

# Klonování genů v kvasinkách

## Důvody pro klonování genů v eukaryotech

**A. Funkce charakteristické pro eukaryotické buňky, které se u bakterií nevyskytují:**

- lokalizace systému regenerujícího ATP v mitochondriích,
- uspořádání DNA v chromatinu
- způsob dělení buněk, mitóza a meióza
- diferenciací buněk, buněčné komunikace, signální dráhy

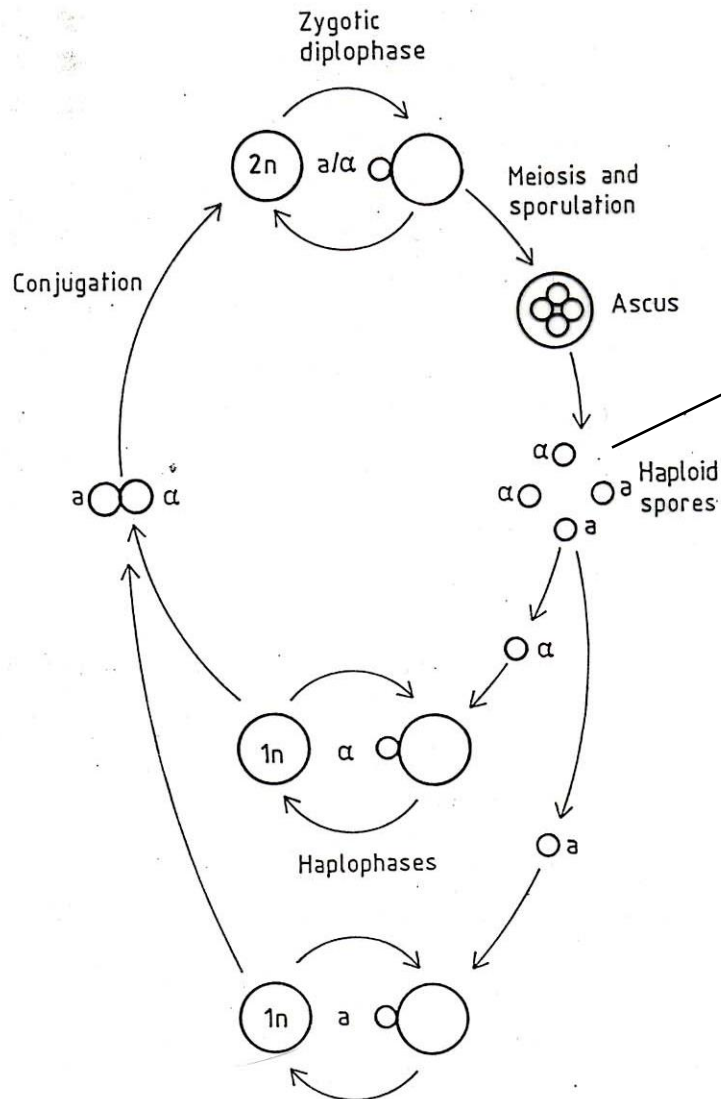
**B. Rozdíly v expresi genů u eukaryot oproti bakteriím:**

- odlišnost regulačních sekvencí pro transkripci, translaci a export
- specifické posttranslační modifikace

# Výhody kvasinek pro GI

- **jednoduchá eukaryota s mikrobiálním charakterem (malý genom se známou sekvencí, krátká generační doba a vysoký počet potomstva, kultivace na definovaných půdách, řada mutant získaných a charakterizovaných klasickou i moderní genetikou**
- **řada genů homologních vyšším eukaryotům, podobná buněčná biochemie a regulace genů**
- **možnost stanovit dominanci a recesivitu alel (na haploidním pozadí)**
- **vysoká frekvence homologní rekombinace – záměny genů**
- **tradiční dobře definovaný a bezpečný biotechnologický organismus, možnost přípravy farmak pro humánní medicínu,**
- **eukaryotické proteiny vytváří v aktivní podobě, lze dosáhnout sekrece do prostředí**

# Životní cyklus kvasinek



tetrádová analýza

**Dva typy haploidních buněk: a a α**

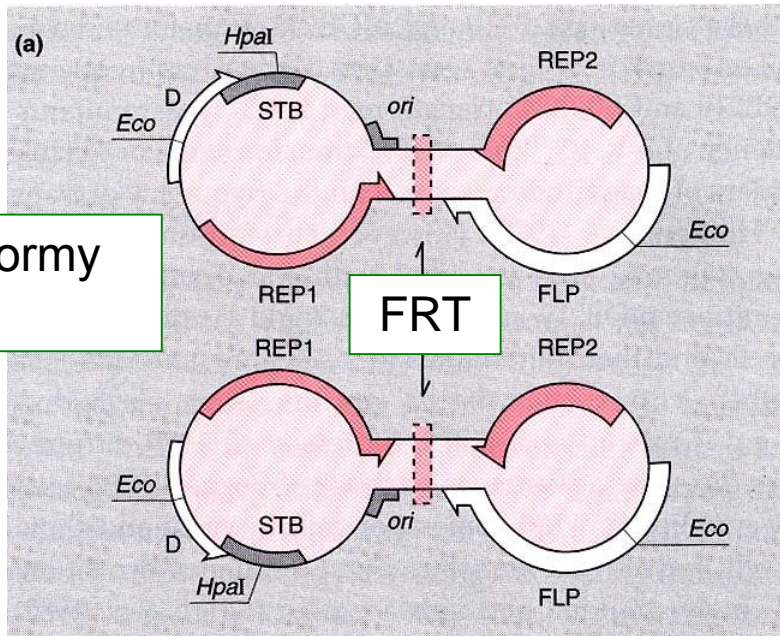
**Heterotalické kmeny** – stabilní

**Homotalické kmeny** – nestabilní,  
haploidní buňky spontánně revertují  
na opačný buněčný typ

# Molekulární struktura kvasinkového 2 $\mu$ plazmidu

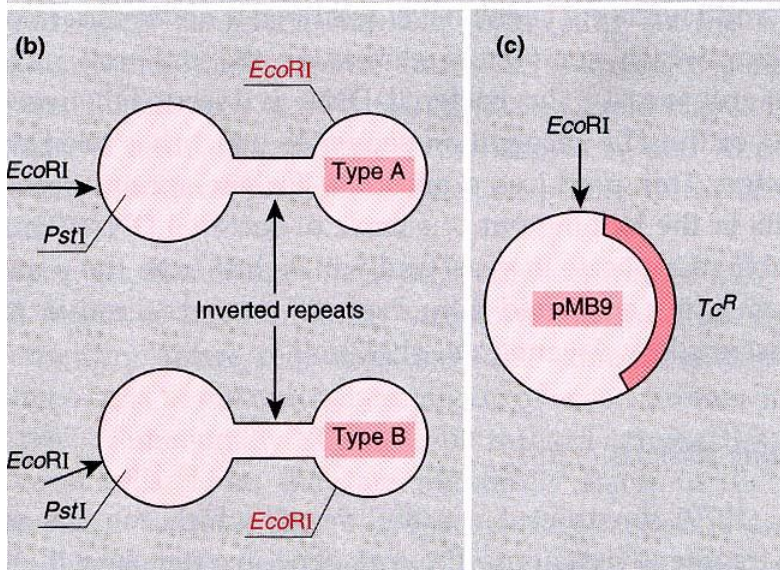
6,3 kb; 50-100 kopií

Izomerní formy plazmidu



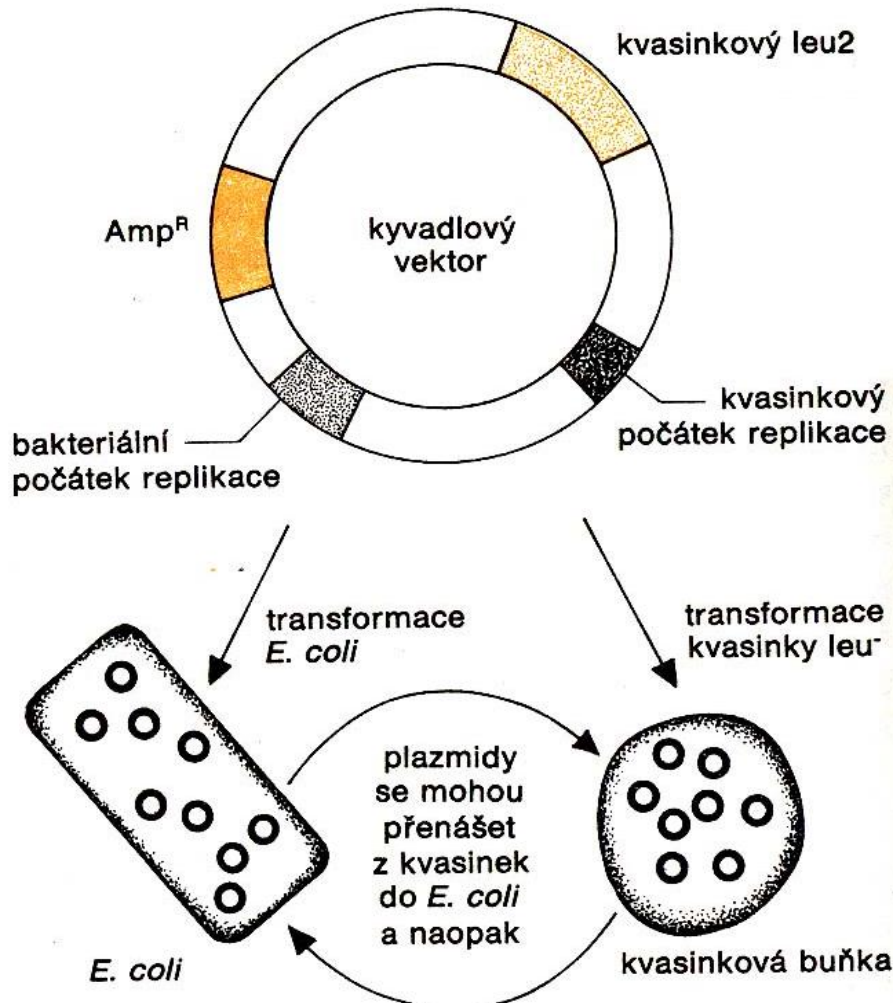
REP – replikace  
FLP – rekombinace  
STB – rozklad kointegrátu

**FRT site = Flp recombination target**  
**Flp recombinase = flippase**  
**System Flp/FRT ~ Cre/loxP**



Chimerické plazmidy vytvořené spojením plazmidů 2 $\mu$  a pMB9 štěpených EcoRI, (dále pak vložení genu *leu2* z kvasinkového chromozomu do místa PstI na plazmidu)

# Kyvadlové vektory pro klonování genů v kvasinkách

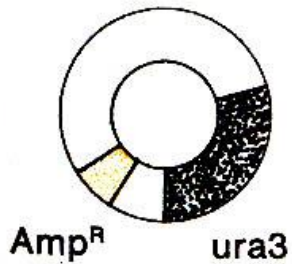


Přenos do kvasinek:  
transformace protoplastů  
**elektroporace**

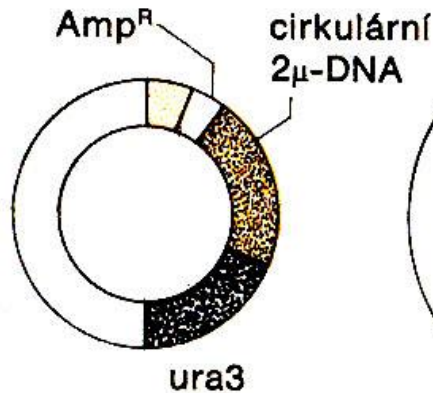
**Příprava protoplastů:**  
lytikáza, zymolyáza

# Základní typy kvasinkových vektorů

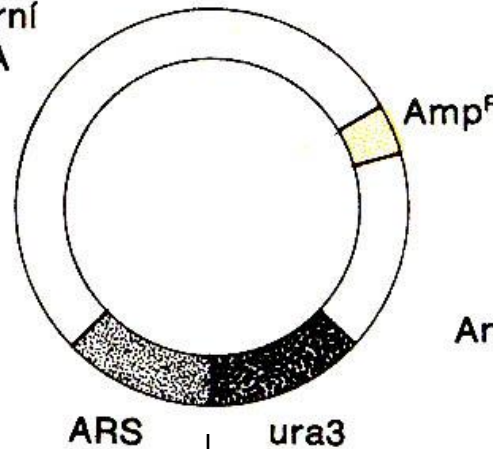
Integrující se ~ pBR322, stabilní po integraci



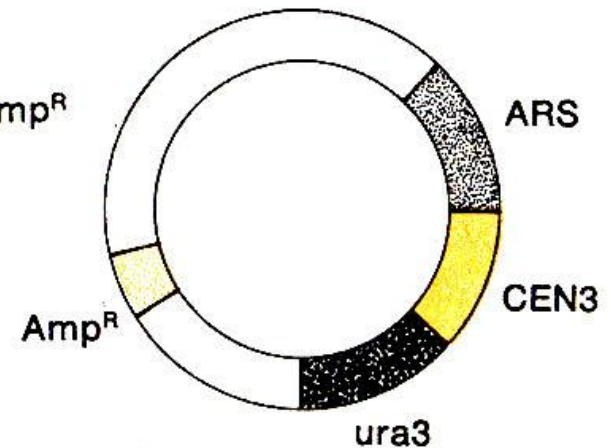
Replikující se malý počet kopií, nízká stabilita



Epizomální, malý počet kopií, stabilní

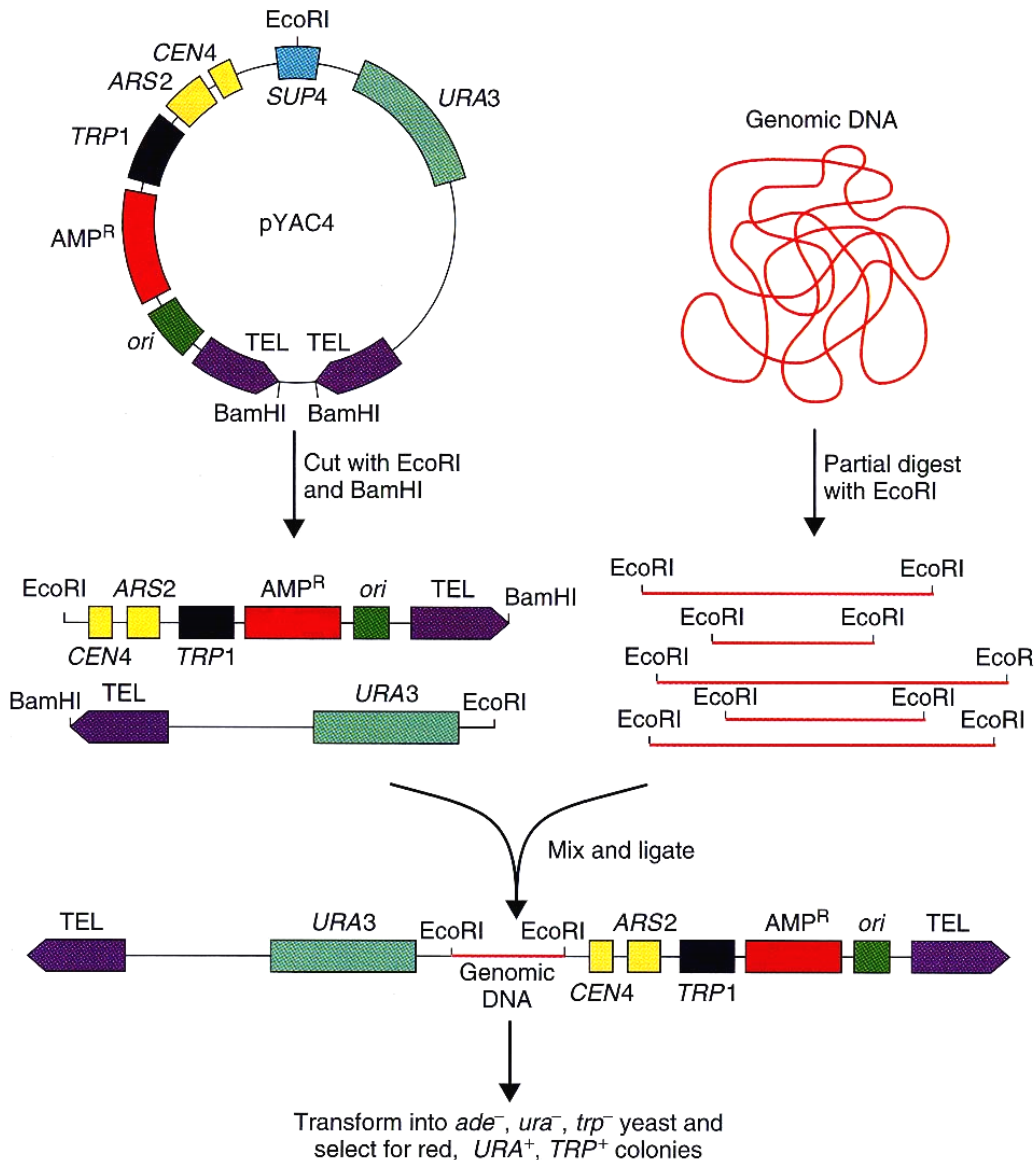


nesoucí centromeru (jediná kopie; stabilní)



Možnost eliminace bakteriálních sekvencí jejich ohraničením FLP

# Umělý kvasinkový chromozom (YAC)

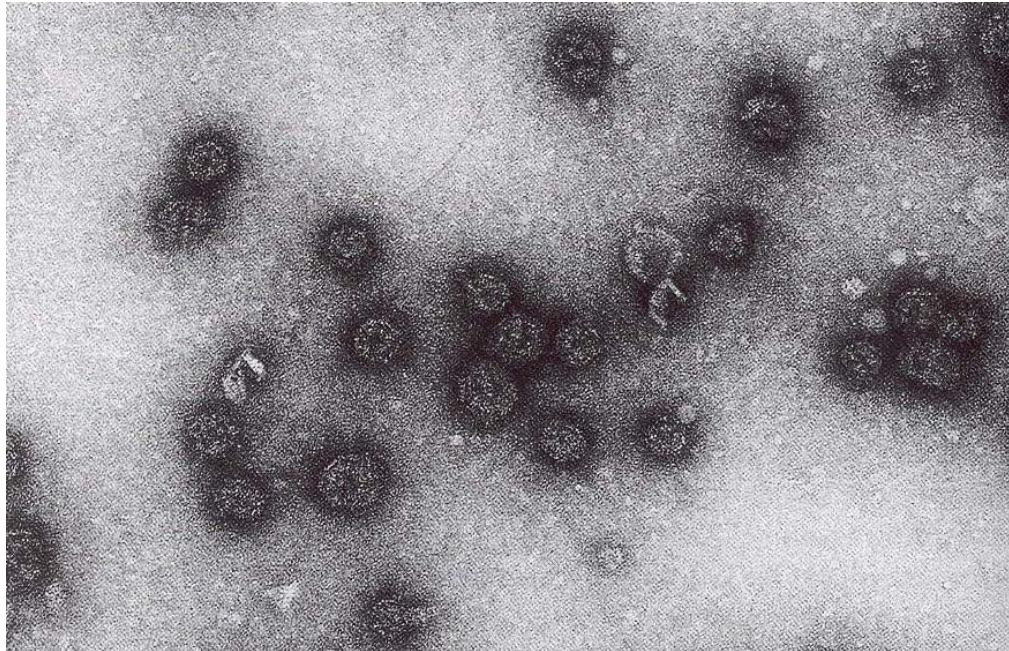


Selekční markery:

AMP<sub>R</sub> – E. coli

TRP1, URA3 - kvasinky

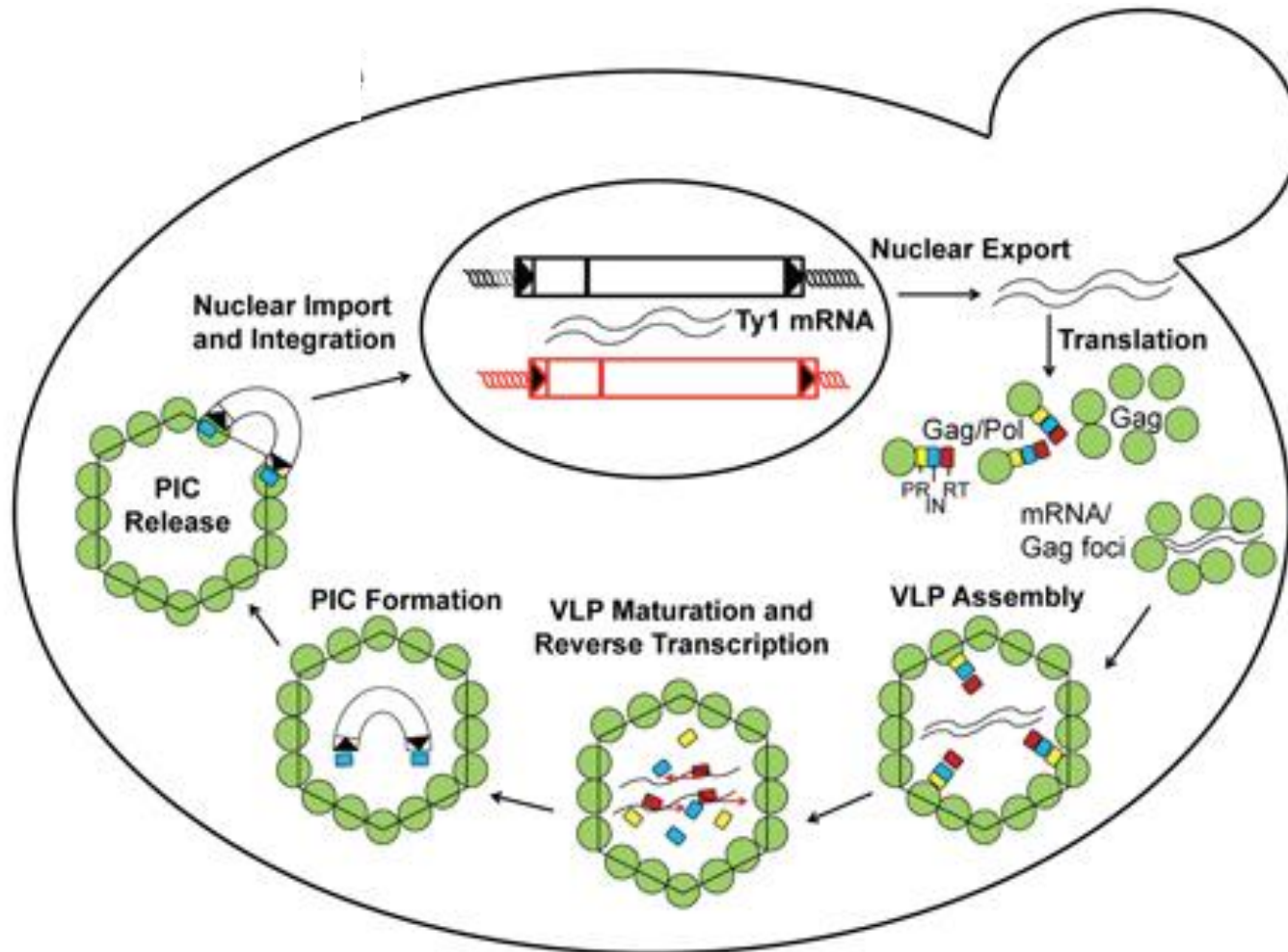
# Virům podobné částice odvozené z Ty elementů nesoucích kódující oblast HIV1 TAT



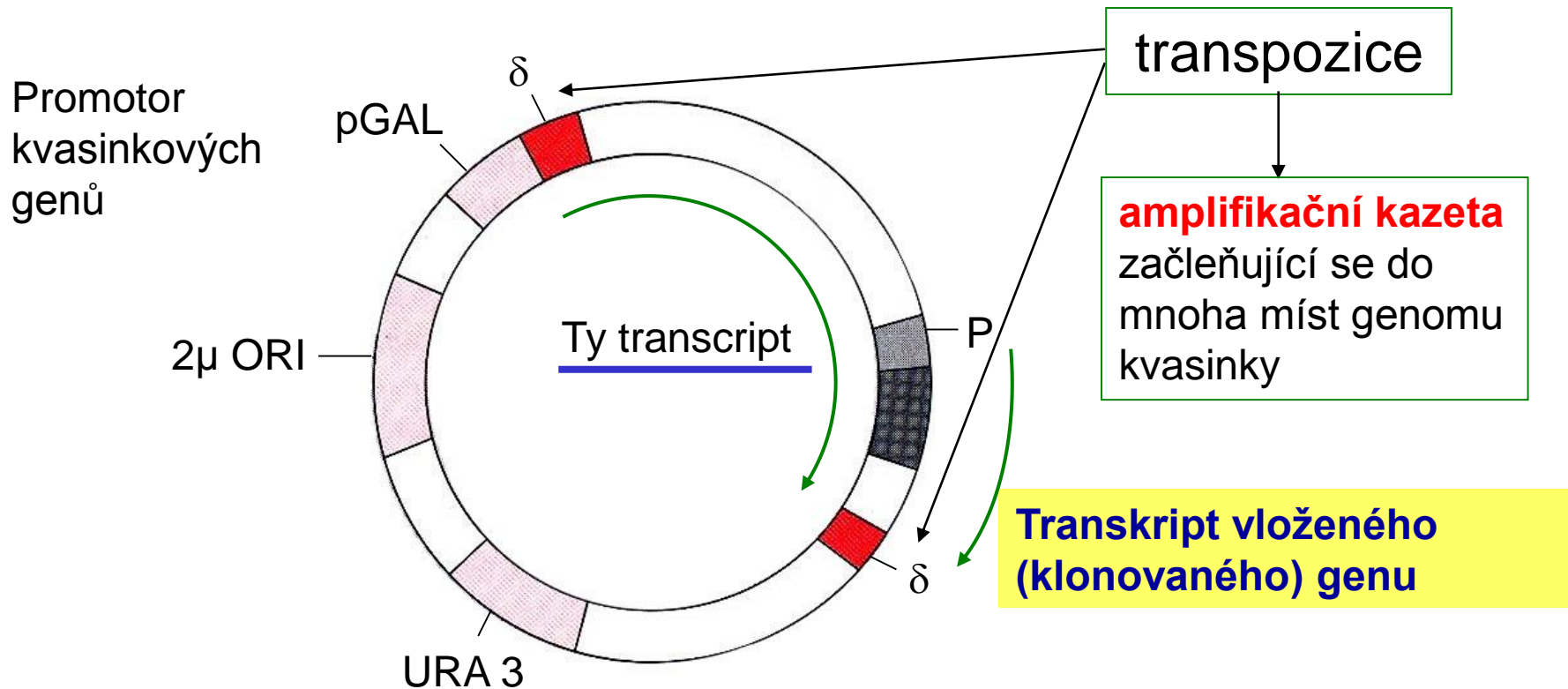
**Ty-element:** 30-40 kopií v genomu *S. cerevisiae*, velikost 5,9 kb  
LTR – 334 bp, levá funguje jako promotor genů pro RT a integrázu.  
Pseudovirion (virus like particle, VLP) obsahuje mRNA, dsDNA, RT a integrázu



# Životní cyklus Ty1



PIC – PREINTEGRATION COMPLEX



Struktura vysokokopiového plazmidu používaná pro začlenění modifikovaného Ty elementu nesoucího klonovaný gen do chromozomu kvasinky. pGAL a P jsou kvasinkové promotory, δ (delta sekvence) jsou LTR

Použití při přípravě vakcín – fúzní plášťový protein obsahující např. antigeny z plazmodií (malárie)

# Table 13.1 Properties of different yeast vectors

## VEKTOR

### integrující se

Vector	Transformation frequency	Copy no./ cell	Loss in non-selective medium	Disadvantages	Advantages
YIp	10 <sup>2</sup> transformants per µg DNA	1	Much less than 1% per generation	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 Low transformation frequency</li> <li>2 Can only be recovered from yeast by cutting chromosomal DNA with restriction endonuclease which does not cleave original vector containing cloned gene</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 Of all vectors, this kind give most stable maintenance of cloned genes</li> <li>2 An integrated YIp plasmid behaves as an ordinary genetic marker, e.g. a diploid heterozygous for an integrated plasmid segregates the plasmid in a Mendelian fashion</li> <li>3 Most useful for surrogate genetics of yeast, e.g. can be used to introduce deletions, inversions and transpositions (see Botstein &amp; Davis 1982)</li> </ol>

### epizomální (ori 2 µ)

YEp	10 <sup>3</sup> –10 <sup>5</sup> transformants per µg DNA	25–200	1% per generation	Novel recombinants generated <i>in vivo</i> by recombination with endogenous 2-µm plasmid	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 Readily recovered from yeast</li> <li>2 High copy number</li> <li>3 High transformation frequency</li> <li>4 Very useful for complementation studies</li> </ol>
-----	---	--------	-------------------	---	--

### replikující se (ars)

YRp	10 <sup>4</sup> transformants per µg DNA	1–20	Much greater than 1% per generation but can get chromosomal integration	Instability of transformants	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 Readily recovered from yeast</li> <li>2 High copy number. Note that the copy number is usually less than that of YEp vectors but this may be useful if cloning gene whose product is deleterious to the cell if produced in excess</li> <li>3 High transformation frequency</li> <li>4 Very useful for complementation studies</li> <li>5 Can integrate into the chromosome</li> </ol>
-----	--	------	---	------------------------------	---

### centromérový

YCp	10 <sup>4</sup> transformants per µg DNA	1–2	Less than 1% per generation	Low copy number makes recovery from yeast more difficult than that of YEp or YRp vectors	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 Low copy number is useful if product of cloned gene is deleterious to cell</li> <li>2 High transformation frequency</li> <li>3 Very useful for complementation studies</li> <li>4 At meiosis generally shows Mendelian segregation</li> </ol>
-----	--	-----	-----------------------------	--	--

### umělý chromozom

YAC		1–2	Depends on length: the longer the YAC the more stable it is	Difficult to map by standard techniques	<ol style="list-style-type: none"> <li>1 High-capacity cloning system permitting DNA molecules greater than 40 kb to be cloned</li> <li>2 Can amplify large DNA molecules in a simple genetic background</li> </ol>
-----	--	-----	---	---	---

### transpoziční

Ty	Depends on vector used to introduce Ty into cell	~20	Stable, since integrated into chromosome	Needs to be introduced into cell in another vector	Get amplification following chromosomal integration
----	--	-----	--	--	---

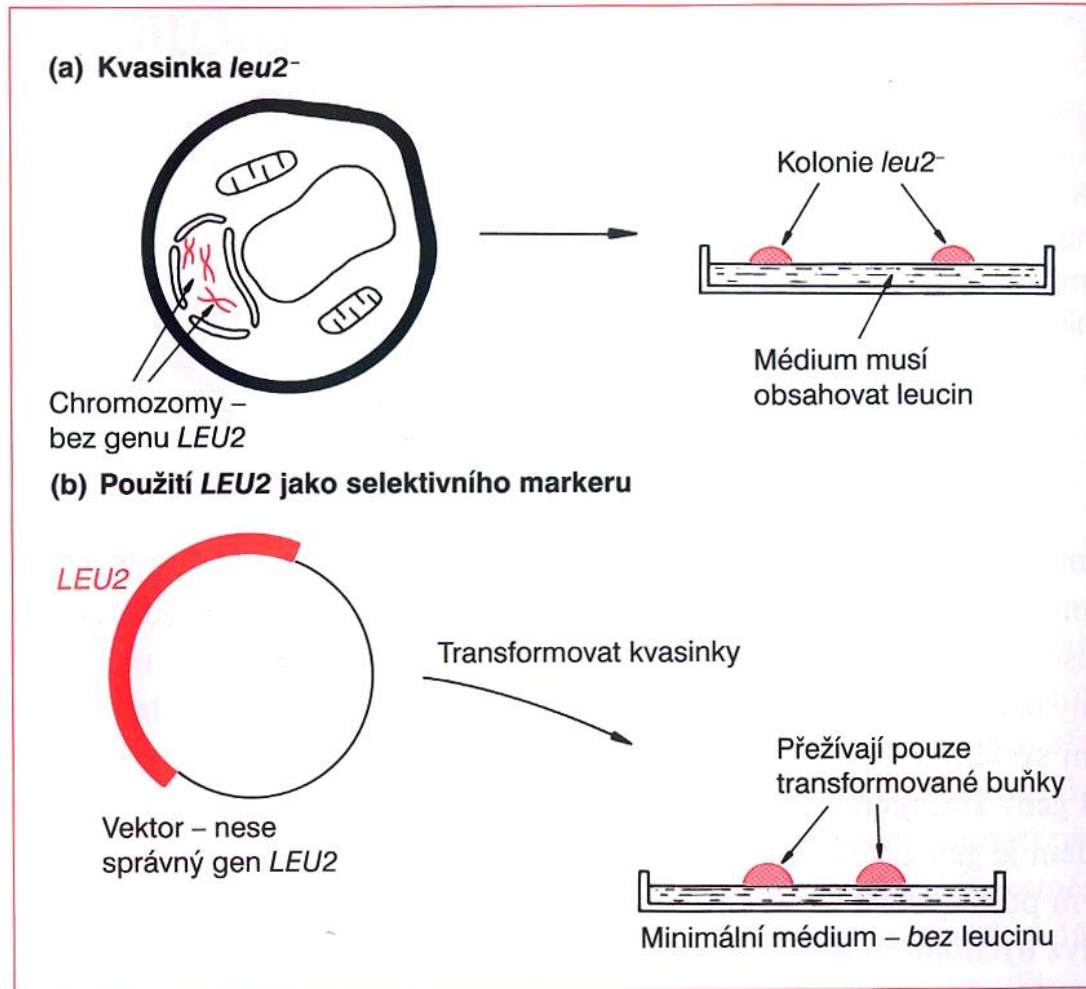
# Selektovatelné markery u kvasinek

Gen	Enzym	Selekce
HIS3	Imidazole glycerolphosphate dehydratase	histidine
LEU2	$\beta$ -Isopropylmalate dehydrogenase	leucine
LYS2	$\alpha$ -Aminoadipate reductase	lysine
TRP1	N-(5'-phosphoribosyl)-anthranilate isomerase	tryptophan
URA3	Orotidine-5'-phosphate decarboxylase	uracil

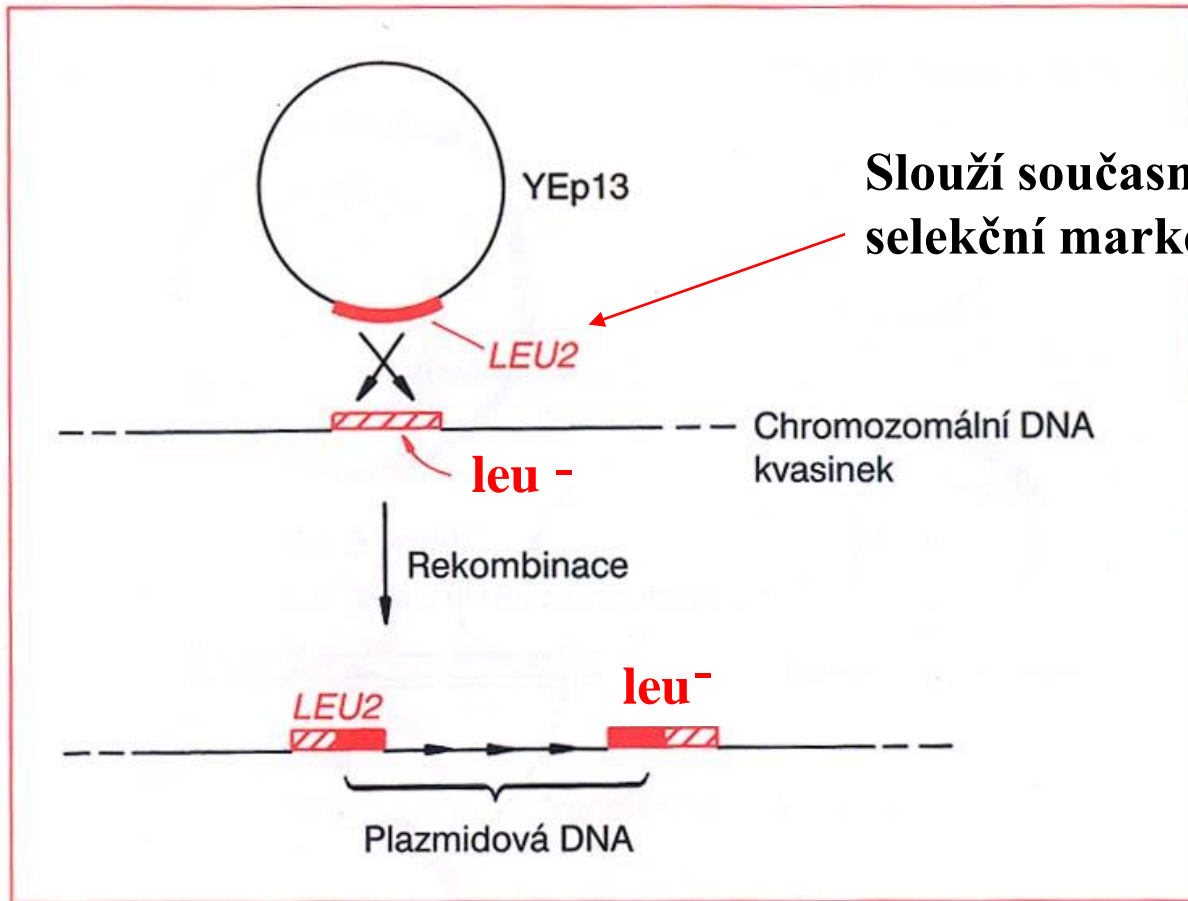
Pozitivní selekce na mediu bez příslušného faktoru

**G418 – rezistence k geneticinu (Kan<sup>R</sup>)**

# Využití genu *LEU2* jako selekčního markeru



# Začleňování epizomálních plazmidů do chromozomu kvasinek



## Výhody dostupnosti různých typů kvasinkových vektorů

- Všechny kvasinkové vektory mohou být použity k vytváření částečných diploidů nebo částečných polyploidů, přičemž genové sekvence zavedené do buňky mohou být buď začleněny do chromozomu nebo přetrvávat v extrachromozomálním stavu.
- Do klonovaných genů mohou být zaváděny *in vitro* mutace a pozměněné geny lze pak vrátit do kvasinky a **nahradit jimi** alely standardního typu.

# Reportérové geny

Gene	Protein	Size (amino acids)	Original source	Detection	Reference
<i>cat</i>	Chloramfenikol-acetyltransferáza	219	<i>E. coli</i> Tn9 transposon	Acetylation of chloroamphenicol using <sup>14</sup> C acetyl-CoA	(Gorman, Moffat and Howard, 1982)
<i>lacZ</i>	$\beta$ -galactosidase	1024	<i>E. coli</i>	Conversion of colourless ONPG to a yellow product; XGal blue–white screening	(Norton and Coffin, 1985)
<i>gusA</i>	$\beta$ -glucuronidase	603	<i>E. coli</i>	Conversion of MUG in a fluorometric assay; XGluc blue–white screening	(Jefferson <i>et al.</i> , 1986)
<i>luc</i>	Luciferase	550	<i>Photinus pyralis</i> (firefly)	Oxidation of luciferin to produce light	(de Wet <i>et al.</i> , 1987)
GFP	Green fluorescent protein	238	<i>Aequoria victoria</i> (jellyfish)	Emits green fluorescence when exposed to blue or UV light	(Chalfie <i>et al.</i> , 1994)

ONPG – *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside.  
 XGal – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside.  
 MUG – 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-glucuronide.  
 XGluc – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide.



# Exprese genů v kvasinkách

- Pro účinnou expresi je žádoucí, aby klonované sekvence byly pod kontrolou kvasinkových promotorů – ty mají určitá specifika. Vektory proto mají promotory z kvasinek.
- Poločas mRNA (1-100 min) je silně ovlivněn netranslatovanými sekvencemi na 5' a 3' konci – jejich odstranění poločas zvýší
- Kvasinky mají jiné využívání kodonů než bakterie nebo vyšší eukaryota. Při chemické syntéze genů je třeba volit kodony, které jsou čteny (96% aminokyselin v kvasinkových proteinech je kódováno jen 25-ti z 61 možných kodonů)
- Exkrece proteinů: signální sekvence jsou dlouhé 20-90 aa. Přesná pravidla nejsou známa – u některých proteinů se exkrece nedaří. Sekrece zabrání rozkladu proteinu v cytoplazmě – proteolýze lze zabránit též změnou aa na N-konci (zábrana ubiquitace)

# Exprese genů v kvasinkách – pokrač.

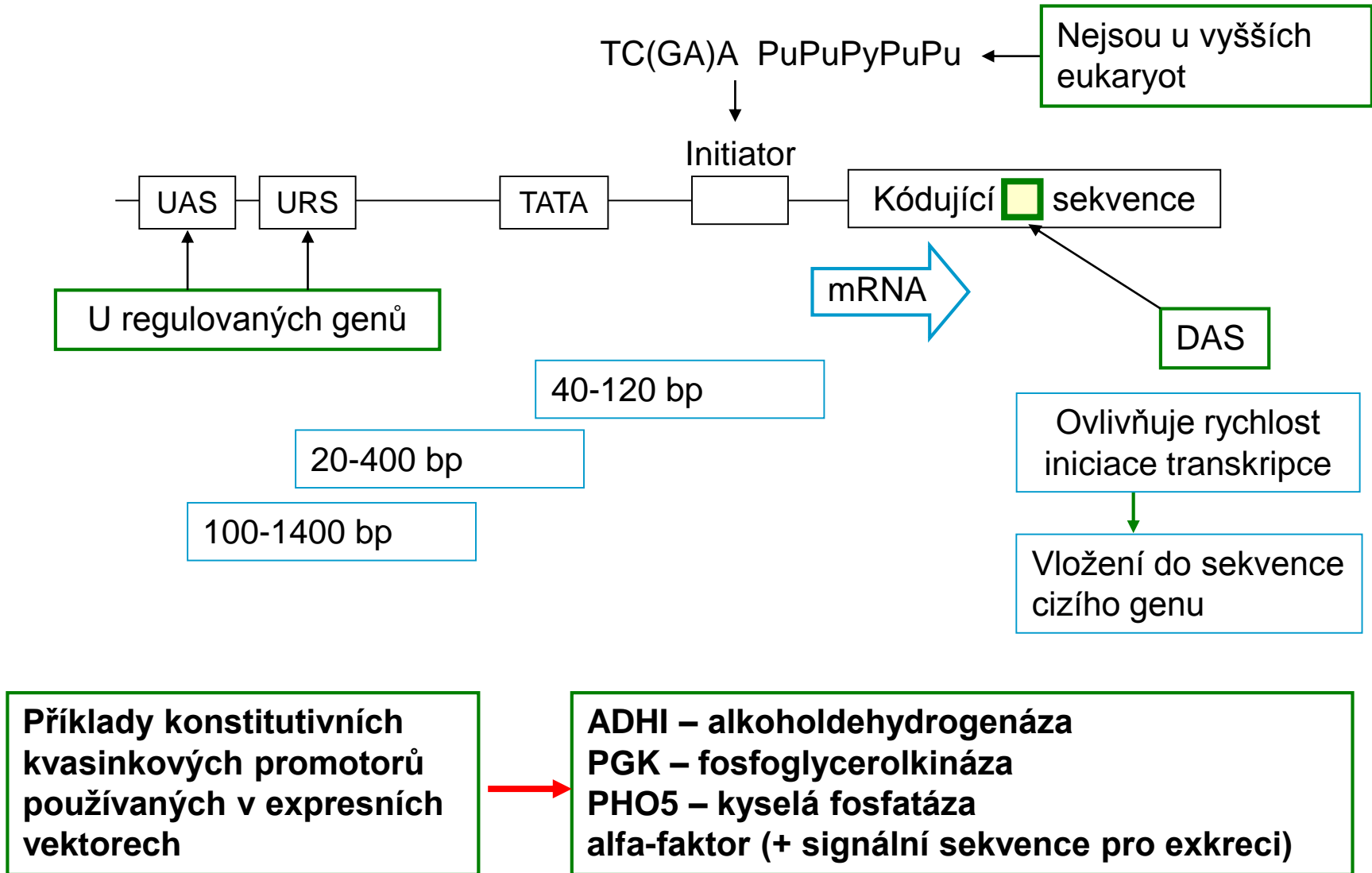
- **Glykozylace** – dochází ke glykozylaci cizích proteinů, ale struktura a sekvence oligosacharidů připojovaných na proteiny je odlišná než v přirozených hostitelích – to může mít důsledky pro stabilitu, imunogenitu a výslednou lokalizaci v tkáních (např. při terapeutickém používání)
- **Stabilita proteinů.** Rychlá degradace proteinů po jejich syntéze nebo po rozbití buněk a purifikaci endoproteinázami, karboxypeptidázami a aminopeptidázami přítomnými ve vakuolách. Byla zkonstruována řada mutantních kmenů s pozměněnou aktivitou těchto enzymů.
- **Sestřih.** Introny mají obecné rysy (5' GU – AG 3') a další konsenzuální sekvence. U kvasinek je před 3' místem sestřihu sekvence, která chybí u vyšších eukaryot.

# Struktura kvasinkového promotoru

4 elementy:

1. TC(G/A)A a PuPuPyPuPu jsou u více než poloviny známých kvasinkových promotorů. Tyto sekvence nejsou u vyšších eukaryot, což ukazuje na rozdílný mechanismus jejich transkripčního aparátu.
2. TATA box, oblast 20-120 nukleotidů před místem iniciace.
3. Sekvence umístěné proti směru transkripce podílející se na regulaci genů:
  - A. **sekvence aktivující transkripci (UAS)** – vazba pozitivního regulačního proteinu na UAS zvyšuje rychlost transkripce, zatímco delece UAS transkripci potlačí. Důležitým strukturním rysem UAS je přítomnost jedné nebo více oblastí s dvojitou symetrií.
  - B. **sekvence reprimující transkripci (URS)**. Vazba negativního regulačního proteinu na URS snižuje rychlost transkripce genů, které jsou regulovány negativně.
4. Sekvence umístěné uvnitř samotného genu, které se označují jako aktivující sekvence umístěné po směru transkripce (**downstream activating sequences, DAS**). Nízká množství heterologních proteinů odráží nízké množství mRNA jako důsledek nízkého stupně iniciace transkripce. Např. vložení aktivující sekvence umístěné po směru transkripce genu PGK obnovuje rychlost transkripce mRNA.

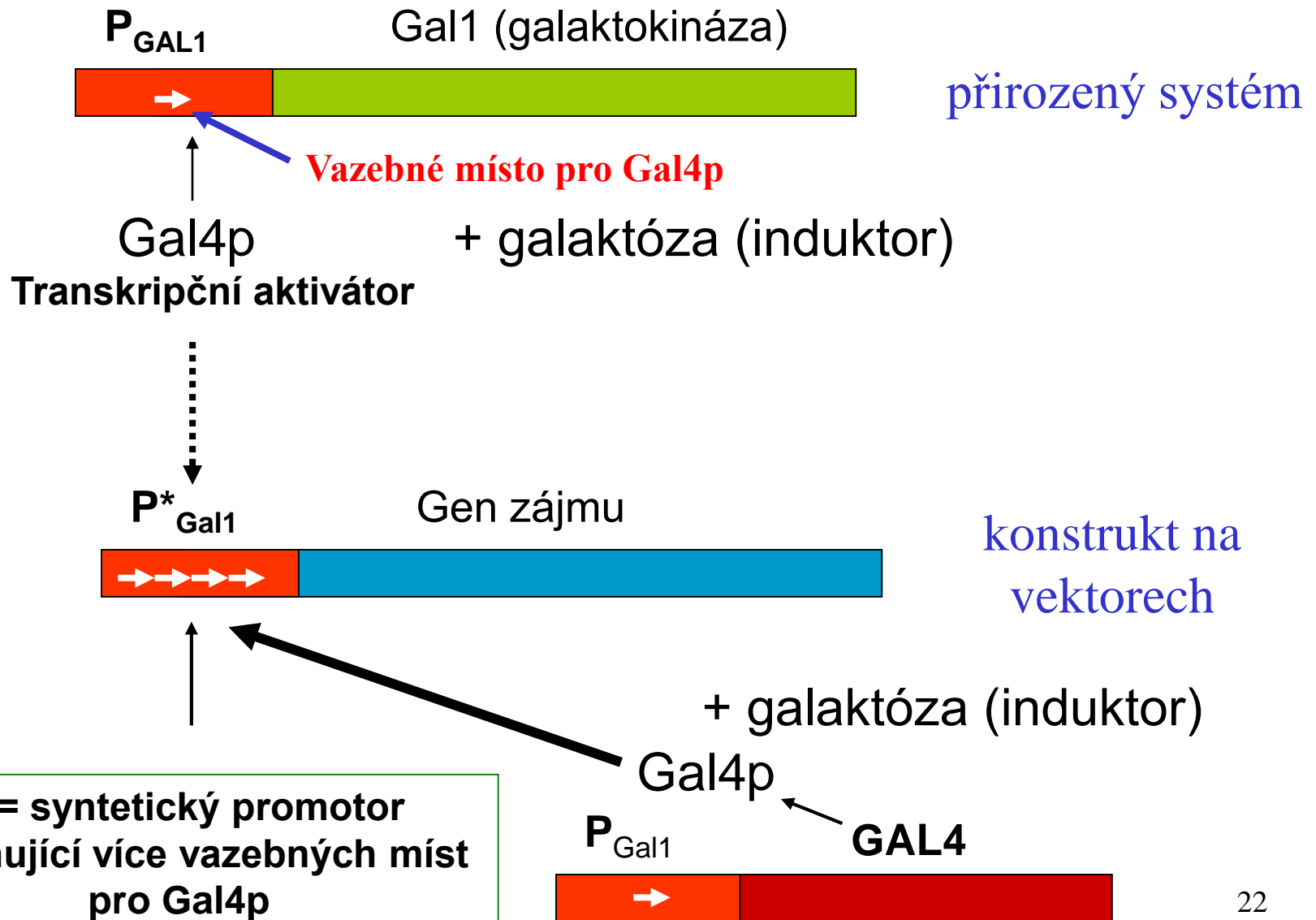
# Struktura typického kvasinkového promotoru



## Promotory *S. cerevisiae* využívané v expresních vektorech

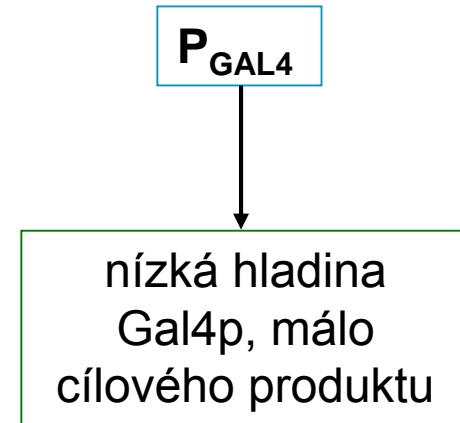
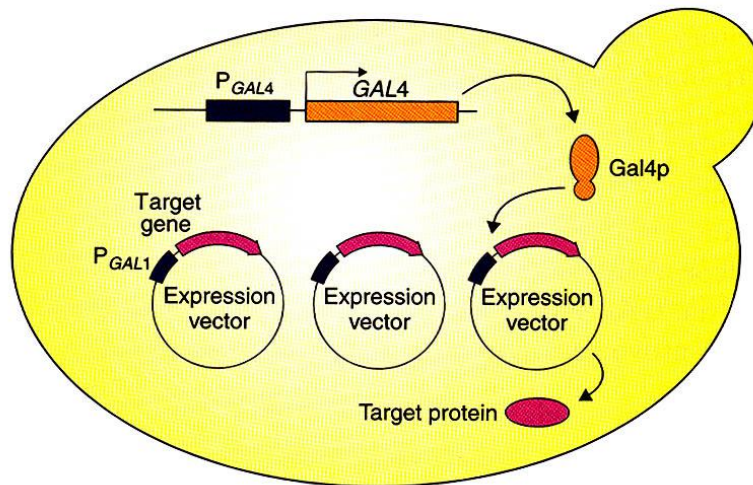
Promotor	Podmínky pro expresi	Tvorba produktu
Acid phosphatase ( <i>PH05</i> )	Phosphate-deficient medium	Inducible
Alcohol dehydrogenase I ( <i>ADHI</i> )	2–5% Glucose	Constitutive
Alcohol dehydrogenase II ( <i>ADHII</i> )	0.1–0.2% Glucose	Inducible
Cytochrome <i>c</i> <sub>1</sub> ( <i>CYC1</i> )	Glucose	Repressible
Gal-1-P Glc-1-P uridylyltransferase	Galactose	Inducible
<u>Galactokinase (<i>GAL1</i>)</u>	<u>Galactose</u>	<u>Inducible</u>
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ( <i>GAPD</i> , <i>GAPDH</i> )	2–5% Glucose	Constitutive
Metallothionein ( <i>CUP1</i> )	0.03–0.1 mM copper	Inducible
Phosphoglycerate kinase ( <i>PGK</i> )	2–5% Glucose	Constitutive
Triose phosphate isomerase ( <i>TPI</i> )	2–5% Glucose	Constitutive
UDP galactose epimerase ( <i>GAL10</i> )	Galactose	Inducible

# Gal systém *S. cerevisiae* využitý pro expresi genů

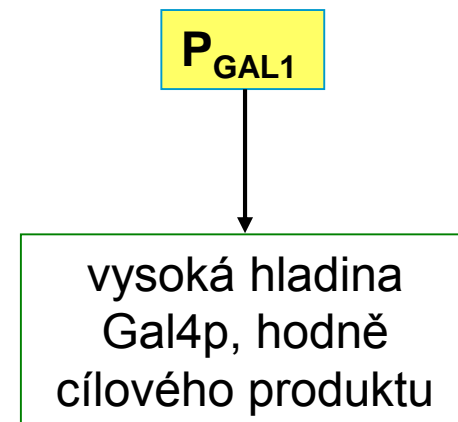
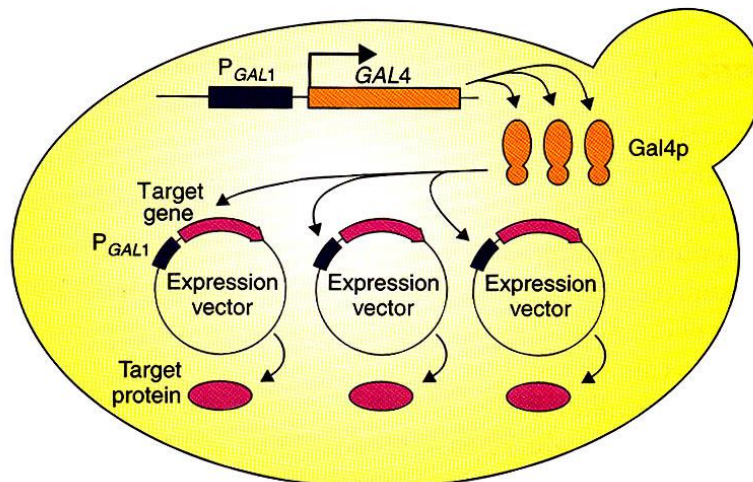


# Exprese genů indukovaná galaktózou

## A. Gal4p vytvářený z vlastního promotoru



## B. Gal4p vytvářený z promotoru Gal1



# Sekrece proteinů v kvasinkách

## Hlavní rysy sekretovaných proteinů:

- jsou syntetizovány na endoplazmatickém retikulu
- z ER jsou transportovány do Golgiho aparátu, kde jsou upraveny a zabaleny do sekrečních váčků
- Fúze sekrečních váčků s plazmatickou membránou se děje konstitutivně nebo jako odpověď na externí signál
- Nakonec jsou lokalizovány na buněčném povrchu nebo exportovány z buňky

## Proteiny přirozeně sekretované do růstového media

a) **párovací feromony** (a-faktor,  $\alpha$ -faktor)

b) **killer toxin** (proteinový produkt dsRNA n. dsDNA plazmidu n. VLP; molekuly působící toxicky na jiné kmeny kvasinek).

- Polypeptidy určené k sekreci mají hydrofobní N-konec, který je odpovědný za translokaci do endoplazmatického retikula.
- N-konec je obvykle tvořen 20 aminokyselinami a odštěpen ze zralého proteinu uvnitř endoplazmatického retikula.

Bylo dosaženo sekrece řady ne-kvasinkových polypeptidů z rekombinantních plazmidů, ale pravidla pro sekreci nejsou zcela jasná.



# Problémy při expresi některých proteinů v *S. cerevisiae*

- nízká exprese klonovaných genů, nízký výtěžek proteinu
- hyperglykozylace heterologních proteinů
- pozměněný transport sekretovaných proteinů  
(zadržení v periplazmatickém prostoru)
- tvorba vysoké koncentrace alkoholu, který usmrcuje buňky a snižuje výtěžek proteinů

# Cílení proteinů do jádra

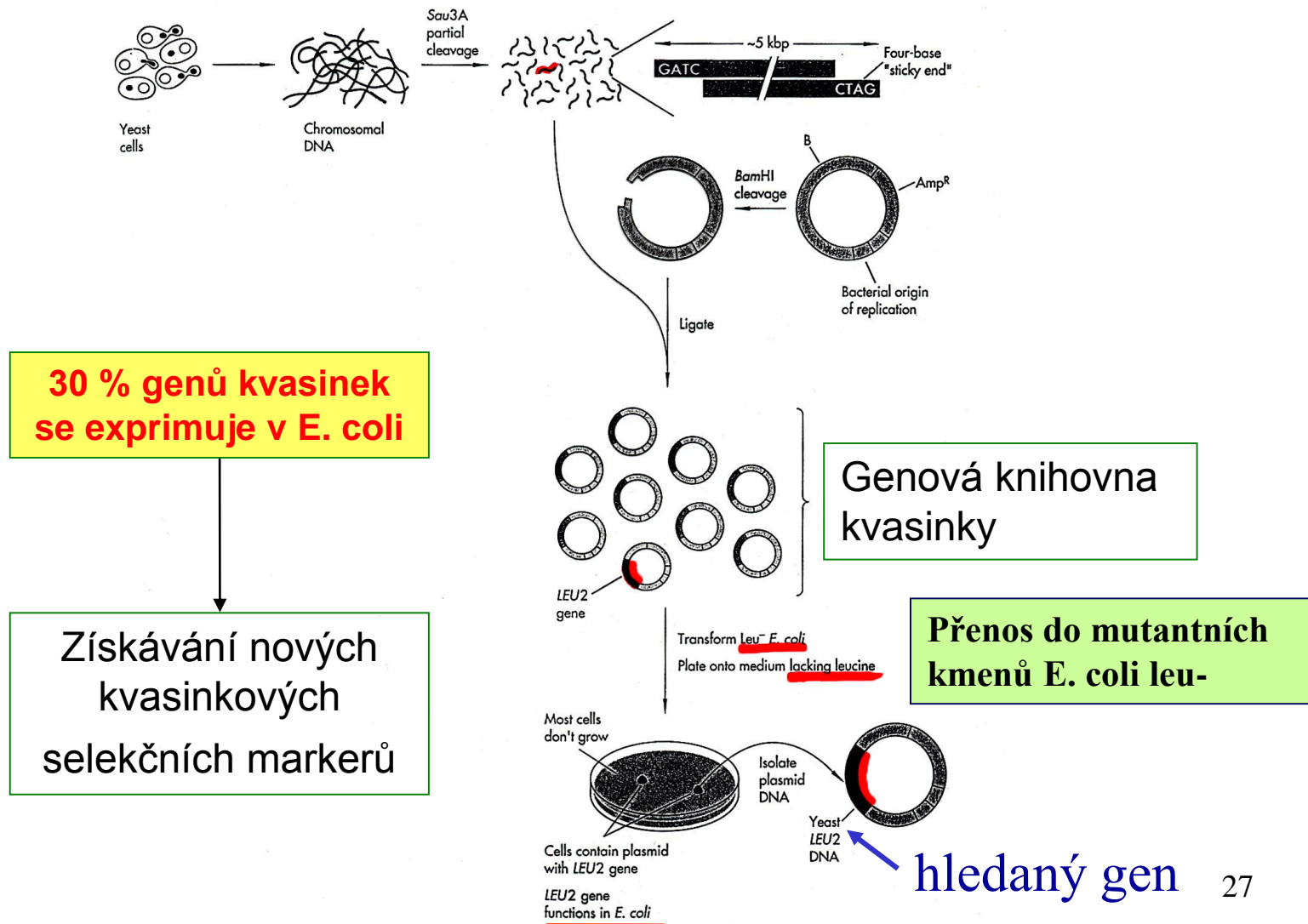
Jádro kvasinky obsahuje sadu proteinů, které jsou syntetizovány v cytoplazmě.

Pro objasnění mechanismu týkajícího se lokalizace proteinů v buňce byly zkonstruovány hybridní geny fúzí kvasinkového *Mata* genu, kódujícího předpokládaný jaderný protein, a genu *lacZ* z *E. coli*. Segment genového produktu *MAT*alfa, který byl 13 aminokyselin dlouhý, byl schopen usměrnit  $\beta$ -galaktozidázovou aktivitu do jádra. To bylo potvrzeno imunofluorescencí. Podobné sekvence byly zjištěny u jiných proteinů a označeny jako

## **nuclear localization signals (sequences) (NLS)**

Podle současného modelu pro import jaderných proteinů jsou proteiny obsahující NLS rozpoznány specifickými receptory (**nuclear transport receptors**) v cytoplazmě. Komplex NLS-receptor se pohybuje k jaderným póřům, které otvírá reakcí vyžadující ATP a dovoluje, aby protein vstoupil do jádra.

# Klonování kvasinkových genů v buňkách *E. coli* s využitím komplementace



**30 % genů kvasinek se exprimuje v *E. coli***

Získávání nových kvasinkových selekčních markerů

Genová knihovna kvasinky

Přenos do mutantních kmenů *E. coli* leu-

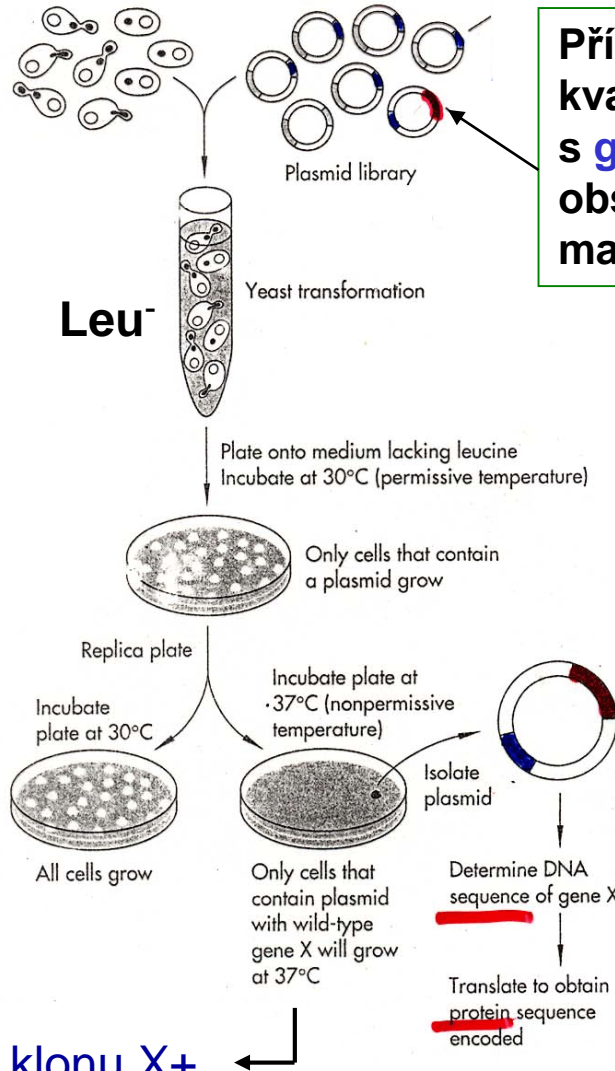
hledaný gen 27

# Klonování kvasinkových genů na základě genetické komplementace

Xts

recipient: kvasinkový kmen nesoucí ts mutaci v genu X a mutaci v genu leu2 – roste jen při 30°C

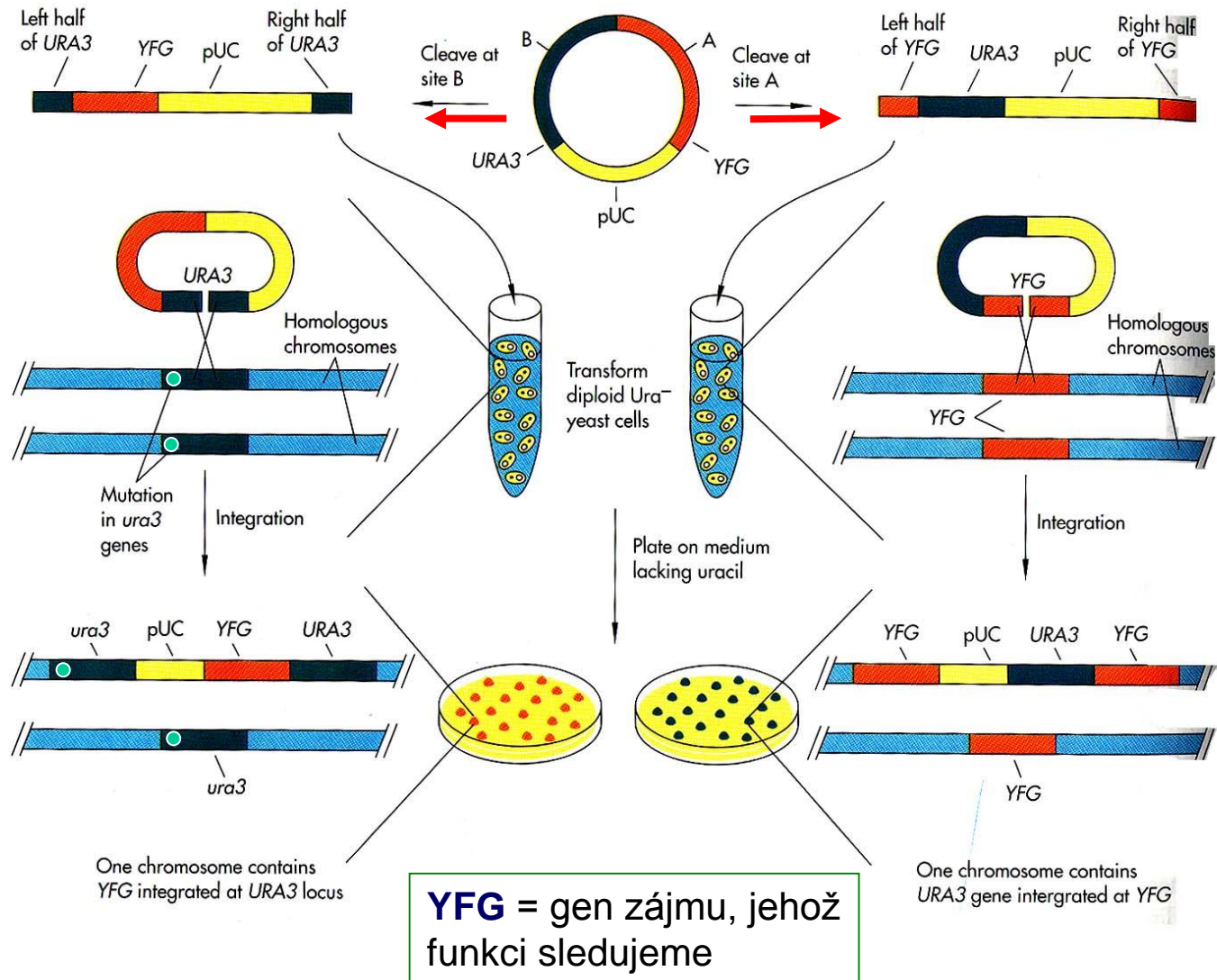
Příp. ztráta nějakého znaku při vyšších teplotách



Příprava genové knihovny z kvasinkového kmene s genem X(wt) ve vektoru obsahujícím jako selekční marker LEU2

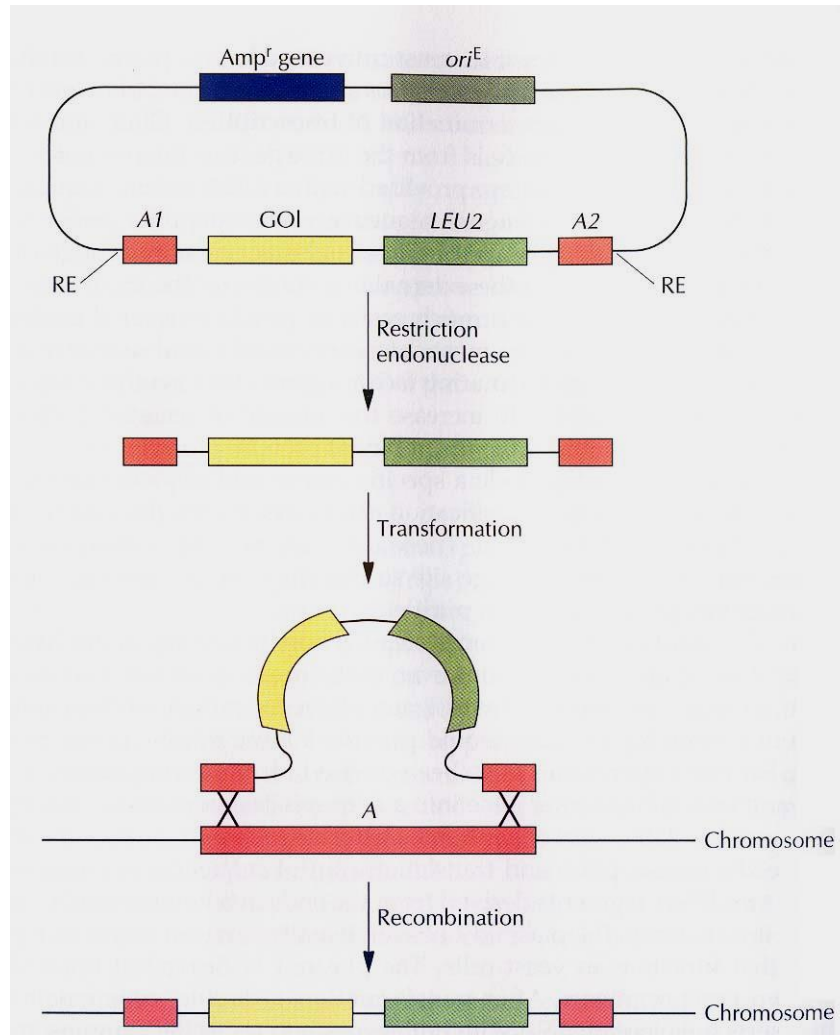
izolace klonu X+

# Začleňování genů homologní rekombinací



Linearizace plazmidu v místě homologie zvyšuje frekvenci začleňování asi 100x

# Vnášení genů do chromozomu kvasinek pomocí integrativních vektorů

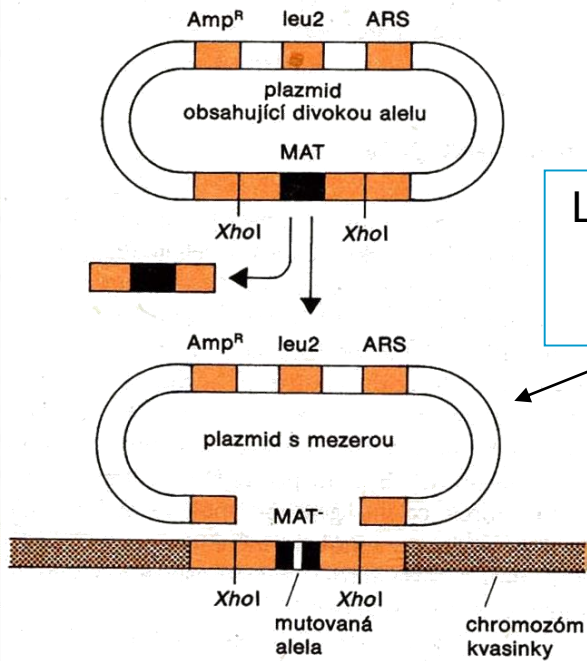


Kyvadlový vektor  
připravený v *E. coli*

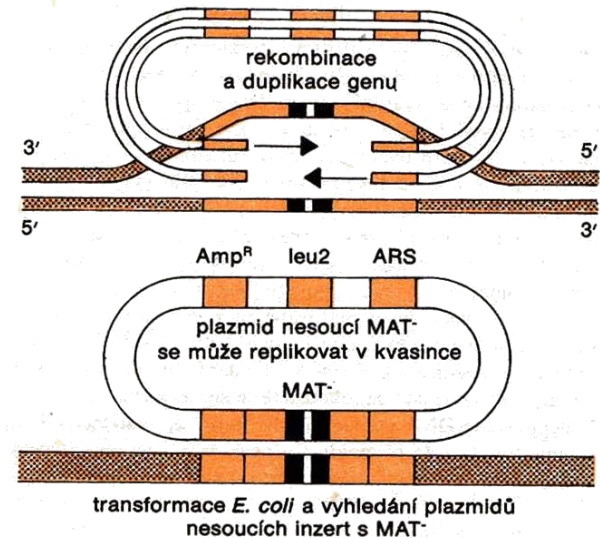
GOI = gen zájmu

*A1*, *A2* =  
nesenciální geny

# Vyprošťovací replikující se vektor



Linearizovaný plazmid se nereplikuje

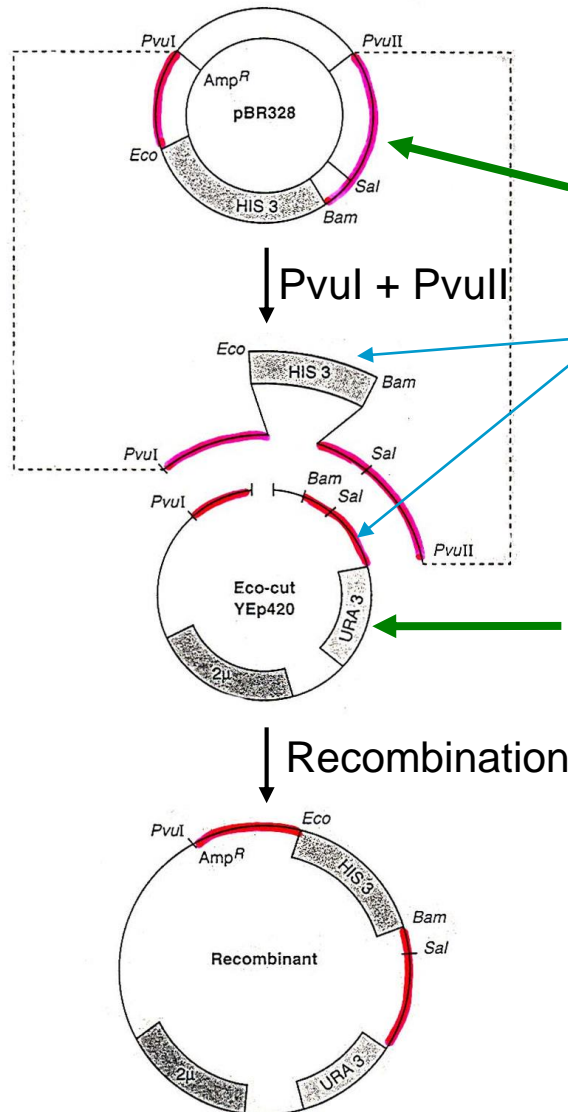


Část genu mat je vyštěpena, hraniční sekvence jsou ponechány

Homologní rekombinace a cirkularizace plazmidů, jejich izolace a přenos do *E. coli*, *studium mutantní alely MAT<sup>-</sup>*

# Rekonstrukce plazmidu homologní rekombinací v kvasinkové buňce

Vložení nového selekčního markeru do plazmidu, překlonování genu zájmu do jiného typu vektoru



Plazmid, který se v kvasince nereplikuje

společně přeneseny do kvasinky transformací

Plazmid, který se v kvasince replikuje

Selekce klonů na *HIS3*, případně na *URA3*



# Vytěsnění a záměna plazmidů

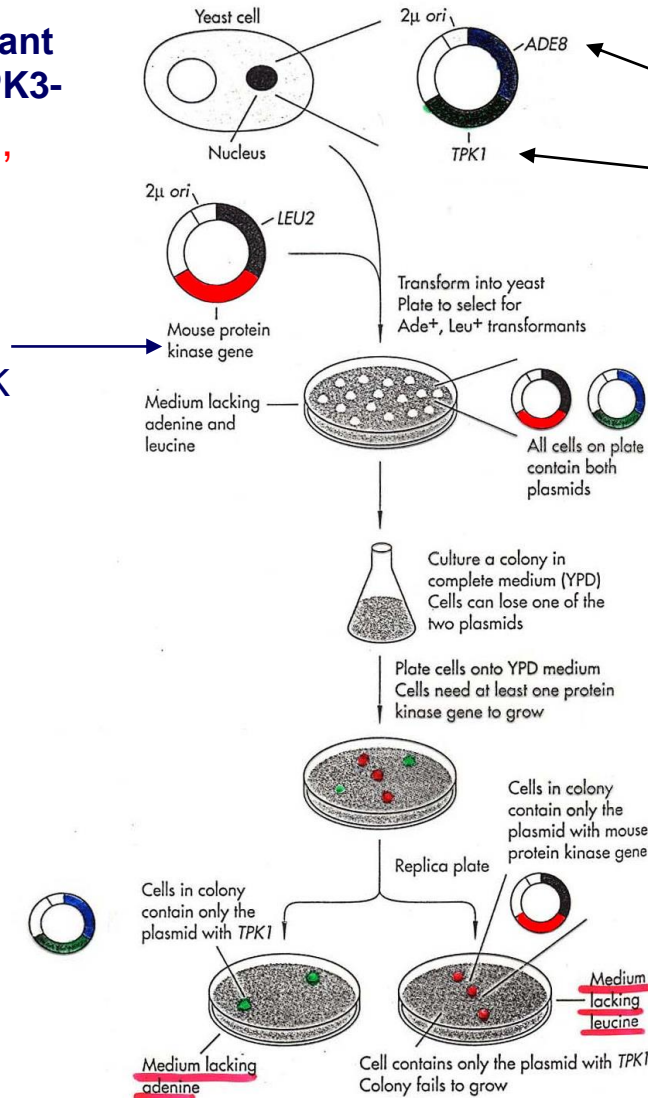
## Plasmid shuffle

# Studium funkce mutantních a cizích genů

Trojnásobný mutant  
TPK1-, TPK2-, TPK3-

ura+, his+, trp+,  
ade-, leu-

Myší cAMP  
dependentní PK



Umožňuje růst na mediu bez adeninu

Zajišťuje životaschopnost buňky

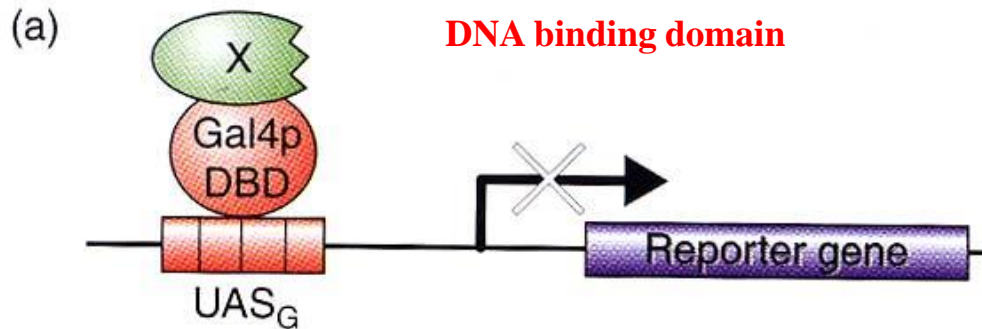
Selekce buněk obsahujících oba plazmidy – **půda bez ade a leu**

Kultivace buněk za neselektivních podmínek

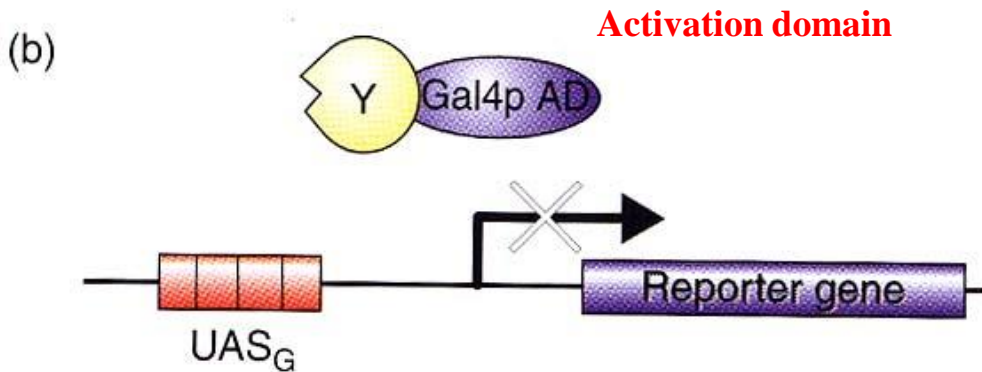
Buňka si musí alespoň jeden z plazmidů s PK podržet

**Závěr: Gen pro myší proteinkinázu může nahradit gen TPK1-**

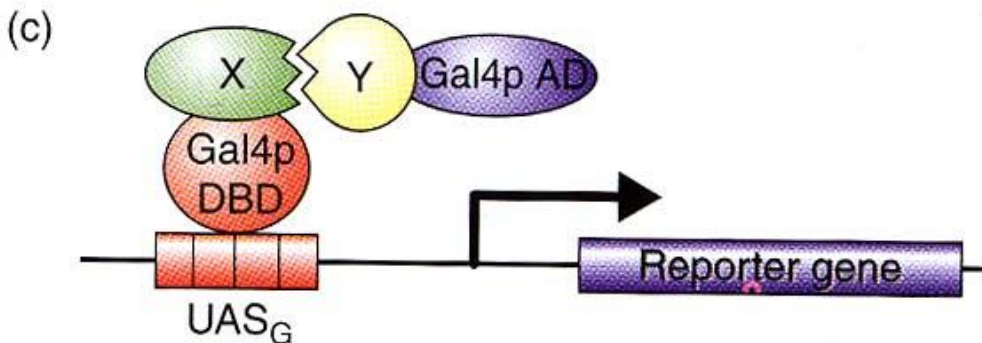
# Dvouhybridní systém ke studiu interakce proteinů



Hybridní protein Gal4p-X se váže na promotor, ale není schopen aktivovat transkripci reportérového genu

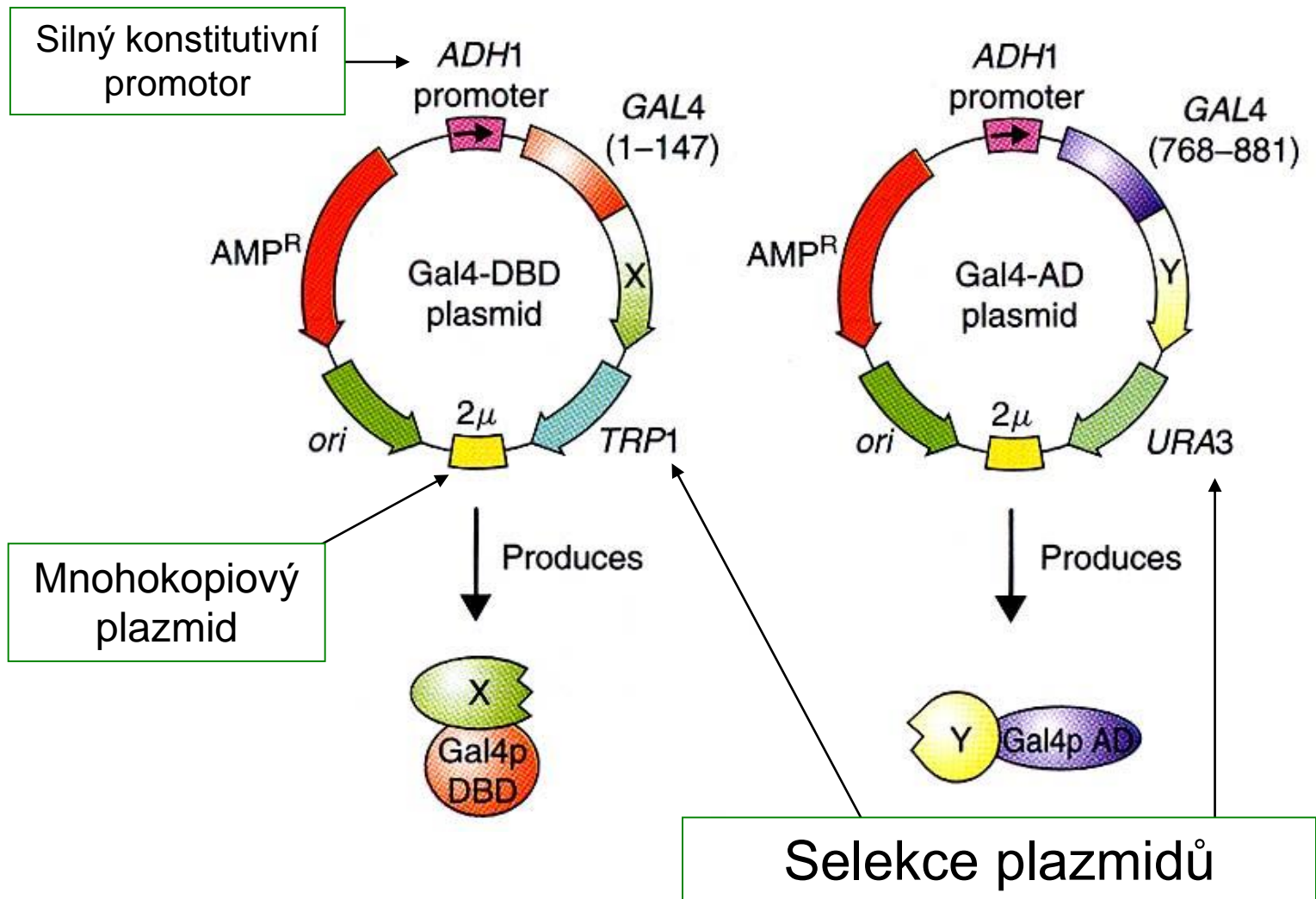


Hybridní protein Gal4p-Y se není schopen vázat na promotor a tudíž není schopen aktivovat transkripci

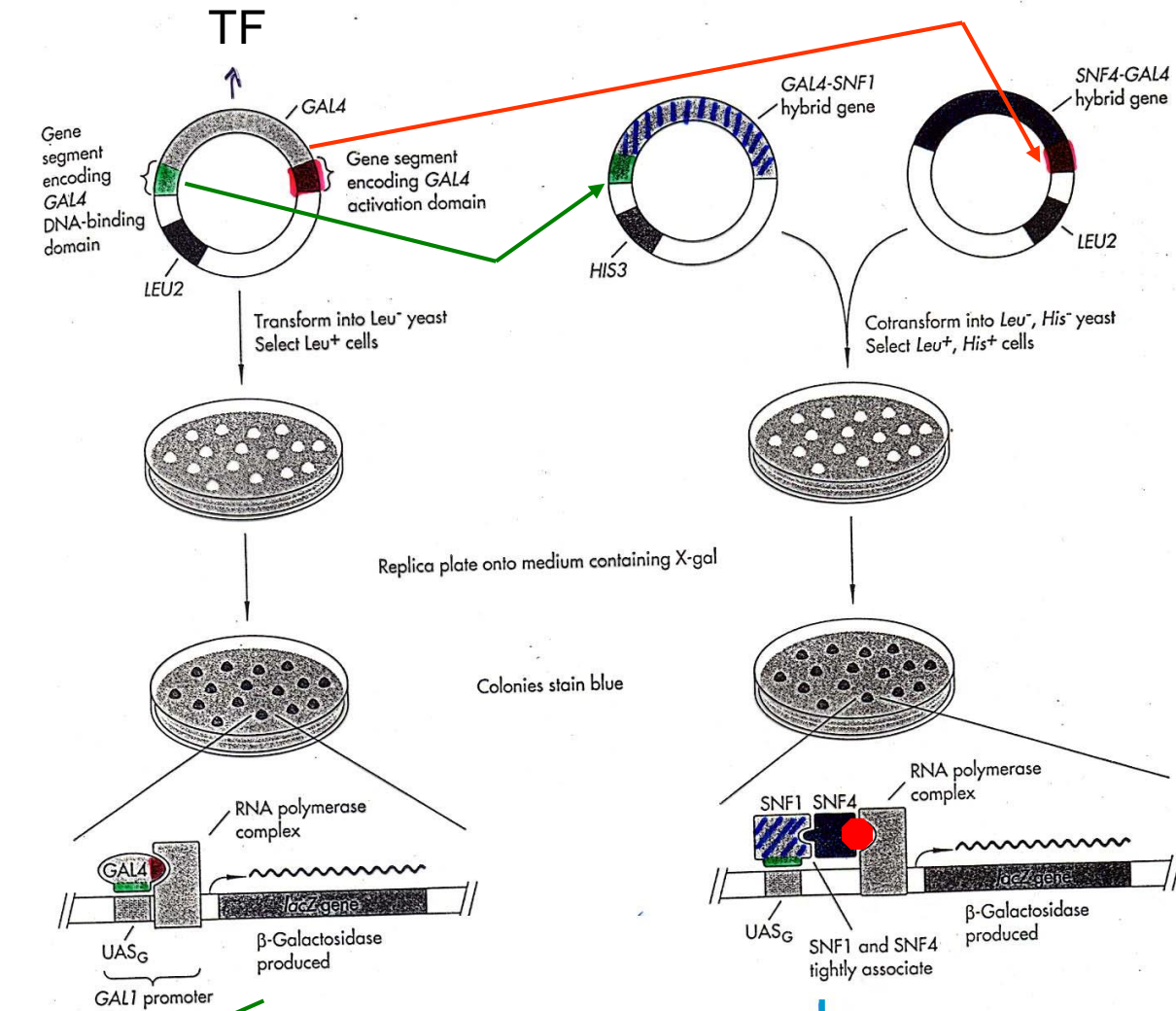


Interakce hybridních proteinů Gal4p-X::Gal4p-Y aktivuje transkripci

# Plazmidy určené k vytváření fúzních proteinů s doménami Gal4p (DBD a AD)



# Vyhledání genů, jejichž produkty interagují

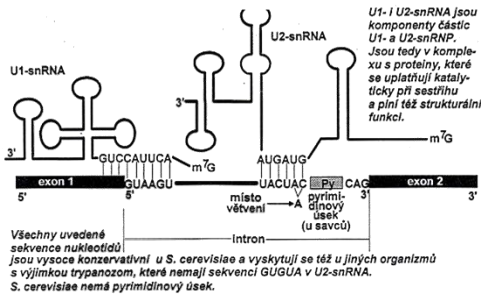


SNF1 a SNF4 asociují za vzniku produktu s protein-kinázovou aktivitou

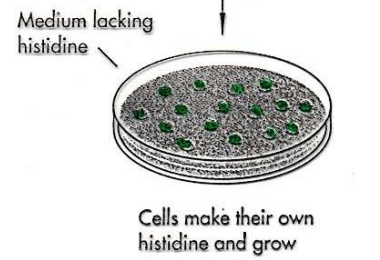
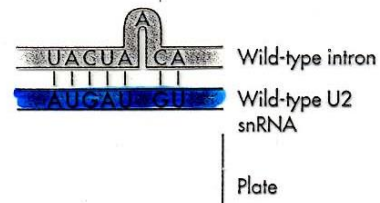
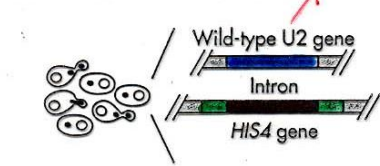
GFP

funkčně aktivní TF se vytvořil spojením proteinů SNF1 a SNF4 – tj. tyto proteiny vzájemně interagují

# Genetický důkaz funkce U2 snRNA

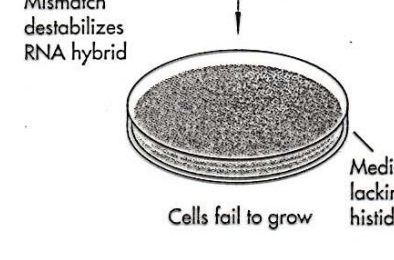
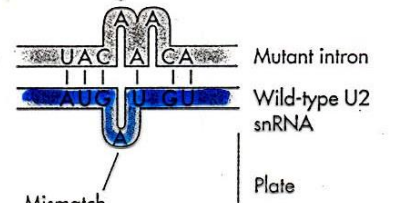
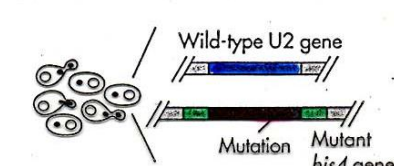


(a) Wild-type strain (strain A) **U2 snRNA**



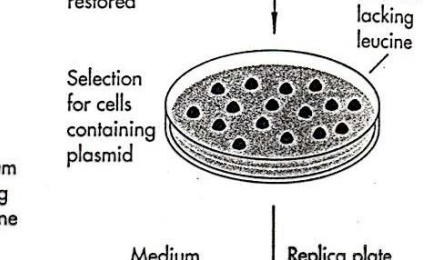
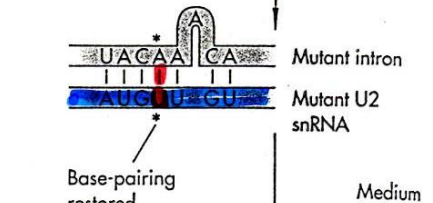
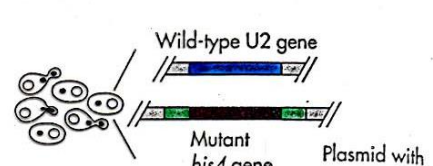
*his4* mRNA spliced

(b) Mutant strain (strain B)

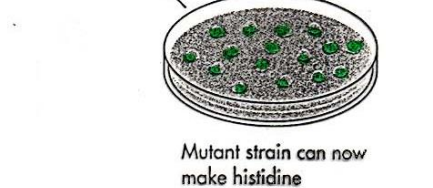


*his4* mRNA not spliced

(c) Mutant strain (strain B)



Replica plate

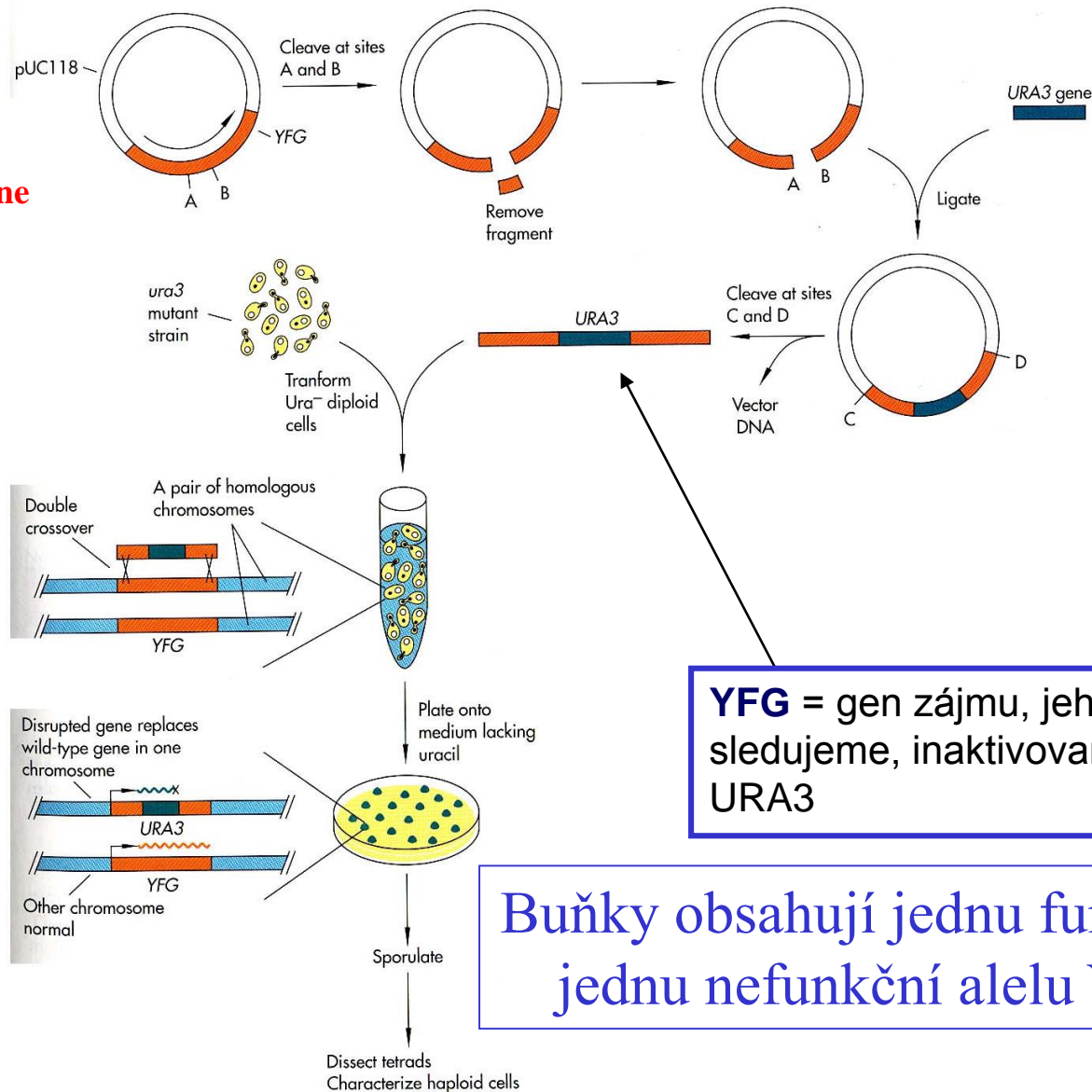


*his4* mRNA spliced

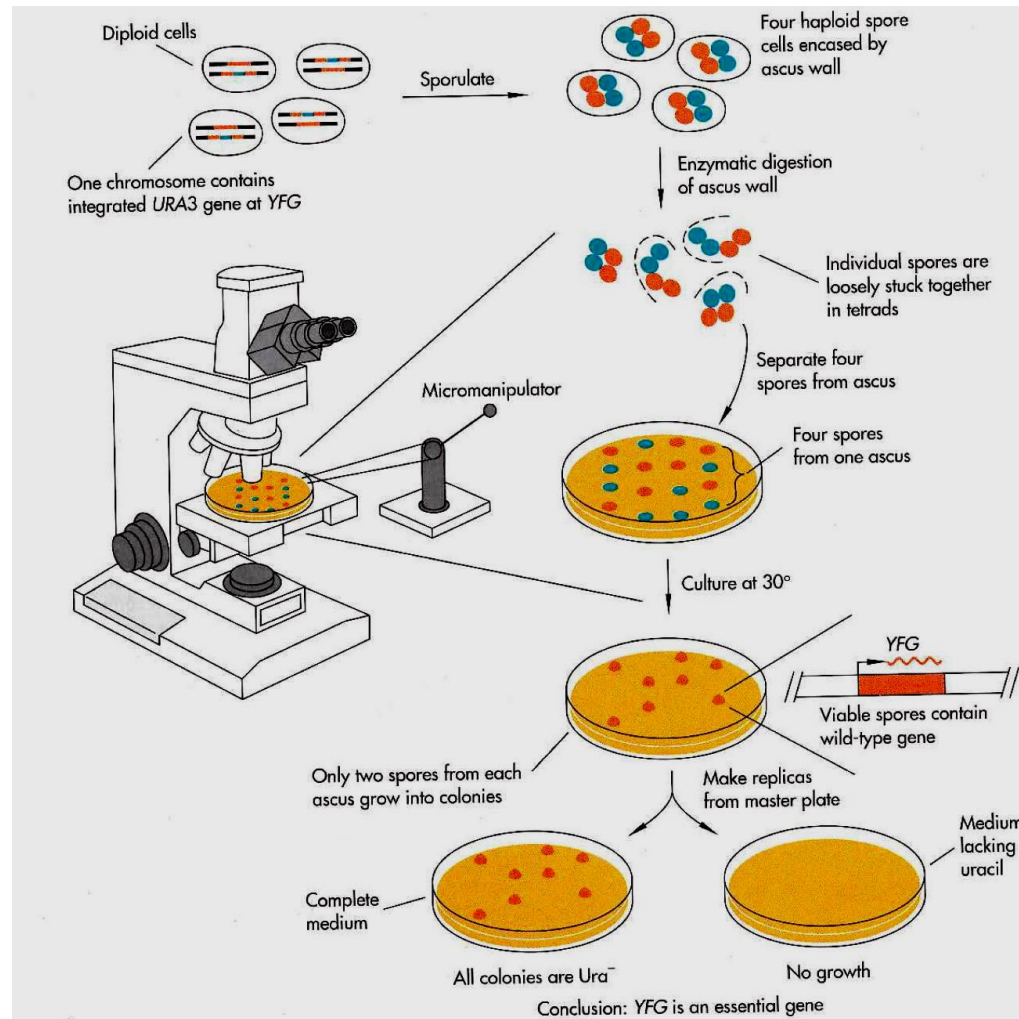
**Pokus prokazuje, že U2 RNA se při sestřihu páruje přímo s intronem.**

# Studium funkce genu po jeho inaktivovaci selekčním markerem

**YFG = your favourable gene**



# Tetrádová analýza: sporulací dochází k separaci mutantní a standardní alely



Spory se nechají klíčit a růst, aby se vytvořily kolonie. Ze čtyř spor dvě ponosou alely standardního typu (*YFG*) a dvě budou mít alelu *YFG* přerušovanou integrovaným genem *URA3*. Pokud je knokautovaný gen esenciální pro růst, vyrostou ze čtyř spor z každé tetrády do kolonií jen dvě, a žádná z nich nebude schopna růst na plotnách bez uracilu (protože gen *URA3* je pouze v knokautované alele).

## Rekombinantní proteiny vytvářené v expresních systémech *S. cerevisiae*

### VACCINES

- Hepatitis B virus surface antigen
- Malaria circumsporozoite protein
- HIV-1 envelope protein

### DIAGNOSTICS

- Hepatitis C virus protein
- HIV-1 antigens

### HUMAN THERAPEUTIC AGENTS

- Epidermal growth factor
- Insulin
- Insulin-like growth factor
- Platelet-derived growth factor
- Proinsulin
- Fibroblast growth factor
- Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
- $\alpha_1$  antitrypsin
- Blood coagulation factor XIIIa
- Hirudin
- Human growth factor
- Human serum albumin



# Kvasinka *Pichia pastoris*

- Má schopnost metabolizovat metanol jako jediný zdroj uhlíku a energie
- Metabolismus metylotrófů umožňuje vytvářet „single-cell“ proteiny – krmivo pro dobytek i člověka bohaté na proteiny



# Heterologní exprese proteinů v metylotrófní kvasince – *Pichia pastoris*

Další druhy: *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*

1. Jednoduché techniky pro genetickou manipulaci u *Pichia*, podobné jako u *S. cerevisiae*.
2. Kultivace za definovaných podmínek včetně velkokapacitní kultivace
3. Schopnost tvořit proteiny ve velkém množství, buď intra- nebo extracelulárně (samy tvoří jen málo vlastních exkretovaných proteinů)
4. Schopnost provádět eukaryotické posttranslační modifikace (glykozylace, tvorba disulfidických můstků a proteolytický procesing).
5. Dostupnost tohoto systému pro komerční účely.

# Vektory pro expresi v *Pichia*

- a) jsou kyvadlové (+ *E. coli*)
- b) mají markery pro *E. coli* a pro kvasinky (ura, his, ade atd)
- c) mají expresní kazetu odvozenou z genu AOX
  - 5'-promotorové sekvence
  - terminátor transkripce
  - mezi promotorem a terminátorem je MCS
- d) u sekrečních vektorů jsou signály z kyselé fosfatázy (PHO) nebo alfa-MAT (**pro transport jsou někdy využívány chaperony**)

## Hostitelské kmeny:

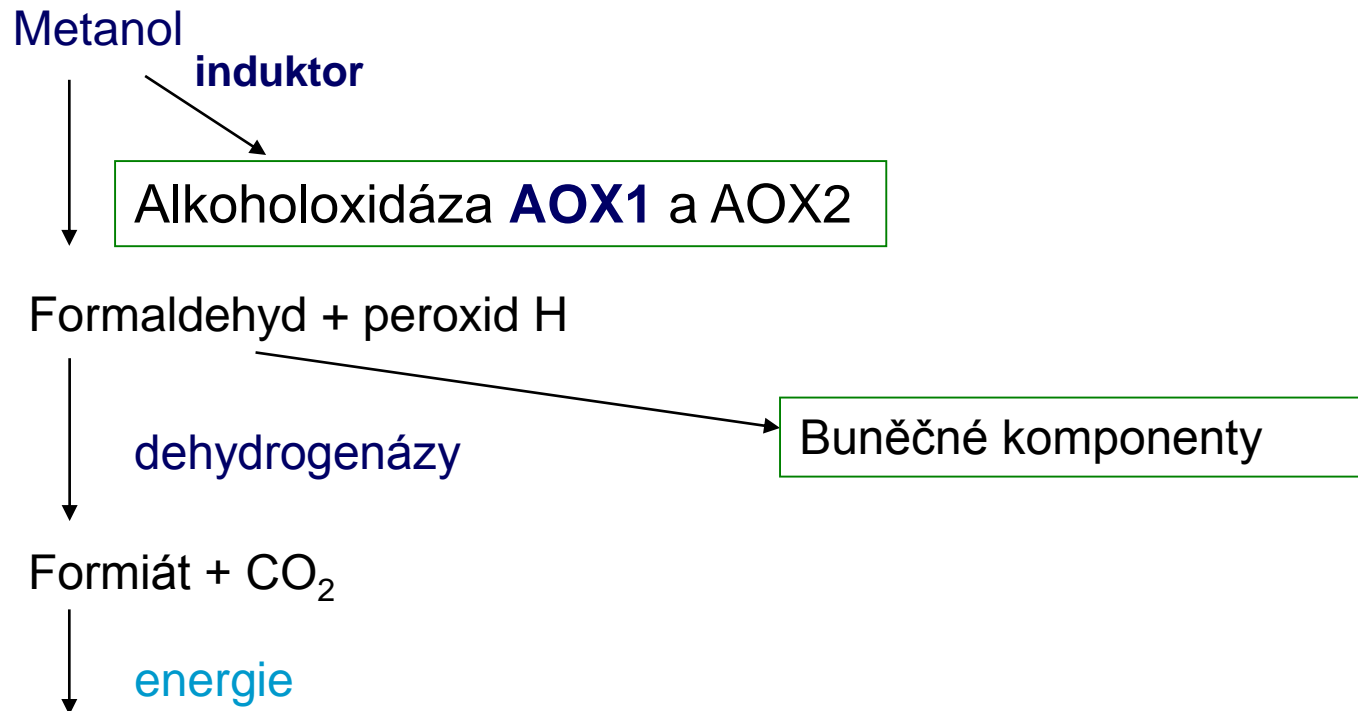
- nesou auxotrofní mutace pro selekci vektorů
- jsou proteáza deficientní

Expresní vektory jsou často inzertovány do chromozomu

## Vektory s vícenásobnou kopií cizorodého genu

- a) kopie genu uspořádány „hlava k patě“
- b) vektor obsahující gen kanR – amplifikace pomocí G418

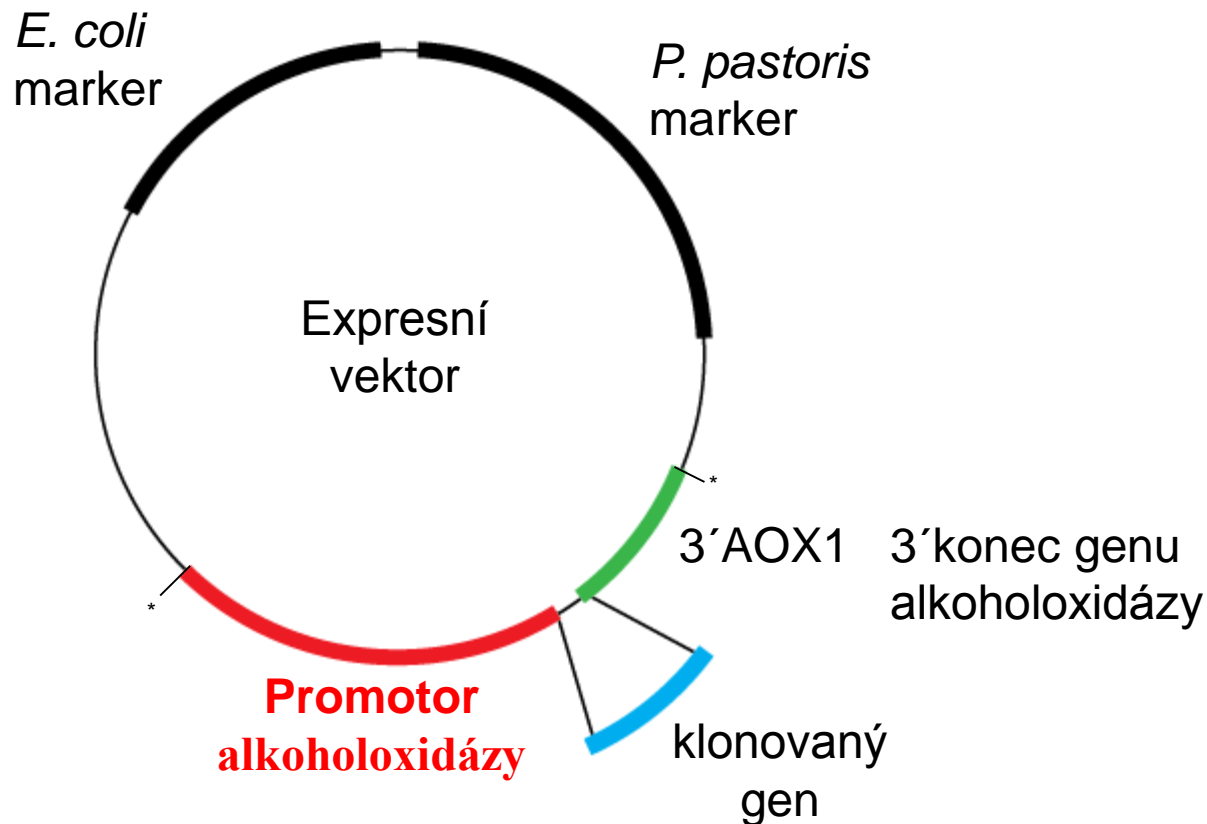
# Metabolizmus metanolu



Po indukci metanolem je 5 % transkriptů tvořeno genem pro alkoholoxidázu, která dosahuje až 30 % všech proteinů v buňce. Exprese klonovaných genů se zvýší až 1000x.

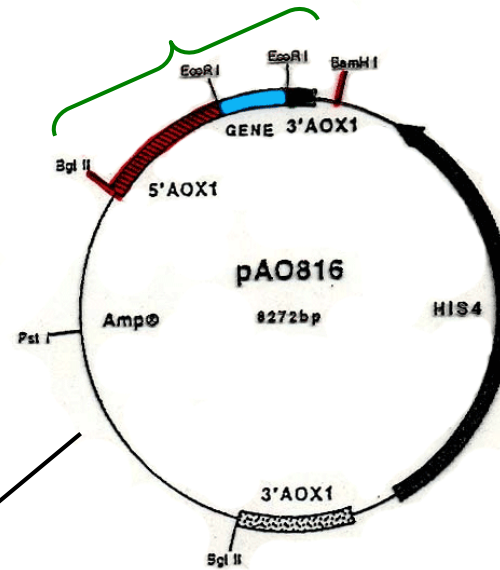
V přítomnosti jiných substrátů (glukóza, glycerol, etanol) je hladina AOX nízká – promotor je přísně regulován (nepropouští)

# Expresní vektor *P. pastoris*

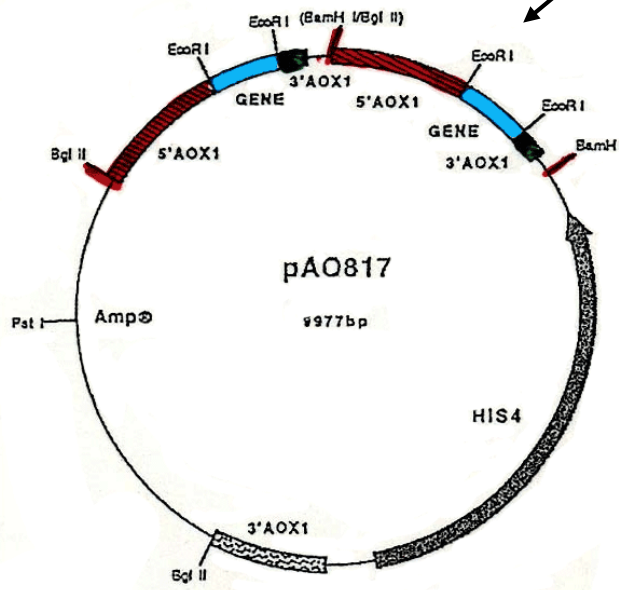


Geny jsou klonovány za silný metanolem indukovatelný promotor genu alkoholoxidázy (AOX1) vložený do expresních vektorů. Syntéza proteinu je spouštěna přidáním metanolu do média, které neobsahuje jiný zdroj uhlíku - metanol tak tvoří jediný zdroj uhlíku

# Konstrukce vektorů s kopiemi expresní kazety

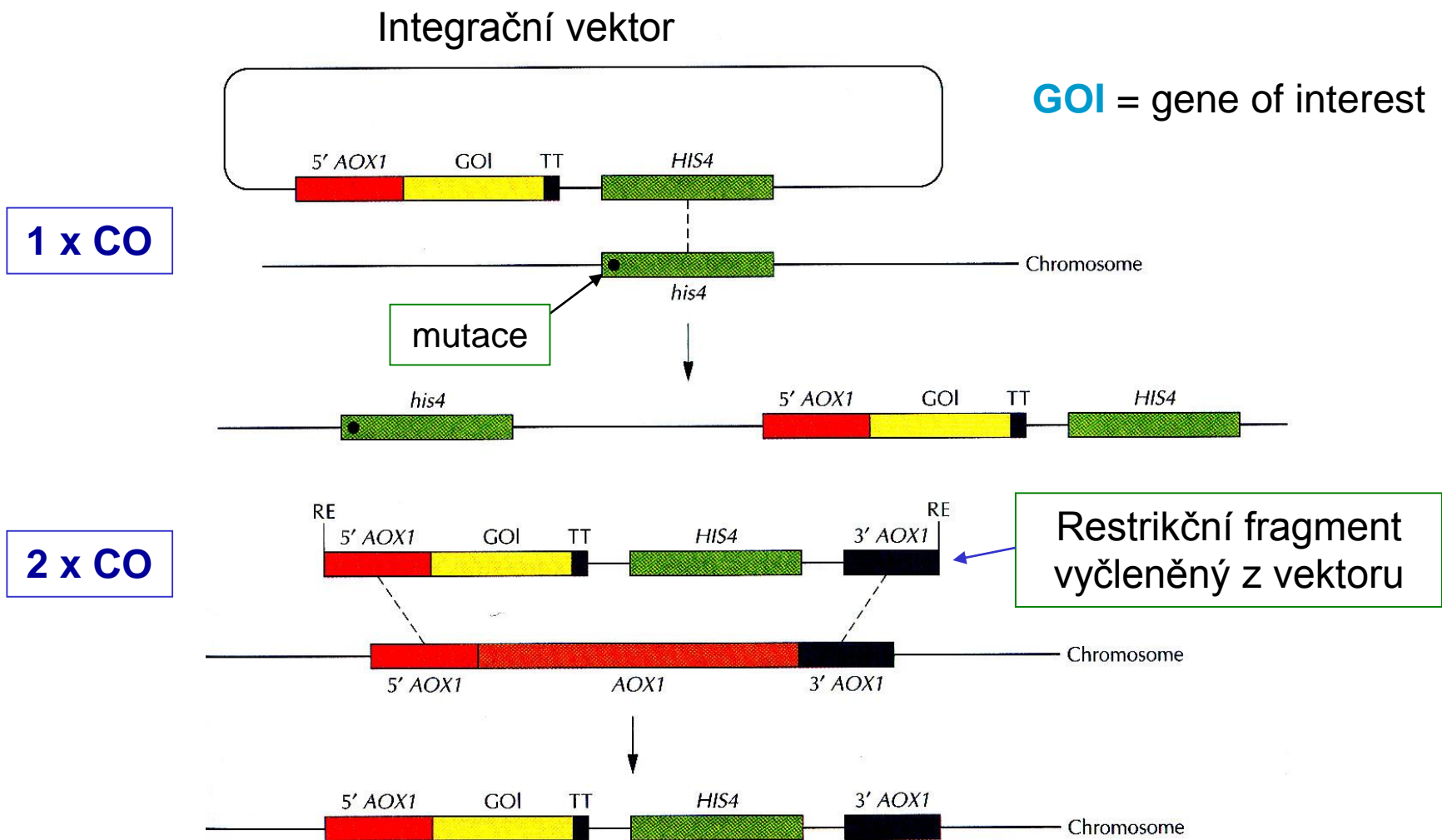


Inserce fragmentu BglII-BamHI do místa BamHI vektoru pAO816

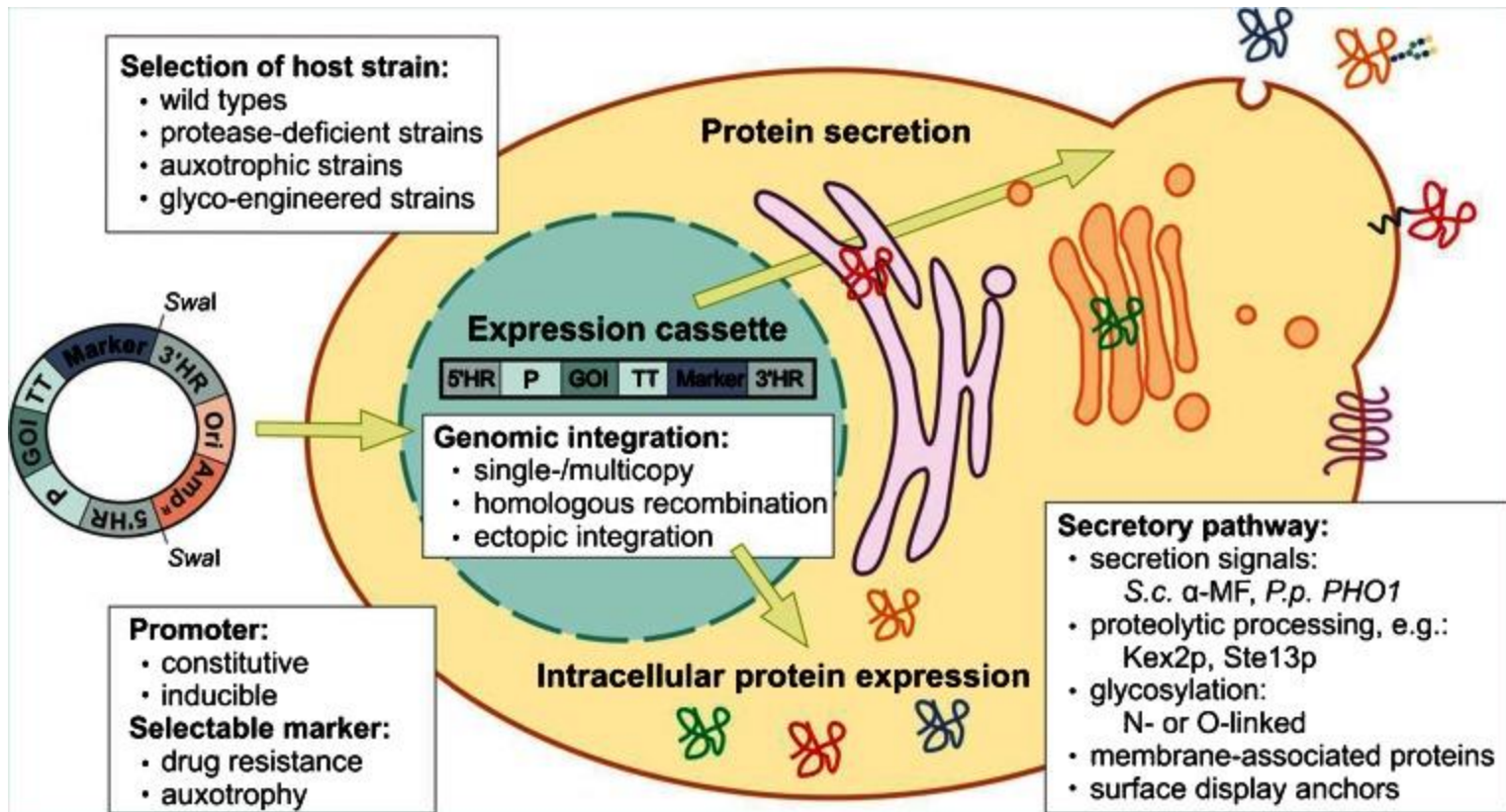


**Další selekční marker:  
rezistence ke kanamycinu  
(geneticinu) – selekce buněk se  
zvýšenou rezistencí =  
spontánní amplifikace kazety,  
vyšší výtěžky produktu**

# Začlenění genu klonovaného v integračním vektoru do specifického místa chromozomu *P. pastoris*



# Heterologní exprese genů v *P. pastoris*



5'HR, 3'HR – úseky homologie s chromozomem pro začlenění kazety



# Table 3: Heterologous proteins expressed in *P. pastoris*

## Protein

## Comments: mode, amount, Reference signal sequence

### Bacteria

<i>Bacillus licheniformis</i> $\alpha$ -amylase	S, 2.5 g l <sup>-1</sup> , SUC2	[51,60]
<i>Bacillus steurothermophilus</i> D-alanine carboxypeptidase	S, 100 mg l <sup>-1</sup> , native	[61]
<i>Bordetella pertussis</i> pertussis pertactin (P69)	I, 3 g l <sup>-1</sup>	[62]
<i>Clostridium botulinum</i> neurotoxin (BoNT) serotype A and B	I, 78 mg l <sup>-1</sup>	[63]
<i>Clostridium botulinum</i> neurotoxin heavy chain fragment, serotype B	I, 390 $\mu$ g g <sup>-1</sup>	[64]
<i>Clostridium botulinum</i> neurotoxin serotype A binding domain	I, 2.4 mg total	[65]
<i>Clostridium tetani</i> tetanus toxin fragment C	I, 12 g l <sup>-1</sup>	[66]
<i>Escherichia coli</i> acid phosphatase/phytase (appA2)	S, 28.9 U mg <sup>-1</sup>	[67]
<i>Escherichia coli</i> $\beta$ -galactosidase	I, 2.0 $\times$ 10 <sup>3</sup> U mg <sup>-1</sup>	[7]
<i>Escherichia coli</i> $\beta$ -lactamase	I	[20]
<i>Leishmania major</i> cathepsin B-like protease	S, $\alpha$ -MF	[68]
<i>Staphylococcus aureus</i> staphylokinase	S, 50 mg l <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF	[69]
<i>Streptococcus equisimilis</i> streptokinase	I, 77. mg l <sup>-1</sup>	[70]
<i>Streptomyces</i> subtilisin inhibitor	S	[71]
<i>Streptomyces viridosporus</i> T7A peroxidase, endoglucanase	S, 2.47 g l <sup>-1</sup> total protein, $\alpha$ -MF	[72]
<i>Toxoplasma gondii</i> SAG1 antigen	S, 12 mg l <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF	[73]
<i>Vibrio cholerae</i> accessory cholera enterotoxin (Acc)	S, 7 mg l <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF	[74]
<b>Fungi</b>		
<i>Alternaria</i> Alt 1 allergen	S, $\alpha$ -MF	[75]
<i>Aspergillus awamori</i> glucoamylase	S, 400 mg l <sup>-1</sup> , native	[76]
<i>Aspergillus awamori</i> glucoamylase catalytic domain	S, 400 mg l <sup>-1</sup> , PHO1	[47]
<i>Aspergillus fumigatus</i> catalase L	S, 2.3 g l <sup>-1</sup> , PHO1	[77]
<i>Aspergillus fumigatus</i> dipeptidyl peptidase IV (DPP IV)	S, PHO1	[78]
<i>Aspergillus fumigatus</i> dipeptidyl peptidase V (DPP V)	S, 0.15 mg l <sup>-1</sup> , PHO1	[79]
<i>Aspergillus giganteus</i> $\alpha$ -sarcin ribotoxin	S, 1 mg l <sup>-1</sup> , synthetic native, PHO1	[43]
<i>Aspergillus niger</i> phytase (phyA)	S, 65 U ml <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF	[80]
<i>Candida guilliermondii</i> xylose reductase gene (xylI)	I, 0.65 U mg <sup>-1</sup> ; S, 0.18 U mg <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF	[81]
<i>Candida rugosa</i> lipase I (CRL)	S, 150 U ml <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF	[42]
<i>Fusarium solani</i> pectate lyase (pelC)	S, 1 mg l <sup>-1</sup> , PHO1	[82]
<i>Fusarium solani</i> pectate lyase (pelD)	S, native	[83]
<i>Geotrichum candidum</i> lipase isoenzymes	S, 60 mg l <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF	[84]
<i>Phytophthora cryptogea</i> $\beta$ -cryptogein	S, 45 mg l <sup>-1</sup> , PHO1	[85]
<i>Rhizopus oryzae</i> lipase	S, 60 mg l <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF	[86]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> invertase	S, 2.5 g l <sup>-1</sup> , native	[30]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ktr1p	S, 400 mg l <sup>-1</sup> ; PHO1	[87]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ( $\alpha$ -1,2-mannosyltransferase)	S, 40 mg l <sup>-1</sup> , PHO1	[87]
<i>Schizophyllum commune</i> vitamin B2-aldehyde-forming enzyme	S, 120 mg l <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF	[88]
<i>Trametes versicolor</i> (white rot fungus) laccase (lccI)	S, native and $\alpha$ -MF	[89]
<i>Trichoderma harzianum</i> $\beta$ -(1-6)-glucanase	S, 9.3 mg l <sup>-1</sup>	[90]

I = intracelulární,  
S = sekretovaný

# Table 3: Heterologous proteins expressed in *P. pastoris*

Protein	Comments: mode, amount, signal sequence	Reference
<b>Protists</b>		
<i>Chondrus crispus</i> red alga hexose oxidase	I	[91]
<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i> red alga $\alpha$ -1,4-glucan lyase (GLq1)	I	[92]
<i>Plasmodium falciparum</i> merozoite surface protein 1 (MSP-1)	S, 24 mg l <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF	[93]
<i>Plasmodium vivax</i> apical membrane antigen I (AMA-1)	S, 50 mg l <sup>-1</sup> , PHO1	[94]
<i>Reticulomyxa filosa</i> (giant freshwater amoeba) $\alpha$ 2, $\beta$ 2 tubulin isoforms	I, 400 $\mu$ g g <sup>-1</sup>	[95]
<i>Trypanosoma cruzi</i> acid $\alpha$ -mannosidase	S, 11.5 $\mu$ g l <sup>-1</sup> , native	[96]
<b>Plants</b>		
<i>Allium sativum</i> (garlic) alliin lyase	I, 2.167 U g <sup>-1</sup>	[97]
<i>Arabidopsis thaliana</i> NADH:nitrate reductase	I, 18 $\mu$ g g <sup>-1</sup>	[98,99]
Barley ( <i>Hordeum vulgare</i> ) sucrose fructan 6-fructosyl transferase	S, $\alpha$ -MF	[100]
Barley $\alpha$ -amylase 1	S, 50 mg l <sup>-1</sup> , native	[48]
Barley $\alpha$ -amylase 2	S, 1 mg l <sup>-1</sup> , native	[48]
Barley aleurone tissue $\alpha$ -glucosidase	S, $\alpha$ -MF	[101]
Coffee bean $\alpha$ -galactosidase	S, 400 mg l <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF	[102]
<i>Cynara cardunculus</i> (cardoon) cyprosin	S, 1 mg l <sup>-1</sup> , native	[103]
<i>Cynodon dactylon</i> (Bermuda grass) Cyn d I	S, 1.5 g l <sup>-1</sup> , PHO1	[104,105]
<i>Galanthus nivalis</i> agglutinin	S, PHA-E	[45]
<i>Hevea brasiliensis</i> hydroxynitrile lyase	I, 22 g l <sup>-1</sup>	[106]
<i>Hevea brasiliensis</i> Hev b 7 patatin-like allergen	S, 10 mg l <sup>-1</sup> , $\alpha$ -MF	[107,108]
Maize cytokinin oxidase	S, native	[109]
Oat phytochrome A, phA	I, 30 $\mu$ g g <sup>-1</sup>	[110,111]
Oat phytochrome A, phyA65 apoprotein	I, 20 $\mu$ g g <sup>-1</sup>	[112]

**I = intracelulární,**  
**S = sekretovaný**

