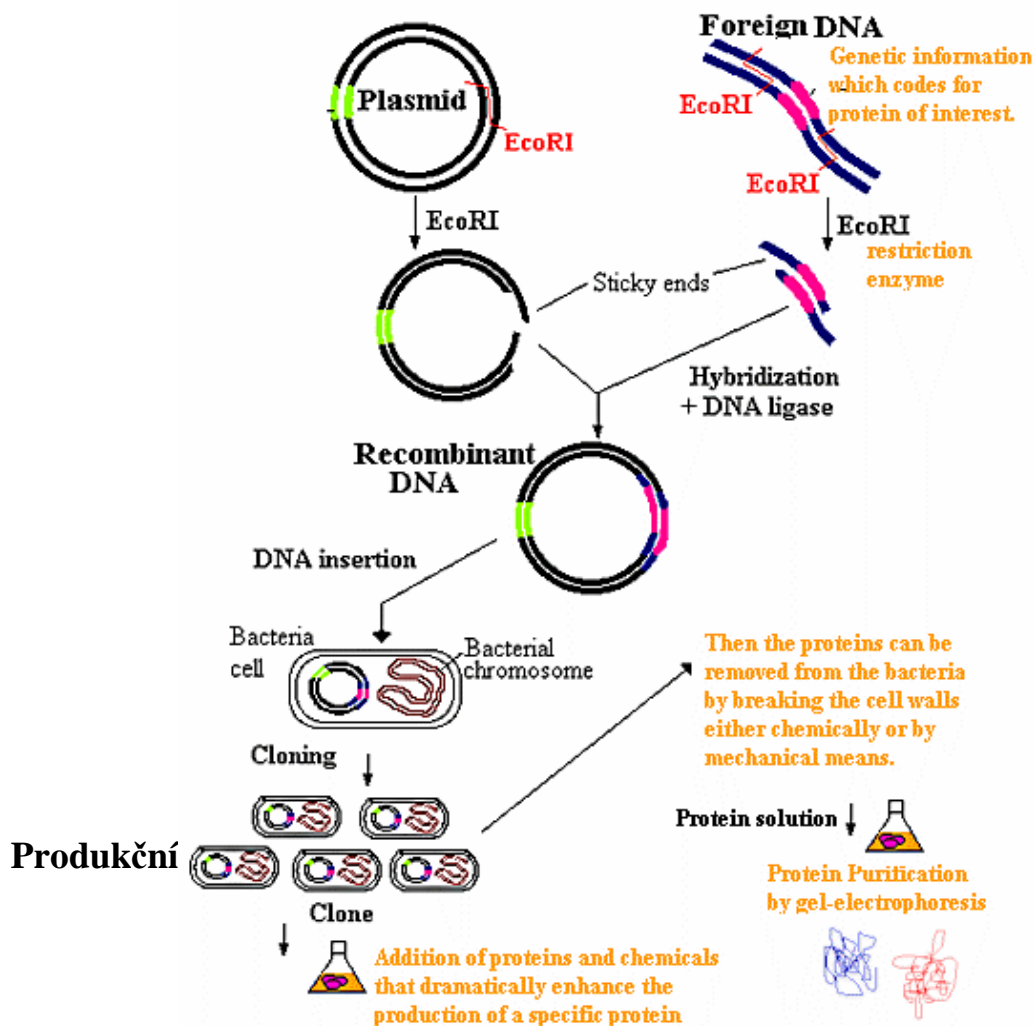


5a. Produkce rekombinantních proteinů v kvasinkách *Pichia pastoris*

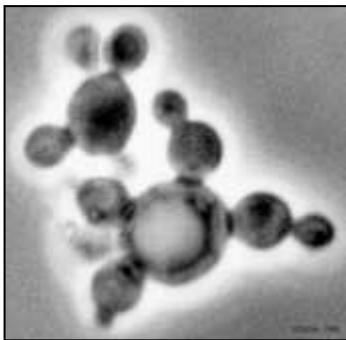
Přenosu DNA do hostitelských buněk lze také využít k tvorbě produktů přenášených genů – a to často ve velkém množství. Nejčastěji jsou využívány bakterie *Escherichia coli*, které jsou výhodné pro svou nenáročnost, velké výtěžky produktů i jednoduchou manipulaci v průmyslových měřítcích. Zásadní nevýhoda prokaryot jako producentů exogenních proteinů spočívá především v tom, že neumožňují posttranslační modifikace eukarotických proteinů.



Obr. 61. Schéma přípravy rekombinantních proteinů v bakteriích.

→ http://www.genome.gov/DIR/VIP/Learning_Tools/genetic_illustrations.html

Tento problém odstranilo zavedení eukaryotických modelových systémů - zejména kvasinek. Protože běžné druhy *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosaccharomyces pombe* neobsahují vhodný silný a indukovatelný promotor, bylo nutné najít takový druh, který bude splňovat tyto předpoklady. Tím se stala v 80. letech metylotrofní kvasinka *Pichia pastoris*. V případě, že živné médium neobsahuje jiný zdroj uhlíku než metanol, aktivuje se promotor genu pro alkohol oxidázu 1/2 (AOX1/2). Pokud je pod kontrolou tohoto promotoru zařazený jiný gen, dochází k jeho silné expresi. Další výhody *P. pastoris* spočívají ve schopnosti dosahovat vysokých hustot (>150g suché hmotnosti/l), jednoduché genetické manipulaci pomocí metodami známých z biologie *S. cerevisiae* a navíc díky síle a specifitě AOX promotoru existuje i možnost průmyslového využití.



Obr. 62. *Pichia pastoris*

→ <http://www.fz-juelich.de/ibt/ferm/curvers.html>

→ www.biochemistry.tugraz.at/GD/Pichia.gif

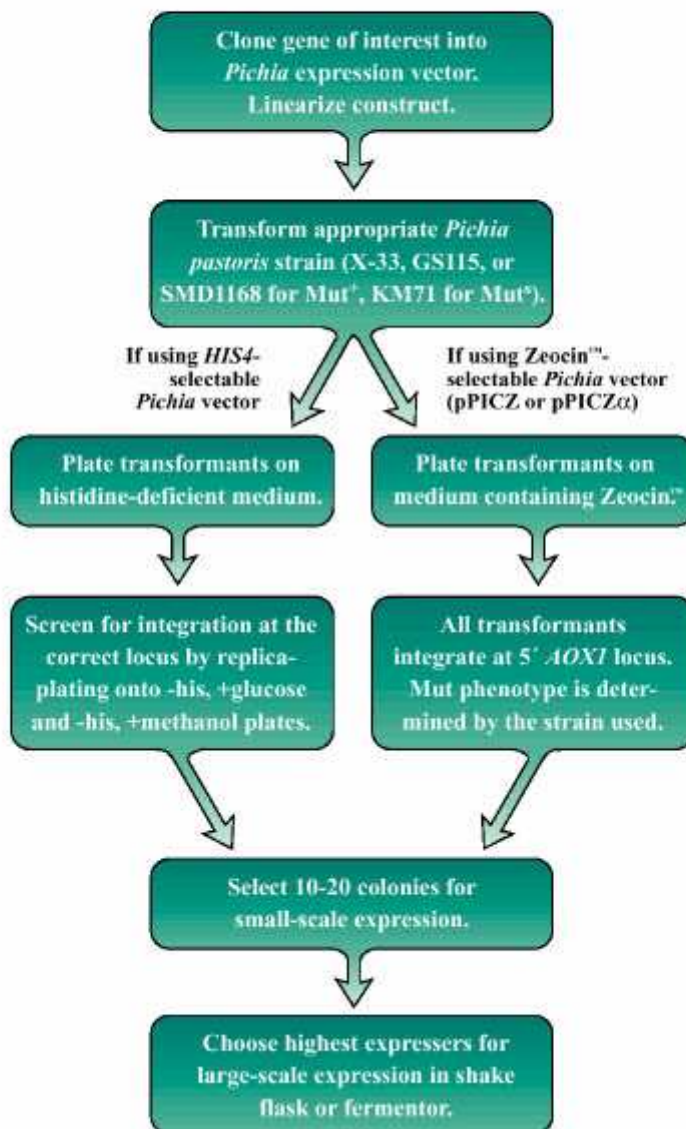
→ www.invitrogen.com

Principy použití *P. pastoris* shrnul J. A. Gatehouse

→ http://silver-server.dur.ac.uk/Teaching/Expression_Systems/Menu.html

HETEROLOGOUS EXPRESSION SYSTEMS FOR PROTEINS

Figure 1 - Flowchart of Expression in *Pichia pastoris*

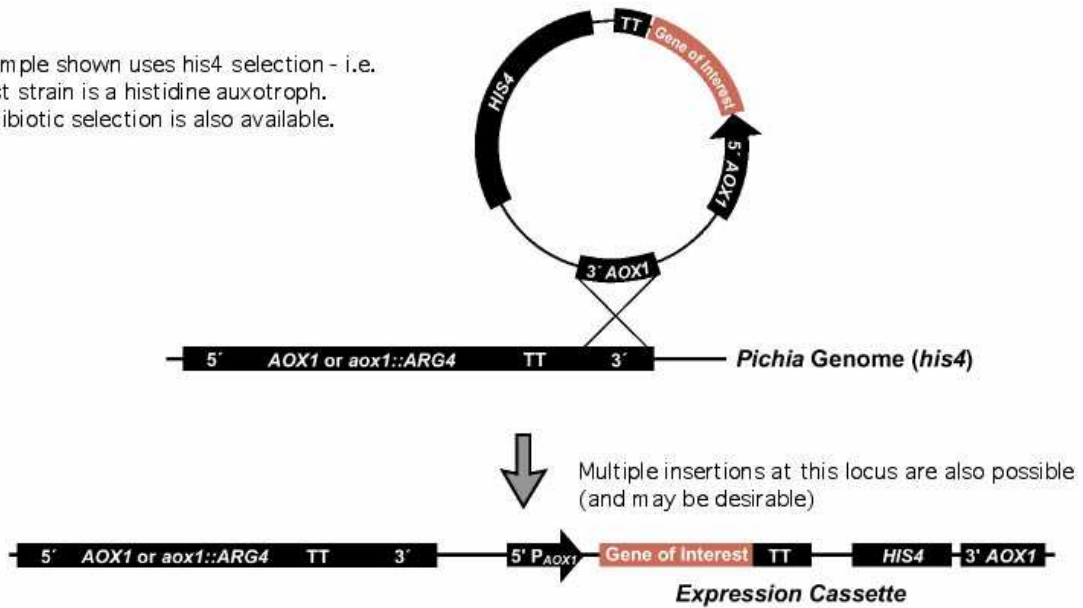


Obr. 63. Postup tvorby rekombinantního proteinu v *P. pastoris* (Gatehouse)

HETEROLOGOUS EXPRESSION SYSTEMS FOR PROTEINS

Modern expression vector systems for *Pichia* are **integrating plasmids** - that is, they are designed to integrate the expression construct containing the desired gene (and a selectable marker) into the host genome by a recombination event. The resulting transformant is stable.

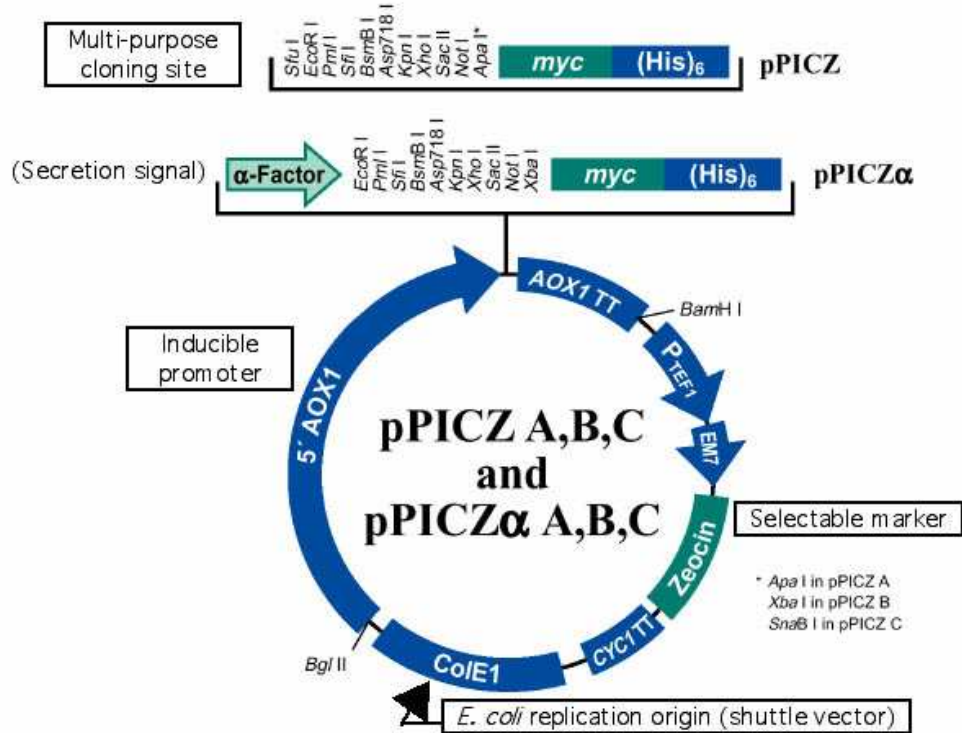
Example shown uses his4 selection - i.e. host strain is a histidine auxotroph. Antibiotic selection is also available.



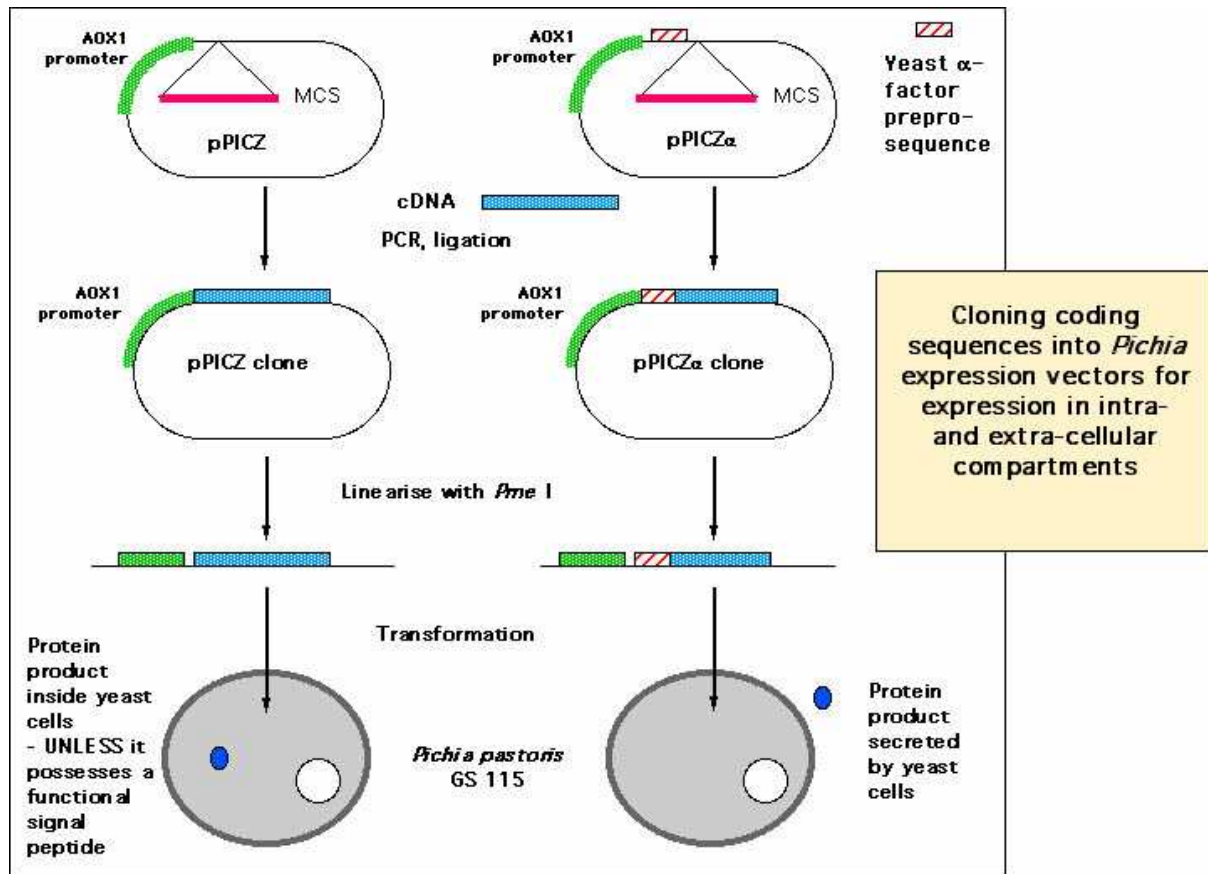
Obr. 64. Příprava expresní kazety (Gatehouse).

HETEROLOGOUS EXPRESSION SYSTEMS FOR PROTEINS

A *Pichia* expression vector:



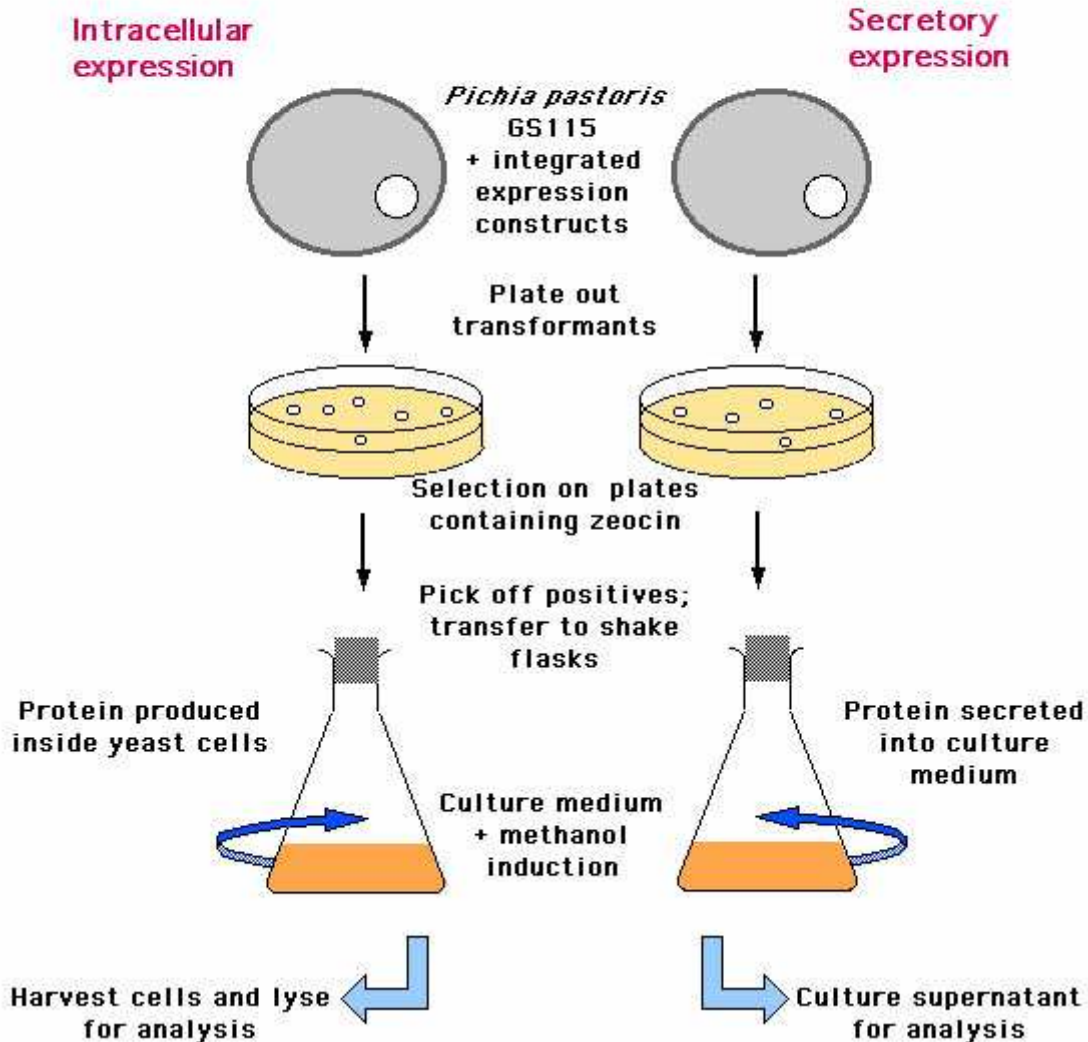
Obr. 65. Příprava vektoru pro přípravu rekombinantních kvasinek (Gatehouse).



Obr. 66. Začlenění regulační sekvence pro signální peptid umožňuje transport vytvořeného proteinu mimo buňku do vnějšího prostředí, což výrazně usnadňuje jeho purifikaci (Gatehouse).

HETEROLOGOUS EXPRESSION SYSTEMS FOR PROTEINS

Expression of constructs in *Pichia*

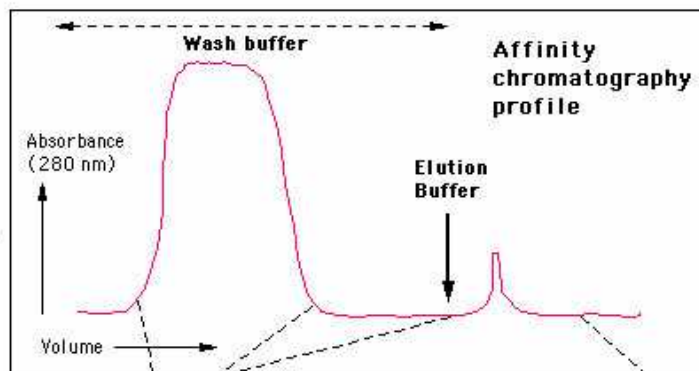


Obr. 67. Schéma produkce rekombinantních proteinů. Kvasinky jsou kultivovány v přítomnosti glycerolu (médiu BMGY) nebo jiného zdroje uhlíku do dosažení optimální hustoty. Poté je médium zaměněno za jiné, obsahující jako zdroj uhlíku metanol (tzv. BMMY). Dochází k aktivaci AOX promotoru a zahájení exprese genu, který byl za něj začleněn (Gatehouse).

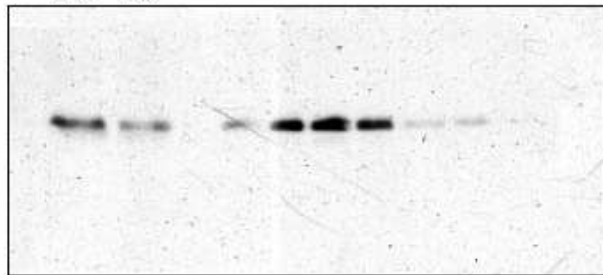
HETEROLOGOUS EXPRESSION SYSTEMS FOR PROTEINS

Proteins expressed in *Pichia* and secreted into culture supernatant are soluble and fully functional

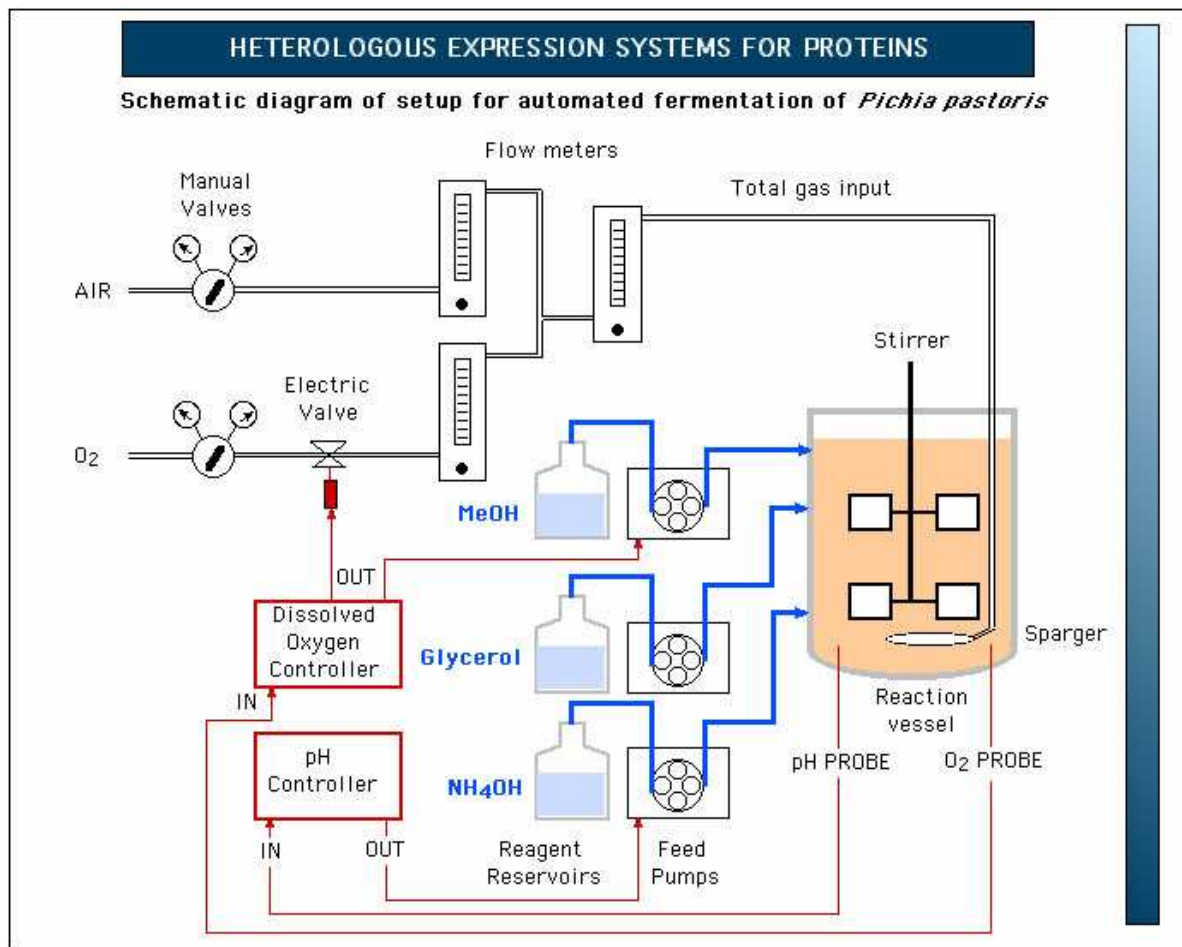
Affinity chromatography of carbohydrate-binding protein; column contains immobilised carbohydrate, i.e. binding depends on protein being functional



Western blot probed with antiserum to protein

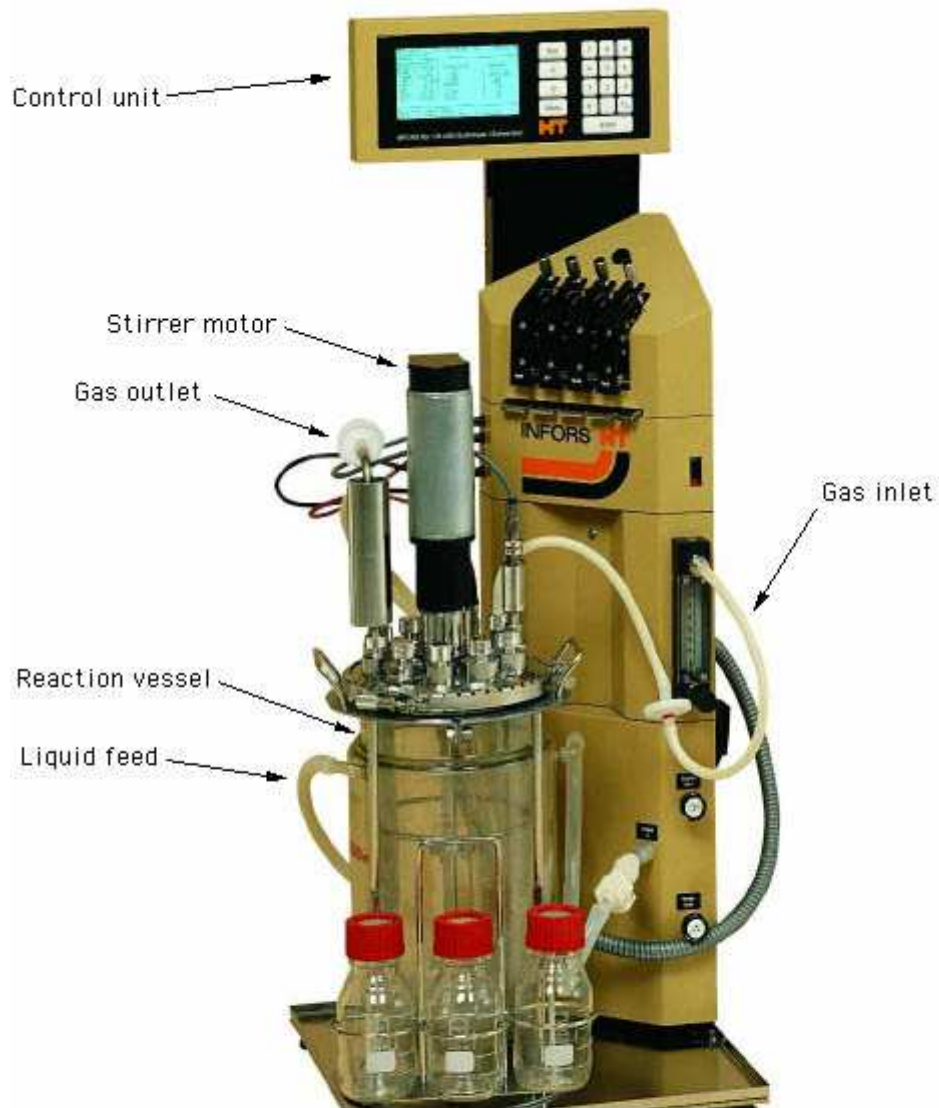


Obr. 68. Analýza získaného produktu – nejčastěji je využívána chromatografie, případně westernový blotting (Gatehouse).



Obr. 69. Výhodou produkce proteinů v *P. pastoris* je i možnost vytvoření automatického fermentačního provozu (Gatehouse).

**A Commercial Laboratory-Scale Fermenter
suitable for *Pichia pastoris***



This lab-scale fermentation apparatus is suitable for volumes from 500ml - 3 litres; the equipment enables temperature, pH and dissolved oxygen concentration to be continuously monitored. Fermentation can be optimised by maintaining optimal pH and oxygen concentration, and feeding carbon source (glycerol) and inducer (methanol) at optimal rates.

(With thanks to Infors AG)

Obr. 70. Komerčně dodávaný laboratorní bioreaktor (fermentor).

5b. Příprava rekombinantního proteinu sRANKL (solubilní RANKL) pomocí kvasinek *P. pastoris*

Použité roztoky:

1. Yeast extract/peptone

10g YE + 20g Peptonu do 700ml H₂O, autoklávovat 20min/liquids

Uchování: 4°C/2měsíce

2. 1M K₂HPO₄/KH₂PO₄

132ml 1M K₂HPO₄ + 868ml 1M KH₂PO₄, pH = 6 (H₃PO₄/KOH) autoklávovat 20min/liquids

Uchování: RT/1rok

3. 10X Yeast-Nitrogen Base

134g YNB /s (NH₄)₂SO₄, bez aminokyselin/ do 1l H₂O sterilizovat filtrací

Uchování 4°C/1rok

4. 500X Biotin

20mg biotinu do 100ml H₂O, sterilizovat filtrací

Uchování 4°C/1rok

5. 10X Glycerol (GY)

50ml Glycerolu do 450ml H₂O, autoklávovat

Uchování měsíce-rok

6. 10X Methanol

5ml methanolu do 95ml H₂O, sterilizace filtrací

Uchování: 4°C/2měsíce

BMGY

700ml YE/peptone (RT)

100ml 1M K₂HPO₄/KH₂PO₄

100ml 10X YNB

2ml 500X Biotin

100ml 10X GY

Uchování: 4°C/2 měsíce, lépe ale připravit vždy čerstvé

BMMY

700ml YE/peptone (RT)

100ml 1M K₂HPO₄/KH₂PO₄

100ml 10X YNB

2ml 500X Biotin

100ml 10X Methanol

Postup:

Fáze proliferace:

Zahájit 6 minikultur v 6ml BMGY v 50ml zkumavkách Falcon
Kultivace ON/300rpm/30°C

Následující den kultivace 6X 200ml z 6 minikultur v 1l Erlenmayer. baňkách nebo 3X 400ml ze 3minikultur v 2l Erlenmayer. Baňkách.

Změřit OD t0/600nm, kultivovat 300rpm/30°C ON. Populace se zdvojnásobí každé 4hod.

Následující den odebrat alikvot, zředit jej 5X nebo 10X podle kultury, změřit OD_{600nm}, musí být mezi 0,5-1, optimum 0,8

Fáze indukce:

Cfg. 15min/4°C/4000rpm ve sterilních zkumavkách. Kultury jsou v indukčním médiu 5X koncentrované, tedy pelet z 200ml kultury resuspendovat ve 40ml BMMY v 500ml Sterilní Erlenm. baňce. Kultivace 30°C/400rp/24hod.

Získání rekombinantních proteinů: (sRANKL)

Cfg. kultury 15min/4°C/400rpm

Dialyzovat supernatant proti 5l PBS ON-24 hod./4°C (promíchávat)

Případně dialyzovat proti 5l Alpha-MEM (promíchávat) 12hod.

Filtrovat 0.22µm, alikvotovat