

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Příprava plazmidových konstruktů pro integraci
AMP-deaminasy do kvasinek**

Autor:	Vendula Kajnarová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Hana Pospíšilová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	14. 5. 2010

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

V Olomouci dne 4. 5. 2010

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 bakalářské práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Vendula Kajnarová
Název práce	Příprava plazmidových konstruktů pro integraci AMP-deaminasy do kvasinek
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Hana Pospíšilová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2010
Abstrakt	<p>V dnešní době jsou různé metody biologie a chemie vyvinuty natolik, že mohou být člověkem využívány k manipulaci s různými organismy za účelem zisku kvalitnějších surovin, materiálů a produktů rostlinného či živočišného původu. Pro takovouto manipulaci s organismy hraje klonování dnes důležitou úlohu hlavně v zemědělství a biotechnologických oborech. Častým modelem pro klonování jsou kvasinky. Tato bakalářská práce je zaměřena právě na tyto jednobuněčné houbové mikroorganismy, konkrétně na <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a <i>Pichia pastoris</i> a jejich vlastnosti.</p> <p>AMP-deaminasa je enzym s homotetramerní strukturou, který katalyzuje deaminaci AMP za vzniku IMP a amoniaku. Jelikož dříve byly geny pro AMP-deaminasu exprimovány neúspěšně v <i>Escherichia coli</i>, byly připraveny konstrukty umožňující expresi genů <i>AMD1</i> původem ze <i>S. cerevisiae</i> a <i>SPBC106.04</i> původem ze <i>Schizosaccharomyces pombe</i> v kvasinkách.</p> <p>V experimentální části byly připraveny plazmidové konstrukty pro expresi AMP-deaminasy v <i>P. pastoris</i> (pGAPZα A s <i>SPBC106.04</i> a pPICZ A s <i>SPBC106.04</i>) a dále v <i>S. cerevisiae</i> (pDR197 s <i>AMD1</i>). Rozdíl mezi vektory je ve výběru promoteru, <i>AOX1</i> v pPICZ A je inducibilní methanolem. U pGAPZα A a pDR197 je použit promotor konstitutivní. Vektor pGAPZα A obsahuje navíc α-faktor, který umožňuje sekreci proteinu do média. U vektoru pPICZ A a pDR197 protein zůstává v buňkách. Vektory pPICZ A a pGAPZα A vnášejí do rekombinantního proteinu histidinovou kotvu, která umožňuje snadnou a rychlou purifikaci proteinu; pDR197 nevnáší aditivní úsek do AMP-deaminasy. Dalším rozdílem mezi použitými vektory je stabilní integrace expresní kazety do genomu <i>P. pastoris</i> (pGAPZα A a pPICZ A) nebo exprese AMP-deaminasy (přítomné na plazmidu pDR197) v <i>S. cerevisiae</i>, bez předchozí integrace do genomové DNA.</p>
Klíčová slova	AMP-deaminasa, <i>P. pastoris</i> , pGAPZ A, pPICZ A, pDR197
Počet stran	49
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Vendula Kajnarová
Title	Preparation of plasmid constructs for integration of AMP deaminase into yeast
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	Mgr. Hana Pospíšilová, Ph.D.
The year of presentation	2010
Abstract	<p>Nowadays, various methods are developed in biology and chemistry, so that they can be used for manipulation of various organisms in order to gain higher quality raw materials, materials and products of plant or animal origin. For handling such organisms, cloning plays an important role especially in agriculture and biotechnology fields today.</p> <p>Common model for cloning are yeasts. This thesis is focused on these single-celled fungal organisms, namely <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Pichia pastoris</i> and their features.</p> <p>AMP deaminase is an enzyme with homotetramer structure which catalyzes deamination of AMP to IMP and ammonia. In past, AMP deaminase genes were not successfully expressed in <i>Escherichia coli</i>. Suitable constructs with <i>AMD1</i> (<i>S. cerevisiae</i>) and <i>SPBC106.04</i> (<i>S. pombe</i>) genes for the yeast expression have been prepared.</p> <p>In the experimental part, plasmid constructs for expression of AMP deaminase in <i>P. pastoris</i> (pGAPZα A with <i>SPBC106.04</i> and pPICZ A with <i>SPBC106.04</i>) and in <i>S. cerevisiae</i> (pDR197 with <i>AMD1</i>) have been prepared. The difference between the vectors is at the selection of promoter, <i>AOX1</i> in pPICZ A is inducible with methanol. For pGAPZα A and pDR197, a constitutive promoter has been chosen. Vektor pGAPZα A contains, in addition, α-factor which allows protein secretion into the medium. Protein expressed from pDR197 and pPICZ A vectors remains in the cells. Vectors pPICZ A and pGAPZα A bring into the recombinant protein polyhistidine tag, which allows quick and easy protein purification; pDR197 does not introduce an additive fragment into the AMP deaminase. The other difference among the applied vectors is stable integration of expression cassette into the genome of <i>P. pastoris</i> (pGAPZα A and pPICZ A) or expression of AMP deaminase (present in the plasmid pDR197) in <i>S. cerevisiae</i> but without integration into genomic DNA.</p>
Keywords	AMP deaminase, <i>P. pastoris</i> , pGAPZ A, pPICZ A, pDR197
Number of pages	49
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

Cíle práce.....	7
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
1.1 Využití kvasinek v biotechnologii.....	8
1.2 <i>Pichia pastoris</i>	10
1.2.1 Rozdíly mezi expresí v <i>E. coli</i> a kvasince.....	10
1.2.2 Srovnání <i>P. pastoris</i> s různými kvasinkovými expresními systémy.....	10
1.2.2.1 <i>P. pastoris</i> jako expresní systém.....	11
1.2.2.2 <i>S. cerevisiae</i> – tradiční alternativa.....	12
1.2.2.3 Využití nekonvenčních kvasinek.....	13
1.3 Kmeny a vektory využívané k expresi proteinu v <i>Pichia pastoris</i>	14
1.3.1 Expresní kmeny <i>P. pastoris</i>	14
1.3.1.1 Využití integrace expresní kazety vektoru do genomu kvasinky.....	14
1.3.1.2 Využití biosyntetických genů jako selekčních markerů.....	16
1.3.1.3 Kmeny pro využití expresních FLD vektorů.....	16
1.3.1.4 Kmeny s mutací v metabolismu methanolu.....	16
1.3.1.5 Kmeny s deficientní proteasou.....	17
1.3.1.6 Kmeny s mutací v glykosylaci.....	17
1.3.1.7 Kmeny nadexprimující disulfidisomerasu (PDI).....	17
1.3.2 Vektory.....	17
1.3.2.1 Vektory pPICZ.....	20
1.3.2.2 Vektory pGAPZ α	22
1.4 Kvasinková AMP-deaminasa.....	24
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	25
2.1 Materiál.....	25
2.1.1 Vektory a použité mikroorganismy.....	25
2.1.2 Komerční kity a software.....	25
2.1.3 Enzymy.....	25
2.1.4 Chemikálie.....	26
2.1.5 Přístrojové vybavení.....	26
2.2 Metody.....	27
2.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	27
2.2.1.1 Optimalizace PCR.....	27

2.2.1.2 Amplifikace genu <i>SPBC106.04</i> (AMP-deaminasa, <i>Schizosaccharomyces pombe</i>).....	27
2.2.1.3 Amplifikace genu <i>AMD1</i> (AMP-deaminasa, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	28
2.2.2 T/A klonování.....	29
2.2.3 Elektroforetická separace nukleových kyselin.....	29
2.2.4 Izolace plazmidová DNA z gelu.....	30
2.2.5 Ligace.....	30
2.2.6 „Heat shock“ transformace kompetentních TOP10 buněk.....	30
2.2.7 Složení kultivačních médií a kultivace <i>E. coli</i>	31
2.2.8 Izolace plazmidové DNA z buněk <i>E. coli</i>	32
2.2.9 Štěpení DNA restrikčními endonukleasami.....	32
2.3 Výsledky a diskuse.....	33
2.3.1 Příprava konstruktů pDR197 s genem <i>AMD1</i>	33
2.3.2 Příprava konstruktů pGAPZ α A s genem <i>SPBC106.04</i>	35
2.3.3 Příprava konstruktů pPICZ A s genem <i>SPBC106.04</i>	38
3. ZÁVĚR.....	42
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	43
SEZNAM ZKRATEK.....	49

Cíle práce

- Literární rešerše na téma:

Využití kvasinek pro genové inženýrství se zaměřením na *S. cerevisiae* a *P. pastoris*. Dále byly blíže popsány plazmidové vektory používané k expresi cizorodé DNA v kvasinkách se zaměřením na vektory pDR197, pGAPZ α a pPICZ, které byly využity v experimentální části.

- Seznámení se a osvojení si základních principů a metod klonování.
- Příprava plazmidových konstruktů s geny pro AMP-deaminasu pocházející z *S. pombe* a *S. cerevisiae* (*SPBC106.04* a *AMD1*) pro expresi deaminasy v kvasinkách.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Využití kvasinek v biotechnologii

Kvasinky jsou od r. 1980 využívány k vysokoobjemové produkci intracelulárních a extracelulárních proteinů lidského, živočišného i rostlinného původu (Romanos, 1995). Expres cizorodých proteinů v kvasinkách zahrnuje 4 kroky:

- a) vnesení kódující sekvence DNA cizorodého genu ve čtecím rámci expresní kazety obsahující kvasinkový promoter a transkripční terminační sekvenci.
- b) transformace a uchování připraveného DNA konstruktů v hostiteli.
- c) syntéza cizorodého proteinu za určitých specifických podmínek během kultivace.
- d) purifikace heterologního proteinu a porovnání s jeho nativním (původním) protějškem.

Obvykle je regulovatelný promoter využíván k řízení exprese cizorodých proteinů, protože před vlastní indukcí exprese je pro minimalizaci selekce netransformovaných buněk nutné udržovat kultivované buňky v režimu, kdy neprobíhá transkripce vneseného genu během růstové fáze buňky. Selektce netransformovaných buněk může nastat jako výsledek zvýšené metabolické zátěže buněk, které exprimují cizorodý protein s velkou intenzitou nebo v důsledku toxického efektu rekombinantního proteinu na buňku. Několik druhů kvasinek bylo modifikováno jako systémy pro expresi heterologních proteinů (Muller et al., 1998). Další text je zaměřen na methylotrofní kvasinku *Pichia pastoris* a pekařskou kvasinku *Saccharomyces cerevisiae*, které jsou nejčastěji využívány k expresi cizorodých proteinů (Cereghino & Cregg, 1999).

První kvasinkou, která byla využívána pro produkci rekombinantních proteinů byla *S. cerevisiae*. Cizí geny jsou do kvasinkových buněk vnášeny v upravených 2 µm plazmidech, kde se potom vyskytují v mnoha kopiích. Při růstu takovýchto kvasinek ve velkoobjemových fermentorech je nutné zachovat selekční tlak pro udržení vneseného plazmidu. Dále je možné integrovat požadovaný gen do genomové DNA kvasinky, kde se potom bude vyskytovat pouze v několika kopiích. Jako promotery bývají využity silné konstitutivní promotery jako je promoter genu pro fosfoglycerátkinasu nebo galaktokinasu. Výhodou exprese v kvasinkách je zejména možnost sekrece heterologních proteinů fúzí požadovaného proteinu s „prepro“ sekvencí „mating faktoru“, kde „pro“ sekvence je odstraněna proteolytickým působením enzymu KEX2. Během sekrece dochází ke skládání proteinu, formování disulfidových můstků a glykosylaci. N-glykosylace probíhá na správních místech, ale

výsledný protein je často odlišný od nativního v důsledku delších uhlovodíkových řetězců cukrů a vyššího podílu manosy.

Výsledný protein může být tedy imunogenní, a to omezuje využití glykosylovaných proteinů jako lidských léčiv. Základy této metodiky byly položeny v polovině osmdesátých let minulého století a vedly k úspěšné produkci vakcíny proti hepatitidě B založené na rekombinantním proteinu HBsAg (povrchový antigen hepatitidy B) (Sudbery, 1996).

Příklady využití kvasinek

A. Produkce významných proteinů

Mezi takové patří např. malé proteiny značené ^{13}C pro 2D-NMR (levné značení pomocí ^{13}C methanolu) (Laroche et al., 1994), exprese hirudinů – účinného inhibitoru trombinu (Weydemann et al., 1995), výroba protilátek a receptorů protilátek (jedny z hlavních produktů biotechnologického průmyslu) (Ridder et al., 1995), produkce hovězí enterokinasy (rozpoznává a štěpí dipeptid Lys-Ile, před nímž předchází negativně nabitý Asp4 - slouží pro odstranění „pomocných“ fúzních proteinů, jako je např. thioredoxin) (Voza et al., 1996), příprava rekombinantních antigenů pro výrobu vakcín (Rodriguez et al., 1994) a stabilizace a cílení malých peptidů do peroxisomů (Faber et al., 1996).

B. Kvasinky jako modelové systémy

Sem patří např. studium receptorového antagonismu a agonismu léčiv (Price et al., 1995), biochemická charakterizace eukaryotických ABC-transportérů („ATP-binding cassette“) (Ruetz et al., 1998) a heterologní exprese lidského cytochromu P450 v kvasinkách pro studium karcinogeneze a metabolismu xenobiotik a léčiv (Wittekindt et al., 1995)

C. Biotechnologický pokrok

Pro účely základního výzkumu bylo nutné navrhnout takové vektory pro expresi požadovaného proteinu, které by např. umožnily překonat problematickou expresi nebo sbalování v kvasinkách (Robinson et al., 1994) a umožnily regulovat intenzitu exprese užitím silných (*TEF1* a *GPD*) nebo slabých (*CYC1* a *ADH*) promoterů (Mumberg et al., 1995).

1.2 *Pichia pastoris*

1.2.1 Rozdíly mezi expresí v *E. coli* a kvasince

Kvasinky jsou vhodnými hostiteli pro expresi rekombinantních proteinů vyšších eukaryot (Romanos et al., 1992). Kombinují jednoduchost a finanční nenáročnost bakteriálních expresních systémů s výsledky podobnými nebo stejnými jako při expresi proteinů v náročnějších a dražších systémech živočišných tkáňových kultur. Stejně jako bakterie je možné kvasinky jednoduše kultivovat na levných růstových médiích, a pro manipulaci s geny lze využít enormní množství dostupných technik. Nicméně, jako eukaryota poskytují prostředí pro postranslační procesy a sekreci rekombinantních proteinů, kdy výsledný produkt je často stejný nebo velice podobný původnímu proteinu. Vzhledem k dlouhé historii užití kvasinky *S. cerevisiae* při výrobě chleba a alkoholických nápojů byla prokázána neškodnost této kvasinky a byly získány znalosti a postupy pro velkoobjemové fermentace (Sudbery, 1996).

Hlavní rozdíl mezi systémem *P. pastoris* a *E. coli* je v množství rekombinantního proteinu získaného v raných fázích kultivace, kde u *E. coli* obvykle rekombinantní proteiny tvoří deset a více procent z celkového množství proteinů, což lze pozorovat po elektroforetickém dělení jako specifické pruhy na gelu. To většinou neplatí u *P. pastoris*, zvláště v raných fázích jejího vývoje, kdy intracelulární proteiny dosahují méně než 1% z celkového množství proteinů, a kde je běžné, že většina z nich je degradována proteinasami dříve než mohou být na gelu pozorovány. Tyto produkty raných fází mohou být pozorovány pouze díky citlivým metodám jako je stanovení enzymatické aktivity nebo „western-blot“ se specifickou protilátkou.

1.2.2 Srovnání *P. pastoris* s různými kvasinkovými expresními systémy

Pichia pastoris je široce používaným kvasinkovým kmenem pro produkci rekombinantních proteinů. Kvasinka *P. pastoris* je jednobuněčný mikroorganismus a stejně jako bakterie relativně rychle roste a je nenáročná na manipulaci při kultivaci. Na rozdíl od bakterií, jak je již uvedeno výše, jsou kvasinky schopny stejných postranslačních modifikací jako vyšší eukaryota včetně člověka. Z tohoto důvodu jsou eukaryotní proteiny syntetizované kvasinkami exprimovány a postranslačně modifikovány za vzniku funkčních molekul.

Na rozdíl od *Saccharomyces cerevisiae* a jiných kvasinek, *P. pastoris* nepreferuje fermentaci cukrů nebo jiných uhlíkatých látek. *P. pastoris* upřednostňuje růst

v přítomnosti kyslíku, což umožňuje masivní nárůst hmoty, jelikož nevzniká významné množství toxického produktu fermentace – ethanolu.

Vzhledem k tomu, že množství produkovaného rekombinantního proteinu je úměrné hustotě vytvořené biomasy, je tato schopnost *P. pastoris* velkou výhodou. Další rozdílnou vlastností *P. pastoris* je růst na methanolu, jako jediném zdroji energie a uhlíku, což je umožněno indukcí specifické skupiny metabolických enzymů, např. při růstu na methanolu mohou enzymy AOX (alkoholoxidas) a DHAS (dihydroxyacetonsyntasa) tvořit až 30% celkových proteinů kvasinky. Regulace hladiny proteinů AOX a DHAS probíhá primárně na úrovni regulace transkripce jejich genů.

Vedle produkce rekombinantních proteinů je *P. pastoris* také používána jako modelový mikroorganismus v buněčné biologii pro studium biogeneze peroxisomů, organizace a funkce Golgiho aparátů apod. (Cregg, 2007).

1.2.2.1 *P. pastoris* jako expresní systém

P. pastoris byla od roku 1984 použita k produkci více než 300 cizorodých proteinů (Cereghio et al., 1999). Existuje několik faktorů díky nimž je tento systém široce používán:

- a) promoter alkoholoxidas I (AOX1) je jedním z nejsilnějších promoterů, které jsou známy.
- b) schopnost trvale integrovat expresní plazmid (v jedné nebo více kopiích) na specifické místo v genomu *P. pastoris*.
- c) schopnost kultivace ve vysokokapacitních fermentorech.
- d) dostupnost expresního kitu od firmy Invitrogen.

Represorem AOX1 promoteru je glukosa a většina ostatních uhlíkatých látek, ale je indukován více než 1000x v buňkách kultivovaných na methanolu jako jediném zdroji uhlíku (Tschopp et al., 1987). S tímto promoterem je tedy silně potlačena exprese rekombinantního proteinu během kultivace na glukose nebo glycerolu, což brání selekci netransformovaných buněk. Po přesunu kultury na médium s methanolem pak nastane indukce exprese rekombinantního proteinu pod silným AOX1 promoterem (Clare et. al., 1998). Přesto existují omezení tohoto systému. Základem pro maximální indukci AOX1 promoteru je methanol, což je hořlavá látka nevhodná pro produkci potravin, kde je vhodnější užití silných promoterů, které nejsou indukované methanolem. Jedním z takových je promoter glyceraldehyd–3–fosfátdehydrogenasy (GAP), který poskytuje konstitutivně vysokou úroveň exprese na glukose, glycerolu a médiích obsahujících methanol (Waterham et al., 1997). Při užití GAP promoteru nelze potlačit expresi rekombinantních proteinů, a proto jej nelze použít při expresi

heterologních proteinů, které jsou toxické pro hostitelskou buňku. Druhý promotor *P. pastoris*, který je odvozen od genu *FLD1*, jehož produktem je glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa, může být indukován buď methanolem nebo methylaminem (netoxický zdroj dusíku) v médiích obsahujících glukosu. Expresní úrovně z methylaminem indukovaného *FLD1* promoteru jsou srovnatelné s těmi dosahovanými s *AOX1* promoterem v přítomnosti methanolu (Shen et al., 1998).

Druhým omezením systému *P. pastoris* byl nedostatek expresních promoterů slabších než *AOX1*, *FLD1* a *GAP* promotery, které mohou vést k nadexpresi toxických proteinů a špatnému sbalení rekombinantního proteinu (Brierley 1998). Dostupnost různých promoterů by také usnadnila současnou expresi více genů, každého v optimální míře, což by mělo využití pro produkci proteinů skládajících se z více podjednotek (Vuorela et al., 1997). Promoter genu *PEX8*, který kóduje protein peroxisomální biogenese, poskytuje nízkou hladinu exprese na glukose a je mírně indukován (10x) v přítomnosti methanolu (Johnson et al., 1999). Jiné středně silné promotery, odvozené od genu *YPT1* (GTP – vázající protein) *P. pastoris*, poskytují nízkou konstitutivní expresi v přítomnosti glukosy, methanolu nebo manitolu (Sears et al., 1998).

Třetím omezením je existence pouze několika selekčních markerů pro transformaci *P. pastoris*. Až do nedávné doby byly dostupné jen tři selekční geny *HIS4*, *ARG4*, *Sh ble* (pro rezistenci na antibiotikum zeocin). Z tohoto důvodu byly zkonstruovány expresní vektory s novými biosyntetickými selekčními geny *ADE1*, *URA3* pro užití v příslušných auxotrofních kmenech *P. pastoris*. Auxotrofní kmeny *P. pastoris* jsou defektní v jednom nebo ve více biosyntetických genech a mohou tedy růst pouze v přítomnosti požadované živiny, kterou nemohou syntetizovat nebo po transformaci vektorem obsahujícím příslušný gen (Cereghino & Cregg, 1999).

1.2.2.2 *S. cerevisiae* - tradiční alternativa

I přes velké množství informací o *S. cerevisiae* na genetické a molekulárně-biologické úrovni je tato kvasinka pro expresi rekombinantních proteinů často nevhodná, kvůli nižší sekreční kapacitě vzhledem k *P. pastoris* a jiným kvasinkám (Muller et al., 1998; Cereghino & Cregg, 1999).

Tato nízká sekreční kapacita je zapříčiněna nestabilitou používaného expresního vektoru 2 μ m. To je vidět na příkladu inhibitoru hovězího pankreatického trypsinu, jehož exprese se lišila v rámci populace transformovaných buněk. Buňky s vyšším obsahem kopií plazmidu akumulovaly nesbalený protein v endoplazmatickém retikulu, kde agregoval bez schopnosti sekrece. Tento problém lze vyřešit buď integrací požadovaného množství kopií plazmidu nebo užitím kmenů, které podpoří nedostatečné funkce endoplazmatického retikula při sbalování cizorodého proteinu.

Bylo totiž zjištěno, že stabilně integrované kopie expresní kazety plazmidu exprimovaly více proteinu než stejný počet expresních kazet na 2 µm vektoru. Optimem pro expresi cizorodého proteinu je integrace asi 10 kopií plazmidu. Také použití kmenů *S. cerevisiae*, které exprimují Hsp70 „chaperon“ BiP (váže polypeptidy v endoplazmatickém retikulu během translokace) a disulfidisomerasu (katalyzuje tvorbu a izomeraci disulfidových můstků v endoplazmatickém retikulu), umožňuje zlepšení výtěžku exprimovaného proteinu (Shusta et al., 1998).

S. cerevisiae může být dále použita k objasnění a pochopení funkce proteinů a k detekci protein–ligand interakcí pro selekci mutací se změněnou vazebnou kapacitou (Shusta et al., 1999).

1.2.2.3 Využití nekonvenčních kvasinek

Pro expresi cizorodých genů v jiných kvasinkových systémech jako je *Yarrowia lipolytica* a *Kluyveromyces lactis* byly identifikovány nové, silné promotery (Muller et al., 1998). Byly také připraveny nové expresní kmeny kvasinek (Tab.1), např. *Pichia methanolica*, která je podobná *P. pastoris* a *Hansenula polymorpha*, včetně schopnosti masivního růstu a dostupností expresních vektorů, které obsahují silně regulovaný promotor alkoholoxidasy ke kontrole exprese cizorodého genu (Raymond et al., 1998).

Metylotrofní kvasinky jako je *Pichia pastoris* a *Hansenula polymorpha* si zachovaly všechny výhody *S. cerevisiae*, ale poskytují vyšší výnosy cizorodého proteinu (Cregg et al., 1993; Faber et al., 1995). Kvasinky *P. pastoris* a *H. polymorpha* mohou růst na jednoduchém definovaném médiu obsahujícím methanol, který využívají jako jediný zdroj uhlíku. Tuto vlastnost umožňuje kvasinkám alkoholoxidasa AOX v *P. pastoris* a methanoloxidasa MOX v *H. polymorpha*. Expresa AOX/MOX je vysoce regulována, je potlačena glukosou nebo ethanolem a úplná indukce vyžaduje přítomnost methanolu. V *H. polymorpha*, ale ne v *P. pastoris*, je MOX potlačena na 10 – 20% maxima během růstu na glycerolu. Silné regulovatelné promotery AOX/MOX byly využity pro produkci rekombinantních proteinů. Expresní kazeta je integrována do genomu kvasinky pomocí homologní rekombinace a je stabilní během růstu bez selekčního tlaku. Jsou k dispozici různé přístupy ke zvýšení počtu kopií, které v některých případech mohou zvýšit výnos produkovaného proteinu. Fermentace v bioreaktoru je nezbytná pro vysokou úroveň exprese, ale dostatečné množství proteinu lze získat i klasickou kultivací kvasinek (Sudbery, 1996).

Tabulka 1: Srovnání kvasinkových expresních systémů (převzato z Cereghino & Cregg, 1999)

Druh kvasinky	Promoter	Regulace
metabolizující methanol		
<i>Candida boidinii</i>	<i>AOD1</i>	indukce methanolem
<i>Hansenula polymorpha</i>	<i>MOX</i>	indukce methanolem
<i>Pichia methanolica</i>	<i>AUG1</i>	indukce methanolem
<i>Pichia pastoris</i>	<i>AOX1</i>	indukce methanolem
	<i>GAP</i>	silný konstitutivní promoter indukce methanolem nebo methylaminem
	<i>FLD1</i>	indukce methanolem (slaběji)
	<i>PEX8</i>	slabší konstitutivní promoter
	<i>YPT1</i>	
metabolizující laktosu		
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>LAC4</i>	indukce laktosou
	<i>PGK</i>	silný konstitutivní promoter
	<i>ADH4</i>	indukce ethanolem
metabolizující škrob		
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	<i>AMY1</i>	indukce maltosou nebo škrobem
	<i>GAM1</i>	indukce maltosou nebo škrobem
metabolizující xylosu		
<i>Pichia stipitis</i>	<i>XYL1</i>	indukce xylosou
metabolizující alkany a mastné kyseliny		
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>XPR2</i>	indukce peptonem
	<i>TEF</i>	silný konstitutivní promoter
	<i>RPS7</i>	silný konstitutivní promoter

Nomenklatura genů: *ADH4*, alkoholdehydrogenasa; *AMY1*, α -amylasa; *AOX1*, *AUG1*, *AOD1* a *MOX*, alkoholoxidasa; *FLD1*, formaldehyddehydrogenasa; *GAP*, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa; *GAM1*, glukoamylasa; *LAC4*, β -galaktosidasa; *PEX8*, peroxin 8; *PGK*, fosfoglycerátkinasa ze *Saccharomyces cerevisiae*; *RPS7*, ribozomální protein S7; *TEF*, translační elongační faktor – 1a; *XPR2*, extracelulární proteasa; *YPT1*, GTPasa podílející se na sekreci.

1.3 Kmeny a vektory využívané k expresi proteinu v *Pichia pastoris*

1.3.1 Expresní kmeny *P. pastoris*

1.3.1.1. Využití integrace expresní kazety vektoru do genomu kvasinky

Systém *P. pastoris* se liší od bakteriálního a mnoha jiných systémů v tom, že samostatně replikující vektory nejsou běžně používány pro expresi heterologního proteinu a vektory jsou integrovány do genomu hostitele. Jako u *S. cerevisiae*, taková

integrace nastává během transformace kvasinky v důsledku dominantního systému pro homologní rekombinaci. Integrace do genomu nastávají do oblastí s vysokou homologií (> 0,5 kb) mezi jednou nebo více sekvencemi vektoru a hostitelskou genomovou DNA (např. mezi *AOX1* promoterovými sekvencemi). Výhodou homologní rekombinace je znalost místa v genomu kvasinky, kam byl expresní vektor integrován. Další výhodou je, že oproti genomům vyšších eukaryot má kvasinkový genom pouze několik oblastí, kde je transkripce potlačovaná nebo umlčena.

Jedna z nejčastěji využívaných strategií pro zvýšení exprese specifických genů v *P. pastoris* je zvýšení počtu expresních vektorů nebo expresních kazet v hostiteli, avšak tato strategie není univerzální. Byly popsány tři základní metody, jak toho dosáhnout. První je konstrukce jednoduchého vektoru s multikopie expresní kazety (tj. fragment obsahující promoter - vnášený gen - terminátor transkripce). Druhá možnost je jednoduše zkonstruovat několik expresních vektorů zároveň, každý s odlišným selekčním genem a následně těmito vektory transformovat vhodný kmen *P. pastoris*. Výhodou této metody, zvláště při výrobě lidských léčiv, je známý přesný počet expresních kazet, který může být ověřen pomocí DNA sekvencování. Vytváření tohoto typu vektoru je založeno na expresní kazetě, která je obklopena restričními místy, která mají komplementární konce (např.: *Bam*HI-*Bgl*II, *Sal*I-*Xho*I kombinace) umožňující opakované zavedení dalších expresních kazet do jediného místa štěpení. Třetí a nejpobulárnější metodou je konstrukce jednoduché expresní kazety ve vektoru, který má jako jeho selekční marker jeden z genů umožňujících selekci na antibiotiku zeocinu, blastidinu, geneticinu, kanamycinu a G418 (*Tn903kan^r*) nebo je možné použít gen formaldehyddehydrogenasy (*FLD1*) *P. pastoris*. Všechny tyto čtyři geny fungují na stejném principu. Kompetentní buňky *P. pastoris* jsou transformovány příslušným vektorem a nanoseny na agarosovou plotnu s médiem obsahujícím vysoké množství příslušného antibiotika (nebo v případě vektorů s genem *FLD1*, formaldehyd). Tato selekce mnohočetných kopií expresní kazety v genomu kvasinky je založena na poznatku, že transformanty s mnohačetnou integrací plazmidu představující menšinu (asi 10%) transformovaných kolonií. Tedy pro úspěšnou detekci takovýchto kolonií musí být studováno značné množství transformantů. Existuje několik zavedených metod pro detekci kolonií s mnohočetnou integrací expresní kazety, např. hybridizace DNA se specifickou sondou nebo vizualizace míry exprese rekombinantních proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy, imunobloting nebo imunobloting kolonií (Cregg, 2007).

1.3.1.2 Využití biosyntetických genů jako selekčních markerů

Mnoho expresních kmenů je odvozeno od *his4* auxotrofního kmene GS115 umožňujícího transformaci vektory obsahujícími biosyntetický gen *HIS4*. Další dostupné kmeny mají rozdílné kombinace auxotrofních mutací v biosyntetických genech *P. pastoris* jako jsou *ARG4*, *ADE1*, *HIS4*, *URA3*, a *URA5*. Tyto kmeny umožňují selekci expresních vektorů obsahujících odpovídající geny biosyntetických markerů vnesených do buněk kvasinek. Ačkoli selekce více než jedné expresní kazety vyžaduje opakované transformace hostitelské buňky, je to umožněno užitím odlišných selekčních markerů (Cregg, 2007).

1.3.1.3 Kmeny pro využití expresních *FLD* vektorů

Kmen MS105 *P. pastoris*, který je *his4* auxotrofní má další mutaci v genu formaldehyddehydrogenasy způsobující neschopnost tohoto kmene růst na methanolu jako zdroji uhlíku nebo methylaminu jako zdroji dusíku. Navíc *P. pastoris fld1* mutanti mají v porovnání s „wild-type“ buňkami zvýšenou citlivost na formaldehyd. Vektory obsahující *FLD1* marker mohou být potom použity k selekci integrovaných mnohočetných kopií plazmidu v expresních kmenech pomocí vysoké hladiny formaldehydu (Cregg, 2007).

1.3.1.4 Kmeny s mutací v metabolismu methanolu

Většina kmenů *P. pastoris* roste na methanolu stejně rychle jako kmeny „wild-typu“ (Mut^+ , „methanol utilization plus phenotype“). Bylo zjištěno, že kmeny s *AOX* mutacemi jsou někdy schopné produkovat vyšší množství heterologních proteinů. Z tohoto důvodu byly připraveny kmeny s delecemi v jednom nebo obou genech *AOX*. Další výhodou použití těchto mutantních kmenů je, že velké množství methanolu běžně používané během fermentací Mut^+ kmenů nejsou nutné. KM71 (*his4 arg4 aox1Δ::ScARG4*) je kmen, kde byla částečná delece *AOX1* nahrazena genem *ARG4* z *S. cerevisiae*. Tento kmen (Mut^s , „methanol utilization slow phenotype“) roste pomaleji na methanolu, protože má pouze slabší *AOX2* gen pro metabolismus methanolu. Jiný kmen MC100-3 (*his4 arg4 aox1Δ::ScARG4 aox2Δ::Pphis4*) nese delecii v genech *AOX1* i *AOX2*, a proto není schopen růstu na methanolu (Mut^- , „methanol utilization minus phenotype“). Oba kmeny Mut^s i Mut^- si zachovávají schopnost indukovat vysokou expresi pod kontrolou *AOX1* promoteru (Cregg, 2007).

1.3.1.5 Kmeny s deficientní proteasou

Kmeny s deficientními vakuolárními proteasami jsou schopny redukovat degradaci rekombinantních proteinů v porovnání s „wild-type“ kmeny. Kmeny s deficientní proteasou SMD1163 (*his4 pep4 prb1*), SMD1165 (*his4 prb1*) a SMD1168 (*his4 pep4*) jsou zvláště užitečné pro expresi heterologních proteinů během fermentace. Je dostupný také kmen odvozený od SMD1168, který byl připraven narušením karboxypeptidasy Kex1 genem *SUC2*, pocházejícím ze *S. cerevisiae*. Tento kmen byl vyvinut k inhibici C-koncové proteolýzy lysinu a argininu a umožňuje získání intaktního lidského endostatínu po 40 hodinách fermentace. Nevýhodou kmenů s deficientní proteasou je pomalejší růst, nižší účinnost transformace a nižší životaschopnost (Cregg, 2007).

1.3.1.6 Kmeny s mutací v glykosylaci

Ve srovnání s *S. cerevisiae* jsou rekombinantní proteiny produkované *P. pastoris* méně často hyperglykosylovány a nemají hyperimmunogenní koncovou α -1,3 manosylaci. Avšak rozdíly v glykosylaci proteinů *P. pastoris* a člověka vedou k blokaci využití těchto proteinů pro farmaceutické účely. Koexprese 1,2- α -D-manosidasy (*Trichoderma reesei*) cílená do endoplazmatického retikula snižuje o více než 85% počet α -1,2-manosových residuí u rekombinantního proteinu produkovaného *P. pastoris*. V další snaze „polidštit“ *P. pastoris*, byl zkonstruován kmen YSH44 eliminací endogenní kvasinkové glykosylační dráhy a vnesením pěti eukaryotických proteinů (manosydasy I a II, *N*-acetylglukosaminyl-transferasa I a II a uridin-5'-difosfát-*N*-acetylglukosaminový transportér) ke zřízení syntetické glykosylační dráhy, která generuje lidské oligosacharidy $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ (Cregg, 2007).

1.3.1.7 Kmeny nadexprimující disulfidisomerasu (PDI)

Bylo zjištěno, že nadexprese proteinu PDI v *P. pastoris* zvyšuje produkci proteinů bohatých na disulfidové můstky jako je např. Pfs25H, který je kandidátem pro přípravu vakcíny proti přenosu *Plasmodium falciparum*. PDI tvoří disulfidové můstky během sbalování proteinu v endoplazmatickém retikulu (Cregg, 2007).

1.3.2 Vektory

Mezi kvasinkami je dostupný značný počet hostitelských kmenů a pro heterologní expresi je ještě větší množství expresních vektorů, které se označují jako *E. coli* / *P. pastoris* „shuttle“ vektory, umožňující replikaci a uchování plazmidu v *E. coli*

a obsahující markery funkční v jednom nebo obou organismech. Většina expresních vektorů obsahuje expresní kazetu skládající se z multiklonovacího místa (MCS) pro vložení cizí kódující sekvence, obklopenou promoterovou a terminační sekvencí, které jsou odvozené od *AOX1*. Optimální exprese bývá dosaženo nejčastěji v případě, kde ATG z heterologní sekvence je vloženo do prvního restrikčního místa MCS. Navíc, pro sekreci heterologních proteinů mohou být zkonstruovány vektory, které obsahují různé sekvence spojené ve stejném čtecím rámci, umožňující například fúzi sekrečního signálu s požadovaným proteinem. Seznam běžně využívaných expresních vektorů dodávaných firmou Invitrogen je uveden v Tab.2 (Cregg, 2007).

Tabulka 2: Expresní vektory *P. pastoris* dostupné u firmy Invitrogen (převzato z Cregg, 2007).

Vektor	Selekční marker	Charakteristika
pHIL-D2	<i>HIS4</i>	Noť místa pro odstranění <i>AOX1</i> genu.
pPICZ	<i>ble^r</i>	Multiklonovacím místo pro inserci cizorodých genů; umožňuje fúzi s polyhistidinovou kotvou a myc epitopem; selekce zeocinem umožňuje produkci kmenů s mnoha kopiemi plazmidu.
pPIC6	<i>bsd^r</i>	Podobný jako pPICZ až na rezistenci na blasticidin; umožňuje produkci kmenů s mnoha kopiemi plazmidu.
pGAPZ	<i>ble^r</i>	Kontrola exprese pomocí konstitutivního <i>GAP</i> promoteru; multiklonovací místo pro inserci cizorodých genů; selekce zeocinem umožňuje produkci kmenů s mnoha kopiemi plazmidu.
pFLD	<i>ble^r</i>	Umožňuje fúzi cizorodých proteinů s polyhistidinovou kotvou a myc epitopem.
pHIL-S1	<i>HIS4</i>	Podobný jako pGAPZ až na kontrolu exprese <i>FLD1</i> promoterem pro inducibilní expresi methylaminem. <i>AOX1</i> promoter fúzovaný s <i>PHO1</i> sekrečním signálem; <i>XhoI</i> , <i>EcoRI</i> a <i>BamHI</i> místa vhodná pro inserci cizorodých genů.
pPICZ α	<i>ble^r</i>	<i>AOX1</i> promoter fúzovaný s α -MF prepro signální sekvencí; multiklonovacím místo pro inserci cizorodých genů; umožňuje fúzi cizorodých proteinů s polyhistidinovou kotvou a myc epitopem; selekce zeocinem umožňuje produkci kmenů s mnoha kopiemi plazmidu.
pPIC6 α	<i>bsd^r</i>	Podobné jako pPICZ až na rezistenci na blasticidin umožňují produkci kmenů s mnoha kopiemi plazmidu.
pGAPZ α	<i>ble^r</i>	<i>GAP</i> promoter fúzovaný s α -MF prepro signální sekvencí; MCS pro inserci cizích genů; možnost fúze cizorodého proteinu s polyhistidinovou kotvou a myc epitopem; selekce zeocinem umožňuje produkci kmenů s mnoha kopiemi plazmidu.
pFLD α	<i>ble^r</i>	Podobně jako u pGAPZ až na kontrolu exprese <i>FLD1</i> promoterem pro inducibilní expresi s methylaminem.

- **Promotery**

Většina expresních vektorů *P. pastoris* využívá pro řízení exprese *AOX1* promoter, který ale není vždy ideální, jelikož indukce methanolem není vhodná pro užití v potravinářském průmyslu. Alternativním promoterem může být glukosou indukovaný silný promoter glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasy z *P. pastoris* a mírné expresní promotery expresních genů *PEX8* a *YPT1* (GTP vázající protein). Geny *FLD1* kódují glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasu, což je klíčový enzym potřebný pro metabolismus methanolu a methylovaných aminů. Výnosy exprese s promoterem genu *FLD1* dosahují podobných hodnot jako u *AOX1* promoteru (testováno s β -lactamasovým reportérovým genem), avšak umožňuje expresi proteinu přidavkem methanolu jako jediného zdroje uhlíku (a síranu amonného jako zdroje dusíku) nebo methylaminu jako jediného zdroje dusíku (a glukosy jako zdroje uhlíku) (Cregg, 2007).

- **Sekreční signály**

Expese heterologních proteinů v *P. pastoris* může být intracelulární nebo extracelulární. Protože tyto kvasinky sekretují malé množství endogenních proteinů, sekretované rekombinantní proteiny často představují většinu z celkových sekretovaných proteinů v médiu. Z toho plyne, že zacílení sekrece rekombinantního proteinu do média slouží jako první významný purifikační krok. Avšak kvůli stabilitě a požadavcím na sbalení proteinu, je možnost sekrece obvykle vyhrazena pro vnášené proteiny, které jsou normálně sekretovány svými původními hostiteli. Použitím vhodných expresních vektorů *P. pastoris* je možné klonovat cizorodé geny ve čtecím rámci se sekvencí kódující buď původní sekreční signál nebo *S. cerevisiae* α -MF prepro peptid či sekreční signál pro kyselou fosfatasu *P. pastoris* (*PHO1*). Byly úspěšně použity další signální sekreční sekvence, včetně *PHA-E* aglutininu z rostlinného lecitinu *Phaseolus vulgaris*, dále původní signální sekvence přítomné v heterologních proteinech nebo syntetické úseky pro efektivnější sekreci. Získané výsledky byly velice variabilní v závislosti na exprimovaném proteinu. Sekreční signál α -MF prepro peptidu, který je součástí vektorů pPICZ α , vykazuje nejlepších výsledků při sekreci různých testovaných proteinů. Pro konstrukci expresní kazety s *S. cerevisiae* α -MF prepro peptidem je nutné pouze integrovat požadované heterologní geny ve stejném čtecím rámci jako je sekreční signál, a to pomocí restričních enzymů zastoupených v multiklonovacím místě vhodného vektoru. V některých případech je α -MF lepším sekrečním signálem pro expresi heterologního proteinu v *P. pastoris* než původní signální sekvence nativního proteinu, jak bylo demonstrováno u exprese lipasy *Lip1* z *Candida rugosa* (Cregg, 2007).

- **Selekční markery**

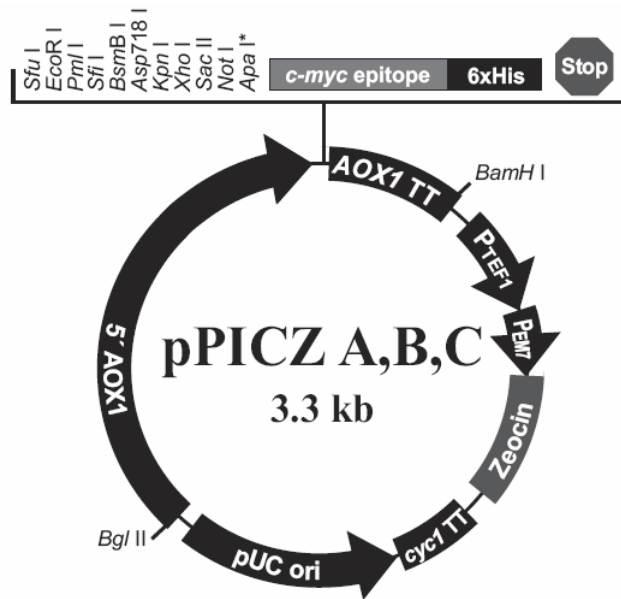
Pro účely klonování jsou všechny expresní vektory *P. pastoris* navrženy pro vnesení do *E. coli* i *P. pastoris* (proto „shuttle“ vektory). Udržení vektoru v bakteriích vyžaduje přítomnost selekčního genu pro rezistenci na antibiotikum, kterým je v případě expresního vektoru *P. pastoris* obvykle *bla* gen umožňující rezistenci na ampicilin. Byly popsány geny biosyntetických drah *P. pastoris* a *S. cerevisiae*, z nichž pět je využíváno v expresních vektorech jako biosyntetických expresních markerů. Jsou to: *ADE1* (PR-amidoimidazolsukcinokarboxamidsynthasa), *HIS4* (histidindehydogenasa), *ARG4* (argininosukcinátlyasa), *URA3* (orotidin-5'-fosfátdekarboxylasa) a *URA5* (orotát-fosforibosyltransferasa) pocházející z *P. pastoris*. Množství expresních vektorů dostupných od firmy Invitrogen je založeno na stejném rezistenčním markeru pro selekci v bakteriích i kvasinkách. Tyto vektory využívají buď *Sh ble* gen *Streptoalloteichus hindustanus*, který umožňuje rezistenci vůči zeocinu (antibiotiku odvozeného od bleomycinu) nebo gen pro blasticidin-S-deaminasu (BSD) z *Aspergillus terreus*, který poskytuje rezistenci k nukleosidovému antibiotiku blasticidinu-S *HC1* izolovanému ze *Streptomyces griseochromogenes*. Použití těchto rezistenčních markerů snižuje velikost expresního vektoru téměř o polovinu. Ačkoli je selekce na zeocinu a blasticidinu srovnatelná, v současné době jsou vektory s geny pro rezistenci na zeocin (série pPICZ A, B, C) více používané než *BsdR* vektory s rezistencí na blasticidin. Nový set expresních vektorů využívající geny *P. pastoris* pro formaldehydehydogenasu (*FLD1*) jako selekčních markerů umožňuje složení expresních vektorů téměř výhradně z DNA *P. pastoris* (s výjimkou exprimovaného heterologního genu). Tyto vektory umožňují selekci mnohočetných transformantů a neobsahují prokaryotické geny pro rezistenci na antibiotika nebo jiné bakteriální sekvence (Cregg, 2007).

Dále bude blíže popsáno složení vektorů pPICZ a pGAPZ α , které byly použity během experimentální části bakalářské práce.

1.3.2.1. Vektory pPICZ

pPICZ je expresní „shuttle“ vektor s velikostí 3,3 kb (Obr.1) užívaný k expresi rekombinantních proteinů v *Pichia pastoris*. Exprimované rekombinantní proteiny obsahují na C-konci *c-myc* epitop a polyhistidinovou kotvu (6xHis). Vektor umožňuje methanolem indukovanou expresi požadovaného genu ve vhodném kmenu *P. pastoris* (X 33, GS115, SMD1168H a KM71H).

- **pPICZ obsahuje následující elementy:**
 - 5'koncový *AOX1* promoter (942 bp) pro silně regulovanou methanolem indukovanou expresi požadovaného genu (Ellis et al., 1985; Koutz et al., 1989; Tschopp et al., 1987) v *P. pastoris*. Výsledná integrace plazmidu je cílena do lokusu *AOX1* v genomu kvasinky pomocí homologní rekombinace.
 - Multiklonovacím místo (MCS) pro integraci požadovaného genu do expresního „shuttle“ vektoru.
 - C-koncovou polyhistidinovou kotvu (6xHis) pro detekci (protilátka Anti-His (C-term)) a zejména purifikaci rekombinantního proteinu pomocí afinitní chelatační chromatografie.
 - Gen umožňující rezistenci na zeocin (*Sh ble*) pro selekci jak v *E. coli*, tak v *P. pastoris* (Baron et al., 1992; Drocourt et al., 1990)
 - *c-myc* epitop (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu) umožňující specifickou detekci rekombinantního proteinu pomocí protilátky Anti-myc (Evans et al., 1985)
 - Tři čtecí rámce k usnadnění klonování – pro zachování čtecího rámce výsledných fúzí DNA.
 - *AOX1* terminátor transkripce (260 bp) – nativní transkripční a polyadenylační signál z *AOX1* genu.
 - *TEF1* promoter genu transkripčního elongačního faktoru 1 *S. cerevisiae*, který řídí expresi genu *Sh ble* pro rezistenci *P. pastoris* na zeocin.
 - *EM7* promoter – syntetický prokaryotický promoter umožňující konstitutivní expresi genu *Sh ble* v *E. coli*.
 - *CYC1* transkripční terminační oblast genu *CYC1* z *S. cerevisiae* pro terminaci transkripce genu *Sh ble* a pro zvýšení stability příslušné mRNA.
 - pUC – počátek replikace, který umožňuje replikaci a zachování plazmidu v *E. coli*.



Obrázek 1: Schéma vektoru pPICZ A
 (převzato z Manuálu pPICZ A, B, C, Invitrogen (2008);
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>)

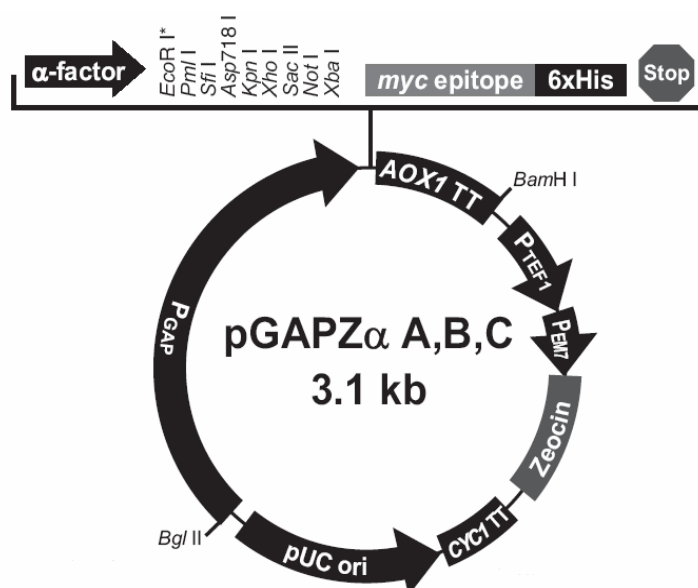
1.3.2.2. Vektory pGAPZα

pGAPZα je expresní „shuttle“ vektor o velikosti 3,1 kb (Obr.2), který umožňuje konstitutivní expresi rekombinantního proteinu v *P. pastoris* (kmeny X 33, GS115, SMD1168H a KM71H) pro integraci do genomu kvasinky homologní rekombinací. Přítomný N-terminální α-faktor umožňuje sekreci rekombinantního proteinu s C-terminálním c-myc epitopem a histidinovou kotvou do kultivačního média.

- **pGAPZα obsahuje následující elementy:**
 - GAP promóter pro silnou konstitutivní expresi v *P. pastoris*. Je cílovým místem integrace plazmidu do genomu kvasinky. Enzym glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPD) je ve vysokých úrovních exprimována v mnoha organismech, včetně *P. pastoris*. Promóter genu (*GAP*) kódující GAPDH protein byl nedávno charakterizován a byla detekována exprese rekombinantních proteinů na vysoké úrovni v *P. pastoris* v závislosti na používaném zdroji uhlíku (Waterham et al., 1997). Úroveň exprese *GAP* promóteru může být mírně vyšší než exprese s promóterem *AOX1*.
 - α-faktor, což je nativní sekreční signál *S. cerevisiae* umožňující efektivní sekreci většiny proteinů exprimovaných v *P. pastoris* (Cregg et al., 1993).

- Multiklonovací místo (MCS), které umožňuje integraci požadovaného genu do expresního vektoru
- C–terminální myc epitop a C–terminální polyhistidinová kotva jsou stejné jako u vektoru pPICZ.
- Gen *Sh ble* a *CYC1* transkripční terminační oblast umožňují rezistenci *E. coli* (za účasti *EM7* promoteru) a *P. pastoris* (za účasti *TEF1* promoteru) na zeocin.
- pUC - počátek replikace, je nutný pro pomnožení plazmidu v *E. coli*.

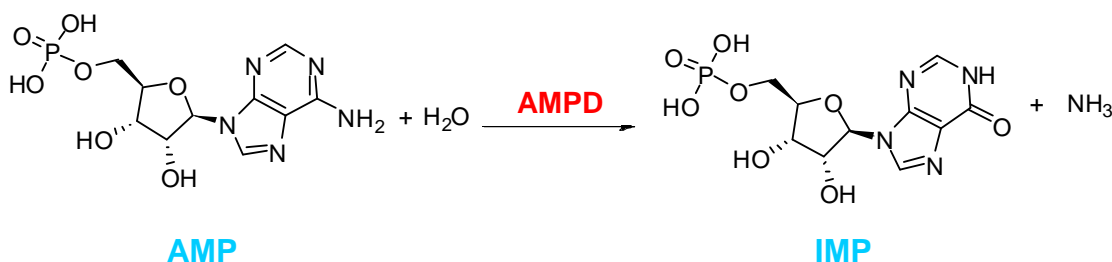
Vektor je dodáván ve třech čtecích rámcích usnadňující klonování ve čtecím rámci s C-histidinovou kotvou a /nebo N-koncovým sekrečním signálem. Exkrece vektoru je založena na dominantním selekčním markeru pro zeocin, který je bifunkční v obou organismech *Pichia* i *E. coli*.



Obrázek 2: Schéma vektoru pGAPZα
 (převzato z Manuál pGAPZ A, B, C a pGAPZα A, B, C, Invitrogen (2008);
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>)

1.4 Kvasinková AMP–deaminasa

AMP-deaminasa (AMP-aminohydrolasa, EC 3.5.4.6) katalyzuje hydrolytické štěpení adenosinmonofosfátu (AMP) za vzniku produktů inosinmonofosfátu (IMP) a amoniaku (Obr.3). Vyskytuje se u mnoha eukaryot, zahrnujících jak savce, ptáky, rostliny (Turner & Turner, 1961), tak kvasinky (Yoshino et al., 1979) a bylo prokázáno, že hraje důležitou roli při regulaci hladiny a energetických přeměn adenylátu (Chapman & Atkinson, 1973; Yoshino & Murakami, 1981), v cyklu purinových nukleotidů (Lowenstein, 1972) a při regulaci fosfofruktokinasy (Yoshino & Murakami, 1982). U prokaryot nebyla přítomnost AMP-deaminasy prokázána. Tento enzym je allostericky aktivován adenosintrifosfátem (ATP) a inhibován anorganickým fosfátem (P_i) (Yoshino et al., 1979; Leung & Schramm, 1980; Meyer et al., 1989). Gen pro AMP-deaminasu je lokalizován na chromozomu XIII u kmene *Saccharomyces cerevisiae* JM1901 a byl klonován a osekvenčován. *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).



Obrázek 3: Reakční schéma hydrolytického štěpení adenosinmonofosfátu na inosinmonofosfát a amoniak za účasti AMP-deaminasy.

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Materiál

2.1.1 Vektory a použité mikroorganismy

pGAPZ α A	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pPICZ A	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pDRIVE + <i>AMD1</i>	Mgr. H. Pospíšilová, Ph. D. (UP Olomouc, ČR), Mgr. Petra Rozumová (MU Brno, ČR)
pDRIVE + <i>SPBC106.04</i>	Mgr. H. Pospíšilová, Ph. D. (UP Olomouc, ČR), Mgr. Petra Rozumová (MU Brno, ČR)
pDR197	Dr. D. Rentsch (University of Bern, Švýcarsko)

kompetentní TOP10 buňky *Escherichia coli* - Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.1.2 Komerční kity a software

QIAquick Gel Extraction Kit (50)

QIAprep Spin Miniprep Kit (250)

PCR Cloning Kit (10)

Všechny výše uvedené kity byly zakoupeny od firmy Qiagen (Hilden, Německo).

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

2.1.3 Enzymy

High Fidelity PCR Enzyme Mix	Fermentas (Ontario, Kanada)
Restrikční endonukleasy:	
<i>KpnI</i> , <i>PstI</i> , <i>SalI</i>	Fermentas (Ontario, Kanada)
<i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>EcoRV</i> , <i>HindIII</i> ,	Takara (Shiga, Japonsko)
<i>NotI</i> , <i>SphI</i> , <i>XbaI</i> , <i>XhoI</i>	Takara (Shiga, Japonsko)
<i>Taq</i> polymerasa	Mgr. Mária Šmehilová (UP Olomouc, ČR)
T4 – DNA ligasa	Takara (Shiga, Japonsko)

2.1.4 Chemikálie

agar	Himedia (Indie)
agarosa	Amresco (Ohio, USA)
ampicilin	Sigma – Aldrich (Praha, ČR)
DMSO	Duchefa (Nizozemí)
dNTP Mix	Fermentas (Ontario, Kanada)
ethidiumbromid	NeoLab (Heidelberg, Německo)
Gene Ruller 1kb DNA Ladder (marker)	Fermentas (Ontario, Kanada)
glycerol	Penta (Chrudim, ČR)
isopropanol	MACH (Ostrava, ČR)
kvasničný extrakt	Sigma – Aldrich (Praha, ČR)
LB broth Hight salt	Duchefa (Nizozemí)
Loading Buffer	Takara (Shiga, Japonsko)
NaCl	Lach – Ner (Neratovice, ČR)
trypton	Duchefa (Nizozemí)
SOC médium	Invitrogen (Carlsbad, USA)
zeocin	Duchefa (Nizozemí)

2.1.5 Přístrojové vybavení

autokláv MLS 3020	Sanyo (Mnichov, Německo)
centrifuga Mikro200R	Hettich (Kirchlengern, Německo)
digestoř	Forlab (Valašské meziříčí, ČR)
laminární box	Forlab (Valašské meziříčí, ČR)
inkubátor biologický	POLL–Lab (Bielsko-Biala, Polsko)
termoblok Thermomixer comfort	Eppendorf (Říčany u Prahy, ČR)
spektrofotometr	Agilent (Santa Clara, USA)
termocykler T - gradient	Biometra (Goettingen, Německo)
termocykler Mini cykler MJ Research	Biometra (Goettingen, Německo)
třepačka inkubovaná Heidolph unimax 1010	Heidolph (Schwabach, Německo)

2.2 Metody

2.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je založena na využití DNA-polymerasy *in vitro* pro mnohonásobné zmnožení požadované molekuly DNA. Syntéza DNA je řízena krátkými oligonukleotidy (primery), které se párují s templátovou DNA na počátku a na konci amplifikovaného fragmentu, každý s jiným vláknem původní dvouřetězcové molekuly DNA (Alberts et al., 1998).

Podmínky jednotlivých PCR reakcí byly následující:

- | | |
|-------------------------|---|
| 1. Počáteční denaturace | 120 s / 95°C |
| 2. Denaturace | 40 – 45 s / 95°C |
| 3. Připojení primerů | 40 – 45 s (v závislosti na použitém primeru byla nastavena teplota) |
| 4. Elongace | 120 – 160 s / 72°C |
| 5. Závěrečná elongace | 10 minut / 72°C |

Body 2 – 4 se cyklicky 45x opakovaly.

2.2.1.1 Optimalizace PCR

Optimalizace amplifikace genů *SPBC106.04* a *AMD1* probíhala za výše uvedených podmínek. Pro gen *SPBC106.04* byly testovány tři různé teploty pro připojení primerů (62°C, 65°C a 68°C). Pro *AMD1* byly testovány čtyři různé teploty pro připojení primerů, a to 58°C, 60°C, 62°C a 64°C. Jako aditivum byl testován přídavek DMSO. Složení reakční směsi bylo podobné jako níže, s tím rozdílem, že pro optimalizaci PCR byla použita *Taq* polymerasa.

2.2.1.2 Amplifikace genu *SPBC106.04* (AMP-deaminasa, *Schizosaccharomyces pombe*)

PCR probíhala za podmínek uvedených výše (2.2.1). Jako teplota pro připojení primerů bylo zvoleno 65°C pro vnesení výsledného amplikonu do vektoru pDRIVE a potom do vektoru pGAPZα A. Pro vnesení do plazmidu pDRIVE a potom do vektoru pPICZ A byla provedena „Touch up“ PCR (55°C - 66°C) .

- Složení reakční směsi pro vnesení *SPBC106.04* do pDRIVE a poté do pGAPZα A o celkovém objemu 10 µl:

5,2 µl PCR vody
1 µl 10x High Fidelity PCR Buffer + MgCl₂
0,4 µl 10 mM dNTP
1 µl 10 mM „forward“ primeru 5´-CTCGAGATGTCTGTACGTCCTCTCTCA-3´
1 µl 10 mM „reverse“ primeru 5´-GCGGCCGCATCTTTCAAATCT-3´
0,2 µl pDRIVE + *SPBC106.04* (templát)
1µl DMSO
0,2 µl High Fidelity PCR Enzyme Mix

Pozn.: Modře označená část sekvence značí místa rozpoznávaná endonukleasami *XhoI* a *NotI*.

- Složení reakční směsi pro vnesení *SPBC106.04* do pDRIVE a poté do pPICZ A o celkovém objemu 10 µl:

5,2 µl PCR vody
1 µl 10x High Fidelity PCR Buffer + MgCl₂
0,4 µl 10 mM dNTP
1 µl 10 mM „forward“ primeru 5´-CTCGAGATGTCTGTACGTCCTCTCTCA-3´
1 µl 10 mM „reverse“ primeru 5´-GCGGCCGCATCTTTCAA-3´
0,2 µl pDRIVE + *SPBC106.04* (templát)
1µl 10 mM MgCl₂
0,2 µl High Fidelity PCR Enzyme Mix

2.2.1.3 Amplifikace genu *AMD1* (AMP-deaminasa, *Saccharomyces cerevisiae*)

Amplifikace genu *AMD1* probíhala obdobně jako u genu *SPBC106.04*. Připojení primerů probíhalo při 60°C a do PCR reakce bylo přidáno 10% DMSO.

- Složení reakční směsi pro vnesení *AMD1* do pDRIVE a poté do pGAPZα A o celkovém objemu 10 µl:

5,2 v PCR vody
1 µl 10x High Fidelity PCR Buffer + MgCl₂
0,4 µl 10 mM dNTP
1 µl 10 mM „forward“ primeru 5´-CTCGAGATGGACAATCAGGCTACA-3´

1 µl 10 mM „reverse“ primeru 5´-GCGGCCGCCTTTTCTTCA-3´
0,2 µl pDRIVE + AMD1 (templát)
1 µl DMSO
0,2 µl High Fidelity PCR Enzyme Mix

- Složení reakční směsi pro vnesení AMD1 do pDRIVE a poté do pPICZ A o celkovém objemu 10 µl:

5,2 v PCR vody
1 µl 10x High Fidelity PCR Buffer + MgCl₂
0,4 µl 10 mM dNTP
1 µl 10 mM „forward“ primeru 5´-CTCGAGATGGACAATCAGGCTACA-3´
1 µl 10 mM „reverse“ primeru 5´-GCGGCCGCCTTTTCTT-3´
0,2 µl pDRIVE + AMD1 (templát)
1 µl DMSO
0,2 µl High Fidelity PCR Enzyme Mix

2.2.2 T/A klonování

T/A klonování využívá převisů thimidinu na obou koncích vektoru a převisů adenosinu na obou koncích insertu (PCR produktu), které jsou k sobě navzájem komplementární.

T/A klonování bylo prováděno dle postupu, který je uveden v manuálu pro PCR Cloning Kit (<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home.html>).

2.2.3 Elektroforetická separace nukleových kyselin

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním metodám při izolaci a analýze nukleových kyselin a proteinů. Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli, kdy hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou záporně nabitě fosfátové skupiny.

Elektroforéza v 1% agarosovém gelu sloužila k separaci, izolaci 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 µl ethidiumbromidu o koncentraci 0,5 µg/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 pufrům (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 5 - 20 μ l. Do jedné z jamek v řadě bylo vždy napipetováno 5 μ l markeru (Gene Ruller 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.

2.2.4 Izolace plazmidová DNA z gelu

DNA byla po elektroforéze z agarosového gelu izolována po vyříznutí požadovaných bandů pomocí skalpelu pod UV lampou. Izolaci jsem prováděla pomocí komerčního kitu QIAquick Gel Extraction Kit od firmy Qiagen (<http://www1.qiagen.com/Default.aspx>).

2.2.5 Ligace

Ligace využívá enzymu T4–DNA ligasy, která katalyzuje tvorbu fosfodiesterové vazby mezi 5'fosfátovou skupinou a 3'OH skupinou sousedního nukleotidu, za spojení dvou molekul DNA zakončených komplementárními konci (Rosypal et al., 2002).

Ligace byla prováděna v celkovém objemu 10 μ l, které obsahovaly 1 μ l 10x Ligation Buffer, 0,5 μ l T4 – DNA ligasy a cílový vektor a insert (PCR produkt) v poměru 1:1. Po promíchání a stočení následovala inkubace při 23°C do druhého dne.

2.2.6 „Heat shock“ transformace kompetentních TOP10 buněk

Kompetentní bakteriální buňky jsou buňky upravené fyzikálně a/nebo chemicky tak, že mají zvýšenou schopnost přijmout cizorodé molekuly DNA (Brown, 2007).

Transformace TOP10 buněk *E. coli* probíhala následovně.

- Mikrozkuřavka s 50 μ l kompetentních buněk *E. coli*, která byla vytažena z -74°C byla ponechána po dobu 5 min na ledu, aby buňky roztály.

- K buňkám byla přidána směs po ligaci (5 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 250 μ l SOC média.
- Následovala inkubace po dobu 1 hodiny při 37°C (při 160 otáčkách za minutu).
- Buňky byly poté vysety na příslušné LB agarové plotny (2% agar) s odpovídajícím antibiotikem, a byly inkubovány do druhého dne při 37°C ve statickém inkubátoru.

2.2.7 Složení kultivačních médií a kultivace *E. coli*

- **Příprava LB média:**

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 při 121°C po dobu 15 minut. Před vlastní kultivací bylo do tekutého i pevného média přidáno příslušné antibiotikum o finální koncentraci 50 μ g/ml pro zeocin nebo 100 μ g/ml pro ampicilin. Zásobní roztoky antibiotik byly rozpuštěny ve sterilní vodě.

- **Příprava LB média s nižším obsahem soli**

1litr LB média s nižším obsahem soli byl připraven rozpuštěním 5 g NaCl, 5 g kvasničného extraktu a 10 g tryptonu v destilované vodě, pH roztoku bylo pomocí NaOH upraveno na 7,5. Takto připravený roztok byl sterilizován autoklávováním při 121°C po dobu 15 minut. Před vlastní kultivací bylo do tekutého i pevného média přidáno příslušné antibiotikum o finální koncentraci 50 μ g/ml pro zeocin nebo 100 μ g/ml pro ampicilin.

K LB nebo LB se sníženým obsahem soli byl přidán agar o výsledné koncentraci 2% w/v. po ochlazení sterilních tuhých médií na cca 60°C bylo do roztoku přidáno příslušné antibiotikum a média byla v laminárním boxu rozlita po asi 25 ml do sterilních Petriho misek.

- **Kultivace *E. coli***

Veškeré práce byly prováděny ve sterilním prostředí laminárního boxu. Kultivace vždy probíhala ve výše popsanych médiích s příslušným antibiotikem při 37°C do druhého dne. Buňky *E. coli* transformované plazmidem pDRIVE nebo pDR197 byly kultivovány s ampicilinem, zatímco binární vektory pGAPZα A a pPICZ A umožňovaly růst transformovaným *E. coli* buňkám na zeocinu.

2.2.8 Izolace plazmidové DNA z buněk *E. coli*

Izolace plazmidové DNA byla prováděna podle komerčního kitu QIAprep Spin Miniprep Kit od firmy Qiagen (<http://www1.qiagen.com/Default.aspx>) nebo následovně:

- 2 ml bakteriální kultury kultivované 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 (vysrážení plazmidová DNA) 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.

2.2.9 Štěpení DNA restrikčními endonukleasami

Restrikční endonukleasy jsou sekvenčně specifické enzymy. Cílové místo restrikční endonukleasy je obvykle tvořeno krátkou (4 – 7 nukleotidovou) sekvencí dvouřetězcové molekuly DNA, tato sekvence bývá velice často palindromická. DNA může být štěpena za vzniku tupého nebo kohezního konce, což je například využíváno k následnému spojení fragmentu DNA vektoru a fragmentu DNA insertu

vzniklým štěpením stejnou restriční endonukleasou za použití T4 – DNA ligasy (Rosypal et al., 2002).

Restriční enzymy sloužily jednak k již uvedené integraci insertu do cílového vektoru, a dále jako kontrolní nástroj pro analýzu správnosti takto připravených konstruktů. DNA byla štěpena enzymy uvedenými v Tab.3, podle návodu příslušného dodavatele (Fermentas nebo Takara) při 30°C nebo 37°C do druhého dne při restriční analýze nebo 2 – 3 hodiny při přípravě komplementárních fragmentů. Takto připravené fragmenty DNA byly vizualizovány pod UV po elektroforetické separaci v přítomnosti ethidiumbromidu.

Tabulka 3: Seznam použitých restričních endonukleas

Endonukleasa	Reakční teplota	Pufr
<i>Bam</i> HI	30°C	10x K Buffer
<i>Eco</i> RI	37°C	10x Eco RI Buffer
<i>Eco</i> RV	37°C	10x H Buffer
<i>Hind</i> III	37°C	10x M Buffer
<i>Kpn</i> I	37°C	KpnI Buffer
<i>Not</i> I	37°C	10x H Buffer
<i>Pst</i> I	37°C	10x Buffer O
<i>Sal</i> I	37°C	10x Buffer O
<i>Sph</i> I	37°C	10x H Buffer
<i>Xba</i> I	37°C	10x M Buffer
<i>Xho</i> I	37°C	10x H Buffer

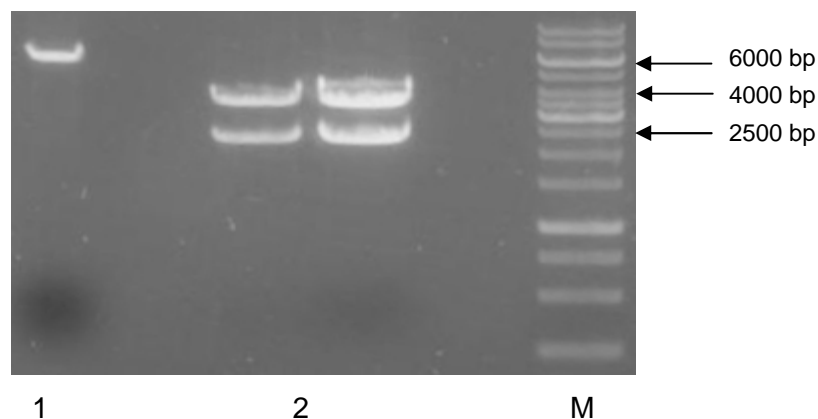
2.3 Výsledky a diskuse

Dřívější pokusy exprimovat AMP-deaminasu v prokaryotickém expresním systému *E. coli* byly neúspěšné. Z tohoto důvodu byly připraveny plasmidové konstrukty umožňující vnesení genů AMP-deaminasy (*SPBC106.04* původem z *S. pombe* nebo *AMD1* původem z *S. cerevisiae*) do kvasinek *S. cerevisiae* a *P. pastoris*.

2.3.1 Příprava konstruktů pDR197 s genem *AMD1*

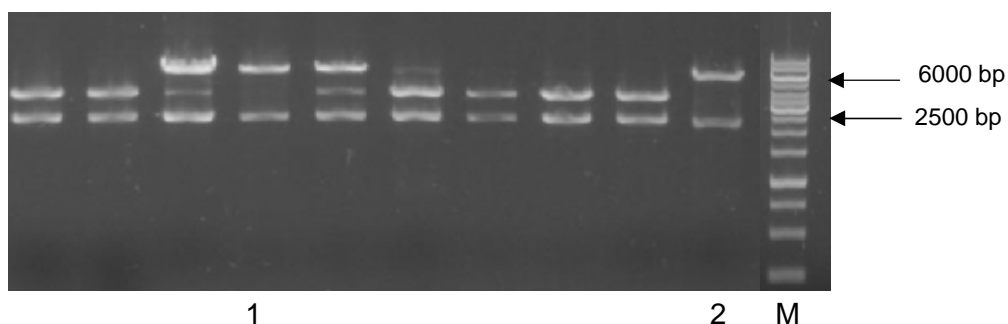
Jako první „shuttle“ vektor pro vnesení AMP-deaminasy do kvasinek byl zvolen vektor pDR197 (Obr.4). Vektor umožňuje pomnožení a expresi studovaného genu v *Saccharomyces cerevisiae* bez integrace do genomu kvasinky. Jelikož vnášený gen *AMD1*, který pochází z *S. cerevisiae*, nebyl úspěšně exprimován v *E. coli*, byl tento jednoduchý plazmid určen zejména jako kontrolní, z toho důvodu, že nepřidává do otevřeného čtecího rámce AMP-deaminasy (ORF) žádné přídavné aminokyseliny, které by v tomto případě mohly vést ke snížení exprese nebo ztrátě aktivity enzymu.

Jako vstupní DNA pro přípravu tohoto konstruktů sloužil dříve připravený konstrukt pDRIVE s genem *AMD1*, který byl pomnožen v TOP10 buňkách a izolován pomocí komerčního kitu jak je popsáno v metodách. Stejným způsobem byl pomnožen a přečištěn cílový vektor pDR197. Čistá plazmidová DNA obou konstruktů byla následně štěpena pomocí restričních endonukleas *Pst*I a *Sal*I za vzniku komplementárních konců, které byly po elektroforetické separaci (Obr.4) následně spojeny ligací jak je popsáno v metodách.



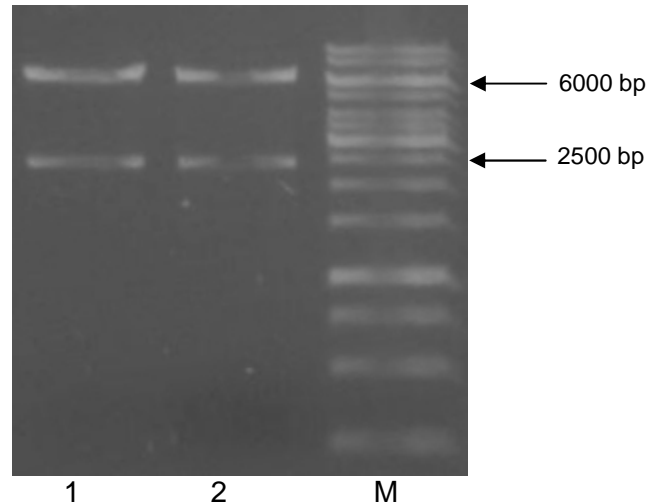
Obrázek 4: Restrikce plazmidu pDRIVE s genem *AMD1* a vektoru pDR197 pomocí restričních enzymů *Pst*I a *Sal*I. 1. pDR197 (6300 bp), 2. pDRIVE (3500 bp) + *AMD1* (2400 bp), M. 1 kb DNA Ladder

Ligační směsí byly transformovány TOP10 buňky *E. coli*, ty byly vysety na pevné LB médium. Následující den bylo 19 kolonií z misek přeočkováno do tekutého LB média, a po kultivaci přes noc byla z buněk izolována plazmidová DNA pomocí roztoků P1 – P3, jak je uvedeno v metodách. Vyizolovaná plazmidová DNA byla podrobena restriční analýze enzymy *Pst*I a *Sal*I (Obr.5).



Obrázek 5: Restriční analýza plazmidu pDR197 s genem *AMD1* pomocí restričních enzymů *Pst*I a *Sal*I. 1., 2. pDR197 (6300 bp) + *AMD1* (2400 bp), M. 1 kb DNA Ladder

Z 19-ti analyzovaných kolonií byly po kontrolní restrikci enzymy *Pst*I a *Sal*I vyhodnoceny dvě jako správné (Obr.6), z toho plyne cca 10% úspěšnost, čímž byla potvrzena úspěšnost ligace, a tedy i úspěšná příprava prvního konstruktů pDR197 s genem *AMD1*.



Obrázek 6: Kontrolní restrikce plazmidu pDR197 s genem *AMD1* pomocí enzymů *Pst*I a *Sal*I. 1., 2. pDR197 (6300 bp) + *AMD1* (2400 bp), M. 1 kb DNA Ladder

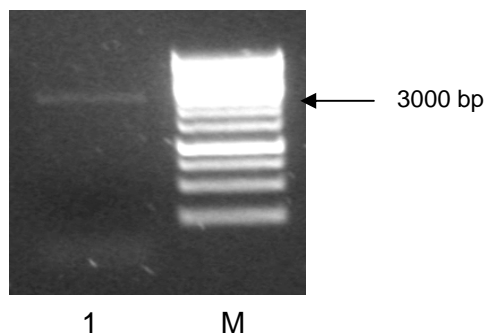
2.3.2 Příprava konstruktů pGAPZ α A s genem *SPBC106.04*

Další práce byla soustředěna na AMP-deaminasu pocházející z *S. pombe*, která byla predikovaná na základě sekvenční homologie s charakterizovanou AMP-deaminasou *Saccharomyces cerevisiae*.

Jako vstupní DNA pro přípravu tohoto konstruktů sloužil již dříve připravený plazmid pDRIVE nesoucí gen *SPBC106.04* ze *Schizosaccharomyces pombe*. Přítomný gen byl získán amplifikací genomové DNA a na rozdíl od genu *AMD1* obsahuje dva introny. Správnost vstupního vektoru pDRIVE s *SPBC106.04* byla před vlastní prací ověřena restrikční analýzou pomocí *Bam*HI, *Eco*RV, *Hind*III, *Kpn*I, *Sp*HI a *Xba*I.

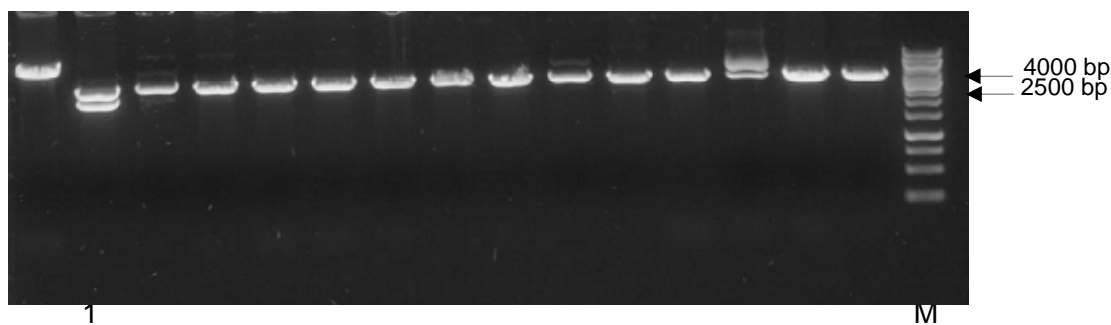
Jelikož multiklonovací místo cílového vektoru pGAPZ α A bylo odlišné od toho, které se nachází v pDRIVE vektoru, bylo nutné provést mnohonásobné zmnožení genu *SPBC106.04* za užití takových primerů, které umožnilo vnesení vhodných nukleotidových sekvencí rozpoznávaných endonukleasami i v cílovém vektoru za vzniku komplementárních lepivých konců. Jako taková byla zvolena rozpoznávací místa pro endonukleasy *Not*I a *Xho*I. Primery byly navrženy tak, aby ohraničovaly kódující sekvenci genu, která je vzhledem k poměru GC a AT a nukleotidové sekvenci problematická, jelikož podmínkou pro navázání primerů a proběhnutí specifické PCR je dostatečně dlouhý komplementární úsek DNA, který tvoří vlásenku nebo dimery.

Z výše zmíněných důvodů nebylo možné navázat na 5'-konec primeru další nukleotidy, které by umožnily štípání restrikťasami přímo po provedení amplifikace a toto také vedlo k nestandardně odlišné predikované teplotě pro připojení primerů. Pro forward primer bylo $T_m = 70^\circ\text{C}$ a pro reverse primer $T_m = 61^\circ\text{C}$. Optimalizace PCR byla úspěšná, při užití 65°C jako teploty pro připojení primerů byl získán jeden fragment předpovězené velikosti 2733 pb (Obr.7). Takovýto amplikon byl po proběhnutí elektroforézy izolován pomocí komerčního kitu a pomocí T/A klonování vnesen do pDRIVE vektoru podle příslušného protokolu. Po transformaci TOP10 buněk produktem T/A klonování následovalo vysetí na Petriho misky s 2% agarem. Z rozpěstovaných kolonií byla poté izolována plazmidová DNA pomocí roztoků P1 – P3. Správnost konstruktu pDRIVE s genem *SPBC106.04* byla ověřována enzymem *XhoI* (Obr.8).



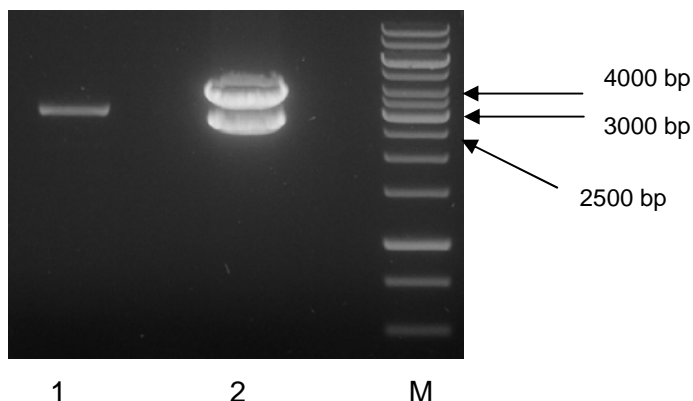
Obrázek 7: Produkt amplifikace *SPBC106.04* po optimalizaci PCR.

1. *SPBC106.04* amplikon (2733 bp), M. 1 kb DNA Ladder



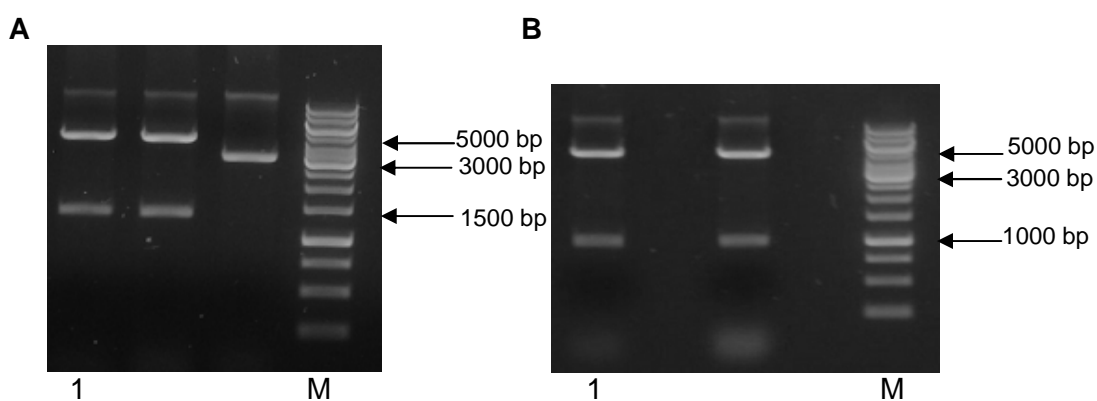
Obrázek 8: Restrikční analýza plazmidu pDRIVE s genem *SPBC106.04* restrikčním enzymem *XhoI*. 1. pDRIVE (3824 bp) + *SPBC106.04* (2761 bp), M. 1 kb DNA Ladder

Správné konstrukty a cílový vektor pGAPZ α A byly poté štěpeny endonukleasami *Xho*I a *Not*I za vzniku lepivých konců (Obr.9) spojených T4-DNA ligasou.



Obrázek 9: Restrikce plazmidu pDRIVE s genem *SPBC106.04* a vektoru pGAPZ α A restrikčními enzymy *Xho*I a *Not*I. 1. pGAPZ α A (3074 bp), 2. pDRIVE (3775 bp) + *SPBC106.04* (2733 bp), M. 1 kb DNA Ladder

Výsledný konstrukt byl poté opět ověřen restrikční analýzou pomocí enzymů *Bam*HI (Obr.10A) a *Hind*III (Obr.10B). V tomto případě byla detekována 65% úspěšnost ligace. Výsledný konstrukt pGAPZ α A s *SPBC106.04* umožní integraci genu kódujícího *S. pombe* AMP-deaminasu do genomu kvasinky *Pichia pastoris* pod konstitutivním promoterem. Díky přítomnému α -faktoru bude cílový protein sekretován do kultivačního média. Výsledný fúzní protein bude na C-konci obsahovat histidinovou kotvu, která umožní jedнокrokovou purifikaci AMP-deaminasy pomocí Ni-NTA agarosy.



Obrázek 10: Restrikční analýza plazmidu pGAPZ α A s genem *SPBC106.04*

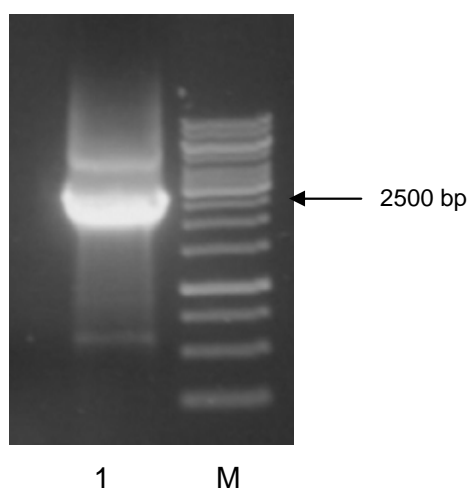
A. enzymem *Bam*HI. 1. pGAPZ α A + *SPBC106.04* (fragmenty 1392 bp, 4406 bp), M. 1 kb DNA Ladder

B. enzymem *Hind*III. 1. pGAPZ α A + *SPBC106.04* (fragmenty 1041 bp, 4757 bp), M. 1 kb DNA Ladder

2.3.3 Příprava konstruktů pPICZ A s genem

SPBC106.04

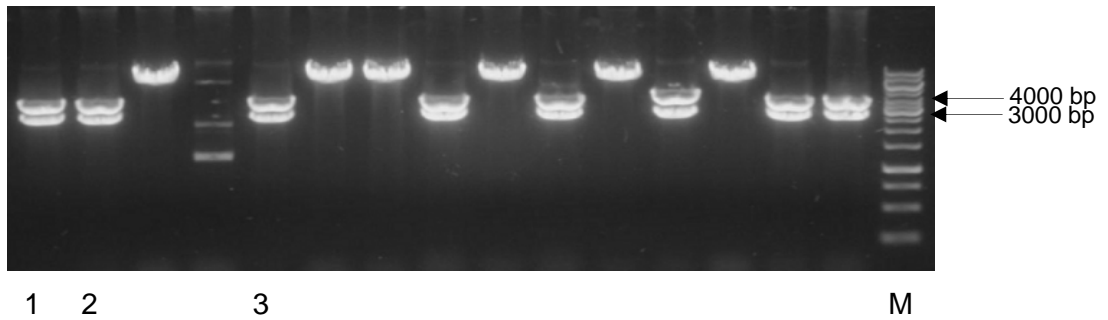
V tomto případě byl použit stejný postup jako v předchozím případě. Jednou z odlišností bylo užití jiného reverzního primeru pro amplifikaci genu *SPBC106.04*, a to v důsledku zachování čtecího rámce C–terminální histidinové kotvy přítomné ve výsledném rekombinantním proteinu. Z tohoto důvodu byla opět provedena optimalizace PCR, kdy nejlepších výsledků bylo dosaženo až užitím tzv. „Touch up“ PCR. Jelikož byl rozdíl v T_m primerů celých 11°C, bylo nutné za čít PCR reakci s málo specifickými podmínkami pro navázání primerů, jako je užití nižší teploty. Posledních 15 cyklů byla teplota pro připojení primerů nastavena na 65°C pro specifickou amplifikaci pouze požadovaného úseku (Obr.11).



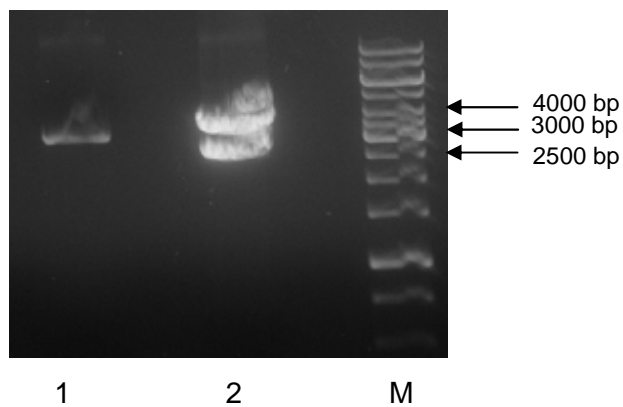
Obrázek 11: Produkt amplifikace genu *SPBC106.04* za užití „Touch up“ PCR

1. *SPBC106.04* amplikon (2734 bp), M. 1 kb DNA Ladder

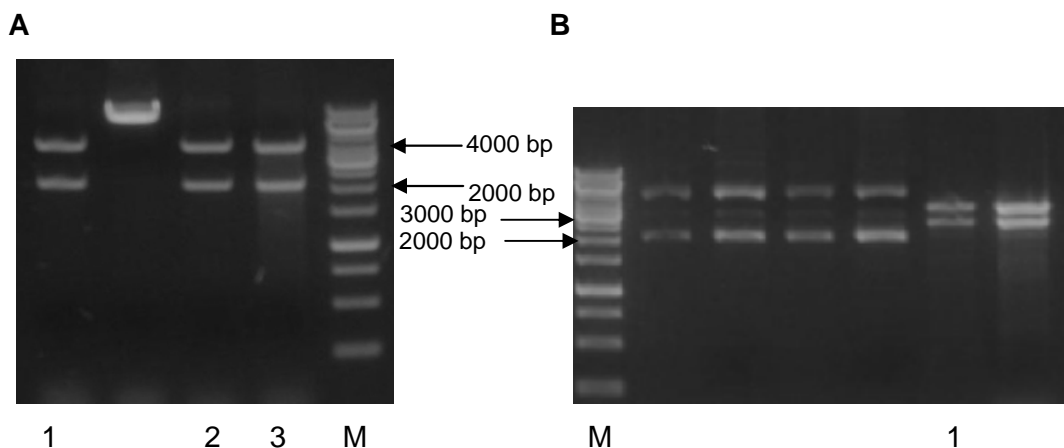
Výsledný amplikon byl opět vnesen T/A klonováním do vektoru pDRIVE a správnost konstruktů byla ověřena enzymem *XhoI* u 20% testovaných kolonií (Obr.12). Následovala restrikce ověřeného upraveného pDRIVE s *SPBC106.04* a cílového binárního vektoru pPICZ A endonukleasami *XhoI* a *NotI* (Obr.13) za vzniku komplementárních konců spojených ligací. Kontrola finálního konstruktů pPICZ A s *SPBC106.04* proběhla úspěšně u 75% testovaných kolonií za užití endonukleas *KpnI* a *EcoRV* (Obr. 14A, B). Výsledná AMP-deaminasa tedy bude exprimována přidávkem methanolu do cytosolu *P. pastoris* opět s C–terminální histidinovou kotvou pro purifikaci pomocí Ni-NTA agarosy.



Obrázek 12: Restrikční analýza plazmidu pDRIVE s genem *SPBC106.04* enzymem *XhoI*. 1., 2., 3. pDRIVE (3825 bp) + *SPBC106.04* (2760 bp), M. 1 kb DNA Ladder



Obrázek 13: Restrikce plazmidu pDRIVE s genem *SPBC106.04* a vektoru pPICZ A restrikčními enzymy *XhoI* a *NotI*. 1. pPICZ A (3324 bp), 2. pDRIVE (3776 bp) + *SPBC106.04* (2732 bp), M. 1 kb DNA Ladder



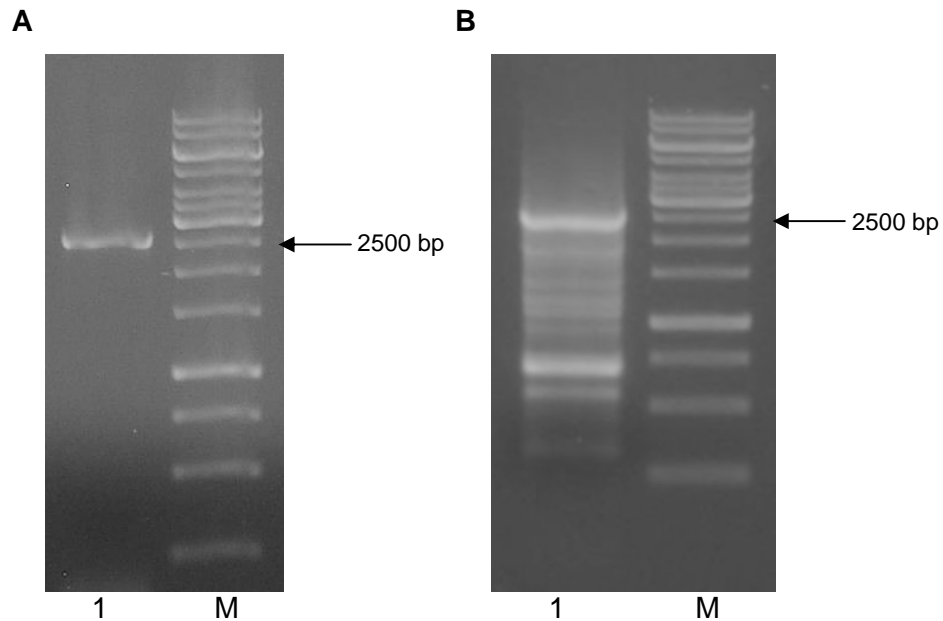
Obrázek 14: Restrikční analýza plazmidu pPICZ A s genem *SPBC106.04*

A. enzymem *KpnI*. 1., 2., 3. pPICZ A + *SPBC106.04* (fragmenty 2103 bp, 3940 bp), M. 1 kb DNA Ladder

B. enzymem *EcoRV*. 1. pPICZ A + *SPBC106.04* (fragmenty 2588 bp, 3455 bp), M. 1 kb DNA Ladder

Záměr vnést gen *AMD1* také do vektorů pGAPZ α A a pPICZ A se nepodařilo z časových důvodů zcela zrealizovat.

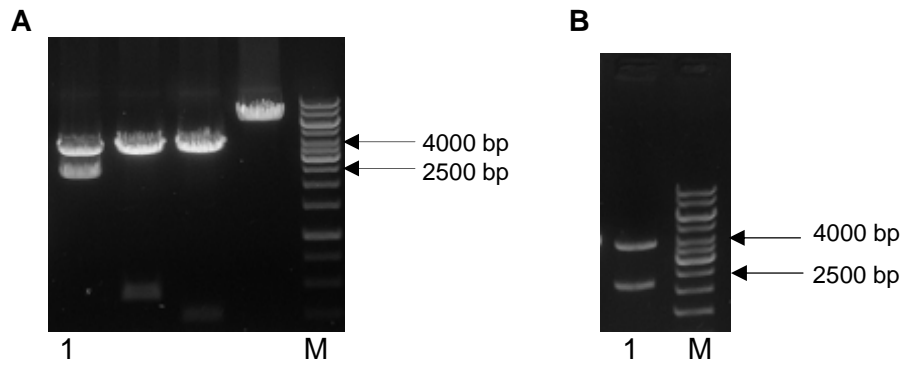
Výchozím materiálem byl opět plazmid pDRIVE, který nesl požadovaný gen *AMD1*. Optimalizací PCR s Hight Fidelity PCR Enzyme Mix byla určena nejvhodnější teplota pro připojení primerů 60°C. Produkt PCR byl nanesen na 1% agarosový gel a byla provedena elektroforéza (Obr.15A, B). Z gelu byl skalpelem vyříznut požadovaný band, a ten byl přečištěn na komerčním kitu od firmy Qiagen.



Obrázek 15: Produkt amplifikace genu *AMD1*

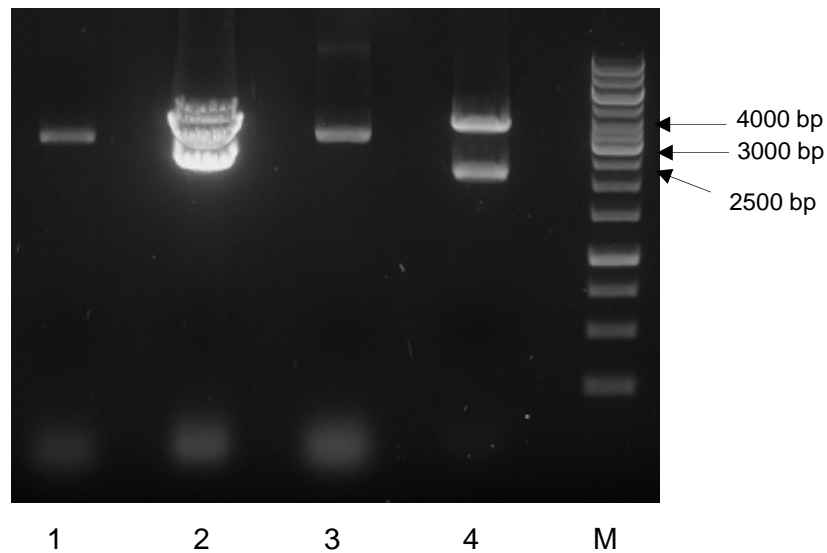
- A.** pro integraci do pGAPZ α A. 1. *SPBC106.04* amplikon (2447 bp), M. 1 kb DNA Ladder
- B.** pro integraci do pPICZ A. 1. *SPBC106.04* amplikon (2445 bp), M. 1 kb DNA Ladder

Dalším krokem bylo vnesení amplikonu do pDRIVE vektoru pomocí T/A klonování. Následovalo ověření správnosti konstruktu restriční analýzou enzymem *XhoI* (Obr.16A, B). Správný konstrukt pDRIVE s *AMD1* byl poté spolu s cílovým vektorem pGAPZ α A štípán endonukleasami *XhoI* a *NotI* stejně tak byl štípán stejnými endonukleasami i správný konstrukt pDRIVE s *AMD1* spolu s cílovým vektorem pPICZ A (Obr.17), avšak následné ligace nebyly úspěšné.



Obrázek 16 : Restrikční analýza plazmidu pDRIVE s genem *AMD1* enzymem *XhoI*

- A.** pro integraci do pGAPZ α A. 1. pDRIVE (3822 bp) + *AMD1* (2475 bp), M. 1 kb DNA Ladder
- B.** pro integraci do pPICZ A. 1. pDRIVE (3824 bp) + *AMD1* (2473 bp), M. 1 kb DNA Ladder



Obrázek 17: Restrikce plazmidů pDRIVE s genem *AMD1* a vektoru pGAPZ α A, pPICZ A enzymy *XhoI* a *NotI*. 1. pGAPZ α A (3074 bp), 2. pDRIVE + *AMD1* (2447 pb), 3. pPICZ A (3324 bp), 4. pDRIVE + *AMD1* (2445 bp), M. 1 kb DNA Ladder

3. Závěr

Byla vypracována literární rešerše na téma využití kvasinek v biotechnologii, popisující nejčastěji využívané „shuttle“ plazmidy a jejich složky pro expresi proteinů v *Pichia pastoris*.

V důsledku neúspěšné exprese kvasinkové AMP-deaminasy v *E. coli*, byly připraveny tři konstrukty umožňující expresi studovaných AMP-deaminas (*AMD1* z *S. cerevisiae*, *SPBC106.04* z *S. pombe*) v kvasinkách.

Jako vhodné binární vektory byly zvoleny plazmidy pGAPZ α A a pPICZ A pro expresi genu *SPBC106.04* v *P. pastoris* pod konstitutivním nebo indukibilním promoterem za vzniku rekombinantního proteinu s C-terminální histidinovou kotvou pro snadnou purifikaci požadované AMP-deaminasy pomocí Ni-NTA agarosy.

Poslední připravený konstrukt (pDR197 s *AMD1*) umožňující pomnožení a expresi AMP-deaminasy v *S. cerevisiae* bude jako kontrola případné ztráty či změny aktivity kvasinkového enzymu s C-terminální histidinovou kotvou.

Přípravu dalších konstruktů, mezi něž patří zejména pGAPZ α A s *AMD1* a pPICZ A s *AMD1*, se nepodařilo z časových důvodů plně realizovat.

Seznam použité literatury

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (1998) Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie., Vol. 10 DNA – technologie, pp. 314-346, Espero Publishing s.r.o, Ústí nad Labem, Česká republika.

Baron M., Reynes J. P., Stassi D., Tiraby G. (1992) A Selectable bifunctional β -galactosidase: Phleomycin-resistance fusion protein as a potential marker for eukaryotic cells. *Gene* **114**, 239-243.

Brierley R. A. (1998) Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-1). *Methods Mol. Biol.* **103**, 149-177.

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

Cereghino G. P. L., Cregg J. M. (1999) Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 422-427.

Cereghino G. P. L., Lin Cereghino J. L., Sunga A. J., Cregg J. M. (2001) Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Genet. Eng.* **23**, 157-169.

Clare J., Sreekrishna K., Romanos M. (1998) Expression of tetanus toxin fragment C. *Methods Mol. Biol.* **103**, 193-208.

Cregg J. M. (2007) *Pichia* Protocols. Series: Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc. Second Edition.

Cregg J. M., Vedvick T. S., Raschke W. C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology* **11**, 905-910.

Drocourt D., Calmels T. P. G., Reynes J. P., Baron M., Tiraby G. (1990) Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acids Res.* **18**, 4009.

- Ellis S. B., Brust P. F., Koutz P. J., Waters A. F., Harpold M. M., Gingeras T. R. (1985) Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast, *Pichia pastoris*. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1111-1121.
- Evans G. I., Lewis G. K., Ramsay G., Bishop V. M. (1985) Isolation of monoclonal antibodies specific for *c-myc* proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3610-3616.
- Faber K. N., Nardet W., Ab G., Veenhuis M. (1995) Methylotrophic yeast as factories for the production of foreign proteins. *Yeast* **11**, 1331-1344.
- Faber K. N., Westra S., Waterham H. R., Keizergunnink I. (1996) Foreign gene expression in *Hansenula polymorpha*. A system for the synthesis of small functional peptides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 72-79.
- 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.
- Chapman A. G., Atkinson D. E. (1973) Stabilization of adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction. *J. Biol. Chem.* **248**, 8309-8312.
- Johnson M. A., Waterham H. R., Ksheminska G. P., Fayura L. R., Cereghino J. L., Stasyk O. V., Veenhuis M., Kulachkovsky A. R., Sibirny A. A., Cregg J. M. (1999) Positive selection of novel peroxisome biogenesis-defective mutants of the yeast *Pichia pastoris*. *Genetics* **151**, 1379-1391.
- Koutz P. J., Davis G. R., Stillmaz C., Barringer K., Cregg J. M., Thill G. (1989) Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. *Yeast* **5**, 167-177.
- Laroche Y., Storme V., De Meutter J., Messens J., Lauwereys M. (1994) High-level secretion and very efficient isotopic labeling of tick anticoagulant peptide (TAP) expressed in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *Biotechnology* **12**, 1119-1124.
- Leung H. B. a Schramm V. L. (1980) Adenylate degradation in *Escherichia coli*. The role of AMP nucleosidase and properties of the purified enzyme. *J. Biol. Chem.* **255**, 10867-10874.

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

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**, 8734-8743.

Muller S., Sandal S., Kamp-Hansen P., Dalboge H. (1998) Comparison of expression systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Y. lipolytica*. *Yeast* **14**, 1267-1283.

Mumberg D., Muller R., Funk M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**, 119-122.

Price L. A., Kajkowski E. M., Hadcock J. R., Ozenberger B. A., Pausch M. H. (1995) Functional coupling of a mammalian somatostatin receptor to the yeast pheromone response pathway. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 6188-6195.

Raymond C. R., Bukowski T., Holderman S. D., Ching A. F., Vanaja E., Stamm M. R. (1998) Development of the methylotrophic yeast *Pichia methanolica* for the expression of the 65 kilodalton isoform of human glutamate decarboxylase. *Yeast* **14**, 11-23.

Ridder R., Schmitz R., Legay F., Gram H. (1995) Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial vage display library and their production in the yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology* **13**, 255-260.

Robinson A. S., Hines V., Wittrup K. D. (1994) Protein disulphide isomerase overexpression increases secretion of foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology* **12**, 381-384.

Rodriguez M., Rubiera R., Penichet M., Montesinos R., Cremata J., Falcon V., Sanchez G., Bringas R., Cordoves C., Valdes M., Ueonart R., Herrera L., De La Fuente J. (1994) High level expression of the b. microplus bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J. Biotechnol.* **33**, 135-146.

Romanos M. A., Scorer C. A., Clare J. J. (1992) Foreign gene expression in yeast. *Yeast* **8**, 423-488.

Romanos R. (1995) Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 527-533.

Rosypal S., Doškař J., Petrzik K., Růžičková V. (2002) Úvod do molekulární biologie, 4. díl, Vol. 21 Výklad základních metod molekulární biologie, pp. 1085-1140, Grafex Blansko, Brno, Česká republika.

Ruetz S., Brault M., Kast C., Hemenway C. (1998) Functional expression of the multidrug resistance-associated protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 4154-4160.

Sears I. B., O'Connor J., Rossanese O. W., Glick B. S. (1998) A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast* **14**, 783-790.

Shen S., Sulter G., Jeffries T. W., Cregg J. M. (1998) A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **216**, 93-102.

Shusta E. V., Raines R. T., Pluckthun A., Wittrup K. D. (1998) Increasing the secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae* for production of single-chain antibody fragments. *Nat. Biotechnol.* **16**, 773-777.

Shusta E. V., VanAntwerp J., Wittrup K. D. (1999) Biosynthetic polypeptide libraries. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 117-122.

Sollitti P., Merkler 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.

Sudbery P. E. (1996) The expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 517-524.

- Tschopp J. F., Brust P. F., Cregg J. M., Stillman C. A., Gingeras T. R. (1987) Expression of the *LacZ* gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res.* **15**, 3859-3876.
- Turner D. H., Turner J. F. (1961) Adenylic deaminase of pea seeds. *Biochem. J.* **79**, 143-147.
- Vozza L. A., Wittwer L., Higgins D. R., Purcell T. J., Bergseid M., Collins R. L. A., Lavallie E. R., Hoeffler J. P. (1996) Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology* **14**, 77-81.
- Vuorela A., Myllyharju J., Nissi R., Pihlajaniemi T., Kivirikko K. I. (1997) Assembly of human prolyl 4-hydroxylase and type III collagen in the yeast *Pichia pastoris*. Formation of a stable enzyme tetramer requires coexpression with collagen and assembly of a stable collagen requires coexpression with prolyl 4-hydroxylase. *EMBO. J.* **16**, 6702-6712.
- Waterham H. R., Digan M. E., Koutz P. J., Lair S. V., Cregg J. M. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene* **186**, 37-44.
- Weydemann U., Keup P., Piontek M., Strasser A. W. M., Schweden J., Gellissen G., Janowicz Z. A. (1995) High-level secretion of hirudin by *Hansenula polymorpha* - authentic processing of three different preprohirudins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 377-385.
- Wittekindt N. E., Wurgler F. E., Sengstag C. (1995) Functional expression of fused enzymes between human cytochrome p4501a1 and human NADPH-cytochrome p450 oxidoreductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Cell. Biol.* **14**, 273-283.
- Yoshino M. a 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. a 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. a 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., Tsushima K. (1979) AMP deaminase from baker's yeast. Purification and some regulatory properties. *Biochim. Biophys. Acta* **570**, 157-166.

Seznam zkratek

ADE1	PR-amidoimidazolsukcinokarboxamidsynthasa
AMP	adenosinmonofosfát
AOX	alkoholoxidasa
ARG4	argininosukcinátlyasa
ATP	adenointrifosfát
DHAS	dihydroxyacetonsynthasa
FLD1	glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenasa
GAP	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa
HIS4	histidindehydrogenasa
IMP	inosinmonofosfát
KEX2	endoproteasa rozpoznávající dipeptidy
LB	Luria Bertani Broth Hight salt médium
MCS	multiklonovací místo
MOX	methanoloxidasa
PCR	polymerázová řetězová reakce
<i>PEX8</i>	gen peroxisomální biogenese
P _i	anorganický fosfát
URA3	orotidin -5' - fosfátdekarboxylasa
URA5	orotát-fosforibosyltransferasa
YPT1	GTP-vázající protein
6xHis	polyhistidinová kotva