavně *Saccharomyces cerevisiae*, jsou pro tento obor lákavým subjektem kvůli svému efektivnímu systému homologní rekombinace schopnému na základě oblastí homologie jednoduše začlenit exogenní DNA a dále kvůli flexibilnímu genomu, který umožňuje provádět rozsáhlé modifikace bez velkých dopadů na fitness. Díky vlastnostem typickým pro eukaryotní organismy je také vhodné využívat kvasinkové expresní systémy coby buněčné továrny, neboť přirozeně provádí post-translační modifikace na proteinech, což otevírá možnosti produkce heterologních proteinů savců a dalších skupin organismů. Tyto vlastnosti dělají ze *Saccharomyces cerevisiae* ideálního kandidáta pro základní výzkum genových interakcí skrze knihovny specificky modifikovaných kmenů, průmyslovou produkci organických molekul a design a aplikaci nových nástrojů pro modifikaci genomů.

**Klíčová slova:** *Saccharomyces cerevisiae*, biologie kvasinek, syntetická biologie, expresní systémy, syntetická genomika, homologní rekombinace, syntetický genom, Sc 2.0

Synthetic biology is a multidisciplinary field using elements of molecular biology, genetic engineering and bioinformatics. Its main objectives include, but are not limited to, the design of new, naturally occurring living systems with novel properties, such as the production of pharmaceuticals or other industrially important molecules, and the design and standardization of biological system components and toolkits.

Yeasts, and *Saccharomyces cerevisiae* in particular, are an attractive subject for this field because of their efficient homologous recombination system capable of easily incorporating exogenous DNA based on regions of homology and a flexible genome that allows large-scale modifications without major fitness impacts. As a eukaryotic organism, it is also convenient to use yeast expression systems as a cellular factory because it naturally performs post-translational modifications on proteins, opening up the possibility of producing heterologous mammalian and other eukaryotic proteins. These properties make *Saccharomyces cerevisiae* an ideal candidate for basic research on gene interactions through libraries of specifically modified strains, industrial production of organic molecules, and the design and application of novel genome modification tools.

**Key words:** *Saccharomyces cerevisiae*, yeast biology, synthetic biology, expression system, synthetic genomics, homologous recombination, syntethic genome, Sc 2.0

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Kvasinky jako nástroj syntetické biologie .....	2
2.1 <i>S. cerevisiae</i> jako expresní systém a chassis.....	2
2.2 Homologní rekombinace <i>S. cerevisiae</i> .....	7
2.3 Toolkits a jejich základní principy .....	9
2.3.1 Základní principy .....	9
2.3.2 Vybrané toolkits a jejich využití.....	14
2.4 In yeasto syntéza DNA, syntetické chromozomy .....	19
2.5 Optimalizace kvasinkového genomu, Sc 2.0 .....	27
2.6 Knihovny kmenů <i>S. cerevisiae</i> .....	31
3. Závěr a diskuze.....	34
4. Reference.....	35

## Seznam použitých zkratek

<b>DSB</b>	Double Strand Break, dvojitý zlom v DNA
<b>GB</b>	Golden Braid
<b>GG</b>	Golden Gate
<b>HR</b>	homologní rekombinace
<b>RE</b>	restrikční enzym
<b>TU</b>	transcription unit, transkripční jednotka
<b>YTK</b>	Yeast Toolkit
<b>MYT</b>	Multiplex Yeast Toolkit
<b>PRO</b>	promotor
<b>CDS</b>	coding sequence, kódující sekvence
<b>TER</b>	terminátor
<b>ORF</b>	open reading frame, jiný název pro kódující sekvence
<b>bp</b>	base pairs, páry bází, jednotka udávající délku sekvence nukleových kyseli

# 1. Úvod

Kvasinky, a z nich zejména *Saccharomyces cerevisiae*, jsou od nepaměti pro lidstvo významným organismem. Během historie byl tento druh relevantní zejména kvůli svým schopnostem fermentace, ale v posledních dekáдах se stal také zásadním mikroorganismem pro biologický výzkum.

Například právě syntetická biologie, což je multidisciplinární obor zahrnující prvky molekulární biologie, genového inženýrství, systémové biologie a bioinformatických oborů, využívá hojně tuto kvasinku pro manipulaci s velkými molekulami DNA, jako modelový organismus pro základní výzkum eukaryotických buněčných systémů, jako buněčnou továrnu (cell factory) pro syntézu průmyslově významných molekul a v mnohých dalších oblastech.

Jednou ze zásadních vlastností pro účely syntetické biologie je velmi silná schopnost homologní rekombinace, která přirozeně slouží jako metoda opravy DNA při dvojitých zlomech (DSB = double strand breaks). Tento systém je schopen ligace dvou molekul DNA za přítomnosti relativně krátkých úseků homologie na okrajích molekul, což lze provést i uměle vloženými molekulami DNA, které si přejeme integrovat do některého z chromozomů. *Saccharomyces cerevisiae* je tedy velmi efektivním chassis pro práci s velkými molekulami DNA, ať už jde o inzerci celých genových kaskád do vlastního genomu kvasinky, či třeba sestavování celých neochromozomů *in vivo* (Schindler et al., 2023).

Tato práce rozebírá využití postupů typických pro syntetickou biologii při přípravě kvasinkových expresních systémů pro syntézu heterologních proteinů a jiných organických molekul hlavně pro medicínské účely, aplikaci a design standardních setů nástrojů pro práci s DNA v rámci kvasinkových kmenů a nakonec využití kvasinek k sestavování velkých makromolekul DNA v řádu desítek až stovek tisíc bází do částečně, či úplně syntetických chromozomů a genomů. Sestavování chromozomů je též v praxi využíváno k přestavbám a optimalizaci samotného genomu *S. cerevisiae*. Pokroky v poli syntetické biologie také umožňují hlubší studium genových funkcí pomocí uměle připravených knihoven definovaně upravených kmenů kvasinek.

## 2. Kvasinky jako nástroj syntetické biologie

Syntetická biologie je fúzní obor využívající metody několika biologických a infromatických oborů. Její náplní je hlavně tvorba rekombinantních nukleových kyselin a jejich využívání k produkci transgenních organismů za různými účely, k výzkumu molekulárních procesů, nebo ke tvorbě předvídatelných setů nástrojů pro další biotechnologické obory.

### 2.1 *S. cerevisiae* jako expresní systém a chassis

Jedním z velmi důležitých využití syntetické biologie je tvorba expresních systémů. Expresní systém zahrnuje organismus, využitý jako chassis pro vnášení cizorodých genů či celých metabolických drah, a expresní vektor, kterým je exogenní DNA přenesena do cílové buňky. Termín chassis v kontextu syntetické biologie představuje druh organismu jako platformu pro konstrukci geneticky upravených živých systémů. Tímto způsobem je možno přeměrovat metabolismus cílového organismu k produkci heterologních proteinů či jiných látek, které jsou *in vitro* velmi těžko získatelné.

Podle typu použitého organismu se dělí systémy na dvě hlavní skupiny: prokaryotické a eukaryotické. Každý typ má své přednosti i nevýhody, produkované látky jsou syntetizovány v pečlivě vybraných expresních systémech, aby se zaručil co největší výtěžek. Určité organismy mají průmyslově relevantní vlastnosti, jako je tomu například u kvasinek a fermentace.

Prokaryotické expresní systémy, typicky bakteriálního charakteru, byly v počátečních fázích vývoje rekombinantních proteinů používány více než systémy eukaryotické. Valná většina relevantních léčiv a látek je produkována v systému s lidskou symbiotickou enterobakterií *Escherichia coli*, která slouží jako modelový mikroorganismus po celé 20. století. Bakteriální expresní systémy jsou díky své prozkoumanosti a relativní jednoduchosti kultivace populární volbou pro produkci v biotechnologickém průmyslu. Ačkoliv je podíl rekombinantních léčiv produkovaných bakteriemi nižší než dříve, dodnes se takto vyrábí cca 30% produktů na trhu (Sanchez-Garcia et al., 2016) .

Ačkoliv pro mnohá uplatnění je bakteriální systém vhodný, syntéza proteinů vyžaduje v mnohých případech určité post-translační modifikace (=PTM, nejčastěji jde o glykosylaci)

nebo vyžaduje eukaryotické chaperonové proteiny ke správnému skládání ( folding ) proteinu. Bakterie (a prokaryota obecně) tyto úpravy u svých vlastních proteinů postrádají (Ferrer-Miralles et al., 2009). Nepřítomnost molekulárního aparátu pro tyto úpravy způsobuje, že bakteriální systém může produkovat látku mimo funkční nativní konformaci či bez kriticky důležitých chemických skupin na řetězci. Zejména tyto problémy vedly během dekad k vyšší adopci eukaryotních expresních systémů.

Z eukaryotických expresních systémů se nejvíce produkuje v savčích buněčných liniích, vzhledem k tomu, že žádané proteiny jsou často určeny k medicínským účelům. Savčí linie mají ze všech typů systémů člověku nejpodobnější molekulární aparát, a tudíž je potřeba nejmenších metabolických změn k produkci proteinů ve správné konformaci a se správnými PTM. Oproti mikrobiálním systémům mají savčí kultury praktickou překážku v podobě složitějších kultivačních podmínek. Vzhledem k mnohobuněčné povaze původního organismu, ze kterého je expresní systém odvozen, mají buňky specifické nároky na okolní podmínky. Za normálních okolností je homeostáza organismu udržována součinností více orgánových soustav. V laboratorních podmínkách je ale potřeba udržovat stálou teplotu, pH, osmotický tlak a další faktory uměle, což způsobuje vyšší nákladnost produkce.

Kvasinkové buněčné továrny v sobě kombinují lákavé vlastnosti bakteriálních i nemikrobiálních eukaryotických expresních systémů. Vzhledem ke své eukaryotní povaze jsou schopné vyšší míry produkce funkčních lidských proteinů než například *E. coli*, zatímco si udržují nižší nároky na kultivaci oproti systémům odvozeným z mnohobuněčných organismů. Jako jednobuněčná houba je *S. cerevisiae* schopna přizpůsobení širšímu spektru podmínek, například nižší pH, vyšší koncentrace cukrů a alkoholů či vyšší osmotický tlak v médiu (Hahn-Hägerdal et al., 2007) .

V biotechnologickém průmyslu se pomocí expresních systémů vyrábí hlavně heterologní (tedy organismu cizí) proteiny, většinou využívané jako farmaceutika. Prvním takto produkováným léčivem proteinového charakteru byl inzulín, využívaný k léčbě relativně časté autoimunitní nemoci *diabetes mellitus* I. typu. Lidský inzulín je protein o dvou řetězcích (A a B), který ovlivňuje glykémii pacientů. Výzkum tou dobou probíhal na enterobakterii *E. coli*, a koncem sedmdesátých let bylo možno syntetizovat oba řetězce proteinu (Goeddel et al., 1979), ačkoliv do komerční produkce vstoupil až v následujícím desetiletí pod jménem Humulin (human insulin, produkováno společností Eli Lilly) (Riggs, 2021). V průběhu osmdesátých let bylo ve spojených státech schváleno k produkci pouze devět rekombinantních proteinových léčiv, do roku 2015 to již bylo téměř 400 (Sanchez-Garcia et al., 2016). Kromě heterologních

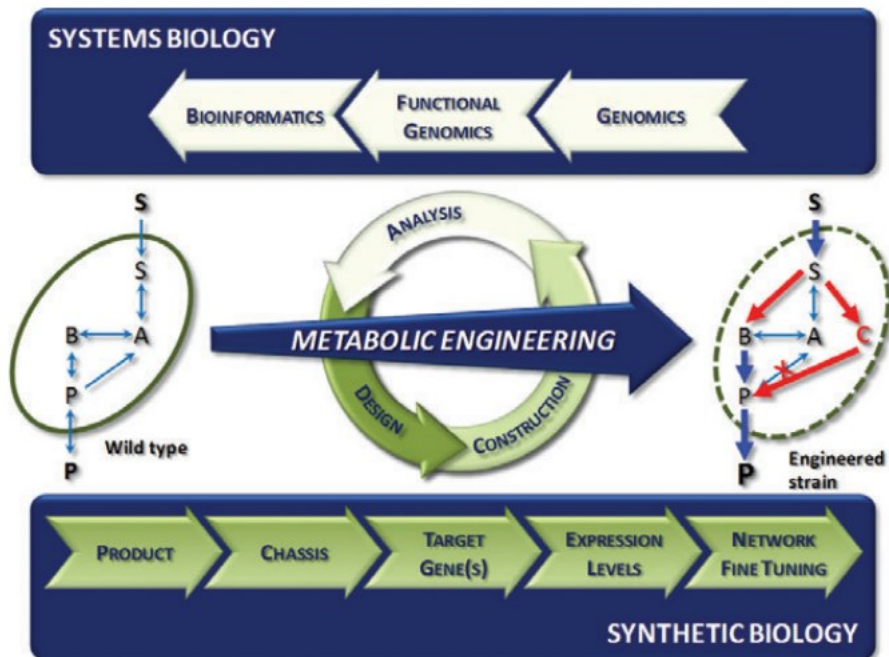


proteinů se kvasinkové systémy hojně využívají pro syntézu jiných organických molekul. Kromě historicky nejrelevantnějšího kvasinkového produktu ethanolu se produkují další alkoholy jako n-butanol či glycerol. Z dalších látek potom například organické kyseliny jako kyselina pyrohroznová, octová či mravenčí, dále pak vanilin, či  $\beta$ -karoten (Kim et al., 2012). Výše zmíněné látky jsou většinou relativně jednoduché, co se týče struktury či biosyntetické dráhy. Příkladem nepeptidových molekul vyžadující import celé biochemické dráhy jsou například semisyntetické opioidy thebain a hydrokodon vyžadující při syntéze z cukrů 21 a 23 enzymatických reakcí (Galanie et al., 2015). Jako další příklad složitější produkce lze zmínit flavonoid breviscapin původně izolovaný z rostliny *Erigeron breviscapus*, který je využíván k léčbě kardiovaskulárních onemocnění (Liu et al., 2018).

Produkce rekombinantních farmaceutik na průmyslové úrovni je podmíněna zvolením dobrého buněčného chassis, jehož molekulární aparát je dobře prozkoumán a tudíž je možné optimalizovat expresi heterologních proteinů tak, aby se produkovala dostatečné koncentrace produktu s předvídatelnými výsledky. Během desetiletí výzkumu se nashromáždilo v databázích obrovské množství dat, díky nimž můžeme pomocí bioinformatických metod vhodně optimalizovat genovou expresi. I z tohoto důvodu je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* lákavým základním blokem pro práci, neboť je prvním eukaryotním organismem s plně sekvenovaným genomem (Goffeau et al., 1996), tradice práce s kvasinkovými kulturami je tedy velmi silná.

Pro design a konstrukci kvasinkových expresních systémů je možné zvolit ze tří hlavních strategií: racionálního metabolického inženýrství, inverzního metabolického inženýrství a evolučních strategií (Kim et al., 2012). Při racionálním metabolickém inženýrství se vychází z existujících biochemických a genetických informací o kvasince, která bude následně podléhat úpravě metodami syntetické biologie pro získání žádaného fenotypu. Při inverzním postupu se postupuje opačně, tedy se vychází z fenotypu a následně se dohledává genotyp, který ho podmiňuje. Během postupu se využije buď náhodné mutageneze či genového knock-outu k sestavení knihovny kmenů s různými fenotypy, nebo se využívá transformace plazmidy, které selektivně inhibují nebo zvyšují expresi specifických genů s pleiotropním efektem. Po indukci změn exprese nebo odstranění segmentů genomu následuje set komparativních analýz na vybraných mutantech, kde jsou identifikovány geny způsobující daný fenotyp. Po identifikaci zúčastněných genů a charakterizaci jejich vlivu je na jejich základě sestaven nový expresní systém (Lee et al., 2011). Alternativou k molekulárně genetickým úpravám cílových kvasinek jsou evoluční strategie. Oproti předchozím metodám mají evoluční

strategie výhodu v tom, že není nutné znát přesné molekulární mechanismy nutné pro získání žádaného fenotypu. Aplikací určitých selekčních podmínek dochází postupem času k akumulaci mutací, z nichž některé mají pozitivní (z pohledu průmyslové produkce) vliv na fenotyp buňky (Kim et al., 2012). Selekcí vhodných kolonií lze takovéto pozitivní mutace akumulovat, dokud se kmen neadaptuje na požadované externí stimuly. Tímto způsobem je možno například adaptovat kvasinku na příjem nového zdroje uhlíku (Liu & Hu, 2010) nebo na toleranci k několika externím stresorům (Cakar et al., 2005) .



Obrázek 1- Kroky popisující pracovní postup při přípravě metabolicky modifikované kvasinky (Kim et al., 2012)

Nejčastější pracovní postup pro přípravu expresního systému, tedy racionální metabolické inženýrství, se dá rozdělit do pěti hlavních bodů (viz. Obrázek 2). Prvním záchytným bodem je výběr produktu. Podle charakteru produkované látky se následně vybere správné buněčné chassis na základě informací o vnitřních biochemických drahách, dostupnosti nástrojů genového inženýrství nebo třeba schopnostem fermentace (Keasling, 2010) . Třetím krokem je identifikace genů, které ovlivňují produkci a nalezení mechanismů, jimiž se tak děje. Geny s pozitivním vlivem na produkci jsou geny biosyntetické dráhy produktu, geny pro odpověď na stresory nebo geny posilující export finálního produktu. Tyto geny mohou být endogenního nebo exogenního původu. Z relevantních genů je následně sestavena celá biosyntetická dráha, která může být buď v celku vložena do kvasinky z odlišného druhu, nebo designovaná *de novo* z různých charakterizovaných prvků biosyntetických drah (Prather & Martin, 2008). Negativně ovlivňující geny vedou obecně ke snížení produkce, ať už tvorbou

jiných proteinů kompetujících o společné intermediáty nebo degradací produktu (Kim et al., 2012). Ve čtvrtém kroku je potřeba provést analýzu kvantitativních a kvalitativních vlastností genů identifikovaných v předchozím kroku (ať už úpravou počtu kopií genů, integrací do chromozomu či delecí ), a v pátém a posledním kroku se pouze optimalizují míry exprese v biosyntetické dráze produktu k docílení nejvyšších výtěžků (Kim et al., 2012).

## 2.2 Homologní rekombinace *S. cerevisiae*

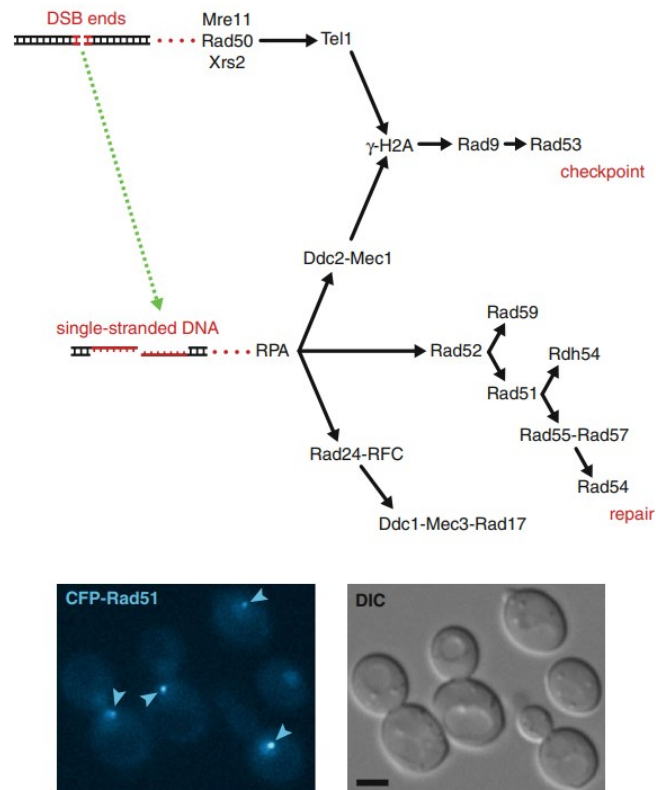
Jednou z nejcennějších vlastností *Saccharomyces cerevisiae*, co se týče syntetické biologie, je její schopnost integrovat cizorodou DNA do svého vlastního genomu pomocí homologní rekombinace a nezvykle velká plasticita co se týče genových přestaveb. Na základě pouze krátkého překryvu homologní DNA je kvasinka schopná svou mašinerií pro opravu zlomů ve vlastní DNA integrovat i cizorodou molekulu.

K homologní rekombinaci přirozeně dochází po nalezení poškození DNA. Po detekci poškození následuje jeden z opravných mechanismů, mezi které řadíme mimo jiné i homologní rekombinaci. Umělá indukce takového poškození vyžaduje tvorbu dvouřetězcových zlomů v DNA (také DSBs = double strand breaks). Možnými prostředky pro indukci tohoto poškození jsou například plazmidem kódované meganukleázy jako I-SceI nebo HO, které jsou exprimovány pod inducibilním promotorem, omezené vystavení  $\gamma$ -záření, nebo chemikálie jako bleomycin, zeocin, či methylmethansulfonát (MMS) (Eckert-Boulet et al., 2011).

Na opravě dvouřetězcového poškození DNA se podílí celá řada genů. Zásadní roli u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* hraje skupina RAD52, která zahrnuje celou skupinu genů kódujících proteiny tvořící opravný komplex. Jejich inaktivace vede k narušení opravných procesů (Symington, 2002). V průběhu opravy se zúčastněné proteiny shlukují do velkých proteinových komplexů o váze v řádu gigadaltonů (Eckert-Boulet et al., 2011). Opravné proteinové komplexy jsou pozorovatelné i *in vivo* pod mikroskopem viz Obrázek 2. . Důležitým faktorem pro homologní rekombinaci je délka homologních sekvencí využitých pro rekombinaci. Pro dráhu využívající gen *RAD51* je nutná homologní sekvence dlouhá kolem 100bp, zatímco mechanismy nezávislé na *RAD51* vyžadují pouze cca 30bp homologie (Ira & Haber, 2002).

Mechanismy propojující oddělené řetězce nukleových kyselin jsou v laboratorních podmínkách využívány k integraci cílových molekul cizorodé DNA do genomové DNA. Tento proces je centrálním úkonem nutným pro expresi rekombinantních proteinů či získání určitých žádaných fenotypických znaků. Nové metody výzkumu struktury genomu kvasinek jako je *S. cerevisiae* umožnily v posledních letech vytvořit vcelku detailně anotovanou genetickou mapu, jejíž informace o promotorech či restričních místech dnes slouží k designu nových průmyslových nástrojů pro práci s touto jednobuněčnou houbou. Informace o anotovaném

genomu lze najít například v databázi SGD, neboli The *Saccharomyces* Genome Database (<https://www.yeastgenome.org/>).



Obrázek 2- Nahoře, opravné dráhy vyvolávající homologní rekombinaci využívající proteiny skupiny RAD52. Dole, proteinové komplexy s fluorescenčně označeným RAD51 jsou pozorovatelné in vivo pod fluorescenčním mikroskopem (vlevo). Vpravo buňky v diferenciatním interferenčním kontrastu. Převzato z . (Eckert-Boulet et al., 2011)

Výše popsané schopnosti homologní rekombinace dělají ze *Saccharomyces cerevisiae* a ostatních kvasinek skvělé prostředí pro syntézu plazmidových vektorů, velkých molekul DNA jako jsou syntetické bakteriální genomy a dalších konstruktů nukleových kyselin.

## 2.3 Toolkits a jejich základní principy

### 2.3.1 Základní principy

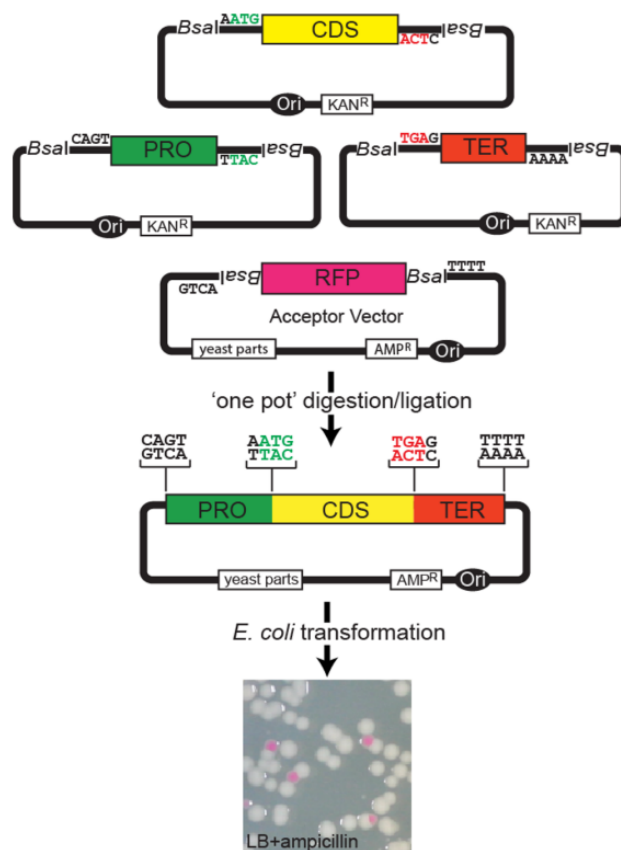
Zásadní usnadnění designu nových expresních systémů či jiných specificky upravených kmenů přináší takzvané „toolkits“, neboli sady nástrojů. Obecně tyto standardizované sady molekul DNA umožňují modulární, ohebný design pro integraci cílových molekul DNA do specifického integračního místa. Součástí těchto standardních sekvencí mohou být například promotory, terminátory, fluorescenční značící proteiny, selekční markery a počátky replikace. Kromě těchto částí mohou sady zahrnovat vstupní vektor, na který mohou být klonovány další sekvence, o jejichž integraci usilujeme (Lee et al., 2015). Pro pracovní přístupy syntetické biologie je zásadní flexibilita prostředků, v setu by se tedy měly vyskytovat sekvence se širokou škálou aktivity v buňce, například různě silné promotory nebo sekvence mířící na specifické lokusy v kvasinkovém chromozomu (Lee et al., 2015).

Prvním významným pokusem o standardizaci syntézy molekul DNA byl systém NOMAD. Tento protokol využívá jako standardní klonovací vektory plazmidy pNOMAD1 a pNOMAD2, které disponují štěpnými místy pro restriční enzymy (RE) typu IIS (*BsmBI* a *BsaI*) (Rebatchouk et al., 1996). Zásadní vlastností těchto enzymů je jejich schopnost štěpit DNA v definované vzdálenosti mimo své rozpoznávané sekvence. Toto ve výsledku umožňuje na základě okolních sekvencí DNA tvořit nové předvídatelné přesahy použitelné pro následnou ligaci (Rebatchouk et al., 1996). Tvorba definovaných přesahů mimo restriční místo pomocí zmíněných endonukleáz umožňuje inzerci směrovaně poskládaných modulů na plazmidový assembly vector (pNOMAD1 nebo 2). Oproti modernějším metodám jako je Golden Gate assembly je při tomto postupu potřeba poskládat jednotlivé moduly do plazmidu postupně, a to po štěpení jednou ze zmíněných restričních endonukleáz. Tyto enzymy produkují kohezní konce kompatibilní s konci tvořenými endonukleázou *StyI*. Tato endonukleáza je využita k opracování konců jednotlivých modulů a umožňuje jejich postupné poskládání do multimodulového konstruktů s definovanou posloupností (Rebatchouk et al., 1996). Autoři tohoto protokolu navrhují sdílení vytvořených modulů a vektorů v rámci otevřené knihovny. Tento přístup je později aplikován pro další postupy a tvoří podstatné jádro pole syntetické biologie.

Obecně je transformace kvasinky zprostředkována plazmidem obsahujícím cílové zájmové sekvence. Základní, a poté často modifikovanou, metodou syntézy těchto plazmidových vektorů je dnes tzv. Golden Gate assembly (=GG), která umožňuje za pomoci endonukleáz typu IIS syntézu plazmidů obsahujících i multigenové komplexy. Podstata tohoto postupu tkví v používaných restričních enzymech, typicky buď *BsaI* nebo *BsmBI*, které štěpí DNA mimo svou rozeznávanou sekvenci jako při výše zmíněné strategii NOMAD. Tyto endonukleázy po štěpení zanechávají 4bp dlouhé, definované přesahy, které umožňují směrované lepení i několika transkripčních jednotek za sebe (Agmon et al., 2015). Významným pokrokem je ale možnost poskládat jednotlivé moduly do assembly vektoru v jednom kroku, tedy v takzvané „one-pot“ reakci, kdy dochází najednou k digesci (opracování) a ligaci jednotlivých modulů transkripční jednotky (Agmon et al., 2015).

Jednou specifickou úpravou GG je yGG, tedy yeast Golden Gate. Tato metoda optimalizuje užití GG definováním tří zásadních částí kvasinkových genů ( PRO = promotor; CDS = coding sequecne; TER = terminátor ) a vybráním konkrétních sekvencí DNA v kohezním přesahu tvořeným *BsaI* a *BsmBI* (Agmon et al., 2015). Definováním těchto oblastí před a za jednotlivými částmi genu je zajištěna posloupnost částí v transkripční jednotce (= TU = transcription unit).

Další výhodou je pouze minimální „zjizvení“ mezi samotnými důležitými částmi TU, neboť rozeznávaná 6bp sekvence je v one-pot reakci eliminována a zbývá pouze 4bp „jizva“, která přímo navazuje na další část (Agmon et al., 2015). Kromě definovaných propojovacích sekvencí yGG obsahuje set nosných vektorů, které zajišťují různý počet plazmidů v buňce (tedy vysoko/nízkokopiové plazmidy), popřípadě specifické sekvence pro integraci do specifických lokusů samotného kvasinkového genomu. Jednotlivé nosné vektory v původní podobě kódují RFP, tedy červený fluorescenční protein obklopený restričními místy pro používané restriční enzymy, který je při úspěšné one-pot reakci vyštěpen z plazmidu. Tento proces umožňuje *in vivo* vizuálně odlišit úspěšně transformované kolonie od kolonií s nezměněným nosným vektorem viz Obrázek 3 (Agmon et al., 2015).



Obrázek 3 - Schéma sestavení celé transkripční jednotky při protokolu Golden Gate. Dodané vektory nesoucí části TU jsou v jedné reakci obsahující jak digesci, tak ligaci, poskládány do jednoho nosného vektoru s odlišným selekčním markerem pro ověření úspěšnosti transformace. (Agmon et al., 2015)

Z GG systému se rozvinul další systém využívající schopností endonukleáz typu IIS, a to MoClo, neboli modular cloning system. Tento protokol byl původně navržen pro využití v bakteriálních systémech, ale jeho principy jsou, ačkoliv s jiným setem součástí (popsáno níže v sadě YTK), aplikovatelné na kvasinkové systémy. Pro MoClo ve kvasinkách platí kromě základního principu a pojmů i stejná omezení, co se týče počtu transkripčních jednotek. Následující segment práce blíže popisuje průběh v bakteriálním systému a prezentuje jeho terminologii a důležité součástky.

Na základě výše definovaných vlastností GG systému rozšiřuje MoClo klasifikaci součástí transkripčních jednotek ze tří na pět. Ve směru 5' → 3' jsou postupně části promotor, 5' nepřekládaná oblast (UTR), signální peptidy, kódující sekvence a terminátor. Systém MoClo klasifikuje několik úrovní konstruktů podle počtu a komplexity částí. Výše zmíněné typy „genových součástí“ jsou označovány jako Level 0 konstrukty a jsou složeny pouze z jednoho

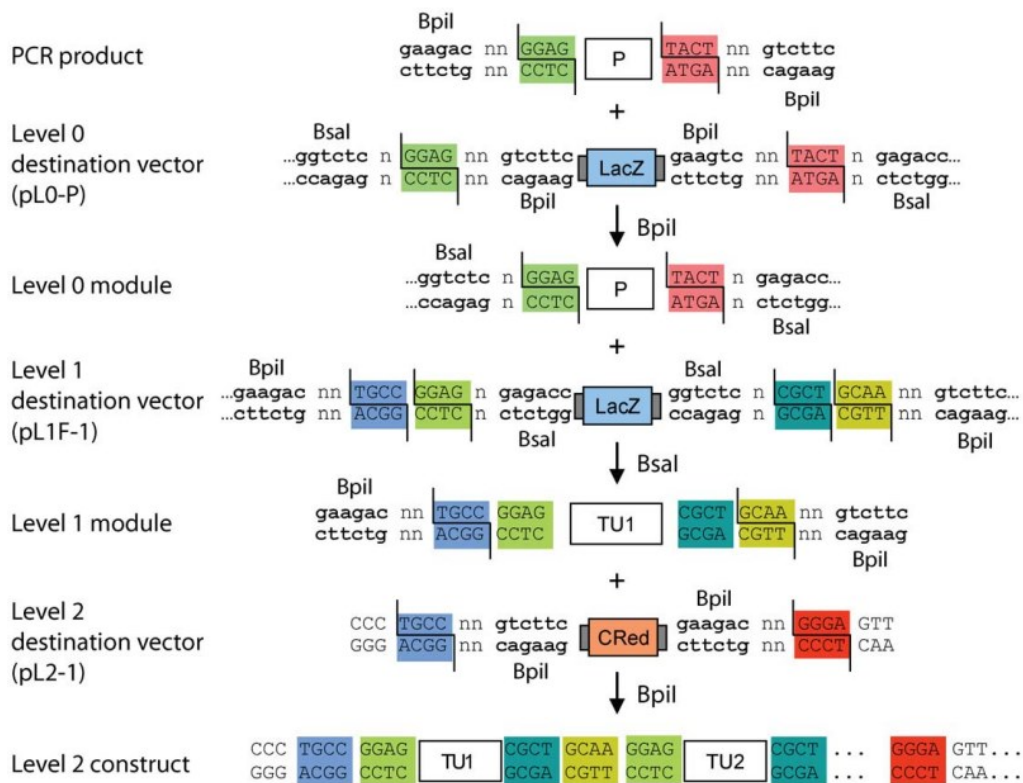


modulu a fúzních sekvencí navázaných na nosné plazmidy ( = destination plasmids, podle typu části jsou to pL0-P, pL0-U, pL0-S, pL0-C a pL0-T ). Tyto plazmidy jsou strukturou založeny na plazmidu pUC19 a udělují rezistenci vůči spectinomycinu (Weber et al., 2011). Konkrétní části TU se vybírají z knihoven modulů a poskytují značnou variabilitu v možnostech sestavení transkripčních jednotek pro tvorbu vyšších úrovní konstruktů.

Po výběru vhodných Level 0 modulů je potřeba sestavit konstrukt vyšší úrovně, tedy Level 1 konstrukt, který obsahuje kompletní transkripční jednotku. Vektory pro konstrukty Level 1 oproti předchozí úrovni udělují rezistenci vůči ampicilinu, což umožňuje efektivní selekci úspěšně transformovaných kolonií na médiu s antibiotikem (Weber et al., 2011) . Destination vektory první i druhé úrovně kódují enzym LacZ (  $\beta$ -galaktosidáza ) ohraničený z každé strany dvěma restrikčními místy pro endonukleázy BpiI a BsaI, které zanechávají komplementární definované přesahy. Oproti Level 0 destination vektorům ale nejsou přesahy na 5' a 3' straně kódovaného proteinu identické, ale obsahují jednonukleotidové rozdíly, které umožňují směrované sestavení jednotlivých modulů první úrovně do finálního Level 2 konstrukt, ve kterém nezůstávají žádná rozeznávaná restrikční místa, ale jenom 4bp jizvy zanechané enzymy typu IIS (Weber et al., 2011). Pro zajištění možnosti tohoto směrovaného sestavování TU je v setu MoClo zahrnuto 7 Level 1 destination vektorů pro posloupnost vpřed ( forward, plazmidy pL1F-1 až pL1F-7 ) a 7 vektorů pro orientaci zpět ( reverse, pL1R-1 až pL1R-7 ) (Weber et al., 2011).

Destination vektory pro konstrukty Level 2 kódují geny pro rezistenci na kanamycin a červený fluorescenční protein, což umožňuje kromě selekce na antibiotiku i vizuální odlišení od úspěšně transformovaných kolonií (Weber et al., 2011) . Vzhledem k omezenému počtu L1 vektorů lze v jednom kroku poskládat pouze 6 TU. Pro syntézu delších multigenových konstruktů byly vyvinuty dva další sety tzv. end-linker vektorů vnášející do Lvl 2 konstruktu nové restrikční sekvence umožňující další napojení multigenového konstrukt za první. Tyto sety vektorů, nazývané pELB-n a pELR-n obsahují restrikční místa pro RE BsaI ( pELB-n ) a Esp3I ( pELR-n ). Při tvorbě větších Lvl 2 konstruktů je tedy v reakci nejprve přítomno několik žádaných vektorů nesoucích TU, end-linker vektor a Level 2 destination vektor. V reakci takto vznikne multigenový konstrukt konečným end linkerem za vzniku tzv Level 2 konstrukt kódující rezistenci na kanamycin. Podle použitého end-linkeru vzniká buď kompletní konstrukt Level 2-1 ( po použití pLBR-n ), nebo intermediátový konstrukt Level 2i, který za poslední transkripční jednotkou obsahuje nová restrikční místa pro RE BsaI a kóduje LacZ stejně jako destination vektory. Tato oblast slouží jako nový cíl pro integraci dalšího setu TU do konstrukt

(Weber et al., 2011). Napojení dvou setů konstruktů samozřejmě vyžaduje další cyklus GG syntézy. Tento proces lze teoreticky opakovat donekonečna, ale prakticky je omezen schopností modifikovaného organismu akceptovat cizorodé DNA (Weber et al., 2011).



Obrázek 4 - Schéma tvorby modulů od úrovně 0 (část TU), přes úroveň 1 (kompletní transkripční jednotka) až po úroveň 2 (multigenový komplex). Postupně je původní produkt PCR integrován do čím dál složitějších komplexů pomocí endonukleáz typu IIS a jimi vytvořenými kohezními konci. (BspI a BsaI). (Weber et al., 2011)

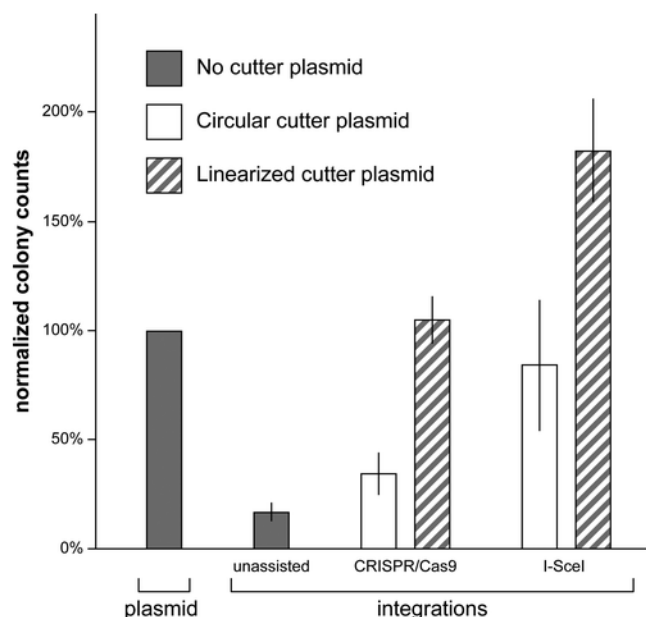
Konstrukty syntetizované strategií MoClo jsou využitelné jak v prokaryotních, tak eukaryotních expresních systémech. Na základě této strategie se rozvinula řada dalších systémů specializovaných pro různé organismy, kvasinky nevyjímaje.

### 2.3.2 Vybrané toolkits a jejich využití

Na základě výše popsaných metod se postupem času rozvinula řada navazujících strategií s většími či menšími úpravami. Laboratoře po celém světě využívají těchto metod jak k základnímu, tak aplikovanému výzkumu. V případě zájmu výzkumného týmu je k dispozici na internetu například nezisková knihovna AddGene (<https://www.addgene.org/kits/>), která shromažďuje knihovny plazmidů, kmeny mikroorganismů a sady nástrojů pro potřeby molekulárního klonování pro potřeby akademiků a neziskových organizací. Kromě AddGene existují komerční poskytovatelé těchto sad nástrojů. Dále bude popsáno několik takovýchto setů a jejich využití v laboratořích syntetické biologie.

Zásadním rozšířením MoClo systému je kit zvaný MoClo-YTK (yeast tool-kit). Tento set 96 charakterizovaných modulárních částí funguje na výše popsaných principech a poskytuje možnost tvorby konstruktů s velkým dynamickým rozmezím aktivity (různé části v konstruktě jsou schopné změnit aktivitu/hojnost produktu v buňce o několik řádů). Místo poskytování sady vektorů pro různé účely disponuje MoClo-YTK možností sestavovat vlastní vektory pomocí součástí poskytnutých v rámci sady (Lee et al., 2015). Jednotlivé součástky poskytnuté v sadě jsou kromě dříve zmíněných kategorií obohaceny i o sekvence zaměřené na práci s kvasinkami, například selekční markery (třeba URA3, LEU2, HIS3...), kvasinkové ARS a 5' a 3' homologní sekvence pro integrace.

Kromě možností plazmidové transformace poskytuje tento toolkit i prostředky pro efektivnější integrace do specifických lokusů v genomu kvasinky, které bez dalších pomocných prostředků vykazují až řádově nižší úspěšnost transformace (Lee et al., 2015). Metoda v tomto protokolu využívá tzv. homing endonukleáz (meganukleáz) k vytvoření DSB, jejichž přítomnost výrazně zvyšuje úspěšnost integrace. V článku představujícím MoClo-YTK jsou analyzovány úspěšnosti neasistované integrace, integrace s užitím megaenukleázy I-SceI a systémem CRISPR/Cas9. Specificita místa integrace byla podpořena vložením tzv. landing padu, tj. „přistávací dráhy“ pro RE do genomu upravovaného kvasinkového kmene. Tato sekvence byla do genomu integrována předem pomocí konvenční homologní rekombinace a obsahuje rozpoznávací sekvenci pro I-SceI a protospacer adjacent motif (PAM) potřebný pro CRISPR/Cas9. Neasistované integrace vykazují 6x nižší úspěšnost oproti plazmidové transformaci, ale přítomnost plazmidů kódujících jednu z endonukleáz (tzv. cutter plasmid) dramaticky zvyšuje úspěšnost. Tato zvýšená efektivita lze ještě umocnit linearizací plazmidu před transformací viz Obrázek 5 (Lee et al., 2015).



Obrázek 5- účinnost transformací. Vlevo je pro porovnání úspěšnost transformace plazmidem. Tmavě šedé sloupce představují úspěšnost transformace bez asistujících štěpných plazmidů. Bílé sloupce představují úspěšnost integrace s cirkulárním štěpným plazmidem a šrafované sloupce s linearizovaným štěpným plazmidem. Jak při využití CRISPR/Cas9, tak při I-SceI je efektivita integrace výrazně vyšší s linearizovaným plazmidem. (M. E. Lee et al., 2015)

Celkově tedy tento toolkit optimalizuje systém MoClo pro využití v kvasinkových kmenech a poskytuje zlepšené možnosti lokus-specifických integrací.

V dalších letech byly postupně vytvořeny další rozšíření YTK, často zaměřené na práci právě s CRISPR associated systémy ( Cas ), například na design vektorů kódujících single guide RNA ( sgRNAs ). Kromě samotných nových modulů se vyvinuly také nové počítačové nástroje schopné dle libosti jednoduše tvořit nové Level 0 konstrukty pouhou inzercí samotné zájmové sekvence a krátké oblastí před a za ní ( tzv prefix a sufix ). Na základě těchto informací systém může produkovat forward a reverse primery s definovaným obsahem G/C bází, různou teplotou tání či délkou (Otto et al., 2021). Tento program je chopen se při návrzích vyvarovat rozpoznávacích sekvencí, které by mohly zasahovat do MoClo.

Kromě počítačových nástrojů pro návrhy primerů je pro využívání moderních protokolů s CRISPR asociovanými proteiny důležitá kromě exprese samotné endonukleázy Cas9 i exprese „naváděcí“ guide RNA (gRNA). Tyto zásadní složky je možné exprimovat z jednoho plazmidového vektoru, to ale zvyšuje pravděpodobnost mutací při syntéze a ztěžuje samotnou transformaci. Vzhledem k tomu, že gRNA je nejefektivněji exprimována z vysokokopiového plazmidu obsahujícího 2 $\mu$  kvasinkový ARS, a Cas9 vykazuje při vyšší expresi negativní efekty na růst buňky, je spíše žádoucí jednotlivé části vnášet do buňky na vlastních vektorech (Otto et al., 2021).

Nejnovější větší rozšíření YTK toolkitu přišlo v roce 2023 pod názvem Multiplex Yeast Toolkit neboli MYT. MYT obsahuje 96 plazmidových vektorů, přičemž deset z nich je specializováno na tzv. markerless integraci do genomu (tedy bez selekčního markeru). Jednotlivé části mohou být sestaveny *in vitro* pomocí protokolu Golden Gate nebo *in vivo* pomocí homologní rekombinace (Shaw et al., 2023). Oproti YTK disponuje tento protokol schopností integrovat s vysokou úspěšností (>60%) i při použití všech 10 vektorů zároveň, a to i bez použití předem vnesených landing padů (Shaw et al., 2023). V protokolu je uvedeno také deset lokusů zachovaných ve velké většině laboratorních kvasinkových kmenů, do kterých je možno integrovat žádané sekvence. Tyto lokusy jsou rozmístěny vždy na jiných chromozomech a jsou umístěny v intergenovém prostoru, tedy nejméně 1 kbp od nejbližšího start kodonu a 0.5 kbp od nejbližšího stop kodonu. Ke každému lokusu náleží jeden z integračních vektorů založených na YTK architektuře (pMYT075–084). Vektory jsou dále pozměněny, aby umožňovaly integraci pomocí gap repair (opravný mechanismus využívající homologní rekombinaci) uvnitř cílové buňky a zajistili možnost vystřížení fluorescenčního markeru mScarlet pro vizuální screening (Shaw et al., 2023). Dalším pokrokem oproti YTK je zjednodušení sestavování Level 1 konstruktů díky poskytnutým předem sestaveným polotovarovým kazetám (assembly cassettes). V YTK protokolu je pro sestavení takového konstruktu potřeba alespoň 8 částí z poskytnutého katalogu, v MYT je tento počet snížen až na polovinu, což výrazně usnadňuje jejich tvorbu (Shaw et al., 2023). Velkou výhodou je také možnost přeskočit tvorbu Level 2 vektorů díky dalšímu restriktivnímu místu pro *NotI*, vložením takovýchto Level 1 integračních kazet a jejich digescí lze za sebe poskládat až deset TU *in vivo* (Shaw et al., 2023).

Další sadou využívající principů MoClo je toolkit zvaný Yeast GoldenBraid (YGB), který představuje adaptaci klonovacího standardu GoldenBraid 2.0, původně určeného pro práci s rostlinnými buňkami, na kvasinky. Od původního rostlinného protokolu se odlišuje přidáním tzv. AOHs (= arms of homology) do svých integračních plazmidů, což umožňuje efektivní homologní integraci cílových TU do kvasinek. Lokusy pro integraci jsou v tomto setu pouze dvě, a to konkrétně YPRCΔ15 na chromozomu XVI a YORWΔ22 na chromozomu XV. Tyto integrační místa se vyskytují v intergenových LTR oblastech a tudíž jsou relativně vzdáleny dalším kódujícím sekvencím. (Pérez-González et al., 2017).

Zvláštností nepřítomnou v jiných protokolech je ale zaměření na expresi mitochondriálních proteinů. Za tímto účelem set obsahuje mimo ostatních částí TU i takzvaný MTS, neboli mitochondria targeting signal. Tento signál (konkrétně Su9, původem z houby

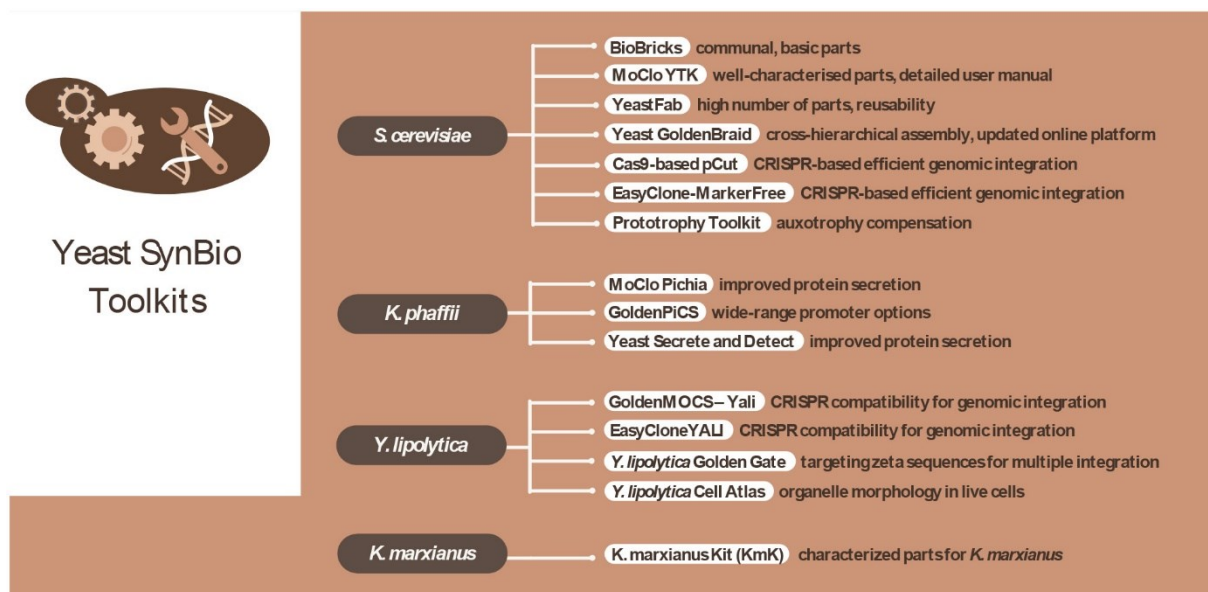
*Neurospora crassa* ) směřuje proteiny do matrix mitochondrie. Tento signál je obvykle při přenosu přes mitochondriální membrány odstraněn endopeptidázami a výsledný protein se hromadí v matrix. Jako ukázka funkčnosti setu byla v článku představujícím tento toolkit použit protein *nifU*, který je součástí proteinů souvisejících s nitrogenázou (Pérez-González et al., 2017).

Výše zmíněné nástroje sice disponují robustní škálou součástí, ale ve svém počtu jsou tyto části vcelku omezené. To se pokusil změnit systém YeastFab, vytvořený v roce 2015. Tento systém charakterizuje části kvasinkových genů na promotory (PRO), open reading frames (ORFs, tedy kódující sekvence) a terminátory (TER). Podle vlastností jednotlivých genových částí YeastFab počítačovou analýzou vytvořil databázi částí kvasinkového genomu. Pro jednotlivé typy představuje také tři vektory kódující rezistenci vůči kanamycinu pro navazující sestavování transkripčních jednotek. Čtvrtým představeným vektorem je POT vektor nesoucí všechny tři části na jednom plazmidu. Z jednotlivých částí jsou také odstraněny interní sekvence rozeznávané restrikcími enzymy, což zamezuje nechtěnému štěpení DNA uvnitř buňky.(Guo et al., 2015). V rámci výzkumu byly charakterizovány stovky promotorů v nativním kvasinkovém genomu s různými aktivitami pomocí fluorescenční cytometrie porovnávající fluorescenční signály žlutého fluorescenčního proteinu ( YFP ) a mCherry. DNA konstrukt exprimující YFP byl umístěn downstream od zkoumaných promotorů, a konstrukt exprimující mCherry byl umístěn pod promotor TEF2. TEF2 sloužil jako kontrola se známou aktivitou a podle porovnání světelného signálu obou fluorescenčních proteinů byly určeny síly jednotlivých promotorů pro případné další využití. Aktivity promotorů byly analyzovány i pod různými stresovými podmínkami, které různou měrou ovlivňují jejich aktivitu (Guo et al., 2015). Celkově YeastFab poskytuje přes 2000 promotorů, jejichž aktivita ale není dokonale prozkoumána. Systém také neobsahuje prostředky pro začlenění C-terminálních a N-terminálních značek do exogenních proteinů a oproti jiným systémům nedisponuje velkým výběrem selekčních markerů v poskytnutých vektorech (Malci et al., 2022)

Kromě sad založených na modifikacích systému MoClo existuje pro využití v kvasinkových kmenech i řada dalších alternativ. Mezi nimi stojí za zmínku například kvasinková sada z databáze BioBricks (<https://technology.igem.org/registry>). BioBricks je nezisková organizace specializující se na sdílení standardních částí DNA, ale převážně je zaměřená na součástky pro syntetickou biologii bakterií. Nicméně v databázi částí se dnes nachází přes 180 kvasinkových částí s definovanou funkcí (Malci et al., 2022). Sada částí specializovaných na kvasinky se nazývá Yeast BioBricks a využívá pouze jeden restrikcí

enzym k linearizaci fragmentů DNA, které jsou následně poskládány do jedné sekvence pomocí mechanismu gap repair, což je opravný systém spoléhající se na přítomnost homologních sekvencí k opravě dvouřetězcových zlomů. V praxi lze tento systém využít k sestavování fragmentů DNA s cca 40bp dlouhými oblastmi homologie do stabilního plazmidového vektoru (Schneider et al., 2012). Na rozdíl od jiných zmíněných sad slouží yeast BioBricks pouze k sestavování plazmidů obsahujících genové konstrukty, nikoliv k jejich integraci do genomu.

Kromě výše zmíněných sad nástrojů existuje celá řada dalších, které se specializují na další druhy kvasinek nebo další úkony viz Obrázek 6.



Obrázek 6- Vybrané sady nástrojů vyvinuté pro častěji využívané kvasinky a jejich účel a možnosti využití. (Malci et al., 2022)

Požadavky syntetické biologie vyžadují od používaných buněk velkou flexibilitu genomu, což *S. cerevisiae* splňuje na výbornou. Stala se proto populárním subjektem výzkumu nástrojů umožňujících tento flexibilní genom upravovat a zároveň tvořit modulární nástroje potenciálně adaptovatelné i na další organismy. Výše popsané sady nástrojů jsou součástí úsilí vytvořit robustní metody genové modifikace ve stylu tradičního inženýrství, tedy s výběrem dobře charakterizovaných, spolehlivých a dále upravitelných nástrojů a součástek.



## 2.4 *In yeasto* syntéza DNA, syntetické chromozomy

Výše zmíněná schopnost účinné homologní rekombinace umožňuje kromě integrace a exprese exogenní DNA i syntézu a propojování velkých DNA fragmentů na základě homologních překryvů na jejich okrajích. Metodami využívající HR lze tvořit velké plazmidy (a to bakteriálního i kvasinkového charakteru) z vícero fragmentů DNA o velikosti v řádu mnoha tisíců párů bází (kbp) (Casini et al., 2014). Na základě i relativně malých homologních sekvencí lze indukovat velké změny struktury jak jednotlivých genů, tak celých chromozomů. Tato schopnost ze *Saccharomyces cerevisiae* udělala kromě významné chassis pro tvorbu expresních systémů i efektivní buněčnou továrnu pro tvorbu syntetických velkých molekul DNA, se kterými se těžko pracuje *in vitro*.

Příkladem využití *S. cerevisiae* jako továrny pro velké molekuly DNA je syntéza fragmentů uměle překódovaného a upraveného genomu *E. coli* (Fredens et al., 2019). Při tomto procesu byl syntetický genom bakterie rozdělen na 100kbp dlouhé fragmenty, které byly systémem homologní rekombinace poskládány do svého nosného vektoru pomocí *S. cerevisiae* a následně poskládány v samotné bakterii. Dalším příkladem je využití kvasinek při dalším projektu překódování genomu *E. coli*, kdy byly v *S. cerevisiae* sestaveny cca 50kbp dlouhé segmenty obsahující kolem dvaceti neesenciálních genů a tří esenciálních. Segmenty byly po ověření integrity opět sestaveny v cílové *E. coli* (Ostrov et al., 2016). V předešlých projektech byly v kvasince sestaveny pouze fragmenty bakteriálních genomů. V *S. cerevisiae* je ale možné sestavit celé syntetické bakteriální genomy. Mezi těmi stojí za zmínku jedny z prvních takových projektů, a to sestavení 582,970bp dlouhého syntetického genomu bakterie *Mycoplasma genitalium* (Gibson et al., 2008) a 1,08Mbp dlouhého chromozomu JCVI-syn1.0 bakterie *Mycoplasma mycoides* (Gibson et al., 2010). Kromě bakterií rodu *Mycoplasma* lze také zmínit 785kbp dlouhý syntetický genom *C. eth-2.0* bakterie *Caulobacter crescentus* (Venetz et al., 2019).

Pokroky v syntetické genomice daly vědcům možnost s velkou přesností i ve velkém rozsahu zasahovat do makromolekul DNA od malého měřítka jednotlivých genů až po genomovou úroveň. Kromě změn ve struktuře chromozomů (delece, inserce, výměna nativních částí za syntetické (Dymond et al., 2011)) lze upravit využívané kodony v rámci genomu (například snížit počet využívaných synonymních kodonů (Fredens et al., 2019)) nebo genom zmenšit o části označené jako nestabilní nebo nepotřebné (Dymond & Boeke, 2012). Zásahy



do struktury genomu lze hrubě rozdělit do tří kategorií podle úrovně zásahu a to na úrovni struktury jednotlivých genů, na úrovni návaznosti a posloupnosti genů nebo na úrovni struktury celých chromozomů, popřípadě genomů (Coradini et al., 2020). Úpravy nejmenšího měřítka zahrnují například odstraňování překrývajících se částí genů, což je v přírodě často se vyskytující jev šetřící místem. Tomuto procesu se říká „refactoring“ a takovéto rozdělení jednotlivých ORFs nevykazuje žádný významný vliv na fenotyp, a zamezuje nepředvídatelným efektům při modifikaci jednoho genu. Takováto úprava dělá následnou manipulaci a výzkum funkcí jednotlivých genů mnohem předvídatelnější a prakticky jednodušší (Chan et al., 2005).

Největším zásahem je přestavba, delece, nebo inserce větších částí chromozomu. Tento proces, který je hůře replikovatelný *in vitro*, je schopen generovat buněčné kmeny s velmi odlišným genomem než jakým disponují wild-type (přírodně se vyskytující) kmeny. V následujících odstavcích bude popsáno několik vybraných protokolů pro indukci změn jak v malém, tak ve velkém měřítku a projekty, ve kterých jsou metody používány.

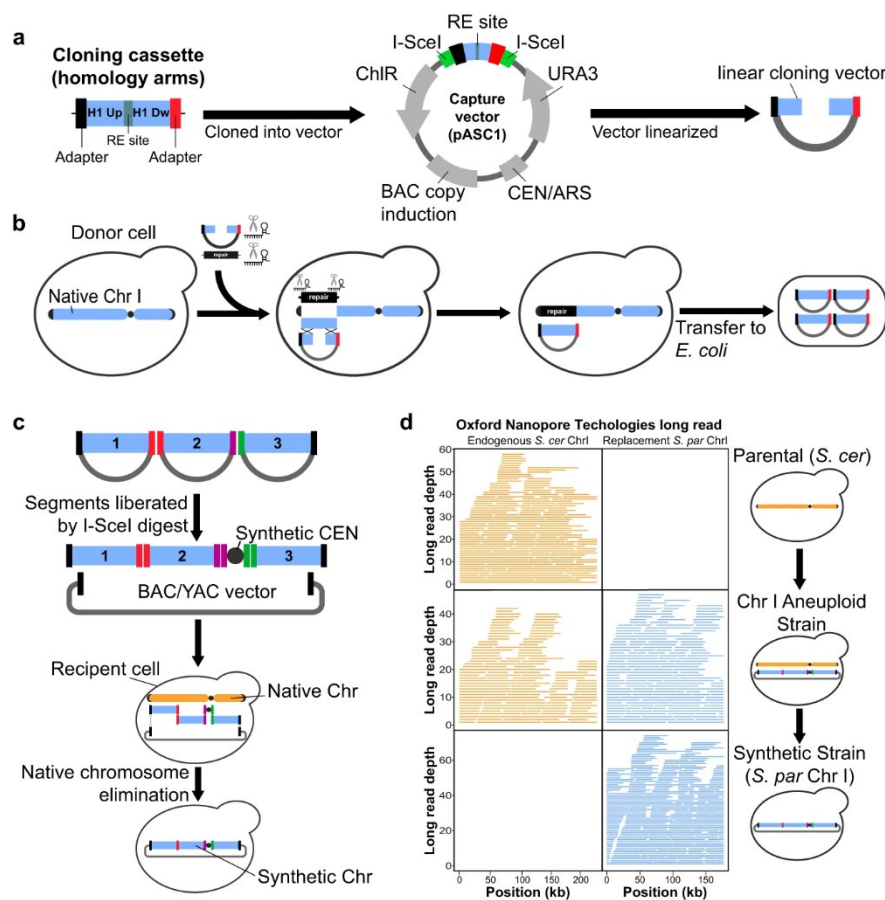
Ačkoliv existuje možnost sestavovat chromozomy i z čistě syntetické DNA, může být v některých případech užitečné sestavovat chromozomy z nativní DNA buněk. K tomuto cíli byla vytvořena metoda CReATiNG, tedy Cloning, Reprogramming, and Assembling Tiled Natural Genomic DNA. Tato metoda tvorby umělých chromozomů umožňuje přesun větších částí chromozomu do jiného kmene kvasinek přes specializovaný BAC/YAC vektor (Coradini et al., 2023). Cílový segment chromozomu je z donorové buňky vyštěpen pomocí Cas9 proteinu a *in vitro* syntetizované guide RNA, která endonukleázu navádí k cílové sekvenci. Takovýto segment se přes místa homologie naklonuje do linearizovaného klonovacího vektoru, který je následně namnožen v bakterii *E. coli* a přenášen do recipientní buňky. Poslední složkou kotransformovanou do donorové buňky je tzv. repair template DNA obsahující selekční marker kódující složky rezistence vůči antibiotiku (například kanamycinu). Tato *de novo* syntetizovaná molekula DNA se přes systém HR integruje do místa vystřiženého segmentu a spojuje k sobě obnažené konce štěpeného chromozomu (Coradini et al., 2023).

Vystřižený segment donorových chromozomů je následně klonován *in vivo* do závěrečného BAC/YAC vektoru pASC1. BAC/YAC vektor, tedy bacterial artificial chromosome/yeast artificial chromosome, obsahuje komponenty jak bakteriálního, tak kvasinkového chromozomu a je schopen se v cílové buňce stabilně udržovat. Mezi důležité součásti tohoto vektoru patří například gen URA3 pro selekci, části bakteriálního plazmidu pCC1BAC kontrolujícího množství kopií a klonovací kazetu (cloning cassette) o délce cca 500bp, do které se přímo integrují vystřižené segmenty chromozomů (Coradini et al., 2023).

Klonovací kazety obsahují dvě 120bp dlouhé oblasti homologie s koncem specifického segmentu, restriční místo pro endonukleázy *AvrII* a *XhoI* a cca 100bp dlouhé adaptérové sekvence udávající pořadí segmentů v rámci BAC/YAC vektoru. Adaptérové sekvence jsou unikátní sekvence DNA na konci fragmentů designované tak, aby terminální adaptér prvního fragmentu odpovídal adaptéru na začátku druhého fragmentu. Tímto systémem je zařízeno správné pořadí v rámci nosného vektoru (Coradini et al., 2023). Tato klonovací kazety jsou ohraničeny dalšími restričními místy, tentokrát pro endonukleázu I-SceI, která se přirozeně nevyskytuje v *S. cerevisiae*. Tato místa pro RE umožňují linearizaci plazmidu a integraci několika velkých segmentů chromozomu za sebe (Coradini et al., 2023).

Buňky, které úspěšně projdou transformací a obsahují kompletní klonovací vektory jsou vybrány dvojitou selekcí na kanamycin a marker *URA3*. Úspěšně syntetizované klonovací vektory jsou následně extrahovány, izolované segmenty jsou vystřiženy z vektorů pomocí I-SceI, purifikovány a nakonec kotransformovány do recipientní buňky spolu s linearizovanou verzí pASC1 bez centromerické části. Centromerická kazeta obsahující syntetický centromerický segment *CEN6* je dodána zvlášť a kromě nového CEN segmentu obsahuje dva markery KanMX a ampR pro selekci. Celkově tedy nový chromozom kromě standardních BAC/YAC součástí obsahuje několik segmentů DNA ohraničených unikátními adaptéry určujícími jejich pořadí, centromerickou kazetu zajišťující stabilní dělení nového chromozomu při mitóze a selekční markery pro identifikaci úspěšných transformantů (Coradini et al., 2023).

Tímto protokolem byl například vytvořen syntetický chromozom I ze *Saccharomyces paradoxus*, který byl následně převeden do *S. cerevisiae*, kde byl schopný se stabilně udržet místo nativního chromozomu I. Pro stabilní udržení bylo potřeba destabilizovat nativní verzi chromozomu, čehož bylo docíleno destabilizací funkce centromery pomocí promotoru *GALI* fungujícího za přítomnosti galaktózy a negativní selekcí na nativní marker *URA3* na chromozomu I. Inducibilní promotor *GALI* byl do kmene integrován před samotným vložením syntetického chromozomu I (Coradini et al., 2023).



Obrázek 7- Sestavení syntetického chromozomu z přirozeně se vyskytujících segmentů. (a) Popis struktury vektoru nesoucího jednotlivé segmenty. (b) Integrace části přirozeného chromozomu do vektoru pomocí oblastí homologie, napmožení v bakteriálním systému. (c) Sestavení segmentů do BAC/YAC vektoru a nahrazení nativního chromozomu destabilizací centromery. (d) Analýza přítomnosti nativního chromozomu (oranžová) a syntetického chromozomu (modrá) pomocí nanopore sekvenace. (Coradini et al., 2023)

V případě potřeby hlubší manipulace se strukturami DNA se místo úpravy nativních částí chromozomů nabízí od základu vybudovaná syntetická DNA v podobě plně syntetických chromozomů. Rozsah těchto syntetických makromolekul sahá od částí jednotlivých chromozomů (Dymond et al., 2011) až po tvorbu zcela nových chromozomů nad standardní počet (Schindler et al., 2023). Tvorba celých syntetických chromozomů umožňuje většinou

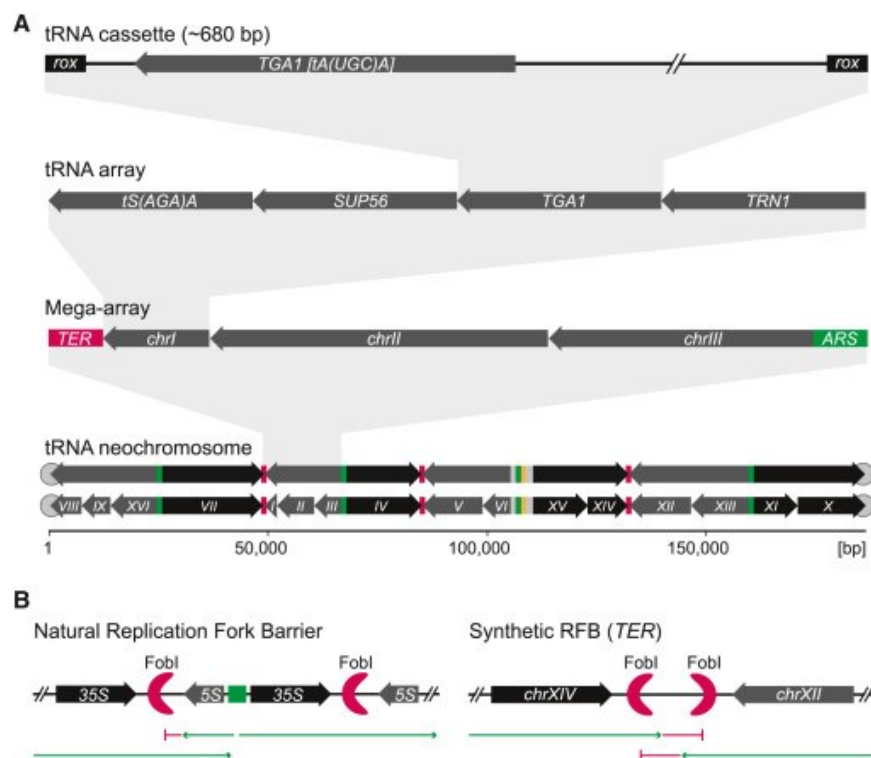
úpravy DNA ve všech měřítkách, tedy od odstraňování překryvů ORFs a struktury jednotlivých genů, přes jejich pořadí a směr až po úpravy samotných velkých makromolekul. Navíc by měly vykazovat tři základní vlastnosti, a to téměř wild-type fitness, odstranění nestabilních genomových prvků jako jsou redundantní tRNA sekvence nebo transpozony a nakonec dostatečnou flexibilitu v genomu umožňující další návazné studie (Dymond et al., 2011). Mezi takové studie prováděné na syntetických chromozomech lze zařadit například analýza stability chromozomu synIII v diploidních kmenech s jedním nativním chromozomem při indukci systému SCRaMbLE a vliv této stability na párovací typ (Annaluru et al., 2014).

Syntetické chromozomy se mohou vyskytovat jako samostatné kruhové molekuly, nebo lineární fragmenty integrované do zkráceného nativního chromozomu (Dymond et al., 2011). Při nahrazení nativních sekvencí je většinou účelem větší manipulovatelnost s výsledným transformantem, například nahrazení TAG kodonů za TAA (uvolnění jednoho kodonu pro případné využití netradiční aminokyseliny) nebo integraci kontrolních PCRTagů pro ověření úspěšnosti. Prvním příkladem takovéto integrace zcela uměle vytvořeného chromozomu byl syntetický synIXR a semi-synVI, tedy plně umělé pravé rameno chromozomu IX a částečně nativní VI s integrovaným syntetickým ramenem (Dymond et al., 2011). Cirkulární synIXR se v kvasince udržoval jako součást výše popsaného BAC/YAC plazmidu, zatímco lineární semi-synVI byl integrován do nativního chromozomu VI po stříhu přes lineární molekulu DNA (Dymond et al., 2011).

Pro správnou funkci buňky bylo potřeba vystříhnout nativní pravé rameno chromozomu IX a nahradit ho fragmentem obsahujícím *URA3* marker. Takto zkrácený chromozom se nazývá IX $\Delta$ R a vzhledem k tomu, že je zkrácen o důležité geny, je pro přežití potomků nutné, aby obsahovali jak synIXR, tak IX $\Delta$ R. Tento chromozom byl zvolen jakožto nejmenší rameno v celém genomu *S. cerevisiae*. Pro integraci do chromozomu VI byl použit syntetický lineární fragment obsahující marker *LEU2* (Dymond et al., 2011). V nově designovaném 89,3kbp dlouhém synIXR bylo pozměněno 2,64% původní sekvence a změny zahrnovaly kromě nahrazení kodonu TAG a PCR tagů i 43 míst lox-Psym pro rekombinaci místně specifickou rekombinázou Cre. Jedná se o varianty LoxP míst s pozměněnými sekvencemi, kdy Cre rekombinuje vždy mezi identickými loxPsym místy ale nikoli mezi sekvencně odlišnými. Tato místa tvoří fragmenty s přesahy v obou orientacích a po indukci Cre rekombinázy mohou produkovat inverze. Tato restriční místa jsou zásadní pro systém SCRaMbLE schopný produkovat velké množství potomků s odlišným pořadím nebo orientací jednotlivých

fragmentů (Dymond et al., 2011). SCRaMbLE systém je dnes důležitým nástrojem pro analýzu funkcí genomu v projektu Sc 2.0 popsaném v další kapitole.

Vrcholným úsilím kvasinkové syntetické biologie v oblasti syntetických genomů je design a tvorba takzvaných neochromozomů, tedy chromozomů bez nativní předlohy. Na takový konstrukt je možno přemístit libovolné geny za účelem jednoduššího průzkumu jejich funkcí či regulace. Příkladem takového projektu je design neochromozomu obsahujícího veškeré geny pro transferovou RNA (Schindler et al., 2023). Design tohoto nového chromozomu vyžaduje hierarchické uspořádání jednotlivých komponentů, které se v principu

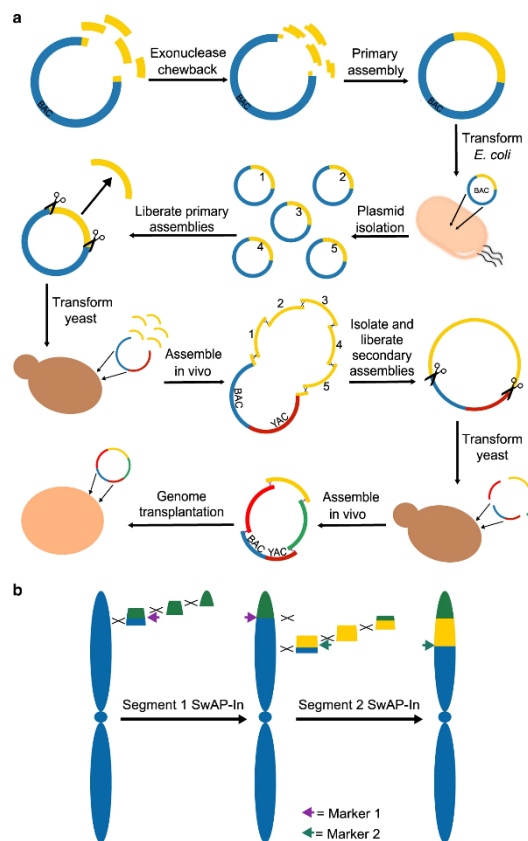


Obrázek 8- (a) Hierarchická organizace tRNA neochromozomu. Základní částí je necelých 700bp dlouhá tRNA kazeta. Několik kazet je sestaveno do tRNA arrays ve stejném směru. Několik arrays tvoří Mega-array sdružující geny z jednotlivých chromozomů. Dole je znázorněna struktura kompletního neochromozomu. (b) Vlevo struktura nativního terminátoru fungujícího jen z jedné strany, vpravo synteticky designovaný terminátor fungující oboustranně. (Schindler et al., 2023)

příliš neliší od sestavování Level 2 multigenových konstruktů v MoClo. Nejmenším prvkem je cca 680bp dlouhá kazeta obsahující na okrajích rox místa rozeznávaná rekombinázou Cre, specifické 5' a 3' koncové sekvence a samotný gen kódující tRNA (Schindler et al., 2023). Jednotlivé tRNA kazety jsou následně poskládány do šestnácti tRNA kazet, nesoucích geny pro tRNA původně sídlící na společném chromozomu. Nejvyšší strukturální jednotkou v hierarchii

je mega-array složené až ze tří kazet, které jsou složeny tandemově, transkribují se tedy stejným směrem (Schindler et al., 2023).

Výsledný neochromozom vzniká systémem eSwAP-In tedy extrachromosomal Switching Auxotrophies Progressively by Integration (Schindler et al., 2023). Tento systém spočívá v postupné integraci jednotlivých tRNA kazet s auxotrofním markerem umožňujícím selekci buněk s úspěšnou integrací do nosného vektoru (ten obsahuje centromerickou oblast *CEN6* a kvasinkový počátek replikace *ARSH4* spolu s prvním markerem). Mezi kroky se markery vyměňují a umožňují selektovat pro postupně rostoucí nový chromozom (Schindler et al., 2023). Konečným stádiem konstrukce je linearizace kompletního chromozomu, což mu dodá stejnou strukturu jakou mají nativní chromozomy *S. cerevisiae*. Tento krok byl proveden systémem Telomerator (Schindler et al., 2023). Výsledkem celého projektu je stabilně se udržující nový chromozom, který ale v následných testech vykazoval mezi koloniemi vysokou variabilitu ve struktuře, s přítomností mnohých inverzí i delecí (Schindler et al., 2023).



Obrázek 9- Konstrukce syntetických chromozomů. (a) Postup při sestavování cirkulárního chromozomu z fragmentů DNA a BAC/YAC vektoru. (b) Nahrazování nativních sekvencí syntetickými metodou SwAP-in. Převzato z (Coradini et al., 2020)

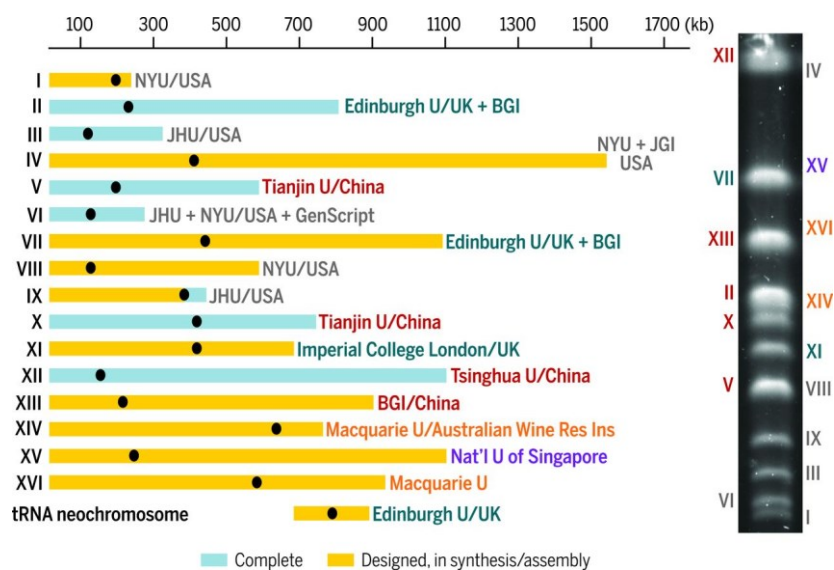
Neochromozomy ale nemusí nést nutně jenom reorganizovanou DNA z nativních chromozomů. Lze je také využít jako potenciální nositele velkého množství exogenní DNA tak,

aby se stabilně udržovala v kvasince. Z části pro tento účel slouží například lineární neochromozom založený svým obsahem na levém rameni chromozomu XII (ChrXII). Tento syntetický neochromozom obsahuje URR, tedy univerzální rekombinační regiony o délce 500bp sloužící jako integrační místa pro velké segmenty exogenní DNA (Jiang et al., 2023).

Všechny výše zmíněné protokoly, od přeskládání nativních částí chromozomů do nového celku, přes nahrazování původních chromozomů svými upravenými a optimalizovanými verzemi, až po konstrukci zcela nových bezprecedentních chromozomů *de novo*, se zakládají na obrovské plasticitě genomu *S. cerevisiae* a dalších kvasinek. Tato plasticita, ze značné části způsobená robustním a aktivním systémem homologní rekombinace, dělá z kvasinek ideální model pro modifikaci a průzkum funkcí genů jak v samotných kvasinkách, tak v dalších eukaryotních organismech.

## 2.5 Optimalizace kvasinkového genomu, Sc 2.0

Metody konstrukce syntetických chromozomů popsané v minulé kapitole jsou kromě výzkumných projektů prozkoumávajících jejich funkce využívány v rámci velkého mezinárodního projektu zvaného Sc 2.0, neboli *Saccharomyces cerevisiae* 2.0. Z názvu je již patrné, že se jedná o novou, upravenou a optimalizovanou verzi této kvasinky. Hlavním cílem tohoto úsilí je tvorba *S. cerevisiae* s plně syntetickými chromozomy, a tím pádem dramaticky upraveným genomem. Finální verze Sc2.0 má genom zkrácený o 8% a obsahuje celkem 1,1Mbp změn v podobě inzercí, delecí nebo jiných úprav (Richardson et al., 2017). Za účelem tvorby Sc 2.0 bylo vytvořeno mezinárodní konsorcium výzkumným týmů, mezi které byla rozdělena konstrukce jednotlivých syntetických chromozomů. Výzkumné týmy pocházejí převážně z USA, Číny, Spojeného království a Austrálie (Richardson et al., 2017).



Obrázek 10- Syntetické chromozomy I-XVI a tRNA neochromozom, jejich relativní délky a týmy zodpovědné za jejich konstrukci. Vpravo záznam z elektroforézy. (Richardson et al., 2017)

Mezi elementy, které jsou v rámci projektu upravovány, patří většina intronů kromě těch obsažených v ribozomálních genech, transpozony, roztroušené geny se zvýšeným počtem kopií a subtelomerické oblasti chromozomů (Schindler et al., 2024). Další součásti genomu mohou být místo odstranění přesunuty na zcela nový neochromozom, viz kapitola 2.4. V rámci Sc 2.0



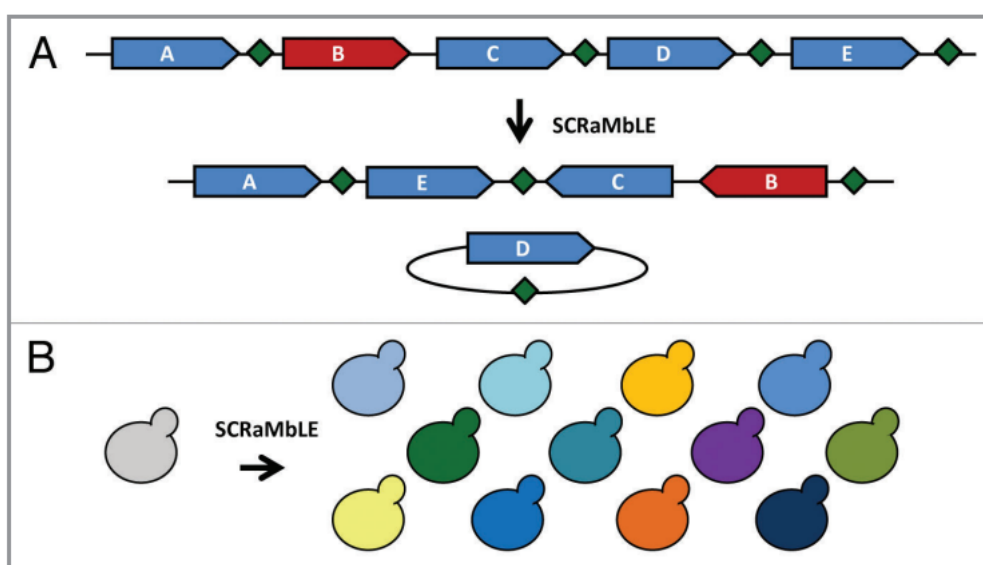
je tedy chromozomů celkem sedmnáct, a to šestnáct analogů k přirozeným kvasinkovým chromozomům a jeden neochromozom nesoucí geny kódující tRNA (Schindler et al., 2024).

V předešlé kapitole byly popsány některé možné protokoly sestavování jednotlivých syntetických chromozomů, ale konečným cílem Sc2.0 je kmen kvasinek s plně syntetickým genomem. Po úspěšném vytvoření kmenů s částečně syntetickým genomem dochází ke slučování těchto kmenů a tvorbě čím dál syntetičtějších kvasinek pomocí metody zvané „endoreduplication intercros“, která spočívá v destabilizaci nativních chromozomů předem integrovanou centromerou s indukibilním promotorem GAL6. Tato centromera po pěstování kvasinky na médiu s galaktózou nativní chromozomy destabilizuje a jejich potomstvo je poté hemizygotní. Tato destabilizace spočívá v zabránění sestavení kinetochoru, čímž je způsobena ztráta v potomstvu. Takto v jednom kmeni mohou být upraveny například i dva nativní chromozomy zároveň za vzniku genotypu  $2n-2$  (Richardson et al., 2017). Kvasinka je v případě aneuploidie schopna duplikace homologního chromozomu, čímž kompenzuje ztracenou genovou dózi. V případě Sc 2.0 je tento systém využit pro duplikaci nových syntetických chromozomů.

V první verzi endoreduplication intercros jsou dva semisyntetické kmeny (s jedním nativním a jedním syntetickým chromozomem) opačného párovacího typu zkříženy za vzniku kmene semisyntetického pro dva chromozomy. Následně je indukována ztráta nativního homologu a přes endoreduplikaci je doplněna kopie syntetického chromozomu za vzniku kompletní diploidní buňky s  $2n$  genomem (Schindler et al., 2024). Sporulací a dalšími procesy jsou získány finální  $1n$  haploidní kmeny. Novější verze je schopna přeskočit krok s  $2n$  buňkou pomocí tzv. chromoduction. V případě chromoduction dochází k páření buněk opačného párovacího typu bez fúzí jader, přičemž dochází k translokaci syntetického chromozomu do recipientní haploidní buňky za vzniku  $1n+1$  buňky, jejíž nativní homolog je destabilizován jako bylo popsáno výše (Zhao et al., 2023). Dnes je kmenem s největším podílem syntetického genomu kvasinka syn7.5, která nese více jak polovinu syntetické DNA (Zhao et al., 2023).

Kromě velkého milníku v oboru syntetické genomiky představují syntetické kmeny kvasinek ideálního kandidáta pro tvorbu ještě komplexnějších a hlouběji upravitelnějších expresních systémů. Pro urychlení tohoto procesu je významný již zmíněný systém SCRaMbLE, neboli Synthetic Chromosome Rearrangement and Modification by LoxPsym-mediated Evolution (přeskládání a modifikace syntetických chromozomů pomocí evoluce indukované přes LoxPsym). Základním kamenem tohoto systému jsou restriční místa položená těsně downstream od genů, která slouží jako záchytné body rozdělující sady genů.

Tato místa jsou 34bp dlouhá a symetrická, což umožňuje spojení s dalšími loxP místy v obou směrech (Wu et al., 2018). Po přidání Cre rekombinázy je možné indukovat velmi rychlou přestavbu celého genomu obsahující odchylky od původního genomu. Tímto způsobem, tedy zamícháním jednotlivými sety genů může docházet k delecím, inverzím, insercím a translokacím (Wu et al., 2018). SCRaMbLE je schopen vygenerovat v rámci jedné reakce značné množství rozdílných genotypů (viz Obrázek 9), na kterých lze provádět screening na žádoucí fenotypy. Mimo jiné je takto možné postupně tvořit minimalizovaný genom syntetické *S. cerevisiae* postupnou delecí čím dál většího množství genů (Dymond & Boeke, 2012).



Obrázek 11- (a) Schéma ukazuje schopnost systému SCRaMbLE reorganizovat segmenty DNA do různých pořadí a směrů. (b) Indukcí tohoto systému získáváme velké množství odlišných fenotypů, ze kterých můžeme vybírat vhodné kandidáty pro libovolnou aplikaci. (J. Dymond & Boeke, 2012)

Kromě nalézání nových technologických postupů pro syntetickou biologii a výzkumu funkcí genomu slouží již dnes částečně syntetické kmeny jako platforma pro optimalizaci biosyntetických vlastností a vnášení heterologních biochemických drah (Blount et al., 2018). Jako příklad lze uvést využití systému SCRaMbLE pro výrazné zvýšení produkce barviva violaceinu, která je podmíněna heterologní syntetickou dráhou pocházející z bakterie *Chromobacterium violaceum*. Po integraci celé biosyntetické dráhy pro toto barvivo do syntetického chromozomu V byl využit na systém SCRaMbLE. Mezi více jak osmdesáti vybranými transformanty byl identifikován jeden, který měl 2,3x zvýšenou produkci cílového violaceinu (Blount et al., 2018). Produkce velkého množství nových fenotypů je obrovskou

výhodou tohoto nástroje, ale zároveň může představovat překážku pro selekci optimálních fenotypů. Proto se v posledních letech pro systém SCRaMbLE vyvíjí automatické nástroje schopné screeningu až tisíců kolonií a jejich sekvenace. Takovéto nástroje, využívají sekvenačních protokolů nové generace, jako je nanopore sequencing, analytických procesů jako liquid chromatography- mass spektrometry (LC-MS) a automatické přípravy vzorků (Gowers et al., 2020). Automatizace tedy může dále zvýšit efektivitu systému.

Tímto náhodným promícháváním segmentů genomu lze teoreticky vysoce zvýšit produktivitu dalších složitých průmyslových produktů. Projekt Sc 2.0 se tím i ve svém nedokončeném stavu projevuje jako průmyslově relevantní úsilí s hmatatelnými výsledky.

## 2.6 Knihovny kmenů *S. cerevisiae*

V minulé kapitole byl zmíněn význam systému SCRaMbLE v přípravě knihoven kvasinkových kmenů s rozdílnými genotypy. Tento systém zrychlené indukované evoluce ale není jediným způsobem tvorby takovýchto kolekcí. Za účelem průzkumu funkcí genů bylo zkonstruováno několik velkých knihoven obsahujících tisíce kmenů *S. cerevisiae* s definovanými úpravami v genomu. Na základě těchto knihoven probíhá výzkum vzájemným porovnáváním fenotypů jednotlivých upravených populací. Projekty využívající těchto knihoven představují zásadní průlom v základním výzkumu kvasinek, neboť umožňují velmi rychle provádět srovnávací analýzu a identifikovat interakce jednotlivých elementů genomu. V této kapitole bude vyzdvíženo několik takovýchto knihoven a jejich relevance a využití.

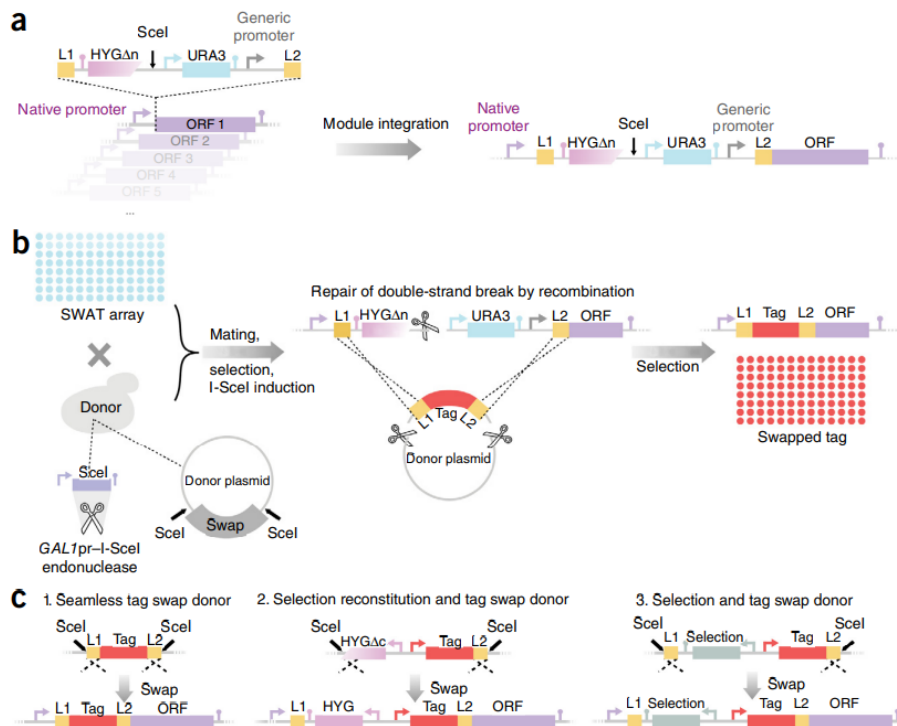
Knihovny mají několik typů na základě úprav pro jednotlivé geny. Mezi ně řadíme deleční knihovny (Giaever & Nislow, 2014), knihovny s geny s variabilní expresí (tedy sníženou či zvýšenou, under/overexpression) (Arita et al., 2021), knihovny s ORFs fúzovanými se značícím proteinem jako GFP nebo mCherry (Huh et al., 2003), či knihovny obsahující mutantní kmeny (Costanzo et al., 2016).

Jednou ze starších knihoven kmenů *S. cerevisiae* je Yeast Knock-Out kolekce, neboli YKO. V rámci knihovny je shromážděno přes 21 000 uměle připravených delečních mutantů (Giaever & Nislow, 2014). Knihovna vznikala už na přelomu tisíciletí a byla využita například při průlomových analýzách esenciálních a neesenciálních genů *S. cerevisiae*. Během analýz s přítomností stresových faktorů bylo například poprvé zjištěno, že 18.7% z prozkoumaných 5916 ORFs sekvencí je pro kvasinky esenciální a byly identifikovány geny esenciální za určitých stresových podmínek (Giaever et al., 2002). Delece v případě této knihovny probíhaly pomocí tzv delečních kazet obsahujících kromě selekčního markeru KanMX také dva „čárové kódy“ (barcodes) sloužící jako naváděcí sekvence k deletovanému genu. Při mitotické rekombinaci byl poté gen nahrazen touto integrační kazetou čímž vznikl deleční kmen (Wach et al., 1994). Kromě výzkumu esenciality genů se s pomocí této knihovny prováděly velké studie, kde probíhal screening fenotypů ve velkém měřítku. Tyto studie mimo jiné sledovaly vliv genů na buněčný růst, páření, sporulaci, membránový transport nebo přizpůsobení se stresovým faktorům (Giaever & Nislow, 2014).

Dalším typem knihoven jsou over/underexpression knihovny obsahující před některými geny umělé silnější nebo slabší promotory. Základní knihovny tohoto typu operují buď pod

promotorem fungujícím bez aktivačního stimulu, nebo pod inducibilním promotorem jako například GAL1, který je aktivován přidáním galaktózy do média bez glukózy. Pro ještě dynamičtější sledování aktivit promotorů je možné využít aktivační molekulu, která je jinak v kvasince inertní, ale její titr ovlivňuje aktivitu umělého promotoru (Arita et al., 2021). V případě využití posledního typu lze v krátké době analyzovat celé spektrum aktivit a jejich vliv na fenotyp kvasinek.

Konstrukce knihoven mutacijních kmenů je velice finančně a časově náročná, což je důvodem pro vývoj dalších nástrojů pro usnadnění jejich konstrukce. Jedním takovým nástrojem je SWAp-Tag strategie, která je založená na integraci takzvaného SWAP modulu do kvasinkového genomu. V rámci této knihovny určené ke konstrukci dalších knihoven je cca 1800 kmenů s integrovanými SWAP moduly před geny kódující proteiny lokalizované do kvasinkového systému membrán (Yofe et al., 2016). Z této otcovské knihovny lze vybrat kmen s integrovaným SWAP modulem na N nebo C konci ORF a nahradit ho pomocí endonukleázy I-SceI za cílový segment dodané DNA s 45bp oblastí homologie. Takto lze jednoduše tvořit nové knihovny kmenů označené různými značkami jak na počátku jejich sekvence, tak na jejich konci. Ve článku představujícím tento nástroj byl SWAp-Tag demonstrován na velmi rychlé konstrukci GFP značených kmenů (Yofe et al., 2016). Podobný systém, pokud by byl rozšířen i na další ORFs, by mohl sloužit jako revoluční nástroj pro zjednodušení tvorby knihoven kmenů se značkovými proteiny. Značené proteiny lze využít zejména k výzkumu lokalizace proteinů do různých buněčných oblastí či kompartmentů (Huh et al., 2003).



Obrázek 12- Strategie SWAP-Tag pro vyměňování původních tagů před ORFs za vlastní pro konstrukci knihoven (a) Tagging N-terminální domény proteinu pomocí markerů *HYGΔn* a *URA3*. Tag také obsahuje restrikční místo pro *I-SceI* a na okrajích disponuje generickými místy homologie, které mohou sloužit jako doména pro budoucí fúzi proteinů. (b) Konstrukce vlastní knihovny pomocí donorového plazmidu, který svým tagem nahradí ten původní integrovaný před ORF. (c) Různé typy donorových plazmidů umožňují import tagu v různých uspořádáních. (Yofe et al., 2016)

Celkově knihovny slouží jako nástroj zejména při screeningových studiích velkého měřítka. Na různě upravených kmenech lze studovat například esencialitu genů za různých podmínek, vliv léčiv na specifické genotypy kvasinek, vztahy genotypu k prostředí kvasinky, nebo teoreticky i testovat umělé biosyntetické dráhy a jejich vztahy ke genotypu hostující kvasinky.

### 3. Závěr a diskuze

Tato práce byla zaměřena na využití kvasinek, především druhu *Saccharomyces cerevisiae*, jako významného nástroje v oblasti syntetické biologie. Tento druh je, díky svým žádaným vlastnostem, jako je silná schopnost homologní rekombinace, vynikajícím modelem pro manipulaci s velkými molekulami DNA. V práci byly představeny různé techniky a nástroje, které umožňují efektivní tvorbu a využití kmenů kvasinek s modifikovaným genomem. Rovněž bylo diskutováno o protokolech jako je syntéza DNA *in vivo* v kvasinkách a konstrukce syntetických chromozomů, které výrazně posouvají možnosti genetické manipulace a výzkumu. Kromě samotných metod a nástrojů pro práci s *S. cerevisiae* byly představeny i průmyslové aplikace těchto systémů pro tvorbu modifikovaných kmenů produkujících významné medicínské produkty a jiné molekuly zájmu.

Přes všechny pokroky zůstávají v tomto rychle se rozvíjejícím oboru mnohé výzvy a otevřené otázky. Jedním probíhajících projektů je přepracování a optimalizace kvasinkového genomu, která může dále zlepšit efektivitu a stabilitu genetických modifikací. Dalším klíčovým směrem je vývoj a standardizace nových „toolkits“, které by umožnily ještě přesnější a rychlejší genetické úpravy. Výzkum v oblasti syntetické biologie kvasinek má i do budoucna obrovský potenciál v průmyslových aplikacích, jako je výroba biofarmaceutik, biopaliv a dalších hodnotných chemických látek.

Budoucí výzkum by měl pokračovat v hledání nových metod pro zlepšení přesnosti a efektivity genetických modifikací, stejně jako v rozšiřování aplikačních možností. Dalším krokem v designu kmenů kvasinek se syntetickým genomem může teoreticky být i konstrukce zcela nových biosyntetických drah či představení nových nástrojů otevírajících nové možnosti přestaveb a manipulací.

Je také důležité věnovat pozornost etickým otázkám a bezpečnosti geneticky modifikovaných organismů. Celkově lze očekávat, že s pokračujícím rozvojem technologií a metod bude význam kvasinek, a zejména *Saccharomyces cerevisiae*, v syntetické biologii nadále velký a bude přinášet nové možnosti pro základní výzkum i průmyslový pokrok.

## 4. Reference

- Agmon, N., Mitchell, L. A., Cai, Y., Ikushima, S., Chuang, J., Zheng, A., Choi, W.-J., Martin, J. A., Caravelli, K., Stracquadanio, G., & Boeke, J. D. (2015). Yeast Golden Gate (yGG) for the efficient assembly of *S. cerevisiae* transcription units. *ACS Synthetic Biology*, *4*(7), 853–859. <https://doi.org/10.1021/sb500372z>
- Annaluru, N., Muller, H., Mitchell, L. A., Ramalingam, S., Stracquadanio, G., Richardson, S. M., Dymond, J. S., Kuang, Z., Scheifele, L. Z., Cooper, E. M., Cai, Y., Zeller, K., Agmon, N., Han, J. S., Hadjithomas, M., Tullman, J., Caravelli, K., Cirelli, K., Guo, Z., ... Chandrasegaran, S. (2014). Total synthesis of a functional designer eukaryotic chromosome. *Science*, *344*(6179), 55–58. <https://doi.org/10.1126/science.1249252>
- Arita, Y., Kim, G., Li, Z., Friesen, H., Turco, G., Wang, R. Y., Climie, D., Usaj, M., Hotz, M., Stoops, E. H., Baryshnikova, A., Boone, C., Botstein, D., Andrews, B. J., & McIsaac, R. S. (2021). A genome-scale yeast library with inducible expression of individual genes. *Molecular Systems Biology*, *17*(6). <https://doi.org/10.15252/msb.202110207>
- Blount, B. A., Gowers, G.-O. F., Ho, J. C. H., Ledesma-Amaro, R., Jovicevic, D., McKiernan, R. M., Xie, Z. X., Li, B. Z., Yuan, Y. J., & Ellis, T. (2018). Rapid host strain improvement by in vivo rearrangement of a synthetic yeast chromosome. *Nature Communications*, *9*(1), 1932. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03143-w>
- Cakar, Z., Seker, U., Tamerler, C., Sonderegger, M., & Sauer, U. (2005). Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, *5*(6–7), 569–578. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.10.010>
- Casini, A., MacDonald, J. T., Jonghe, J. De, Christodoulou, G., Freemont, P. S., Baldwin, G. S., & Ellis, T. (2014). One-pot DNA construction for synthetic biology: the Modular Overlap-Directed Assembly with Linkers (MODAL) strategy. *Nucleic Acids Research*, *42*(1), e7–e7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt915>
- Chan, L. Y., Kosuri, S., & Endy, D. (2005). Refactoring bacteriophage T7. *Molecular Systems Biology*, *1*(1). <https://doi.org/10.1038/msb4100025>
- Coradini, A. L. V., Hull, C. B., & Ehrenreich, I. M. (2020). Building genomes to understand biology. *Nature Communications*, *11*(1), 6177. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19753-2>
- \*Coradini, A. L. V., Ne Ville, C., Krieger, Z. A., Roemer, J., Hull, C., Yang, S., Lusk, D. T., & Ehrenreich, I. M. (2023). Building synthetic chromosomes from natural DNA. *Nature Communications*, <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44112-2>
- Costanzo, M., VanderSluis, B., Koch, E. N., Baryshnikova, A., Pons, C., Tan, G., Wang, W., Usaj, M., Hanchard, J., Lee, S. D., Pelechano, V., Styles, E. B., Billmann, M., van Leeuwen, J., van Dyk, N., Lin, Z.-Y., Kuzmin, E., Nelson, J., Piotrowski, J. S., ... Boone, C. (2016). A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. *Science*, *353*(6306). <https://doi.org/10.1126/science.aaf1420>



- Dymond, J., & Boeke, J. (2012). The *Saccharomyces cerevisiae* SCRaMbLE system and genome minimization. *Bioengineered*, 3(3), 170–173. <https://doi.org/10.4161/bbug.19543>
- Dymond, J. S., Richardson, S. M., Coombes, C. E., Babatz, T., Muller, H., Annaluru, N., Blake, W. J., Schwerzmann, J. W., Dai, J., Lindstrom, D. L., Boeke, A. C., Gottschling, D. E., Chandrasegaran, S., Bader, J. S., & Boeke, J. D. (2011). Synthetic chromosome arms function in yeast and generate phenotypic diversity by design. *Nature*, 477(7365), 471–476. <https://doi.org/10.1038/nature10403>
- Eckert-Boulet, N., Rothstein, R., & Lisby, M. (2011). Cell Biology of Homologous Recombination in Yeast. *Methods Molecular Biology*, 745: 523–536. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-129-1\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-129-1_30)
- Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J. L., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2009). Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-17>
- Fredens, J., Wang, K., de la Torre, D., Funke, L. F. H., Robertson, W. E., Christova, Y., Chia, T., Schmied, W. H., Dunkelmann, D. L., Beránek, V., Uttamapinant, C., Llamazares, A. G., Elliott, T. S., & Chin, J. W. (2019). Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome. *Nature*, 569(7757), 514–518. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1192-5>
- Galanie, S., Thodey, K., Trenchard, I. J., Filsinger Interrante, M., & Smolke, C. D. (2015). Complete biosynthesis of opioids in yeast. *Science*, 349(6252), 1095–1100. <https://doi.org/10.1126/science.aac9373>
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., ... Johnston, M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature*, 418(6896), 387–391. <https://doi.org/10.1038/nature00935>
- Giaever, G., & Nislow, C. (2014). The Yeast Deletion Collection: A Decade of Functional Genomics. *Genetics*, 197(2), 451–465. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.161620>
- Gibson, D. G., Benders, G. A., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Baden-Tillson, H., Zaveri, J., Stockwell, T. B., Brownley, A., Thomas, D. W., Algire, M. A., Merryman, C., Young, L., Noskov, V. N., Glass, J. I., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2008). Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*, 319(5867), 1215–1220. <https://doi.org/10.1126/science.1151721>
- Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R.-Y., Algire, M. A., Benders, G. A., Montague, M. G., Ma, L., Moodie, M. M., Merryman, C., Vashee, S., Krishnakumar, R., Assad-Garcia, N., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Young, L., Qi, Z.-Q., Segall-Shapiro, T. H., ... Venter, J. C. (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 329(5987), 52–56. <https://doi.org/10.1126/science.1190719>

- Goeddel, D. V, Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., & Riggs, A. D. (1979). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(1), 106–110. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.106>
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, *274*(5287), 546–567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>
- Gowers, G.-O. F., Chee, S. M., Bell, D., Suckling, L., Kern, M., Tew, D., McClymont, D. W., & Ellis, T. (2020). Improved betulinic acid biosynthesis using synthetic yeast chromosome recombination and semi-automated rapid LC-MS screening. *Nature Communications*, *11*(1), 868. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14708-z>
- Guo, Y., Dong, J., Zhou, T., Auxillos, J., Li, T., Zhang, W., Wang, L., Shen, Y., Luo, Y., Zheng, Y., Lin, J., Chen, G. Q., Wu, Q., Cai, Y., & Dai, J. (2015). YeastFab: the design and construction of standard biological parts for metabolic engineering in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, *43*(13), e88–e88. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV464>
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-Martins, I., & Gorwa-Grauslund, M. F. (2007). Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *74*(5), 937–953. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0827-2>
- Huh, W.-K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., & O’Shea, E. K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, *425*(6959), 686–691. <https://doi.org/10.1038/nature02026>
- Ira, G., & Haber, J. E. (2002). Characterization of RAD51 -Independent Break-Induced Replication that acts preferentially with short homologous sequences. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(18), 6384–6392. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.18.6384-6392.2002>
- Jiang, S., Luo, Z., Wu, J., Yu, K., Zhao, S., Cai, Z., Yu, W., Wang, H., Cheng, L., Liang, Z., Gao, H., Monti, M., Schindler, D., Huang, L., Zeng, C., Zhang, W., Zhou, C., Tang, Y., Li, T., ... Dai, J. (2023). Building a eukaryotic chromosome arm by de novo design and synthesis. *Nature Communications*, *14*(1), 7886. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43531-5>
- Keasling, J. D. (2010). Manufacturing Molecules Through Metabolic Engineering. *Science*, *330*(6009), 1355–1358. <https://doi.org/10.1126/science.1193990>
- Kim, I.-K., Roldão, A., Siewers, V., & Nielsen, J. (2012). A systems-level approach for metabolic engineering of yeast cell factories. *FEMS Yeast Research*, *12*(2), 228–248. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00779.x>
- Lee, K., Hong, M., Jung, S., Ha, S., Yu, B. J., Koo, H. M., Park, S. M., Seo, J., Kweon, D., Park, J. C., & Jin, Y. (2011). Improved galactose fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* through inverse metabolic engineering. *Biotechnology and Bioengineering*, *108*(3), 621–631. <https://doi.org/10.1002/bit.22988>

- Lee, M. E., Deloache, W. C., Cervantes, B., & Dueber, J. E. (2015). A highly characterized Yeast Toolkit for modular, multipart assembly. *ACS Synthetic Biology*, 4(9), 975–986 <https://doi.org/10.1021/sb500366v>
- Liu, E., & Hu, Y. (2010). Construction of a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain by combined approaches of genetic engineering, chemical mutagenesis and evolutionary adaptation. *Biochemical Engineering Journal*, 48(2), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.10.011>
- Liu, X., Cheng, J., Zhang, G., Ding, W., Duan, L., Yang, J., Kui, L., Cheng, X., Ruan, J., Fan, W., Chen, J., Long, G., Zhao, Y., Cai, J., Wang, W., Ma, Y., Dong, Y., Yang, S., & Jiang, H. (2018). Engineering yeast for the production of breviscapine by genomic analysis and synthetic biology approaches. *Nature Communications*, 9(1), 448. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02883-z>
- \*Malci, K., Watts, E., Roberts, T. M., Auxillos, J. Y., Nowrouzi, B., Boll, H. O., Nascimento, C. Z. S. do, Andreou, A., Vegh, P., Donovan, S., Fragkoudis, R., Panke, S., Wallace, E., Elfick, A., & Rios-Solis, L. (2022). Standardization of synthetic biology tools and assembly methods for *Saccharomyces cerevisiae* and emerging yeast species. *ACS Synthetic Biology*, 11(8), 2527–2547. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00442>
- Ostrov, N., Landon, M., Guell, M., Kuznetsov, G., Teramoto, J., Cervantes, N., Zhou, M., Singh, K., Napolitano, M. G., Moosburner, M., Shrock, E., Pruitt, B. W., Conway, N., Goodman, D. B., Gardner, C. L., Tyree, G., Gonzales, A., Wanner, B. L., Norville, J. E., ... Church, G. M. (2016). Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome. *Science*, 353(6301), 819–822. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3639>
- Otto, M., Skrekas, C., Gossing, M., Gustafsson, J., Siewers, V., & David, F. (2021). Expansion of the yeast Modular Cloning Toolkit for CRISPR-based applications, genomic integrations and combinatorial libraries. *ACS Synthetic Biology*, 10(12), 3461–3474. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00408>
- Pérez-González, A., Kniewel, R., Veldhuizen, M., Verma, H. K., Navarro-Rodríguez, M., Rubio, L. M., & Caro, E. (2017). Adaptation of the GoldenBraid modular cloning system and creation of a toolkit for the expression of heterologous proteins in yeast mitochondria. *BMC Biotechnology*, 17(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0393-y>
- Prather, K. L. J., & Martin, C. H. (2008). De novo biosynthetic pathways: rational design of microbial chemical factories. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(5), 468–474. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.07.009>
- Rebatchouk, D., Daraselia, N., & Narita, J. O. (1996). NOMAD: a versatile strategy for in vitro DNA manipulation applied to promoter analysis and vector design. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), 10891–10896. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.10891>
- Richardson, S. M., Mitchell, L. A., Stracquadanio, G., Yang, K., Dymond, J. S., DiCarlo, J. E., Lee, D., Huang, C. L. V., Chandrasegaran, S., Cai, Y., Boeke, J. D., & Bader, J. S. (2017). Design of a synthetic yeast genome. *Science*, 355(6329), 1040–1044. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4557>

- Riggs, A. D. (2021). Making, cloning, and the expression of human insulin genes in bacteria: the path to humulin. *Endocrine Reviews*, 42(3), 374. <https://doi.org/10.1210/ENDREV/BNAA029>
- Sanchez-Garcia, L., Martín, L., Mangues, R., Ferrer-Miralles, N., Vázquez, E., & Villaverde, A. (2016). Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microbial Cell Factories*, 15, 33. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0437-3>
- \*Schindler, D., Walker, R. S. K., & Cai, Y. (2024). Methodological advances enabled by the construction of a synthetic yeast genome. *Cell Reports Methods*, 4(4), 100761. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2024.100761>
- Schindler, D., Walker, R. S. K., Steinmetz, L. M., Boeke, J. D., & Cai Correspondence, Y. (2023). Design, construction, and functional characterization of a tRNA neochromosome in yeast. *Cell*, 186(24), 5237-5253. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.10.015>
- Schneider, M., Fresenborg, L., & Schadeweg, V. (2012). Yeast BioBrick Assembly (YBA) Standardized method for vector assembly of BioBrick devices via homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. In *iGEM*.
- Shaw, W. M., Khalil, A. S., & Ellis, T. (2023). A multiplex MoClo toolkit for extensive and flexible engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, 12(11), 3393–3405. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.3c00423>
- Symington, L. S. (2002). Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(4), 630–670. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.4.630-670.2002>
- Venetz, J. E., Del Medico, L., Wölfle, A., Schächle, P., Bucher, Y., Appert, D., Tschan, F., Flores-Tinoco, C. E., van Kooten, M., Guennoun, R., Deutsch, S., Christen, M., & Christen, B. (2019). Chemical synthesis rewriting of a bacterial genome to achieve design flexibility and biological functionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(16), 8070–8079. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818259116>
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R., & Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10(13), 1793–1808. <https://doi.org/10.1002/yea.320101310>
- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., & Marillonnet, S. (2011). A Modular Cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PLoS ONE*, 6(2), e16765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>
- Wu, Y., Zhu, R.-Y., Mitchell, L. A., Ma, L., Liu, R., Zhao, M., Jia, B., Xu, H., Li, Y.-X., Yang, Z.-M., Ma, Y., Li, X., Liu, H., Liu, D., Xiao, W.-H., Zhou, X., Li, B.-Z., Yuan, Y.-J., & Boeke, J. D. (2018). In vitro DNA SCRaMbLE. *Nature Communications*, 9(1), 1935. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03743-6>
- Yofe, I., Weill, U., Meurer, M., Chuartzman, S., Zalckvar, E., Goldman, O., Ben-Dor, S., Schütze, C., Wiedemann, N., Knop, M., Khmelinskii, A., & Schuldiner, M. (2016). One library to make them all: streamlining the creation of yeast libraries via a SWAp-Tag strategy. *Nature Methods*, 13(4), 371–378. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3795>

Zhao, Y., Coelho, C., Hughes, A. L., Lazar-Stefanita, L., Yang, S., Brooks, A. N., Walker, R. S. K., Zhang, W., Lauer, S., Hernandez, C., Cai, J., Mitchell, L. A., Agmon, N., Shen, Y., Sall, J., Fanfani, V., Jalan, A., Rivera, J., Liang, F.-X., ... Boeke, J. D. (2023). Debugging and consolidating multiple synthetic chromosomes reveals combinatorial genetic interactions. *Cell*, 186(24), 5220-5236.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.09.025>