

MIKROBIOLOGIESE PRODUKSIE VAN L-MALAAT

ABRAHAM CHRISTIAAN POTGIETER

B.Sc

**Verhandeling voorgelê vir gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die graad
Magister Scientiae in Mikrobiologie in die Fakulteit Natuurwetenskappe van die
Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.**

Studieleier: Prof. P.J Pretorius

Potchefstroom

Januarie 1997

***“God het deur Hom alles geskep wat in die
hemel en op aarde is: alles wat gesien kan word en
alles wat nie gesien kan word nie, ... “***

Kolossense 1:16

Aan my ouers, broer en suster.....

INHOUDSOPGAWE

AFKORTINGSLYS	1
OPSOMMING	4
ABSTRACT	5
 HOOFSTUK 1 : INLEIDING	 6
 HOOFSTUK 2 : LITERATUUROORSIG	 7
2.1 Inleiding	7
2.2 Vorming van L-malaat in lewende selle	7
2.3 Gebruik van L-malaat	8
2.3.1 Voedsel- en drankindustrie	8
2.3.2 Farmaseutiese gebruike	8
2.4 Kommersiële produksie van L-malaat	9
2.5 Biotransformering	10
2.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> fumarase: geen- en proteïenstruktuur	11
2.7 Integreerende rekombinasie van transformering-DNA in <i>S.cerevisiae</i> ..	12
2.8 Doelstelling en benaderingswyse	12
 HOOFSTUK 3 : KLONERING VAN FUM1	 13
3.1 Inleiding	13
3.1.1 Benaderingswyse	13
3.2 Ontwerp van voorvoeders spesifiek vir die FUM1-geen	14
3.3 Isolering van genomiese DNA uit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
3.4 PCR met FUM1-spesifieke voorvoeders	18
3.4.1 Restriksiekartering van PCR-produkte	19
3.5 Klonering van PCR-produkte	21
3.5.1 Suiwering en restriksie-endonuklease behandeling	21
3.5.2 Transformering van <i>E coli</i> DH10B selle	23

3.6	Samevatting	25
HOOFSTUK 4 : INTEGRERENDE REKOMBINASIE		26
4.1	Inleiding	26
4.1.1	Benaderingswyse	27
4.2	Materiaal en metodes	27
4.2.1	Gedeeltelike nukleotiedvolgordebepaling van PCR 2-2	27
4.2.2	Konstruksie van pFUM::HIS3	27
4.2.3	Integrerende rekombinasie van FUM1::HIS3 in <i>S. cerevisiae</i>	27
4.2.4	Sifting van positiewe MMY FUM1::HIS3-klone	30
4.2.5	Komplementering van die fumarasedefek in MMY FUM1::HIS3 deur die plasmiede pACP1 en pACP2	31
4.2.5.1	Groot skaalse bereiding van pACP1- en pACP2-plasmiede	31
4.2.5.2	Transformerings van MMY FUM1::HIS3 en seleksie vir komplementering	31
4.3	Resultate en bespreking	32
4.3.1	Gedeeltelike volgordebepaling van PCR 2-2	32
4.3.2	Konstruksie van pFUM::HIS 3	32
4.3.3	Integrerende rekombinasie van FUM1::HIS3 in <i>S.cerevisiae</i>	32
4.3.4	Sifting van MMY FUM1::HIS3-klone deur PCR	34
4.3.5	Komplementering van die respiratoriese defek in MMY FUM1::HIS3 deur die plasmiede pACP1 en pACP2	34
4.4	Samevatting	37
HOOFSTUK 5 : UITDRUKKING VAN DIE FUM1-GEEN EN BIOTRANSFORMERING VAN FUMAARSUUR NA L-MALAAT		38
5.1	Inleiding	38
5.1.2	Benaderingswyse	39

5.2	Materiaal en metodes	39
5.2.1	Induksie van MMY FUM1::HIS3 en W303-1A getransformeer met pACP1 en pACP2	39
5.2.2	Bepaling van fumarase-aktiwiteit	40
5.2.3	SDS-PAGE-analise van totale selproteïen	40
5.2.4	Biotransformering van fumaarsuur na L-malaat	41
5.3	Resultate en bespreking	41
5.3.1	Induksie van fumarase en bepaling van fumarase-aktiwiteit ..	41
5.3.2	SDS-PAGE-analise van totale selproteïen	42
5.3.3	Biotransformering van fumaarsuur na L-malaat	44
5.4	Samevatting	46
HOOFSTUK 6 : BESPREKING		47
6.1	Inleiding	47
6.2	Ontwerp van voorvoeders spesifiek vir die FUM1-geen	48
6.3	Klonering van PCR-produkte	49
6.4	Integrerende rekombinase	50
6.5	Uitdrukking van die FUM1-geen biotransformerng van fumaarsuur na L-malaat	51
6.6	Slotsom	54
LITERATUURVERWYSINGS		55
BEDANKINGS		59

AFKORTINGSLYS

A	Adenien
Amp	ampisillienweerstandbiedendheid
bp	basepare
C	sitosien
°C	grade Celsius
cDNA	polideoksiribonukleotied gesintetiseer onder leiding van RNA-afhanklike DNA-polimerase
CIP	(Eng) Calf intestine phosphatase
ddH2O	gedeïoniseerde hoogsgesuiwerde water
DNA	deoksiribonukleiensuur
dNTP	deoksinukleosiedtrifosfaat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etileendiamientetra-asynsuur
FUM1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -fumarasegeen
G	Guanien
g	gram
GC-inhoud	guaniensitosieninhoud
gDNA	genomiese DNA
g/ml	gram per milliliter
kb	kilobasepaar
kd	kilodalton
l	liter

λ -DNA	faag Lambda-DNA
LiAc	litiumasetaat
M	molêr
mA	milliampere
MDH	malaatdehidrogenase
mg	milligram
MgCl ₂	magnesiumchloried
mg/ml	milligram per milliliter
ml	milliliter
mM	millimolêr
mmol	millimol
mmol/h/g	millimol per uur per gram
mRNA	boodskapperribonukleïensuur
m/v	massa per volume
μ g	mikrogram
μ l	mikroliter
μ mol	mikromol
μ mol/min/mg	mikromol per minuut per milligram
NaCl	natriumchloried
nm	nanometer
OD ₆₀₀	optiese digtheidseenhede by 600 nanometer
opm	omwentelinge per minuut
PAGE	poli-akrielamiedgelëlektroforese
PEG	poliëtileenglikool
PCR	polimerasekettingsreaksie
PMSF	fenielmetielsulfonielfluoried
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i>

R	rand
RNA	ribonukleïensuur
RNase	ribonuklease
SD-medium	synthetische dekstrosemEDIUM
SDS	natriumdodecylsulfaat
SDS-PAGE	PAGE in de aanwezigheid van SDS
T	timien
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA-siklus	tricarbonsuursiklus
TE	Tris/EDTA-buffer
T _m -waarde	smeltingstemperatuur
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminometaan
U	eenheid
U	uracil
UV	ultraviolet
V	volts
v/v	volume per volume
w/v	massa per volume

OPSOMMING

Mikrobiologiese produksie van L-malaat

L-Malaat is van groot belang in die voedsel- en drankindustrie waar dit gebruik word as 'n reguleerder van suurgehalte, preserveermiddels en saamfiksseerder. 'n Unieke gebruik van L-malaat is die behandeling van pasiënte met oorgeërfde metaboliese siektes soos hiperammonemie. Die D-isomeer van malaat kom egter nie in die natuur voor nie. Om hierdie rede is chemies gesintetiseerde DL-malaat nie altyd geskik vir gebruike in die voedsel en farmaseutiese industrieë nie. Aangesien L-malaat nie kommersieël in Suid-Afrika vervaardig word nie, het ons die moontlikheid ondersoek om dit mikrobiologies te produseer deur die gis *Saccharomyces cerevisiae* wat die fumarase-ensiem oorproduseer.

Voorvoeders is ontwerp vir amplifisering van die gisfumarasegeen (FUM1) deur PCR. Vervolgens is die PCR-produkte gekloneer in 'n gisuitdrukkingsektor. Funksionele PCR-klone is geselekteer deur komplementering van 'n *Saccharomyces cerevisiae* respiratories defekte stam wat geskep is deur homoloë rekombinasie van 'n HIS3 onderbreekte FUM1-volgorde. Funksionele PCR-klone is gebruik vir die ooruitdrukking van die fumarase-proteïen in twee verskillende gisstamme. Een van die stamme het 31 keer ooruitdrukking van die fumaraseproteïen getoon. Hierdie stam is gebruik vir die biotransformering van fumaarsuur na L-malaat. Die produktiwiteit van hierdie stam was hoër as die van geïmmobiliseerde *Brevibacterium* spesies wat voorheen gebruik was vir die biotransformering van fumaarsuur na L-malaat.

ABSTRACT

The microbial production of L-malic acid

(Original title: Mikrobiologiese produksie van L-malaat)

L-Malic acid is of great importance in the food and beverage industries where it is being used as an acidulant, preservative and flavour fixative. A unique application of L-malic acid is the treatment of patients with inherited metabolic defects such as hyperammonemia. The D-isomer of malic acid does not occur in nature; for this reason, chemically synthesized DL-malic acid is not always acceptable for food and pharmaceutical use. Since L-malic acid is not produced commercially in South-Africa we investigated the possibility of producing it microbiologically with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* amplified for fumarase.

We designed primers for PCR of the yeast fumarase gene (FUM1). The PCR-products were cloned in an yeast expression vector. Functional PCR-clones were selected by complementation in a *Saccharomyces cerevisiae* respiratory defective strain, created by homologous recombination of a HIS3 deleted FUM1-sequence. Functional PCR-clones were used for overexpression of the fumarase protein in two different yeast strains. One of the strains showed 31-fold overexpression of the fumarase enzyme and was used for bioconversion of fumaric acid to L-malic acid. The productivity of the strain was higher than that of immobilized *Brevibacterium* strains previously used in the bioconversion of fumaric acid to L-malic acid.

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Die L-isomeer van malaat is van belang in die voedsel- en drankindustrie asook in die behandeling van pasiënte met metaboliese afwykings. In die natuur kom slegs die L-isomeer van malaat voor en die D-isomeer is nie geskik vir menslike gebruik nie. L-malaat word nie tans kommersieël in Suid-Afrika vervaardig nie en moet ten duurste ingevoer word. Normaalweg word L-malaat geproduseer deur geïmmobiliseerde bakterieë met hoë fumarase-aktiwiteit of deur geïmmobiliseerde fumarase-ensiem. Alternatiewe weë soos die fermentasie van koolstofbronne deur verskillende *Aspergillus* spesies word ook gebruik. Chemiese sintese van malaat lewer egter 'n rasemaat van DL-malaat. Tans word die beste biotransformering van fumaarsuur na L-malaat verkry deur gis *Saccharomyces cerevisiae* waarin die fumarase-proteïen ooruitgedruk is.

Die doel van hierdie studie is dan om die fumarase-geen van *S.cerevisiae* te kloner in 'n gisuitdrukkingsvektor om sodoende ooruitdrukking van die fumarase-ensiem in *S.cerevisiae* te bewerkstellig sodat die gis gebruik kan word vir die biotransformering van fumaarsuur na L-malaat. In hoofstuk 2 van hierdie studie word 'n literatuuroorsig oor die gebruike en produksie van L-malaat gegee. In al die opeenvolgende hoofstukke word daar 'n oorsig van die literatuur wat op die betrokke hoofstuk van toepassing is gegee. In hoofstuk 3 word die ontwerp van voorvoeders vir PCR en klonering van die FUM1-geen gegee. In hoofstuk 4 word die konstruksie van 'n fumarase defekte gisstam deur homoloë rekombinasie en komplementering van die defek deur PCR-klone beskryf. Hoofstuk 5 handel oor die uitdrukking van die fumarase-geen in gis en biotransformering van fumaarsuur na L-malaat. Die resultate van hierdie studie word in samehang met die literatuur in hoofstuk 6 bespreek.

HOOFSTUK 2

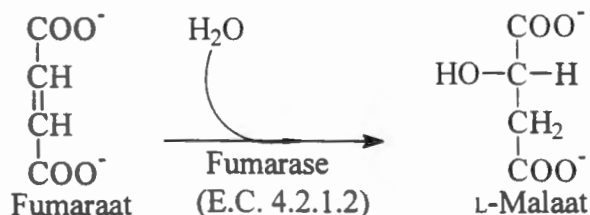
LITERATUUROORSIG

2.1 Inleiding

L-Malaat is 'n intermediêre metaboliet in die trikarboksielsuursiklus van lewende selle (Mathews & van Holde, 1996). Hierdie karboksielsuur is van groot belang in die voedsel- en drankindustrie (Neufeld *et al*, 1991) en het ook 'n unieke toepassing in die behandeling van pasiënte met oorgeërfde metaboliese siektes soos hiperammonemie (Peleg *et al*, 1988). Vir hierdie doeleindes kan slegs die L-isomeer van malaat gebruik word, aangesien die ensieme betrokke in die metabolisme van die mens spesifiek is vir hierdie isomeer (Mathews & van Holde, 1996). Die koste van die L-isomeer van malaat is ongeveer R1500 per kilogram. Dit maak die behoefte aan 'n organisme om L-malaat deur biotransformering te produseer ooglopend. In hierdie hoofstuk word 'n oorsig gegee van die gebruike en produksie van L-malaat waarna die geen- en proteïenstruktuur van die fumarase-ensiem van *Saccharomyces cerevisiae* kortliks bespreek word. Uit hierdie literatuuroorsig word die doelstelling en benaderingswyse vir hierdie studie geformuleer.

2.2 Vorming van L-malaat in lewende selle

L-Malaat word in die trikarboksielsuursiklus van lewende selle gevorm deur die hidrering van die dubbelbinding van fumaarsuur (fumaraat) deur die ensiem fumarase (fumaraathidratase):



Die reaksie is stereospesifiek en slegs die L(S)-isomeer van malaat word gevorm (Voet & Voet, 1995).

2.3 Gebruike van L-malaat

2.3.1 Voedsel- en drankindustrie

L-Malaat word in die drank- en voedselindustrie gebruik as 'n reguleerder van suurgehalte. Hoewel sitroensuur gewoonlik gebruik word, verleen L-malaat egter beter suurgehalte en smaakretensie aan voedsel en drank as ander voedselsure (Neufeld *et al*, 1991). L-Malaat is 'n hoof suurkomponent in sekere vrugtesoorte, veral appels en staan ook bekend as appelsuur en word bygevoeg in konfyte, jellies, roomys, tamatiesous, ingelegde vrugte, piekels en veral in vrugtesappe (Lumyong *et al*, 1990). Ander kommersiële gebruike sluit in die preserving van voedsel met 'n lae soutinhoud, smaakfiksering tesame met aspartaam en gebruike as 'n malaatgebaseerde plastiseerder (Peleg *et al*, 1988).

2.3.2 Farmaseutiese gebruike

L-Malaat word gebruik in die behandeling van pasiënte met metaboliese en lewersiektes (Peleg *et al*, 1988). Hierdie siektes sluit defekte in waar L-malaat of oksaloasetaat in klein hoeveelhede of glad nie gevorm word nie. L-Malaat kan beskou word as die "draer" van oksaloasetaat oor die mitochondriale membraan in eukariote. Met verlaagde vlakke van oksaloasetaat sal die trikarboksielsuursiklus stadiger verloop, wat verlaagde energieproduksie tot gevolg het (Voet & Voet, 1995).

Die TCA-siklus word egter ook verbind aan die ureumsiklus deur die vorming van aspartaat uit oksaloasetaat (Mathews & van Holde, 1996). Indien 'n tekort aan oksaloasetaat dus sou voorkom, sou die ureumsiklus nie doeltreffend enige oormaat stikstof uit die liggaam kan verwyder in die vorm van ureum nie. Hierdie defek, hiperammonemie, het breinskade tot gevolg. Pasiënte met bogenoemde defekte kan egter met L-malaat behandel word om normale vlakke van oksaloasetaat te herstel. Slegs

die L-isomeer van malaat is egter geskik vir menslike gebruik aangesien die D-isomeer 'n inhiberende effek op die ensiem malaatdehidrogenase (MDH) kan hê. Ander gebruike van L-malaat sluit in labaratoriumpraktyke soos die gebruik daarvan in die bepaling van die aktiwiteit van die ensieme, fumarase en malaatdehidrogenase. Die suur word ook gebruik as 'n interne standaard in organiese suur-analises m.b.v gaschromatografie en massaspektrometrie.

2.4 Kommersiële produksie van L-malaat

Die tradisionele metode vir die bereiding van L-malaat is die ekstraksie daarvan uit appelsap, maar appelsap bevat slegs 0,4 tot 0,7% L-malaat, wat dit in vandag se mark onekonomies maak (Peleg *et al*, 1988). Daarom is alternatiewe wyses van bereiding ondersoek en word L-malaat vandag op drie wyses kommersieel geproduseer, naamlik:

1. Chemiese sintese: Dit geskied deur die hidratering van fumaarsuur maar 'n rasemaat van DL-malaat word egter gevorm wat nie geskik is vir menslike gebruik nie (Peleg *et al*, 1988). Duur prosesse is ook nodig om die twee isomere van mekaar te skei.
2. Direkte fermentasie: In hierdie geval word suikeragtige koolstofbronne bv. glukose of nie-suikeragtige bronne soos paraffiene en etanol deur 'n enkele stam of geassosieerde kulture gefermenteer vir die vorming van L-malaat (Peleg *et al*, 1988). Die prosesse het egter die nadeel dat ongewenste byprodukte gevorm word wat moeilik is om van L-malaat te skei.
3. Biotransforming: In hierdie proses word van geïmmobiliseerde fumarase-ensiem of geïmmobiliseerde selle met hoë fumarase-aktiwiteit gebruik gemaak om L-malaat uit fumaarsuur as substraat te vorm (Yamamoto *et al*, 1976; Takata *et al*, 1980). Die voordeel van hierdie prosesse is dat min of geen byprodukte gevorm word nie en dat die reaksie stereospesifiek is.

2.5 Biotransforming

Biotransforming behels die gebruik van mikro-organismes en/of geïsoleerde en gedeeltelik gesuiwerde ensieme vir die omskakeling van gegewe substrate na nuttige produkte. Die voordeel van hierdie benaderingswyse is dat spesifieke isomere van verbindings geproduseer kan word deur stereoselektiewe ensieme (Davies & Green, 1992).

Faktore wat in ag geneem moet word wanneer 'n keuse gemaak moet word tussen mikro-organismes en geïsoleerde ensieme vir biotransforming sluit die volgende in: Mikro-organismes is relatief goedkoop om te kweek en ko-faktore wat nodig is vir ensiemreaksies is teenwoordig. Apparaat vir en kennis van fermentasie word egter benodig. 'n Nadeel met die gebruik van selle is dat ander ensieme van die selle kan inmeng met die spesifieke reaksie of dit selfs domineer wat daartoe lei dat ongewenste byprodukte gevorm word. In die geval van geïsoleerde ensieme is ko-faktore nie teenwoordig nie en moet dikwels bygevoeg word. Geïsoleerde ensieme is ook spesifiek vir 'n geselekteerde reaksie (Davies & Green, 1992).

Wanneer daar egter besluit word om van selle gebruik te maak, moet die volgende in ag geneem word: Die organisme wat gebruik word, moet nie patogenies wees vir mens of dier nie, toksiese byprodukte moet nie gevorm word nie, die organisme moet maklik gekweek en hanteer kan word en daar moet voldoende kennis oor die fermentasie van die betrokke organisme bekend wees.

Die gis *Saccharomyces cerevisiae* is 'n niepatogene organisme en daar is baie bekend oor die fermentasie en metabolisme van die organisme. Die organisme het ook die voordeel dat geen suksiensuur in die biotransforming van fumaarsuur na L-malaat gevorm word nie (Peleg *et al*, 1990). Die selle het egter 'n laer fumarase-aktiwiteit as bakteriese selle wat gebruik word vir L-malaat produksie (Figueiredo *et al*, 1990). Omdat genetiese manipulasie van giste relatief maklik is (Lundblad, 1992), is die

ooruitdrukking van gisfumarase in dié organisme 'n aantreklike moontlikheid om 'n gepaste organisme te verkry vir die produksie van L-malaat vanaf fumaarsuur.

2.6 *Saccharomyces cerevisiae*-fumarase: geen- en proteïenstruktuur

Die geen wat kodeer vir *Saccharomyces cerevisiae*-fumarase (FUM1) is gekloneer deur die komplementering van 'n respiratoriesdefekte gisstam (Wu *et al*, 1987). Dié outeurs het vasgestel dat die geen 'n oop leesraam van 1464 nukleotiede bevat wat kodeer vir 'n proteïen van 488 aminosure.

Daar is egter ook vasgestel dat FUM1 kodeer vir beide die iso-ensieme van fumarase (sitosolies en mitochondriaal). Wu en Tzagoloff (1987) het voorgestel dat dié ensieme getransleer word vanaf twee differensieel getranskriebeerde mRNA-spesies vanaf dieselfde geen. Die langer proteïen, naamlik die mitochondriale fumarase, sou dan 'n ekstra 25 aminosure bevat wat 'n voorgestelde leiervolgorde is vir die oordrag van die isoensiem oor die mitochondriale membraan. Alhoewel die eerste 25 aminosure ses basiese en vyf gehidroksileerde aminosure bevat (kenmerkend van 'n mitochondriale leiervolgorde) het ander outeurs egter waargeneem dat die sitosoliese iso-ensiem groter is as die mitochondriale ensiem, naamlik 53 kilodalton en 48 kilodalton onderskeidelik (Boonyarat en Doonan 1988).

Peleg *et al*, (1990) het die bakteriese *lac Z*-geen gekoppel aan 'n 273 bp fragment van die FUM1 geen wat die voorgestelde koderingsgebied vir die seinpeptiedvolgorde bevat. Hulle het vasgestel dat uitdrukking van die fusieproteïen in *S.cerevisiae*, β -galaktosidase-aktiwiteit in die mitochondria kan lokaliseer. Dit wil dus voorkom of beide die iso-ensieme getransleer word vanaf dieselfde mRNA, maar dat die mitochondriaal geteikende ensiem gevorm word deur verwydering van die voorgestelde seinpeptied. Dit sou die groter sitoplasmiese ensiem verklaar. Die presiese meganisme vir die verspreiding van die twee iso-ensieme tussen subcellulêre kompartemente in *S.cerevisiae* is egter nog nie opgeklaar nie.

2.7 Integreerende rekombinasie van transformerings-DNA in *S.cerevisiae*

'n Groot voordeel van *S.cerevisiae* is die vermoë om die wilde tipe chromosomale kopie van 'n geen te vervang met 'n mutante alternatief wat *in vitro* berei is uit 'n gekloneerde kopie van dié geen. Vir hierdie doel is daar verskeie tegnieke ontwikkel wat almal afhanklik is van homoloë rekombinasie tussen transformerings-DNA en DNA-volgordes van die gisgenoom (Rothstein, 1983).

Hierdie tegnieke kan gebruik word om mutasies onder akkurate *in vivo* kondisies te bestudeer maar ook om geendeleesies in gis teweeg te bring vir die bestudering van sogenaamde "nul fenotipes", waar die geenprodukte totaal afwesig is. Hierdie nul fenotipes kan op hulle beurt weer gebruik word in komplementeringstudies. Nul fenotipes kan ook gebruik word as kontroles in studies oor proteïenuitdrukking en ensiemaktiwiteit.

2.8 Doelstelling en benaderingswyse

L-Malaat word nie kommersieël in Suid-Afrika vervaardig nie en moet dus ten duurste ingevoer word.

Die doelstelling van hierdie studie is om die ooruitdrukking van die fumarase-ensiem in *S.cerevisiae* te bewerkstellig vir die biotransformering van fumaarsuur na L-malaat.

Die volgende benaderingswyse is geformuleer:

- Ontwerp van voorvoeders vir en amplifisering van die gis fumarasegeen (FUM1).
- Klonering van FUM1 in 'n *S.cerevisiae* uitdrukkingsvektor.
- Bereiding van 'n FUM1 defekte mutant deur integreerende rekombinasie in *S.cerevisiae*.
- Seleksie van funksionele PCR-klone deur komplementering in die FUM1-mutant.
- Ooruitdrukking van fumarase in gis en die biotransformering van fumaarsuur na L-malaat.

HOOFSTUK 3

KLONERING VAN FUM1

3.1 Inleiding

Die vermoë om met behulp van PCR mikrogram hoeveelhede van 'n spesifieke DNA-fragment te kan berei, kan die klonering van 'n enkelkopie geen vanaf genomiese DNA baie vereenvoudig. Deur spesifieke voorvoeders te gebruik waarvan die basevolgorde verander is om nuwe restriksie-endonuklease punte te skep, kan klonering van PCR-produkte in enige verlangde vektor bewerkstellig word. Die voordeel van hierdie benaderingswyse is dat die konstruksie en sifting van faag- of kosmiedbiblioteke nie nodig is nie (Scharf, 1990).

Wanneer die PCR-produkte egter in 'n uitdrukkingsvektor vir uitdrukking gekloneer moet word is daar 'n nadeel aan verbonde. Die ensiem *Taq*-Polimerase wat gebruik word vir PCR het nie 3' na 5' eksonuklease-aktiwiteit (proefleesaktiwiteit) nie (Innis *et al*, 1990), wat tot gevolg mag hê dat foute wat in die basevolgorde van PCR-produkte ontstaan, geamplifiseer word. Klonering en uitdrukking van so 'n PCR-produk kan dus 'n niefunksionele of minder funksionele rekombinante proteïen tot gevolg hê.

Hierdie probleem kan egter oorkom word deur gebalanseerde en lae konsentrasies (10 tot 50µM elk) dNTP's te gebruik (Innes *et al*, 1990) asook deur gebruik te maak van termostabiele DNA-polimerases met 3' na 5' eksonuklease-aktiwiteit, byvoorbeeld *Pwo* DNA polimerase (Boehringer Mannheim).

3.1.1 Benaderingswyse

Ten einde ooruitdrukking van FUM1 in *Saccharomyces cerevisiae* te bewerkstellig, is besluit om 'n PCR-produk wat hierdie geen bevat te kloner in 'n hoë kopiegetal gis-uitdrukkingsvektor onder beheer van 'n sterk induseerbare promotor. Vir hierdie doel is voorvoeders spesifiek vir die fumarasegeen van *Saccharomyces cerevisiae* ontwerp vir

amplifisering van die geen deur middel van PCR. Die PCR-produk kan gekloneer word in die multifunksionele kloneringsgebied van 'n gisuitdrukingsvektor onder beheer van 'n sterk induseerbare promotor.

3.2 Ontwerp van voorvoeders spesifiek vir die FUM1-geen

Voorvoeders is ontwerp soos beskryf deur Steyn (1995). Die voorvoeders sluit die volledige ooplesraam van die FUM1-geen in (figuur 3.2). Die verwagte grootte van die PCR-produk met voorvoeders FUMPLUS1 en FUMMIN2 is 1811 basepare en die grootte van die produk met voorvoeders FUMPLUS2 en FUMMIN2 1636 basepare (figuur 3.1). Die volgordes van die voorvoeders is ook so verander dat dit restriksie-endonukleasepunte insluit wat gerigte klonering van die beplande PCR-produk in die uitdrukingsvektor pYES2 (Invitrogen) moontlik sou maak. Die eienskappe van die voorvoeders is soos volg:

FUMPLUS 1

Volgorde : 5'-CGCGAGCTCAAACAAGCATC
CAACAGGAGGCCGG-3'

Restriksie-endonuklease punt : Sac I

Lengte : 34 bp

GC-inhoud : 61,8%

Tm-waarde : 56°C

FUMPLUS 2

Volgorde : 5'-CCATAAAAGTCGAGCTCTTAAACGG-3'

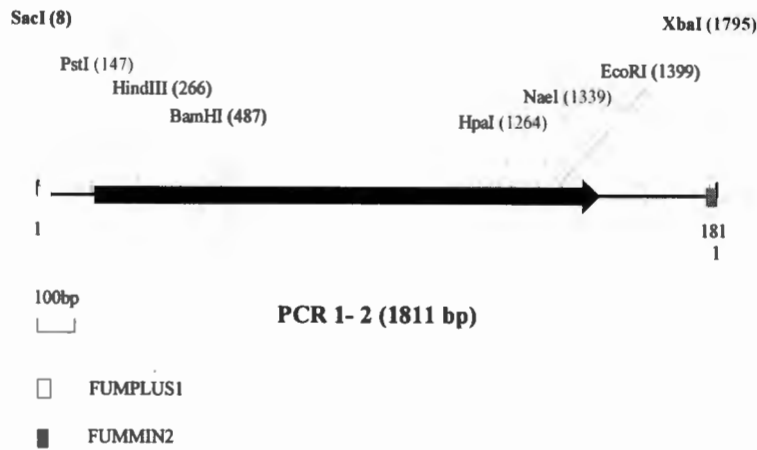
Restriksie-endonuklease punt : Sac I

Lengte : 25 bp

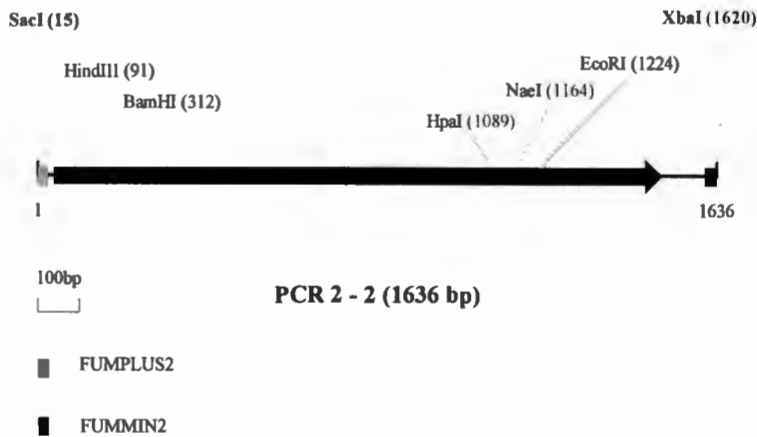
GC-inhoud : 45,7%

Tm-waarde : 55,5°C

A.



B.



Figuur 3.1 Restriksiekaart van FUM1 PCR-produkte A: met voorvoeders FUMPLUS1 en FUMMIN2 (PCR2-1) en B: voorvoeders FUMPLUS2 en FUMMIN2 (PCR2-2) onderscheidelijk

1 ggaatgactacccccgattcccggaatgggcgttcgatgattggctctttcctgtaagcc
ccttactgatggggctaagggccttaccgcgaagctactaaccgagaaaggacatttcgg

FUMPLUS 1 cgc gc c

61 tttttgcgtttcttataggctatatataatcttcactggtt~~gtagacgttaacaagc~~
aaaaacgcaaagaatatccgatatatattagaagtagtgacaacatctgcaatttggttcg

121 ~~atccaacaggaggccgga~~accgaacacacgggggagtgactctagctctttctctgggat
taggttgtcctccggcctggcttgtgtgccccctcactgagatcgagaaagaagacccta

181 attcatatcgtttctccattacatacagtcatttttttgcatttttaaatcgtgacttt
taagtatagcaaagaggtaatgtatgtcagtaaaaaaacgtaaaaaatttaagcactgaaa

FUMPLUS 2

241 tagtactgcagctgttttttttctcacgtcaagaaatt~~ccataaagcttaactattaac~~
atcatgacgtcgacaaaaaaagagtgacgttctttaaggtatttcagattgataatttg

301 ~~gg~~ataagagatacaatc~~ATG~~TTGAGATTTACCAATTGTAGTTGCAAGACTTTTCGTAAAAT
cctattctctatgttagTACAACTCTAAATGGTTAACATCAACGTTCTGAAAGCATTTTA

361 CGTCATATAAGCTTAATATAAGAAGAATGAACTCCTCGTTCAGAACTGAAACCGATGCAT
GCAGTATATTTCGAATTATATTCTTCTTACTTGAGGAGCAAGTCTTGACTTTGGCTACGTA

421 TTGGTGAGATACACGTGCCTGCTGATAAGTACTGGGGTGCCCAAACCTCAAAGATCCTTTC
AACCCTCTATGTGCACGGACGACTATTTCATGACCCACGGGTTTGAGTTTCTAGGAAAG

481 AAAAATTCAAGATTGGTGGCGCTCGTGAAAAGATGCCATTGCCTTTGGTGCATGCATTTG
TTTTGAAGTTCTAACCACCGCGAGCACTTTCTTACGGTAACGGAAACCACGTACGTAAAC

541 GTGTTTTGAAGAAATCTGCCGCGATTGTGAATGAGTCTCTGGGGGATTGGATCCCAAGA
CACAAAACCTCTTTAGACGGCGCTAACACTTACTCAGAGACCCCCCTAACCTAGGGTTCT

601 TCTCCAAGGCTATTCAACAGGCCGCTGACGAAGTGGCTTCTGGTAAGCTAGACGACCACT
AGAGGTTCCGATAAGTTGTCCGGCGACTGCTTCACCGAAGACCATTTCGATCTGCTGGTGA

661 TTCCATTGGTTGTTTTCCAAACGGGTTCGGGTACCCAGTCTAACATGAACGCTAATGAAG
AAGGTAACCAACAAAAGGTTTGCCCAAGGCCATGGGTGAGATTGTAAGTTGCGATTACTTC

721 TTATTTCCAATCGTGCCATTGAGATCCTAGGAGGCAAGATTGGATCTAAACAAGTCCATC
AATAAAGGTTAGCACGGTAACCTTAGGATCCTCCGTTCTAACCTAGATTGTTCAGGTAG

781 CAAACAATCATTGCAACCAATCTCAATCATCCAATGATACTTTCCCCACTGTCGTGCATA
GTTTGTAGTAACGTTGGTTAGAGTTAGTAGGTTACTATGAAAGGGGTGACAGCACGTAT

841 TCGCTGCCAGTTTGCAAATTCAAAACGAGTTGATACCTGAGTTGACCAATTTAAAGAACG
AGCGACGGTCAAACGTTTAAAGTTTGTCTCAACTATGGACTCAACTGGTTAAATTTCTTGC

901 CCCTTGAAGCCAAATCCAAGGAATTTGACCATATTGTGAAGATCGGTAGAACACACTTGC
GGGAACCTTCGGTTTAGGTTCCTTAAACTGGTATAACACTTCTAGCCATCTTGTGTGAACG

961 AAGATGCCACGCCTTTGACACTAGGTCAAGAGTTTTCCGGTTACGTGCAACAAGTTGAGA
TTCTACGGTGCGGAAACTGTGATCCAGTTCTCAAAGGCCAATGCACGTTGTTCAACTCT

1021 ACGGTATCCAAGAGTGGCACATTCTTTGAAAACATTGAGTTTCCGTCACAAAGGTGGTA
TGCCATAGGTTTCTCACCCTGTAAGAACTTTTGTAACTCAAAGGACCGTGTTCCACCAT

1081 CTGCCGTTGGTACAGGGTTGAACACCAAGCCCGGATTTCGATGTCAAGATAGCCGAGCAAA
GACGGCAACCATGTCCCAACTTGTGGTTTCGGGCTAAGCTACAGTTCTATCGGCTCGTTT

1141 TTTCCAAAGAACTGGACTAAAGTTTCAAACCGCCCCTAATAGGTTTCGAGGCTTTGGCTG
AAAGGTTTCTTTGACCTGATTTCAAAGTTTGGCGGGGATTATCCAAGCTCCGAAACCGAC

1201 CTCACGACGCCATTGTCTGAATGTAGCGGTGCTCTAAACACCCTTGCTTGTTCTCTTTTCA
GAGTGCTGCGGTAACAGCTTACATCGCCACGAGATTTGTGGGAACGAACAAGAGAAAAGT

1261 AAATAGCGCAAGATATAAGATACTTAGGGTCCGGGCCACGTTGCGGCTACCATGAACTAA
TTTATCGCGTTCTATATTCTATGAATCCCAGGCCCGGTGCAACGCCGATGGTACTTGATT

1321 TGCTGCCAGAGAATGAACCAGGTTCTCAATCATGCCTGGTAAAGTTAACCCAAACCCAAA
ACGACGGTCTCTTACTTGGTCCAAGGAGTTAGTACGGACCATTTC AATTGGGTTGGGTTT

1381 ACGAGGCATTGACTCAAGTGTGTGTGCAAGTCATGGGTAACAATGCAGCTATCACGTTTG
TGCTCCGTAACTGAGTTCACACACACGTT CAGTACCCATTGTTACGTCGATAGTGCAAAC

1441 CCGGCTCTCAAGGTCAATTTCGAGTTAAATGTCTTCAAGCCAGTCATGATCGTCAATCTAT
GGCCGAGAGTTCCAGTTAAGCTCAATTTACAGAAGTTCCGGTCAGTACTAGCAGTTAGATA

1501 TGAATTCGATCAGGTTAATTACTGATGCCGCATATTCATTTAGAGTGCAGTGTGTTGAAG
ACTTAAGCTAGTCCAATTAATGACTACGGCGTATAAGTAAATCTCACGTGACACAACCTTC

1561 GTATCAAAGCCAATGAGCCTCGTATTCATGAGTTGTTGACTAAATCTTTAATGTTAGTCA
CATAGTTTCGGTTACTCGGAGCATAAGTACTCAACAACCTGATTTAGAAATTACAATCAGT

1621 CCGCTTTGAACCCTAAGATCGGTTATGATGCCGCTTCCAAGGTCGCCAAGAATGCTCATA
GGCGAAACTTGGGATTCTAGCCAATACTACGGCGAAGGTTCCAGCGGTTCTTACGAGTAT

1681 AGAAGGGCATTACCTTGAAGGAAAGTGCATTGGAATTGGGTGTATTGACTGAAAAGGAAT
TCTTCCCGTAATGGAACCTTCCTTTCACGTAACCTTAACCCACATAACTGACTTTTCCTTA

1741 TTGATGAATGGGTTGTTTCCTGAACACATGCTAGGTCCTAAATAAacgagctaaataccta
AACTACTTACCCAACAAGGACTTGTGTACGATCCAGGATTTATTTgctcgatttatggat

1801 ataatatacaagttttttatgtcttattatatgaaggaaaataaggaagtggagagaatt
tattatatgttcaaaaaatacagaataataatacttccttttattccttcacctctcttaa

1861 tgtgattcagcaatggtccctccgctaaggtcccgcctctggcagttatgtcagaagagg
acactaagtcggtaccaggaggcgattccagggcggagaccgtcaatacagtcttctcc
t t g FUMMIN 2

Figuur 3.2 Posities van voorvoeders in die volgorde van FUM 1. Die oopreesraam van die geen word in hoofletters aangedui. Die nukleotiedvolgordes van die onderskeie voorvoeders is onderstreep. Nukleotiedvolgordes wat in die voorvoeders verander is word bo en onder die voorvoeders aangedui. Die inisiasie- en stopkodons van die geen is donker, kursief en onderstreep.

FUMMIN 2

Volgorde	: 5'-CTGACATAGCTTCTAGAGGCCGG ACCT-3'
Restriksie-endonukleasepunt	: Xba I
Lengte	: 27 bp
GC-inhoud	: 55,6%
Tm-waarde	: 62,1°C

3.3 Isolering van genomiese DNA uit *Saccharomyces cerevisiae*

Die gisstam MMY290 (*Mat a ura3 leu2 his3*) is oornag in 20ml YPD-meduim (2% Peptoon, 1% Gisektrak, 2% Glukose) gekweek. Die gisselle is gesedimenteer deur sentrifugering ($2500 \times g$), in 1,5ml TE-buffer (10mM Tris-Cl pH8,0, 1mM EDTA) gesuspendeer en oorgedra na 'n steriele 1,5ml Eppendorfbuis. Die selle is weer gesedimenteer, die supernatant is verwyder en die selle is in 200µl lise-buffer (2% v/v Triton X-100, 1% v/v SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-Cl pH 8,0 1mM EDTA) gesuspendeer. Ongeveer 200µl glasballetjies (0,45mm) is bygevoeg asook 200µl Fenol:Chloroform:Isoamylalcohol (25:24:1). Die buis is vir 3 minute teen maksimum spoed gevortex waarna nog 200µl TE-buffer bygevoeg is. Die buis is hierna vir 5 minute teen 14 000 o.p.m gesentrifugeer. Die supernatant is oorgedra na 'n skoon 1,5ml buis en die DNA is gepresipiteer deur 2,5ml yskoue etanol (-20 °C) by te voeg waarna die buis vir 3 minute teen 14 000 o.p.m. gesentrifugeer is. Die DNA is in 400µl TE-buffer gesuspendeer en 30µl 1mg/ml RNase A is bygevoeg. Die buis is vir 5 minute teen 37 °C geïnkubeer waarna 10µl 4M ammoniumasetaat bygevoeg is. Die DNA is weer gepresipiteer en kortliks in 'n Speed Vac gedroog. Die DNA is opgelos in 100µl TE-buffer waarna die konsentrasie en kwaliteit van die DNA spektrofotometries bepaal is (Ausubel *et al*, 1991).

3.4 PCR met FUM1-spesifieke voorvoeders

Die standaardisering van PCR-kondisies is gedoen soos Herzelman (1994) dit beskryf het. Die konsentrasies van dNTP's is egter verlaag van 200µM na 40µM en 'n 1:1

mengsel van *Taq* en *Pwo* DNA-polimerases (Boehringer Mannheim) is gebruik. Aanvanklik is 'n **Techne PHC-2** en later 'n **PTC-100Tm** termiese sikliseerder gebruik. Die programstellings vir PCR met voorvoerders FUMPLUS1 en FUMMIN2 was soos volg:

Program 1 : 3 minute 94,0 °C - Denaturering
 1x 30 sekondes 55,0 °C - Hibridisering
 45 sekondes 72,0 °C - Verlenging

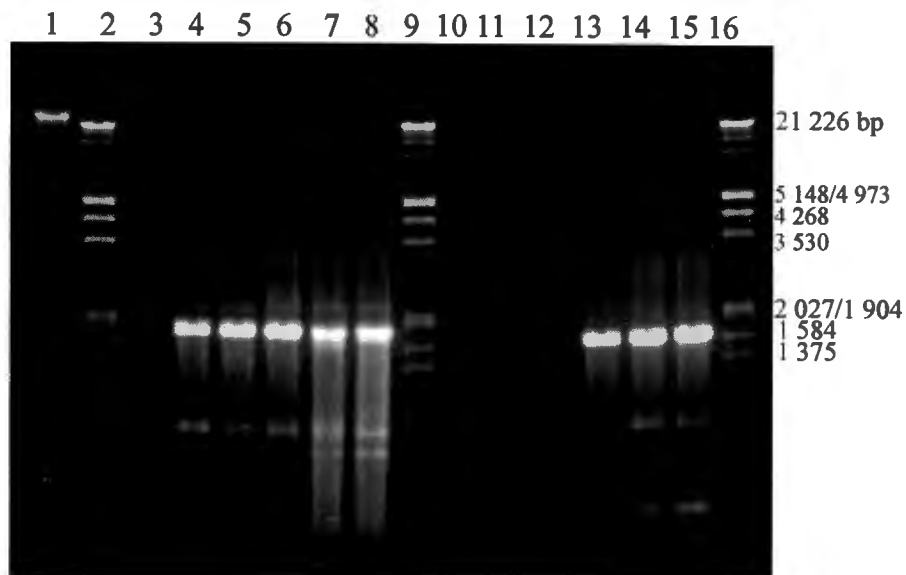
Program 2 : 30 sekondes 94,0 °C
 30x 50 sekondes 55,0 °C
 1 minuut 72,0 °C

Program 3 : 5 minute 72,0 °C
 1x

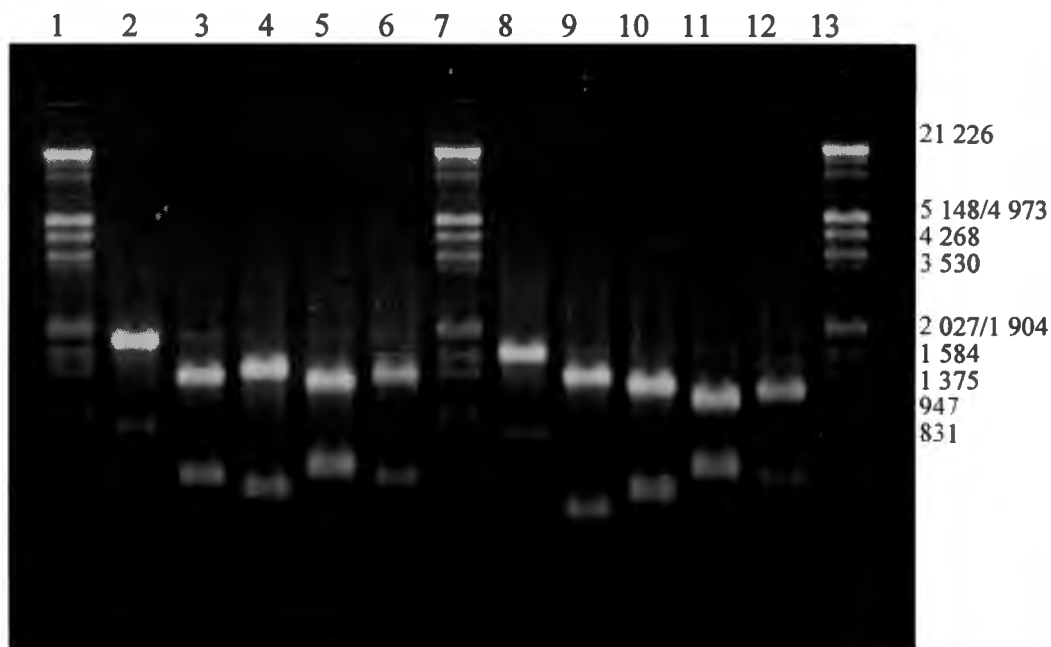
Die programstelling vir PCR met voorvoerders FUMPLUS2 en FUMMIN2 het verskil deurdat die hibridiseringstemperatuur 52 °C was en nie 55 °C nie. Die buisies is direk na program 3 op ys geplaas, waarna 10µl van die PCR-produk op 'n 1% agarosegel teen 40V vir 2,5 uur geëlektroforeer is. Beide reaksies het PCR-produkte van die verwagte groottes getoon (figuur 3.3). Die optimum MgCl₂- konsentrasie van beide reaksies was 3mM (figuur 3.3 bane 5 en 13 onderskeidelik). Aangesien voldoende PCR-produk verkry is met die eerste poging, is daar nie aan ander parameters van die PCR-reaksies verander nie.

3.4.1 Restriksiekartering van PCR-produkte

Om te bepaal of die PCR-produkte wat verkry is oor die regte volgordes beskik, is die onderskeie fragmente met vier verskillende restriksie-endonukleases behandel waarvan die restriksiepunte in die verwagte fragmente sou voorkom nl. Bgl II, EcoR I, Hpa II en Nae I. Die onderskeie fragmente is op 'n 1% agarosegel vir 2.5 uur teen 35V geëlektroforeer. Fragmente van die verwagte groottes is verkry (figuur 3.4).



Figuur 3.3 Elektroforetogram van PCR-produkte. Bane 3 tot 8 bevat PCR-produkte van voorvoeders FUMPLUS 1 en FUMMIN 2 en bane 10 tot 15 PCR-produkte van voorvoeders FUMPLUS2 en FUMMIN2. Baan 1: Genomiese DNA uit *Saccharomyces cerevisiae* Baan 2,9 en 16: Standaard: λ -DNA behandel met EcoR I en Hind III, Baan 3: 1.0mM $MgCl_2$, Baan 4: 1.5mM $MgCl_2$, Baan 5: 2.0mM $MgCl_2$, Baan 6: 3.0mM $MgCl_2$, Baan 7: 4.0mM $MgCl_2$, Baan 8: 5.0mM $MgCl_2$, Baan 10: 1.0mM $MgCl_2$, Baan 11: 1.5mM $MgCl_2$, Baan 12: 2.0mM $MgCl_2$, Baan 13: 3.0mM $MgCl_2$, Baan 14: 4.0 mM $MgCl_2$, Baan 15: 5.0mM $MgCl_2$



Figuur 3.4 Elektroforetogram van restriksiekartering van PCR-produk met voorvoeders FUMPLUS1 en FUMMIN2 (bane 2 tot 6) en FUMPLUS2 en FUMMIN2 (bane 8 tot 12) onderskeidelik. Baan 1,7 en 13: Groottestandaard: λ -DNA behandel met Eco RI en Hind III; Baan 2: PCR produk van voorvoeders FUMPLUS1 en FUMMIN2; Baan 3: Bgl II; Baan 4: EcoR I; Baan 5: Hpa I; Baan 6: Nae I; Baan 8: PCR produk van voorvoeders FUMPLUS2 en FUMMIN2; Baan 9: Bgl II; Baan 10: EcoR I; Baan 11: Hpa I; Baan 12: Nae I

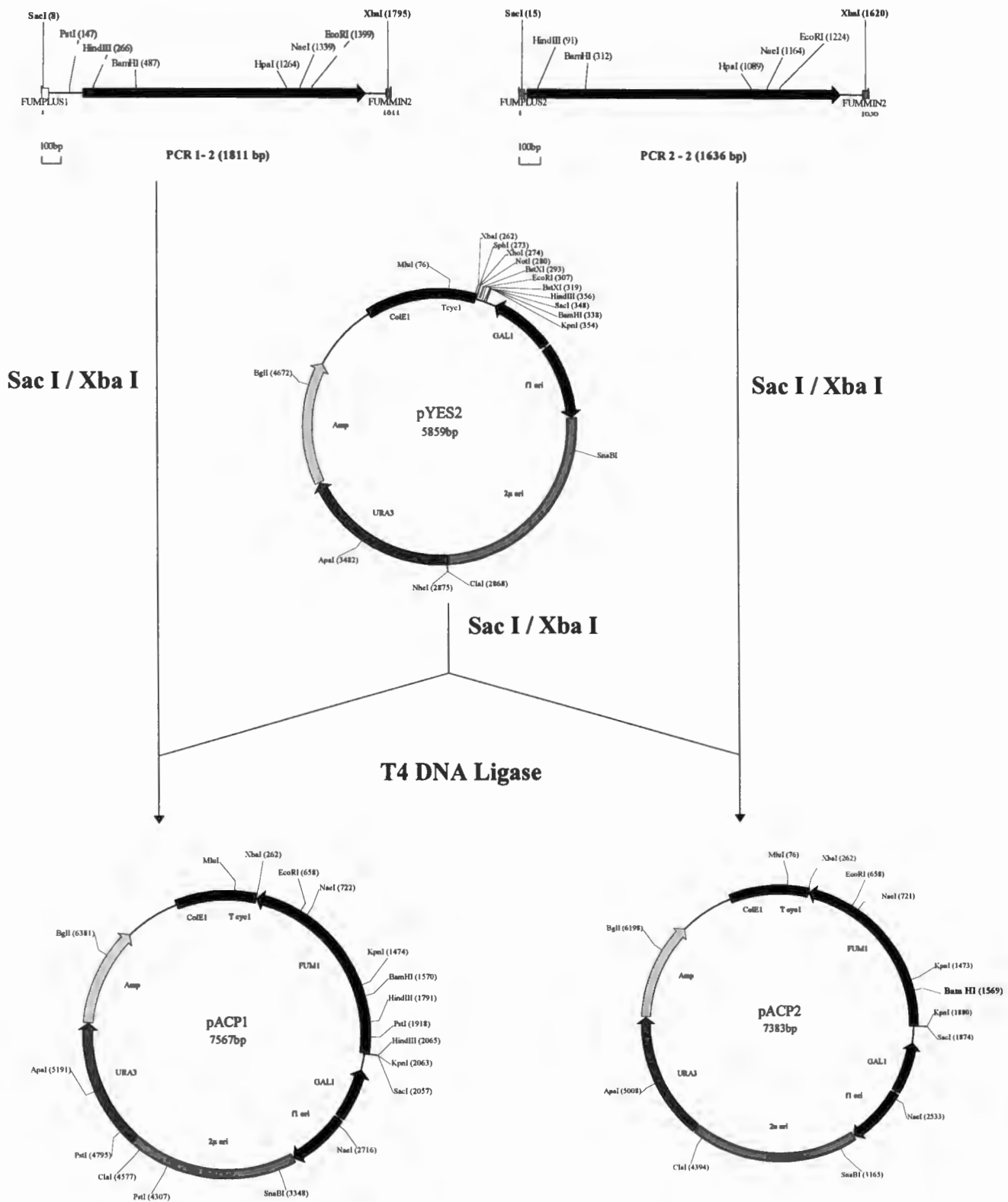
3.5 Klonering van PCR-produkte

3.5.1 Suiwering en restriksie-endonuklease behandeling

Die PCR-produkte is gesuiwer deur gebruik te maak van QIAGEN se "QIAEX-Gel Extraction Kit". Ongeveer 40µl van die PCR-reaksies is met die bogenoemde stel skoongemaak volgens die ontsoutingsprotokol van die vervaardigers. Die gesuiwerde PCR-produk is met 30µl steriele ddH₂O geëluëer. Daar is 5µl van Promega se "Multicore Buffer" hierby gevoeg asook 10U elk van die restriksie-endonukleases Sac I en Xba I. Die reaksiemengsel is vir 3 ure by 37 °C geïnkubeer waarna die behandelde DNA op 'n 1% agarosegel vir 2,5 ure teen 40V geëlektroforeer is. Om PCR-artefakte (figuur 3.3) uit te sluit, is die DNA-band met 'n steriele lemmetjie uit die agarosegel gesny. Die DNA is uit die gel geëluëer met die "QIAEX Gel Extraction Kit" volgens die vervaardigers se spesifikasies.

Die uitdrukkingsvektor pYES2 is met dieselfde restriksie-endonukleases behandel as die PCR-produk, op 'n agarosegel geskei en geëluëer met behulp van die "QIAEX Gel Extraction Kit". Beide die vektor en PCR-fragmente is opgelos in 30µl steriele ddH₂O. Die konsentrasies van die onderskeie DNA-fragmente is spektrofotometries bepaal (Ausubel, 1991).

Die PCR-fragmente is in die vektor gekloneer deur gebruik te maak van 'n "Rapid Ligation Kit" (Boehringer Mannheim). Ekwimolêre hoeveelhede van vektor- en fragment-DNA is met mekaar geligeer volgens die voorskrifte van die vervaardigers. Negatiewe kontroles wat slegs restriksie-endonuklease behandelde vektor bevat is ook ingesluit om vals positiewe ligerings uit te skakel. Die konstruksie van die vektore pACP1 en pACP2 word in figuur 3.5 skematies voorgestel.



Figuur 3.5 Skematiese voorstelling van die konstruksie van pACP1 en pACP2.

3.5.2 Transformerings van *E.coli* DH10B

Kompetente *E.coli* DH10B selle is berei volgens 'n aangepaste metode van Sambrook *et al.*, (1989) en uitgevoer soos beskryf deur Greeff (1993). Die volgende wysigings is aangebring : 20 µl kompetente selle is gemeng met 2µl van die ligeringsmengsels en vir 5min op ys gelaat waarna hittedkok vir 45 sekondes teen 42 °C toegepas is. 'n Negatiewe transformeringskontrole wat slegs buffer bevat en 'n positiewe kontrole wat slegs onbehandelde vektor-DNA bevat is ook ingesluit. Met behulp van 'n vinnige isoleringsmetode van plasmied-DNA uit individueel getransformeerde kolonies (Vergeer, 1988), is klone geïdentifiseer wat oor die korrekte pACP1- en pACP2-vektore beskik. (figuur 3.6 en 3.7 onderskeidelik). Om te bepaal of pACP1 en pACP2 korrek gekonstrueer is, is beide vektore met 6 restriksie-endonukleases behandel. Die teoretiese en waargenome fragmentgroottes word saamgevat in tabel 3.1. Die resultaat van die kartering word in figuur 3.8 gegee.

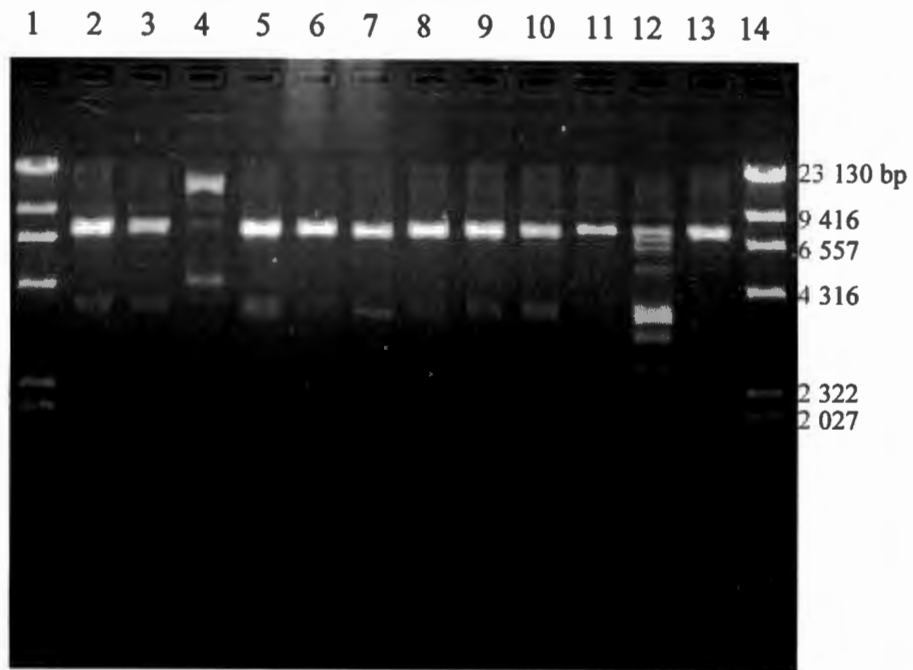
Tabel 3.1 Teoretiese en waargenome fragmentgroottes van die restriksiekartering. A: pACP1 en B: pACP2

A

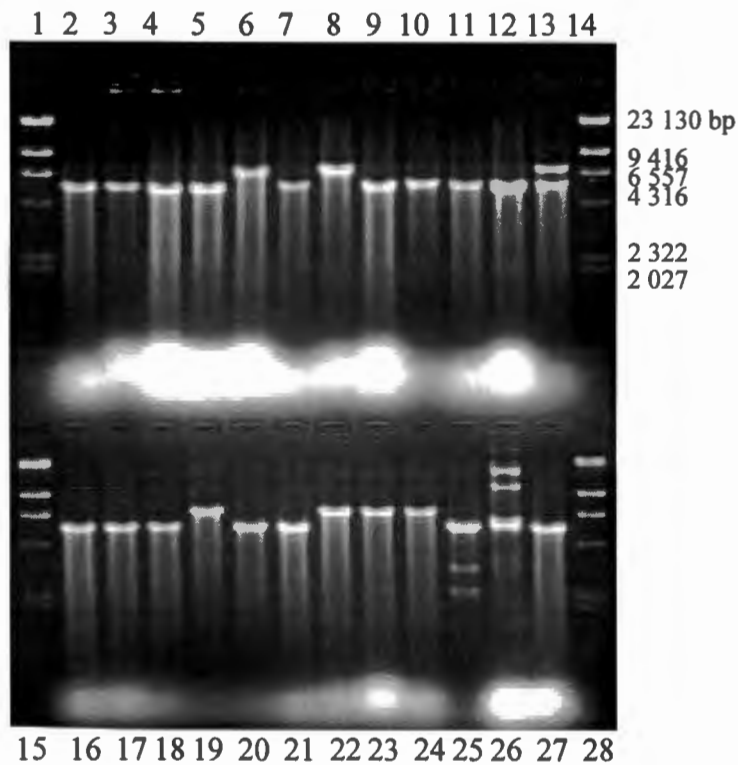
Restriksie-ensiem	Teoretiese fragmentgroottes (bp)	Waargenome fragmentgroottes (bp)
Bgl II	7567	7500
Sac I/Xba I	5772, 1795	5700, 1800
EcoR I/Bam HI	6655, 912	6600, 900
Hpa I	4371, 3186	4300, 3200
Nae I	5573, 1994	5500, 2000
Hind II	2712, 2679, 1326, 484, 230, 136	2700-2600, 1350, 500

B

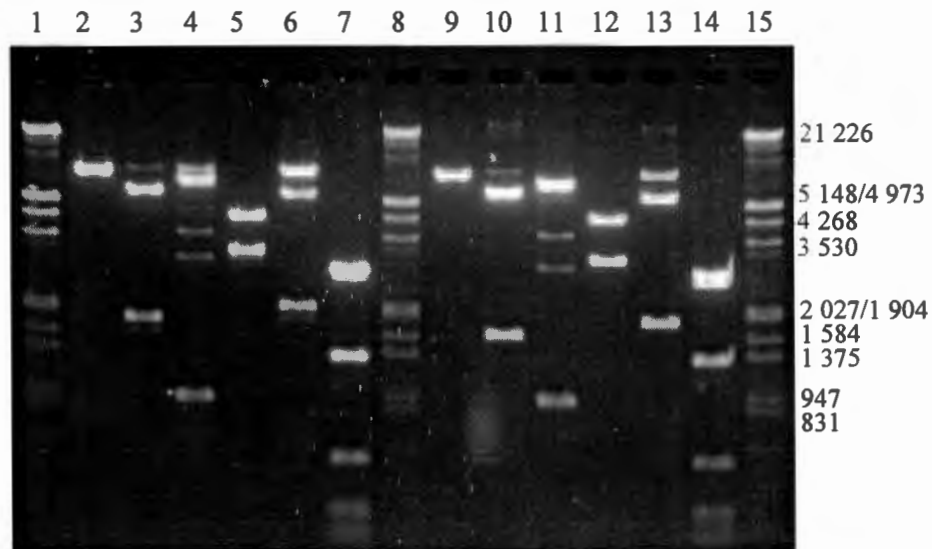
Restriksie-ensiem	Teoretiese fragmentgroottes (bp)	Waargenome fragmentgroottes (bp)
Bgl II	7384	7300
Sac I/Xba I	5772, 1614	5700, 1600
EcoR I/Bam HI	6472, 912	6400, 900
Hpa I	4371, 3015	4300, 3000
Nae I	5573, 1813	5500, 1800
Hind II	2678, 2530, 1326, 484, 230, 136	2600, 2500, 1350, 500



Figuur 3.6 Elektroforetogram van vinnige analyse van pACP1-plasmiede. Bane 1 en 14: Standaard: λ -DNA behandel met Hind III.; Bane 2 tot 13: Plasmied-DNA behandel met Xba I.



Figuur 3.7 Elektroforetogram van vinnige analyse van pACP2-plasmiede. Bane 1,14,15 en 28: Standaard: λ -DNA behandel met Hind III.; Bane 2 tot 13: Plasmied-DNA behandel met Xba I; Bane 16 tot 27: Plasmied-DNA behandel met Xba I; Bane 6,8,19,22-24: Positieve pACP2 klone.



Figuur 3.8 Restriksiekartering van pACP1 en pACP2. Baan 1, 8 en 15: Groottestandaard (λ -DNA behandel met Eco RI en Hind III); Baan 2: Bgl II; Baan 3: Sac I en Xba I; Baan 4: Eco RI en Bam HI; Baan 5: Hpa I; Baan 6: Nae I; Baan 7: Hind II; Baan 9: Bgl II; Baan 10: Sac I en Xba I; Baan 11: Eco RI en Bam HI; Baan 12: Hpa I; Baan 13 : Nae I; Baan 14: Hind II

3.6 Samevatting

Drie voorvoeders spesifiek vir die FUM1-geen van *S.cerevisiae* is ontwerp en twee groottes FUM1-fragmente is met behulp van hierdie voorvoeders deur middel van PCR verkry. Hierdie fragmente is suksesvol in die gis-uitdrukkingsvektor pYES2 gekloneer.

In hoofstuk 4 word die aanwending van die PCR-produk in pACP2, onderbreek met 'n selekteerbare genetiese merker, vir die konstruksie van 'n fumarasemutante-gis deur middel van integrerende rekombinasie beskryf.

HOOFSTUK 4

INTEGRERENDE REKOMBINASIE

4.1 Inleiding

Rothstein *et al* (1983) het waargeneem dat die vrye punte van getransformeerde DNA tydens gistransformering in staat is tot rekombinasie deur direkte interaksie met homologe DNA-volgordes van die gisgenoom. Hierdie waarneming het aanleiding gegee tot verskeie metodes waarmee chromosomale kopieë van gene in die gisgenoom vervang kan word met veranderde en/of mutante gene (Lundblad, 1992). Een so 'n metode naamlik "one step gene disruption" behels die onderbreking van 'n spesifieke gekloneerde geen met 'n selekteerbare genetiese merker. Die chromosomale kopie van die geen in gis word dan vervang met die onderbreekte geen deur middel van integrerende rekombinasie. Op hierdie wyse word die chromosomale kopie van 'n geen vervang met 'n mutante een om die funksie van die geen te bepaal. Op hierdie wyse kan bepaal word of 'n spesifieke geen oor die regte nukleotiedvolgordes beskik en of die geen noodsaaklik is vir die oorlewing van die gis (Rothstein, 1983). Hierdie beginsel is in hierdie studie toegepas om 'n fumarasedefekte stam te skep.

4.1.1 Benaderingswyse

Ten einde te bepaal of die onderskeie pACP1- en pACP2-plasmiede oor nukleotiedvolgordes beskik wat sal lei tot die uitdrukking van funksionele fumarase-proteïen is die volgende benaderingswyses gevolg. Die bepaling van die nukleotiedvolgorde van die PCR-produk in pACP2 en die skep van 'n fumarase-defekte gisstam deur integrerende rekombinasie van die FUM1-konstruk in pACP2 onderbreek met 'n selekteerbare genetiese merker. Seleksie van positiewe mutante deur middel van PCR en die transformering van die fumarasedefekte mutant met verskillende pACP1- en pACP2-klone om te bepaal of die klone die fumarasedefek kan komplementeer.

4.2 Materiaal en metodes

4.2.1 Gedeeltelike nukleotiedvolgordebepaling van PCR 2-2

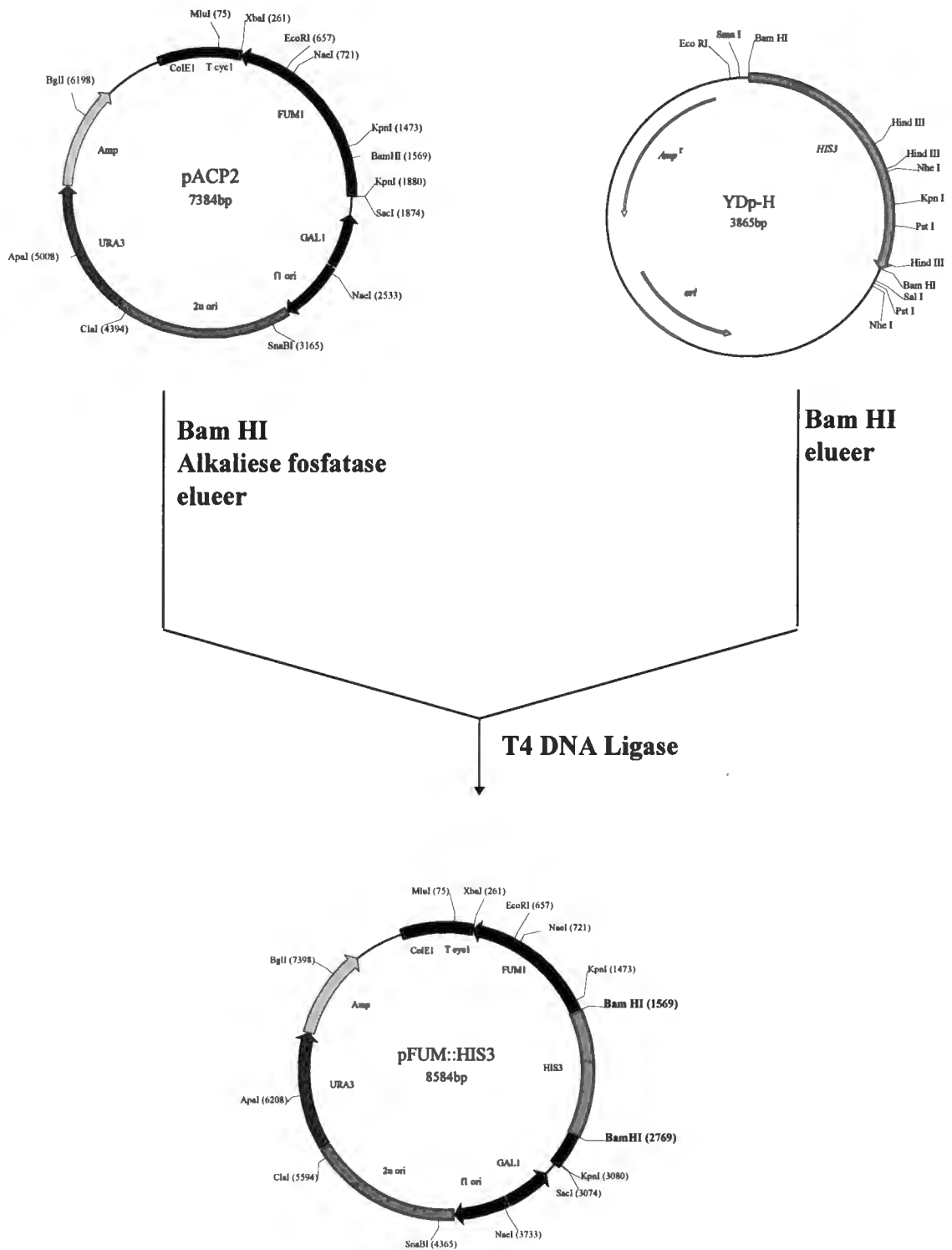
Ten einde te bepaal of die FUM1 PCR-produk in pACP2 oor voldoende homologie beskik met die chromosomale kopie van die FUM1-geen, is 'n gedeelte van die nukleotiedvolgorde van die gekloneerde PCR-produk bepaal. Vir hierdie doel is gebruik gemaak van 'n "fmol™ DNA Sequencing System" van Promega volgens die voorskrifte van die vervaardigers. Die plasmied pACP2 waarin die FUM1 PCR-produk gekloneer is, is as templaar gebruik met die voorvoeders FUMPLUS1 en FUMMIN2 onderskeidelik.

4.2.2 Konstruksie van pFUM::HIS3

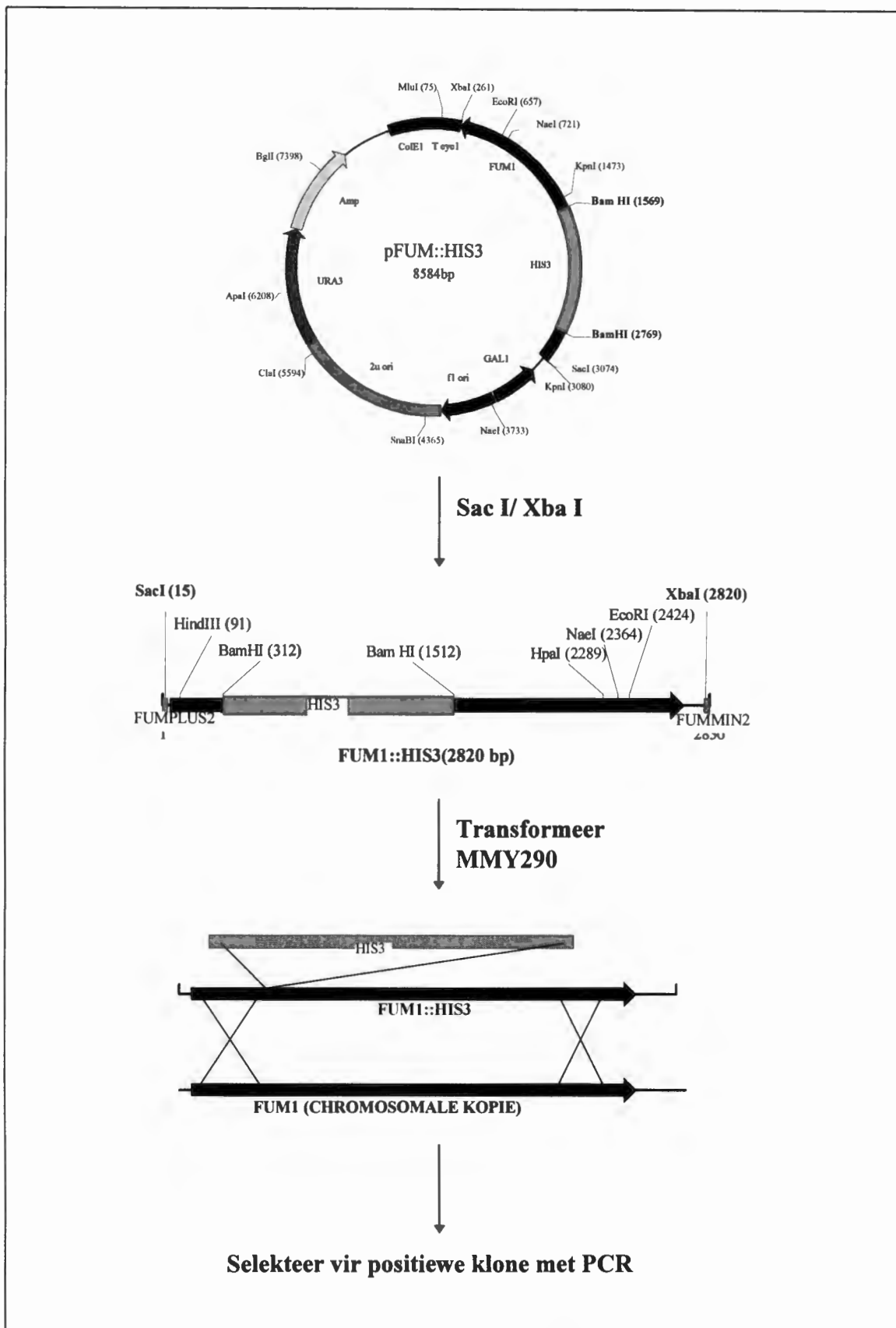
Om die FUM1 PCR-fragment te onderbreek is 'n selekteerbare genetiese merker, naamlik HIS3, in die ooplesraam van die FUM1 PCR-fragment gekloneer. Die plasmied pACP2 wat die PCR-fragment bevat is met die restriksie-endonuklease Bam HI behandel. Die HIS3-fragment van ongeveer 1200bp is verkry deur die plasmied YDp-H met Bam HI te behandel. Die pACP2-Bam HI fragment is met CIP (Boehringer Mannheim) behandel. Beide die pACP2-BamHI en HIS3-BamHI-fragmente is op 'n 1% agarosegel vir 3 ure teen 35V geëlektroforeer waarna die onderskeie fragmente met 'n steriele lemmetjie uit die gel gesny is en met behulp van QIAGEN se "QIAEX-Gel extraction kit" geëluëer is. Ligerings van die fragmente, transformering van die ligeringsmengsels en vinnige analise van plasmied-DNA is uitgevoer soos beskryf in afdeling 3.5. In figuur 4.1 word 'n skematiese voorstelling van die konstruksie van pFUM::HIS3 gegee.

4.2.3 Integrerende Rekombinasie van FUM1::HIS3 in *S.cerevisiae*

Om 'n liniêre fragment van FUM1::HIS3 te bekom, is die plasmied pFUM::HIS3 met die restriksie-endonukleases Sac I en Xba I behandel. Die reaksiemengsel is op 'n 1% agarosegel vir 3 ure teen 35 V geskei en die FUM1::HIS3-fragment van ongeveer 2800 bp is geëluëer met die "QIAEX Gel extraction kit". Die gisstam MMY290 (*Mata ura3 leu2 his3*) is getransformeer met die FUM1::HIS3-fragment volgens die volgende protokol: Die



Figuur 4.1 Skematiese voorstelling van die konstruksie van pFUM::HIS3



Figuur 4.2 Skematiese voorstelling van die metodes wat gevolg is om 'n fumarasedefekte gis te skep en te selekteer

gisstam MMY290 is in 10ml YPD-medium vir 24 uur by 30°C gekweek waarna 100ml YPD geïnkuleer is met 1ml van die bogenoende kultuur en by 30°C gekweek is totdat die kultuur 'n OD₆₀₀ van 0,8 bereik het. Die selle is gesedimenteer deur dit by kamertemperatuur vir 10 minute teen 1500 x g te sentrifugeer. Die supernatant is verwyder en die selle is met 20ml TE-buffer gewas en weer gesedimenteer. Hierna is die selle in 5ml TE-buffer geresuspendeer en 0,25ml 2.5M LiAc is bygevoeg. Die selle is vir 30 minute by 30°C geskud. Hierna is die selsuspensie in 0,3ml hoeveelhede in 1,5ml Eppendorfbuise verdeel, waarna 20µl draer-DNA (Kalfimus DNA 10mg/ml) bygevoeg is. Plasmied DNA, naamlik pFUM::HIS3 (1µg) en FUM1::HIS3 fragment (1µg), is in afsonderlike buise bygevoeg. 'n Negatiewe kontrole wat slegs TE-buffer bevat is ook ingesluit. Die buise is vir 30 minute teen 30°C geïnkubeer waarna 0,7ml steriele PEG 4000 (50% w/v) bygevoeg is. Die buise is vir 1 uur teen 30°C geïnkubeer waarna die selle teen 3000 o.p.m. vir 2 minute gesentrifugeer is. Die selle is met 1ml steriele 1M sorbitol gewas en weer gesedimenteer waarna die selle in 100µl steriele 1M sorbitol geresuspendeer is. Die helfte van die selsuspensies (50µl) is uitgesprei op SD -His-glukosemedium (0,67% YNB, 2% glukose en aminosure sonder histidien) en die plate is vir 3 dae by 30°C geïnkubeer.

4.2.4 Sifting van positiewe MMY FUM1::HIS3-klone

Normaalweg word van Southern-oordraganalise gebruik gemaak om te selekteer vir klone waarin integrerende rekombinasie van onderbreekte gene plaasgevind het (Rothstein 1983). In hierdie geval is egter gebruik gemaak van PCR met dieselfde voorvoeders wat gebruik is om die FUM1-PCR-fragmente te verkry. Die klone wat verkry is met die transformering van die FUM1::HIS 3-fragment asook een kloon wat pFUM::HIS 3 bevat het, is oornag in SD -His-glukosemedium gekweek. Genomiese DNA van die selle is berei soos beskryf in afdeling 3.3 waarna PCR uitgevoer is met genomiese DNA van die bogenoemde klone asook met genomiese DNA van MMY290 as kontrole. Die voorvoeders FUMPLUS2 en FUMMIN2 is gebruik by 'n MgCl₂-konsentrasie van 3mM. Dieselfde program as in afdeling 3.4 is gebruik met 'n PTC-100 termiese sikliseerder. Aangesien aanvanklik nie genoegsame PCR-produk verkry is nie,

is die proses herhaal met 'n $MgCl_2$ -konsentrasie van 4mM. Die proses is ook herhaal met die voorvoeders FUMPLUS1 en FUMMIN2 om te bepaal of integrerende rekombinasie op die presiese chromosomale lokus van FUM1 plaasgevind het (FUMPLUS1 bind ongeveer 160 basepare meer stroomop in die FUM1 volgorde as FUMPLUS2 - kyk figuur 3.1). Die PCR-produk wat verkry is, is ook behandel met die restriksie-endonuklease Bam HI om te bepaal of die produk wat verkry is wel die FUM1::HIS3 fragment is.

4.2.5 Komplementering van die fumarasedefek in MMY FUM1::HIS3 deur die plasmiede pACP1 en pACP2

4.2.5.1 Groot skaalse bereiding van pACP1- en pACP2-plasmiede

Om plasmiede te berei wat verteenwoordigend is van al die positiewe pACP1- en pACP2-klone, is 10 positiewe klone van pACP1 en 7 klone van pACP2 afsonderlik vir 16 ure in 5ml LB-Ampisillien (1% Triptoon, 0,5% Gisekstrak, 0,5% NaCl en 50 mg/ml Ampisillien) gekweek. Twee 500ml Erlenmeyerflesse wat elk 100ml LB-Ampisillien bevat het, is geïnkuleer met 0,5ml van elke oornagkultuur (pACP1 en pACP2 afsonderlik). Die flesse is vir 6 ure by 37°C teen 200 o.p.m geïnkubeer. Na inkubasie is die selle in twee 50ml Falconbuise gesedimenteer en plasmied-DNA is op groot skaal uit die selle berei met behulp van 'n "NucleobondTM PC 100 Kit" (Machery-Nagel) volgens die voorskrifte van die vervaardigers. Die plasmied-DNA is opgelos in TE-buffer en die konsentrasie en kwaliteit is bepaal soos vroeër beskryf (afdeling 3.3).

4.2.5.2 Transformerings van MMY FUM1::HIS3 en seleksie vir komplementering

Die gisstam MMY FUM1::HIS3 (*Mat a fum1::HIS3 leu2 his3 ura3*) is getransformeer met 4µg van die plasmiede pACP1 en pACP2 onderskeidelik, asook met pYES2 en TE-buffer as negatiewe kontroles vir seleksie op gliserol. Transformerings is uitgevoer soos beskryf in afdeling 4.2.3. Die helfte van die getransformeerde selle (50µl) is uitgesprei op SD -Ura-glukose-agarplate en die ander helfte op -Ura-gliserol/etanol-agarplate. Die plate is onderskeidelik vir 3 en 5 dae by 30°C geïnkubeer. Die SD -Ura-gliserol/etanol-

agarplate selekteer vir respiratoriesdefekte mutante, soos MMY FUM1::HIS3, aangesien gliserol slegs aërobies gekataboliseer kan word. Positiewe klone wat na 3 dae inkubasie op SD -Ura-glukose verkry is, is oorgedra na SD-Ura-gliserol/etanol om vas te stel of al die PCR-klone die respiratoriese defek van MMY FUM1::HIS3 kon komplementeer. Die gisstam MMY290, getransformeer met pYES2, is gebruik as positiewe kontrole en MMY FUM1::HIS3 getransformeer met pYES2 as negatiewe kontrole.

4.3 Resultate en bespreking

4.3.1 Gedeeltelike volgordebepaling van PCR2-2

In figuur 4.3 word 'n gedeelte van die volgordegel wat verkry is, gegee. Die nukleotiedvolgordes wat vanaf hierdie gel gelees is (sowat 200bp vanaf die 5' en 3' punte van die PCR-produk), is vergelyk met die gepubliseerde volgorde van die FUM1-geen, deur gebruik te maak van die rekenaarprogram PC-Gene. Die nukleotiedvolgordes van die PCR-produk wat bepaal is, het 100% homologie getoon met die gepubliseerde volgorde van die FUM1-geen. Die analise het getoon dat die PCR-produk wat in pACP2 gekloneer is, wel die FUM1-volgordes bevat. Hieruit kon ook afgelei word dat voldoende homologie tussen die chromosomale kopie van FUM1 en die PCR-produk bestaan, sodat 'n onderbreekte PCR-produk gebruik kon word vir die daarstelling van 'n respiratoriesdefekte FUM1-mutant deur integrerende rekombinasie.

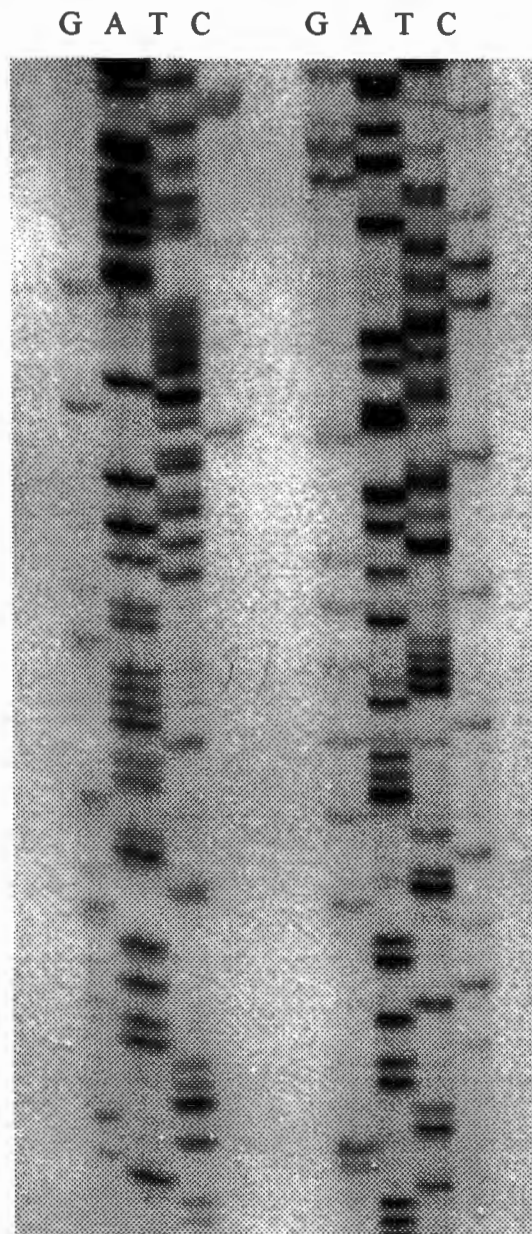
4.3.2 Konstruksie van pFUM::HIS3

Deur vinnige analise van plasmied-DNA is tien positiewe klone van pFUM::HIS3 verkry. Een van hierdie klone is gebruik om die plasmied op groot skaal te berei.

4.3.3 Integrerende rekombinasie van FUM1::HIS3 in *S.cerevisiae*.

Uit die transformering van MMY290 met pFUM::HIS3 (positiewe kontrole) is ongeveer 1000 transformante verkry en in die geval van negatiewe kontrole het geen

transformante voorgekom nie. Slegs vier transformante is egter verkry uit die transformering van MMY290 met die liniêre fragment FUM1::HIS3.



Figuur 4.3 Outoradiogram van die volgordebepaling van FUM1-PCR2-2. Die volgorde-mengsels van die verskillende voorvoeders is twee keer op een poliakrielamiedgel geëlektroforees sodat 'n langer volgorde gelees kon word met behulp van die oorvleuelende gedeeltes.

Volgens die resultate het integrerende rekombinasie van die fragment wel plaasgevind, maar dit bewys egter nie dat integrerende rekombinasie van die fragment op die presiese

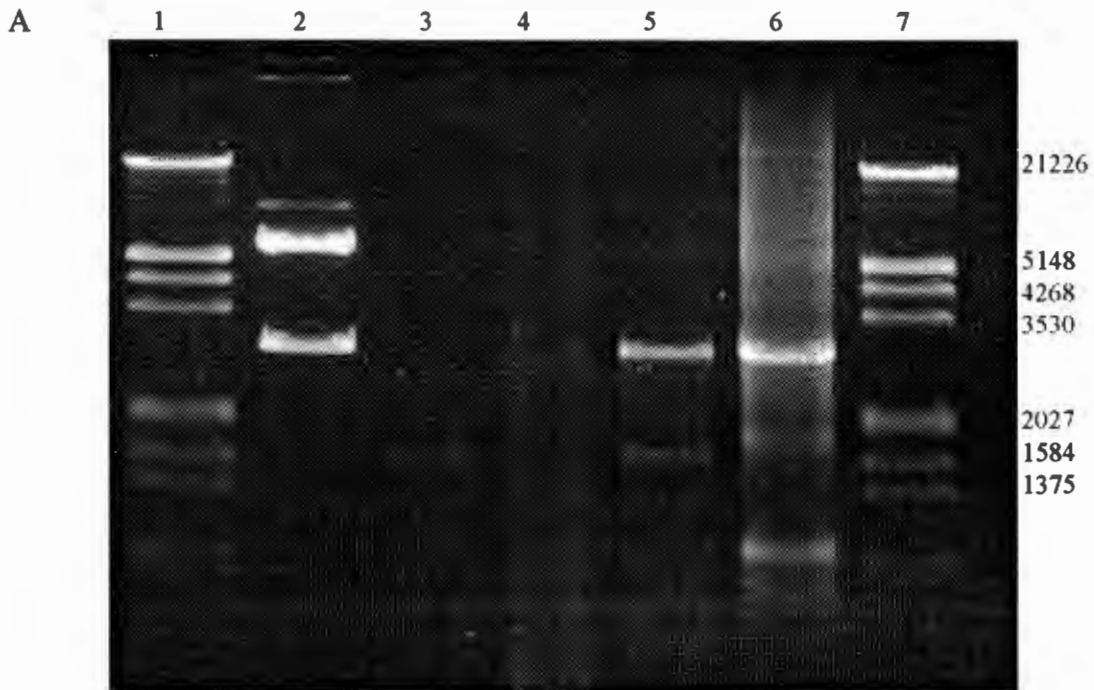
chromosomale lokus van FUM1 plaasgevind het nie. Om dit te kan aantoon is van PCR gebruik gemaak.

4.3.4 Sifting van MMY FUM1::HIS3-klone deur PCR

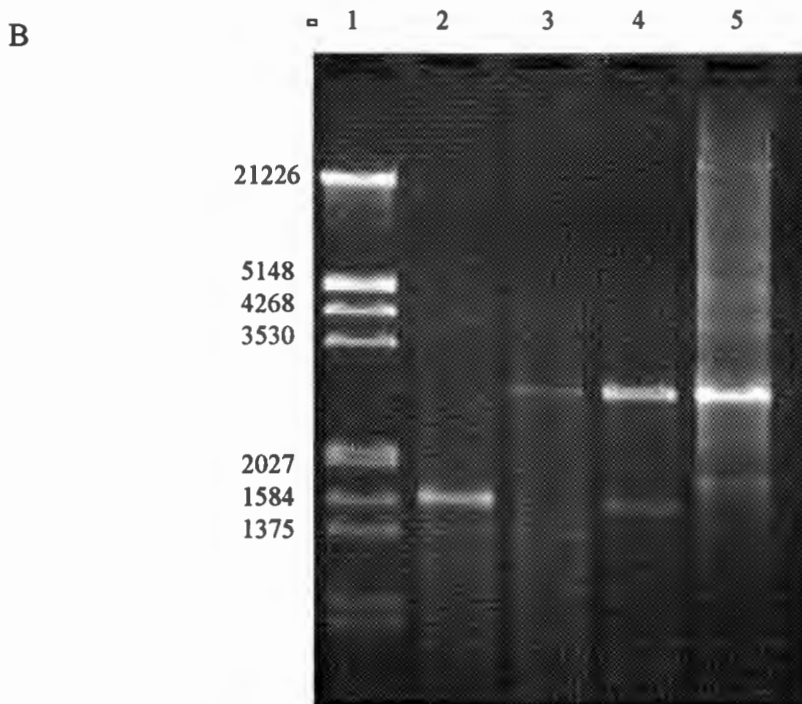
Van die vier klone wat met behulp van PCR geslekteer is, het een kloon 'n PCR-produk van 2800 bp bevat. Aangesien daar nie voldoende produk was om 'n elektroforetogram te verkry wat die produk op 'n foto sou aantoon nie, is PCR by 'n hoër $MgCl_2$ -konsentrasie herhaal. Figuur 4.4 toon hierdie PCR-produkte en in baan 3 van figuur 4.4B kan 'n produk van ongeveer 2800bp waargeneem word. Daar kom egter nie 'n produk van die normale grootte (soos in baan 2) voor nie, wat daarop dui dat integrerende rekombinasie van FUM1::HIS3 moontlik in die chromosomale lokus van FUM1 plaasgevind het. In baan 4 kom daar egter twee produkte voor, een van 2800bp en een van 1600bp. Hierdie produkte kom van die plasmied pFUM::HIS3 en die genoom onderskeidelik. Die gis is getransformeer met pFUM::HIS3 en om die rede kan meer van die 2800 bp produk waargeneem word. PCR met voorvoeders FUMPLUS1 en FUMMIN2 is ook uitgevoer. In baan 3 van figuur 4.5 kan hierdie produk waargeneem word. Slegs 'n produk van ongeveer 3000bp word waargeneem, wat daarop dui dat die integrerende rekombinasie van FUM1::HIS3 wel in die chromosomale lokus van FUM1 in hierdie transformant plaasgevind het. Die 3000 bp produk wat met Bam HI behandel is, het ook fragmente van die verwagte groottes opgelewer (baan 5 figuur 4.5). Dit dui daarop dat die PCR-produk wel 'n produk is van FUM1::HIS3 en nie 'n PCR-artifakt is nie. Daar kan dus met sekerheid gesê word dat daar in een van die klone wel rekombinasie van die onderbreekte FUM1-geen, naamlik FUM1::HIS3, plaasgevind het. Hierdie respiratoriesdefekte stam is MMY FUM1::HIS3 genoem.

4.3.5 Komplementering van die respiratoriese defek in MMY FUM1::HIS3 deur die plasmiede pACP1 en pACP2

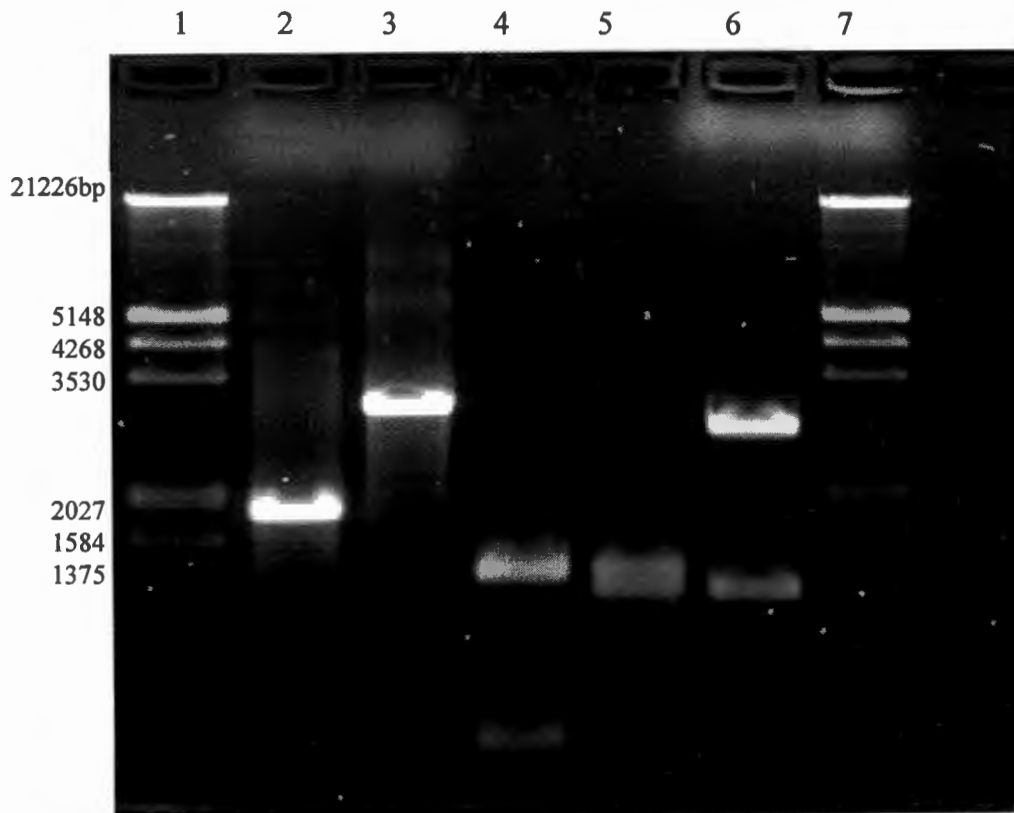
Twintig transformante wat verkry is van die transformering van MMY FUM1::HIS3 met pYES2, pACP1, en pACP2 onderskeidelik, is oorgedra vanaf SD -Ura-glukose na SD -Ura-gliserol/etanol. Die 20 transformante wat met pYES2 getransformeer is, het nie



Figuur 4.4 A: Elektroforetogram van eerste PCR-produkte met FUMPLUS2 en FUMMIN2. Banel en 7: Groottemerker, Baan2: pFUM::HIS3 behandel met Sac I en Xba I, Bane 3 en 4: PCR van potentiële MMY FUM1::HIS3-klone, Baan 5: PCR van MMY290 getransformeerd met pFUM::HIS3, Baan 6: PCR van pFUM::HIS3



Figuur 4.4 B: Elektroforetogram van PCR-produkte (tweede poging). Baan 1: Groottemerker, Baan 2: PCR-produk van MMY290, Baan3: PCR-produk van MMY FUM1::HIS3, Baan4: PCR van MMY290 getransformeerd met pFUM::HIS3, Baan 5: PCR van pFUM::HIS3



Figuur 4.5 Elektroforetogram van PCR-produkte van MMY290 en MMY FUM1::HIS3 en hulle BamH I-fragmente. Baan 1 en 7: Groottemerker, Baan 2: PCR-produk van MMY290, Baan 3: PCR-produk van MMY FUM1::HIS3, Baan 4: BamH I-fragmente van MMY290-PCR, Baan 5: BamH I-fragmente van MMY FUM1::HIS3-PCR, Baan 6: YDp-H behandel met BamH I

op SD -Ura-gliserol gegroei nie. Die transformante wat met pACP1 en pACP2 getransformeer is, het egter op SD -Ura-gliserol gegroei. Al die transformante het egter nie gegroei nie. Van die pACP1-klone het 16 van die 20 wat oorgedra is gegroei en 15 van die 20 pACP2-klone. MMY290 wat met pYES getransformeer is, het egter almal op SD -Ura-gliserol gegroei. Hierdie resultate dui daarop dat MMY FUM1::HIS3 wel 'n respiratoriesdefekte stam is. Die feit dat nie al die pACP1- en pACP-klone die respiratoriese defek van MMY FUM1::HIS3 kon komplementeer nie, kan moontlik toegeskryf word aan mutasies in die FUM1-PCR-produk tydens PCR, aangesien die ensiem *Taq*-Polimerase nie oor proefleesaktiwiteit beskik nie (Innes *et al*, 1990).

Die pACP1- en pACP2-transformante wat direk op SD -Ura-gliserol/etanol uitgesprei is, het na 5 dae gegroei. Daar was geen groei van pYES2-transformante of van selle wat met TE-buffer getransformeer is nie. Daar was egter 'n groot verskil in die aantal transformante wat op SD -Ura-glukose en SD -Ura-gliserol/etanol gegroei het. Dit kan toegeskryf word aan die feit dat nie al die pACP1- en pACP2-klone die respiratoriese defek kon komplementeer nie. Daar was egter ongeveer 2000 transformante van beide pACP1- en pACP2-klone op SD -Ura-glukose teenoor die ongeveer 300 op SD -Ura-gliserol/etanol. Aangesien die verhouding nie dieselfde is as die verhouding tussen die transformante wat oorgedra is na SD -Ura-gliserol nie, word dit toegeskryf aan die feit dat SD -Ura-gliserol/etanol 'n dubbele seleksiemedium is. Nietemin dui die resultate daarop dat MMY FUM1::HIS3 wel 'n respiratoriesdefekte gisstam is as gevolg van die invoeging in die FUM1-geen, asook dat van die pACP1- en pACP2-klone oor die regte nukleotiedvolgordes beskik vir die uitdrukking van 'n funksionele fumarase-proteïen.

4.4 Samevatting

Die gedeeltelike nukleotiedvolgorde van die gekloneerde PCR2-2 fragment in pACP2 is bepaal en 'n fumarasedefekte gisstam naamlik MMY FUM1::HIS3 is deur integrerende rekombinasie van die PCR2-2-fragment onderbreek met 'n selekteerbare merker geskep. Positiewe mutante is geselekteer deur middel van PCR. Die fumarasedefek van MMY FUM1::HIS3 is gekomplementeer deur die PCR-produkte gekloneer in pACP1 en pACP2.

In die volgende hoofstuk word die ooruitdrukking van die fumarasegeen in *S.cerevisiae* en die gebruik daarvan vir biotransformering van fumaarsuur na L-malaat beskryf.

HOOFSTUK 5

UITDRUKKING VAN DIE FUM1-GEEN - BIOTRANSFORMERING VAN FUMAARSUUR NA L-MALAAT

5.1 Inleiding

Die galaktokinase promotor van gis (*GAL1*) is 'n sterk reguleerbare promotor. Geen-uitdrukking vanaf die *GAL1*-promotor word geïnduseer deur die teenwoordigheid van galaktose en onderdruk deur die teenwoordigheid van glukose (Moir, 1991). Daar is twee regulatoriese proteïene naamlik GAL4 en GAL80 wat die transkripsie vanaf *GAL1* reguleer. Die *GAL3* geenproduk produseer moontlik 'n intrasellulêre induseerder vanaf galaktose. Wanneer galaktose teenwoordig is bind die GAL4 - proteïen aan volgordes in die UAS ("upstream activation site") en aktiveer transkripsie. Wanneer geen galaktose teenwoordig is nie, bind GAL80 aan die karboksielterminus van GAL4 en geen induksie vind plaas nie (Schneider, 1991).

Wanneer selle egter op glukose gegroei word, word die *GAL1*-promotor onderdruk. Hierdie sterk regulering van die *GAL1*-promotor maak dit 'n goeie promotor vir die manipulering van uitdrukking van gekloneerde gene in gis. Die sterk induksie wat die *GAL1*-promotor tot gevolg het (duisendvoudig), maak die gebruik van die promotor handig vir ooruitdrukking van die rekombinante proteïene in gis. Die hoogste omskakeling deur mikrobiese selle van fumaarsuur na L-malaat is verkry deur gisselle waarvan die FUM1-geen ooruitgedruk is onder beheer van die *GAL10*-promotor (Peleg *et al*, 1990; Neufeld *et al*, 1991).

In hierdie hoofstuk word die ooruitdrukking van twee FUM1-PCR-produkte onder beheer van die *GAL1*-promotor beskryf en die gebruik van die selle vir die biotransformering van fumaarsuur na L-malaat.

5.1.2 Benaderingswyse

Ten einde L-malaat vanaf fumaarsuur te produseer is die volgende benaderingswyse gevolg:

- Ooruitdrukking van die FUM1-PCR-produkte in pACP1 en pACP2 deur induksie met galaktose
- Bepaling van fumarase-aktiwiteit in geïnduseerde selle
- SDS-PAGE-analise van totale selproteïen in geïnduseerde selle
- Die gebruik van selle met hoë fumarase-aktiwiteit vir biotransformering van fumaarsuur na L-malaat
- Ensimatiese bepaling van L-malaat gevorm vanaf fumaarsuur.

5.2 Materiaal en metodes

5.2.1 Induksie van MMY FUM1::HIS3 en W303-1A getransformeer met pACP1 en pACP2

Aangesien MMY FUM1::HIS3 nie op SD -Ura-galaktose gegroei het nie, is die selle op SD -Ura-mannose/galaktose (0,67% YNB, 1% mannose, 1% galaktose en aminosure sonder urasil) gegroei. Die gisstam W303-1A (*leu2-3 ura3-1 trp1-1 his3-11 15 can1-100 SUC2 GAL mal 0*) is ook met pACP1, pACP2 en pYES2 getransformeer. Hierdie stam het wel goeie groei op SD -Ura-galaktose getoon.

Die MMY FUM1::HIS3-stamme getransformeer met pYES2, pACP1 en pACP2 onderskeidelik is verkry vanaf die seleksie vir komplementering van die fumarasedefek in MMY FUM1::HIS3 deur pACP1 en pACP2 (afdeling 4.3.5). Die verskillende stamme is by 30°C in 25ml van die onderskeie galaktosemedia tot stasionêre fase gegroei. As negatiewe kontrole vir induksie is die onderskeie selle ook in SD-Ura-glukose gegroei. Na groei is die fumarase-aktiwiteit van die verskillende kulture bepaal.

5.2.2 Bepaling van fumarase-aktiwiteit

Vir bepaling van fumarase-aktiwiteit is totale selproteïen as volg berei: 5ml van elke giskultuur is oorgedra na 5ml Medispobuise en die selle is deur sentrifugering by 4°C gesedimenteer. Die supernatante is verwyder en die selle is in 300µl TE-buffer wat 1mM PMSF bevat het geresuspendeer, waarna 200µl glasballetjies (0,45mm) bygevoeg is. Die selle is gebreek deur die buise vir 1 minuut te vortex (30 sekondes vortex, 30 sekondes op ys). Selreste is verwyder deur die buise vir 1 minuut teen 14000 x g te sentrifugeer en die supernatant is gebruik vir bepaling van fumarase-aktiwiteit. Fumarase-aktiwiteit is by 25°C bepaal deur die produksie van fumaraat vanaf L-malaat te monitor as die toename in absorpsie by 250nm (Kanarek en Hill, 1964). Totale selproteïen is bepaal met behulp van 'n "Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit" (Sigma). Fumarase-aktiwiteit is uitgedruk as µmol fumaraat gevorm/min/mg totale selproteïen deur gebruik te maak van 'n waarde van 1.45mmol/cm vir die absorpsie-koëffisiënt van fumaraat by pH 7.3 en 25°C. Die fumarase-aktiwiteit is as volg bereken:

$$(\Delta A_{250}/\text{min} \times 3.02\text{ml (reaksievolume)} \times 1.45\text{mmol/cm (absorpsie-koëffisiënt)}) \div (\text{proteïenkonsentrasie in mg/3.02ml})$$

5.2.3 SDS-PAGE-analise van totale selproteïen

Om te bepaal of die rekombinante fumaraseproteïen waargeneem kan word is totale selproteïen aan SDS-PAGE-analise onderwerp. Dieselfde selproteïen wat gebruik is vir fumarasebepaling is hiervoor gebruik. Ongeveer 50µg totale selproteïen is op 'n 10 tot 18% liniêre poliakrielamiedgradiëntgel gelaai en in die teenwoordigheid van SDS teen 25mA vir 16 uur geëlektroforeer. Monstervoorbereiding, bereiding van die liniêre gradiëntgel en coomassie-kleuring van die gel is uitgevoer soos beskryf deur Hames, (1981).

5.2.4 Biotransformering van fumaarsuur na L-malaat.

Dieselfde stamme as in afdeling 5.2.1 is vir biotransformering gebruik. Aangesien mannose 'n duur fermenteerbare koolstofbron is, is die gisstam MMY FUM1::HIS3 wat met pYES2, pACP1 en pACP2 onderskeidelik getransformeer is eers tot OD₆₀₀ van 1,5 gegroei in 100ml SD -Ura-glukose en na 100ml SD -Ura-galaktose oorgedra. Die gisstam W303-1A wat met pYES2, pACP1 en pACP2 onderskeidelik getransformeer is, is direk in 100ml SD -Ura-galaktose tot stasionêre fase gegroei. Voordat die biotransformering van fumaarsuur na L-malaat uitgevoer is, is die fumarase-aktiwiteit van die verskillende sellyne weer bepaal. SDS-PAGE-analise van die totale selproteïen is ook herhaal.

Slegs die sellyn wat die hoogste fumarase-aktiwiteit getoon het, is gebruik vir biotransformering van fumaarsuur na L-malaat met die wilde tipe stam as negatiewe kontrole. Biotransformering is na induksie as volg uitgevoer: 'n Volume van die selkultuur, ekwivalent aan een gram (nat gewig) selle, is gesentrifugeer om die selle te sedimenteer. Hierdie selle is in 30ml 1M fumaarsuur (pH7.5) wat 0,2% (w/v) deoksicholaat bevat het, gesuspendeer. Die mengsel is vir 90 minute by 37°C geïnkubeer terwyl dit teen 100 o.p.m. geskud is. Elke 15 minute is 1ml van die mengsel onttrek en die selle deur sentrifugering verwyder waarna 500µl supernatant na 'n skoon buis oorgedra is. Die hoeveelheid L-malaat in die supernatant is met behulp van 'n "L-malic acid test kit" (Boehringer Mannheim) bepaal.

5.3 Resultate en bespreking

5.3.1 Induksie van fumarase en bepaling van fumarase-aktiwiteit

Tabel 5.1 toon die fumarase-aktiwiteit van die verskillende sellyne op SD -Ura-glukose en SD -Ura-mannose/galaktose en galaktose onderskeidelik. Die gisstam MMY FUM1::HIS3 wat met pYES2 getransformeer is, het op beide media geen fumarase-aktiwiteit getoon nie. Die gisstam MMY FUM1::HIS3 wat met pACP1 getransformeer is, het egter op SD -ura galaktose/mannose 27 keer hoër fumarase-

aktiwiteit getoon as MMY290 wat met pYES2 getransformeer is. Die fumarase-aktiwiteit van MMY::FUM1 HIS 3 wat met pACP2 getransformeer is, was egter slegs 7 keer hoër as MMY290 wat met pYES2 getransformeer is. Die gisstam W303-1A wat met pACP2 getransformeer is, het 'n 11 keer verhoging in fumarase-aktiwiteit op SD -Ura-galaktose getoon teenoor die 5 keer verhoging van pACP1 (tabel 5.1). Albei die stamme wat met pACP1 en pACP2 getransformeer is, het egter 'n verhoging in fumarase-aktiwiteit getoon op SD -Ura-galaktose of SD -Ura-mannose/galaktose.

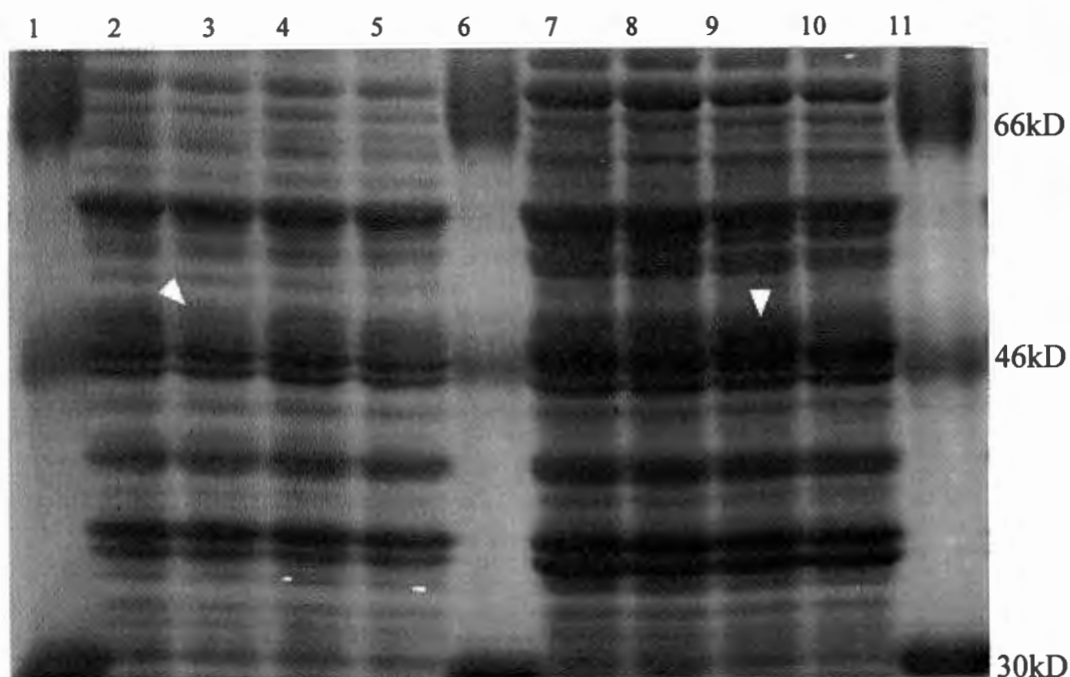
Tabel 5.1 Fumarase-aktiwiteit van verskillende sellyne op glukose (voor induksie) en galaktose (na-induksie).

STAM	FUMARASE-AKTIWITEIT (μ mol fumaarsuur/min/mg proteïen)	
	GLUKOSE	GALAKTOSE
MMY290-pYES2	0.8	0.7
MMY FUM1::HIS3-pYES2	0.0	0.0
MMY FUM1::HIS3-pACP1	1.2	18.9
MMY FUM1::HIS3-pACP2	0.6	4.9
W303-1A-pYES2	0.8	0.65
W303-1A-pACP1	0.9	1.95
W303-1A-pACP2	0.9	7.15

5.3.2 SDS-PAGE-analise van die totale selproteïen

In Figuur 5.1 word die resultaat van 'n SDS-PAGE-analise gegee. In bane 2 tot 5 word die totale selproteïene van die verskillende MMY-klone wat op SD -Ura-glukose gegroei was gegee. Bane 7 tot 10 toon die totale selproteïene van dieselfde klone wat op SD-Ura-mannose/galaktose gegroei is (na induksie). In baan 9 word die totale selproteïen van MMY FUM1::HIS wat met pACP1 getransformeer is gegee. In hierdie baan kom 'n proteïen van ongeveer 48 kilodalton voor wat nie in bane 7 en 8 (negatiewe kontroles) voorkom nie, asook nie in baan 4 (totale proteïene van dieselfde

kloon op glukose) nie. Die proteïen word aangedui met 'n pyl. Alhoewel die grootte van die proteïen (48 kilodalton) ooreenstem met die grootte van gis mitochondriale fumarase, is geen proteïen met 'n grootte van 55 kilodalton teenwoordig nie (sitosoliese fumarase). Die feit dat die bogenoemde die proteïen slegs voorkom by die stam MMY FUM1::HIS3-pACP1 (na induksie), stem goed ooreen daarmee dat hierdie stam die hoogste fumarase-aktiwiteit getoon het. Daar is dus 'n groot moontlikheid dat hierdie proteïen die rekombinante fumaraseproteïen is. In baan 3 word die totale selproteïen van MMY FUM1::HIS3-pYES2 gegroei op glukose aangetoon. In die baan kan waargeneem word dat daar proteïene met groottes van ongeveer 48 kilodalton afwesig is, wat in bane 2, 4 en 5 voorkom (dit word ook aangedui met 'n pyl). Aangesien die stam 'n fumarasemutant is, is die afwesigheid van die proteïene moontlik te wyte aan die feit dat geen fumaraseproteïene gevorm is nie.



Figuur 5.1 Foto van totale selproteïen van MMY290 en MMY FUM1::HIS3-kone voor en na induksie. Bane 1, 6 en 11: Groottemerkers (RainbowTM coloured protein molecular weight markers). Bane 2 tot 5 voor induksie (glukose) en Bane 7 tot 10 na induksie (galaktose). Baan 2: MMY290-pYES2; Baan 3: MMY FUM1::HIS3-pYES2; Baan 4: MMY FUM1::HIS3-pACP1; Baan 5: MMY FUM1::HIS3-pACP2; Baan 7: MMY290-pYES2; Baan 8 MMY FUM1::HIS3-pYES2; Baan 9: MMY FUM1::HIS3-pACP1; Baan 10: MMY FUM1::HIS3-pACP2;

5.3.3 Biotransformering van fumaarsuur na L-malaat

In tabel 5.2 word die resultate wat verkry is uit die bepaling van die fumarase-aktiwiteit van die verskillende stamme se klone na induksie op galaktose saamgevat. In hierdie geval is egter van ander W303-1A klone gebruik gemaak, aangesien die wat in afdeling 5.3.1 beskryf is, slegs 'n 10 keer verhoging in fumarase-aktiwiteit getoon het.

Tabel 5.2 Fumarase-aktiwiteit van die verskillende stamme na 'n tweede rondte induksie.

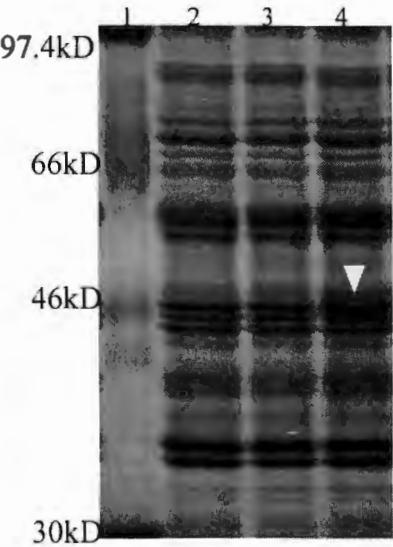
STAM	FUMARASE-AKTIWITEIT $\mu\text{mol fumarat/min/mg}$ proteïen
MMY290-pYES2	0.9
MMY FUM1::HIS3-pYES2	0.0
MMY FUM1::HIS3-pACP1	5.4
MMY FUM1::HIS3-pACP2	1.2
W303-1A-pYES2	0.8
W303-1A-pACP1	6.4
W303-1A-pACP2	24.3

Uit bogenoemde resultate kan gesien word dat die MMY FUM1::HIS3-pACP1 kloon slegs 'n 6 keer hoër fumarase-aktiwiteit getoon het as die wilde tipe stam MMY290 getransformeer met pYES2. Dit kan toegeskryf word aan die feit dat hierdie klone eers op glukose gegroei is en toe na galaktose oorgedra is. Die W303-1A-pACP2 kloon het egter 31 keer hoër fumarase-aktiwiteit getoon as W303-1A-pYES2. Om die rede is die W303-1A-pACP2 kloon, geïnduseer met galaktose, gebruik vir biotransformering van fumaarsuur na L-malaat met die W303-1A-pYES kloon as negatiewe kontrole. Die resultate wat verkry is met die biotransformering van fumaarsuur na L-malaat word saamgevat in tabel 5.3.

Tabel 5.3 L-malaat gevorm (g/l) deur W303-1A stamme na induksie.

STAM	15min	30min	45min	60min
W303-1A-pYES2	2.47	5.58	6.0	6.6
W303-1A-pACP2	25.3	38.8	51.7	55.0

In tabel 5.3 kan gesien word dat die stam W303-1A wat met pACP2 getransformeer is, na induksie meer L-malaat gevorm het as dieselfde stam wat met pYES2 getransformeer is. Die spesifieke fumarase-aktiwiteit van W303-1A-pACP1 was 12,3mmol/h/g teenoor 1,48 mmol/h/g van W303-1A-pYES2.



Figuur 5.2 SDS-PAGE-analise van totale selproteïen van W303-1A-klone na induksie. Baan1: Groottemerker; Baan2: W303-1A-pYES2; Baan3: W303-1A-pACP1; Baan 4: W303-1A-pACP2.

In figuur 5.2 word ‘n resultaat van die SDS-PAGE-analise van die W303-1A-klone se totale selproteïen gegee. In baan 4 kan daar duidelik ‘n proteïen van ongeveer 48 kilodalton (dieselfde grootte as gis mitochondriale fumarase) waargeneem word, wat nie in baan 2 (totale selproteïen van W303-1A-pYES2 na induksie) voorkom nie. In baan 3 kan ‘n effens donkerder band ook met ‘n grootte van 48 kilodalton waargeneem word. Hierdie resultaat tesame met die feit dat die fumarase-aktiwiteit van W303-1A-pACP1 en pACP2 onderskeidelik 8 en 31 keer hoër was as die van

W303-1A-pYES2 dui daarop dat daar wel 'n rekombinante fumaraseproteïen gevorm is op grond van die relatiewe hoë uitdrukking van die FUM1-PCR-produk in pACP2 onder leiding van die *GAL1*-promotor.

5.4 Samevatting

Die gisfumaraseproteïen is suksesvol uitgedruk deur induksie van die PCR-fragmente in pACP1 en pACP2 onder leiding van die *GAL1*-promotor in twee verskillende gisstamme, soos bepaal deur funksionele fumarase-analise en SDS-PAGE-analise van totale selproteïen. Een van die stamme is gebruik vir die biotransformering van fumaarsuur na L-malaat en het 12 keer hoër produktiwiteit getoon as die ooreenstemmende wilde tipe stam.

HOOFSTUK 6

BESPREKING

6.1 Inleiding

Die doelstelling van hierdie studie (afdeling 2.8) was om die ooruitdrukking van die fumarase-ensiem in *S.cerevisiae* te bewerkstellig vir die biotransformering van fumaarsuur na L-malaat.

In die literatuuroorsig (hoofstuk 2) is 'n oorsig gegee van die gebruike en produksie van L-malaat. In 1990 was 15% van die wêreldwye produksie van malaat deur biotransformering geproduseer (Peleg *et al*, 1990). Sover bekend word daar tans geen L-malaat in Suid-Afrika geproduseer nie. Om hierdie rede moet L-malaat ten duurste ingevoer word. Pasiënte met metaboliese defekte gebruik tot 1kg L-malaat per week en die koste beloop ongeveer R1 500/kg L-malaat (persoonlike kommunikasie)¹.

Daar is besluit om 'n mikro-organisme te identifiseer met hoë fumarase-aktiwiteit vir die biotransformering van fumaarsuur na L-malaat. Normaalweg word van geïmmobiliseerde bakterieë met hoë fumarase-aktiwiteit gebruik gemaak, byvoorbeeld *Brevibacterium flavum* (Takata *et al*, 1980) en *Brevibacterium ammoniagenes* (Yamamoto *et al*, 1976). Die hoogste en vinnigste omskakeling was egter deur die gis *S.cerevisiae* waarvan die FUM1-geen ooruitgedruk is onder beheer van die *GAL10*-promotor (Neufeld *et al*, 1991).

Daar is dus besluit om 'n FUM1-PCR-produk in 'n gisuitdrukkingsvektor te kloneer en die fumaraseproteïen oor uit te druk sodat die organisme gebruik kon word vir die biotransformering van fumaarsuur na L-malaat.

¹ Prof.L.J Mienie (Departement Biochemie P.U vir C.H.O.)

6.2 Ontwerp van voorvoeders spesifiek vir die FUM1-geen

Aangesien die nukleotiedvolgorde van die FUM1-geen reeds gepubliseer is (Wu *et al*, 1987), is voorvoeders vir PCR ontwerp wat die volledige oopleesraam van die FUM1-geen insluit (afdeling 3.2). Voorvoeders is ontwerp vir twee PCR-produkte, een van 1636 basepare en een van 1811 basepare. Die groter PCR-produk sluit die voorgestelde promotorvolgorde van die FUM1-geen in. Die kleiner produk sluit egter nie die promotorvolgorde in nie, maar is so beplan dat die eerste ATG-inisiasie kodon so na as moontlik aan die *GALI*-promotor in pYES2 sou wees. Dit volg op die waarneming dat verwydering van 5' en 3' ongetransleerde gebiede van 'n gekloneerde geen in gis, kan lei tot hoër produksie van die rekombinante proteïen (Vasavada, 1995).

Om 'n aanduiding te kry of die voorvoeders funksioneel sou wees, is rekenaaranalise van die voorvoeders uitgevoer met behulp van PC-gene. Hoewel die onderskeie voorvoeders nie voldoen het aan al die kriteria nie, het die voorvoeders wel PCR-produkte van die verwagte groottes gelewer (afdeling 3.4). Die volgordes van die voorvoeders is ook so verander dat hulle die restriksie-endonukleasepunte insluit wat direkte klonering van die PCR-produkte in pYES2 moontlik sou maak. Dit het subklonering uitgesluit wat tydrowend sou wees. FUMPLUS1 se restriksie-endonukleasepunt was egter slegs 4 basepare vanaf die 5'-punt van die voorvoerder (afdeling 3.2) wat veroorsaak het dat klonering van die 1811 basepare PCR-produk moeilik en tydrowend was, aangesien *Sac I* slegs 20% vertering toon met 3 tot 4 basepare van die 5'-punt van die restriksie-endonuklease snitpunt (Promega).

Daar is egter daarin geslaag om voldoende PCR-produk te verkry wat die regte FUM1-volgordes bevat het (afdeling 3, figure 3.3 en 3.4), soos bepaal deur restriksie-kartering van die PCR-produkte. Die optimum $MgCl_2$ -konsentrasie vir die sintese van beide produkte was 3.0mM $MgCl_2$ en die optimum hibridiseringstemperatuur van PCR1-2 en PCR2-2 was 55°C en 52°C onderskeidelik (afdeling 3.4). Die PCR-produkte is vervolgens in die gisuitdrukingsvektor pYES2 gekloneer.

6.3 Klonering van PCR-produkte

Die PCR-produkte is gesuiwer met 'n QIAGEN "QIAEX Gel extraction kit" voor restriksie-endonukleasebehandeling om dNTP's, *Taq*-Polimerase en voorvoeders te verwyder, aangesien hierdie elemente restriksie-endonukleases kan belemmer (Boehringer Mannheim). 'n Oormaat restriksie-endonukleases is gebruik om te verseker dat beide fragment- en vektorvolgordes volledig verteer is. Om seker te maak dat slegs die verwagte PCR-produkte gekloneer word, is beide PCR-fragmente geëlektroelueer om PCR-artifakte te verwyder.

Die transformering van *E.coli* DH10B met die onderskeie pACP1- en pACP2-ligeringsmengsels het egter verskillende resultate opgelewer aangesien dieselfde Sac I/Xba I behandelde pYES2-vektor nie in albei gevalle gebruik is nie. Die ligeringsmengsels van pACP2 het meer ampisillien weerstandbiedende klone as pACP1 tot gevolg gehad, maar slegs 30% van die pACP2-klone was ware positiewe klone (figuur 3.7). Alhoewel daar baie min (slegs 18) positiewe pACP1-klone was, was meer as 75% van hierdie klone ware pACP1 klone (figuur 3.6). Die lae persentasie ware pACP2-klone kan toegeskryf word aan die feit dat vertering van die vektor pYES2 met beide die restriksie-endonukleases Sac I en Xba I nie volledig was nie. Die feit dat min pACP1-klone verkry is, kan daaraan toegeskryf word dat die Sac I snitpunt in FUMMIN1 van PCR1-2 slegs 4 basepare van die 5' punt van die fragment af voorkom en dat die PCR1-2 fragment dus nie volledig met Sac I behandel is nie.

Restriksiekartering van beide pACP1 en pACP2 het egter die verwagte fragmentgroottes opgelewer (afdeling 3.5.2; figuur 3.7). In sommige gevalle het behandeling met van die restriksie-endonukleases bande van 7500 (pACP1) en 7300 basepare (pACP2) onderskeidelik opgelewer tesame met die verwagte groottes. Dit kan toegeskryf word aan die feit dat van die restriksie-endonukleases oud was, byvoorbeeld, Nae I (figuur 3.7) sodat vertering nie volledig was nie.

Daar kan egter met sekerheid gesê word dat beide die PCR-fragmente suksesvol in die gis-uitdrukkingsvektor pYES2 gekloneer is (figuur 3.8).

6.4 Integrerende rekombinasie

Aangesien die ensiem *Taq*-Polimerase moontlik amplifiseringsfoute in die FUM1-PCR-produkte kon veroorsaak het (Innis *et al*, 1990), is besluit om te selekteer vir funksionele pACP1- en pACP2-klone deur komplementering van 'n fumarasedefekte stam.

Die fumarasedefekte stam is gegenereer deur integrerende rekombinasie van 'n FUM1-PCR-produk (PCR2-2) wat onderbreek is met 'n gisselekteerbare merker (HIS3). Om te bepaal of die PCR-fragment in pACP2 homologie met die FUM1-geen het, is die nukleotiedvolgorde van die fragment gedeeltelik bepaal (afdeling 4.2.1). Die nukleotiedvolgordes wat verkry is, het 100% homologie met die gepubliseerde volgorde van die FUM1-geen gehad soos bepaal deur rekenaaranalise. Hieruit kan die afleiding gemaak word dat die PCR-produk wat in pACP2 gekloneer is, wel korrekte FUM1-volgordes bevat het. Hierdie PCR-produk, onderbreek met 'n HIS3-fragment, is gebruik om die gisstam MMY290 te transformeer.

Soos bepaal deur die PCR-analise van die klone wat verkry is, het die FUM1::HIS3-fragment wel in die chromosoom van een van die klone gerekombineer (afdeling 4.3.4 en figuur 4.5 baan 2). Slegs een PCR-produk met 'n grootte wat ooreenstem met die van die FUM1::HIS3-fragment is verkry deur PCR met voorvoeders FUMPLUS2 en FUMMIN2 (figuur 4.4 B, baan 3). Om te verseker dat integrerende rekombinasie wel op die chromosomale lokus van die FUM1-geen plaasgevind het, is PCR herhaal met die voorvoerder FUMPLUS1 wat ongeveer 200bp meer opstroom bind as FUMPLUS2. Weereens is slegs een PCR-produk van die verwagte grootte verkry (figuur 4.5, baan 2). Hieruit is afgelei dat integrerende rekombinasie van die FUM1::HIS3-fragment wel plaasgevind het en is in 'n belangrike doelwit van hierdie studie geslaag.

Die stam waarin rekombinasie van die FUM1::HIS3-fragment plaasgevind het, naamlik MMY FUM1::HIS3, is gebruik om te selekteer vir funksionele pACP1- en pACP2-

klone. Uit hierdie seleksie is waargeneem dat nie al die pACP1- en pACP2-klone die vermoë gehad het om die fumarasedefek in MMY FUM1::HIS3 te komplementeer nie (afdeling 4.3.5). Dit kan toegeskryf word aan die feit dat mutasies moontlik ontstaan het in van die FUM1-PCR-produkte tydens amplifisering as gevolg van die afwesigheid van proefleesaktiwiteit van die ensiem *Taq*-DNA Polimerase (Innes *et al*, 1990). Die gisstam MMY FUM1::HIS3 getransformeer met pYES2 het egter geen groei getoon op SD-Ura-gliserol nie, wat daarop dui dat die stam wel 'n respiratories defekte stam is. Komplementering van hierdie respiratoriese defek deur die plasmiede pACP1 en pACP2 onderskeidelik (afdeling 4.3.5), dui ook daarop dat hierdie plasmiede FUM1-volgordes bevat wat vir 'n funksionele fumaraseproteïen kodeer. Hierdie volgordes is vervolgens gebruik om die fumaraseproteïen in gis uit te druk.

6.5 Uitdrukking van die FUM1-geen en biotransformering van fumaarsuur na L-malaat

Dieselfde gisstamme wat verkry is met die komplementering van MMY FUM1::HIS3 is gebruik vir die induksie aangesien hierdie sellyne pACP1 en pACP2 plasmiede met funksionele FUM1-volgordes bevat (afdeling 6.4). Hierdie stamme het egter nie op galaktose gegroei nie en om die rede is die gisstam W303-1A (wat wel op die galaktose groei) met pACP1 en pACP2 getransformeer. Aangesien 75% van pACP1 en pACP2 plasmiede die respiratoriese defek in MMY FUM1::HIS3 kan komplementeer, is besluit om verskillende W303-1A klone te gebruik vir induksie.

Induksie van die onderskeie MMY FUM1::HIS3 en W303-1A klone wat onderskeidelik met pACP1 en pACP2 getransformeer is, het gelei tot verhoging van fumarase-aktiwiteit in die selle. Die sellyn MMY FUM1::HIS3 getransformeer met pACP1, het 'n 27 keer verhoging in fumarase-aktiwiteit getoon (tabel 5.2) ten opsigte van die wilde tipe MMY290 stam wat met pYES2 getransformeer is. Aangesien hierdie verhoging nie voorkom wanneer dieselfde stamme op glukose gegroei is nie, kan die verhoging in fumarase-aktiwiteit toegeskryf word aan die uitdrukking van die FUM1-PCR produk in pACP1 onder beheer van die *GALI*-promotor (glukose onderdruk die *GALI*-promotor). SDS-PAGE-analise van die totale selproteïen van MMY FUM1::HIS3-pACP1 het ook

'n proteïen met 'n massa van ongeveer 48 kilodalton getoon (figuur 5.1). Dit wil dus voorkom of slegs die mitochondriale iso-ensiem van fumarase uitgedruk is, aangesien die sitosoliese iso-ensiem 'n massa van 53 kilodalton het (Boonyarat en Doonan, 1988). Die proteïen van 48 kilodalton kan egter nie waargeneem word by dieselfde stam wat op glukose gegroei is nie, asook nie by die stam MMY290 wat met pYES2 getransformeer is nie (figuur 5.1, bane 4 en 7). By die stam MMY FUM1::HIS3 getransformeer met pYES2 is geen fumarase-aktiwiteit waargeneem nie, hetsy die stam op glukose of galaktose gekweek is. Hierdie waarneming, tesame met die feit dat die stam nie op gliserol wou groei nie, dui daarop dat die stam wel respiratories defek is. Dit dui ook daarop dat die onderbreking van die chromosomale kopie met die HIS3-merker tot gevolg het dat daar nie 'n sitosoliese of mitochondriale iso-ensiem van fumarase geproduseer word nie. In baan 3 van figuur 5.1 kan ook waargeneem word dat daar 'n proteïen van 48 kilodalton afwesig is wat by die ander stamme voorkom.

Na herhaling van induksie (afdeling 5.2.4) was daar 'n baie klein verhoging in fumarase-aktiwiteit in die geval van die MMY FUM1::HIS3-klone. Dit kan toegeskryf word aan die feit dat die selle eers op glukose gegroei is en toe oorgedra is na galaktose. In die eerste plek onderduk glukose die *GALI*-promotor (Schneider, 1991) en induksie vind gewoonlik eers 3 tot 4 ure plaas na oordrag na galaktose.

Induksie is ook herhaal met ander W303-1A klone as wat in afdeling 5.2.1 gebruik is. Een van hierdie klone, naamlik W303-1A, getransformeer met pACP2, het 'n 31 keer hoër fumarase-aktiwiteit getoon as dieselfde stam getransformeer met pYES2. SDS-PAGE-analise het weereens 'n proteïen van ongeveer 48 kilodalton getoon (figuur 5.2) wat nie by die wilde tipe stam W303-1A, wat met pYES2 getransformeer is, waargeneem is nie. Die selle wat 'n verhoging in fumarase-aktiwiteit getoon het, is gebruik vir die biotransformering van fumaarsuur na L-malaat met die ooreenstemmende wilde tipe stam as kontrole (afdeling 5.2.4).

Na biotransformering van fumaarsuur na L-malaat is die volgende resultate verkry. Die gisstam W303-1A-pACP2 het 'n spesifieke fumarase-aktiwiteit van 12,3 mmol /h/g getoon teenoor die 1,48 mmol/uur/g van die wilde tipe stam (tabel 5.3). Takata *et al*,

(1980) en Yamamoto *et al*, (1976) het egter laer aktiwiteite gekry met geïmmobiliseerde *Brevibacterium* (10,6 mmol/h/g). Neufeld *et al*, (1991) wat ook FUM1-geen in *S. cerevisiae* ooruitgedruk het, het egter aktiwiteit van 65 mmol/h/g gekry met vrye selle. Hierdie waarde is sowat 5 keer hoër as in die geval van W303-1A-pACP2.

Die feit dat die fumarase-aktiwiteit van Neufeld *et al*, (1991) se gisstam ook 5 keer hoër was as die van W303-1A-pACP1, dui daarop dat heelwat verbetering van uitdrukking nog moontlik is. Die laer fumarase-aktiwiteit van W303-1A-pACP1 kan moontlik toegeskryf word aan mutasies wat in die nukleotiedvolgorde voorkom van die FUM1 PCR-produkte wat in pACP1 en pACP2 gekloneer is. Dit word ondersteun deur die feit dat daar telkens slegs een rekombinante proteïen van 48 kilodalton waargeneem is en nie een van 53 kilodalton nie.

Die gisstam W303-1A-pACP2 is egter nie geskik as 'n organisme vir die industriële produksie van L-Malaat nie. In die eerste plek is die fumarase-aktiwiteit van die organisme heelwat laer as die van die Peleg *et al*, (1990). In die tweede plek is die koste verbonde aan media vir die seleksie van die pACP2-plasmied baie hoog. Hierdie probleem kan egter oorkom word deur die fumarasegeen in veelvoudige kopieë op die genoom in te voeg. Vir hierdie doel kan gebruik gemaak word van Ty-transposisie vektore (Boeke *et al*, 1988). Wanneer 'n geen in so 'n vektor gekloneer word, word dit gevleuel deur Ty-element herhalings. Induksie van transposisie het tot gevolg dat die Ty-element-geen-kasset se mRNA gesintetiseer word. Hierdie RNA word dan deur 'n gis Ty-gekodeerde omgekeerde transkriptase omgeskakel na cDNA wat dan integrerende rekombinase kan ondergaan met van die 30 tot 40 kopieë van die Ty-elemente wat tipies op die gischromosome voorkom (Boeke *et al*, 1988).

In hierdie geval sal egter gebruik gemaak moet word van 'n chromosomale kopie van FUM1 aangesien die FUM1-PCR-produkte heel moontlik mutasies bevat. Vir hierdie doel kan van die fumarasedefekte gisstam MMY FUM1::HIS3 gebruik gemaak word om te selekteer vir die gis fumarasegeen uit 'n gis genomiese biblioteek deur komplementering van die fumarasedefek. Alternatiewelik kan van pACP1 as 'n herwinningsvektor gebruik gemaak word. Die gedeelte van die PCR-produk in pACP2

wat die oopleesraam van die FUM1-geen bevat, kan verwyder word deur restriksie-endonuklease-behandeling. Die resulterende behandelde vektor word dan in gis getransformeer en geselekteer vir die urasil-ouksotrofie. Aangesien die vektor steeds volgordes bevat wat homoloog is aan die van die FUM1-geen, sal integrerende rekombinasie plaasvind tussen die homoloë volgordes. Die vektor sal egter nie in die genoom integreer nie, maar die gaping in die vektor sal slegs gevul word met chromosomale volgordes deur 'n meganisme bekend as "plasmid-gap repair". Hierdie metode word gebruik vir die herwinning van mutante allele (Rothstein, 1991).

Die genomiese FUM1-fragment gekoppel aan die *GALI*-promotor kan dan op die gis-genoom geamplifiseer word, wat sal lei tot 'n organisme wat meer stabiel is en waarvan seleksie vir die kopiegetal van die *GALI*-FUM1-kasset onnodig sal wees. Dit sal die gebruik van duur seleksiemedia uitsluit.

Die FUM1-proteïen is egter suksesvol uitgedruk in *S. cerevisiae*. Gebruik van die stam het ook gelei tot verhoogde biotransformering van fumaarsuur na L-malaat.

6.6 Slotsom

Die doelwitte wat vir hierdie studie gestel is, is grootliks bereik: PCR-produkte van die FUM1-geen is suksesvol geamplifiseer en in 'n gisuitdrukkingsvektor gekloneer. Funksionele PCR-klone is suksesvol geselekteer deur komplementering van 'n FUM1-mutant wat deur integrerende rekombinasie geskep is. Die FUM1-geen is suksesvol uitgedruk in die gis *Saccharomyces cerevisiae* en die gis het verhoogde aktiwiteit getoon in die biotransformering van fumaarsuur na L-malaat.

LITERATUURVERWYSINGS

AUSUBEL, R.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A. & STRUHL, K. 1991. *eds. Current Protocols in Molecular Biology.*

BOEKE, J.D., XU, H. & FINK, R. 1988. A General Method for the Chromosomal Amplification of Genes in Yeast. **SCIENCE**, 239:280 - 282

BOONYARAT, D. & DOONAN, S. 1988. Purification and Structural comparisons of the cytosolic and mitochondrial fumarases from baker's yeast. **International Journal of Biochemistry**, 20:1125 - 1132

DAVIES, H.G., GREEN, R.H., KELLY, D.R., ROBERTS, S.M. 1992 *eds.* Biotransformations in preparative organic chemistry: The use of enzymes and whole cell systems in synthesis. London Academic Press Ltd 268p.

FIGUEIRIDO, Z.M.B. & CARVALHO, L.B. 1990. L-Malic acid production using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 30:217-224

GREEFF, S. 1993. **Klonering en uitdrukking van die mensgene vir granulosiet-makrofaag-stimuleringsfaktor(GM-CSF) EN granulosietkoloniestimuleringsfaktor (G-CSF).** Verhandlerling vir M.Sc.-graad, PU vir CHO.

HAMES, B.D. & RICKWOOD D. 1981. *eds.* Gel electrophoresis of proteins: a practical approach. England : IRL Press Limited. 290p.

HERZELMAN, L. 1994. **Die Fenotipiese heterogeniteit binne 'n Suid-Afrikaanse familie met osteogenesis imperfecta.** Verhandelng vir M.Sc.-graad, PU vir CHO.

INNES, M.A., GELFLAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J. 1990. *eds.* PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. California. Academic Press, Inc. 482p

KANAREK, L. & HILL, L. 1964. The preparation and Characterization of Fumarase from Swine Heart Muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, 239: 4202-4206.

LUMYONG, S. TAKAO, S. TOMITA, F. 1990. Organic acid production by *Monascus araneosus* AHU 9087 (In Joint Seminar on Biotechnology, December 22-26, 1990, Songkla, Thailand and Singapore: Microbial Utilization of Renewable Resources. 1990 Vol 7 : p166-174)

LUNDBLAD, V. 1992. Manipulation of Cloned Yeast DNA. (In Ausubel, R.M., Brent, R, Kingston, R.E, Moore, D.D, Seidman, J.G., Smith. J.A. & Struhl, K. 1991. *eds.* Current Protocols In Molecular Biology. 2:13.10.1-13.10.8)

MATHEWS, C.K. & VAN HOLDE, K.E. *eds.* 1996. Biochemistry. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1159p.

MOIR, D.I. & DAVIDOW L.S. 1991. Production of proteins by secretion from yeast (In Guthrie, C. & Fink, G.R., *eds.* Methods in ENZYMOLOGY. California.: Academic Pres. Inc. 194:491-507p.)

NEUFELD, R.J., PELEG, Y. ROKEM. J.S., Pines, O. & GOLDBERG, I. 1991. L-Malic acid formation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* amplified for fumarase. **Enzyme Microbial Technology**, 13:991-996.

PELEG, Y., STIEGLITZ, B., GOLDBERG, I. 1988. Malic acid accumulation by *Aspergillus Flavus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 28:69-75.

PELEG, Y., ROKEM, J.S., GOLDBERG, I & PINES, O. 1990. Inducible overexpression of the *FUM1* Gene in *Saccharomyces cerevisiae* : Localization of Fumarase and Efficient Fumaric Acid Bioconversion to L-Malic Acid. **Applied and Environmental Microbiology**, 56:2777-2783.

ROTHSTEIN, R.J. 1983. One-Step Gene Disruption in Yeast. (In Wu, R., Grossman, L. & Moldave, K., eds. *Methods in ENZYMOLOGY: Recombinant DNA*. London.: Academic Press, Inc. 101:202-211)

ROTHSTEIN, R.J. 1991. Targeting, Disruption, Replacement, and Allele Rescue: Integrative DNA Transformation in Yeast. (In Guthrie, C. & Fink, G.R., eds. *Methods in ENZYMOLOGY: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. California.: Academic Press. Inc. 194:281-301p).

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning - A laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour laboratory press.

SCHARF, S.J. 1990. (In Innes, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. 1990. eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. California. Academic Press, Inc. p85-91)

SCHNEIDER, J.C. & GUARENTE, L. 1991. Vectors for Expression of Cloned Genes in Yeast: Regulation, Overproduction, and Underproduction. (In Guthrie, C. & Fink, G.R., eds. *Methods in ENZYMOLOGY: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. California.: Academic Press. Inc. 194:373-388p).

STEYN, S.J. 1995. **Klonering en uitdrukking van die mensgeen vir Interleukin-3 (IL-3)**. Verhandelings vir MSc-graad, PU vir CHO.

TAKATA, I., YAMAMOTO, K., TOSA, I. CHIBATA, I. 1980. Immobilization of *Brevibacterium Flavum* with carrageenan and its application for continuous production of L-Malic acid. **Enzyme Microbial Technology**, 2:30-36.

VASAVADA, A. 1995. Improving Productivity of Heterologous Proteins in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Fermentations.(In Advances in Applied Microbiology. 41:25-54).

VERGEER, W.P. 1988. **Transfeksie van soogdiersellyne met pendelvektore vir die bestudering van transkripsionele reguleringsvolgordes in die mensgeen vir Pro- α 1(I)-kollageen.** Verhandeling vir MSc.-graad, PU vir CHO.

VOET, D. & VOET, J.G. eds. 1995. BIOCHEMISTRY. Second edition. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1361p.

WU, M. & TZAGOLOFF, A. 1987. Mitochondrial and Cytoplasmic Fumarases in *Saccharomyces cerevisiae* Are Encoded by a Single Nuclear Gene *FUM1*. **The Journal of Biological Chemistry**, 262:12215-12282.

YAMAMOTO, K., TOSA, T., YAMASHITA, K. & CHIBATA, I. 1976. Continuous Production of L-Malic Acid by Immobilized *Brevibacterium ammanioenes* cells. **European Journal of Applied Microbiology**, 3:169-183.

BEDANKINGS

My opregte dank aan die volgende persone en instansies:

- Prof. Piet Pretorius vir al u hulp en vriendelike leiding oor die afgelope aantal jare
- My ouers, broer en suster vir hul volgehoue liefde, ondersteuning, en finansiële bystand.
- Mandie vir haar liefde, geduld en hulp met die tik van hierdie verhandeling.
- Prof. Oubaas Pretorius vir al u hulp met metodes in gis-molekulêre biologie
- Al die nagraadse studente van Biochemie en Mikrobiologie. In die besonder wil ek vir Anina van Dyk en Johan Hendriks bedank vir hul belangstelling en hulp.
- Al my vriende vir hul aanmoediging
- Die SNO vir hul geldelike hulp tydens hierdie studie

SOLI DEO GLORIA