

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Klonování, exprese a purifikace AMP-deaminasy
z kvasinek**

Autor:	Bc. Vendula Kajnarová
Studijní program:	M1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Hana Pospíšilová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	23. 4. 2012

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 17. 4. 2012

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce paní Mgr. Haně Pospíšilové, Ph.D. za věnovaný čas, cenné rady, všestrannou pomoc a odborné vedení při tvorbě této diplomové práce. Poděkování patří také paní Mgr. Martě Greplové, Ph.D. za instruktáž k metodice imunoblotu a celému kolektivu Oddělení molekulární biologie za ochotu kdykoli poradit nebo pomoci.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Bc. Vendula Kajnarová
Název práce	Klonování, exprese a purifikace AMP-deaminasy z kvasinek
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Hana Pospíšilová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2012
Abstrakt	<p>Díky genetickému a proteinovému inženýrství, které využívají rekombinantní technologie je dnes možné produkovat komerčně významné proteiny. Tyto proteiny jsou poté využívány v různých oblastech průmyslu, medicíny a zemědělství.</p> <p>AMP-deaminasa je enzym s homotetramerní strukturou, katalyzující hydrolýzu adenosinmonofosfátu na inosinmonofosfát a amoniak. Je jedním z klíčových enzymů regulace hladin purinových nukleotidů. V současnosti je spousta nově vyvíjených léčiv syntetizována na bázi purinů. Některé syntetické deriváty cytokininů (N⁶-substituované deriváty adeninu) jsou specifickými inhibitory regulačních proteinů buněčného cyklu. Příkladem je olomoucín, roskovitin nebo bohemin, které mají protinádorové účinky a jsou využívány jako léčiva proti rakovině. Vzhledem k podobnosti kvasinkové a savčí AMP-deaminasy by bylo možné získat základní data o tom, zda tento enzym má schopnost tato léčiva odbourávat či ne. Bylo prokázáno, že lidská adenosindeaminasa některá tato léčiva odbourává. Tyto znalosti by mohly sloužit k přípravě derivátů léčiv, které by touto skupinou enzymů degradovány nebyly.</p> <p>Tato diplomová práce navazuje na bakalářskou práci „Příprava plazmidových konstruktů pro integraci AMP-deaminasy do kvasinek“, kde byly připraveny tři plazmidové konstrukty s geny AMP-deaminas pro vnesení do kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nebo <i>Pichia pastoris</i>. Jedná se o konstrukty pDR197 s genem <i>AMD1</i> pro kultivaci a expresi v <i>S. cerevisiae</i>, pGAPZα A s genem <i>SPBC106.04</i> a pPICZ A taktéž s genem <i>SPBC106.04</i> pro kultivaci a expresi v <i>P. pastoris</i>. Gen <i>AMD1</i> pochází z <i>S. cerevisiae</i>, gen <i>SPBC106.04</i> z <i>S. pombe</i>.</p> <p>V experimentální části této práce byla zkoumána integrace výše zmíněných genů AMP-deaminas do uvedených kvasinek, exprese AMP-deaminasy v kvasinkách a relativní specifická aktivita daného proteinu v hrubém lyzátu buněk.</p>
Klíčová slova	AMP-deaminasa, <i>P. pastoris</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> , rekombinantní protein
Počet stran	99
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc. Vendula Kajnarová
Title	Cloning, expression and purification of AMP deaminase from yeast
Type of thesis	Master
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Mgr. Hana Pospíšilová, Ph.D.
The year of presentation	2012
Abstrakt	<p>Thanks to the genetic and protein engineering that use the recombinant technology, production of commercially important proteins is now possible. These proteins are then used in various industrial areas, medicine and agriculture.</p> <p>AMP-deaminase is an enzyme with homotetramer structure which specifically catalyzes the hydrolysis of adenosine monophosphate to products inosin monophosphate and ammonia. It is one of the key enzymes regulating the levels of purine nucleotides. In these days, synthesis of many novel drugs is derived from structure of purines. Some synthetic derivatives of cytokinins (N⁶-substituted adenine derivatives) are specific inhibitors of cell cycle regulatory proteins. An example is olomoucine, roscovitine or bohemine that have anticancer effects and that are used as drugs against cancer. Given the similarity between yeast and mammalian AMP deaminase, basic data on whether this enzyme has the ability to degrade these drugs or not could be obtained. It has been shown that human adenosin deaminase degrades some of these drugs. This knowledge could be used for preparation of suitable drug derivatives.</p> <p>This diploma work is based on bachelor thesis, "Preparation of plasmid constructs for the integration of AMP deaminase in yeast", where were prepared three plasmid constructs with AMP deaminase genes for insertion into the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> or <i>Pichia pastoris</i>. It is construct pDR197 with gene <i>AMD1</i> for cultivation and expression in <i>S. cerevisiae</i>, pGAPZα A with gene <i>SPBC106.04</i> and pPICZ A also with gene <i>SPBC106.04</i> for cultivation and expression in <i>P. pastoris</i>. <i>AMD1</i> gene originates from <i>S. cerevisiae</i>, <i>SPBC106.04</i> gene originates from <i>S. pombe</i>.</p> <p>In the experimental part of this work, integration of the above mentioned AMP deaminase genes in these yeast, expression of AMP deaminase in yeast and the relative specific activity of the protein in crude cell lysate were studied.</p>
Keywords	AMP deaminase, <i>P. pastoris</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. pombe</i> , rekombinant protein
Number of pages	99
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

Cíle práce.....	7
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
1.1 REKOMBINANTNÍ PROTEINY A JEJICH PRODUKCE.....	8
1.1.1 Úvod.....	8
1.1.2 Historie produkce enzymů.....	9
1.1.3 Různorodost expresních systémů pro produkci rekombinantních proteinů....	12
1.2 KVASINKY JAKO „TOVÁRNÝ“ NA PROTEINY	
Vlastnosti a biotechnologické využití kvasinek se zaměřením na :	
<i>S. cerevisiae</i> , <i>P. pastoris</i> a <i>S. pombe</i>	13
1.2.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
1.2.2 <i>Pichia pastoris</i>	20
1.2.3 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	25
1.3 AMP-deaminasa.....	27
1.3.1 Kvasinková AMP-deaminasa.....	28
1.3.2 Paralela v <i>E. coli</i> jako zástupce prokaryot - AMP-nukleosidasa.....	32
1.3.3 Substráty, aktivátory a inhibitory AMP-deaminas kvasinek.....	33
1.3.4 Srovnání kódujících sekvencí DNA AMP-deaminas kvasinek a mikroskopických houbových mikroorganismů.....	34
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
2.1 MATERIÁL.....	37
2.1.1 Použité mikroorganismy a plazmidové konstrukty.....	37
2.1.2 Komerční kity a software.....	37
2.1.3 Enzymy.....	37
2.1.4 Chemikálie.....	38
2.1.5 Přístrojové vybavení.....	39
2.2 METODY.....	41
2.2.1 Složení a příprava kultivačních médií.....	41
2.2.2 Příprava elektrokompetentních buněk <i>Pichia pastoris</i> X33.....	44
2.2.3 Izolace DNA.....	44
2.2.3.1 Izolace plazmidové DNA (pDR197 + <i>AMD1</i>) z kvasinek.....	44
2.2.3.2 Izolace plazmidové DNA z TOP10 buněk <i>E. coli</i>	45
2.2.3.3 Izolace genomové DNA z kvasinek.....	46
2.2.4 Izolace kvasinkové RNA.....	47

2.2.5	Syntéza cDNA.....	48
2.2.6	Ověření přítomnosti vnášeného genu <i>SPBC106.04</i> pomocí PCR.....	48
2.2.7	Štěpení restrikčními endonukleasami.....	50
2.2.7.1	Restrikční analýza DNA.....	50
2.2.7.2	Linearizace plazmidu.....	50
2.2.8	Transformace.....	51
2.2.8.1	Elektroporace.....	51
2.2.8.1.1	Elektroporace kvasinek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 23344c ura ⁻	51
2.2.8.1.2	Elektroporace kvasinek <i>P. pastoris</i> X33.....	52
2.2.8.2	Metoda „heat shock“.....	52
2.2.9	Kultivace.....	53
2.2.10	Určení Mut ⁺ nebo Mut ^S transformantů.....	54
2.2.11	Izolace proteinů.....	55
2.2.11.1	Příprava hrubého extraktu.....	55
2.2.11.2	Purifikace pomocí Ni-NTA agarosy.....	55
2.2.12	Stanovení koncentrace proteinů.....	56
2.2.13	Elektroforetická separace nukleových kyselin v agarosovém gelu.....	57
2.2.14	SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS).....	57
2.2.15	Barvení Coomassie Brilliant Blue R-250.....	59
2.2.16	Barvení stříbrem.....	59
2.2.17	Imunoblot (Western blot).....	59
2.2.17.1	Blotování.....	59
2.2.17.2	Imunodetekce.....	59
2.2.18	Měření aktivity proteinu.....	61
2.3	VÝSLEDKY.....	62
2.3.1	AMP-deaminasa <i>S. cerevisiae</i> (pDR197 + <i>AMD1</i>).....	62
2.3.2	AMP-deaminasa <i>S. pombe</i> (pPICZ A + <i>SPBC106.04</i>).....	65
2.3.3	AMP-deaminasa <i>S. pombe</i> (pGAPZα A + <i>SPBC106.04</i>).....	71
2.4	DISKUSE.....	76
3.	ZÁVĚR.....	81
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	83
	SEZNAM ZKRATEK.....	99

Cíle práce

- Vypracování literární rešerše zaměřené zejména na kvasinkové AMP deaminasy, rekombinantní proteiny a jejich expresi v dostupných hostitelích a kvasinky jako nejběžnější hostitele se zaměřením na *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* a *Pichia pastoris*.
- Vnesení připravených plazmidových konstruktů do kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* 23344c *ura⁻* (pDR197 + *AMD1*) a *Pichia pastoris* X33 (pPICZ A + *SPBC106.04* a pGAPZ α A + *SPBC106.04*).
- Ověření aktivity *AMD1* v kvasinkovém lyzátu *S. cerevisiae*.
- Ověření aktivity *SPBC106.04* v kvasinkovém lyzátu *P. pastoris* a purifikace AMP-deaminas pomocí Ni-NTA.
- Stanovení relativní specifické aktivity AMP-deaminasy *AMD1* a *SPBC106.04*.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 REKOMBINANTNÍ PROTEINY A JEJICH PRODUKCE

1.1.1 Úvod

Proteiny – základní stavební kameny života, jsou syntetizovány všemi živými organismy jako součást přirozeného metabolismu. Jedná se o vysokomolekulární přírodní látky (biopolymery) složené z aminokyselin relativní molekulové hmotnosti 10^3 až 10^6 Da. Svými vlastnostmi se mnohé bílkoviny navzájem liší, především podle toho, jakou úlohu v organismu zastávají. Biologická funkce bílkovin je velmi rozmanitá. Některé jsou stavebním materiálem tkání, orgánů, vlasů, chlupů, nehtů, rohů atd. (např. kolagen, elastin, keratin), další zastávají funkci transportní a skladovací (např. hemoglobin, transferin), jiné zajišťují pohyb (např. aktin, myosin), mají ochranné a obranné funkce (např. imunoglobulin, fibrin, fibrinogen), katalyzují, řídí a regulují biochemické pochody (např. enzymy jsou biokatalyzátory zvyšující rychlost metabolických reakcí, které hrají důležitou roli hlavně během mikrobiální tvorby antibiotik a dalších sekundárních metabolitů. Dále např. hormony a receptory, účastníci se buněčné signalizace). Proteiny mají stěžejní význam v imunitních odpovědích, adhezi buněk a buněčném cyklu (Demain & Vaishnav, 2009; Mareček & Honza, 2005).

Rekombinantní DNA technologie představuje v genovém inženýrství postup, při němž jsou z buněk izolovány jednoduché geny, které jsou poté zaváděny zpět do buněk organismu buď stejného nebo odlišného druhu. Pod pojmem rekombinantní DNA technologie si nelze představit jeden konkrétní postup – jde o společné označení biotechnologických postupů, které dohromady umožňují vytvářet nové kombinace molekul deoxyribonukleových kyselin (DNA), které se v přirozeném organismu společně nevyskytují (Brown, 2006; Murray et al., 2002).

V současnosti jsou díky genetickému a proteinovému inženýrství produkovány v průmyslu komerčně významné proteiny. Nativní a rekombinantní proteiny jsou důležité hlavně v oblasti biofarmaceutického průmyslu, průmyslu enzymů a zemědělském průmyslu, kde se uplatňují v medicíně, diagnostice, potravinářství, výživě, detergentech, textilu, výrobě papíru, kůže, dřevě, polymerů, plastických hmot aj. V r. 1796 byla produkována Jennerem první proteinová vakcína, a to vakcína proti pravým neštovicím.

Průmyslová mikrobiální fermentace se zrodila na počátku 20. století, kdy poprvé započala ve velkém měřítku anaerobní fermentace pro výrobu chemikálií jako je aceton a buthanol, následovaná aerobní produkcí kyseliny citronové. Prvním farmaceuticky produkováným proteinem byl insulin, který v r. 1922 vyrobili pánové

Banting a Best. Penicilin byl objeven v r. 1927, ale tento objev se projevil až začátkem 40. let 20. století. Éra moderní biotechnologie začala v r. 1971 založením společnosti Cetus Corporation v Kalifornii, přibližně jeden až dva roky před objevení rekombinantní DNA. V následujících pěti letech vznikly další společnosti, jako například Genentech, Amgen, Biogen aj.

Do r. 2002 bylo vyvinuto biofarmaceutickými firmami přes 155 schválených léčiv a vakcín. Dnes je na listině Food and Drug Agency (FDA) schválených více než 200 pouze peptidových a proteinových léčiv.

Příkladem rekombinantních proteinových farmaceutických léčiv je lidský insulin, albumin, lidský růstový hormon (HGH), faktor VIII a mnoho dalších. Díky těmto proteinům biofarmaceutický průmysl pomohl radikálně zlepšit péči o lidské zdraví. Mezi konkrétní přínosy medicíně patří mimo jiné:

- Léčba pacientů s cukrovkou.
Podávání rekombinantních proteinů nahradilo užívání zvířecího insulinu.
- Léčba dětských pacientů s nedostatkem růstového hormonu.
Užívání proteinů minimalizuje mimo jiné riziko nákazy Kreutzfeld-Jacobovým syndromem.
- Léčba dětských pacientů s chronickou granulomatózní chorobou.
Děti mohou vést normální život díky gamma interferonové terapii.
- Léčba pacientů s rakovinou.
Pacienti s rakovinou podstupující chemoterapii nebo radioterapii se díky podávání rekombinantních proteinů zotavují rychleji a s menším rizikem nákazy infekcemi, než při léčbě založené na G-CSF (granulocyte colony – stimulating factor) (Demain & Vaishnav, 2009).

1.1.2 Historie produkce enzymů

V 70. letech 20. století byla většina využívaných enzymů získávána z přímých rostlinných a živočišných zdrojů. Tato náročná metoda získávání enzymů se vyznačovala nízkou efektivitou a vysokými náklady, což mělo za následek nižší úroveň dostupnosti, vysokou cenu a pomalý rozvoj enzymatického průmyslu. Zlom ve vývoji enzymového průmyslu přineslo v 80. a 90. letech 20. století širší využití mikrobiálních enzymů a vývoj metody pro získání enzymů pomocí rekombinantních procesů. Mikrobiální enzymy se ukázaly být ekonomicky výhodné, neboť kultivace mikrobů je mnohem jednodušší a rychlejší než pěstování rostlin či chov zvířat. Mikroorganismy jsou také snáze geneticky manipulovatelné, což vede k dosažení požadované kvality

a množství daného enzymu. V průběhu let docházelo ke zvýšení výroby enzymů vlivem mutagenese a náhodného screeningu mikroorganismů.

Od 90. let 20. století začaly být využívány rekombinantní techniky pro průmyslovou výrobu enzymů, a již v r. 1993 bylo na trhu přes 50% průmyslových enzymů produkováno právě těmito procesy (Hodgson, 1994). Jejich prodej činil 140 milionů \$ a využití se rozšířilo do mnoha odvětví, byly využívány jako detergenty, potrava nebo krmivo ve zpracovatelském průmyslu.

Mezi nejvíce rozšířenými mimo jiné byly:

- Rostlinná fytasa produkována rekombinantní houbou *Aspergillus niger*. Využitím rekombinantní technologie bylo dosaženo až tisícinásobného zvýšení produkce tohoto enzymu a tím se stal velmi hojně využívaným v různých průmyslových odvětvích (byl použit pro výkrm až 50% všech vepřů v Holandsku) (Van Hartingsveldt et al., 1993).
- Průmyslové lipasy. Ty byly klonovány v askomycetách *Humicola* a průmyslově produkovány v houbě *Aspergillus oryzae*. Jsou využívány na čištění prádla, vnitřní esterifikaci lipidů, esterifikaci glykosidů a produkci glykolipidů. Glykolipidy mají uplatnění jako biodegradativní neiontové povrchy pro detergenty, produkty pro péči o pleť, kontaktní čochky a jako emulgátory potravin.
- Savčí chymosin byl klonován a produkován opět v *A. niger* nebo v bakterii *Escherichia coli* a jeho cena byla ve srovnání s telecím chymosinem poloviční.

Důležitým momentem průmyslu enzymů byl rozvoj tzv. technologie rekombinantní DNA. Tato technologie přinesla hned několik důležitých poznatků (Falch, 1991):

1. Rostlinné a živočišné enzymy jako např. chymosin mohou být vytvářeny mikrobiální fermentací.
2. Enzymy z organismů náročných na růst nebo ty, které byly získávány náročnou genetickou manipulací jsou nyní produkovány pomocí některých druhů průmyslových organismů jako jsou *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* a *Bacillus licheniformis* (např. termofilní lipasa byla produkována mikroskopickou houbou *A. oryzae*, cyclodextringlykosyltransferasa pomocí bakteriálního kmene *Bacillus*).
3. Produktivita enzymů vzrostla s využitím většího počtu kopií daného genu, silných promotorů a efektivních signálních sekvencí.
4. Produkce užitečných enzymů z patogenních či toxiny produkujících druhů může být nyní prováděna v bezpečném hostiteli.

5. Proteinové inženýrství se podílelo na zlepšení stability, aktivity a /nebo specifity enzymu.

Díky vývoji a zdokonalování metod jsou dnes enzymy rozšířeny do mnoha oblastí průmyslu a obchodu. Pro potřeby dnešního trhu je až 50% z celkové produkce enzymatického průmyslu vyráběno pomocí kvasinek a plísní, bakteriálního původu je přibližně 30%, živočišného 8% a rostlinného jen asi 4% (Demain & Vaishnav, 2009). Poptávka po produktech enzymatického původu tvoří velkou část celkové poptávky po léčivech, či potravinách a krmivech. Celkový prodej průmyslových enzymů dosáhl v r. 2000 2 bilionů \$ a o devět let později se tato hodnota pohybovala až okolo 2.5 bilionů \$ (Demain & Vaishnav, 2009).

Z těch hlavních průmyslově vyráběných enzymů to jsou především:

- Proteasa z bakterií rodu *Bacillus*, která je vedoucím enzymem zaujímá 57% trhu.
- Amidasa z *E. coli* používaná k produkci 6-aminopenicillianové kyseliny (6-APA) v množství 40000 tun/rok.
- Xylosaisomerasa z bakterií rodu *Streptomyces* používaná k izomeraci D-glukosu na D-fruktosu v množství 100000 tun/rok.
- Nitrilhydratasa *Pseudomonas chlorapis* používaná k produkci akrylamidu z akrylonitrilu v množství 30000 tun/rok.
- Amylasy z bakterií rodu *Bacillus* je produkována v množství 95000 tun/rok.
- Mezi další významné enzymy patří: glukoamylasa, laktasa, lipasa, cellulasa, pullulanasa a xylanasa (Demain & Vaishnav, 2009).

Technika rekombinantní DNA může být dále využita ke zlepšení kvality proteinových léčiv, nízkomolekulárních léčiv, genové terapie, DNA vakcín, vakcín z rekombinantních proteinů, virálních vakcín a k vývoji virů (Demain & Vaishnav, 2009; Tobin et al., 2000).

Dnes je cílem rekombinantních DNA technologií a proteinového inženýrství příprava enzymů na míru, tak aby vyhovovaly požadavkům uživatelů nebo procesům, ke kterým mají být využívány. Již není nutné se spokojit s přirozenými vlastnostmi enzymů. Enzymy získávají lepší kvalitu díky proteinovému inženýrství a speciálně řízené mutagenezi. Jediná změna aminokyselinové sekvence způsobí změnu v pH optimu, termostabilitě, zpětnovazebné inhibici, inhibici zdrojem uhlíku, substrátové specifitě, V_{lim} , K_m a K_i . Novou a důležitou metodou pro zlepšení byla tzv. přímá evoluce (také známá jako aplikovaná molekulární evoluce nebo přímá molekulární evoluce) (Kuchner & Arnold, 1997; Johannes & Zhao, 2006). Na rozdíl od přímé mutageneze,

tato metoda umožňuje rekombinování částí podobných genů z různých druhů nebo kmenů vedoucí k pozoruhodnému zlepšení výnosů požadovaných enzymů ve velmi krátkém čase. Tato procedura ve skutečnosti napodobuje procesy mutace, selekce a rekombinace a uplatňuje je v kratším časovém období než se tomu děje během evoluce (Demain & Vaishnav, 2009).

1.1.3 Různorodost expresních systémů pro produkci rekombinantních proteinů

Aby bylo možno vyhovět obrovské poptávce, je většina proteinů produkovaných biofarmaceutickým průmyslem získávána pomocí nástrojů genetického inženýrství, tedy pomocí rekombinantních systémů. Prvním krokem pro produkci rekombinantních proteinů je získání požadované DNA, kterou chceme klonovat. Poté je odpovídající sekvence DNA pro daný protein amplifikována ve vybraném expresním systému. Dnes v době moderních technologií je dostupná celá řada proteinových expresních systémů. Výběr správného expresního systému pro produkci proteinů je závislý na faktorech, jako je požadovaná kvalita proteinu, jeho funkčnost, rychlost produkce a výnos. Proteiny mohou být exprimovány v buněčných kulturách bakterií, kvasinek, plísní, savců, rostlin nebo hmyzu nebo prostřednictvím transgenních rostlin a zvířat (Demain & Vaishnav, 2009).

Od r. 2002 bylo v Evropě a USA schváleno okolo 140 terapeutických proteinů (Walsh, 2003). Velké proteiny jsou obvykle exprimovány v eukaryotických systémech, zatímco ty menší jsou exprimovány v systémech prokaryotických. Neglykosylované proteiny jsou obvykle vytvářeny v *E. coli* nebo kvasinkách a představují na trhu 40% podíl terapeutických proteinů. Systém *E. coli* je nejlevnější, nejjednodušší a dosahuje nejrychlejší exprese proteinů, problémem však je, že tímto způsobem nelze exprimovat proteiny o větších velikostech (ve smyslu molekulové hmotnosti). Tento systém také není vhodný pro proteiny bohaté na S-S vazby (disulfidové můstky) a proteiny, které vyžadují posttranslační modifikace.

Pro produkci proteinů, které vyžadují glykosylaci jsou voleny savčí buňky, houby nebo systém *Baculoviru*. Systém *Baculoviru* umožňuje komplexnější posttranslační modifikace proteinu. Pomocí kvasinek je možno produkovat velké množství proteinů za nízkou cenu. Produkované proteiny mohou být větší než 50 kDa a signální sekvence v nich mohou být pozměněny nebo dokonce odstraněny tak, aby byly umožněny potřebné glykosylace. Pro produkci proteinů založených na systému savčích buněk jsou nejčastěji využívány kvasinky, plísně a buňky hmyzu, které jsou obecně schopny provádět savčí glykosylaci. Nejpopulárnějším systémem pro produkci rekombinantních, savčích, N-glykosylovaných proteinů jsou savčí buňky, které

napodobují lidskou glykosylaci. Geneticky modifikovaná zvířata sekretují rekombinantní proteiny v jejich mléce, krvi nebo moči. Např. buňky vaječníků čínského křečka produkují okolo 50% terapeutických proteinů na trhu. Tento proces je ovšem velmi nákladný a vytvořené glykoproteiny neodpovídají přesně lidskému typu, a v některých případech musí být modifikovány. Proto byla k produkci glykosylovaných proteinů lidského typu geneticky navržena dnes velice populární methylotrófní kvasinka, *P. pastoris* (Demain & Vaishnav, 2009). V rostlinné říši jsou produkce rekombinantních proteinů schopny tzv. transgenní rostliny, např. pro produkci jedlých vakcín (Cebadera & Camara, 2007) nebo monoklonálních protilátek (Girard et al., 2006).

1.2 KVASINKY JAKO „TOVÁRNY“ NA PROTEINY

Vlastnosti a biotechnologické využití kvasinek se zaměřením na : *S. cerevisiae*, *P. pastoris* a *S. pombe*

Kvasinky patří mezi jednobuněčné eukaryotické organismy houbového původu, rozmnožující se převážně asexuálně (pučení, přehrádečné dělení) a méně často sexuálně. V některých případech vytvářejí pseudomycelium, případně i pravé mycelium. Taxonomie kvasinek uvádí přibližně 400 druhů, mnohé z nich jsou pro své vlastnosti využívány v biotechnologiích (Čejková).

Kvasinkové druhy se staly populárními a jsou široce využívány jak v oblasti medicíny, tak pro průmyslovou produkci rekombinantních proteinů, které se dobře nedaří produkovat v prokaryotním systému *E. coli*, kde se objevují problémy se správným sbalováním proteinů a jejich glykosylací. Kvasinky kombinují výhody jednobuněčných organismů, tj. snadnost genetické manipulace a rychlý růst se schopností vykonávat eukaryotické posttranslační modifikace. Na rozdíl od komplexnějších eukaryotických organismů je kvasinkový expresní systém ekonomičtější a v relativně krátkém časovém období může rapidně zvýšit buněčnou hustotu a produkovat požadovaný protein ve velkých objemech. Tyto systémy na rozdíl od jiných neobsahují pyrogeny, patogeny nebo virové inkluze.

Hlavní výhody kvasinkového expresního systému jsou:

1. vysoký výnos
2. existence stabilních kmenů
3. trvanlivost
4. cenová nenáročnost
5. masivní růst

6. vysoká produktivita
7. vhodnost pro přípravu izotopicky značených proteinů
8. rychlý růst v chemicky definovaných médiích
9. zpracování produktu je podobné savčím buňkám
10. schopnost tvorby proteinů bohatých na disulfidové vazby
11. schopnost sbalování a glykosylace proteinu

Kvasinkové kmeny jsou geneticky dobře charakterizovány a je známa jejich schopnost mnoha posttranslačních modifikací. Práce s nimi je snadnější, méně nákladná ve srovnání s hmyzími nebo savčími buňkami (buněčnými liniemi) a jsou jednodušeji adaptovatelné k fermentačním procesům (Demain & Vaishnav, 2009).

Pro každý individuální produkt byl po genetické i fermentační stránce identifikován a optimalizován expresní systém s přihlédnutím na vlastnosti požadovaného produktu, organismus a použitou expresní kazetu. Existuje široká paleta zajímavých kvasinkových expresních hostitelů zahrnující druhy *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica* a *Arxula adenivorans*, s různými charakteristikami jako je termotolerance nebo halotolerance, a které dosahují masivních nárůstů nebo využívají neobvyklých zdrojů uhlíku. Některé druhy byly navrženy tak, že nesou další výhody, např. schopnost lidských glykosylačních reakcí nebo mají nižší množství proteas (Celik & Calik, 2011).

Saccharomyces cerevisiae, první a nejlépe charakterizovaný kvasinkový expresní systém, byl vyvinut v 80. letech 20. století a je velice významným systémem v tradičních oblastech jako je pekařství, výroba vína a piva atd. Avšak četné případy nestability integrovaného plazmidu, nízká hladina proteinů a hyperglykosylace proteinů limitují množství komerčních produktů původem z *S. cerevisiae* (Buckholz & Gleeson, 1991). Navíc, *S. cerevisiae* produkuje proteiny s N-vazebnými koncovými glykosylacemi přes α -1,3-vazby mannosových residuí, které jsou považovány za alergenní. Tyto problémy vedly k vývoji alternativních expresních systémů, které jsou nyní v praxi již dobře zavedeny. Zahrnují dvě methylotrófní kvasinky *Pichia pastoris* a *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* patřící do rodu *Saccharomyces*, dimorfní kvasinky *Arxula adenivorans*, *Yarrowia lipolytica* a *Schizosaccharomyces pombe*, která se rozmnožuje přehrádečným dělením. Projekt sekvencování genomů *S. cerevisiae* (Goffeau et al., 1996), *S. pombe* (Wood et al., 2002), *H. polymorpha* (Ramezani-Rad et al., 2003), *K. lactis*, *Y. lipolytica* (Dujon et al., 2004) a *P. pastoris* (DeSchutter et al., 2009; Mattanovich et al., 2009a) má za následek zisk obrovského

množství dat, ze kterých jsou sestavovány různé databáze dostupné na internetu, např.: *Saccharomyces* Genome Database (SGD) (Cherry et al., 1998), Yeast Proteome Database (YPD) (Hodges et al., 1999) a *Pichia pastoris* Genome Browser (Mattanovich et al., 2009b). Navíc jsou hostitelské kmeny navrženy tak, aby prováděly více N-glykosylací, čehož bylo dosaženo prvně u *P. pastoris* (Hamilton et al., 2006), následovaly počáteční studie u *H. polymorpha* (Kim et al., 2006; Oh et al., 2008), *Y. lipolytica* (Song et al., 2007), *K. lactis* (Liu et al., 2009) a *S. pombe* (Ohashi et al., 2009), jež otevřely cestu kvasinkám k tomu, aby se staly hlavními průmyslovými hostiteli pro produkci terapeutických proteinů.

Kromě toho se setkáváme s širokou paletou vektorů, promotorů a selekčních markerů kombinovanými se znalostmi fermentačních technik a postgenomickým výzkumem v průmyslovém měřítku, a proto je tedy možné navrhnout úspornější a výkonnější expresní systémy, za účelem uspokojení rostoucí poptávky po rekombinantních proteinech a glykoproteinech. Navržení optimálního systému pro produkci rekombinantních proteinů zahrnuje několik zásadních kroků:

1. Selekcí vhodného hostitelského kmene, který umožňuje správné skládání proteinu a jeho posttranslační modifikace.
2. Výběr vhodného vektoru (episomálního nebo integrativního) s vhodným promotorem (konstitutivním, inducibilním nebo represibilním) a selekčním markerem.
3. Vhodné kodony pro daný gen.
4. Fúze genu s epitopovou kotvou, která je významná pro afinitní purifikaci nebo detekci rekombinantního proteinu.
5. Výběr signální sekvence k zamíření rekombinantního proteinu do intracelulárního nebo extracelulárního prostředí – růstového média.
6. Předcházení proteolytickému štěpení produktu.
7. Navržení kultivačního (fermentačního) média (zdroje uhlíku a dusíku; indukční podmínky).
8. Optimalizace parametrů bioprosesu (teplota, pH, přenos kyslíku atd.).

Pro úspěch celého procesu má stěžejní význam výběr hostitelského kmene. Při výběru nejvhodnější hostitelské buňky pro expresi proteinů je důležitá kompatibilita hostitelského biochemického prostředí se schopností procesu a translace RNA transkriptu, spolu se schopností modifikovat a udržovat produkované proteiny (Greene, 2004). Proto jsou pomocí metabolického inženýrství (Ostergaard et al., 2000a),

evolučního inženýrství (Sonderegger & Sauer, 2003) a využitím průmyslových nástrojů biologie (Papini et al., 2010) neustále vyvíjeny lepší a lepší hostitelské kmeny.

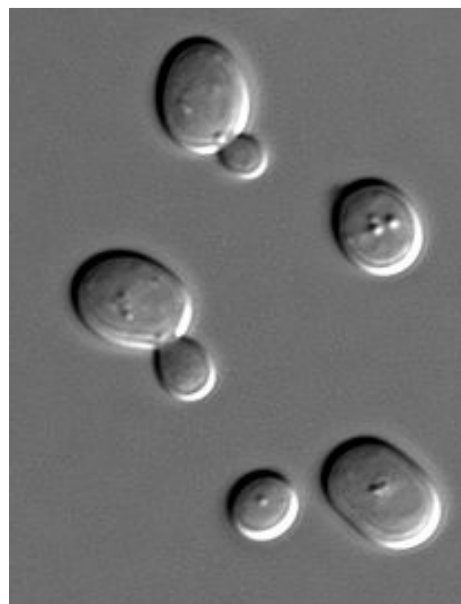
V důsledku vývoje, technologických úspěchů kvasinkových expresních systémů a aktuální dostupnosti široké škály kombinací hostitelských vektorů a optimálních systémů, je budoucí perspektiva rekombinantních proteinů produkovaných v kvasinkových systémech značná (Celik & Calik 2011).

Některé druhy kvasinek se ukázaly být extrémně užitečné a výhodné pro expresi a analýzu rekombinantních eukaryotických proteinů. Např. glukosaoxidasa *A. niger* může být produkována pomocí *S. cerevisiae* v množství 9 g/L. V současnosti jsou nejpobulárnější a nejvíce využívané pro expresi cizorodých proteinů dva kvasinkové kmeny, a to *S. cerevisiae* a methylotrófní kvasinka *P. pastoris* (Demain & Vaishnav, 2009).

Vzhledem k tomu, že tyto dva kmeny byly využívány i během experimentů této diplomové práce budou zmíněny blíže jejich obecné charakteristiky spolu s další kvasinkou *S. pombe*.

1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Rod *Saccharomyces* představuje nepochybně ekonomicky nejvýznamnější skupinu mikroorganismů používaných v průmyslu. Množství kvasinek produkovaných každoročně pivovarskými a lihovarskými technologickými postupy tvoří řádově miliony tun. Nejčastěji využívanými zástupci jsou *S. cerevisiae* subsp. *cerevisiae* a *S. cerevisiae* subsp. *uvarum*. *S. cerevisiae* (Obr.1) je využívána v porovnání s ostatními kvasinkami s takovou převahou, že v řadě prací je pojem kvasinka považován za její synonymum.



Obrázek 1 : *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae byla prvním eukaryotním organismem, jehož genom byl plně osekvenován (Goffeau et al., 1996). Tento genom je tvořen 12 156 677 páry bazí a 6 275 geny organizovanými do 16 chromosomů. Z celkového počtu genů je 5 800 genů funkčních (Čejková).

Tato kvasinka je využívána zejména pro svoji schopnost konvertovat cukry na etanol a oxid uhličitý. Existoval mylný předpoklad, že význam zmíněného

mikroorganismu v budoucnu poklesne, protože produkuje pouze minimální množství komerčně zajímavých sekundárních metabolitů (neprodukuje žádné antibiotikum). *S. cerevisiae* však představuje výhodný model eukaryotické buňky, vzhledem k tomu, že umožňuje jednoduchou genetickou analýzu. Tyto znalosti vytvořily užitečný základ pro klonování genů a přípravu vektorů. Kvasinky se v dané souvislosti využívají především proto, že se s nimi dá manipulovat stejně jako s prokaryoty, ovšem svojí strukturou a chováním připomínají spíše vyšší eukaryota (rostliny a živočichy).

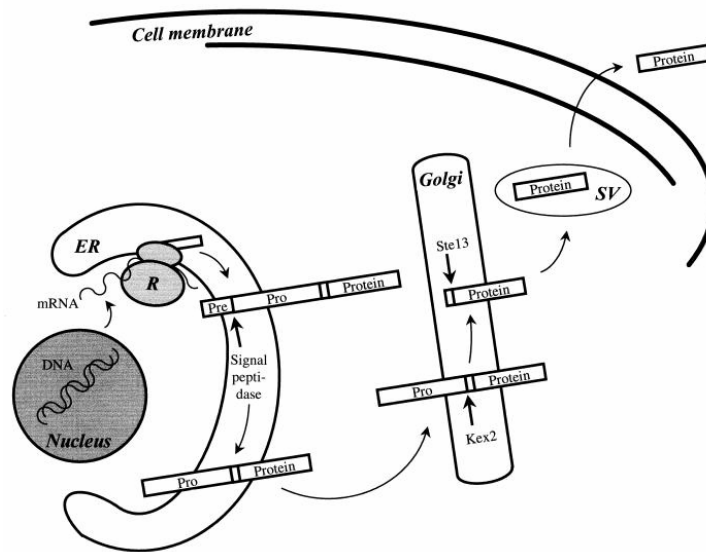
Pro *S. cerevisiae* je charakteristický vegetativní způsob rozmnožování probíhající multilaterálním pučením, buňky jsou sférické, elipsoidní, cylindrické nebo protáhlé (Obr.1). Výjimečně je vytvářeno pseudomycelium, vegetativně rostoucí buňky jsou převážně diploidní, nebo polyploidní. Méně časté je pohlavní rozmnožování vedoucí k tvorbě askospor. Askospory jsou sférické, uložené v množství 1 – 4 v asku, které po vyžrání nepraská. Tento rod je fermentativní se schopností respirace. Za aerobních podmínek (energeticky výhodnější) jsou cukry metabolizovány enzymy glykolýzy a navazujícím Krebsovým cyklem. *S. cerevisiae* fermentuje glukosu, manosu, fruktosu, galaktosu, maltosu, sacharosu, maltotriosu a v závislosti na konkrétním poddruhu i rafinosu. *S. cerevisiae* subsp. *cerevisiae* zahrnuje řadu původně samostatných druhů, např. *S. ellipsoideus*, *S. oviformis*, *S. vini* (vinařské kvasinky), *S. pastorianus* (kontaminují pivo), *S. italicus*, *S. saké*, *S. diastaticus* (jediný zástupce disponující glukoamylasou). Tyto kvasinky zkvašují rafinosu neúplně. K *S. cerevisiae* subsp. *uvarum* patří původně samostatné druhy *S. carlsbergensis*, *S. uvarum* a *S. monacensis*, které zkvašují rafinosu úplně (Čejková).

Využití v biotechnologiích:

- Velký počet kmenů je využíván pro výrobu alkoholických nápojů a fermentovaných potravin (líh, pivo, víno, cider, kefír, pulque, sake), pro výrobu droždí, sterolů, enzymů a dalších produktů.
- Využití buněčných komponent pro izolaci lipidů, proteinů, peptidů, enzymů, kofaktorů, nukleových kyselin, vitamínů (Čejková).
- Velmi významné je rovněž využití těchto kvasinek v genetickém výzkumu.
- Tato kvasinka má mimo jiné také schopnost sekretovat proteiny do extracelulárního prostředí, tedy do média, ve kterém je kultivována, díky α -faktorů prepro-leaderu (proteinu), který je běžně používán pro expresi heterologních proteinů (Ostergaard et al., 2000a; Zsebo et al., 1986).

Fúze sekvence prepro-leaderu s heterologním genem umožňuje *S. cerevisiae* sekreci heterologního proteinu, neboť leader sekvence

zprostředkovává kotranslační translokaci fúzního proteinu do ER. Pre-oblast sekvence leaderu je odštěpena signální peptidasou, a v Golgiho aparátu odštěpí Kex2 endoproteasa pro-oblast leaderu na C-terminální straně (pozice Lys-Arg) (Achstetter & Wolf, 1985; Julius et al, 1984). Před sekrecí je ještě odstraněno několik aminokyselin na C-terminální straně působením dipeptidylaminopeptidasy, kódované genem *STE13* (Julius et al, 1983), přičemž je heterologní protein přes vezikuly uvolněn do extracelulárního prostoru (Obr.2) (Ostergaard et al., 2000a).



Obrázek 2: Sekreční dráha proteinů u *S. cerevisiae*. Schéma ilustruje odštěpení pre-regionu signální peptidasou, pro-regionu Kex2 endoproteasou a peptidového „spaceru“ dipeptidylaminopeptidasou. Zkratky: R = ribosom; SV = sekreční vezikuly (převzato z Ostergaard et al., 2000a).

V období posledních tří desetiletí byla tato kvasinka upravena pomocí genetického inženýrství k expresi široké škály rekombinantních proteinů. První vakcína účinná proti lidské virové infekci, hepatitidě B, byla produkována intracelulárně pomocí rekombinantní *S. cerevisiae* (McAleer et al., 1984). Dnes jsou rekombinantní proteiny schvalované americkými vládními agenturami FDA a EMEA produkovány téměř výlučně systémem *S. cerevisiae* (Huang et al., 2010). Produkty na trhu, které jsou produkovány *S. cerevisiae* zahrnují insulin, povrchový antigen hepatitidy B, urát oxidasu, glukagony, granulocytární - makrofágový kolonie stimulující faktor (GM-CSF), hirudin a růstový faktor odvozený od krevních destiček (Demain & Vaishnav, 2009; Celik & Calik 2011). Kromě výše uvedených výhod kvasinkových

systémů, které jsou obecně přičítány *S. cerevisiae*, je současná průmyslová popularita tohoto mikroorganismu zapříčiněna tím, že je všeobecně uznávaná jako bezpečný organismus, což vyplývá z množství doposud získaných znalostí o její fyziologii, genetice a fermentačních technikách. Údaje získané z oblasti analýzy transkriptomu, proteomu, metabolomu, interaktomu a dalších oblastí přispívají k zisku velkého souboru cenných informací. *S. cerevisiae* je pravděpodobně organismus s nejkompexnějším množstvím dostupných informací. Konkurenceschopnost této kvasinky spočívá ve vysoké produkci ethanolu a toleranci stresu z okolního prostředí, jako je např. nízká hladina kyslíku (Celik & Calik, 2011).

S. cerevisiae nabízí oproti bakteriím jako klonovacím hostitelům určité výhody (Gellison et al., 1992). Má dlouhou historii ve využití v průmyslové fermentaci. Umí sekretovat heterologní proteiny do extracelulárního prostředí, pomocí vlastní signální sekvence připojené ke strukturním genům. U *S. cerevisiae* probíhá O-glykosylace vedoucí k vyššímu podílu mannosy, zatímco u savčích proteinů převládají řetězce sialované. Proto je exprese mnoha savčích proteinů v *S. cerevisiae* nepřijatelná (Demain & Vaishnav, 2009). Mimo to, kvasinková hyperglykosylace N-vazebných míst vede k redukci aktivity řady enzymů a vazbě na receptory vedoucí až k imunologickým problémům. Téměř všechny sekretované eukaryotické proteiny jsou glykosylovány. Glykosylace je druhově, tkáňově a podle typu buněk specifická. V některých případech jsou nativně glykosylované proteiny bez karbohydrátové složky aktivní a mohou být vytvářeny v bakteriích, jako v případě γ -interferonu (Rinderknecht et al., 1984). V případě, kdy je glykosylace pro stabilitu nebo vlastní sbalení proteinu nezbytná (př. erythropoetin (EPO) a lidský choriový gonadotropin), může být rekombinantní protein produkován kvasinkami, plísněmi, hmyzem nebo savčími buňkami (Demain & Vaishnav, 2009).

Houbové enzymy, které jsou sekretovány, jsou často glykosylovány stejně (Elbein et al., 1984), ačkoli jsou občas přítomny v proteinech hub další karbohydráty spojené přes kyslík serinu nebo threoninu (Nunberg et al., 1984). Glykosylace proteinů může probíhat vlivem různých faktorů, např. složením média, ve kterém buňky rostou. Glykosylace ovlivňuje reakční kinetiku (pokud je protein enzymem), rozpustnost, teplotní stabilitu, aktivitu *in vivo*, imunogenitu a vazbu na receptory. Bylo zjištěno, že některé glykosylované peptidy (enkefaliny) jsou 1000 - 10000x aktivnější a stabilnější než peptidy v nativní formě. Na druhou stranu je lidský EPO 1000x aktivnější *in vivo* než jeho desialovaná forma, ale obě formy mají *in vitro* stejnou aktivitu (Yamaguchi et al., 1991). Glykosylace má vliv také na farmakokinetiku léčiv na bázi proteinů (ovlivňuje délku působení v organismu) (Demain & Vaishnav, 2009).

Pro zajištění požadovaného typu glykosylace je možné pro produkci heterologních proteinů využít glykosyltransferas (Demain & Vaishnav, 2009; Solá & Griebenow, 2010).

1.2.2 *Pichia pastoris*

P. pastoris patří mezi tzv. methylotrófní kvasinky. Pod pojmem methylotrófní mikroorganismus máme na mysli aerobní růst neautotrofních mikroorganismů na redukovaných uhlíkatých látkách postrádajících vazby C-C. Mezi nejdůležitější substráty methylotrófů patří methan, methanol, methylaminy, mravenčí kyselina, formaldehyd, formamid, dimethylether, dimethylkarbonát, dimethylsulfoxid a dimethylsulfid.

Methylotrófní mikroorganismy můžeme dělit na obligátně a fakultativně methylotrófní. Obligátní methylotrófové využívají výše uvedené substráty jako jediný zdroj uhlíku a energie, zatímco fakultativní methylotrófové jsou schopni růst na řadě jiných látek. Vzhledem k tomu, že příslušné substráty jsou v přírodě bohatě zastoupeny (voda, půda, povrchy rostlin a živočichů), není překvapující, že methylotrófie představuje častý typ fyziologie jednobuněčných organismů, a to jak u bakterií, tak u eukaryot (kvasinky) (Čejková).

Během posledních 15 let byla methylotrófní kvasinka *P. pastoris* vyvinuta jako vysoce užitečný systém pro produkci různých heterologních proteinů. Vzrůstající popularitu tohoto konkrétního expresního systému lze přičíst několika faktorům, z nichž nejdůležitější jsou:

1. Jednoduchost technik potřebných pro molekulárně genetickou manipulaci s *P. pastoris* a její podobnost s *S. cerevisiae*.
2. Schopnost *P. pastoris* produkovat cizí proteiny ve vysokých koncentracích, intracelulárně nebo extracelulárně.
3. Schopnost provádět mnoho eukaryotních posttranslačních modifikací jako jsou glykosylace, tvorba disulfidových můstků a proteolytické zpracování.

Oproti *E. coli*, která může produkovat špatně sbalené proteiny, které jsou poté obvykle inaktivní nebo nerozpustné, má *P. pastoris* schopnost formovat disulfidické můstky a glykosylovat proteiny, což je její hlavní výhodou. Ve srovnání s ostatními expresními systémy jako jsou S2 buňky *Drosophila melanogaster* nebo ovariální buňky čínskému křečka, *Pichia* obvykle poskytuje lepší výnosy s menší finanční náročností, protože na rozdíl od buněčných linií z mnohobuněčných organismů nevyžaduje

komplexní bohatá média, čímž je možno dosáhnout nižší ceny produkce proteinu. Kromě toho, je schopna *Pichia* růst v médiu obsahujícím jen jeden zdroj uhlíku a jeden zdroj dusíku, což je vhodné pro izotopové značení proteinů. Úspěchem v genetickém inženýrství *P. pastoris* byla sekreční dráha pro produkci lidského typu N-glykosylovaných proteinů (Choi et al., 2003).

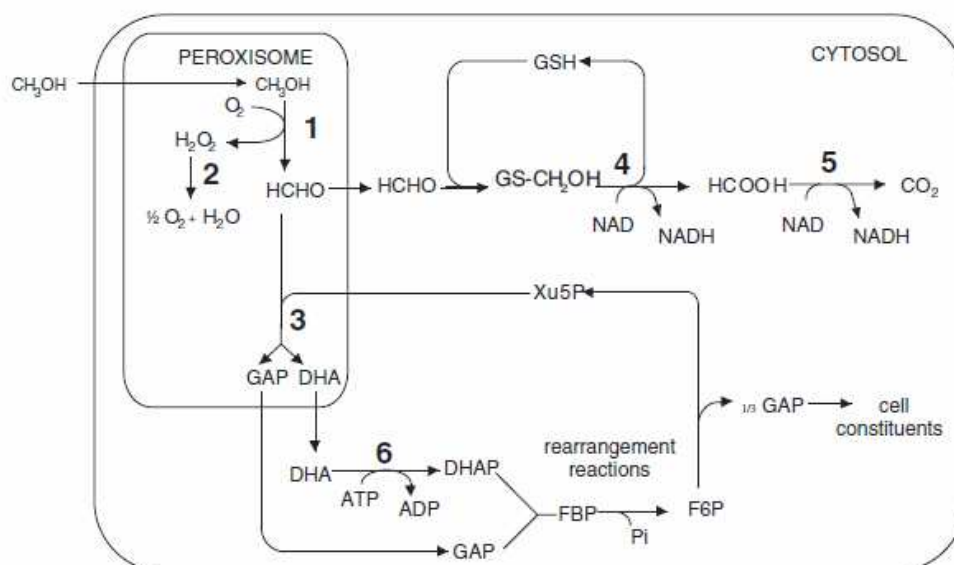
Využití methylotrofů v biotechnologii

Methanol (případně methan) představoval zejména v uplynulých desetiletích atraktivní substrát pro kultivaci methylotrofních kvasinek. Velmi perspektivní je v tomto ohledu využití kvasinky *P. pastoris*, která je díky svým vlastnostem vhodná pro produkci rekombinantních proteinů (Čejková). Jedná se o:

- Jednoduchý expresní systém, ve srovnání se složitějšími eukaryoty. Všechny expresní kmeny *P. pastoris* jsou odvozeny od WT kmenu NRRL-Y 11430. Běžně jsou používány auxotrofní mutanti (např. GS115) a proteasa-deficientní kmeny (např. SMD1163, SMD1165, SMD1168) (Celik & Calik, 2011).
- Schopnost stabilní integrace mnoha kopií cizorodé DNA do chromozomální DNA za vzniku stabilních transformantů (Celik & Calik, 2011; Gellison et al., 1992).
- Snadná genová manipulace.
- Nízká náročnost na složení kultivačních medií (levná kultivace – velké objemy). Methylotrofní kvasinky mohou dorůst do optické hustoty větší než 130 g/L (Gellison et al., 1992).
- *P. pastoris* preferuje respirační způsob růstu před fermentačním (Cereghino et al., 2002), což umožňuje kultuře dosáhnout vysoké hustoty buněk (200 g/L suché váhy, Heyland et al., 2010). Ve srovnání s *S. cerevisiae* poskytuje *P. pastoris* 10 – 100x vyšší výtěžky biomasy. Je tedy ideální pro produkci transgenního proteinu ve velkých objemech (Čejková).
- Neprodukuje toxiny a pyrogenní látky.
- Možnost produkce nativních proteinů přítomných u vyšších eukaryot (správná posttranslační modifikace). Výhodou tohoto expresního systému je absence α -1,3-vazebné mannosyltransferasy, která u *S. cerevisiae* produkuje vysoce imunogenní koncové α -1,3-vazebné mannosylové spoje. U methylotrofů se délka mannosového řetězce pohybuje okolo 8 – 17 residuí, což je asi 8x nižší frekvence manosylace než je pozorována u *S. cerevisiae*. V případě

P. pastoris jsou terminální mannosová residua spojena α -1,2-vazbou, která na rozdíl od α -1,3-vazeb není alergenní (Gellissen et al., 2005).

- Zatímco rekombinantní lidský EPO exprimovaný ve WT *P. pastoris* obsahuje většinou 17 mannosových residuí (Celik et al., 2007), po rozsáhlých výzkumech glykosylačních drah *P. pastoris* (Bobrowicz et al., 2004; Callewaert et al., 2001; Choi et al., 2003; Hamilton et al., 2003; Verweken et al., 2004), byly konečně získány plně funkční rekombinantní krysí EPO s terminálními residui kyseliny sialové (Hamilton et al., 2006; Celik & Calik, 2011).
- *P. pastoris* přirozeně sekretuje daleko méně vlastních proteinů ve srovnání s *S. cerevisiae* - jednodušší izolace rekombinantního proteinu. U *P. pastoris* se setkáváme s tendencí sekretovat proteiny i o vysoké molekulové hmotnosti, zatímco u *S. cerevisiae* jsou proteiny většinou zachovány v periplasmě. Navíc, je možná jednoduchá purifikace sekretovaných proteinů vzhledem k relativně nízké hladině endogenních proteinů v extracelulárním médiu (Celik & Calik, 2011).
- Dokáže využít glycerol, methanol, glukosu, sorbitol, etanol, acetát jako výhradní zdroj uhlíku a energie. Např. je schopna růstu v přiměřeně silných methanolvých roztocích, které mohou být pro ostatní organismy toxické. *P. pastoris* je schopna využívat methanol jako jediný zdroj energie a uhlíku bez přítomnosti jiných zdrojů tohoto prvku.
- *P. pastoris* oxiduje methanol na formaldehyd (dva geny kódující alkoholdehydrogenasu AOX1, AOX2) za přítomnosti kyslíku, proces probíhá v peroxisomech (Obr.3) (Čejková).



Obrázek 3: Schéma metabolické dráhy methanolu u methylotrofní kvasinky *Pichia pastoris*. 1 – alkoholoxidasu, 2 – katalasu, 3 – dihydroxyaceton-synthasu, 4 – formaldehyddehydrogenasu, 5 – formiátdehydrogenasu, 6 – dihydroxyacetonkinasu, GSH – glutathion, Xu5P – xylulosa-5-fosfát, FBP – fruktosa-1,6-bisfosfát (převzato z Gellissen et al., 2005).

Prvním krokem metabolické dráhy methanolu je jeho oxidace na formaldehyd a peroxid vodíku enzymem alkoholoxidasou. Aby se zabránilo intoxikaci kvasinky peroxidem, proces probíhá ve specializovaných organelách – peroxisomech, které udržují toxický H_2O_2 mimo zbytek buňky. H_2O_2 je rozkládán pomocí enzymu katalasy na vodu a kyslík.

Vzniklý formaldehyd může být dále odbouráván dvěma cestami. První možností je odbourání formaldehydu dihydroxyaceton-synthetasou na dihydroxyaceton a glycerinaldehyd-3-fosfát, tyto látky mohou být následně zapojeny např. do pentosafosfátového cyklu. Druhou možností je odbourání formaldehydu formaldehyddehydrogenasou na formiát, a ten následně pomocí formiátdehydrogenasy na oxid uhličitý. Přeměny dihydroxyacetonu, glycerinaldehyd-3-fosfátu a formiátu probíhají v cytosolu.

Exprese genů, které se uplatňují v těchto procesech je regulována na úrovni jejich transkripce. Ve vztahu k methanolu a jeho využití existují 3 fenotypy *P. pastoris* zvané:

- Mut⁺ = „methanol utilization plus phenotyp“
- Mut^S = „methanol utilization slow phenotyp“

- Mut⁻ = „methanol utilization minus phenotyp“ (Celik & Calik, 2011; Macauley-Patrick et al, 2005).
- Kvasinková AOX je exprimována ve velkém množství (5% veškeré mRNA), čehož využívá heterologní expresní systém, kdy je transgen vložen pod AOX promotor (Čejková). AOX1, promotor alkoholoxidasy1, je znám jako jeden z nesilnějších a přísně regulovaných eukaryotních promotorů. S využitím tohoto promotoru byla exprimována široká paleta proteinů s výtěžkem větším jak 14,8 g/L (myší kolagen, Werten et al., 1999) jiné zdroje uvádí dokonce 20 – 30 g/L rekombinantního proteinu (Celik & Calik, 2011). Při identifikaci genů alkoholoxidasy byla využívána enzymatická, imunologická a sekvenční analýza. DNA a předpovídané aminokyselinové sekvence jsou úzce homologní, zatímco lemující sekvence nevykazují žádnou homologii. Studie kmenů na methanolu rostoucí *P. pastoris* s narušenými AOX geny ukázaly, že AOX1 je hlavním zdrojem methanoloxidující aktivity. Výsledky experimentů ukazují, že rozdíl v AOX aktivitě, která vzniká přispěním dvou genů, je důsledkem sekvence lokalizované na 5'konci kódující části genu. Kódující část AOX2 je schopna funkčně nahradit AOX1, pokud je umístěna pod kontrolou AOX1 regulační sekvence (Cregg et al., 1989).

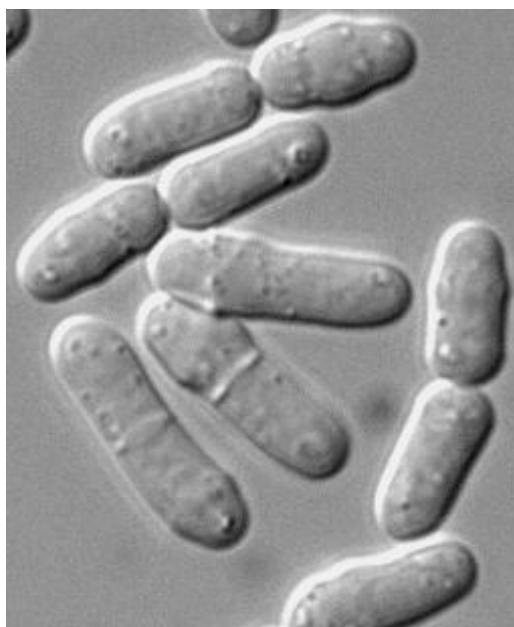
Doposud bylo pomocí expresního systému *P. pastoris* exprimováno přes 200 různých heterologních proteinů (Cregg et al., 2000). První terapeutický polypeptid exprimovaný pomocí *P. pastoris* byl ekalantid (60 aminokyselin). Tento polypeptid byl schválen americkou agenturou FDA, a od r. 2009 je produkován společností Dyax Corporation (Cambridge, MA) k léčbě dědičného angioedému (Celik & Calik, 2011). V dnešní době je vyráběn rekombinantními kvasinkami např. hirudin, inhibitor trombinu z léčivých pijavic – *Hirudo medicinalis* (Sohn et al., 2001). Produktivita tohoto enzymu u *P. pastoris* činí 1500 mg/L (Demain & Vaishnav, 2009). *P. pastoris* produkuje také velké množství savčích rekombinantních proteinů do extracelulárního média. Prekursor insulínu byl produkován v množství 1,5 g/L (Wang et al., 2001). Ostatní články uvádějí 4 g/L intracelulárního interleukinu, 2, 4 g/L sekretovaného lidského sérového albuminu (Cregg et al., 1993) a 6 - 10 g/L tumor nekrotizujícího faktoru (Dale et al., 1999; Sreerishana et al., 1989). Produkce sérového albuminu v *S. cerevisiae* činila 0,15 g/L, zatímco u *P. pastoris* to bylo 10 g/L (Nevalainen et al., 2005). Gelatin byl produkován v *P. pastoris* v množství přes 14 g/L (Werten et al., 1999). *P. pastoris* je schopna produkovat 300 mg/L lidské rekombinantní chitinasy za den (Goodrick et al., 2001). Intracelulární fragment C toxinu tetanu tvořil 27% všech proteinů s titrem 12 g/L (Clare et al., 1991; Demain & Vaishnav, 2009).

Skupině vedené Gerngrossem se podařilo připravit kmen, který produkuje EPO v normální lidské glykosylované formě (Gerngross, 2004; Hamilton et al., 2006). Toho bylo dosaženo výměnou enzymů odpovědných za typ kvasinkové glykosylace se savčími homology. Tato změna glykosylace umožňuje proteinu být v lidském organismu plně funkční. Schopnost *P. pastoris* glykosylovat rekombinantní proteiny byla využita i u jiných lidských proteinů (Demain & Vaishnav, 2009).

Jednu nevýhodu však *P. pastoris* má, jako hostitel pro heterologní expresi vyžaduje pro vlastní sbalení požadovaného proteinu chaperoniny, které však není schopna sama produkovat (Demain & Vaishnav, 2009).

1.2.3 *Schizosaccharomyces pombe*

S. pombe (Obr.4) je dimorfní kvasinka, která se obvykle v průběhu normálního životního cyklu vyskytuje v haploidním stavu. Byla šestým eukaryotickým organismem jehož genom byl plně osekvenčován (Wood et al., 2002) a třetím eukaryotickým organismem, po *S.cerevisiae* a *Homo sapiens*, pro který je přístupný kompletní proteom v UniProtKB/Swiss-Prot. Vlastnosti této kvasinky jsou intenzivně studovány mimo jiné kvůli mnoha důležitým vlastnostem, které sdílí s vyššími eukaryoty, jako je např.



Obrázek 4 : *Schizosaccharomyces pombe* regulace buněčného cyklu, iniciace transkripce, organizace chromozomů, RNA „splicing“ a reakce interferenčních RNA (RNAi) (Olsson & Bjerling, 2011; Rhind et al., 2011).

Dále je v této kvasince dobře definován Golgiho aparát, je možná galaktosylace glykoproteinů (Moreno et al., 1985) a mechanismus kontroly kvality sbalení glykoproteinů je bližší savčím buňkám než *S. cerevisiae* (Parodi, 1999). *S. pombe* se také stala důležitým organismem při studiu buněčné odpovědi na poškození DNA a procesu replikace DNA.

Genom této kvasinky zahrnuje přibližně 14,1 milionu párů bází, odhaduje se, že obsahuje 4940 genů kódujících proteiny a alespoň 450 nekódujících RNA (Wilhelm et al, 2008).

Kvasinkové druhy *S. pombe* a *S. cerevisiae* jsou intenzivně studovány. Po srovnání genové sekvence a fylogenetické analýze se předpokládá, že tyto dva druhy se začaly divergentně vyvíjet před cca 330 - 420 miliony let a jsou významnými nástroji molekulární a buněčné biologie (Wood, 2002).

Srovnání s pučící kvasinkou *S. cerevisiae*:

- *S. cerevisiae* obsahuje přinejmenším 5651 genů kódujících proteiny (Blandin et al., 2000), zatímco *S. pombe* jich má pouze 4940 (Wood, 2002).
- I přes podobný počet genů má *S. cerevisiae* jen 272 intronů, zatímco *S. pombe* jich má 4730 (Wood, 2002).
- *S. cerevisiae* má 16 chromozomů (Blandin et al., 2000), zatímco *S. pombe* má pouze 3 (Yanagida, 2002).
- *S. cerevisiae* je obvykle diploidní, zatímco *S. pombe* je obvykle haploidní (Kocková-Kratochvílová & Kutková, 1961).
- *S. cerevisiae* zůstává v G1 fázi buněčného cyklu po delší dobu (a tudíž je G1-S přechod přísně kontrolován), zatímco *S. pombe* zůstává déle ve fázi G2 (a tudíž, G2-M přechod je pod přísnou kontrolou).
- Oba druhy sdílí geny vyšších eukaryot, které však mezi těmito organismy navzájem nejsou shodné (Aravind et al., 2000; Wixon 2002). U *S. pombe* jsou přítomny geny procesu RNAi, které se obvykle vyskytují u obratlovců. Tyto geny *S. cerevisiae* nemá.
- *S. cerevisiae* má také výrazně jednodušší heterochromatin ve srovnání s *S. pombe* (Hickman et al., 2011). Naopak *S. cerevisiae* má oproti *S. pombe* lépe vyvinuté peroxisomy.
- *S. cerevisiae* má malou oblast centromery okolo 120 bp (Cole et al, 2011; Krassovsky, 2012) a sekvence definující počátek replikace o stejné velikosti (Dubey et al., 1996). Naopak *S. pombe* má mnohem větší opakující se oblasti centromer, které jsou 300 – 1000x větší než u *S. cerevisiae* (Wood, 2002), jsou více podobné savčím centromerám (Wixon, 2002) a mají degenerované počátky replikace 0,5 - 1 kb (Cotobal et al., 2011).

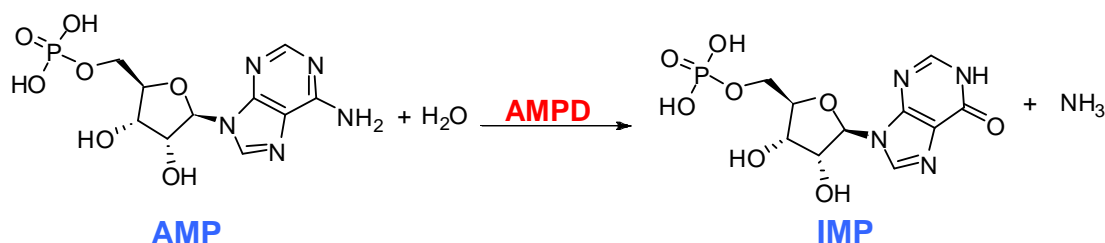
Z těchto důvodů je *S. pombe* považována za atraktivního hostitele pro expresi savčích proteinů. Přesto je expresní systém *S. pombe*, který je přístupný průmyslovým aplikacím, málo rozvinut a je cílem několika v současnosti probíhajících výzkumů (Celik & Calik, 2011; Giga-Hama et al., 2007; Idiris et al., 2010; Kjærulff & Jensen, 2005).

1.3 AMP-deaminasa

AMP-deaminasa (AMP-aminohydrolasa, EC 3.5.4.6) je enzym s homotetramerní strukturou (Murakami, 1979) (u rostlin se jedná o homodimer (Han et al., 2006)), který je řazen do třetí třídy enzymů, tedy hydrolas. Katalyzuje hydrolytické štěpení adenosinmonofosfátu (AMP) za vzniku produktů inosinmonofosfátu (IMP) a amoniaku (Obr.5). Hraje důležitou roli při regulaci intracelulárních hladin a energetických přeměn adenylátu (Chapman & Atkinson, 1973; Yoshino & Murakami, 1981), v cyklu purinových nukleotidů (Obr. 6) (Lowenstein, 1972), při přeměně nukleotidů adeninu na nukleotidy inosin a guanin (Murakami, 1979) a při regulaci fosfofruktokinasy (Yoshino & Murakami, 1982a, b).

Vyskytuje se u mnoha eukaryot, zahrnujících jak vyšší eukaryota - savce, ptáky, obojživelníky (Yoshino et al., 1979a) a rostliny (Turner & Turner, 1961), tak i nižší eukaryota - kvasinky (Yoshino et al., 1979a). AMP-deaminasa byla intenzivně studována v mnoha živočišných tkáních (Murakami, 1979). Sekvence AMP-deaminasy byla během evoluce vysoce konzervována a u savců došlo k vývojové a tkáňově specifické regulaci exprese tohoto genu (Sabina et al., 1987). Tkáňově specifické isoformy AMP-deaminasy byly nalezeny v několika orgánech dospělých obratlovců (Ogasawara et al., 1978; Solano & Coffee, 1978; Ogasawara et al., 1982) a rozdílné isoformy AMP-deaminasy jsou produkovány v různých stádiích vývoje orgánů (Ogasawara et al., 1978; Kaletha & Skladanowski, 1984; Spsychala et al., 1985; Marguetant et al., 1987).

U dospělých zvířat, konkrétně u krysy je např. AMP-deaminasa v různých typech svalových vláken exprimována různou mírou a s odlišnou aktivitou (Sabina et al., 1987). U prokaryot nebyla však přítomnost tohoto enzymu prokázána (Yoshino et al., 1979a).



Obrázek 5 : Reakční schéma hydrolytického štěpení adenosinmonofosfátu na inosinmonofosfát a amoniak za účasti AMP-deaminasy.

1.3.1 Kvasinková AMP-deaminasa

Dosud byla kvasinková AMP-deaminasa studována pouze u *S. cerevisiae*, *S. pombe* a *C. albicans*. Jelikož enzym z *S. cerevisiae* byl popsán nejlépe a vzhledem k tomu, že AMP-deaminasy *S. cerevisiae* a *S. pombe* byly studovány v praktické části této práce, bude další popis zaměřen především na tyto enzymy.

U kmene *Saccharomyces cerevisiae* JM1901 byl osekvcován a klonován gen pro AMP-deaminasu (AMD), který je lokalizován na chromozomu XIII. Tento gen byl lokalizován mezi 73. a 76. centimorganem na levém raménku tohoto chromozomu (Sollitti et al., 1993). Geny purinového metabolismu jsou u kvasinek distribuovány na mnoha chromozomech, např. geny pro auxotrofii adeninu nacházíme na chromozomech IV, VII, IX, XII a XVI (Mortimer et al., 1989). Struktura promotorové oblasti pro AMD indikuje konstitutivní expresi, což bylo potvrzeno během metabolických a růstových studií (Meyer et al., 1989). AMP-deaminasa z *S. cerevisiae* byla exprimována v kvasinkovém kmeni deficientní na AMPD (Meyer et al., 1989) a také v *E. coli* (Merkler et al., 1989).

Molekulová hmotnost nativního enzymu byla podle studia sedimentační rovnováhy odhadnuta na 360 000 Da. Po SDS-PAGE v přítomnosti dodecylsulfátu sodného vykazoval enzym jediný polypeptidový pás s molekulovou hmotností 83 000 Da, což naznačuje, že nativní enzym má homotetramerní strukturu. AMP-deaminasa z pekařských kvasinek se tedy skládá ze dvou podjednotek, která se každá sestává ze dvou polypeptidových řetězců s identickou molekulovou hmotností (Murakami, 1979).

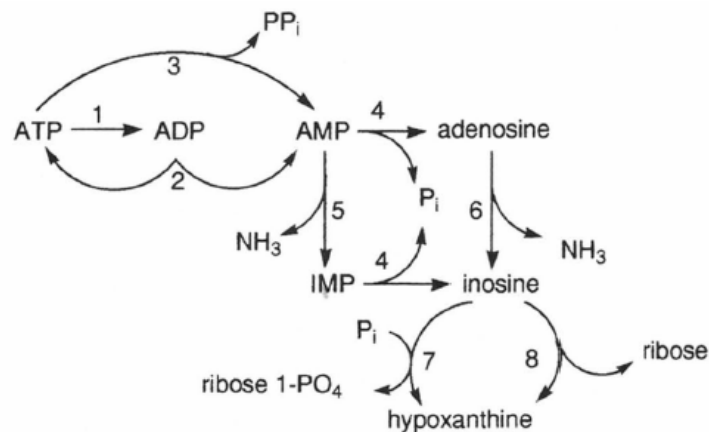
Rozsáhlé studie imunologických, fyzikálních a kinetických vlastností AMP-deaminasy z krysích tkání ukázaly přítomnost tří isoenzymů, A (kosterního svalstva), B (jaterní) a C (srdečního svalu), které se navzájem liší s ohledem na jejich kinetické a molekulární vlastnosti (Ogasawara et al., 1975; Ogasawara et al., 1977). AMP-deaminasa pekařských kvasinek je funkčně i strukturně podobná enzymu z krysích jater, tedy isoenzymu B. Kvasinková AMP-deaminasa a jaterní isoenzym B mají velice podobnou molekulovou hmotnost (Ogasawara et al., 1977), zatímco isoenzym kosterního svalstva má molekulovou hmotnost 280 000 Da pro nativní enzym a 70 000 Da pro příslušnou podjednotku (Murakami, 1979).

Schizosaccharomyces pombe obsahuje AMP-deaminasu s podobnými katalytickými vlastnostmi jako má *S. cerevisiae*, a to i přesto, že DNA sekvence genů a imunoreaktivita deaminasy z *S. pombe* se výrazně liší od AMP-deaminasy *S. cerevisiae* (Sollitti et al., 1993).

Přítomnost AMP-deaminasy u kvasinky *S. pombe* byla zkoumána na základě porovnání DNA pomocí hybridizace, proteinové imunoreaktivity a katalytické aktivity s *S. cerevisiae* obsahující tento protein. Na základě hybridizačních testů byla mezi genem AMP-deaminasy z *S. cerevisiae* a genomickou DNA původem z kmene *S. pombe* 972^{h-s} zjištěna nízká homologie. Molekulová hmotnost purifikované AMP-deaminasy z *S. pombe* koresponduje s proteolyticky štěpeným enzymem z *S. cerevisiae* a naznačuje tak, že je enzym rychle štěpen do stabilní formy, které chybí fragment 193 aminokyselin z N-terminální oblasti podobným způsobem jaký byl pozorován u enzymu z *S. cerevisiae* (Meyer et al., 1989; Sollitti et al., 1993). Geny a proteiny byly natolik divergentní, že ani DNA hybridizace nebo užití protilátky nestačily k potvrzení jejich podobnosti (Sollitti et al., 1993).

Navzdory rozdílům v genetické a proteinové struktuře se zdají být kinetické vlastnosti enzymu *S. pombe* podobné těm, které má enzym z *S. cerevisiae*. Proteinové extrakty z *S. pombe* a *S. cerevisiae* byly analyzovány paralelně a z výsledků plyne, že aktivita AMP-deaminasy původem z *S. pombe* je na úrovni srovnatelné s tou z *S. cerevisiae*. Pomocí analýzy reakčních intermediátů v buněčném extraktu *S. pombe* bylo zjištěno, že IMP je tvořen přímo z AMP. AMP-deaminasa z *S. pombe* byla přečištěna 1,100x až do dosažení specifické katalytické aktivity 67 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteinu. Purifikovaný protein slabě interagoval s polyklonálními protilátkami specifickými vůči AMP-deaminase z *S. cerevisiae*. AMP-deaminasa *S. cerevisiae* i *S. pombe* je aktivována ATP s mikromolárními aktivačními konstantami, které jsou specifické pro AMP, když je srovnáme s jinými purinovými nukleosidy a nukleotidy. Podle výsledků bylo zjištěno, že *S. pombe* obsahuje AMP-deaminasu s katalytickými vlastnostmi podobnými s *S. cerevisiae*, třebaže DNA sekvence genů a imunoreaktivita proteinu *S. pombe* se výrazně liší od AMP-deaminasy z *S. cerevisiae* (Sollitti et al., 1993). Z tohoto vyplývá, že i u *S. pombe* má v cyklu purinových nukleotidů (Obr. 6) AMP-deaminasa své důležité místo.

Chromozomální a vývojové rysy u *S. pombe* naznačují, že se *S. pombe* od *S. cerevisiae* vyvíjela značně odlišně. Např. proteiny zapojené do procesu tvorby proteinů v endoplazmatickém retikulu *S. pombe* jsou stejně divergentní jako jejich obdobné protějšky u *S. cerevisiae* a u savců (Pidoux a Armstrong, 1992; Sollitti et al., 1993).



Obrázek 6: Dráhy katabolismu adenylátu u *S. pombe*.

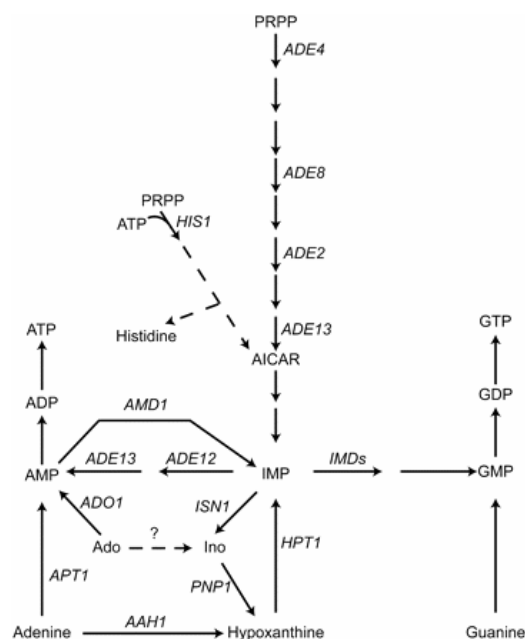
Enzymy vystupující v reakcích daného metabolismu jsou: 1, ATP-dependentní kinasa; 2, adenylátkinasa; 3, adenylát transferové reakce se vznikem AMP a PP_i jako produkty, 4, 5'-nukleotidasa; 5, AMP-deaminasa; 6, adenosindeaminasa; 7, purinnukleosidfosforylasy a 8, nukleosidhydrolasa (Sollitti et al., 1993).

Nejnovější studie zabývající se AMP-deaminasou uvádějí výsledky několika vědeckých skupin, které se zabývaly studiem mutantů defektních v genech zapojených do metabolismu purinů.

Výsledky Waltherova týmu ukázaly, že v souladu s předchozími údaji získanými *in vitro* (Yoshino & Murakami, 1985), byly mutanti defektní na AMP deaminasu výrazně citlivější na inhibici respirace než divoký typ a ostatní připravení mutanti (Walther et al., 2010).

Aktivita kvasinkové AMP-deaminasy byla charakterizována *in vitro* (Meyer et al 1989.) a za určitých růstových podmínek se předpokládá, že je tato aktivita vysoká, jelikož byla pozorována masivní syntéza IMP z AMP (Osorio et al., 2003; Loret et al., 2007). IMP pak může být metabolizováno třemi různými páry enzymatických reakcí. Může se vrátit zpět na AMP přes dva enzymatické kroky kódované geny *ADE12* (adenylosukcinátsyntetasa) a *ADE13* (adenylosukcinátlyasa) nebo může být přeměněn na GMP pomocí IMP-dehydrogenasy a GMP-syntetasy a třetí možností je degradace na inosin a hypoxanthin postupným působením IMP-specifické nukleotidasy (Isn1p) a purinnukleosidfosforylasy (Pnp1p) (Lecoq et al., 2001; Itoh et al., 2003). Proto se kvasinková AMP-deaminasa jeví jako stěžejní enzym pro přeměnu a degradaci obou purinů (Obr.7). Zatímco biochemické vlastnosti kvasinkové AMP-deaminasy byly dobře prostudovány (Merkler et al., 1989, 1993; Merkler & Schramm 1990, 1993), fyziologické důsledky defektu tohoto enzymu ve starších vědeckých publikacích zkoumány nebyly.

Novější studie uvádí, že defekt v aktivitě AMPD za určitých podmínek narušuje růst kvasinkových buněk a bylo prokázáno, že AMPD hraje klíčovou roli v udržování homeostázy guanylových nukleotidů. Studium homologů AMPD, Yjl070p a Ybr284p, ukázalo, že zvýšená exprese těchto proteinů nemůže potlačit fenotypy spojené s delecí AMPD. Naopak bylo zjištěno, že zvýšená exprese YJL070c napodobuje ztrátu funkce AMPD. Analýzy transkriptomu byly provedeny pomocí různých konstruktů a buněk ošetřených mykofenolovou kyselinou (MPA), což umožnilo vyhodnotit důsledky různým způsobem vyčerpaných guanylových nukleotidů. Tyto nové genetické nástroje byly také použity pro revizi fenotypů několika MPA hypersenzitivních mutantů (Saint-Marc et al., 2009).



Obrázek 7: Schéma metabolismu purinů u *S. cerevisiae*.

Ado, adenosin; AICAR, 5'-phosphoribosyl-5-amino-4-imidazolkarboxamid; AMP, adenosin-5'-monofosfát; Ino, inosin; IMP, inosin-5'-monofosfát a PRPP, 5-fosforibosyl-1-pyrofosfát. Názvy genů jsou psány kurzívou. Pro jednoduchost jsou na obrázku vyznačeny pouze některé kroky této dráhy. Aktivita AMP-deaminasy je označena *AMD1* a domnělá aktivita adenosindeaminasy je označena otazníkem. (převzato z Saint-Marc et al., 2009).

1.3.2 Paralela v *E. coli* jako zástupce prokaryot – AMP-nukleosidasa

AMP-deaminasa je zodpovědná za regulaci adenylátu u eukaryot jako jsou savci, ptáci a kvasinky, u prokaryot však tento enzym nebyl detekován. Regulace adenylátu u prokaryot je zřejmě řízena AMP-nukleosidasou (AMP-phosphoribohydrolasou, EC 3.2.2.4), která také degraduje AMP, a to na adenin a ribosa-5-fosfát (Schramm & Lazarik, 1975; Schramm & Leung, 1973). Většina prokaryot, mimo jiné např. *E. coli*, bakterie rodů *Salmonella* a *Micrococcus* obsahují AMP-nukleosidasu (Leung & Schramm, 1984; Schramm & Leung, 1973), která byla poprvé identifikována u *Azotobacter vinelandii* (Hurwitz et al., 1957; Leung & Schramm, 1984).

Gen *amn* pro AMP-nukleosidasu byl detekován na chromozomu *E. coli* (Leung & Schramm, 1984) a kóduje protein o 483 aminokyselinách a velikosti cca 53 800 Da (Leung et al., 1989). Tato AMP-nukleosidasa byla osekvenována, charakterizována a exprimována v kmenech *A. vinelandii* a *E. coli* deficitních na AMP-nukleosidasu.

Pozoruhodnou výjimkou u prokaryot se zdá být mořská bakterie *Benekea natriegens*, která vykazuje aktivitu AMP-deaminasy, ale ne AMP-nukleotidasy (Niven et al., 1977). AMP-deaminasa u eukaryot a AMP-nukleosidasa u prokaryot jsou podobné v tom, že oba enzymy jsou allostericky inhibovány P_i a aktivovány ATP (Chapman & Atkinson, 1973; Leung & Schramm, 1980; Merkler et al., 1989; Yoshino M., 1970; Yoshino et al., 1976) a polyaminy (Yoshino et al., 1978; Yoshino et al., 1979b) a vykazují podobné reakce na energetickou změnu adenylátu (Schramm & Leung, 1973).

Porovnání aminokyselinové sekvence AMP-nukleosidasy s kvasinkovou AMP-deaminasou ukazuje, že AMP-nukleosida *E. coli* nevykazuje žádnou celkovou homologii. Pouze 76 z celkových 483 aminokyselin nukleosidasy se shoduje s 810 aminokyselinami kvasinkové AMP-deaminasy (tj. 16%). Vyskytuje se zde jedna oblast osmi aminokyselin, která je u obou proteinů podobná, šest z osmi těchto aminokyselin je identických. Tato oblast by mohla odpovídat vazebnému místu pro AMP, ATP nebo fosfát, které se nachází u obou enzymů. Analýza DNA a odvozená aminokyselinová sekvence kvasinkové AMP-deaminasy a AMP-nukleosidasy z *E. coli* tedy prokázaly, že se tyto enzymy vyvinuly z odlišných prekurzorů (Meyer et al., 1989) a naznačují tedy konvergentní evoluci (Leung et al., 1989; Meyer et al., 1989; Sollitti et al., 1993).

Tato pozorování společně s pozorováním regulace zásob adenylátu v mnoha organismech přisuzují těmto enzymům společnou metabolickou roli. Společným rysem celého regulačního mechanismu je degradace AMP, která snižuje množství zásob

adenylátu se stabilizací energetické přeměny adenylátu u obou eukaryot i prokaryot (Yoshino et al., 1979a). Pokud je funkční role přiřazená těmto enzymům u prokaryot a eukaryot správná, dá se předpokládat, že řada dalších nižších eukaryot bude také obsahovat AMP-deaminasu.

1.3.3 Substráty, aktivátory a inhibitory AMP-deaminasy

kvasinek

U AMP-deaminasy purifikované z pekařské kvasinky byly charakterizovány kinetické a molekulární vlastnosti. AMP-deaminasa je allostericky aktivována ATP, MgATP a dATP, naopak je inhibována anorganickým fosfátem (P_i) a GTP (Brady & Costello, 1974; Yoshino et al., 1979a; Merkler & Schramm, 1990).

AMP-deaminasa katalyzuje hydrolytické štěpení AMP na produkty IMP a amoniak. Kinetická analýza dále ukázala, že kvasinková AMP-deaminasa má kromě dvou vazebných míst pro AMP (substrát) na každé molekule také stejný počet míst pro P_i (inhibitor). Oproti tomu většina AMP-deaminas z různých živočišných zdrojů má pravděpodobně přinejmenším čtyři interakční místa pro substrát a ostatní ligandy na molekulu enzymu (Yun & Suelter, 1978; Setlow & Lowenstein, 1967; Ellis et al., 1971; Chung & Bridger, 1976; Yoshino et al., 1976; van den Berghe et al., 1977; Coffee & Solano, 1977) a bylo prokázáno, že se skládá ze 4 identických podjednotek (Ellis et al., 1971; Murakami, 1979; Ogasawara et al., 1977).

Bylo zjištěno, že kinetické vlastnosti proteolyzovaného a neproteolyzovaného enzymu jsou stejné a tudíž není N-terminální část potřebná pro katalytickou nebo allosterickou aktivaci (Merkler et al., 1989; Sabina & Mahnke-Zizelman, 2000).

Mezi další substráty tohoto enzymu patří deriváty adeninu, u AMPD *S. cerevisiae* (Yoshino et al., 1979a; Murakami, 1979; Sollitti et al., 1993) stejně jako u *S. pombe* (Sollitti et al., 1993) a *C. albicans* (Thompson et al., 1998). Také byla pozorována degradace (7% rychlosti odbourávání AMP) 5-deoxyadenylové kyseliny AMPD z *S. cerevisiae* (Yoshino et al., 1979a). Pro AMPD mikroskopické houby *Aspergillus sp.* může složit jako substrát také AMP nebo adenosin či 2',3'-isopropylidenadenosin, který je však odbouráván velice pomalu (Alessandrini et al., 2008).

Enzym pekařských kvasinek vykazuje kooperativní vazbu AMP, kde ATP funguje jako pozitivní efektor (Yoshino et al., 1979a). Stejný pozitivní efekt má ATP na AMPD z *S. pombe* (Sollitti et al., 1993) i z *C. albicans*. U *C. albicans* jsou dalšími aktivujícími látkami např. adenin, adenosin, ADP, citrát, D-glucosa, deoxyribosa, glycerol a hypoxanthin. AMPD *C. albicans* vykazuje mírný nárůst aktivity, pokud jsou

kultury pěstovány v přítomnosti dvojmocných kationtů Ca^{2+} , Mg^{2+} a Zn^{2+} (Thompson et al., 1998). Bylo také zjištěno, že enzym z *S. cerevisiae* v různé míře ovlivňují ionty alkalických kovů a ionty kovů alkalických zemin. Efekt kovů alkalických zemin byl však nižší než u iontů alkalických kovů. K^+ a Li^+ byly neúčinnějšími aktivátory, následovaly ionty Na^+ a Cs^+ , přičemž Cs^+ vykazoval inhibici při koncentracích vyšších než 50mM. Při testování živočišných AMP-deaminas byly ionty alkalických zemin zcela neefektivní (Chapman & Atkinson, 1973; Murakami, 1979).

Srovnáním AMP-deaminasy z *S. cerevisiae* s podobným krysím isoenzymem B bylo zjištěno, že obě AMP-deaminasy jsou aktivovány ATP a inhibovány GTP a mohou být aktivovány ionty jako např. Li^+ , Na^+ a K^+ , u kterých není znatelná žádná specifita (Smith & Kizer, 1969). Li^+ je u enzymu kosterního svalstva méně efektivní než Na^+ a K^+ (Smiley et al., 1967; Murakami, 1979). Oba enzymy vyžadují Mg^{2+} pro maximální aktivaci pomocí ATP (Chapman & Atkinson, 1973), na rozdíl od enzymu kosterního svalstva, u kterého Mg^{2+} redukuje efekt ATP (Murakami, 1979). Na druhou stranu je enzym kosterního svalstva silně inhibován ATP při nízkých koncentracích a při vyšších koncentracích tento ligand enzym aktivuje (Murakami, 1979; Tomozawa & Wolfenden, 1970). Negativní kooperativita při studiu kinetiky byla také pozorována při vazbě nukleosidtrifosfátů.

Pro AMP-deaminasy bylo také popsáno široké spektrum inhibitorů, protože jsou potenciálními léčivy a cíly herbicidů. Leupeptin a phenylmethansulfonylfluorid inhibuje AMPD *C. albicans* stejně jako tosyl-L-lysin-chloromethylketon (Thompson et al., 1998). AMPD *S. cerevisiae* a *S. pombe* inhibuje koformicin (Sollitti et al., 1993).

U kvasinkové AMP-deaminasy byl detekován také inhibiční efekt (R)- a (S)-2' deoxykoformicinu, (R)-koformicinu a odpovídajících 5'-monofosfátů (Merkler et al., 1990). Inhibitory AMPD odvozené od koformycinu vykazují silný herbicidní efekt (Dancer al., 1997).

1.3.4 Srovnání kódujících sekvencí DNA AMP-deaminas kvasinek a mikroskopických houbových mikroorganismů

Byly srovnávány kódující DNA sekvence dostupných mikroskopických hub a kvasinek (Tab.1). V textu i v tabulce je uveden počet případných intronů, ze kterého je patrné, že 11 z 50 AMPD obsahuje 1 – 3 introny, kde pouze patogenní *Coccidioides* a *S. pombe* patří mezi kvasinky (pozn. *Ajellomyces* se také může vyskytovat v tzv. kvasinkové formě).

Největší podobnost mezi srovnávanými sekvencemi DNA se projevila u *C. posadasii* (1 intron) a *C. immitis* 95%, *D. discoideum* (3 introny) a *D. discoideum*

94%, *C. dubliniensis* a *C. albicans* 90%. Značná podobnost se vyskytla i u dvojic *N. crassa* a *S. macrospora* 88%, *P. tritici* a *P. teres* 85% a 82% u dvojic *P. marneffeii* (2 introny) a *T. stipitatus* (1 intron).

AMP-deaminasa *S. pombe* a *S. japonicus* jsou spolu s *C. posadasii* a *C. immitis* nejméně podobné s ostatními kvasinkovými AMPD (kolem 45%), což potvrzuje odlišný vývoj těchto kvasinek, které na rozdíl od ostatních obsahují 1 intron. Zajímavé je, že na rozdíl od AMPD *Coccidioides*, které vykazují relativně vysokou podobnost s houbami (běžně kolem 50%), AMPD *Schizosaccharomyces* nedosahuje významné podobnosti ani s kvasinkami (kolem 45%) ani s houbami (kolem 40%).

Za zmínku stojí také *D. discoideum* (3 introny) a *D. purpureum* (2 introny), *A. otae* a *A. gypseum* s podobností 79%, *D. purpureum* (2 introny) a *D. discoideum* 74% a 71% u dvojic *N. fischeri*, *A. fumigatus*; *C. tropicalis* a *C. albicans*.

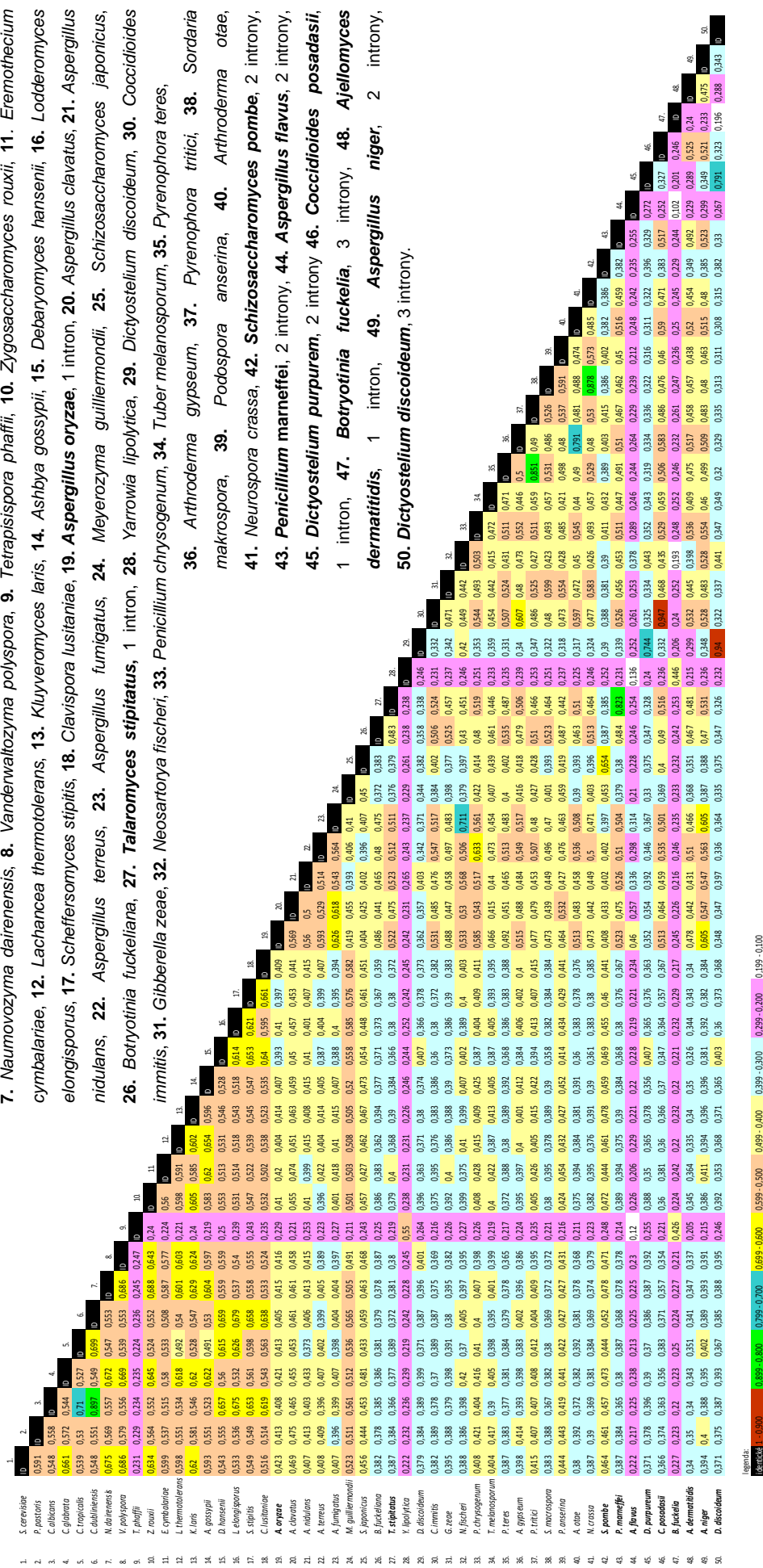
Naopak nejmenší podobnost z celého spektra srovnávaných DNA sekvencí vykazují dvojice *D. discoideum* (3 introny) a *B. fuckelia* (3 introny) 20%, *B. fuckelia* (3 introny) a *N. fischeri* 19%, *A. flavus* (2 introny) a *Y. lipolytica* 14%, *A. flavus* (2 introny) a *T. phaffii* 12% a nejméně schodné jsou *B. fuckelia* (3 introny) a *A. flavus* (2 introny) s 10% podobností.

Dále bylo srovnáváno 59 proteinů, taktéž získaných z databáze UniProt. Výsledná tabulka srovnání zde není uvedena, jen okomentována.

Největší podobnost mezi srovnávanými proteinovými sekvencemi byla viditelná u *A. benhamiae* a *T. rubrum* a to 99%. Výrazná shoda se projevila také u *A. gypseum* a *A. benhamiae* 94%, *T. equinum* a *T. rubrum*; *A. benhamiae* a *T. equinum*; *A. gypseum* a *T. rubrum* 93%. 91% u *M. acridum* a *M. robertsii*, 90% u *P. teres* a *P. tritici*. Dále stojí za zmínku shoda u *S. makrospora* a *N. crassa*; *A. gypseum* a *T. equinum*; *T. tonsurans* a *A. benhamiae* 89%. 88% u *T. tonsurans* a *T. rubrum*. 87% *A. otae* a *T. rubrum*; *A. otae* a *T. equinum*; *A. otae* a *A. benhamiae*; *A. gypseum* a *A. otae*. *P. marneffeii* a *T. stipitatus* 86%. *T. tonsurans* a *T. equinum*; *A. gypseum* a *T. tonsurans* 85%. Nejméně podobná v porovnání s většinou ostatních sekvencí vyšla *P. brasiliensis*, kde nejmenší hodnota schody činila 28,1% a to se sekvencí *C. tropicalis*.

Tabulka 1: Srovnání kódujících sekvencí DNA AMP-deaminas mikroskopických houbových mikroorganismů a kvasinek. Data byla získána z databáze UniProt a dále byla zpracována za použití ClustalW multiple sequence alignment a pomocí softwaru BioEdit 7.0.5.3 sequence identity matrix calculation (Hall, 1999). Tučně zvýrazněny jsou mikroorganismy s introny.

- Saccharomyces cerevisiae*, **2.** *Pichia pastoris*, **3.** *Candida albicans*, **4.** *Candida glabrata*, **5.** *Candida tropicalis*, **6.** *Candida dubliniensis*, **7.** *Naumovozyma dairenensis*, **8.** *Vanderwaltozyma polyspora*, **9.** *Tetrapispora phaffii*, **10.** *Zygosaccharomyces rouxii*, **11.** *Eremothecium cymbalariae*, **12.** *Lachancea thermotolerans*, **13.** *Kluyveromyces laris*, **14.** *Ashbya gossypii*, **15.** *Debaryomyces hansenii*, **16.** *Loedderomyces elongisporus*, **17.** *Scheffersomyces stipitis*, **18.** *Clavispora lusitanae*, **19.** *Aspergillus oryzae*, 1 intron, **20.** *Aspergillus clavatus*, **21.** *Aspergillus nidulans*, **22.** *Aspergillus terreus*, **23.** *Aspergillus fumigatus*, **24.** *Meyerozyma guilliermondii*, **25.** *Schizosaccharomyces japonicus*, **26.** *Botryotinia fuckeliana*, **27.** *Talaromyces stipitatus*, 1 intron, **28.** *Yarrowia lipolytica*, **29.** *Dictyostelium discoideum*, **30.** *Coccidioides immitis*, **31.** *Gibberella zeae*, **32.** *Neosartorya fischeri*, **33.** *Penicillium chrysogenum*, **34.** *Tuber melanosporum*, **35.** *Pyrenopeziza teres*, **36.** *Arthroderma gypseum*, **37.** *Pyrenophora tritici*, **38.** *Sordaria makrospora*, **39.** *Podospora anserina*, **40.** *Arthroderma otae*, **41.** *Neurospora crassa*, **42.** *Schizosaccharomyces pombe*, 2 introny, **43.** *Penicillium marneffei*, 2 introny, **44.** *Aspergillus flavus*, 2 introny, **45.** *Dictyostelium purpureum*, 2 introny **46.** *Coccidioides posadasii*, 1 intron, **47.** *Botryotinia fuckelia*, 3 introny, **48.** *Ajellomyces dermatitidis*, 1 intron, **49.** *Aspergillus niger*, 2 introny, **50.** *Dictyostelium discoideum*, 3 introny.



2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 MATERIÁL

2.1.1 Použité mikroorganismy a plazmidové konstrukty

- kompetentní TOP10 buňky *Escherichia coli* - Invitrogen (Carlsbad, USA)
- kompetentní buňky *Pichia pastoris* X33 – Invitrogen (Carlsbad, USA)
- kompetentní buňky *Saccharomyces cerevisiae* 23344c ura⁻ - Prof. Schmülling (Free University of Berlin, Německo)
- *Schizosaccharomyces pombe* – Dr. Marie Kopecká (Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno)

- pDR197 s genem *AMD1* původem z *S. cerevisiae*
- pGAPZα A s genem *SPBC106.04* původem z *S. pombe*
- pPICZ A s genem *SPBC106.04* původem z *S. pombe*

Konstrukty byly připraveny v rámci bakalářské práce z r. 2010 s názvem „Příprava plazmidových konstruktů pro integraci AMP-deaminasy do kvasinek“.

2.1.2 Komerční kity a software

iBLOT Gel Transfer Stacks Nitrocellulose Regular	Applied Biosystems, Invitrogen (Izrael)
MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit	Epicentre® Biotechnologies (Madison, Wisconsin, USA)
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	Qiagen (Hilden, Německo)
QIAprep Spin Miniprep Kit (250)	Qiagen (Hilden, Německo)
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas (Ontario, Kanada)
Super Signal West Chemiluminescent Substrate 500 ml kit	ThermoScientific (Rockford, USA)

BioEdit 7.0.5.3. volně dostupný na internetu (Hall T. A., 1999)

2.1.3 Enzymy

DNase Turbo	Ambion (Austin, USA)
Phusion DNA polymerase	Finnzymes (Vantaa, Finsko)
RevertAid H Minus M-MULV Reverse Transcriptase	Fermentas (Ontario, Kanada)

Restrikční endonukleazy:

*Pst*I, *Sal*I

*Bln*I, *Sac*I

Fermentas (Ontario, Kanada)

Takara (Shiga, Japonsko)

2.1.4 Chemikálie

1 kb DNA Ladder

agar

agarosa

AgNO₃

akrylamid

amidočern 10B

amoniumperoxidisulfát APS

ampicilin

biotin D (vitamín H)

BSA

Coomassie Brilliant Blue R-250

DMSO

dNTP Mix

ethidiumbromid

Gene Ruller 1kb DNA Ladder (marker)

glukosa

glycerol

histidin

isopropanol

kvasničný extrakt

KODAK vývojka

KODAK ustalovač

LB broth Hight salt

Loading Buffer

methionin

NaCl

Ni-NTA agarose

oligo(dT)primer

PageRuler™ Unstained Protein Ladder 10-200 kDa

pepton

phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1) pH 8

PMSF (phenylmethanesulfonylfluorid)

Fermentas (Ontario, Kanada)

Himedia (Indie)

Amresco (Ohio, USA)

Lach – Ner (Neratovice, ČR)

Sigma – Aldrich (Praha, ČR)

Merk (Darmstadt, Německo)

Fluka (Basel, Švýcarsko)

Sigma – Aldrich (Praha, ČR)

NeoLab (Heidelberg, Německo)

Takara (Shiga, Japonsko)

Fluka (Basel, Švýcarsko)

Duchefa (Haarlem, Nizozemí)

Fermentas (Ontario, Kanada)

NeoLab (Heidelberg, Německo)

Fermentas (Ontario, Kanada)

Lach – Ner (Neratovice, ČR)

Penta (Chrudim, ČR)

Fluka (Basel, Švýcarsko)

MACH (Ostrava, ČR)

Sigma – Aldrich (Praha, ČR)

Sigma – Aldrich (Praha, ČR)

Sigma – Aldrich (Praha, ČR)

Duchefa (Haarlem, Nizozemí)

Takara (Shiga, Japonsko)

Roanal (Maďarsko)

Lach – Ner (Neratovice, ČR)

Qiagen (Hilden, Německo)

Fermentas (Ontario, Kanada)

Fermentas (Ontario, Kanada)

Duchefa (Haarlem, Nizozemí)

Sigma – Aldrich (Praha, ČR)

Sigma – Aldrich (Praha, ČR)

tetraethylmethylenediamid TEMED	Fluka (Basel, Švýcarsko)
TRI Reagent® Solution	Ambion (Austin, USA)
tryptofan	Lachema (Brno, ČR)
SOC médium	Invitrogen (Carlsbad, USA)
sorbitol	Duchefa (Nizozemí)
yeast extract	Sigma – Aldrich (Praha, ČR)
yeast nitrogen base	Difco (Kansas, USA)
water DEPC-treated, Rnase & Dnase free	Ambion (Austin, USA)
zeocin	Duchefa (Haarlem, Nizozemí)
monoclonal Anti-polyHistidine Peroxidase Conjugate - Clone HIS-1, ATP, AMP, IMP, GTP, BAP, IP, IPR a většina dalších použitých chemikálií byla zakoupena od firmy Sigma – Aldrich (Praha, ČR).	

2.1.5 Přístrojové vybavení

autokláv MLS 3020	Sanyo (Mnichov, Německo)
centrifuga Mikro200R	Hettich (Kirchlengern, Německo)
centrifuga Rotanta 460R	Hettich (Kirchlengern, Německo)
centrifuga MR23i Jouan	Thermo Fischer Scientific (Asheville, USA)
digestoř	Forlab (Valašské meziříčí, ČR)
elektroforéza Casting System Compact	Biometra (Goettingen, Německo)
elektroforéza-proteiny- Mini-PROTEAN 3 Cell	BIO-RAD (Kalifornie, USA)
elektroporátor ECM 399	BTX (San Diego, USA)
french press FA080	Thermo Fischer Scientific (Asheville, USA)
iBlot® Dry Blotting System	Invitrogen (Carlsbad, USA)
laminární box	Forlab (Valašské meziříčí, ČR)
míchačka magnetická RH basic 2	IKA (Schoeller, Německo)
micro-spektrofotometr (ACTGene), NAS-99	INYDIA (Madrid, Španělsko)
mikroskop Olympus CX21FS3-5	Olympus (Tokio, Japonsko)
inkubátor biologický	POLL–Lab (Bielsko-Biala, Polsko)
pH metr Jenway 3505	Jenway (Staffordshire, UK)
orbitální inkubovaná třepačka SI-900R	JEIO TECH (Seoul, Korea)
spektrofotometr	Agilent (Santa Clara, USA)
termoblok Thermomixer comfort	Eppendorf (Říčany u Prahy, ČR)
termostat oběhový F12-ED	Julabo (Seelbach, Germany)
termocykler T - gradient	Biometra (Goettingen, Německo)
termocykler Mini cykler MJ Research	Biometra (Goettingen, Německo)

transiluminátor s bílým světlem TW-200	Alpha Ingotech (Kalifornie, USA)
transiluminátor UV Superbright	Vilber Lourmat (MarneLaVallee, Francie)
třepačka inkubovaná Heidolph unimax 1010	Heidolph (Schwabach, Německo)
zdroj Standard power Pack P25	Biometra (Goettingen, Německo)
zdroj Power PAC300	BIO-RAD (Kalifornie, USA)

ostatní:

filtry Ophthalsart	Sartorius Stedim Biotech (Goettingen, Německo)
kyvety s filtry 30,000 MWCC	Millipore (Německo)
Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film	Roche (Basel, Švýcarsko)
skleněné kuličky Glass beads 425-600µm	Sigma – Aldrich (Praha, ČR)

2.2 METODY

2.2.1 Složení a příprava kultivačních médií

Veškerá manipulace se sterilními médii a roztoky byla prováděna ve sterilním prostředí laminárního boxu, aby byla zachována sterilita veškerého pracovního materiálu.

zásobní 10x koncentrované YNB tekuté médium = Yeast Nitrogen Base

Podle návodu na obalu od výrobce bylo připraveno zásobní 10x koncentrované YNB tekuté médium (13,4%) rozpuštěním 67 g práškového YNB v 485 ml destilované vody a tento roztok byl sterilizován autoklávováním při 121°C po dobu 15 minut. Po vyautoklávování a schlazení média byly přimíchány roztoky jednotlivých aminokyselin – finální objem 500 ml. Zásobní 10x koncentrované médium bylo vždy před použitím ředěno sterilní destilovanou vodou.

Aminokyseliny

Byly připraveny zásobní roztoky aminokyselin histidinu, tryptofanu a methioninu a to tak, že bylo 50 mg každé AMK rozpuštěno v 10 ml sterilní vody. Roztoky AMK byly vždy přidávány do zásobního 10x koncentrovaného YNB tekutého média tak, že tvořily 1/100 jeho objemu.

20% glukosa

Roztok byl připraven rozpuštěním 20 g glukosy v 80 ml destilované vody. Roztok byl následně v laminárním boxu pomocí stříkačky přefiltrován přes sterilní filtr Ophthalsart.

YNB selekční agarové plotny

Složení média bylo následující: 0.68% yeast nitrogen base w/v-amino acids Difco, 2% agar, 2% glukosa. 250 ml tohoto média bylo připraveno rozpuštěním 5 g agaru v 212,3 ml destilované vody. Po vyautoklávování a mírném ochlazení bylo přidáno 12,7 ml 10x koncentrovaného YNB média a 25 ml 20% sterilní glukosy, aby výsledný roztok byl 2%. Vše bylo promícháno a agarové médium bylo po 25 ml rozlito na Petriho misky a nechalo se ztuhnout.

YNB tekuté médium

Složení média bylo následující: 0.68% yeast nitrogen base w/v-amino acids Difco, 2% glukosa. 250 ml tohoto média bylo připraveno smísením 12,7 ml 10x koncentrovaného

YNB média s 212,3 ml sterilní destilované vody a 25 ml 20% sterilní glukosy, aby výsledný roztok byl 2%.

YPDS agarové plotny = Yeast Extrakt Peptone Dextrose Medium with Sorbitol

Složení média bylo následující: 1% yeast extrakt, 2% pepton, 1M sorbitol, 2% agar, 2% glukosa. 250 ml tohoto média bylo připraveno rozpuštěním 2,5 g yeast extraktu, 5 g peptonu, 45,55 g sorbitol a 5 g agaru v 225 ml destilované vody. Po vyautoklávování a schlazení média cca na 50°C bylo do média přidáno 25 ml 20% glukosy, tak aby byl výsledný roztok glukosy v médiu 2%. A v neposlední řadě také antibiotikum ZeocinTM v odpovídající koncentraci (100 nebo 1000 µg/ml). Poté bylo takto připravené sterilní médium v laminárním boxu rozlito po asi 25 ml do sterilních Petriho misek.

Zásobní roztoky antibiotik

Zásobní roztoky Zeocinu o koncentraci 100 mg/ml a 1000 mg/ml byly připraveny rozpouštěním ve sterilní vodě. Do média byl roztok antibiotika přidáván tak, aby bylo antibiotikum 1000x zředěno.

YPD tekuté médium = Yeast Extrakt Peptone Dextrose Medium

Složení média bylo následující: 1% yeast extrakt, 2% pepton, 2% glukosa. 250 ml tohoto média bylo připraveno rozpuštěním 2,5 g yeast extraktu a 5 g peptonu v 225 ml destilované vody a sterilizováno. Po schlazení média bylo opět přidáno 25 ml 20% glukosy, tak aby výsledný roztok byl 2% a ZeocinTM v odpovídající koncentraci. Při ověřování exprese AMP-deaminasy v kvasinkách s konstruktem pPICZ A + *SPBC106.04* byla v tomto médiu nahrazena glukosa methanolem. Methanol tvořil 0,5% celkového objemu média.

LB tekuté médium

1litr LB média byl připraven rozpuštěním 25 g práškového média v destilované vodě, pH roztoku bylo pomocí NaOH upraveno na 7,2. Takto připravený roztok byl sterilizován autoklávováním. Před vlastní kultivací bylo do tekutého média přidáno antibiotikum ampicilin o finální koncentraci 100 µg/ml.

Zásobní roztok antibiotika

Zásobní roztok Ampicilinu o koncentraci 100 mg/ml byl připraven rozpouštěním ve sterilní vodě. Do média byl roztok antibiotika přidáván tak, aby bylo antibiotikum 1000x zředěno.

LB selekční agarové plotny

Pevné LB médium bylo připraveno obdobně jako tekutého LB, s tím rozdílem, že byl přidán agar o výsledné koncentraci 2% w/v. Takto připravený roztok byl sterilizován autoklávováním a po ochlazení sterilního média na cca 50°C bylo do roztoku přidáno antibiotikum Ampicilin a médium bylo v laminárním boxu rozlito po asi 25 ml do sterilních Petriho misek.

MD agarové plotny = Minimal Dextrose Medium

Samotné složení MD média bylo následující: 1,34% YNB, 0,00004% biotin, 2% glukosa a 1,5% agar. 250 ml média bylo připraveno rozpuštěním 3,75 g agaru ve 200 ml destilované vody. Takto připravený roztok byl sterilizován autoklávováním. K 200 ml sterilního agaru bylo přidáno 25 ml 10x YNB, 25 ml 20% glukosy a 5 µl zásobního biotinu – vše bylo promícháno a nalito na Petriho misky.

Biotin

Zásobní roztok o koncentraci 40 mg/ml byl připraven rozpuštěním 0,04 g biotinu v 1 ml DMSO.

MM agarové plotny = Minimal Methanol Medium

Složení MD média bylo následující: 1,34% YNB, 0,00004% biotin, 0,5% methanol, 1,5% agar. 250 ml média bylo připraveno rozpuštěním 3,75 g agaru ve 225 ml destilované vody a opět bylo ke sterilizaci využito autoklávování jako v předchozím případě. K 225 ml sterilního agaru bylo přidáno 25 ml 10x YNB, 5 µl zásobního biotinu a 1,25 ml methanolu – vše bylo promícháno a nalito na Petriho misky.

MGY tekuté médium = Minimal Glycerol Medium

Složení média bylo následující: 1,34% YNB, 1% glycerol, 0,00004% biotin.

Na přípravu 1l média bylo nutno zautoklávovat 890 ml destilované vody a přidat 100 ml 10x YNB, 10 ml glycerolu a 5 µl zásobního biotinu.

MMY tekuté médium = Minimal Methanol Medium

Složení média bylo následující: 1,34% YNB, 0,00004% biotin, 0,5% methanol.

Na přípravu 1l média bylo nutno zautoklávovat 895 ml destilované vody a přidat 100 ml 10x YNB, 5 µl zásobního biotinu a 5 ml methanolu.

YE tekuté médium

Složení média bylo následující: 5 g/L yeast extrakt, 30 g/L glukosa.

2.2.2 Příprava elektrokompetentních buněk *Pichia pastoris* X33

Příprava elektrokompetentních buněk probíhala podle návodu v manuálu pPICZ A, B, and C (*Pichia* expression vectors for selection on Zeocin™ and purification of secreted, recombinant proteins) od firmy Invitrogen. Tyto buňky byly poté uchovávány zamražené na -80°C. Takto připravené buňky byly využívány během elektroporací konstrukty pPICZ A a pGAPZα A s genem *SPBC106.04*.

2.2.3 Izolace DNA

2.2.3.1 Izolace plazmidové DNA (pDR197 + *AMD1*) z kvasinek

Narostlé kultury kvasinek v tekutém YNB médiu byly pozorovány pod světelným mikroskopem, aby byly vyloučeny kontaminované vzorky a bylo ověřeno, zda se opravdu jedná o kvasinky. Vyizolovaná DNA poté sloužila k transformaci kompetentních TOP10 buněk *E. coli* pro ověření přítomnosti a správnosti vneseného konstruktů.

➤ Izolace pomocí skleněných kuliček

- 4 ml narostlé kultury kvasinek v tekutém YNB médiu byly stočeny při 16000 g po dobu 2 min při laboratorní teplotě.
- Pelet byl rozsuspendován v 500 µl sterilní vody a znovu stočen 2 min.
- Pelet byl následně rozsuspendován v 200 µl připraveného lyzačního pufru (2 ml TritonX-100; 5 ml 20% SDS; 2 ml 5 M NaCl; 2 ml 1 M Tris-Cl pH 8; 2 ml 0,5 M EDTA pH 8, objem doplněn do 100 ml destilovanou vodou) a byly přidány skleněné kuličky, až nad nimi byla pouze tenká hladina.
- Dále bylo přidáno 200 µl směsi phenol:chloroform:isoamylalkohol (v poměru 25:24:1).
- Tato směs byla vortexována 30 s při max. rychlosti a poté dána na 30 s na led, tento krok se ještě 2x opakoval.
- Následovala 5 min centrifugace při 16000 g a 4°C, po níž byla vrchní vrstva odebrána do čisté mikroskopické pipety.
- Dalším krokem byla precipitace stejným objemem 100% isopropanolu (cca 200 µl), směs byla kývavým pohybem důkladně promíchána.
- Centrifugace 20 min/ 16000 g/ 4°C.
- K peletu bylo přidáno 750 µl vychlazeného 70% ethanolu a pelet byl rozsuspendován.
- Centrifugace 5 min/ 16000 g/ 4°C, ethanol byl odpipetován a pelet byl sušen 10 min v laminárním boxu.

- Pelet byl rozsuspendován v 50 µl sterilní vody a uchováván při -20°C.
- **Přečištění vyizolované DNA pomocí propojení Kitů QiaPrepSpin – MiniprepKit Qiagen a GelExtractionKit Qiagen**
- Do vyizolované DNA z kvasinek bylo přidáno 250 µl P1 pufru a směs byla kývavým pohybem promíchána.
- Bylo přidáno 250 µl pufru P2.
- Do směsi bylo také přidáno 350 µl pufru M3 a tato směs byla kývavým pohybem promíchávána dokud nezmizelo modré zbarvení.
- Centrifugace 10 min/ max. rychlostí/ 4°C.
- Supernatant byl přepipetován do modrých kolonek a následovala centrifugace 1 min.
- Do kolonky bylo přidáno 500 µl PB roztoku, centrifugace 1 min/ 16000 g/ 4°C.
- Bylo přidáno 750 µl PE pufru s ethanolem, centrifugace 1 min/ 16000 g/ 4°C.
- Stočení naprázdno 2 min/ 16000 g/ 4°C.
- Následovala eluce 50 µl sterilní vody (inkubace 1 min), centrifugace 2 min/ 16000 g/ 4°C.
- K těmto výsledným 50 µl bylo přidáno 150 µl QG pufru a směs byla kývavým pohybem promíchána.
- Ke směsi bylo přidáno 75 µl 100% isopropanolu, vše bylo přepipetováno na fialovou kolonku a následovala centrifugace 1 min/ 16000 g/ 4°C.
- Následovalo promývání se 700 µl PE pufru s ethanolem a centrifugace 1 min/ 16000 g/ 4°C.
- Centrifugace naprázdno 2 min/ 16000 g/ 4°C.
- Eluce byla provedena 10 µl sterilní vody (inkubace 1 min), centrifugace 2 min na max. otáčky při laboratorní teplotě.

2.2.3.2 Izolace plazmidové DNA z TOP10 buněk *E. coli*

Plazmidová DNA po izolaci z *E. coli* sloužila jako materiál pro ověření přítomnosti pDR197 + *AMD1* v kvasinkách.

Izolace probíhala podle následujícího postupu:

- 2 ml bakteriální kultury kultivované v LB médiu 16 – 24 hodin byly centrifugovány 2 min při 16000 g za laboratorní teploty.
- Byl odstraněn supernatant a pelet byl rozsuspendován v 250 µl roztoku pufru P1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM Na₂EDTA, 0,1 mg/ml RNAasy, pH 8).

- Dále bylo ke směsi přidáno 250 µl roztoku pufru P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS). Tato směs byla kývavým pohybem promíchána a poté inkubována 5 min při laboratorní teplotě.
- Bylo přidáno 250 µl roztoku pufru P3 (3 M KCH₂COOH, pH 5,5), směs byla kývavým pohybem promíchána a inkubována 5 min na ledu.
- Následovala centrifugace 10 min/ 16000 g/ 4°C.
- Supernatant byl odebrán do čisté mikrozkušavky, bylo přidáno 500 µl 100% isopropanolu a směs byla důkladně promíchána.
- Následovala centrifugace 20 min při 16000 g za laboratorní teploty.
- K peletu bylo přidáno 750 µl 70% vychlazeného ethanolu. Centrifugace 1 min při 16000 g za laboratorní teploty, ethanol byl odpipetován a pelet byl sušen 10 min v laminárním boxu.
- Pelet byl rozsuspendován v 50 µl sterilní vody a uchován při – 20°C.

2.2.3.3 Izolace genomové DNA z kvasinek

Izolace genomové DNA byla prováděna pomocí kitu Epicentre® Biotechnologie „MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit“. Vyizolovaná genomová DNA potom sloužila jako templát do PCR reakce.

Izolace probíhala podle následujícího postupu:

- 1,5 ml kvasinkové kultury kultivované v YPD médiu (OD₆₀₀ = 8 – 10) bylo centrifugováno 2 – 5 min při 10000 g, supernatant byl odstraněn.
- Pelet byl rozsuspendován ve 300 µl „Yeast Cell lysis solution“.
- Následovala inkubace při 65°C po dobu 15 min, poté byly vzorky dány na 5 min na led.
- Bylo přidáno 150 µl „MPC Protein precipitation reagent“, vortexováno 10 s.
- Centrifugace 10 min/ 10000 g.
- Supernatant byl přenesen do čisté mikrozkušavky a bylo přidáno 500 µl 100% isopropanolu a směs byla kývavým pohybem promíchána.
- Centrifugace 10 min při max. rychlosti.
- Supernatant byl odpipetován a pelet DNA byl promyt 0,5 ml 70% ethanolu. Ethanol byl odpipetován, vzorek byl krátce stočen a zbytky ethanolu odpipetovány.
- DNA byla rozsuspendována ve 35 µl TE pufru a byl přidán 1 µl RNasy A o koncentraci 5 µg/ µl, směs byla promíchána a inkubována 30 min při 37°C.
- Poté byla na nanodropu ACTGene proměřena koncentrace genomové DNA.

Takto získané vzorky genomové DNA byly poté uchovávány při -80°C.

2.2.4 Izolace kvasinkové RNA

Vyizolovaná RNA sloužila jako templát pro přepsání do cDNA pomocí kitu firmy Fermentas RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit.

Izolace probíhala podle následujícího postupu:

- 1 – 2 ml zamražené kvasinkové kultury pěstované v YPD médiu byly rozdrceny v třecí misce pomocí tekutého dusíku a trochy mořského písku.
- K takto připravenému materiálu byl přidán 1 ml TRI Reagent® Solution (v digestoři) a homogenizovaný vzorek byl inkubován při laboratorní teplotě 5 min.
- Následně bylo přidáno 0,2 ml chloroformu (v digestoři), směs byla důkladně protřepána a poté byla inkubována při laboratorní teplotě 2 – 3 min.
- Následovala centrifugace při 12000 g/ 15 min/ 2°C. Směs se rozdělila na tři fáze: nižší růžovou fází obsahující fenol-chloroform, mezifázi a bezbarvou horní fází obsahující RNA.
- Z horní bezbarvé fáze byla dále izolována RNA. Tato horní fáze byla odpipetována do čisté mikroskopické zkumavky a byla provedena precipitace RNA přidáním 500 µl 100% isopropanolu a směs byla protřepána.
- Následovala inkubace 10 min za laboratorní teploty a po ní centrifugace při 12000 g/ 10 min/ 2°C.
- Supernatant byl odstraněn a pelet obsahující RNA byl promyt 1 ml 70% ethanolu – krátce zvortexováno.
- Po promíchání směsi následovala centrifugace 7500 g/ 5 min/ 2°C a 10 min vysušení RNA v digestoři.
- RNA byla poté rozpuštěna v 50 µl RNAsa-free vody a byla proměřena její koncentrace pomocí nanodropu ACTGene.
- Následovalo ošetření RNA DNAsou (pro odstranění kontaminující DNA). Ke vzorku byly přidány 2 µl DNAsy Turbo a příslušné množství pufru a po promíchání následovala inkubace 30 min při 37°C, poté byl přidán další 1 µl DNAsy s následnou inkubací po dobu 30 min.
- Poté bylo přidáno 5 µl inaktivačního reagentu a směs byla inkubována a průběžně vortexována při laboratorní teplotě 5 min.
- Dalším krokem byla centrifugace 10000 g/ 2 min/ 4°C. Horní vrstva byla odpipetována, v ní byla opět změřena koncentrace RNA pomocí nanodropu ACTGene.

Takto získané vzorky RNA byly poté uchovávány při -80°C.

2.2.5 Syntéza cDNA

Získaná RNA z kroku 2.2.4 sloužila jako templát pro přepsání do cDNA. Syntéza cDNA byla nastavena za pomoci setu firmy Fermentas RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit. cDNA poté sloužila jako templát do PCR reakce pro ověření exprese vnášeného genu *SPBC106.04*.

- Reakční směs o celkovém objemu 10 µl obsahovala 10 ng - 5 µg celkové RNA, 0,5 µl oligo(dT), 2 µl reakčního pufru, 1 µl 10 mM dNTP a 0,5 µl RevertAid H Minus Reverse Transkriptase a směs byla do celkového objemu 10 µl doplněna DEPC vodou.
- Připravená reakční směs byla inkubována 60 min při 42°C.
- Reakce byla zastavena zvýšením teploty na 70°C po dobu 10 min a poté byla mikrozkušavka s cDNA přemístěna na led.

Takto získané vzorky cDNA byly poté uchovávány při -80°C.

2.2.6 Ověření přítomnosti vnášeného genu *SPBC106.04* pomocí PCR

Jako templát do PCR sloužil supernatant po rozbití kvasinkové kultury tekutým dusíkem či kvasinková cDNA viz. kapitola 2.2.5 nebo kvasinková genomová DNA viz. kapitola 2.2.3.3.

➤ Rozbíjení kvasinkových buněk pomocí tekutého dusíku

Získané supernatanty byly použity jako templáty do PCR reakce pro ověření přítomnosti integrovaného genu *SPBC106.04*.

Postup byl následující:

- Každý jednotlivý vzorek kultury, cca 2 ml, byl stočen 2 min při 5000 g a 4°C.
- Pelet byl rozsuspendován v 50 – 100 µl sterilní vody.
- Takto rozsuspendovaný pelet byl po dobu 1 min zmražen v tekutém dusíku, následně byly vzorky přendány do předem vytemperovaného termobloku na 60°C na dobu 3 min.
- Zmražení v dusíku a rozmražení v termobloku bylo ještě 2x zopakováno.
- Poté, co byly vzorky vyndány z termobloku byly znovu stočeny a do čistých mikrozkušavek byly odebrány příslušné supernatanty.

➤ **PCR reakce**

Podmínky jednotlivých PCR reakcí byly následující:

1. Počáteční denaturace 1 min (pro cDNA), 5 min (pro gDNA) / 98°C
2. Denaturace 30 s / 98°C
3. Připojení primerů 30 s (v závislosti na použitém primeru byla nastavena teplota)
4. Elongace 160 s / 72°C
5. Závěrečná elongace 4 - 10 minut / 72°C

Body 2 – 4 se cyklicky 40 - 45x opakovaly (v závislosti na použitém primeru).

K reakcím byly používány dvě různé dvojice primerů. Jedna dvojice specifická pro ohraničení celé oblasti genu (teplota pro připojení primerů byla 60°C) a druhá dvojice specifická k určité vnitřní oblasti genu *SPBC106.04* (teplota pro připojení primerů 56°C).

Sekvence primerů pro ohraničení celé oblasti genu *SPBC106.04*:

FP 5'-ATGTCTGTACGTCCTCTCTCACTATGT-3'

RP 5'-ATCTTTCAAATCTTGGCTACTGCT-3'

Sekvence primerů pro ohraničení určité vnitřní oblasti genu *SPBC106.04*:

FP 5'-CATTCTGCTCTTGCGAATCA-3'

RP 5'-ATGGAGACATTGCGATAGGG-3'

Složení reakční směsi o celkovém objemu 10 µl:

3,4 – 4,4 µl PCR vody (v závislosti na přidání DMSO)

2 µl 5x Buffer Phusion HF

0,4 µl 10 mM dNTP

1 µl 10 mM „forward“ primeru

1 µl 10 mM „reverse“ primeru

1 µl templátu (cDNA/gDNA)

(1 µl DMSO)

0,2 µl Phusion DNA Polymerasy

2.2.7 Štěpení restrikčními endonukleasami

2.2.7.1 Restrikční analýza DNA

Restrikční enzymy sloužily jako kontrolní nástroj pro analýzu správnosti připravených konstruktů v *E. coli* a *S. cerevisiae*. DNA byla štěpena enzymy *Pst*I a *Sa*II, podle návodu příslušného dodavatele (Fermentas) při 37°C do druhého dne. Takto připravené fragmenty DNA byly vizualizovány pod UV po elektroforetické separaci v přítomnosti ethidiumbromidu.

2.2.7.2 Linearizace plazmidu

Jiné restrikční endonukleasy sloužily k linearizaci konstruktů pGAPZ α A + SPBC106.04, a to konkrétně *Bln*I, u pPICZ A + SPBC106.04 tento úkol plnil enzym *Sa*I, aby mohly být tyto konstrukty poté vneseny pomocí elektroporace do elektrokompetentních kvasinek *P. pastoris* X33, kde byly integrovány pomocí homologní rekombinace do genomu. Obě restrikční endonukleasy štěpí při 37°C a jsou dodávány firmou Takara.

pPICZ A + SPBC106.04

Linearizace byla prováděna pomocí restrikční endonukleasy *Sa*I (Takara) při 37°C 2 – 4 hodiny (1 μ l L pufru, 0,5 μ l enzymu *Sa*I, 10 μ g DNA a doplněno do 10 μ l sterilní vodou). Po restrikci byl konstrukt přečištěn přes kolonky QIAquick Gel Extraction Kit firmy Qiagen (10 μ l restrikce + 50 μ l QG pufru a 30 μ l 100% isopropanolu bylo dáno na kolonku, stočeno 1 min při 14000 g, poté bylo přidáno 700 μ l PE pufru, stočeno 1 min při 14000 g, stočeno 2 min naprázdno a eluováno 11 μ l PCR vody).

pGAPZ α A + SPBC106.04

V tomto případě byla linearizace prováděna pomocí restrikční endonukleasy *Bln*I (Takara) při 37°C 2 – 4 hodiny (1 μ l K pufru, 0,5 μ l enzymu *Bln*I, 10 μ g DNA a do 10 μ l doplněno sterilní vodou). Po restrikci následovalo přečištění obdobně jako v případě pPICZ A + SPBC106.04.

2.2.8 Transformace

2.2.8.1 Elektroporace

Elektroporace sloužila k vnesení jednotlivých konstruktů do určených kvasinkových buněk. Nejprve bylo nutné připravit roztok sorbitolu a řádně jej vychladit (30 min při -20°C).

1 M sorbitol

Roztok byl připraven rozpuštěním 18,22 g sorbitolu v destilované vodě a objem byl doplněn do 100 ml.

2.2.8.1.1 Elektroporace kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* 23344c ura⁻

Elektroporace buněk *S. cerevisiae* 23344c ura⁻ konstruktem pDR197 + *AMD1* probíhala následovně:

- Mikrozkuhavka s 50 µl kompetentních buněk *S. cerevisiae*, která byla vytažena z -80°C byla ponechána po dobu 5 minut na ledu, aby buňky roztály.
- Následovala centrifugace v důkladně vychlazené centrifuze 2 min/ 5000 g/ 1 – 2°C.
- Supernatant byl odstraněn a pelet byl jemně rozsuspendován v 1 ml předem řádně vychlazeného 1 M sorbitol.
- Centrifugace a rozsuspendování peletu byly ještě 2x zopakovány. Mikrozkuhavky byly udržovány stále na ledu.
- Poslední pelet byl rozsuspendován v 80 µl 1 M sorbitolu a byl přidán 1 µl vyzolované plazmidové DNA s konstruktem pDR197 + *AMD1*, tato směs byla jemně promíchána špičkou pipety.
- Transformační směs byla přepipetována na dno předem vychlazené elektroporační cely. Cely byla důkladně osušena a vložena do elektroporátoru nastaveného na 1.500 kV.
- Byl udělen elektropulz, který musí trvat minimálně 4 ms (ideálně 5 ms) a do cely bylo okamžitě napipetováno 300 µl vychlazeného 1 M sorbitolu (předem připravený ve sterilní mikrozkuhavce) a buňky byly rozsuspendovány.
- Kvasinky byly po elektrošoku rozetřeny hokejkou na YNB selekční agarové plotny a následovala inkubace po dobu 2 – 3 dnů při 30°C ve statickém inkubátoru.
- Narostlé kolonie byly přeočkovány do 5 ml tekutého YNB média a inkubovány 2 – 3 dny při 30°C a rychlosti 200 rpm/min.

2.2.8.1.2 Elektroporace kvasinek *P. pastoris* X33

V případě kvasinky *P. pastoris* X33 sloužila elektroporace k vnesení úseku pPICZ A + SPBC106.04 nebo pGAPZ α A + SPBC106.04 do genomu kvasinky.

Elektroporace probíhala následovně:

- K 80 μ l elektrokompetentních buněk *P. pastoris* X33, které byly 5 minut ponechány na ledu, byly přidány 2 μ l linearizovaného plazmidu pPICZ A + SPBC106.04 a směs byla opatrně promíchána špičkou pipety.
- Směs byla přepipetována do vychlazené (0 – 4°C) elektroporační kyvety a inkubována na ledu 5 min (pro každý vzorek byly nastaveny 2 – 4 elektroporace).
- Byla provedena elektroporace obdobně jako u *S. cerevisiae*, okamžitě byl do kyvety přidán 1 ml vychlazeného 1M sorbitolu a obsah kyvety byl přenesen do sterilní mikrozkuřavky.
- Následovala statická inkubace (bez třepání) 1 – 2 hodiny/ 30°C (možno po 1 h inkubace přidat 1 ml YPD média a inkubovat při třepání rychlostí 200 rpm/min při 30°C další hodinu).
- Kultura byla nanesena na YPDS agarové plotny se 100 μ g/ml zeocinu (po 200 μ l), následovala inkubace 2 – 3 dny při 30°C.

2.2.8.2 Metoda „heat shock“

„Heat shock“ metoda byla využita k transformaci kompetentních TOP10 buněk *E. coli* přečištěnou plazmidovou DNA (pDR197 + AMD1) z *S. cerevisiae*.

Transformace TOP10 buněk *E. coli* probíhala následovně:

- Mikrozkuřavka s 50 μ l kompetentních buněk *E. coli*, která byla vytažena z -80°C byla ponechána po dobu 5 min na ledu, aby buňky roztály.
- K buňkám byla přidána vyizolovaná DNA z kvasinek (10 μ l), následovalo jemné promíchání tak, aby nedošlo k poškození buněk.
- Takto promíchaná směs se nechala stát 30 min na ledu.
- Dále byla tato směs vložena na 45 s při 42°C do předem vytemperovaného termobloku (tzv. „heat-shock“).
- Buňky se ochladily na ledu 2 – 5 min, a poté se k nim přidalo 450 μ l SOC média.
- Následovala inkubace po dobu 1 hodiny při 37°C (při 160 rpm/min).
- Buňky byly poté vysety na příslušné LB agarové plotny (2% agar) s ampicilinem o koncentraci 100 μ g/ml a byly inkubovány do druhého dne při 37°C ve statickém inkubátoru.

2.2.9 Kultivace

Veškeré práce byly prováděny ve sterilním prostředí laminárního boxu. Kultivace probíhala ve výše popsaných médiích.

Kultivace *E. coli*

Kultivace tohoto bakteriálního mikroorganismu transformovaného konstruktem nesoucí vektor pDR197 probíhala na LB agarových plotnách a v LB tekutém médiu s ampicilinem o koncentraci 100 µg/ml při 37°C do druhého dne.

Kultivace *S. cerevisiae* 23344c ura⁻

Nejdříve byla připravena 5 – 10 ml inokula, která byla kultivována přes noc při 30°C. Jako kontrola sloužila WT *S. cerevisiae*. Kultury byly pěstovány paralelně ve dvou různých médiích, a to v minimálním YNB médiu s glukosou a kompletním YPD médiu. Každá z kultur byla takto kultivována v objemu po 50 ml po dobu 5 dnů. Důležité je, že do WT kultury pěstované v YNB médiu bylo nutno přidávat uracil, jelikož tato kultura je ura⁻ (deficientní v syntéze uracilu). Do YNB kultivačního média byl zásobní roztok uracilu přidávána vždy tak, aby tvořil 1/100 celkového objemu. Po každých 24 hodinách byla jedna série testovaných kultur stočena 5min/ 4500 g/ 4°C, supernatant odlit a pelet zmrazen v tekutém dusíku a následně skladován při -80°C.

uracil

Zásobní roztok uracilu byl připraven rozpuštěním 5 mg uracilu v 10 ml sterilní vody.

Kultivace *P. pastoris* X33

Po elektroporaci byly narostlé kolonie pomnoženy v tekutém YPD médiu se zeocinem o koncentraci 100 µg/ml, kde byly kultivovány při stejné teplotě opět po dobu 2 – 3 dnů. Pro detekci mnohonásobné integrace vnášeného úseku byly připraveny YPDS agarové plotny s koncentrací zeocinu 1000 µg/ml, na které byly zaočkovány již vyselektované vzorky a kultivace probíhala opět při 30°C po dobu 2 – 3 dnů (měly by růst pouze ty, které obsahují větší počet integrací).

Kvasinky nesoucí konstrukt pGAPZα A + *SPBC106.04* byly kultivovány jak v YPD médiu, tak v YNB médiu s 0,5% glukosou. Nejprve bylo připraveno inokulum zaočkováním 10 ml YPD média, kultivace probíhala při 28 – 30 °C/ 250 rpm přes noc. Druhý den bylo zaočkováno 50 – 400 ml YPD 0,1 ml kultury a kultivace trvala 6 dní. 3. a 6. den byly odebírány alikvoty kultury na analýzu, ty byly stočeny, pelety zamrazeny na -80°C.

V případě kvasinek nesoucích konstrukt pPICZ A + *SPBC106.04* probíhala kultivace podle následujícího postupu:

- Bylo zaočkováno 25 ml MGY nebo YPD média ve 250 ml Erlenmeyerově baňce. Alobal na hrdle flásky byl probodán a otvory byly překryty polopropustnou páskou. Jako kontrola sloužila neindukovaná kultura (kultivace v MGY médiu). V případě kultivace v YPD sloužil jako negativní kontrola WT *P. pastoris* X33.
- Kultivace při 28 – 30°C/ 250 – 300 rpm do $OD_{600} = 2 - 6$ (asi 16 – 18 hodin; log fáze).
- Buňky byly následně stočeny při 3000 g/ 5 min při laboratorní teplotě. Po odlití supernatantu byly buňky z jedné baňky rozsuspendovány v MMY médiu nebo YPD médiu (s methanolem místo glukosy) pro indukování exprese tak, aby bylo výsledné $OD_{600} = 1$ (200 – 400 ml) a kultura byla přenesena do 1l Erlenmeyerovy baňky. Alobal na hrdle lahve byl probodán a otvory překryty polopropustnou páskou. Neindukovaná kultura, která sloužila jako kontrola byla rozsuspendována opět v MGY médiu nebo v případě kdy sloužila jako kontrola WT *P. pastoris* X33 v YPD s glukosou. Během kultivace bylo nutné každých 24 hodin přidat methanol, tak aby koncentrace methanolu v médiu byla 0,5%, tj. 500 μ l methanolu/ 100 ml média, aby byla stále indukována exprese vneseného genu.
- Následovalo odebrání (většinou byly sklizeny celé objemy kultury) alikvotů kultury po 72 hodinách (3 dny) a po 144 hodinách (6 dní). Kultury byly stočeny, supernatant byl odlit a pelet zamražen na – 80°C.

Kultivace WT *S. pombe*

Nejprve bylo připraveno inokulum v 10 ml YE média, které bylo kultivováno po dobu 3 dnů při 28°C. Následně bylo zaočkováno touto kulturou 100 ml YE média a kultivace při 28°C trvala další 3 dny, poté byla kultura stočena a pelet zamražen na -80°C.

2.2.10 Určení Mut⁺ nebo Mut^S transformantů

Transformanti pPICZ A + *SPBC106.04*, kteří vyrostli na YPDS plotnách s koncentrací zeocinu 1000 μ g/ml byli rozpěstováni po dobu 2 – 3 dnů v 10 ml YPD s glukosou bez zeocinu. Od každého transformanta byl zamražen alikvot s glycerolem. 2 ml kultury každého transformanta byly využity pro analýzu vnášeného úseku pomocí PCR, viz. 2.2.6.

Ze zbylého objemu byly zaočkovány nejdříve MM a potom MD misky (misky byly rozděleny na sektory mřížkou a z každé kultury bylo zaočkováno na obě misky). Následovala inkubace při 30°C po dobu 2 – 3 dnů.

2.2.11 Izolace proteinů

2.2.11.1 Příprava hrubého extraktu

Příprava hrubého extraktu byla prováděna podle následujícího postupu:

- Kvasinkové pelety byly vyndány z -80°C na led, aby rozmrzly. Poté byly rozsuspendovány v přiměřeném objemu rozbíjecího pufru (50 mM fosforečnanu sodného, pH 7,4; 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonylfluorid – inhibitor proteas); 1 mM EDTA; 5% glycerol) a centrifugovány 5 – 10 min při 3000 g a 4°C. Inhibitor proteas byl do roztoku přidáván vždy těsně před použitím.
- Buňky byly opět rozsuspendovány v čerstvém pufru s proteasou tak, aby OD₆₀₀ mělo hodnotu 50 – 100.
- Bylo přidáno stejné množství skleněných kuliček (0,5 mm), a pak se buňky střídavě vortexovaly a inkubovaly na ledu vždy po dobu 30 s. Vortexování a inkubace na ledu se opakovaly ještě 7x.
- Centrifugace 5 – 10 min/ 12000 g/ 4°C.
- Čirý supernatant byl přenesen do čisté mikrokumavky. Pelet byl pro další analýzu uschován v 6M močovíně při 4°C.

Inhibitor proteas PMSF

Byl připraven 100 mM zásobní roztok inhibitoru proteas PMSF rozpuštěním 0,17419 g PMSF v 10 ml isopropanolu.

2.2.11.2 Purifikace pomocí Ni-NTA agarosy

Z narostlé kultury byl izolován protein dle následujícího postupu:

- Zamražené kvasinkové pelety na -80°C se nechaly povolit na ledu a byl přidán vhodný objem lyzačního pufru (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 0,5% TritonX-100, 5% glycerol, 1 mM PMSF, pH 8), směs byla pipetováním rozsuspendována.
- Rozbití buněk bylo prováděno dvěma způsoby, buď byl přidán vhodný objem rozbíjecích kuliček a vzorky byly střídavě po 30 sekundách vortexovány a inkubovány na ledu, což se opakovalo celkem 8x. Nebo byly rozbity pomocí „French pressu“ při 20 000 psi podle návodu od výrobce (suspenze buněk byla systémem French pressu prohnána celkem 5x až do vyčerení).

- Následovala centrifugace při 4000 g/ 10 min a více / 4°C a supernatant byl poté odebrán do čisté mikrozkušavky.
- K jednotlivým vzorkům bylo přidáno 200 µl Ni-NTA směsi a směs byla inkubována 1 hodinu v chladu za mírného třepání.
- Centrifugace při 1000 g/ 10 s/ 4°C.
- Supernatant byl opatrně odpipetován a k peletu bylo přidáno 2x 750 µl promývacího pufru (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8), opět centrifugace 1000 g/ 10 s/ 4°C, poté byl supernatant odpipetován. Promývání bylo opakováno ještě 4x.
- K peletu bylo přidáno 30 µl elučního pufru (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8), vzorky se nechaly na ledu po dobu 5 min a následně byly centrifugovány 1000 g/ 10 s/ 4°C a vzniklá frakce byla odpipetována a uschována v čisté mikrozkušavce.
- K peletu bylo přidáno dalších 50 µl elučního pufru, směs byla jemně promíchána a nechána 30 min na ledu, centrifugace 1000 g/ 10 s/ 4°C, vzniklá frakce byla opět odpipetována a uschována v čisté mikrozkušavce. Tento postup byl opakován dle potřeby.
- Dále bylo provedeno orientační stanovení koncentrace proteinu v eluovaných vzorcích pomocí činidla Bradfordové. Směs obsahovala 1 µl proteinu, 79 µl sterilní destilované vody a 20 µl činidla Bradfordové. Jako blank byla použita směs 80 µl sterilní destilované vody a 20 µl činidla Bradfordové. Přítomnost proteinu se projevila modrým zbarvením.

2.2.12 Stanovení koncentrace proteinů

Koncentrace proteinů byly stanovovány pomocí činidla Bradfordové. Vzorek obsahoval 200 µl činidla Bradfordové, 2 (i více) µl vzorku, zbytek do 1 ml byla sterilní destilovaná voda. Blank obsahoval 200 µl činidla Bradfordové a 800 µl sterilní destilované vody. Dále byly připraveny 3 standardy o známé koncentraci BSA (zásobní roztok 2 mg/ml). Standardy obsahovaly 2; 4 nebo 6 µl zásobního BSA, 200 µl činidla Bradfordové a zbytek do 1 ml byl doplněn sterilní destilovanou vodou. Absorbance byla měřena při 595 nm. Koncentrace byla určena z kalibrační křivky standardů pomocí aplikace „Quantification“ ve standardním programu spektrofotometru.

2.2.13 Elektroforetická separace nukleových kyselin v agarosovém gelu

Elektroforéza v 1% agarosovém gelu sloužila k separaci a vizualizaci fragmentů DNA.

Provedení elektroforézy:

Asi 50 ml připraveného tekutého 1% agarosového gelu v TAE pufru (0,001 M EDTA a 0,04 M Tris-acetát pH 8) bylo smícháno s 5 μ l ethidiumbromidu o koncentraci 0,5 μ g/ml, tato směs byla nalita do předem složené elektroforetické vaničky a na jeden z konců této vany byl vložen hřebínek, který vytvořil po ztuhnutí gelu jamky pro nanášení vzorků. Gel tuhnul asi 20 - 30 minut při laboratorní teplotě. Jakmile gel ztuhnul, hřebínek byl vyjmut tak, aby nedošlo k roztržení gelu. Takto připravený gel ve vaničce byl vložen do elektroforetického zařízení s naředěným TAE puforem (ten tvoří elektrolyt pro vedení proudu) tak, aby gel byl ponořen zhruba 3 mm pod hladinou pufru. Gel vkládáme tak, aby startovní jamky ležely v blízkosti katody (záporný pól). Do jednotlivých jamek ponořeného gelu byly nanášeny jednotlivé vzorky po 10 μ l. Do jedné z jamek v řadě bylo vždy napipetováno 5 μ l markeru (Gene Ruler 1kb DNA Ladder). Do jednotlivých vzorků byl přidáván před nanášením na gel příslušně zředěný Loading Buffer 10x. Elektroforéza probíhala cca 20 – 30 minut při napětí 120V. DNA fragmenty s inkorporovaným ethidiumbromidem byly následně vizualizovány pomocí UV transluminátoru a vyfoceny.

2.2.14 SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS)

SDS-PAGE sloužila k separaci proteinů z hrubého proteinového extraktu a k separaci proteinů po purifikaci.

Provedení SDS-PAGE:

Nejprve byla sestavena aparatura pro elektroforézu. Skla se upevnila do stojánku a jako první byl mezi tyto skla nalit separační gel, který byl převrstven 100% buthanolem. Po zatuhnutí gelu, kdy došlo k jeho polymeraci (cca po 30 min) byl buthanol vylit, vymyt destilovanou vodou a zbytky byly vysušeny filtračním papírem. Separační gel byl převrstven koncentračním gelem a mezi skla byl umístěn hřebínek a gel se nechal ztuhnout. Po zatuhnutí koncentračního gelu (cca 30 min) byl hřebínek opatrně vyjmut a tím byly vytvořeny jamky pro nanášení vzorků, jamky byly vypláchnuty destilovanou vodou. Skla s gelem tzv. „sendvič“ byla umístěna do vlastní

elektroforetické vaničky pro SDS-PAGE a mezi skla byl nalit elektrodový pufr (50 mM Tris-HCl, 384 mM glycin, 0,1% SDS, 2 mM EDTA, pH 8,3) tak, aby byly jamky ponořeny v pufru. Do jamek byly napipetovány vzorky po 20 µl, které byly předem smíchány v poměru 4 : 1 s nanášecím pufr, 5 µl proteinového markeru a elektroforéza probíhala při napětí 100 V, dokud vzorky nebyly zakoncentrovány. Poté bylo napětí zvýšeno na 120 V na cca 1,5 hodiny.

Příprava vzorků : K cytosolu (hrubý proteinový extrakt) byl přidán předem připravený nanášecí pufr (loading buffer) (0,05 mol/l Tris-HCl, 2 mmol/l EDTA, 2% SDS, 10% glycerol, 0,2% bromfenolová modř, 6% merkaptoethanol, pH 6,8) – během experimentů byl používán 4x koncentrovaný nanášecí pufr. Potom následovala denaturace při 95°C po dobu 5 min. Před tím, než byly vzorky nanášeny na gel, byly po denaturaci uloženy na ledu.

Příprava polyakrylamidového gelu:

SEPARAČNÍ GEL 10% (10 ml na přípravu dvou gelů)	
4,00 ml	destilovaná voda
3,30 ml	30% akrylamidový roztok (29,2% akrylamidu, 0,8% N,N-bis-methylen-akrylamidu)
2,50 ml	separační pufr (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)
0,10 ml	10% SDS
0,10 ml	10% persíran amonný
15 µl	TEMEDu

KONCENTRAČNÍ GEL 5% (3 ml na přípravu dvou gelů)	
2,10 ml	destilovaná voda
0,50 ml	30% akrylamidový roztok (29,2% akrylamidu, 0,8% N,N-bis-methylen-akrylamidu)
0,38 ml	koncentrační pufr (1 M Tris-HCl, pH 6,8)
0,03 ml	10% SDS
0,03 ml	10% persíran amonný
10 µl	TEMEDu

Po skončení elektroforézy byl gel nejdříve opláchnut destilovanou vodou a vložen do fixačního roztoku (10% kyselina octová, 30% isopropanol) přibližně na 30 – 60 min a následně barven roztokem Coomassie Brilliant Blue R-250 nebo stříbrem pro zviditelnění proteinových pásů.

2.2.15 Barvení Coomassie Brilliant Blue R-250

Gel byl nejdříve vložen na cca 12 h (přes noc) do barvicího roztoku (0,025% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol, 10% kyselina octová) a následně odbarven v roztoku obsahujícím 40% methanol a 10% kyselinu octovou. Po odbarvení pozadí byl gel promyt destilovanou vodou a uložen ve vodě.

2.2.16 Barvení stříbrem

Barvení gelu probíhalo v níže popsanych roztocích podle následujícího postupu:

- | | |
|---|----------------|
| 1. 60 ml 50% acetonu + 1,5 ml 50% TCA + 15 μ l 37% HCHO | 5 minut |
| 2. 3x oplach destilovanou vodou | 3 x 5 sekund |
| 3. promytí destilovanou vodou | 5 minut |
| 4. 3x oplach destilovanou vodou | 3 x 5 sekund |
| 5. 60 ml 50% acetonu | 5 minut |
| 6. 60 ml destilované vody + 100 μ l 10% Na ₂ S ₂ O ₃ | 1 minutu |
| 7. 3x oplach destilovanou vodou | 3 x 5 sekund |
| 8. 60 ml destilované vody + 160 mg AgNO ₃ + 0.6 ml 37% HCHO | 8 minut |
| 9. 2x oplach destilovanou vodou | 2 x 5 sekund |
| 10. 60 ml 2% Na ₂ CO ₃ + 25 μ l 37% HCHO + 25 μ l 10% Na ₂ S ₂ O ₃ | 10 – 20 sekund |
| 11. 60 ml 1% kyseliny octové | 30 sekund |
| 12. promytí destilovanou vodou | 10 sekund |

Takto obarvený gel byl poté uchovávan v destilované vodě.

2.2.17 Imunoblot (Western blot)

2.2.17.1 Blotování

Polyakrylamidový gel s proteiny po proběhnuté SDS-PAGE byl opláchnut destilovanou vodou a přenesen do blotovacího přístroje iBlot® Dry Blotting system od firmy Invitrogen. Spolu s příslušnými součástmi (anoda s membránou, filtrační papír, katoda, houbička) byl sestaven systém pro přenos proteinů na nitrocelulosovou membránu podle přiloženého návodu od výrobce. Pro přenos proteinů na membránu byl použit program P3: 7 min/ 20 V.

2.2.17.2 Imunodetekce

Dále následovala imunodetekce s monoklonální Anti-polyHistidine protilátkou. Všechny inkubační kroky byly prováděny při laboratorní teplotě.

Postup byl následující:

- Membrána s přenesenými proteiny byla ponořena do 5% mléka v TBST a v tomto roztoku inkubována 1 hodinu.
- Roztok mléka byl odlit a membrána byla promývána v TBS za mírného třepání po dobu 5 min.
- Následovalo další promývání v TBST po dobu 5 min.
- Promývání v TBS 5 min.
- Dalším krokem bylo promývání membrány v 5% mléce v TBST s protilátkou (ta musí být 2000x zředěná, 7,5 μ l protilátky c = 5 – 11 mg/ml v 15 ml 5% mléka v TBST) po dobu 2 hodin.
- Promývání v TBS 5 min.
- Promývání v TBST 5 min.
- Promývání v TBS 5 min.
- Membrána byla opatrně osušena od přebytečné tekutiny a vložena na kancelářskou eurofólii, kde na membránu bylo aplikováno 1,3 ml směsi Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (ThermoScientific) (reportérový enzym vázaný na primární protilátce – křenová peroxidasa) v poměru 1:1 a nechala se 5 min působit.
- Membrána byla překryta další kancelářskou fólií a přebytečná směs substrátu byla odstraněna.
- Membrána uzavřená v kancelářské fólii byla přendána do kovového pouzdra pro vyvolávání filmu.
- Ve fotokomoře byl na membránu přiložen na světlo citlivý film od firmy Roche (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film) a vše bylo uzavřeno v kovovém pouzdře po dobu 5 min až 1 hodiny v závislosti na požadované intenzitě signálu. Poté byly k vyvíjení použity roztoky firmy Kodak (vývojka a fixer), kdy byl film nejdříve ponořen do vyvíjecího roztoku, poté opláchnut destilovanou vodou, dále zafixován ve fixačním roztoku, opět opláchnut destilovanou vodou a osušen na vzduchu.
- Membrána byla obarvena po dobu 3 – 6 s roztokem amidočerni (2,5 g amidočerni, 250 ml methanolu, 215 ml destilované vody, 35 ml kyseliny octové), řádně promyta destilovanou vodou a po osušení srovnávána s výsledkem na filmu.

Složení pufrů: TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5)

TBST (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,5)

2.2.18 Měření aktivity proteinu

Bylo prováděno měření relativní specifické aktivity AMP-deaminasy transformantů *S. cerevisiae* v hrubém extraktu nebo po purifikaci extraktu u transformantů *P. pastoris*. Dále byla také měřena aktivita AMP-deaminasy v hrubých extraktech WT kvasinek *P. pastoris*, *S. cerevisiae* a *S. pombe*.

Nejprve byly připraveny 10 mM roztoky všech těchto látek: AMP, ATP, GTP, IMP, které byly rozpouštěny v ledové sterilní vodě a látek BAP, IP a IPR, které byly rozpouštěny v DMSO.

Aktivita AMPD byla měřena při 235 nm, protože při této vlnové délce dochází k největšímu rozdílu absorpčních maxim odbourávajícího se substrátu a vznikajícího produktu. Maximum absorbance substrátu (AMP) je při vlnové délce 260 nm a maximum absorbance produktu (IMP) je při 249 nm.

Postup měření aktivity byl následující. Daný pufr vytemperovaný na požadovanou teplotu, tj. 37°C byl napipetován do křemenné kyvety a ta se umístila do spektrofotometrické cely, která byla vytemperovaná na stejnou teplotu. Do kyvety byl dále napipetován proteinový vzorek (1 – 100 µl), poté 0,033 mM ATP a následovala inkubace po dobu 1 min. Po proměření pozadí byl přidán substrát AMP 0,066 mM a ihned se začala měřit aktivita. Aktivita byla měřena 30 - 45 min při 37°C. K měření byl použit pufr o složení 100 mM MOPS, 100 mM KCl, pH 7,2. Během měření aktivity AMPD *S. pombe* měl reakční pufr následující složení: 50 mM MOPS, 100 mM KCl, pH 7.

Při měření inhibičních reakcí byl do reakční směsi přidáván spolu s ATP i 0,066 mM GTP. Během experimentů, kde bylo testováno odbourávání cytokininů BAP, IP a IPR, byly tyto látky přidávány místo substrátu AMP.

Bylo nutné také změřit extinkční molární koeficient AMP a IMP, aby mohla být vypočítána specifická aktivita enzymu podle následujícího vzorce:

Výpočet specifické aktivity enzymu:

$$aktivita_{spec} = \left[\left(\frac{\Delta A_{235}}{\epsilon_{235}^P - \epsilon_{235}^S} \right) * V * \text{ředění} \right] * \frac{1}{c}$$

ΔA_{235} – změna absorbance enzymu za 1 sekundu (vlnová délka 235 nm)

ϵ_{235}^P – extinkční molární koeficient produktu při 235 nm (3864,4 cm⁻¹.mol⁻¹.l)

ϵ_{235}^S – extinkční molární koeficient substrátu při 235 nm (2149,5 cm⁻¹.mol⁻¹.l)

V – celkový objem [l]

c – koncentrace proteinu [mg/ml]

Pro získání relevantních výsledků byly aktivity proměřovány ve 2 – 3 opakováních.

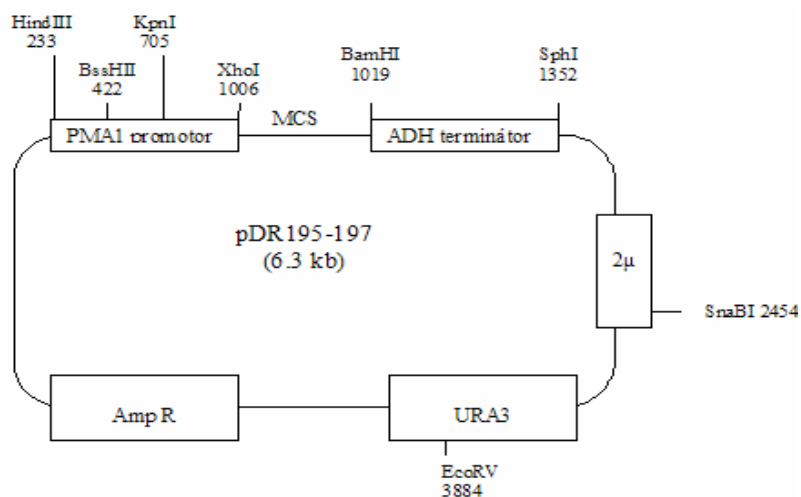
2.3 VÝSLEDKY

Téma této diplomové práce navazuje na mou bakalářskou práci z r. 2010 s názvem „Příprava plazmidových konstruktů pro integraci AMP-deaminasy do kvasinek“, kde byly připraveny tři plazmidové konstrukty nesoucí gen AMP-deaminasy pro integraci do kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia pastoris*, z toho důvodu, že dřívější pokusy exprimovat AMP-deaminasu v prokaryotickém expresním systému *E. coli* nebyly úspěšné. Jedná se o konstrukty pDR197 + *AMD1* pro expresi *S. cerevisiae*, pGAPZ α A + *SPBC106.04* a pPICZ A + *SPBC106.04* pro *P. pastoris*. Gen *AMD1* pochází z *S. cerevisiae*, gen *SPBC106.04* obsahující dva introny z *S. pombe*.

Byla provedena integrace výše zmíněných genů AMP-deaminasy do uvedených kvasinek, exprese AMP-deaminasy v kvasinkách a měření relativní specifické aktivity daného proteinu.

2.3.1 AMP-deaminasa *S. cerevisiae* (pDR197 + *AMD1*)

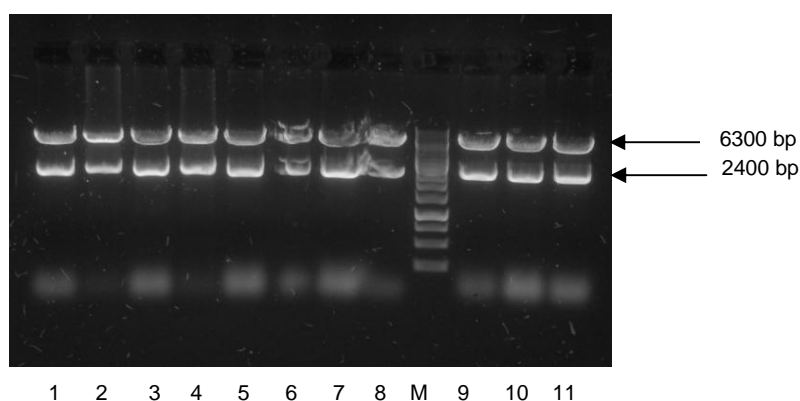
Prvním plazmidovým konstruktem pro vnesení AMP-deaminasy do kvasinek, konkrétně do *S. cerevisiae*, byl konstrukt vektoru pDR197 (Obr.8) s genem *AMD1* původem z *S. cerevisiae*.



Obrázek 8 : Expresní vektor pDR197.

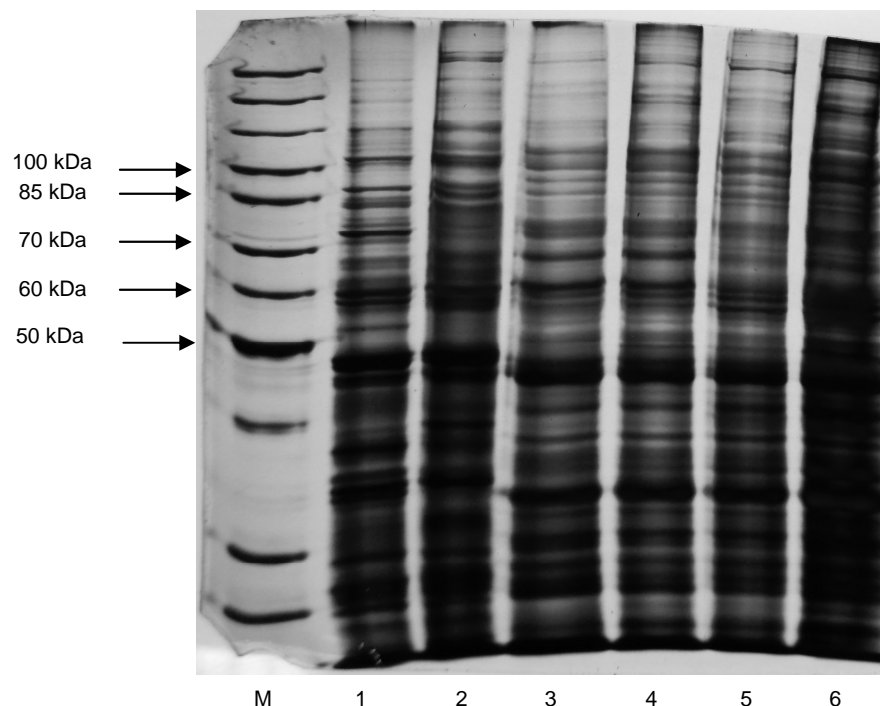
ADH - terminátor odvozený od genu alkoholdehydrogenasy, Amp R – gen pro rezistenci na ampicilin, MCS – multiklonovací místo, PMA1 – promotor odvozený od plasmamembránové ATPasy (konstitutivní), URA3 –selekční gen auxotrofie uracilu, 2 μ – počátek replikace pro *Saccharomyces cerevisiae*.

Vnesení připraveného konstruktů pDR197 + *AMD1* do buněk kvasinky *S. cerevisiae* 23344c *ura⁻* bylo provedeno pomocí elektroporace. Po kultivaci deseti vybraných transformantů v YNB selekčním médiu byly buňky rozbity pomocí skleněných kuliček a supernatant byl použit k transformaci elektrokompetentních TOP10 buněk *E. coli* „heat shockem“. Transformované buňky *E. coli* byly poté vyselektovány na LB médiu s ampicilinem a bylo získáno jedenáct kolonií. Z těchto jedenácti transformantů byla posléze vyizolována plazmidová DNA, která byla podrobena restriční analýze enzymy *Pst*I a *Sal*I (Obr.9). Pozitivně vyšly všechny vzorky. Tímto bylo potvrzeno úspěšné vnesení požadovaného konstruktů do *S. cerevisiae*.



Obrázek 9: Restriční analýza vyizolovaných plazmidů pDR197 s genem *AMD1* z transformovaných TOP10 buněk *E. coli* pomocí restričních enzymů *Pst*I a *Sal*I. 1. – 11. pDR197 (cca 6300 bp) + *AMD1* (cca 2400 bp), M. 1 kb DNA Ladder (Fermentas)

Dále byla vhodná vyselektovaná kultura kvasinek rozpěstována paralelně v YNB a YPD médiu spolu s WT *S. cerevisiae*. Během následné pětidenní kultivace byla vždy po 24 h kultivace kultura odebírána, stočena a pelet byl zamražen na -80°C. Ze zamražených peletů byl pomocí skleněných kuliček a rozbíjecího pufru, který obsahoval inhibitor proteas PMSF, připraven hrubý extrakt proteinů. V tomto hrubém extraktu byla změřena koncentrace proteinů dle Bradfordové a následovalo měření aktivity AMP-deaminasy *S. cerevisiae* v hrubém extraktu při 235 nm a vizualizace overexprese AMP-deaminasy pomocí SDS-PAGE (Obr.10).



Obrázek 10: Polyakrylamidový gel po SDS-PAGE barvený stříbrem se vzorky cytosolů. 1. WT v YNB médiu 3. den; 2. WT v YPD médiu 3. den; 3. pDR197 + *AMD1* v YNB médiu 3. den; 4. pDR197 + *AMD1* v YNB médiu 4. den; 5. pDR197 + *AMD1* v YPD médiu 3. den; pDR197 + *AMD1* v YPD médiu 4. den; M. PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas). Naneseno cca 20 µg proteinového extraktu na jamku.

Na gelu můžeme pozorovat pás okolo 90 kDa (velikost monomeru *AMD1* je 93 kDa), který značí overexpresi *AMP*-deaminasy v transformovaných kvasinkách.

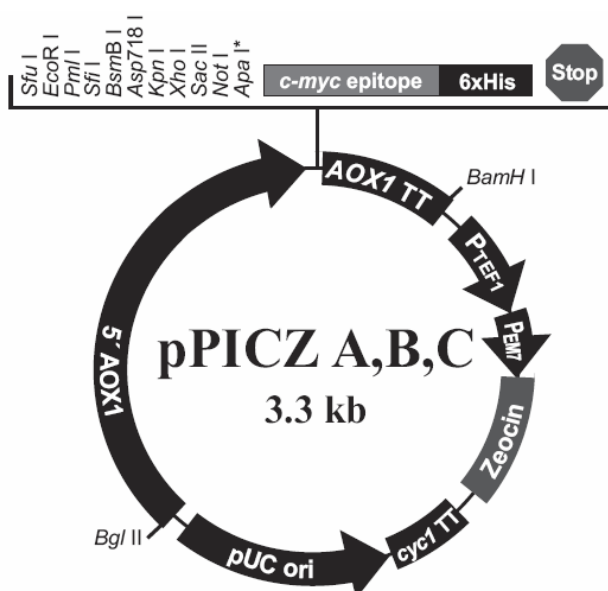
Po optimalizaci reakčních podmínek byla měřena relativní specifická aktivita *AMP*-deaminasy v hrubém extraktu 2., 3., 4. a 5. den kultivace. Největší aktivity byly detekovány 4. den kultivace. V extraktu kvasinek kultivovaných v YPD médiu byla relativní specifická aktivita *AMP*-deaminasy $3,1 \cdot 10^{-8}$ kat/mg a u kvasinek kultivovaných v YNB médiu byla v extraktu změřena relativní specifická aktivita enzymu $3,83 \cdot 10^{-8}$ kat/mg.

Aktivita *AMP*-deaminasy kultivané v YNB médiu byla zvýšena až 5x v porovnání s kontrolou. Aktivita *AMD1* během kultivace v YPD médiu byla jen o 31% větší v porovnání s kontrolou, kterou byla WT *S. cerevisiae*. Po přidavku 0,066 mM GTP (2x přebytek oproti ATP) se aktivita snížila o 17% u lyzátu kvasinky kultivané v YPD médiu, v přítomnosti 5x vyšší koncentrace GTP než ATP byla aktivita deaminasy inhibována ze 100%. Aktivita *AMD1* během kultivace v YNB médiu byla v přítomnosti GTP snížena jen mírně cca o 5%, z čehož usuzujeme, že v lyzátu zůstalo ještě velké množství *AMP*-deaminasy s nenavázaným allosterickým inhibítor. Proto byl

experiment opakován a bylo optimalizováno množství proteinových extraktů v reakci získaných 4. den kultivace kvasinky. V tomto případě bylo detekováno snížení aktivity AMP-deaminasy o 70% (kultivace v YNB médiu) a o 45% (kultivace v YPD médiu) v přítomnosti 0,066 mM GTP.

2.3.2 AMP-deaminasa *S. pombe* (pPICZ A + SPBC106.04)

Prvním konstruktem, který byl využit pro expresi AMP-deaminasy původem z *S. pombe* byl vektor pPICZ A (Obr.11) nesoucí gen *SPBC106.04*. pPICZ je expresní „shuttle“ vektor užívaný k expresi rekombinantních proteinů v *Pichia pastoris*. Výsledná AMP-deaminasa by měla být exprimována přidávkem methanolu do buněk, jelikož je v tomto případě gen *SPBC106.04* zaklonován pod inducibilní promotor.



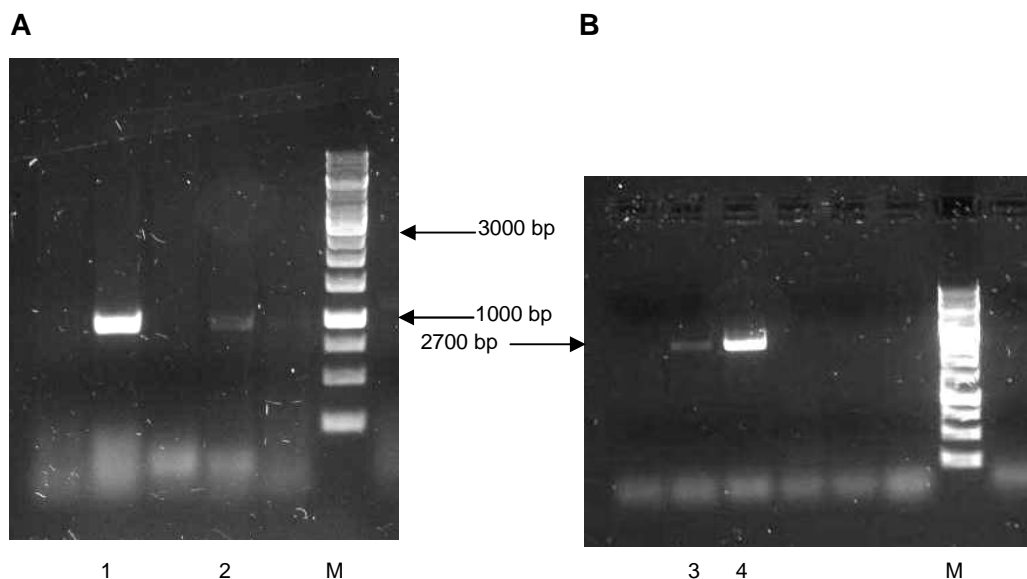
Obrázek 11: Expresní vektor pPICZ A. (převzato z Manuálu pPICZ A, B, C, Invitrogen (2008); <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>).

5' *AOX1* - 5' koncový *AOX1* promotor odvozený od alkoholoxidasy, *AOX1 TT* - *AOX1* terminátor transkripce, *c-myc* epitop - umožňující specifickou detekci rekombinantního proteinu pomocí protilátky Anti-myc, *CYC1* - transkripční terminační oblast genu *CYC1* z *S. cerevisiae* pro terminaci transkripce genu *Sh ble* a pro zvýšení stability příslušné mRNA, *EM7* promotor – syntetický prokaryotický promotor (umožňuje konstitutivní expresi genu rezistence na zeocin *Sh ble* v *E. coli*), MCS – multiklonovací místo, pUC ori – počátek replikace umožňující replikaci a zachování plazmidu v *E. coli*, *TEF1* - promotor genu transkripčního elongačního faktoru 1 *S. cerevisiae* (řídí expresi genu *Sh ble* pro rezistenci *P. pastoris* na zeocin), 6xHis - C-koncová polyhistidinová kotva pro

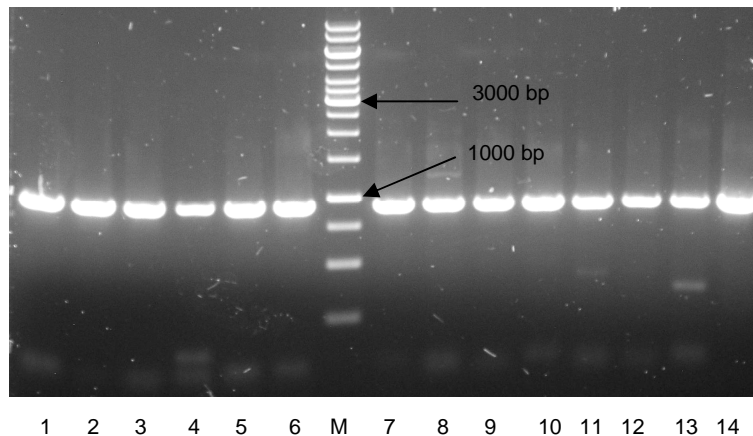
detekci rekombinantního proteinu protilátkou Anti-His (C-term) a jeho purifikaci, Zeocin – gen *Sh ble* umožňující rezistenci na zeocinu.

Nejprve byla provedena linearizace plazmidu pPICZ A + *SPBC106.04* pomocí enzymu *SacI*, po restrikci byl produkt přečištěn přes kolonky Gel Extraction kitu. Takto linearizovaný plazmid byl vnesen pomocí elektroporace do kvasinek *P. pastoris* X33. Po inkubaci na YPDS agarových plotnách se 100 µg/ml zeocinu a následném pomnožení narostlých kolonií v tekutém YPD se zeocinem o koncentraci 100 µg /ml, kdy bylo testováno čtyřicet kolonií, byly hledány takové, u kterých došlo k mnohonásobné integraci vnášeného úseku, pomocí YPDS ploten s koncentrací zeocinu 1000 µg /ml. Takto bylo získáno šest kolonií, které byly podrobeny určení Mut^+ a Mut^S fenotypu transformantů. Tento experiment byl prováděn u transformovaných kvasinek *P. pastoris* X33 s konstruktem pPICZ A + *SPBC106.04*, jelikož tento konstrukt nese AOX1 promotor, který je indukován jen v přítomnosti methanolu přidaného do média. Experiment byl prováděn na základě kultivace šesti vyselektovaných transformantů s mnohočetnou integrací genu v menším objemu YPD s glukosou bez zeocinu, z části objemu byly zaočkovány MM a MD agarové plotny. Jeden z transformantů nenarostl ani na jednom z médií, jeden z transformantů rostl na obou médiích, byl tedy určen jako Mut^+ = „methanol utilization plus phenotyp“ a zbylí transformanti, kteří rostli na MD médiu a slabě i na MM médiu byli určeni jako Mut^S = „methanol utilization slow phenotyp“. Dále bylo pracováno s transformanty Mut^S , jelikož se jednalo o požadovaný genotyp.

Část buněk byla rozbita pomocí tekutého dusíku (střídání rychlého zmrazování a rozmrazování) a vzniklý extrakt byl použit jako templát do PCR reakce pro ověření integrace genu AMP-deaminasy. V případě využití primerů ohraničujících část vnitřního úseku genu *SPBC106.04* byly specifické amplikony detekovány pouze u dvou vzorků (Obr.12 A), v případě využití primerů ohraničujících celou sekvenci daného genu, byly taktéž detekovány pouze dva amplikony (Obr.12 B). Proto byl pro potvrzení a ověření přítomnosti transgen připraven kvalitní templát pro PCR reakci, a to izolací genomové DNA kvasinek pomocí komerčního kitu (Obr.13). Následnou PCR byla potvrzena přítomnost genu *SPBC106.04* u všech testovaných transformantů.

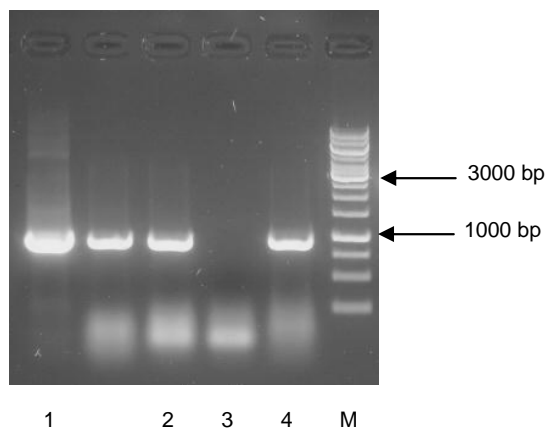


Obrázek 12: Produkt amplifikace genu *SPBC106.04* po PCR reakci A. s použitím vnitřních primerů; B. s použitím primerů ohraničujících celou kódující sekvenci genu. 1., 2. specifické amplikony genu *SPBC106.04* o velikosti cca 933 bp; 3., 4. specifické amplikony genu *SPBC106.04* o velikosti cca 2700 bp; M. 1 kb DNA Ladder (Fermentas)



Obrázek 13: Produkt amplifikace genu *SPBC106.04* po PCR reakci za použití vnitřních primerů. Jako templát byla použita genomová DNA vyizolovaná z kvasinkových buněk získaná pomocí kitu MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit - Epicentre® Biotechnologie ze všech šesti původně testovaných transformantů. 1. – 6. vzorky transformantů pGAPZ α A + *SPBC106.04*; 7. – 12. vzorky transformantů pPICZ A + *SPBC106.04*; 13. WT *P. pastoris* X33; 14. pDRIVE + *SPBC106.04* – kontrolní plazmid

Pomocí PCR byla také testována cDNA z transformantů, u kterých byla poté měřena aktivita AMP-deaminasy (Obr.14). Výsledky amplifikace úseku cDNA vybraných transformantů s použitím primerů ohraničujících úsek vnitřní části genu *SPBC106.04* (velikost amplikonu cca 933 bp) potvrzují expresi *SPBC106.04* v hostitelském organismu.



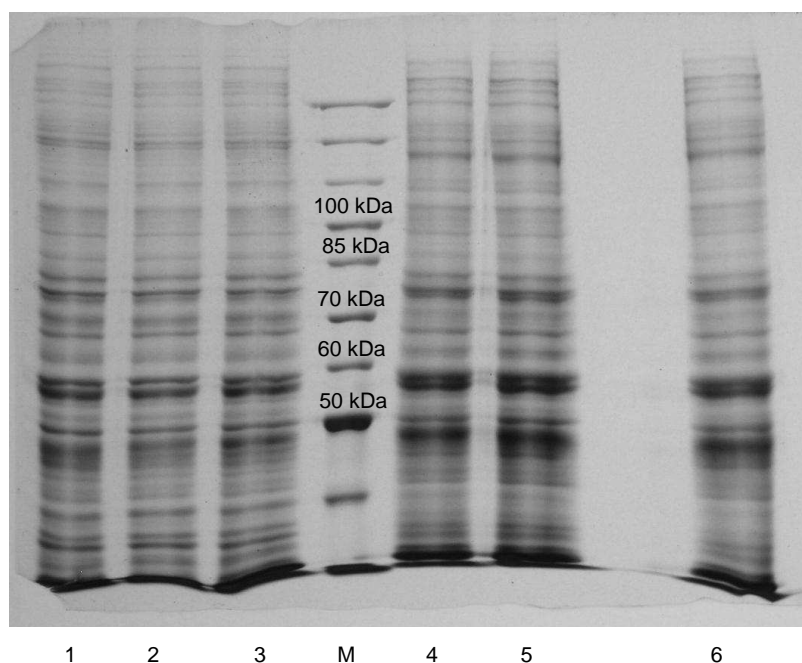
Obrázek 14: Produkt amplifikace genu *SPBC106.04* po PCR reakci. Jako templát byla použita cDNA získaná z přepisu mRNA vyizolované z kvasinkových buněk. Během reakce bylo použito vnitřních primerů. Jako templát PCR reakce sloužila: 1. pDRIVE + *SPBC106.04* – pozitivní kontrola; 2. cDNA transformanta pGAPZ α A + *SPBC106.04*; 3. cDNA WT *P. pastoris* X33; 4. cDNA transformanta pPICZ A + *SPBC106.04*; M. 1 kb DNA Ladder (Fermentas)

Vzorek pro další testování byl vybrán podle výsledků naměřené relativní specifické aktivity AMP-deaminasy z buněk kultivovaných v YNB médiu, kdy vybraný vzorek vykazoval největší aktivitu AMP-deaminasy. U tohoto vzorku byla poté prováděno další testování exprese AMP-deaminasy.

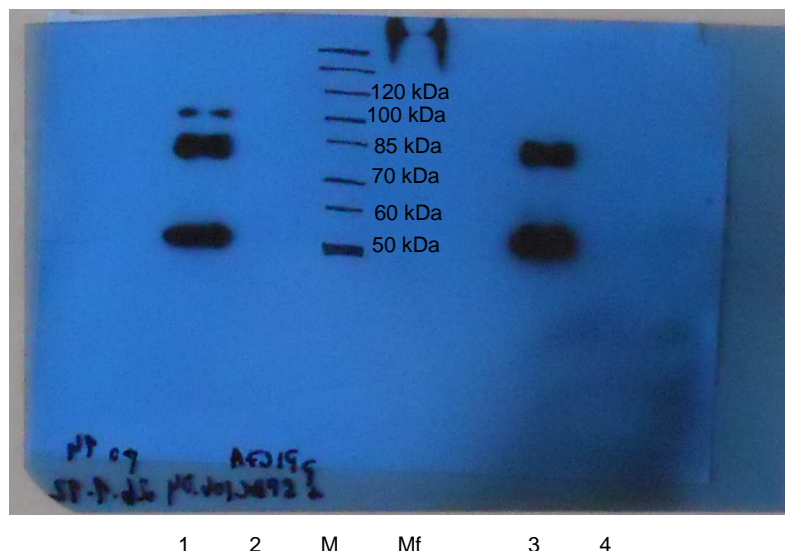
Následovalo ověření exprese AMP-deaminasy v kvasinkách, které probíhalo paralelně s testováním integrace genu do genomu kvasinky. Jako první byla testována kultivace všech vyselektovaných transgenních *P. pastoris* v menším objemu MMY média, který byl ale pro další studie nedostatečný. Dále byl vybrán jeden zástupce vyselektovaných transformantů, který byl následně kultivován znovu v MMY médiu, s tím rozdílem, že bylo ke kultivaci využito většího objemu média. Testování exprese AMP-deaminasy bylo prováděno také v YPD médiu s methanolem. Postup kultivace v YPD byl obdobný jako v případě kultivace v MGY a MMY médiu a kultura byla rovněž pěstována ve větším objemu média, a to v 1,6 litrech a kontrola ve 400 ml. Kultura

kultivovaná v MMY médiu byla sklizena po 3. dni kultivace a kultury kultivované v YPD médiu byly sklizeny po 3. a 6. dni kultivace.

Ze zamražených peletů byl pomocí skleněných kuliček (nebo French pressu v případě kultury z YPD média) a rozbíjecího pufru, který obsahoval inhibitor proteas PMSF, připraven hrubý extrakt proteinů a byla provedena purifikace. Po purifikaci byla v získaném vzorku změřena koncentrace proteinů dle Bradfordové a po optimalizaci následovalo měření aktivity AMP-deaminasy *S. pombe* v hrubém extraktu při 235 nm a vizualizace overexprese AMP-deaminasy pomocí SDS-PAGE. Polyakrylamidové gely byly následně obarveny stříbrem pro detekci odpovídajících pásů (934 aminokyselin, MW = 106 804,32 Da). Vzhledem k tomu, že na polyakrylamidovém gelu po SDS-PAGE nebyl ani v případě kultivace v MMY a ani v YPD médiu v porovnání s kontrolami detekován žádný specifický pás, který by měl odpovídat našemu proteinu (Obr.15), byl pro detekci prováděn ještě imunoblotting se specifickou protilátkou na histidinovou kotvu (Obr.16).



Obrázek 15: Polyakrylamidový gel po SDS-PAGE barvený stříbrem, vzorky nanášeny po purifikaci na Ni-NTA agarose. Kultury pěstovány v YNB médiu, 3. den kultivace. 1. – 3. kontrola bez indukce methanolem; 4. – 6. pPICZ A + *SPBC106.04* indukován methanolem; M. PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas); na jamku připadá cca 5,45 µg proteinů celkového lyzátu.



Obrázek 16: Membrána a film po imunodetekci specifickou protilátkou na histidinovou kotvu, po 1 hodině vyvíjení. Kultury pěstovány v YPD médiu, 3. a 6. den kultivace. 1. pPICZ A + *SPBC106.04* indukován methanolem, 3. den kultivace; 2. WT kontrola bez indukce methanolem, 3. den kultivace; 3. pPICZ A + *SPBC106.04* indukován methanolem, 6. den kultivace; 4. WT kontrola bez indukce methanolem, 6. den kultivace; M. PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas); Mf. ColorBurst™ Electrophoresis Marker (Sigma-Aldrich). Naneseno 4,8 – 5,4 µg proteinového extraktu na jamku.

Aktivita AMP-deaminasy získané z buněk kultivovaných ve větším objemu YPD média byla největší po 6. dni kultivace. V porovnání s aktivitou ve 3. dnu byla až 2,3x větší a hodnota této aktivity byla $1,98 \cdot 10^{-8}$ kat/mg.

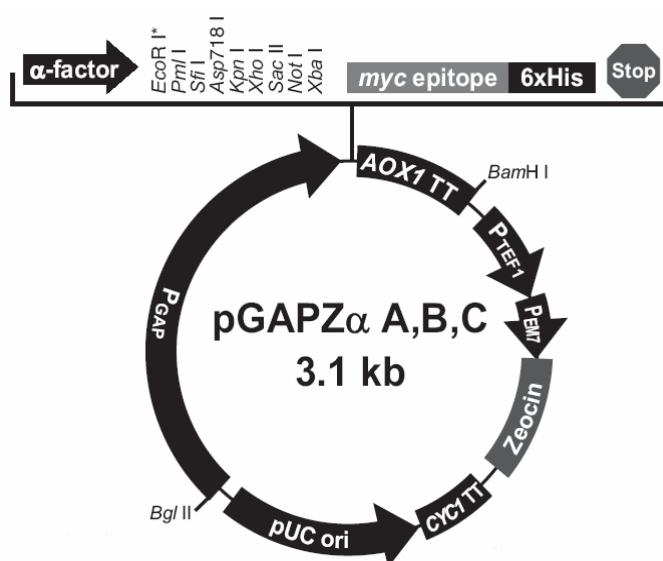
Po přidavku stejné koncentrace allosterického inhibitoru GTP jako bylo množství substrátu přidávaného do reakce se aktivita AMP-deaminasy snížila cca 1,9x.

Dále byla testována případná degradace cytokininů BAP (benzylaminopurin), IP (isopentenyladenin) a IPR (isopentenyladenin ribosid) AMP-deaminasou, ale odbourávání cytokininů nebylo detekováno.

Po proměření aktivity AMP-deaminasy získané z buněk kultivovaných ve větším objemu YNB média po 3. dnu byla hodnota aktivity cca 2,7x větší než hodnota naměřená u kontrolního vzorku – WT *P. pastoris* X33. Relativní specifická aktivita AMP-deaminasy měla hodnotu $4,1 \cdot 10^{-9}$ kat/mg.

2.3.3 AMP-deaminasa *S. pombe* (pGAPZ α A + SPBC106.04)

Druhým konstruktem pro expresi AMP-deaminasy původem z *S. pombe* byl vektor pGAPZ α A (Obr.17) nesoucí gen SPBC106.04 pod konstitutivním promotorem. pGAPZ α je tedy expresní „shuttle“ vektor umožňující konstitutivní expresi rekombinantního proteinu v *P. pastoris* pro integraci do genomu kvasinky homologní rekombinací. Exprese proteinu s C-terminálním c-myc epitopem a histidinovou kotvou pro purifikaci daného proteinu pomocí Ni-NTA agarosy, bude probíhat do buněk z důvodu vyštěpení Kex2 místa, a tudíž nefunkčnosti přítomného N-terminálního α -faktoru, který je důležitý pro sekreci rekombinantního proteinu do kultivačního média.

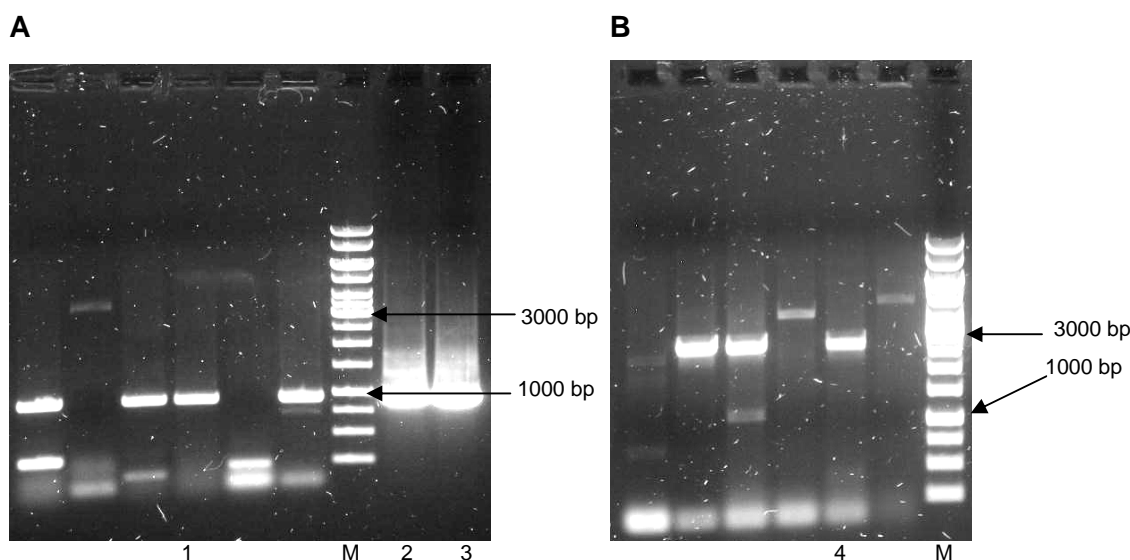


Obrázek 17: Expresní vektor pGAPZ α A. (převzato z Manuál pGAPZ A, B, C a pGAPZ α A, B, C, Invitrogen (2008); <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>). α -factor - nativní sekreční signál *S. cerevisiae* (umožňuje efektivní sekreci většiny proteinů exprimovaných v *P. pastoris*), GAP - promotor odvozený od genu glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy. Ostatní elementy tohoto vektoru jsou stejné jako v případě vektoru pPICZ A.

Vektor je dodáván ve třech čtecích rámcích usnadňující klonování ve čtecím rámci s C-histidinovou kotvou a /nebo N-koncovým sekrečním signálem.

Prvním krokem byla opět linearizace plazmidu pGAPZ α A + SPBC106.04 pomocí enzymu *BlnI*, po restrikci byl produkt přečištěn přes kolonky Gel Extraction kitu. Linearizovaný plazmid byl vnesen pomocí elektroporace do kvasinek. Po pomnožení narostlých kolonií (testováno čtyřicet kolonií) v tekutém YPD se zeocinem o koncentraci 100 μ g/ml byly hledány takové, u kterých došlo k mnohonásobné

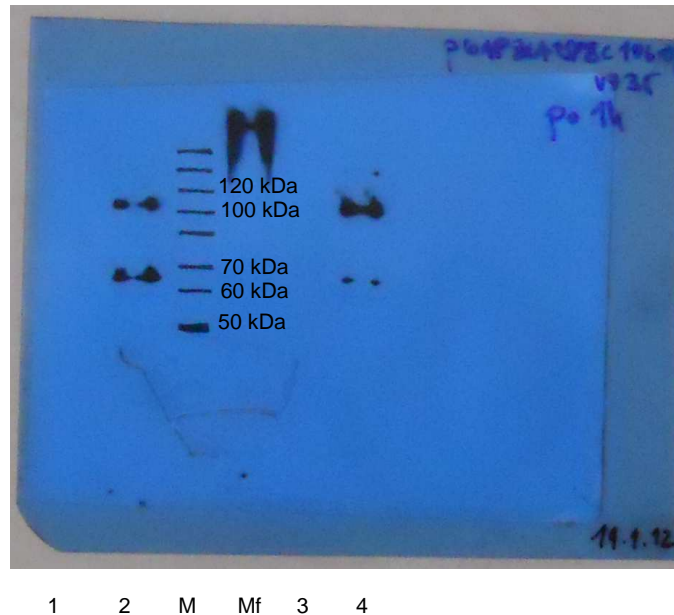
integraci vnášeného úseku, pomocí ploten s koncentrací zeocinu 1000 µg/ml. Bylo tedy získáno šest kolonií a ty byly rozpěstovány v menším objemu YPD s glukosou bez zeocinu. Část buněk byla rozbita pomocí tekutého dusíku (střídání rychlého zmrazování a rozmrazování) a vzniklý extrakt byl stejně jako u pPICZ A s genem *SPBC106.04* použit jako templát do PCR reakce pro ověření integrace. Přítomnost transgenu byla potvrzena užitím dvojice primerů umožňujících amplifikaci vnitřního úseku genu (Obr.18 A) a i užitím dvojice primerů ohraničujících celou kódující sekvenci vnášeného genu (Obr.18 B). Vzhledem k detekovaným nespecitám během amplifikace byla jako v předchozím případě izolována genomové DNA pomocí komerčního kitu, která potom sloužila jako templát PCR s vnitřními primerů (Obr.13). Na základě toho byli vybráni transformanti se správně integrovaným genem *SPBC106.04*, u kterých byla potvrzena také exprese studovaného transgenu (Obr.14).



Obrázek 18: Produkt amplifikace genu *SPBC106.04* po PCR reakci A. s použitím vnitřních primerů; B. s použitím primerů ohraničujících celou kódující sekvenci genu. 1. specifický amplicon vnitřní části genu *SPBC106.04* o velikosti cca 933 bp; 2., 3. plazmidy pGAPZα A + *SPBC106.04* použité k transformaci kvasinek; 4. specifický amplicon kódující sekvence genu *SPBC106.04* o velikosti cca 2700 bp; M. 1 kb DNA Ladder (Fermentas)

Stejně jako v předchozím případě následovalo ověření exprese AMP-deaminasy v kvasinkách, které probíhalo paralelně s testováním integrace genu do genomu kvasinky. Podle těchto výsledků byl vybrán jeden zástupce z šesti vyselektovaných transformantů a jako první byla testována kultivace v 50 ml YNB

média. Kultury byly kultivovány po dobu 6 dnů, kdy se po 1., 2., 3. a 6. dnu kultivace odebraly alikvoty kultury v intervalech po 24 hodinách. Jelikož bylo získané množství proteinů pro další studie nedostačující následovala kultivace ve větším objemu YNB média (1,6 litru). Jako kontrola sloužil WT *P. pastoris* X33 (400 ml). Kultura byla testována po 3. dnu kultivace. Vybraná kultura byla také testována na přítomnost AMP-deaminasy po kultivaci v YPD médiu. Alikvoty se odebíraly opět po 3. a 6. dnu. Ze zamražených peletů byl pomocí skleněných kuliček (nebo French pressu v případě YPD média) a rozbíjecího pufru s inhibítorem proteas PMSF, připraven hrubý extrakt proteinů. V tomto hrubém extraktu byla po purifikaci obdobně jako v přechozím případě změřena koncentrace proteinů dle Bradfordové a následovalo měření aktivity AMP-deaminasy *S. pombe* v hrubém extraktu při 235 nm a vizualizace overexprese AMP-deaminasy pomocí SDS-PAGE. Polyakrylamidové gely byly následně obarveny stříbrem pro detekci odpovídajících pásů (1016 aminokyselin, MW = 115236,16 Da). Vzhledem k tomu, že ani v tomto případě nebyl detekován protein příslušné velikosti odpovídající AMP-deaminase, jelikož na polyakrylamidovém gelu po SDS-PAGE nebyl v porovnání s kontrolami detekován žádný specifický pás podobně jako tomu bylo u pPICZ A + *SPBC106.04*, byl pro detekci studovaného enzymu prováděn také imunoblotting se specifickou protilátkou na histidinovou kotvu (Obr.19). Pomocí imunodetekce byla potvrzena přítomnost požadovaného rekombinantního proteinu.



Obrázek 19: Membrána a film po imunodetekci specifickou protilátkou na histidinovou kotvu, po 1 hodině vyvíjení. Kultury pěstovány v YPD médiu, 3. a 6. den kultivace. 1. WT kontrola, 3. den kultivace (3,09 µg na jamku); 2. pGAPZα A + *SPBC106.04*, 3. den kultivace (3,10 µg na jamku); 3. WT kontrola, 6. den kultivace (3,09 µg na jamku); 4. pGAPZα A + *SPBC106.04*, 6. den kultivace (4,54 µg na jamku); M. PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas); Mf. ColorBurst™ Electrophoresis Marker (Sigma-Aldrich)

Relativní specifická aktivita AMP-deaminasy získané z buněk kultivovaných ve větším objemu YPD média byla největší 6. dne kultivace ($1,23 \cdot 10^{-8}$ kat/mg), kdy byla její aktivita 2,72x větší než 3. den.

Třetí den kultivace byla aktivita AMP-deaminasy 1,48x větší ve srovnání s hodnotou naměřenou u WT kontroly. Po přidání 0,066 mM inhibitoru GTP se aktivita studovaného enzymu snížila 1,47x ve srovnání s kontrolou.

U proteinu získaného šestý den došlo po přidavku GTP opět ke snížení aktivity, a to cca 2,25x, což byla stále 7,18x větší aktivita ve srovnání s WT kontrolou také inhibovanou GTP.

Dále byla stejně jako v předchozím případě testována případná degradace cytokininů (BAP, IP a IPR) touto AMP-deaminasou. Odbourávání cytokininů nebylo pozorováno ani v tomto případě.

V YNB médiu byly pozorovány pouze nízké hladiny aktivity AMP-deaminasy.

Byl také prováděn experiment měření aktivity AMP-deaminasy proteinových extraktů WT kultur používaných kvasinek, a to *P. pastoris*, *S. cerevisiae* a *S. pombe*. Během experimentu bylo také testováno odbourávání tří různých cytokininových derivátů, konkrétně BAP, IP, IPR. Do reakce bylo přidáváno 74,3 µg proteinového extraktu. Významná AMP-deaminasová relativní specifická aktivita byla při daných podmínkách detekována pouze v extraktu proteinů z *P. pastoris*, a to $1,48 \cdot 10^{-8}$ kat/mg. Pouze zde byla také pozorována degradace testovaných cytokininů.

2.4 DISKUSE

Deriváty purinu, nukleové báze (adenin a guanin) jsou spolu s pyrimidinovými bázemi (cytosinem, thyminem a uracilem) biologicky významné látky, které ve spojení s pětiuhlíkatým monosacharidem (ribosou nebo deoxyribosou) a jedním nebo více zbytky kyseliny fosforečné tvoří nukleotidy, které jsou stavebními kameny nukleových kyselin, kofaktorů i jiných látek klíčových pro život. Účastní se procesu biologických syntéz, buněčné komunikace a přenosu energie.

Tato diplomová práce byla zaměřena na studium AMP-deaminasy, která je jedním z klíčových enzymů regulace hladin purinových nukleotidů. Tento enzym konkrétně katalyzuje hydrolýzu adenosinmonofosfátu na produkty inosinmonofosfát a amoniak. Doposud byla charakterizována pouze AMP-deaminasa z *S. cerevisiae* a stále není dostupná žádná struktura tohoto proteinu (doposud byla vyřešena pouze struktura rostlinné dimerní AMP-deaminasy (Han et al., 2006)). Neboť je AMP-deaminasa u eukaryot důležitým enzymem, mohly by být tyto znalosti posléze využity ve výzkumu aplikovaném na vyšší eukaryota.

V dnešní době je spousta nově vyvíjených léčiv syntetizována na bázi purinů. Např. N⁶ substituované deriváty adeninu – cytokininy, které vykazují účinek v regulaci buněčného dělení. Přirozené rostlinné hormony cytokininy jsou obecně nespecifickými inhibitory živočišných cyklin-dependentních kinas, klíčových enzymů každé eukaryotické buňky, ve které regulují aktivitu řady proteinů buněčného cyklu. V řadě lidských nádorů jsou cykliny a cyklin-dependentní kinasy abnormálně regulovány. Na základě cytokininů již byly syntetizovány specifické inhibitory těchto regulačních proteinů, např. olomoucín, roskovitín nebo bohemin, které mají protinádorové účinky a jsou využívána jako léčiva proti rakovině (Strnad, 2010).

Vzhledem k podobnosti kvasinkové a savčí AMP-deaminasy by bylo možné získat základní data o tom, zda tento enzym má schopnost tato léčiva odbourávat či ne. Bylo prokázáno, že lidská adenosindeaminasa (komerčně dostupná) některá tato léčiva odbourává (Pospíšilová et al., 2008). Tyto znalosti by mohly sloužit k přípravě derivátů léčiv, které by touto skupinou enzymů degradovány nebyly.

Tato diplomová práce vychází z výsledků bakalářské práce z r. 2010 „Příprava plazmidových konstruktů pro integraci AMP-deaminasy do kvasinek“, kde byly připraveny tři plazmidové konstrukty s geny AMP-deaminas pro vnesení do kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Pichia pastoris*. Tyto konstrukty byly připraveny proto, že dřívější pokusy exprimovat AMP-deaminasu v jednodušším prokaryotickém expresním systému *E. coli* nebyly úspěšné (Rozumová, 2009). Jedná se o konstrukty pDR197 s genem *AMD1* pro kultivaci a expresi v *S. cerevisiae*, pGAPZα A s genem

SPBC106.04 a *pPICZ A* taktéž s genem *SPBC106.04* pro kultivaci a expresi v *P. pastoris*. Gen *AMD1* pochází z *S. cerevisiae*, gen *SPBC106.04* z *S. pombe*.

V průběhu diplomové práce byla zkoumána integrace výše zmíněných genů AMP-deaminas do uvedených kvasinek, exprese AMP-deaminasy v kvasinkách a měřena relativní specifická aktivita daného proteinu v hrubém proteinovém lyzátu kvasinek.

- **pDR197 + AMD1**

Použitý vektor umožňuje expresi a pomnožení studovaného genu v *S. cerevisiae* bez integrace do genomu kvasinky. Tento jednoduchý konstrukt byl vytvořen jako kontrolní, jelikož nepřidává do otevřeného čtecího rámce AMP-deaminasy žádné přídavné aminokyseliny, které by mohly vést ke snížení exprese nebo ztrátě aktivity studovaného enzymu. Exprese požadovaného proteinu je řízena konstitutivním promotorem.

Správnost vnesení tohoto konstruktu do kvasinky *S. cerevisiae* byla potvrzena po transformaci TOP10 buněk *E. coli* extraktem z kvasinek restriční analýzou jejich plazmidové DNA. Produkce AMP-deaminasy byla potvrzena měřením relativní specifické aktivity v hrubém extraktu proteinů. Díky GTP (allosterickému inhibitoru) bylo potvrzeno, že aktivita, která byla měřena je opravdu aktivitou AMP-deaminasy.

Tyto výsledky potvrzují funkčnost klonování AMP-deaminasy, která byla ještě dříve testována v bakteriálním expresním systému *E. coli* (Rozumová, 2009). Jelikož by další práce s tímto enzymem byla problematická (složitá purifikace, obtížné vnesení do vhodného vektoru, jedná se o charakterizovaný enzym), byla další práce na tomto enzymu z časových důvodů přerušena.

Dále se tato práce zaměřovala na AMP-deaminasu původem z *S. pombe* kódované genem *SPBC106.04*, který v porovnání s genem *AMD1* obsahuje dva introny, a která dosud nebyla charakterizována.

- **pPICZ A + SPBC106.04**

V tomto případě byl použit methanol-inducibilní promotor AOX1 (Obr.11), jelikož exprese transgenu pod konstitutivním promotorem často zpomaluje růst buněk vlivem nadbytku toxického produktu, který je potom špatně sbalen nebo rychleji odbouráván, což vede ke snížené koncentraci funkčního proteinu v cytosolu.

Integrace požadovaného úseku a exprese genu *SPBC106.04* byla potvrzena pomocí PCR. Výsledný rekombinantní protein obsahuje C-terminální histidinovou kotvu, pomocí které byl daný protein purifikován užitím Ni-NTA agarosy. Z výsledků

imunodetekce s protilátkou specifickou na histidinovou kotvu můžeme usuzovat, že se studovaný protein v buňkách kvasinek opravdu nachází. 3. den kultivace byla pomocí imunodetekce potvrzena přítomnost proteinu predikované velikosti. Zbývající bandy o nižší velikosti jsou pravděpodobně výsledkem rozpadu původní struktury studovaného proteinu vlivem proteolytického štěpení (produkty proteolytického štěpení o velikosti 85 a 50 kDa). Tyto produkty štěpení mohou následně vykazovat jen částečnou nebo plnou aktivitu studované AMP-deaminasy. Pro ověření výsledků imunodetekce byla tato metoda provedena ve dvou opakováních. V prvním případě však při přípravě hrubého extraktu proteinů nebyl do rozbíjecího pufru přidán inhibitor proteas PMSF a nebyl tedy detekován žádný band o velikosti kolem 106 kDa. Z toho můžeme usuzovat na velice intenzivní degradaci rekombinantního proteinu v *P. pastoris*, která ale může být nezbytná pro získání funkčního proteinu (Meyer et al., 1989; Sollitti et al., 1993). Proteinový pás o velikosti kolem 85 kDa pravděpodobně odpovídá odštěpení 193 AMK z N-terminální oblasti proteinu a mělo by se tedy jednat o funkční protein. Přítomnost druhého degradačního produktu považujeme za nežádoucí proteolýzu, kde pravděpodobně vzniká neaktivní fragment enzymu. Vzhledem k tomu, že vizualizace probíhá na základě přítomnosti histidinové kotvy na C-konci rekombinantní AMP-deaminasy, můžeme říci, že k proteolýze dochází pouze na N-konci proteinu.

Během měření relativní specifické aktivity bylo testováno i odbourávání cytokininů, jelikož bylo zjištěno, že proteinový extrakt *S. pombe* má schopnost tyto látky degradovat (Guern et al., 1972). Ikdyž jsou cytokininy purinové deriváty, nebyla pozorována jejich degradace.

V případě měření aktivity AMP-deaminasy izolované z buněk kultivovaných v MMY médiu byla aktivita měřena pouze po 3. dni kultivace, z toho důvodu je uvedená hodnota aktivity nižší. Pokud by byla aktivita měřena až po 6. dni kultivace předpokládáme, že by byla na úrovni srovnatelné s aktivitou získanou z buněk kultivovaných v YPD médiu, a proto nebyl z časových důvodů tento experiment proveden. V komplexním YPD médiu kultura kvasinek lépe a rychleji roste, rychleji také metabolizuje a produkce proteinu je tak větší. Nevýhodou minimálního YNB média je to, že má pro kvasinku omezené zdroje, tudíž kvasinky produkují menší množství proteinu, ale na druhou stranu by toto médium mělo usnadnit případnou purifikaci vzhledem k menšímu množství celkových proteinů. V našem případě byla ovšem pozorována silná kopurifikace velkého množství dalších proteinů na Ni-NTA agarose.

- **pGAPZ α A + SPBC106.04**

V tomto případě je exprese AMP-deaminasy řízena konstitutivním promotorem GAP (Obr.17). Výsledný rekombinantní protein obsahuje C-terminální histidinovou kotvu, která by měla sloužit pro purifikaci daného proteinu pomocí Ni-NTA agarosy jako v předchozím případě a N-terminální α -faktor.

Po provedení imunodetekce s protilátkou specifickou na histidinovou kotvu můžeme porovnáním nitrocelulosové membrány obarvené amidočerní s vyvolaným filmem usuzovat, že se studovaný protein v buňkách kvasinek nachází. Velikost bandu odpovídá cca 115 kDa, což by v tomto případě měla být velikost námi hledaného proteinu. Zbývající bandy o nižší velikosti jsou výsledkem degradace studovaného proteinu. Pro ověření výsledků imunodetekce byla tato metoda provedena opět ve dvou opakováních. Zajímavé je, že nedochází k tak intenzivní degradaci na N-konci v porovnání s předchozím případem. To je pravděpodobně zapříčiněno přítomností α -faktoru na N-konci. Jelikož asi 50% získaného rekombinantního proteinu není štěpeno vůbec a vzhledem k tomu, že změřená aktivita tohoto rekombinantního proteinu je 2,5x menší než v předchozím případě, můžeme podpořit údaje získané dříve (Meyer et al., 1989), že proteolýza určitého počtu AMK na N-konci zvyšuje stabilitu tohoto enzymu.

Relativní specifická aktivita byla stanovena pouze pro kulturu v YPD médiu vzhledem k nízkým aktivitám detekovaným po kultivaci v YNB médiu. Nízká AMP-deaminasová aktivita během kultivace v YNB médiu může být zapříčiněna nižším množstvím proteinů, které pravděpodobně mají schopnost stabilizovat rekombinantní AMP-deaminasu v závislosti na koncentraci celkových proteinů v buňce, která je během kultivace v YPD médiu vyšší. Během měření aktivity a studia odbourávání cytokininů byly výsledky obdobné jako u předchozího případu - žádná degradace cytokininů pozorována nebyla.

Kvůli ověření, že studovaný protein, i přes porušení Kex2 místa potřebného pro sekreci proteinu do kultivačního média, není opravdu do média uvolňován, bylo u tohoto konstruktu testována aktivita AMP-deaminasy v kultivačním médiu. Získané médium bylo vždy zahuštěno ve speciálních falkonkách s filtry asi 25x. Aktivita AMP-deaminasy v žádném z médií naměřena nebyla.

Závěrem orientačního experimentu měření aktivity AMP-deaminasy u WT kultur používaných kvasinek bylo, že významná aktivita byla detekována pouze u extraktu proteinů z *P. pastoris*, a také zde byla pozorována degradace cytokininů BAP, IP a IPR. Z časových důvodů nebyla tato degradace blíže prozkoumána, ale je možné, že se na ní podílí jiné enzymy než AMP-deaminasa. Takovéto degradace cytokininů

extrakty kvasinek již byly pozorovány dříve (Guern et al., 1972). Za enzym zodpovědný za degradaci cytokininů kvasinkami nebo savci byly označeny právě adenindeaminasy podílející se na přeměně adeninu (Guern et al., 1972) a AMP-deaminasy (Dorée & Terrine, 1972).

3. ZÁVĚR

Byla zpracována literární rešerše na téma rekombinantní proteiny a jejich exprese v dostupných hostitelích. Dále jsou v první části této práce popisovány obecné vlastnosti, které mají kvasinky jako nejčastěji využívané expresní systémy se zaměřením na *P. pastoris*, *S. cerevisiae* a *S. pombe*. V neposlední řadě byla také část rešerše věnována kvasinkové AMP-deaminase, která byla také studována v experimentální části této práce.

Tato diplomová práce navazuje na mou bakalářskou práci (Kajnarová, 2010), během níž byly připraveny tři konstrukty umožňující expresi genů AMP-deaminasy v kvasinkách, které byly využity během experimentální části této práce. Konkrétně se jedná o konstrukty pDR197 s genem *AMD1* (původem z *S. cerevisiae*), který umožňuje expresi tohoto proteinu v *S. cerevisiae* a konstrukty pPICZ A + *SPBC106.04* a pGAPZα A + *SPBC106.04*, které nesou gen pro AMP-deaminasu původem z *S. pombe* a umožňují expresi proteinu v *P. pastoris*. U konstruktů pDR197 + *AMD1* a pGAPZα A + *SPBC106.04* jsou geny exprimovány pod konstitutivními promotory ve srovnání s konstruktem pPICZ A + *SPBC106.04*, kde je gen exprimován pod methanol indukibilním promotorem. U konstruktů pGAPZα A + *SPBC106.04* se nachází α-faktor, který by měl za normálních okolností umožňovat sekreci proteinu do kultivačního média. Avšak během zaklonování genu do vektoru pGAPZα A došlo k vyštěpení Kex2 místa, které je jedním z důležitých aspektů pro správnou funkčnost sekreční dráhy proteinů, tudíž nemohla být tato výhodná vlastnost využita. U konstruktů s vektory pDR197 a pPICZ A protein zůstává v buňkách. Vektory pGAPZα A a pPICZ A vnášejí do rekombinantního proteinu histidinovou kotvu, která by měla umožňovat snadnou a rychlou purifikaci požadovaného proteinu, pDR197 nevnaší do AMP-deaminasy žádný aditivní úsek. U konstruktů pGAPZα A + *SPBC106.04* a pPICZ A + *SPBC106.04* dochází ke stabilní integraci expresní kazety do genomu *P. pastoris*, zatímco u pDR197 + *AMD1* probíhá exprese AMP-deaminasy v *S. cerevisiae* bez předchozí integrace do genomové DNA, jelikož je tento konstrukt vnesen do kvasinky ve formě plazmidu.

Cílem diplomové práce bylo zaklonovat připravené konstrukty do odpovídajících kvasinek, ověřit expresi genů pro AMP-deaminasu a detekovat aktivitu AMP-deaminasy pocházející z *S. cerevisiae* a *S. pombe* v kvasinkách.

V lyzátu buněk byla opravdu detekována námi vnášená deaminasa, v případě AMP-deaminasy původem z *S. cerevisiae* byla naměřená aktivita největší 4. den kultivace v YNB médiu. Potvrzení, že se jedná o nadexprimovanou *AMD1* bylo podpořeno také specifickým snížením aktivity AMP-deaminasy po přidavku inhibitoru v porovnání

s WT kontrolami. Tyto výsledky potvrzují funkčnost AMP-deaminasy, která byla dříve neúspěšně testována v bakteriálním expresním systému *E. coli*. Jelikož by další práce s tímto enzymem byla problematická (složitá purifikace, obtížné vnesení do vhodného vektoru, jedná se o charakterizovaný enzym), byla další práce na tomto enzymu z časových důvodů přerušena.

Dále byla během experimentů zkoumána AMP-deaminasa původem z *S. pombe*, která dosud nebyla charakterizována, a která se na genové úrovni značně liší od *AMD1*. Během diplomové práce byly do *P. pastoris* vneseny dva různé úseky plazmidové DNA obsahující gen *SPBC106.04*. Největší aktivity byly detekovány z testovaných variant vzorků kultivovaných v YPD médiu z 6. dne. K potvrzení exprese AMP-deaminasy původem z *S. pombe* přispěla zejména metoda imunodetekce se specifickou protilátkou na histidinovou kotvu, kterou obě varianty integrovaných úseků nesly.

U testovaných proteinů nebyla potvrzena degradace cytokininů BAP, IP a IPR, která byla pozorována dříve v hrubém extraktu *S. pombe* (Guern et al., 1972) a bylo prokázáno, že není způsobena adenindeaminasou (Pospíšilová et al, 2008). Proto byla orientačně testována a následně i potvrzena degradace cytokininů, ale pouze v přítomnosti extraktu *P. pastoris*. Tato degradace nebyla z časových důvodů blíže studována. Během experimentu, kdy byla testována aktivita studovaného proteinu v proteinovém extraktu WT kultur, bylo zjištěno, že největší aktivita byla detekována u WT *P. pastoris*, která byla srovnatelná s nadexprimovanými a částečně purifikovanými AMP-deaminasami. Vzhledem k těmto okolnostem by pro další studium AMP-deaminas byla pravděpodobně nejvhodnější deaminasa z *P. pastoris*, která neobsahuje introny, a která by mohla být produkována v přirozené formě v expresním systému *P. pastoris*.

Seznam použité literatury:

Achstetter T., Wolf D. H. (1985) Hormone processing and membrane-bound proteinases in yeast. *EMBO J.* **4**, 173-7.

Alessandrini L., Ciuffreda P., Pavlovic R., Santaniello E. (2008) Activity of adenosin deaminase and adenylate deaminase on adenosine and 2', 3'-isopropylidene adenosine: role of the protecting group at different pH values. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **27**, 31-6.

Aravind L., Watanabe H., Lipman D. J., Koonin E. V. (2000) Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 11319-24.

Blandin G., Durrens P., Tekaiia F., Aigle M., Bolotin-Fukuhara M., Bon E., Casarégola S., de Montigny J., Gaillardin C., Lépingle A., Llorente B., Malpertuy A., Neuvéglise C., Ozier-Kalogeropoulos O., Perrin A., Potier S., Souciet J., Talla E., Toffano-Nioche C., Wésolowski-Louvel M., Marck C., Dujon B. (2000) Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 4. The genome of *Saccharomyces cerevisiae* revisited. *FEBS Lett.* **487**, 31-6.

Bobrowicz P., Davidson R. C., Li H., Potgieter T. I., Nett J. H., Hamilton S. R., Stadheim T. A., Miele R. G., Bobrowicz B., Mitchell T., Rausch S., Renfer E., Wildt S. (2004) Engineering of an artificial glycosylation pathway blocked in core oligosaccharide assembly in the yeast *Pichia pastoris*: production of complex humanized glycoproteins with terminal galactose. *Glycobiology.* **14**, 757-66.

Brady T. G., Costello J. F. (1974) Activation and inhibition of AMP deaminase by GTP and ATP. *Biochim Biophys Acta* **350**, 455-60.

Brown T. A. (překlad Fellner a kol.) (2006) Klonování genů a analýza DNA, Vol. 4 Manipulace s purifikovanou DNA, pp. 54-86; Vol. 5 Přenos DNA do živých buněk, pp. 87-106; 376, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká republika.

Buckholz R. G., Gleeson M. A. (1991) Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology (N Y)* **9**, 1067-72.

Callewaert N., Laroy W., Cadirgi H., Geysens S., Saelens X., Min Jou W., Contreras R. (2001) Use of HDEL-tagged *Trichoderma reesei* mannosyl oligosaccharide 1,2-alpha-D-mannosidase for N-glycan engineering in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett.* **503**, 173-8.

Cebadera E., Camara M. (2007) Green Biotechnology. Plants as biofactories: Edible vaccines production. *J. Biotechnol.* **131**, 43-47.

Celik E., Calik P. (2011) Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv.* 10.1016/j.biotechadv.2011.09.011.

Celik E., Calik P., Halloran S. M., Oliver S. G. (2007) Production of recombinant human erythropoietin from *Pichia pastoris* and its structural analysis. *J Appl Microbiol.* **103**, 2084-94.

Cereghino G. P., Cereghino J. L., Ilgen C., Cregg J. M. (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr Opin Biotechnol.* **13**, 329-32.

Clare J. J., Rayment F. B., Ballantine S. P., Sreekrishna K., Romanos M. A. (1991) High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology (N Y)* **9**, 455-60.

Coffee C. J., Solano C. (1977) Rat muscle 5'-adenylic acid aminohydrolase. Role of K⁺ and adenylate energy charge in expression of kinetic and regulatory properties. *J Biol Chem.* **252**, 1606-12.

Cole H. A., Howard B. H., Clark D. J. (2011) The centromeric nucleosome of budding yeast is perfectly positioned and covers the entire centromere. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **108**, 12687-92.

Cotobal C., Segurado M., Antequera F. (2010) Structural diversity and dynamics of genomic replication origins in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **29**, 934-42.

Cregg J. M., Cereghino J. L., Shi J., Higgins D. R. (2000) Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol.* **16**, 23-52.

Cregg J. M., Madden K. R., Barringer K. J., Thill G. P., Stillman C. A. (1989) Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol.* **9**, 1316-23.

Cregg J. M., Vedvick T. S., Raschke W. C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)* **11**, 905-10.

Čejková A., Sylabus - Biotechnologické aplikace mikroorganismů, Vol. Methylotrofní mikroorganismy; Rod *Saccharomyces*, pp. 11-13; 24-25, Ústav biotechnologie VŠCHT Praha, Praha, Česká republika.

Dale C., Christopher, Allen A., Aaron, Fogerty S., Scott (1999) *Pichia pastoris*: A eukaryotic system for the large-scale production of biopharmaceuticals. *Biopharm* **12**, 36-42.

Dancer J. E., Hughes R. G., Lindell S. D. (1997) Adenosine-5'-phosphate deaminase. A novel herbicide target. *Plant Physiol.* **114**, 119-29.

Demain A. L., Vaishnav P. (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.* **27**, 297-306.

De Schutter K., Lin Y. C., Tiels P., Van Hecke A., Glinka S., Weber-Lehmann J., Rouzé P., Van de Peer Y., Callewaert N. (2009) Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol.* **27**, 561-6.

Dorée M., Terrine C. (1972) Action of AMP deaminase on *N*⁶-substituted adenine nucleoside 5'-monophosphates. *Physiol Veg D* **275**, 1503-1506.

Dubey D. D., Kim S. M., Todorov I. T., Huberman J. A. (1996) Large, complex modular structure of a fission yeast DNA replication origin. *Curr Biol.* **6**, 467-73.

Dujon B., Sherman D., Fischer G., Durrens P., Casaregola S., Lafontaine I., De Montigny J., Marck C., Neuvéglise C., Talla E., et al. (2004) Genome evolution in yeasts. *Nature.* **430**, 35-44.

Elbein A. D., Mitchell M., Molyneux R. J. (1984) Effect of castanospermine on the structure and secretion of glycoprotein enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *J Bacteriol.* **160**, 67-75.

Ellis K. J., Kuntz K., Sturtevant J. M. (1971) The activation of muscle adenylate deaminase by substrate. *J Biol Chem.* **246**, 6631-7.

Falch E. A. (1991) Industrial enzymes - developments in production and application. *Biotechnol Adv.* **9**, 643-58.

Gellison G., Janowicz Z. A., Weydemann U., Melber K., Strasser A. W., Hollenberg C. P. (1992) High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol Adv.* **10**, 179-89.

Gellissen G., Kunze G., Gaillardin C., Cregg J. M., Berardi E., Veenhuis M., van der Klei I. (2005) New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica* - a comparison. *FEMS Yeast Res.* **5**, 1079-96.

Gerngross T. U. (2004) Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nat Biotechnol.* **22**, 1409-14.

Giga-Hama Y., Tohda H., Takegawa K., Kumagai H. (2007) *Schizosaccharomyces pombe* minimum genome factory. *Biotechnol Appl Biochem.* **46**, 147-55.

Girard L. S., Fabis M. J., Bastin M., Courtois D., Pétiard V., Koprowski H. (2006) Expression of a human anti-rabies virus monoclonal antibody in tobacco cell culture. *Biochem Biophys Res Commun.* **345**, 602-7.

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**, 546 - 567.

Goodrick J. C., Xu M., Finnegan R., Schilling B. M., Schiavi S., Hoppe H., Wan N. C. (2001) High-level expression and stabilization of recombinant human chitinase produced in a continuous constitutive *Pichia pastoris* expression system. *Biotechnol Bioeng.* **74**, 492-7.

Guern J., Dorée M., Leguay J. J., Heslot H. (1972) Enzymatic degradation of kinetin and certain N6-substituted adenines, in *Schizosaccharomyces pombe*. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* **275**, 377-80.

Hall T. A. (1999) BioEdit: A user – friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* **41**, 95-98.

Hamilton S. R. Bobrowicz P., Bobrowicz B., Davidson R. C., Li H., Mitchell T., Nett J. H., Rausch S., Stadheim T. A., Wischnewski H., Wildt S., Gerngross T. U. (2003) Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science* **301**, 1244-6.

Hamilton S. R., Davidson R. C., Sethuraman N., Nett J. H., Jiang Y., Rios S., Bobrowicz P., Stadheim T. A., Li H., Choi B. K., Hopkins D., Wischnewski H., Roser J., Mitchell T., Strawbridge R. R., Hoopes J., Wildt S., Gerngross T. U. (2006) Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science* **313**, 1441-3.

Han B. W., Bingman C. A., Mahnke D. K., Bannen R. M., Bednarek S. Y., Sabina R. L., Phillips G. N. Jr. (2006) Membrane association, mechanism of action, and structure of Arabidopsis embryonic factor 1 (FAC1). *J Biol Chem.* **281**, 14939-47.

Heyland J., Fu J., Blank L. M., Schmid A. (2010) Quantitative physiology of *Pichia pastoris* during glucose-limited high-cell density fed-batch cultivation for recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng.* **107**, 357-68.

Hickman M. A., Froyd C. A., Rusche L. N. (2011) Reinventing heterochromatin in budding yeasts: Sir2 and the origin recognition complex take center stage. *Eukaryot Cell.* **10**, 1183-92

Hodges P. E., McKee A. H., Davis B. P., Payne W. E., Garrels J. I. (1999) The Yeast Proteome Database (YPD): a model for the organization and presentation of genome-wide functional data. *Nucleic Acids Res.* **27**, 69-73.

Hodgson J. (1994) The Changing Bulk Biocatalyst Market. *Nat Biotechnol.* **12**, 789-90.

Huang C. J., Lowe A. J., Batt C. A. (2010) Recombinant immunotherapeutics: current state and perspectives regarding the feasibility and market. *Appl Microbiol Biotechnol.* **87**, 401-10.

Hurwitz J., Heppel L. A., Horecker B. L. (1957) The enzymatic cleavage of adenylic acid to adenine and ribose 5-phosphate. *J Biol Chem.* **226**, 525-40.

Greene J. J. (2004) Host cell compatibility in protein expression. *Methods Mol Biol.* **267**, 3-14.

Chapman A. G., Atkinson D. E. (1973) Stabilization of adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction. *J Biol Chem.* **248**, 8309-8312.

Cherry J. M., Adler C., Ball C., Chervitz S. A., Dwight S. S., Hester E. T., Jia Y., Juvik G., Roe T., Schroeder M., Weng S., Botstein D. (1998) SGD: *Saccharomyces* Genome Database. *Nucleic Acids Res.* **26**, 73-9.

Choi B. K., Bobrowicz P., Davidson R. C., Hamilton S. R., Kung D. H., Li H., Miele R. G., Nett J. H., Wildt S., Gerngross T. U. (2003) Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**, 5022-7.

Chung L., Bridger W. A. (1976) Activation of rabbit cardiac AMP aminohydrolase by ADP: a component of a mechanism guarding against ATP depletion. *FEBS Lett.* **64**, 338-40.

Idiris A., Tohda H., Kumagai H., Takegawa K. (2010) Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* **86**, 403-17.

Itoh R., Saint-Marc C., Chaignepain S., Katahira R., Schmitter J. M., Daignan-Fornier B. (2003) The yeast *ISN1* (YOR155c) gene encodes a new type of IMP-specific 5'-nucleotidase. *BMC Biochem.* **4**, 4.

Johannes T. W., Zhao H. (2006) Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Curr Opin Microbiol.* **9**, 261-7.

Julius D., Blair L., Brake A., Sprague G., Thorner J. (1983) Yeast alpha factor is processed from a larger precursor polypeptide: the essential role of a membrane-bound dipeptidyl aminopeptidase. *Cell.* **32**, 839-52.

Julius D., Brake A., Blair L., Kunisawa R., Thorner J. (1984) Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine-cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro-alpha-factor. *Cell*. **37**, 1075-89.

Kajnarová Vendula (2010) Příprava plazmidových konstruktů pro integraci AMP-deaminasy do kvasinek. Bakalářská práce, PŘF UP Olomouc.

Kaletha K., Skladanowski A. (1984) Regulatory properties of 14 day embryo and adult hen heart AMP-deaminase. *Int J Biochem*. **16**, 75-81.

Kim M. W., Kim E. J., Kim J. Y., Park J. S., Oh D. B., Shimma Y., Chiba Y., Jigami Y., Rhee S. K., Kang H. A. (2006) Functional characterization of the *Hansenula polymorpha* *HOC1*, *OCH1*, and *OCR1* genes as members of the yeast OCH1 mannosyltransferase family involved in protein glycosylation. *J Biol Chem*. **281**, 6261-72.

Kjaerulff S., Jensen M. R. (2005) Comparison of different signal peptides for secretion of heterologous proteins in fission yeast. *Biochem Biophys Res Commun*. **336**, 974-82.

Kocková-Kratochvílová A., Kutková M., (1961) Atlas kvasinek a kvasinkových mikroorganismů, Státní nakladatelství technické literatury, Praha, Česká republika.

Krassovsky K., Henikoff J. G., Henikoff S. (2012) Tripartite organization of centromeric chromatin in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**, 243-8.

Kuchner O., Arnold F. H. (1997) Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol*. **15**, 523-30.

Lecoq K., Belloc I., Desgranges C., Konrad M., Daignan-Fornier B., (2001) *YLR209c* encodes *Saccharomyces cerevisiae* purine nucleoside phosphorylase. *J Bacteriol*. **183**, 4910–4913.

Leung H. B., Kvalnes-Krick K. L., Meyer S. L., deRiel J. K., Schramm V. L. (1989) Structure and regulation of the AMP nucleosidase gene (*amn*) from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **28**, 8726-33.

Leung H. B., Schramm V. L. (1980) Adenylate degradation in *Escherichia coli*. The role of AMP nucleosidase and properties of the purified enzyme. *J Biol Chem.* **255**, 10867-74.

Leung H. B., Schramm V. L. (1984) The structural gene for AMP nucleosidase. Mapping, cloning, and overproduction of the enzyme. *J Biol Chem.* **259**, 6972-8.

Liu B., Gong X., Chang S., Yang Y., Song M., Duan D., Wang L., Ma Q., Wu J. (2009) Disruption of the *OCH1* and *MNN1* genes decrease N-glycosylation on glycoprotein expressed in *Kluyveromyces lactis*. *J Biotechnol.* **143**, 95-102.

Loret M. O., Pedersen L., François J. (2007) Revised procedures for yeast metabolites extraction: application to a glucose pulse to carbon-limited yeast cultures, which reveals a transient activation of the purine salvage pathway. *Yeast* **24**, 47-60.

Lowenstein J. M. (1972) Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. *Physiol Rev.* **52**, 382-414.

Macauley-Patrick S., Fazenda M. L., McNeil B., Harvey L. M. (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**, 249-70.

Mareček A., Honza J. (2005) Chemie pro čtyřletá gymnázia 3. díl, Vol. 4 Peptidy a bílkoviny, pp. 147-154, Nakladatelství Olomouc s. r. o., Olomouc, Česká republika.

Marquetant R., Desai N. M., Sabina R. L., Holmes E. W. (1987) Evidence for sequential expression of multiple AMP deaminase isoforms during skeletal muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**, 2345-9.

Mattanovich D., Callewaert N., Rouzé P., Lin Y. C., Graf A., Redl A., Tiels P., Gasser B., De Schutter K. (2009b) Open access to sequence: browsing the *Pichia pastoris* genome. *Microb Cell Fact.* **8**, 53.

Mattanovich D., Graf A., Stadlmann J., Dragosits M., Redl A., Maurer M., Kleinheinz M., Sauer M., Altmann F., Gasser B. (2009a) Genome, secretome and glucose transport highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microb Cell Fact.* **8**, 29.

McAleer W. J., Buynak E. B., Maigetter R. Z., Wampler D. E., Miller W. J., Hilleman M. R. (1984) Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature*. **307**, 178-80.

Merkler D. J., Brenowitz M., Schramm V. L. (1990) The rate constant describing slow-onset inhibition of yeast AMP deaminase by cofomycin analogues is independent of inhibitor structure. *Biochemistry* **29**, 8358-64.

Merkler D. J., Kline P. C., Weiss P., Schramm V. L. (1993) Transition-state analysis of AMP deaminase. *Biochemistry* **32**, 12993–13001.

Merkler D. J., Schramm V. L. (1990) Catalytic and regulatory site composition of yeast AMP deaminase by comparative binding and rate studies. Resolution of the cooperative mechanism. *J Biol Chem*. **265**, 4420–4426

Merkler D. J., Schramm V. L. (1993) Catalytic mechanism of yeast adenosine 5' monophosphate deaminase. Zinc content, substrate specificity, pH studies, and solvent isotope effects. *Biochemistry* **32**, 5792–5799.

Merkler D. J., Wali A. S., Taylor J., Schramm V. L. (1989) AMP deaminase from yeast. Role in AMP degradation, large scale purification, and properties of the native and proteolyzed enzyme. *J Biol Chem*. **264**, 21422-30.

Meyer S. L., Kvalnes-Krick K. L., Schramm V. L. (1989) Characterization of *AMD*, the AMP deaminase gene in yeast. Production of amd strain, cloning, nucleotide sequence, and properties of the protein. *Biochemistry* **28**, 8734-43.

Moreno S., Ruíz T., Sánchez Y., Villanueva J. R., Rodríguez L. (1985) Subcellular localization and glycoprotein nature of the invertase from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch Microbiol*. **142**, 370-4.

Mortimer R. K., Schild D., Contopoulou C. R., Kans J. A. (1989) Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*, edition 10. *Yeast* **5**, 321-403.

Murakami K. (1979) AMP deaminase from baker's yeast. Kinetic and molecular properties. *J Biochem*. **86**, 1331-6.

Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W. (překlad Fialová L. a kol.) (2002) Harperova BIOCHEMIE, Vol. 42 Technologie rekombinantní DNA, pp. 471-487, H & H, 4. vyd., Jihlava, Česká republika.

Nevalainen K. M., Te'o V. S., Bergquist P. L. (2005) Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends Biotechnol.* **23**, 468-74.

Niven D. F., Collins P. A., Knowles C. J. (1977) Adenylate energy charge during batch culture of *Beneckea natriegens*. *J Gen Microbiol.* **98**, 95-108.

Nunberg J. H., Meade J. H., Cole G., Lawyer F. C., McCabe P., Schweickart V., Tal R., Wittman V. P., Flatgaard J. E., Innis M. A. (1984) Molecular cloning and characterization of the glucoamylase gene of *Aspergillus awamori*. *Mol Cell Biol.* **4**, 2306-15.

Oh D. B., Park J. S., Kim M. W., Cheon S. A., Kim E. J., Moon H. Y., Kwon O., Rhee S. K., Kang H. A. (2008) Glycoengineering of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* for the production of glycoproteins with trimannosyl core N-glycan by blocking core oligosaccharide assembly. *Biotechnol J.* **3**, 659-68.

Ogasawara N., Goto H., Watanabe T. (1975) Isozymes of rat AMP deaminase. *Biochim Biophys Acta.* **403**, 530-7.

Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., Watanabe T. (1978) Distribution of AMP-deaminase isozymes in rat tissues. *Eur J Biochem.* **87**, 297-304

Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., Watanabe T., Asano T. (1982) AMP deaminase isozymes in human tissues. *Biochim Biophys Acta.* **714**, 298-306.

Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., Yoshino M. (1977) Subunit structures of AMP deaminase isozymes in rat. *Biochem Biophys Res Commun.* **79**, 671-6.

Ohashi T., Ikeda Y., Tanaka N., Nakakita S., Natsuka S., Giga-Hama Y., Takegawa K. (2009) The *och1* mutant of *Schizosaccharomyces pombe* produces galactosylated core structures of N-linked oligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem.* **73**, 407-14.

Olsson I., Bjerling P. (2011) Advancing our understanding of functional genome organisation through studies in the fission yeast. *Curr Genet.* **57**, 1-12.

Osorio H., Carvalho E., del Valle M., Gunther Sillero M. A., Moradas-Ferreira P., Sillero A. (2003) H₂O₂, but not menadione, provokes a decrease in the ATP and an increase in the inosine levels in *Saccharomyces cerevisiae*. An experimental and theoretical approach. *Eur J Biochem.* **270**, 1578–1589.

Ostergaard S., Olsson L., Nielsen J. (2000a) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **64**, 34-50.

Ostergaard S., Roca C., Rønnow B., Nielsen J., Olsson L. (2000) Physiological studies in aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* strains harboring the *MEL1* gene. *Biotechnol Bioeng.* **68**, 252-9.

Papini M., Salazar M., Nielsen J. (2010) Systems biology of industrial microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* **120**, 51-99.

Parodi A. J. (1999) Reglucosylation of glycoproteins and quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum of yeast cells. *Biochim Biophys Acta.* **1426**, 287-95.

Pidoux A. L., Armstrong J. (1992) Analysis of the *BiP* gene and identification of an ER retention signal in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **11**, 1583-91.

Pospíšilová H., Šebela M., Novák O., Frébort I. (2008) Hydrolytic cleavage of N6-substituted adenine derivatives by eukaryotic adenine and adenosine deaminases. *Biosci Rep.* **28**, 335-47.

Ramezani-Rad M., Hollenberg C. P., Lauber J., Wedler H., Griess E., Wagner C., Albermann K., Hani J., Piontek M., Dahlems U., Gellissen G. (2003) The *Hansenula polymorpha* (strain CBS4732) genome sequencing and analysis. *FEMS Yeast Res.* **4**, 207-15.

Rhind N., Chen Z., Yassour M., Thompson D. A., Haas B. J., Habib N., Wapinski I., Roy S., Lin M. F., Heiman D. I., et al. (2011) Comparative functional genomics of the fission yeasts. *Science* **332**, 930-6.

Rinderknecht E., O'Connor B. H., Rodriguez H. (1984) Natural human interferon-gamma. Complete amino acid sequence and determination of sites of glycosylation. *J Biol Chem.* **259**, 6790-7.

Rozumová Petra (2009) Amplifikace, klonování a exprese AMP-deaminasy. Diplomová práce, PŘF UP Olomouc.

Sabina R. L., Mahnke-Zizelman D. K. (2000) Towards an understanding of the functional significance of N-terminal domain divergence in human AMP deaminase isoforms. *Pharmacol Ther.* **87**, 279-83.

Sabina R. L., Marquetant R., Desai N. M., Kaletha K., Holmes E. W. (1987) Cloning and sequence of rat myoadenylate deaminase cDNA. Evidence for tissue-specific and developmental regulation. *J Biol Chem.* **262**, 12397-400.

Saint-Marc C., Pinson B., Couplier F., Jourden L., Lisova O., Daignan-Fornier B. (2009) Phenotypic consequences of purine nucleotide imbalance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **183**, 529-38.

Setlow B., Lowenstein J. M. (1967) Adenylate deaminase. II. Purification and some regulatory properties of the enzyme from calf brain. *J Biol Chem.* **242**, 607-15.

Schramm V. L., Lazarik F. C. (1975) The pathway of adenylate catabolism in *Azotobacter vinelandii*. Evidence for adenosine monophosphate nucleosidase as the regulatory enzyme. *J Biol Chem.* **250**, 1801-8.

Schramm V. L., Leung H. (1973) Regulation of adenosine monophosphate levels as a function of adenosine triphosphate and inorganic phosphate. A proposed metabolic role for adenosine monophosphate nucleosidase from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem.* **248**, 8313-5.

Smiley K. L. Jr, Berry A. J., Suelter C. H. (1967) An improved purification, crystallization, and some properties of rabbit muscle 5'-adenylic acid deaminase. *J Biol Chem.* **242**, 2502-6.

Smith L. D., Kizer D. E. (1969) Purification and properties of rat liver AMP deaminase. *Biochim Biophys Acta* **191**, 415-24.

Sohn J. H., Kang H. A., Rao K. J., Kim C. H., Choi E. S., Chung B. H., Rhee S. K. (2001) Current status of the anticoagulant hirudin: its biotechnological production and clinical practice. *Appl Microbiol Biotechnol.* **57**, 606-13.

Solá R. J., Griebenow K. (2010) Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy. *BioDrugs.* **24**, 9-21.

Solano C., Coffee C. J. (1978) Differential response of AMP deaminase isozymes to changes in the adenylate energy charge. *Biochem Biophys Res Commun.* **85**, 564-71.

Sollitti P., Merkle D. J., Estupiñán B., Schramm V. L. (1993) Yeast AMP deaminase. Catalytic activity in *Schizosaccharomyces pombe* and chromosomal location in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **268**, 4549-55.

Sonderegger M., Sauer U. (2003) Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. *Appl Environ Microbiol.* **69**, 1990-8.

Song Y., Choi M. H., Park J. N., Kim M. W., Kim E. J., Kang H. A., Kim J. Y. (2007) Engineering of the yeast *Yarrowia lipolytica* for the production of glycoproteins lacking the outer-chain mannose residues of N-glycans. *Appl Environ Microbiol.* **73**, 4446-54.

Spychała J., Kaletha K., Makarewicz W. (1985) Developmental changes of chicken liver AMP deaminase. *Biochem J.* **231**, 329-33.

Sreekrishna K., Nelles L., Potenz R., Cruze J., Mazzaferro P., Fish W., Fuke M., Holden K., Phelps D., Wood P., et al. (1989) High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* **28**, 4117-25.

Strnad M. (Laboratoř růstových regulátorů UP & Ústav experimentální botaniky AVČR): Deriváty adeninu pro léčení nádorových onemocnění. Sborník odborné konference Rutinní analýza nukleových kyselin molekulárně biologickými technikami (RANK 2010), Pardubice 2010, pp. 8-9.

Thompson A., Hall C., Karunakaran T., Gunasekaran M. (1998) Properties of adenosine monophosphate deaminase of *Candida albicans*. *Microbios.* **96**, 133-9.

Tobin M. B., Gustafsson C., Huisman G. W. (2000) Directed evolution: the 'rational' basis for 'irrational' design. *Curr Opin Struct Biol.* **10**, 421-7.

Tomozawa Y., Wolfenden R. (1970) Binding of guanosine triphosphate and adenosine triphosphate by rabbit muscle adenosine monophosphate deaminase. *Biochemistry* **9**, 3400-4.

Turner D. H., Turner J. F. (1961) Adenylic deaminase of pea seeds. *Biochem J.* **79**, 143-147.

Van den Berghe G., Bronfman M., Vanneste R., Hers H. G. (1977) The mechanism of adenosine triphosphate depletion in the liver after a load of fructose. A kinetic study of liver adenylate deaminase. *Biochem J.* **162**, 601-9.

Van Hartingsveldt W., Gouka R. J., Harteveld G. M., Luiten R. G., Selten G. C., Suykerbuyk M. E., van Gorcom R. F., van Paridon P. A., van Zeijl C. M., Veenstra A. E., et al. (1993) Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (*phyA*) of *Aspergillus niger*. *Gene* **127**, 87-94.

Vervecken W., Kaigorodov V., Callewaert N., Geysens S., De Vusser K., Contreras R. (2004)
In vivo synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol.* **70**, 2639-46.

Walsh G. (2003) Biopharmaceutical benchmarks - 2003. *Nat Biotechnol.* **21**, 865-70.

Walther T., Novo M., Rössger K., Létisse F., Loret M. O., Portais J. C., François J. M. (2010) Control of ATP homeostasis during the respiro-fermentative transition in yeast. *Mol Syst Biol.* **6**, 344.

Wang Y., Liang Z. H., Zhang Y. S., Yao S. Y., Xu Y. G., Tang Y. H., Zhu S. Q., Cui D. F., Feng Y. M. (2001) Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnol Bioeng.* **73**, 74-9.

Werten M. W., van den Bosch T. J., Wind R. D., Mooibroek H., de Wolf F. A. (1999) High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast* **15**, 1087-96.

Wilhelm B. T., Marguerat S., Watt S., Schubert F., Wood V., Goodhead I., Penkett C. J., Rogers J., Bähler J. (2008) Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* **453**, 1239-43.

Wixon J. (2002) Featured organism: *Schizosaccharomyces pombe*, the fission yeast. *Comp Funct Genomics* **3**, 194-204.

Wood V., Gwilliam R., Rajandream M. A., Lyne M., Lyne R., Stewart A., Sgouros J., Peat N., Hayles J., Baker S., et al. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-80.

Yamaguchi K., Akai K., Kawanishi G., Ueda M., Masuda S., Sasaki R. (1991) Effects of site-directed removal of N-glycosylation sites in human erythropoietin on its production and biological properties. *J Biol Chem.* **266**, 20434-9.

Yanagida M. (2002) The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biol.* **3**(3):COMMENT2003.

Yoshino M. (1970) AMP nucleosidase from *Azotobacter vinelandii*. I. Purification and properties. *J Biochem.* **68**, 321-9.

Yoshino M., Kawamura Y., Ogasawara N. (1976) Regulation of AMP deaminase from chicken erythrocytes. A kinetic study of the allosteric interactions. *J Biochem.* **80**, 299-308.

Yoshino M., Murakami K. (1981) In situ studies on AMP deaminase as a control system of the adenylate energy charge in yeasts. *Biochim Biophys Acta* **672**, 16-20.

Yoshino M., Murakami K. (1982a) AMP deaminase reaction as a control system of glycolysis in yeast. Activation of phosphofructokinase and pyruvate kinase by the AMP deaminase-ammonia system. *J Biol Chem.* **257**, 2822-2828.

Yoshino M., Murakami K. (1982b) AMP deaminase as a control system of glycolysis in yeast. Mechanism of the inhibition of glycolysis by fatty acid and citrate. *J Biol Chem.* **257**, 10644-10649.

Yoshino M., Murakami K. (1985) AMP deaminase reaction as a control system of glycolysis in yeast. Role of ammonium ion in the interaction of phosphofructokinase and pyruvate kinase activity with the adenylate energy charge. *J Biol Chem.* **260**, 4729-32.

Yoshino M., Murakami K., Tsushima K. (1978) The role of polyamines in the regulation of AMP deaminase isozymes. *Biochim Biophys Acta* **542**, 177-9.

Yoshino M., Murakami K., Tsushima K. (1979a) AMP deaminase from baker's yeast. Purification and some regulatory properties. *Biochim Biophys Acta* **570**, 157-166.

Yoshino M., Murakami K., Tsushima K. (1979b) Polyamines as activators of AMP nucleosidase from *Azotobacter vinelandii*. *Experientia* **35**, 578-9.

Yun S., Suelter C. H. (1978) Human erythrocyte 5'-AMP aminohydrolase. Purification and characterization. *J Biol Chem.* **253**, 404-8.

Zsebo K. M., Lu H. S., Fieschko J. C., Goldstein L., Davis J., Duker K., Suggs S. V., Lai P. H., Bitter G. A. (1986) Protein secretion from *Saccharomyces cerevisiae* directed by the prepro-alpha-factor leader region. *J Biol Chem.* **261**, 5858-65.

Seznam použitých zkratek:

AMD, AMPD	AMP-deaminasa
AMK	aminokyseliny
<i>amn</i>	gen pro AMP-nukleosidasu
AMP	adenosine-5-monofosfát (sodná sůl)
AOX	alkoholoxidasa
ATP	adenosin-5-trifosfát (hydrát disodné soli)
BAP	benzylaminopurin
BSA	hovězí sérový albumin
cDNA/ gDNA	komplementární DNA k RNA/ genomová DNA
dATP	deoxyadenosinmonofosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EMEA	European Medicines Agency
EPO	erythropoetin
ER	endoplazmatickém retikulum
FDA	Food and Drug Agency
GAP	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
GTP	guanosin-5-trifosfát (hydrát disodné soli)
IMP	inosine-5'-monofosfát (disodná sůl)
IP	isopentenyladenin
IPR	isopentenyladenin ribosid
Kex2	endoproteasa rozpoznávající dipeptidy
LB	Luria Bertani Broth Hight salt médium
MOPS	3-(<i>N</i> -morpholino) propansulfonová kyselina
MPA	mykofenolová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
P _i	anorganický fosfát
PMSF	phenylmethansulfonylfluorid
RNA	ribonukleová kyselina
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline s Tween 20
TEMED	tetraethylmethylendiamid
YNB	Yeast nitrogen base médium
YPD	Yeast Extrakt Peptone Dextrose médium