

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY  
V PRAZE**

KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**CUG kodon  
u patogenních kvasinek rodu *Candida***

Lucie Marečková

Poděkování patří především mé školitelce RNDr. Olze Hruškové-Heidingsfeldové, CSc. za seznámení mě s kolektivem laboratoře a za cenné rady při psaní mé bakalářské práce.

Prohlašuji, že bakalářskou práci na téma: CUG kodon u patogenních kvasinek rodu *Candida* jsem vypracovala sama s použitím uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Praha 2010

## Osnova:

1. Abstrakt .....	4
2. Abstract .....	5
3. Úvod .....	6
4. Odchytky od standardního genetického kódu .....	7-8
5. Hlavní molekulární evoluční teorie .....	8
5.1. Teorie „Codon capture“ .....	8-9
5.2. Teorie „Ambiguous intermediate“ .....	9-10
6. Původ ser-tRNA <sub>CAG</sub> .....	10-12
7. Struktura ser-tRNA <sub>CAG</sub> .....	12
7.1. Primární struktura ser-tRNA <sub>CAG</sub> .....	12-13
7.2. Sekundární a terciární struktura ser-tRNA <sub>CAG</sub> .....	14
7.2.1. Významné strukturní elementy ser-tRNA <sub>CAG</sub> .....	15
7.2.1.1. Antikodonová sekvence 5' CAG 3' .....	16
7.2.1.2. G33 místo U33 .....	16-17
7.2.1.3. Nemodifikovaný uracil na pozici 44 a antikodonová stopka ....	17-18
7.2.1.4. Determinanty pro seryl- i leucyl- tRNA-syntetáz.....	18-19
8. Charakterizace jednotlivých serinových a leucinových tRNA .....	19-20
9. Experimentální důkazy překladu leucinového CUG kodonu jako serin.....	20-22
10. Ekologie patogenních kvasinek rodu <i>Candida</i> .....	22-23
11. Vlastní experimentální práce.....	24
11.1. Patogenní kvasinka <i>C. parapsilosis</i> .....	24
11.2. SAP – sekretované aspartátové proteázy .....	25-27
11.3. Materiály a metody .....	28-32
11.4. Výsledky.....	33-34
12. Závěr .....	35
13. Použitá literatura .....	36-39

## 1. Abstrakt

Mnoho druhů kvasinek rodu *Candida* překládá standardní leucinový kodon CUG jako serin, ovšem ne v 100% případech. Ukázalo se, že dvojitá specifita CUG kodonu se vyvíjela pomocí mechanismu zahrnujícího dvojnásobné kódování zprostředkované unikátní tRNA<sub>CAG</sub>, která je *in vitro* častěji aminoacylována serinem než leucinem. Tato dvojnásobnost byla tolerována některými kandidami více jak 170 miliónů let. Prozatím nejlepším možným vysvětlením této tolerance je, že nestandardní překlad CUG způsobil vznik genové diverzity a umožnil produkci nového fenotypu odolnějšího vůči stresovým podmínkám. Důležitým krokem byla zároveň redukce negativního vlivu dvojnásobné translace pomocí klíčových mutací ve struktuře ser-tRNA<sub>CAG</sub>.

Kandidy se staly cenným experimentálním modelem pro objasnění změn v genetickém kódu. Zatímco byly důsledky dvojitého překladu CUG kodonu studovány hlavně u druhu *Candida albicans*, ve spojitosti s kvasinkou *Candida parapsilosis* nebylo toto téma prozatím diskutováno. Vyřešení struktury sekretované aspartátové proteázy Sapp1p z *C. parapsilosis* nám poskytlo nástroj ke studiu případů možného vlivu dvojnásobného překladu CUG kodonu. Gen *SAPP1* obsahuje jeden CUG kodon a na jeho místo dosazovaný serin se ve struktuře proteinu nachází ve smyčce v těsné blízkosti aktivního místa.

**Klíčová slova:** CUG kodon, kandidy, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, ser-tRNA<sub>CAG</sub>, dvojnásobný kodon

## 2. Abstract

In many *Candida* species the standard leucine CUG codon is translated as a serine, although not in 100% cases. This dual specificity of the CUG codon has evolved through a mechanism that required codon ambiguity mediated by a unique tRNA<sub>CAG</sub>, which is *in vitro* aminoacylated more often by serine than by leucine. This codon ambiguity has been tolerated for more than 170 million years. The explanation at least for now is that the CUG codon reassignment could have generated genetic diversity that facilitated occurrence of new phenotypes resistant to stress. Beside this, an important step was to reduce negative impact of the codon ambiguity by crucial mutations in the structure of the ser-tRNA<sub>CAG</sub>.

*Candida* species became a valuable experimental model for elucidation of the genetic code changes. While consequences of the CUG codon reassignment have been extensively studied in *Candida albicans*, this topic has not yet been addressed in *Candida parapsilosis*. Solving the structure of *C. parapsilosis* secreted proteinase Sapp1p provided a tool to carry out a “case study” of possible effects of the CUG codon ambiguity. The *SAPPI* gene contains one CUG codon, and the respective serine is located on the loop in the close proximity of the active site of the proteinase.

**Key words:** CUG codon, *Candida* spp., *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, ser-tRNA<sub>CAG</sub>, codon ambiguity

### 3. Úvod

F. Crick publikoval v roce 1968 hypotézu tzv. „frozen accident“ (hypotéza „zamrzlé náhody“), podle které náhodně vzniklý genetický kód po určité době vývoje a dosažení značné komplexity organismů už není dále měněn. Jeho hlavní úlohou měla být univerzálnost, tzn. měl být stejný u všech organismů. Každá jeho změna by byla letální nebo by byla odstraněna selekcí. Přesto byly později u řady organismů a některých buněčných kompartmentů nalezeny a zdokumentovány odchylky od tohoto standardního kódu (Osawa *et al.*, 1992). Většinu odchylek lze nalézt v mitochondriálním genomu, a u jaderné DNA jsou spojeny s nestandardním kódováním stop kodonů. Nicméně, v nedávné době byla vypořádána a popsána unikátní deviace od standardního kódování patogenních kvasinek rodu *Candida* a *Debaryomyces*, kde je CUG kodon pro leucin dekódován jako serin (Kawaguchi, *et al.*, 1989; Ohama *et al.*, 1993; Miranda *et al.*, 2006). Ukázalo se, že kodon CUG je dekódován zvláštní tRNA<sub>CAG</sub>, která je *in vitro* aminoacylována serinem místo leucinu (Santos *et al.*, 1993). Z porovnání struktur a biochemických analýz ser-tRNA a leu-tRNA vyvstalo několik možných teorií, pokoušejících se o vysvětlení evoluční a molekulární podstaty této změny. Doposud ale nebyla nalezena uspokojivá vysvětlení, proč se genetický kód vyvíjí a jaké jsou vlastně evoluční výhody tohoto vývoje.

Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky o významu nestandardní translace CUG kodonu u druhů patogenních kvasinek rodu *Candida* a nabídnout a ohodnotit výsledky dosavadních studií. V experimentální části mé bakalářské práce se věnuji přípravě prekurzoru sekretované aspartátové proteázy Sapp1p z kvasinky *C. parapsilosis*, jejíž gen obsahuje jeden CUG kodon. Pro-Sapp1p bude klíčovým proteinem pro zkoumání možného vlivu nestandardního překladu CUG kodonu na aktivaci a enzymatickou aktivitu proteázy v navazující diplomové práci.

## 4. Odchylky od standardního genetického kódu

Za posledních 30 let byla u prokaryot a v jádře a mitochondriích eukaryot objevena řada odchylek od původního genetického kódu (Tab. 1.) (Osawa et al., 1992):

- *Spiroplasma* a *Mycoplasma*<sup>1)</sup> kódují tryptofan nejen pomocí UGG, ale i UGA, jež standardně kóduje stop kodon.
- *Acetabularia*, *Tetrahymena* a *Paramecium*<sup>1)</sup> mají „release“ faktor, který se váže pouze na UGA, zatímco stop kodony UAA a UAG čtou jako glutamin.
- *Euplotes*<sup>1)</sup> používá UGA pro kódování cysteinu, UAG se u něj vůbec nevyskytuje a jediný terminační kodon je UAA.
- V mitochondriálním genomu živočichů bylo nalezeno nejvíce změn využití genetického kódu. Odchylky v kódování jsou u UGA, AUA, AAA, AGR a CUN (R= purin, N= jakýkoliv nukleotid). Kromě mutačního tlaku (mají až 82% AT) je zde významným evolučním faktorem ekonomizace genomu směřující k jeho zmenšení. Mitochondrie mají jen 22 tRNA, což stačí díky tomu, že tRNA nerozlišují vůbec purin a pyrimidin ve třetí poloze kodonu.
- Bylo zjištěno, že několik přirozeně se vyskytujících tRNA v kvasinkách a jiných eukaryotech je schopno s nízkou efektivitou překládat stop-kodony (Beier et al., 2001, Santos et al., 2004). Schopnost produkovat tyto přirozené „nonsense supresory“ byla udržována po celou dobu evoluce zřejmě proto, že měla dlouhodobý pozitivní efekt na životaschopnost.
- Řada druhů kvasinek rodu *Candida* a rodu *Debaryomyces* překládá CUG kodon pro leucin jako serin (Miranda et al., 2006).

---

<sup>1)</sup> *Spiroplasma* a *Mycoplasma* jsou parazitická prokaryota; *Euplotes*, *Paramecium* a *Tetrahymena* jsou prvoci patřící do kmene *Ciliophora* – nálevníci; *Acetabularia* patří do zelených řas - *Chlorophyta*

	U		C		A		G	
<b>U</b>	UUU	fenylalanin	UCU	serin	UAU	tyrosin	UGU	cystein
	UUC	fenylalanin	UCC	serin	UAC	tyrosin	UGC	cystein
	UUA	leucin	UCA	serin	UAA	<b>stop</b>	UGA	<b>stop</b>
	UUG	leucin	UCG	serin	UAG	<b>stop</b>	UGG	tryptofan
<b>C</b>	CUU	leucin	CCU	prolin	CAU	histidin	CGU	arginin
	CUC	leucin	CCC	prolin	CAC	histidin	CGC	arginin
	CUA	leucin	CCA	prolin	CAA	glutamin	CGA	arginin
	CUG	leucin	CCG	prolin	CAG	glutamin	CGG	arginin
<b>A</b>	AUU	izoleucin	ACU	treonin	AAU	asparagin	AGU	serin
	AUC	izoleucin	ACC	treonin	AAC	asparagin	AGC	serin
	AUA	izoleucin	ACA	treonin	AAA	lysin	AGA	arginin
	AUG	<b>metionin</b>	ACG	treonin	AAG	lysin	AGG	arginin
<b>G</b>	GUU	valin	GCU	alanin	GAU	kys.	GGU	glycin
	GUC	valin	GCC	alanin	GAC	asparagová	GGC	glycin
	GUA	valin	GCA	alanin	GAA	kys.	GGA	glycin
	GUG	valin	GCG	alanin	GAG	glutamová	GGG	glycin

Tab. 1.: Genetický kód.

Tato tabulka ukazuje všech 64 možných kodonů a aminokyseliny, které kódují (převzato a upraveno z <http://genetika.wz.cz/images/tabulka.gif>)

## 5. Hlavní molekulární evoluční teorie odchylek od standardního kódování

Existují dvě centrální molekulární evoluční teorie, které se pokouší o vysvětlení odchylek od standardního kódování.

### 5.1. Teorie „Codon Capture“ / „Codon Disappearance“ (Teorie zmizení kodonu)

(Osawa et al., 1992)

Evolučně neutrální teorie

Tato teorie tvrdí, že nejdůležitějším krokem je proces ztráty kodonu z kódovací sekvence. Hlavní silou působící změny je tzv. „GC nebo AT tlak“<sup>2)</sup>, díky kterému mohou některé kodony z genomu zcela vymizet a pak se následně ztratí i tRNA pro tento kodon. Tento vymizelý kodon se pak může v genomu znovu objevit mutací kodonu pro jinou aminokyselinu. Protože mu chybí odpovídající tRNA, není nejdřív překládán. Po nějaké době může vzniknout mutace také v antikodonu jiné tRNA a ta pak bude dosazovat ke změněnému kodonu jinou aminokyselinu. Mutovaná tRNA může postupně převládnout, až zcela vytěsňuje typ tRNA pro původní kodon.

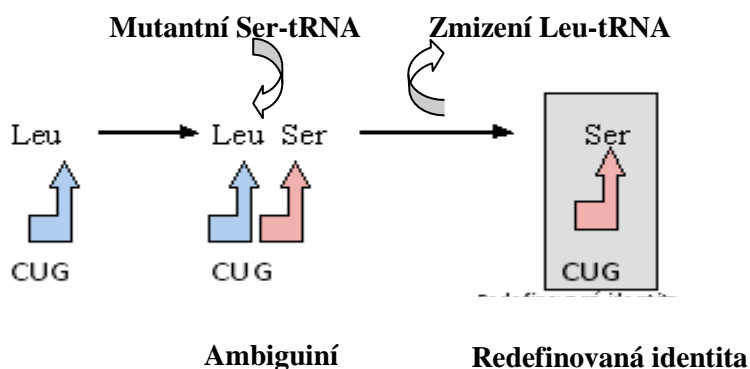


Příkladem působení „AT tlaku“ je *Mycoplasma capricolum* s nízkým podílem GC bází, kde CGG pro arginin nekóduje žádnou aminokyselinu. U bakterie *Micrococcus luteus*, naopak s vysokým obsahem GC nenajdeme některé kodony, které končí na A (AGA, AUA).

## 5.2. Teorie „Ambiguous intermediate“ (Teorie dvojznačného meziprojektu) (Schultz and Yarus, 1994)

Selekcí řízená teorie

Předpokládá se, že klíčovým okamžikem pro vznik odchylky v kódování je strukturální změna v tRNA. Tato změna poté umožní tRNA rozpoznat obdobný kodon, čímž nastane situace, kdy jeden kodon budou rozpoznávat zároveň dvě tRNA. Vznik takového dvojznačného kodonu umožní preferenci jedné z tRNA vlivem přirozeného výběru (obr. 1.). Právě tato dvojznačnost=ambiguita je klíčovým mezikrokem celého procesu. Jedním z příkladů této teorie může být dvojznačnost kodonu UGA. UGA kodon funguje u *Escherichia coli* jako stop kodon a zároveň jako kodon pro selenocystein.

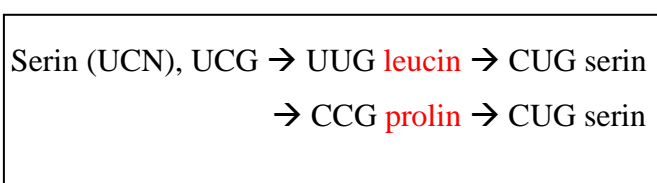


Obr. 1.: Nově vzniklá Ser-tRNA rozpoznávající leucinový CUG kodon vytlačila původní Leu-tRNA (upraveno podle Santos et al., 2005)

<sup>2)</sup> „GC respektive AT tlak“ vzniká nejspíše vlivem přirozeného výběru směřujícího k vyšší stabilitě DNA a úspornosti exprese, nebo následkem asymetrických oprav replikačních chyb. Během několika milionů let vývoje se může zvýšit obsah GC resp. AT i o několik desítek procent. To se projeví v úbytku kodonů s méně hojnými třetími basemi.

Existují i smíšené modely předešlých dvou teorií. Příkladem může být model **ztráty a zisku** (Sengupta and Higgs, 2005). Za ztrátu je považována např. delece genu pro tRNA nebo ztráta funkce překládaného genu způsobená mutací nebo zásadní modifikací antikodonu. Ziskem je míněn zisk nového typu tRNA pro nestandardně překládaný kodon nebo zisk nové funkce již existující tRNA díky mutaci umožňující ji párovat s tímto kodonem.

**Shrnutí:** Pomocí teorie Codon Capture nelze zcela vysvětlit odchylku od standardního čtení CUG kodonu. Jedním z důvodů je, že zastoupení GC/AT u kandid není stejné mezi chromozómy, tudíž je nepravděpodobné, že by kodony vymizely kvůli GC resp. AT tlaku ze všech chromozómů. Dalším důvodem je, že kodon pro serin UCN vyžaduje nejméně 2 mutace ke změně na leucinový CUG. Mnohem pravděpodobnější by bylo uchycení mutace už v mezikroku (obr. 2.) (Santos et al., 1995). Pro vysvětlení dvojznačnosti CUG kodonu u kandid se teorie „Ambiguous intermediate“ jeví jako pravděpodobnější, protože nevyžaduje tolik nepravděpodobných kroků jdoucích za sebou jako teorie „Codon capture“. Jedinou podmínkou a zároveň řídicí silou je prospěch těžící z nestandardního překládání. Obě teorie se ovšem nemusí v zásadě vylučovat. Např. snížení frekvence v užívání kodonu pomocí „GC / AT tlaku“ usnadní poté kodonu stát se dvojznačně překládaným. Méně kodonů znamená méně záměn, tudíž menší škody.

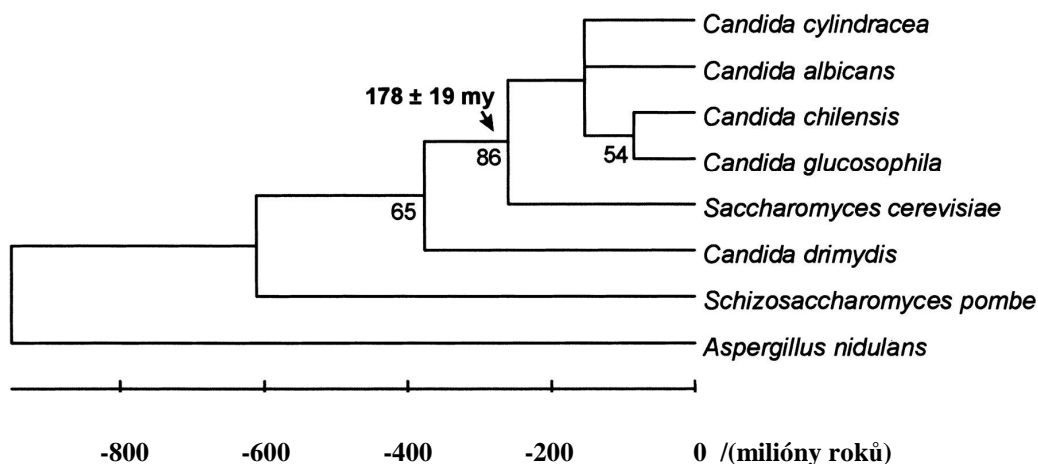


Obr. 2.: Jednotlivé kroky nutné při postupné záměně leucinového UCG kodonu na CUG serinový pomocí mutací

## 6. Původ ser-tRNA<sub>CAG</sub>

Samotná ser-tRNA<sub>CAG</sub> existovala u předka kandid zřejmě již před  $272 \pm 25$  miliony let. Nestandardní překlad CUG kodonu se objevil nejméně před  $171 \pm 27$  miliony lety (studie na základě sekvencí ser-tRNA<sub>CAG</sub>) nebo  $178 \pm 19$  miliony lety (studie na základě SSU rRNA).

Rody *Candida* a *Saccharomyces* se od sebe oddělily pravděpodobně před  $178 \pm 19$  miliony lety (obr. 3.) (Massey et al., 2003). Všechny kopie původní tRNA, která byla předkem ser-tRNA<sub>CAG</sub>, byly konvertovány na dnešní ser-tRNA<sub>CAG</sub> nebo z genomu vymizely.



Obr. 3.: Pravděpodobné místo divergence nestandardního překladu CUG kodonu.

Metoda založená na srovnání sekvencí SSU rRNA. Jako outgroup vůči všem SSU rRNA jednotlivých druhů kvasinek byla zvolena SSU rRNA kvasinky *Aspergillus nidulans*. Vespod je vyznačena časová osa. (převzato a upraveno podle Massey et al., 2003)

Analýza zastoupení kodonů pro leucin v otevřených čtecích rámcích 65 genů u kvasinky *C. albicans* ukázala, že nejčastěji používaným kodonem je UUA/G, kdežto rodina kodonů CUN, do které patří CUG, je užívána zřídka. Většina původních CUG u *C. albicans* mutovala na leucinové kodony UUA (27,8 %) a UUG (25,3 %) (Santos et al., 1995). Nízké zastoupení CUG kodonu dobře koreluje s nízkou hojností ser-tRNA<sub>CAG</sub> (Santos et al., 1993; Santos et al., 1995). Srovnání genomů *C. albicans* a *S. cerevisiae* ukázalo jak je všech 17 000 CUG kodonů z *C. albicans* representováno v *S. cerevisiae*. Zajímavým zjištěním bylo, že většina současných CUG kodonů přítomných v genomu *C. albicans* odpovídala kodonům pro serin v *S. cerevisiae*, tudíž se pravděpodobně vyvinula nedávno z kodonů pro serin. Pouze malá frakce CUG kodonů (0,2%) z *C. albicans* existovala analogicky v *S. cerevisiae* jako kodon pro leucin. To znamená, že většina **původních** CUG z genomu *C. albicans* vymizela. Rozdílné zastoupení CUG kodonu bylo nalezeno u druhu *C. cylindracea*. CUG kodon kvasinky *C. cylindracea* je na rozdíl od CUG kodonu u *C. albicans* hojně využíván (Suzuki et al., 1994; Santos et al., 1995).

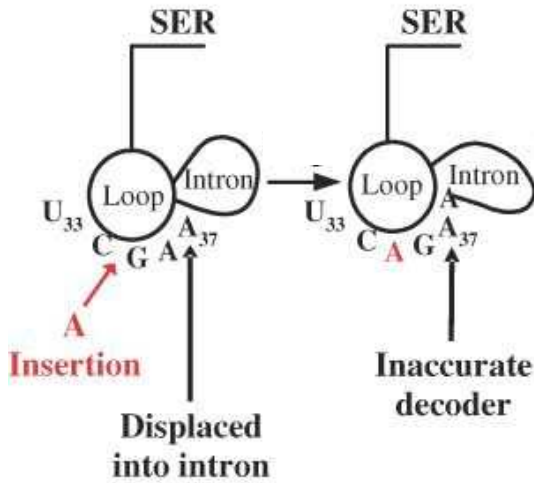
Vznik ser-tRNA<sub>CAG</sub> společně s působením „AT tlaku“ na třetí pozici kodonu byly zřejmě hlavními evolučními silami, které svým působením zapříčinily dnešní převahu UUN kodonů pro leucin nad CUG kodonem u kvasinky *C. albicans* (Massey et al., 2003).

## 7. Struktura ser-tRNA<sub>CAG</sub>

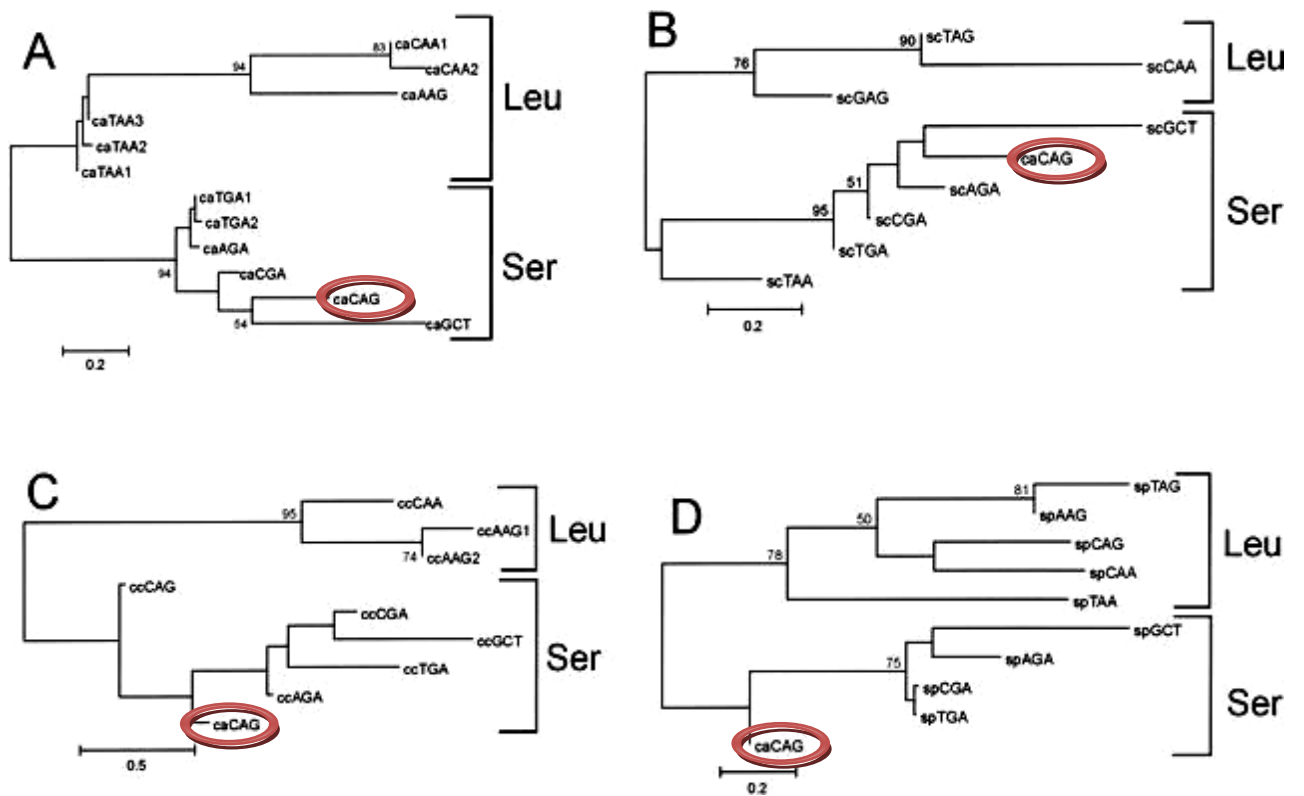
Nestandardní překlad CUG kodonu jako serin místo leucinu v cytoplasmě kandid je zprostředkován strukturálními změnami translační mašinerie. Tyto změny se odrážejí v unikátních vlastnostech ser-tRNA<sub>CAG</sub>. Ser-tRNA<sub>CAG</sub> je rozpoznávána jak seryl- tak i leucyl-tRNA syntetázou.

### 7.1. Primární struktura ser-tRNA<sub>CAG</sub>

Srovnání sekvencí ser-tRNA<sub>CAG</sub> z *C. albicans* se sekvencemi tRNA II. třídy z *S. cerevisiae*, *Sz. pombe*, *C. cylindracea* a *C. albicans* ukázalo, že ser-tRNA<sub>CAG</sub> vykazuje větší identitu se serinovými tRNA než s leucinovými (obr. 4.). Srovnání sekvencí ser-tRNA<sub>CAG</sub> *C. albicans* a ser-tRNA<sub>CGA</sub> *C. guilliermondii* poukazuje na společného předka. Navíc inserce adeninu do sekvence antikodonu CGA dá vzniknout CAG antikodonu a přidá adenin na 5' konec intronu, který můžeme dneska nalézt u kvasinky *C. cylindracea* (obr. 5.). To poukazuje na to, že ser-tRNA<sub>CAG</sub> je spíše serinová tRNA. Výsledek souhlasí se strukturální analýzou, která demonstruje, že struktura ser-tRNA<sub>CAG</sub> je bližší struktuře serinové tRNA (diskutováno v kap. 7.2.) (Perrau et al., 1999).



Obr. 5.: Inzerce adeninu do sekvence CGA antikodonu ser-tRNA (převzato a upraveno z Miranda et al., 2006)

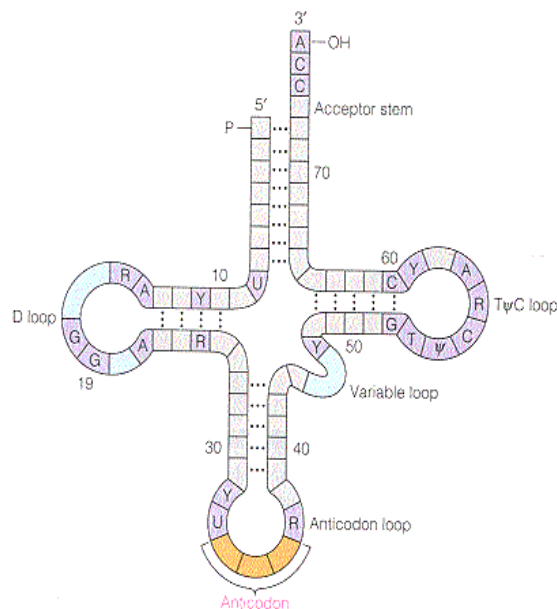


Obr. 4.: Stromy serinových a leucinových tRNA z *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *C. cylindracea* a *Schizosaccharomyces pombe*. Srovnání se ser-tRNA<sub>CAG</sub> *C. albicans* (označena červeně). (A) Serinové a leucinové tRNA z *C. albicans*. (B) Serinové a leucinové tRNA z *S. cerevisiae*. (C) Serinové a leucinové tRNA z *C. cylindracea*. (D) Serinové a leucinové tRNA z *Sz. pombe* (převzato a upraveno podle Massey et al., 2003)

## 7.2. Sekundární a terciární struktura ser-tRNA<sub>CAG</sub>

Struktura obecné tRNA je vysoce konzervovaná. Tvoří charakteristickou sekundární strukturu jetelového listu s pěti rameny (obr. 6.):

- Akceptorové rameno má 7 párů basí. Na 3' konci se nachází absolutně konzervovaná sekvence tří nukleotidů CCA, na kterou se váže patřičná aminokyselina.
- D-rameno má 4 páry basí a smyčku (D-loop), která obsahuje dihydrouridin. Ve smyčce mohou někdy chybět báze 20:1, 20:2 a 17:1.
- T $\psi$ C rameno má pět párů basí ve stonku. Je nazvané podle absolutně konservované trojice bází (T, pseudouridin, C) ve smyčce (T $\psi$ C loop).
- Antikodonové rameno je složeno ze stopky, která obsahuje pět párujících bází, a ze smyčky obsahující sedm nepárujících bází, která nese antikodonovou sekvenci (nukleotidy 34-36).
- Nejvariabilnějším úsekem tRNA je Variabilní rameno, které může být 5-21 nukleotidů dlouhé. Podle jeho délky rozdělujeme tRNA do tříd: I. třída má délku extra ramena kratší než 10 nukleotidů, II. třída má délku delší než 10 nukleotidů. Leu-tRNA a ser-tRNA jsou členy II. třídy (Dirheimer et al., 1995; Perreau et al., 1999).



Obr. 6.: Sekundární struktura obecné tRNA

Podle sekvence antikodonu by tRNA<sub>CAG</sub> měla být leucinová tRNA. Nicméně srovnání struktur ser-tRNA kvasinky *C. albicans* se strukturami leu-tRNA a ser-tRNA u kvasinky *S. cerevisiae* poukazuje na větší procento identity se serinovou tRNA.

### 7.2.1. Významné strukturní elementy ser-tRNA<sub>CAG</sub>

Struktura ser-tRNA<sub>CAG</sub> z *C. albicans* je znázorněná na obr. 7.

Souhrn významných strukturních elementů v ser-tRNA<sub>CAG</sub>:

- Antikodonová sekvence 5' CAG 3', která je schopna dekodovat CUG kodon
- Nukleotid guaninu hned za 5' antikodonovým tripletem, tzn. na pozici č. 33 (dále značený jako G33)
- Nemodifikovaný uracil na pozici 44 (U44) a antikodonová stopka
- Obsah klíčových determinant jak pro rozpoznání seryl-tRNA-syntetázou, tak i leucyl-tRNA-syntetázou (viz. kap.7.2.1.1-4.).

Výjimky tvoří ser-tRNA<sub>CAG</sub> v *C. tropicalis*, která má většinou C33 místo G33, ser-tRNA<sub>CAG</sub> v *C. cylindracea*, která má A37 místo m<sup>1</sup>G37 a U73 (diskutováno níže) (Kawaguchi et al., 1989, Ohama et al., 1993, Tuite et al., 1996).



Obr. 7.: Struktura Ser-tRNA<sub>CAG</sub> *C. albicans* s číselně vyznačenými pozicemi nukleotidů tak, jak jsou v práci používány. (převzato a upraveno ze Santos et al., 1996)

### 7.2.1.1. Antikodonová sekvence 5' CAG 3'

Za možnou příčinu vzniku CAG antikodonu, který umožnil čtení leucinového CUG kodonu, se považuje inserce adenosinu do antikodonové sekvence CGA Ser-tRNA<sub>CGA</sub> (Miranda et al., 2006). Aby původní tRNA udržela správnou trojrozměrnou strukturu modulující správné párování kodon-antikodon, musela se s touto inzercí „vyrovnávat“ pomocí dalších mutačních změn.

### 7.2.1.2. G33 místo U33

Rozhodujícím prvkem pro vznik nestandardního kódování CUG a jeho udržení by mohla být záměna uridinu na pozici 33 za guanin. Seryl-tRNA<sub>CAG</sub> je jediná tRNA, která obsahuje na antikodonovém ramenu v pozici 33 G místo U (Yokogawa et al., 1992; Santos et al. 1993). Uridin v pozici 33 je odpovědný za správný U-ohyb antikodonové smyčky, který hraje klíčovou roli při interakci kodonu s antikodonem. Záměna U za G nebo A má za následek častější výpadky z A místa na ribozomu (Dix et al., 1986). Vysvětlením by mohla být větší velikost G, která neumožňuje správný ohyb a tudíž snižuje efektivitu nasedání seryl-tRNA<sub>CAG</sub> na CUG kodon (Santos et al., 1995).

K zjištění jaký bude mít vliv záměna 33G za jiné báze v ser-tRNA<sub>CAG</sub>, byl do plasmidu v kvasince *S. cerevisiae*<sup>3)</sup> vložen DNA fragment z *C. albicans*, který obsahoval gen pro ser-tRNA<sub>CAG</sub>, nebo jeho mutantní varianty. Divoký typ ser-tRNA<sub>CAG</sub> z *C. albicans* obsahuje guanin na pozici 33. Tato ser-tRNA<sub>CAG</sub> byla mutována tak, aby obsahovala různé nukleotidy na pozici 33 (Santos et al., 1996). Výsledná data ukázala, že U na pozici 33 v ser-tRNA<sub>CAG</sub> je pro kvasinku *S. cerevisiae* letální. Příčina by mohla být ta, že ser-tRNA<sub>CAG</sub> s G33 není tak velkým kompetitorem pro endogenní leu-tRNA<sub>CAG</sub> jako ser-tRNA<sub>CAG</sub> s U33. Ostatní alternativy vedly k mírnému snížení růstu kvasinky. Překvapivě nízký vliv na snížení růstu měla mutace C33. Jelikož se C a U v pozici 33 na ribozom váží stejně silně, očekával se podobný efekt jako u mutace U33 (Curran and Yarus, 1986). Je zřejmé, že když U33 v heterologní ser-tRNA<sub>CAG</sub> u *S. cerevisiae* není slučitelný se životem, tak se změna překladu CUG nemohla objevit v běžné tRNA s U v pozici 33 ani u předka kandid.



Dále byla srovnána efektivita dekódování všech variant ser-tRNA<sub>CAG</sub> u beta-galaktosidázy v *S. cerevisiae*. Efektivita dekódování byla měřena prostřednictvím aktivity tohoto enzymu. Nejnižší aktivita byla naměřena u ser-tRNA<sub>CAG</sub> A33 a G33. Z experimentů vyplývá, že ser-tRNA<sub>CAG</sub> je funkční i v kvasince *S. cerevisiae* a ta je schopná v nízkých koncentracích nesprávný překlad CUG tolerovat. Mohli bychom si představit, že podobný mírný negativní vliv nastal i u předka kandid, když se změna v kódování objevila. Protože kodon CUG z genomu kandid nevyumizel, musel být jeho překlad řízen selekcí. Jaká tedy byla prvotní selekční výhoda pro udržení téhle dvojznačnosti? Možné vysvětlení podává experiment M. A. S. Santose z roku 1996, z něhož vyplývá, že chybná translace CUG může u *S. cerevisiae* indukovat produkci některých Hsp<sup>4)</sup> proteinů. Takhle získaná termotolerance mohla hrát důležitou roli při kolonizaci nových nik (Santos et al., 1996). Zajímavé je, že kandidy tolerují i teploty mírně vyšší jak 37 °C, přitom u většiny ostatních kvasinek se růstové optimum pohybuje mezi 25 a 30 °C (Calderone, 2002). Dále byla vyzorována zvýšená tolerance k těžkým kovům, některým lékům, etanolu, oxidantům a chloridu sodnému (Santos et al., 1999).

### 7.2.1.3. Nemodifikovaný uracil na pozici 44 a antikodonová stopka

Podle studie Perreau et al., 1999, kde se srovnávaly struktury ser-tRNA<sub>CAG</sub> z *C. albicans* s leu-tRNA<sub>m5CAA</sub><sup>5)</sup> a ser-tRNA<sub>IGA</sub> z *S. cerevisiae*, může za atypickou strukturu ser-tRNA<sub>CAG</sub> vedoucí ke snížení efektivit vazby na ribozom vzájemné působení změn G33 a U44. Všechny ser-tRNA z *S. cerevisiae* a všechny ser-tRNA kromě ser-tRNA<sub>CAG</sub> z *C. cylindracea* obsahovaly modifikovaný Um<sup>6)</sup> na pozici 44. Ser-tRNA<sub>CAG</sub> měly na této pozici nemodifikovaný uracil. Um je důležitý pro interakci s G26 a tím i pro správnou terciární strukturu. Největším rozdílem mezi ser-tRNA<sub>CAG</sub> a ser-tRNA<sub>IGA</sub> z *S. cerevisiae* byl atypický ohyb ve struktuře antikodonu ser-tRNA<sub>CAG</sub>, způsobený G33 a U44. Ten má nejspíš vliv na snížení efektivit párování kodon-antikodon (Perreau et al., 1999).

---

<sup>3)</sup> Důvod, proč byla použita *S. cerevisiae* byl ten, že *S. cerevisiae* a *C. albicans* mají podobné zastoupení GC a podobné využívání kodonů a CUN rodina je u obou využívána zřídka.

<sup>4)</sup> Hsp = heat shock protein = proteiny teplotního šoku. Některé Hsp proteiny fungují jako chaperony, proteiny významně napomáhající dosažení správné prostorové konformace proteinů.

<sup>5)</sup> m5C = methylovaný cytosin, 5-methylcytosin

<sup>6)</sup> Um = methylovaný uridin, 2'-O-methyluridin

„Extended anticodon theory“ (Teorie prodlouženého antikodonu) říká, že vystavení antikodonového tripletu je zvýšeno selekcí odpovídajících si sekvencí antikodonové smyčky a antikodonové stopky. Dovoluje tudíž predikci antikodonové stopky, tak aby byl antikodonový triplet efektivní. Např. aby byla 5´CAG3´efektivním „dekodérem“ musí mít nukleotidy na stopce takovéto uspořádání: Py27-Pu43, Py28-Pu42 a G30-C40 nebo C30-G40. (Pu= purin, Py= pyrimidin)(Yarus, 1982; Perreau et al., 1999). Ser-tRNA<sub>CAG</sub> z *C. albicans* má ovšem Pu27-Py43 a Pu28-Py42. Podobný výskyt dvou Pu-Py místo Py-Pu na vrcholu antikodonové stopky se vyskytuje u serinových tRNA (např. ser-tRNA<sub>IGA</sub> u *C. cylindracea*). To podporuje hypotézu, že se ser-tRNA<sub>CAG</sub> vyvíjela původně ze serinové tRNA, a ne z leucinové. Ser-tRNA<sub>CAG</sub> u *C. cylindracea* obsahuje Py28-Pu42 a je oproti ser-tRNA<sub>CAG</sub> z *C. albicans* efektivnějším „dekodérem“. Lze tedy předpokládat, že uspořádání Py27-Pu43, Py28-Pu42 hraje v efektivitě také významnou roli.

#### 7.2.1.4. Determinanty pro seryl- i leucyl- tRNA-syntetázu

Úkolem aminoacyl-tRNA-syntetáz je specificky vázat aminokyselinu na její správnou tRNA. Je jich přesně 20, tj. každá je specifická pro jednu aminokyselinu a všechny její tRNA. S tRNA interagují tak, že se jí přímo dotýkají na konci akceptorového ramena, na antikodonovém ramenu a ve středové oblasti D-ramena.

Ser-tRNA<sub>CAG</sub> obsahuje ve své struktuře jak determinanty pro seryl-tRNA-syntetázu, tak i pro leucyl-tRNA-syntetázu:

- **Determinanty pro seryl-tRNA-syntetázu:**

G na pozici 73, kde je záměna G73 za A73 dostačující ke změně leu-tRNA na serinový akceptor (Breitschopf, et al., 1994).

- **Determinanty pro leucyl-tRNA-syntetázu:**

m1G na pozici 37 a A na pozici 35 (Tuite et al., 1996).

Tato kombinace determinant pro dvě různé aminoacyl-tRNA-syntetázy by mohla poukazovat na problémy s nejasnou aminoacylací. Předcházející studie (Suzuki et al., 1994) ukazuje, že pouze 3% ser-tRNA<sub>CAG</sub> u *C. zeylanoides* jsou aminoacylována leucinem, ve zbylých

97 % to byl serin. U *C. cylindracea*, u které je nukleotid m1G<sup>7)</sup> zaměněn za A37, je tato tRNA kompletně aminoacylována pouze serinem. Přítomnost m1G37 v ser-tRNA<sub>CAG</sub> mohla být jednoduše adaptivní mutace vzniklá hned poté, co serinový kodon mutoval na CAG. Kodon m1G37 je totiž typický pro všechny tRNA, které čtou C G/Y N kodony (Björk et al., 1987).

## 8. Charakterizace jednotlivých serinových a leucinových tRNA

U druhu *C. cylindracea* byla zjištěna poměrně vysoká frekvence ve využívání CUG kodonu. U ostatních druhů kandid je tomu právě naopak (tab. 2.). Žádná ze zkoumaných sekvencí u *C. cylindracea* neobsahovala kodony CUA a UUA. Proto byla *C. cylindracea* shledána jako výborný model pro zkoumání důsledků nestandardního překlada CUG kodonu. (Tuite et al., 1996).

K charakterizaci a určení struktury ser-tRNA a leu-tRNA byly z kvasinky *C. cylindracea* vyizolovány a purifikovány 3 leucinové a 5 serinových izoakceptorových tRNA (Suzuki et al., 1994). Výsledky práce jsou zpracovány v tab. 3.

Kodon	Sc	Cm	Ca	Cc	Ct
UUA	26,3	35,7	33,0	0,0	17,0
UUG	27,1	48,1	37,1	42,9	59,7
CUU	12,1	8,6	9,3	13,5	6,5
CUC	5,4	1,9	2,2	41,1	2,5
CUA	13,4	1,2	2,7	0,0	0,6
CUG	10,4	1,4	2,3	33,5	0,9

Tab. 2.: Procentuální zastoupení jednotlivých kodonů pro leucin u pěti druhů kvasinek.

Sc= *Sacharomyces cerevisce*, Cm= *Candida maltosa*, Ca= *Candida albicans*, Cc= *Candida cylindracea*, Ct= *Candida tropicalis* (převzato a upraveno podle Tuite et al., 1996)

<sup>7)</sup> m1G = methylovaný guanin, 1-methylguanin

amino acid	codon	anticodon	tRNA		
Leu	UUA	CmAA	Leu1		
	UUG				
	CUU	IAG	Leu2 Leu3		
	CUC				
CUA					
	<b>CUG</b>	CAG	Ser1		
Ser	UCU	IGA	Ser3		
	UCC				
	UCA			cm <sup>5</sup> UGA	Ser2
	UCG			CGA	Ser4
	AGU	GCU	Ser5		
AGC					

Tab. 3.: Leucinové a serinové tRNA v *C. cylindracea* a příslušné kodony.

Kodon UUG dekóduje Leu1-tRNA s CmAA antikodonem. CUU, CUC a CUA dekódují Leu2-tRNA a Leu3-tRNA, obě s IAG antikodonem. Zatímco CUG kodon je dekódován Ser1-tRNA<sub>CAG</sub>. Ser2-tRNA, Ser3-tRNA a Ser4-tRNA s antikodonovými sekvencemi cm<sup>5</sup>UGA, IGA a CGA dokáží přeložit všechny kodony z UCN boxu (N = jakýkoliv z nukleotidů A, C, G, U). Zbývající Ser5-tRNA s GCU antikodonem překládá AGU a AGC kodony, (I = inosin), (upraveno podle Suzuki et al., 1994).

## 9. Experimentální důkazy překlada leucinového CUG kodonu jako serin

*In vitro* translace několika mRNA obsahujících CUG kodon za přítomnosti ser-tRNA<sub>CAG</sub> vedla ke zvýšení molekulové hmotnosti polypeptidu na SDS-PAGE (Santos et al., 1990). Očekávalo se, že pokud by tRNA<sub>CAG</sub> z *C. albicans* přepisovala CUG kodon jako serin, tak by poté výsledný protein vykazoval větší mobilitu, protože molekulová hmotnost serinu (105,1) je menší než leucinu (131,2). Výsledkem byl ovšem protein, který se pohyboval pomaleji než původní. Soudilo se, že příčinou by mohla být inkorporace modifikovaného serinu (např. fosforylací). Tato možnost byla pomocí několika experimentů zavržena:

Změna v mobilitě byla pozorována i přes ošetření produktu translace střešní nebo bakteriální alkalickou fosfatázou (Santos et al., 1990). Dále byl k objasnění této možnosti v kvasince *C. albicans* exprimován gen *RPB1* (rapamycin-binding protein), který byl modifikován tak, aby obsahoval 2 CUG kodony. Tato studie potvrdila, že na místo CUG kodonu je vkládán serin a nikoliv modifikovaný serin (Santos et al., 1995). Nejpravděpodobnějším vysvětlením pro změnu

mobility je záměna hydrofobního leucinu za polární serin, který nejspíš ovlivnil schopnost vázat SDS. Výsledkem bylo zpomalení migrace proteinu v gelu.

Závěrem *in vitro* studie na králíčích mRNA alfa a beta globinu obsahujících CUG kodony byla schopnost unikátní ser- tRNA<sub>CAG</sub> z *C. albicans* translatovat terminační kodony UAG a UGA (Tuite et al., 1989, Santos et al., 1993, Moura et al., 2002). Vzhledem k tomuto výsledku, nemohlo být vyloučeno, že za sníženou mobilitu výsledného polypeptidu by nemusela být odpovědná záměna leucinu za serin ale translační pročtení (readthrough) stop kodonů, nebo obojí. Proto byl zkonstruován nový systém mRNA, který postrádal CUG kodony, aby demonstroval, že vznik aberantního proteinu není následkem pročtení nebo jiné nestandardní translační události. To prokázaly následující experimenty:

Nejdříve bylo testováno, zdali je za přítomnosti ser-tRNA<sub>CAG</sub> aberantně translatován i UAA stop-kodon. Pro experiment byly použity mRNA tří genů končící UAA stop-kodonem: *CAT*, *HSP26* a *TEF1*. Transkripty byly translatovány *in vitro* za přítomnosti ser-tRNA<sub>CAG</sub>. Polypeptidy z *TEF1* a *CAT* genu vykazovaly podobnou elektroforetickou mobilitu jako jejich polypeptidy divokého typu. Polypeptid vzniklý překladem genu *HSP26* měl mírně vyšší molekulovou hmotnost oproti polypeptidu divokého typu. Z výsledků vyplývalo, že různá elektroforetická mobilita není důsledkem pročtení UAA terminačního stop-kodonu, nýbrž že je specifická pro danou mRNA a z ní překládaný protein. Dále byl proveden experiment pokoušející se opakovat výsledky předešlé studie, zdali je ser-tRNA<sub>CAG</sub> schopná translatovat terminační kodony. Pro experiment byly zhotovené 4 mRNA, které obsahovaly dva geny: *ENO* a *GFP*, které byly od sebe odděleny pomocí speciální krátké sekvence. Do této sekvence byly postupně vloženy stop kodony UAG, UGA, UAA a jedna sekvence zůstala jako kontrolní. Zhotovené mRNA byly translatovány *in vitro* za přítomnosti ser-tRNA<sub>CAG</sub>. Hmotnost kontrolního produktu byla 67kDa, což odpovídalo plné délce chimérického genu. Translace ostatních mRNA vyprodukovala polypeptidy poloviční hodnoty. Výsledkem tohoto pozorování byl závěr, že ser-tRNA<sub>CAG</sub> z *C. albicans* nemá schopnost dekódovat ani jeden ze tří stop-kodonů (Moura et al., 2002).

Po zavržení možnosti, že by za sníženou mobilitu mohlo pročtení terminačních kodonů, bylo na řadě se utvrdit v názoru, že se jedná o úkaz zapříčiněný záměnou leucinu za serin. Experiment byl proveden následovně: Cistron proteinu pláště viru BMV obsahoval 4 CUG kodony. Ty byly mutovány tak, aby vytvořily 4 varianty s jedním CUG na různém místě. Varianty byly translatovány *in vitro* za přítomnosti nebo nepřítomnosti ser-tRNA<sub>CAG</sub>. Pouze jedna ze čtyř mutací vedla ke změně mobility virového proteinu. Výsledné zjištění vedlo

k závěru, že jedna záměna leucinu za serin je sice dostačující ke změně mobility v gelu, ale důležitou roli hrálo zejména umístění mutovaného kodonu a tedy umístění serinu v proteinu (Moura et al., 2002).

**Shrnutí:** Z předcházejícího výčtu pokusů o experimentální ověření záměny leucinu za serin při překladu CUG kodonu serinovou tRNA<sub>CAG</sub> plyne, jak nesnadné je pomocí současných dostupných metod provést kvalitní průkazný experiment týkající se této záměny. Vhodné metody pro experimentální ověření této aminokyselinové záměny by mohly být ty, jejichž závěrečným krokem by byla MS – hmotnostní spektroskopie, která dokáže určit hmotu molekuly s vysokou přesností.

## 10. Ekologie patogenních kvasinek rodu *Candida*

Rod *Candida* je velmi diverzifikovaná skupina kvasinek zahrnující i patogenní druhy. Patogenní kandidy patří mezi oportunistické patogeny využívající momentální dysfunkci imunitního systému hostitele. Některé druhy jako je např. *Candida parapsilosis* jsou běžnou součástí mikroflóry lidské kůže nebo povrchů sliznic. Výskyt onemocnění způsobených kandidami dramaticky vzrostl za posledních pár desítek let. Nejhojnějším druhem je *Candida albicans*, která je nyní považována za čtvrtého nejčastějšího původce infekcí krevního oběhu. Ostatní druhy kandid tvoří až 50 % všech závažných případů kandidóz (Haynes, 2001).

Hlavními faktory, které zásadně ovlivňují virulenci, jsou:

- Adherence na hostitelskou tkáň
- Tvorba biofilmů a kolonizace lékařského vybavení (zejména plastové povrchy)
- Sekrece hydroláz

Hlavně sekretované aspartátové proteázy (SAP), které slouží k inaktivaci hostitelských defenzivních molekul, poskytování živin, ničení bariér při vnikání do hostitelského organismu.

- Metabolická odpověď na změny v prostředí

Schopnost odpovídat na změny v prostředí je důležitou potřebou každého úspěšného organismu. Schopnost odolávat teplotnímu šoku mohla vést ke schopnosti kolonizace nových nik. Jednou z nich mohlo být v minulosti lidské tělo. Dnes kandidy úspěšně kolonizují nové niky vzniklé nadbytečným využíváním antibiotik, která ničí naši přirozenou bakteriální bariéru.

## 11. Vlastní experimentální práce: Příprava prekurzoru sekretované aspartátové proteázy Sapp1p z *C. parapsilosis*

### 11.1. Patogenní kvasinka *C. parapsilosis*

*C. parapsilosis* je typickým komenzálem lidské kůže a je jednou z nejčastějších kvasinek izolovaných z lidských rukou (Trofa et al., 2008). Průměrná mortalita pacientů s fungemiemi *C. parapsilosis* se pohybuje v závislosti na vnějších faktorech (věk pacientů, stav imunitního systému pacientů, geografická poloha apod.) mezi 4 až 45% (Trofa et al., 2008).

Ještě před nástupem sekvenačních metod existovalo povědomí o tom, že se pod množinou organismů nazývaných *C. parapsilosis* skrývá několik navzájem odlišných skupin (skupina I, II, III.). Nebyl ovšem důvod mezi nimi rozlišovat, protože mikroorganismy se dříve charakterizovaly na základě jejich schopnosti utilizovat a zkvašovat různé sacharidy. Jednotlivé skupiny *C. parapsilosis* se od sebe touto schopností nelišily. Až nástup nových molekulárně genetických metod vedl k odhalení významných rozdílů v genomech těchto tří skupin a k rozdělení *C. parapsilosis* na tři odlišné druhy: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* a *C. metapsilosis* (Tavanti et al., 2005, Trofa et al., 2008).

Genom *C. parapsilosis* byl osekvenován skupinou The Sanger Institute Pathogen Genomics group ve spolupráci s K. Wolfem, G. Butler a N. Gowem a byl publikován v roce 2009 neanotovaný (Butler et al., 2009). Genom je veřejně přístupný na internetových stránkách institutu:

<http://www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/parapsilosis/>

Na těchto stránkách lze používat funkci BLAST, ale nelze vyhledávat jednotlivé geny podle názvu. Další nepříjemný důsledek chybějící anotace je, že informace týkající se *C. parapsilosis* nejsou uceleně prezentovány na jedné spravované stránce, jako je tomu u anotované *C. albicans* nebo *S. cerevisiae*, ale jsou rozesety neorganizovaně po více databázích, což způsobuje značné komplikace v hledání a shromažďování faktů.

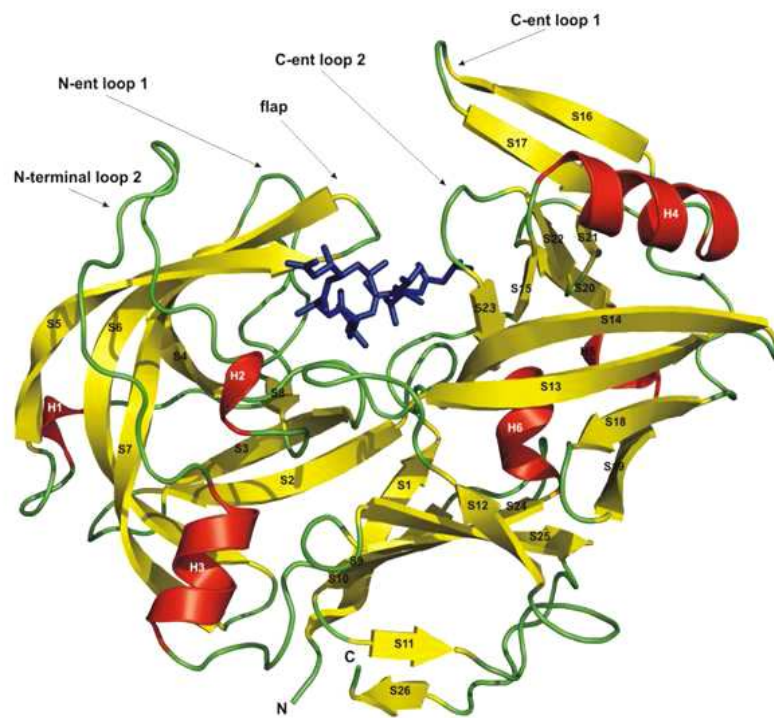


## 11.2. SAP – sekretované aspartátové proteázy

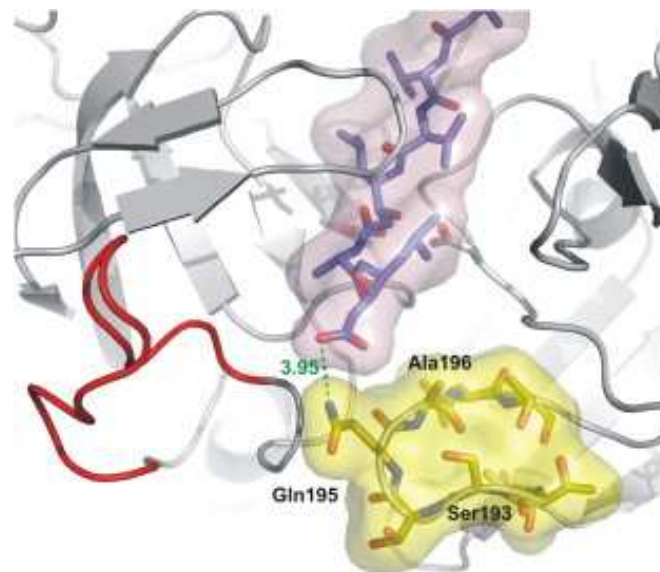
Sekretované aspartátové proteázy jsou považovány za jeden z nejvýznamnějších virulentních faktorů kandid, proto se jejich inhibitory začaly testovat jako antimykotika (Weig et al., 2007). Lepší porozumění struktuře a funkci sekretovaných aspartátových proteáz nám umožní rozšířit znalosti týkající se především vstupu kandid do organismu a tak podpořit možné přístupy k prevenci u pacientů, u kterých je zvýšené riziko nákazy a vzniku nebezpečného systémového rozšíření. Extracelulární proteázy se vyskytují i u jiných patogenních hub, např. u *Aspergillus niger* nebo *Neurospora crassa* a zastávají spoustu důležitých funkcí jak v patogenezí, tak v metabolismu kvasinky (slouží k inaktivaci hostitelských defenzivních molekul, poskytování živin, ničení bariér při vnikání do hostitele) (Ogrydziak, 1993; Naglik et al., 2003). U *C. albicans* existuje rodina 10 genů SAP (Monod et al., 1994; Naglik et al., 2003; Hruskova-Heidingsfeldova, 2008). *C. albicans* není jediným druhem kandid produkujícím sekretované aspartátové proteázy. Geny SAP byly nalezeny také u *C. dubliniensis* (Gilfillan et al., 1998; Naglik et al., 2003), *C. tropicalis* (Monod et al., 1994; Naglik et al., 2003; Hruskova-Heidingsfeldova, 2008) a *C. parapsilosis* (de Viragh et al., 1993; Monod et al., 1994; Naglik et al., 2003; Hruskova-Heidingsfeldova, 2008). Ve srovnání s *C. albicans*, vykazuje *C. parapsilosis* nižší aktivitu extracelulárních proteáz (Ruchel et al., 1986; Trofa et al., 2008). V genomu *C. parapsilosis* byly identifikovány tři geny pro SAP: *SAPP1*, *SAPP2* a *SAPP3*. Doposud nejvíce prostudovaný je *SAPP1* a jeho produkt Sapp1p, který má vyšší katalytickou účinnost a při indukci alternativním zdrojem dusíku může v kultivačním médiu nabývat až o dva řády vyšší koncentrace než ostatní Sapp (Trofa et al., 2008; Hrušková-Heidingsfeldová et al., 2009; Dostál, et al., 2009). Proteáza Sapp1p je kódovaná v podobě proenzymu (obr. 9.) (Dostál et al., 2006).

Výsledkem srovnání sekvence Sapp1p izolované z kmene CP69 (Dostál et al., 2009) se sekvencemi publikovanými v databázi NCBI (P32951, de Viragh et al., 1993) bylo nalezení rozdílných reziduí aminokyselin. Záměna Pro196 za Ala a delece Tyr mezi aminokyselinami 312 a 313. Následně byla na proteinové úrovni objevena záměna Leu193 za Ser způsobená rozdílným čtením CUG kodonu. Ser193 a Ala196 se nachází v těsné blízkosti uvnitř krátké smyčky mezi  $\beta$ -listy s označením S12 a S13 (obr. 8.). Usoudili jsme, že by záměna Pro196 za Ala mohla být výsledkem přizpůsobení se na změnu vyvolanou náhradou hydrofobního leucinu za polární serin v důsledku nestandardního kódování CUG.

**A**



**B**



Obr. 8.: Prostorová struktura proteázy Sapp1p

(A) Sapp1p v komplexu s inhibítoem pepstatinem A. (B) Detail smyčky s Ala196 a Ser193 (Převzato a upraveno podle Dostál et al., 2009)

MVAIVTLTRQ VLLTIALALF AQGAAIPEEA AKRDDNPGFV ALDFDVLRRK LNLTEALLRE

8 18 28 38 48 58  
KRDSISLSLI NEGPSYASKV SVGSNKQQQT VIIDTGS SDF WVVD SNAQCG KGVDC KSSGT

68 78 88 98 108 118  
FTPSSSSSYK NLGAAFTIRY GDGSTSQGTW GKDTVTINGV SITGQOIADV TQTSVDQGIL

128 138 148 158 168 178  
GIGYTSNEAV YDTSGRQTTP NYDNVPVTLK KQ GKIRTNAY SLYLN SPSAE TGTIIFGGVD

188 198 208 218 228 238  
NAKYSGLVA EQVTS S Q E L T ISLASVNLKG SSFSFGDGAL L D S G T T L T Y F PSDFAAQLAD

248 258 268 278 288 298  
KAGARLVQVA RDQYLYFIDC NTDTSGTTVF NFGNGAKITV PNTEYVYQNG DGTCLWGIQP

308 318 328 338  
SDDTILGDNF LRHAYYLLYN LDANTISIAQ VKYTTDSSIS AV

Signální peptid

Propeptid

Aktivní místa

Ser193, Pro196

Obr. 9.: Aminokyselinová sekvence pre-pro-Sapp1p

Proteáza *C. parapsilosis* je kódovaná jako **proenzym**. Na obrázku jsou vyznačené úseky pro signální peptid, propeptid, aktivní místo, serin v pozici 193 přeložený z CUG kodonu a prolin v pozici 196. Délka: 402 aa (databáze UniProt: P32951). Přesná hranice mezi signálním peptidem a propeptidem není zcela známa.

Molekulová hmotnost maturní proteázy Sapp1p je 36 kDa, molekulová hmotnost pre-pro-Sapp1p je 42,8 kDa a molekulová hmotnost pro-Sapp1p, jejíž kódující sekvence je vložena do expresního vektoru, je 39,4 kDa.

## 11.3. Materiály a metody

### Mikroorganismy a růstové podmínky

V experimentální práci byl použit kmen BL21(DE3) bakterie *Escherichia coli*, který byl skladován v glycerolu při -70 °C.

#### **Složení kultivačních médií bylo následující:**

- Médium pro kultivaci *E. coli*:

Bakteriální živné médium LB od firmy HiMedia (Mumbai, India) 2%,

- Agarové plotny s ampicilinem pro selektivní růst *E.coli*:

Bakteriální živné médium LB od firmy HiMedia (Mumbai, India) 2%, obohacené o ampicilin (100 µg/ml), agar (Himedia, Indie) 2%

### Expres a purifikace proteázy

#### **Používané přístroje:**

Rotační třepačka (Brunswick-Innova 4300)

Centrifugy (Sigma 1 K15, Heraeus Multifuge 3)

Vybavení pro SDS-PAGE (Bio-Rad)

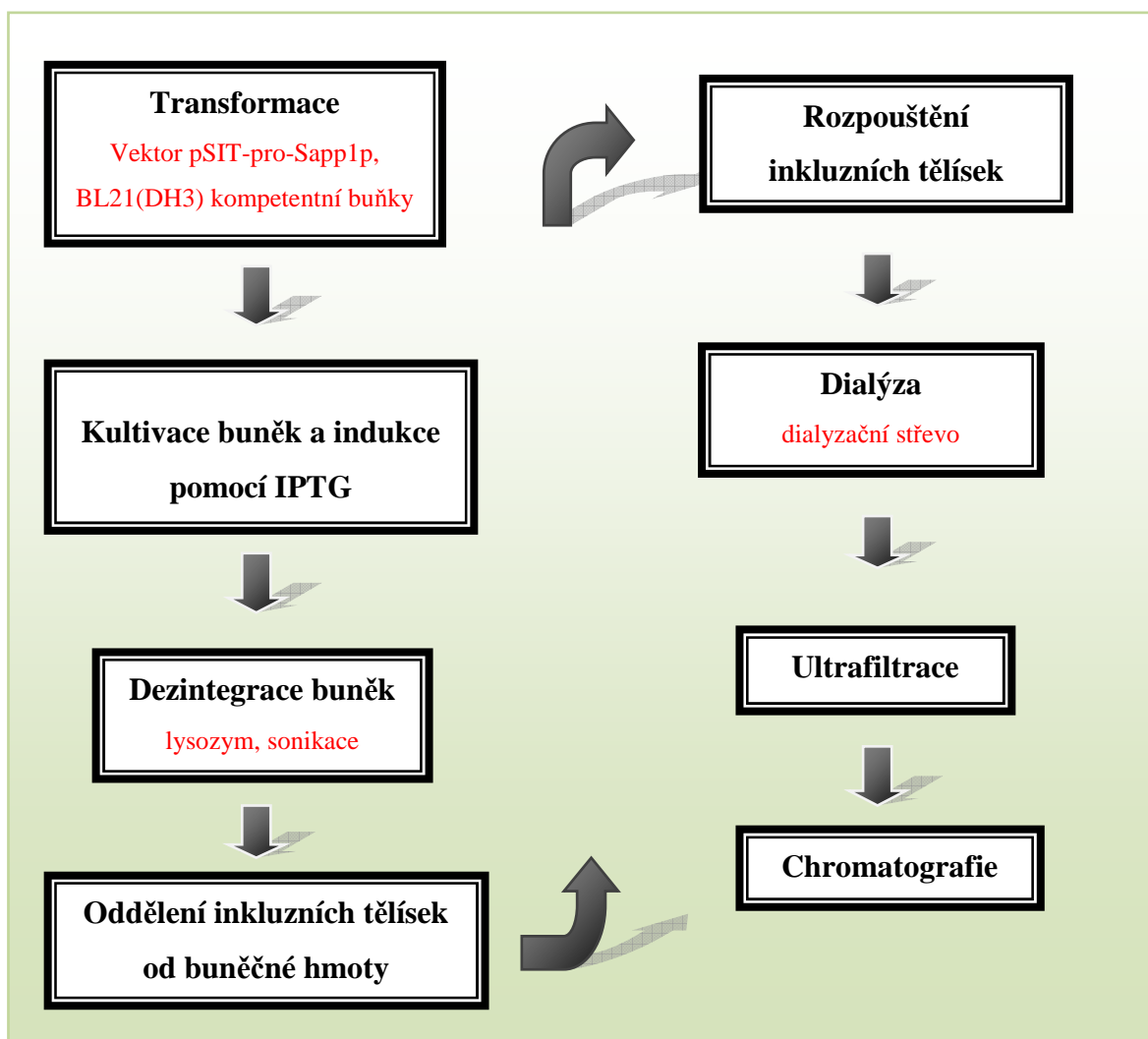
Spektrofotometry (UNICAM HELIOS α, Aminco DW 2000)

Termostat (Thermomix BM)

Sonikátor (Soniprep 150)

Chromatograf (Äkta purifier)

Expresní vektor pro transformaci **pSIT-pro-SAPP1** obsahující sekvenci pro-Sapp1p pocházel od Ing. Jiřího Dostála, PhD, ÚOCHB, AV ČR, v.v.i., Flemingovo náměstí 2, 166 10 Praha 6. Připraven byl podle Dostál et al., 2005.



Obr. 10.: Základní schéma jednotlivých kroků exprese a purifikace pro-Sapp1p

### Trasformace

5  $\mu$ l zásobního roztoku vektoru pSIT-pro-Sapp1p o koncentraci 5 mM bylo smícháno s kompetentními buňkami *E. coli*, kmen BL21(DH3). Inkubace probíhala na ledu po dobu 30 minut. Následoval teplotní šok ve vodní lázni o teplotě 42 °C po dobu 2 minut. Poté bylo k buňkám sterilně přidáno 800  $\mu$ l LB média a směs byla ponechána 1 hodinu v termostatu při 37 °C. Z inokula bylo odebráno 2x po 400  $\mu$ l a vyseto na 2 agarové plotny s ampicilinem. Plotny byly kultivovány přes noc v termostatu při 37°C. Kolonie, které na plotnách vyrostly, obsahovaly vektor pSIT-pro-Sapp1p, protože jeho součástí je selekční marker-rezistence proti ampicilinu.

## **Kultivace a indukce bakteriálních buněk, separace a rozpouštění inkluzních tělísek**

Koloniemi ze dvou agarových ploten s ampicilinem bylo zaočkováno tekuté médium (médium po 500 ml ve 4 dvoulitrových Erlenmeyerových baňkách). Kultivace probíhala na rotační třepačce při 200 rpm a teplotě 37°C až do doby, kdy optická hustota kultury dosáhla hodnoty OD 0,9 (cca půl dne). Při této optické denzitě bylo médium indukováno pomocí IPTG (0,4 mM). Optická hustota (OD) buněk byla sledována spektrofotometricky při vlnové délce 580 nm. 4 hodiny po indukci byly buňky z média odděleny centrifugací (15 000 g, 15 min, 4 °C) a vzniklá peleta byla resuspendována v 50 ml TN pufru (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4). Kvůli rozrušení bakteriální buněčné stěny byl k suspenzi přidán lysozym (1mg/g biomasy) a po smíchání byl roztok uložen do -20 °C. Po rozmrazení byla viskózní suspenze pro vyšší účinnost rozbití buněk podrobena ještě sonikaci ultrazvukem. Vniklá směs byla centrifugována (9000 g, 4 °C, 10 min). Výsledkem centrifugace vzorku byla peleta obsahující inkluzní tělíška. Tento sediment byl 3x promyt 50 ml promývacího pufru (100 mM Tris-HCl, 2 M urea, 5 mM EDTA, 2% Triton, pH 7,0) a centrifugován (9000 g, 10 min, 4 °C). Výsledná peleta byla rozpuštěna přidáváním rozpouštěcího pufru (50 mM Tris-HCl, 8 M urea, 1 mM glycin, 1 mM EDTA, 100 mM mercaptoethanol, pH 8,0) až do doby, kdy se mléčná suspenze proměnila v čirý roztok se zbytky sraženého proteinu. Sraženina obsahovala nežádoucí znečištění (precipitované proteiny) a byla odstraněna centrifugací (9000 g, 10 min, 4 °C). Denaturovaný protein (vlivem 8 M močoviny) v roztoku byl dále dialyzován.

### **Dialýza v gradientu močoviny**

Roztok byl vpraven do dialyzačního střevo (SpectraPor, dělicí rozsah 6-8 kDa) a umístěn do nádoby s pufrům o nízké iontové síle (0,1 M tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,2). Metodou dialýzy přes dialyzační střevo byl roztok zbaven nízkomolekulárních látek (např. solí). Při dialýze v gradientu močoviny docházelo zároveň k postupné renaturaci proteinu. Intervaly mezi jednotlivými kroky byly 12 hodin.

Gradient pufrů byl následující:

1. 8 M močovina, 0,1 M tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,2
2. 4 M močovina, 0,1 M tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,2
3. 2 M močovina, 0,1 M tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,2
4. 0 M močovina, 0,1 M tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,2

## **Zahuštění dialyzovaného roztoku pro chromatografii**

Jelikož v předešlém kroku purifikace došlo k naředění roztoku, bylo potřeba pro získání co nejkonzentrovějšího roztoku s pro-Sapp1p dialyzovaný roztok zbavit přebytečné vody (objem vzorku je limitujícím faktorem navazující gelové chromatografie). K tomuto účelu byla použita cela s ultrafiltrační membránou (AMICON Ultra-30), která nepropouští částice s větší molekulovou hmotností než 30 kDa. Vzorky byly centrifugovány (4 000 g, cca 4x po dobu 20 min z objemu přibližně 40 ml na 5 ml). Takto připravený supernatant obsahoval ještě značný podíl znečišťujících látek, hlavně proteiny o vyšší molekulové hmotnosti než je pro-Sapp1p, proto následoval další čistící krok - gelová chromatografie.

## **FPLC Chromatografie**

Závěrečným krokem purifikace byla FPLC (**f**ast **p**rotein **l**iquid **c**hromatography) gelová chromatografie. K separaci byla použita kolona SE-Sephadex C50 o délce 120 cm, která byla ekvilibrovaná ekvilibračním pufrém (0,1 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,2). Průtok kolony byl nastaven na 1 ml/min a jednotlivé frakce byly odebírány po 5 ml (zkumavky s frakcemi byly očíslovány v pořadí odběru čísly 1-7).

## **SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS PAGE)**

Pro sledování efektivity purifikace byla využita SDS elektroforéza, která byla sestavena podle Laemliho diskontinuálního systému s 5% zaostřovacím a 12% separačním gelem. Napětí v celém průběhu elektroforézy bylo 200 V. Vzorky pro elektroforézu byly smíchány se vzorkovým pufrém v poměru 2:1 (vzorkový pufr: 3 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2 ml glycerolu, 1 ml merkaptoethanolu, 4 ml 10% SDS a 0,5 ml 0,1% bromfenolové modři) a poté denaturovány povařením ve vodě po dobu 5 minut. K určení molekulové hmotnosti byl použit standard Kaleidoscope<sup>TM</sup> od firmy BIO-RAD.

Objem nanášených vzorků s přihlédnutím k očekávané koncentraci výsledného pro-Sapp1p:

1. Buněčná suspenze před indukcí IPTG – 1  $\mu$ l
2. Buněčná suspenze po indukcii IPTG – 1  $\mu$ l
3. Inkluzní tělíška před dialýzou v 8 M močovíně – 5  $\mu$ l
4. Inkluzní tělíška po dialýze – 5  $\mu$ l
5. Vzorky po chromatografii – 10  $\mu$ l

6. Standard – 2  $\mu$ l

**Vizualizace vzorků – barvení gelu z SDS-PAGE stříbrem:**

1. 60 min v roztoku 12%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 50%  $\text{CH}_3\text{OH}$
2. 3 x 15 min v roztoku 50%  $\text{CH}_3\text{OH}$
3. 1 min v  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0,2g/l)
4. 2 x promýt v  $\text{H}_2\text{O}$
5. 20 min v  $\text{AgNO}_3$  (2g/l)
6. 2 x promýt v  $\text{H}_2\text{O}$
7. V roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (60g/l),  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (4mg/l), 37%  $\text{HCHO}$  (0,5ml/l) do vybarvení gelu
8. 2 x promýt v  $\text{H}_2\text{O}$
9. 10 min v roztoku 12%  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 50%  $\text{CH}_3\text{OH}$
10. 30 min v 50%  $\text{CH}_3\text{OH}$

Gel byl vysušen pomocí sušícího roztoku (25% ethanol, 3% glycerol) a celofánu.

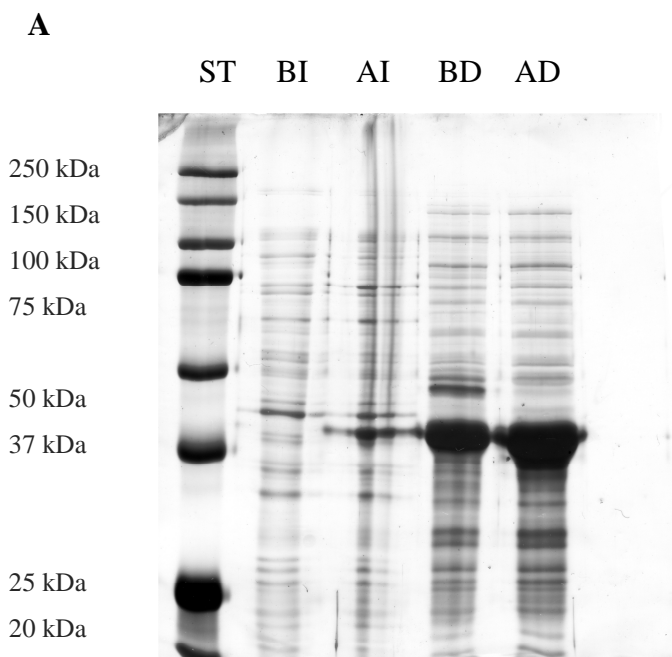
**Stanovení koncentrace bílkovin podle Bradfordové**

Na mikrotitrační destičku bylo naneseno po 20  $\mu$ l slepého vzorku (pouze s  $\text{H}_2\text{O}$ ), kalibračních vzorků ředěním standardního roztoku BSA o koncentraci 1mg/ml a sledovaných vzorků. Do jamek bylo posléze přidáno ke každému vzorku po 250  $\mu$ l činidla Bradfordové – BRČ (100 mg Coomassie brilliant blue G-250, 50 ml 95% etanolu, 100 ml 85% kyseliny fosforečné, 850 ml deionizované vody). BRČ vytváří s bílkovinami barevný komplex, který se kvantifikuje spektrofotometricky při vlnové délce 595 nm proti slepému vzorku. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí kalibrační křivky.



## 11.4. Výsledky

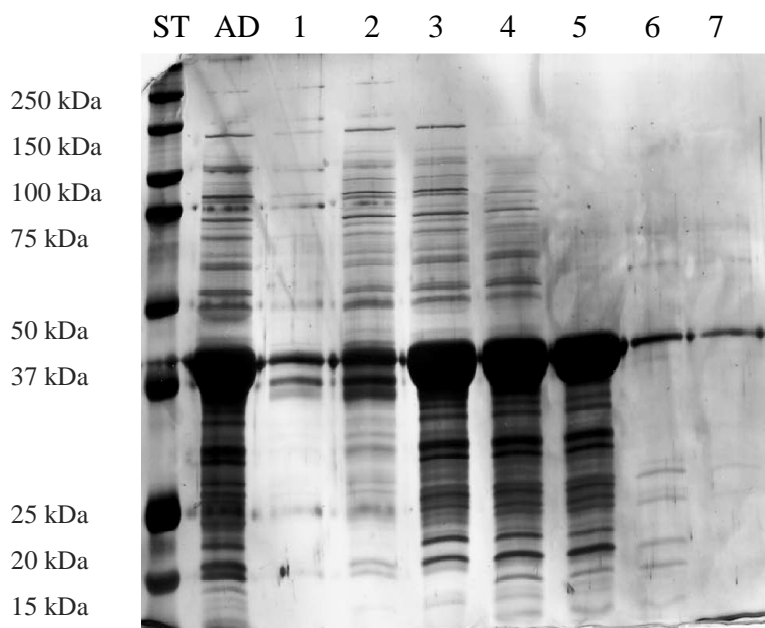
Jednotlivé kroky purifikace pro-Sapp1p byly sledovány pomocí SDS-PAGE. Na gelu je patrné postupné zvyšování koncentrace výsledného pro-Sapp1p na úkor znečišťujících složek v procesu purifikace (viz obr. 11. A, B).



Obr. 11.: 12 % SDS PAGE gel barvený stříbrem

**A.** Na gelu jsou v pořadí zleva: (ST) Standard, (BI) Buňky před indukcí IPTG, (AI) Buňky po indukcí IPTG, (BD) Inkluzní tělíčka v 8M močovíně před dialýzou, (AD) Inkluzní tělíčka po dialýze.

## B



Obr. 11.: 12 % SDS PAGE gel barvený stříbrem

**B.** Na gelu jsou v pořadí zleva: (ST) Standard, (AD) Inkluzní tělíska po dialýze, (1-7) Frakce z chromatografie

### **Naměřené koncentrace proteinu po chromatografii:**

Zkumavka 1.: 0,02 mg/ml

Zkumavka 2.: 1,00 mg/ml

Zkumavka 3.: 0,35 mg/ml

Zkumavka 4.: 0,79 mg/ml

Zkumavka 5.: 0,60 mg/ml

Zkumavka 6.: 0,04 mg/ml

Zkumavka 7.: 0,03 mg/ml

Výsledkem mé experimentální práce je purifikovaný prekurzor proteázy Sapp1p v páté frakci chromatografie (viz obr. 11.). Koncentrace výsledného pro-Sapp1p je 0,60 mg/ml. Celkový výtěžek purifikované proteázy činí 3 mg. Tato hodnota je dostačující pro účely navazující diplomové práce.

## 12. Závěr

Současné evoluční studie se snaží objasnit evoluci nestandardního překladu CUG pomocí kombinací dvou evolučních mechanismů. Přesto stále není známý molekulární mechanismus, který by vedl postupně ke změně překladu CUG kodonu a přitom nesnížil fitness kvasinek. Konkrétní možné evoluční výhody této změny se věnovalo prozatím jen pár studií. Adaptivní výhodou přinášející užitek z dvojnásobného překladu CUG kodonu byla shledána možnost kvasinek účinněji bojovat se stresovými podmínkami navozenými vyšší teplotou. Není ale zcela jasné, jak byla dvojnásobnost CUG kodonu udržována po milióny let. Proč nebyla např. nahrazena alternativním, méně škodlivým mechanismem, jež využívají jiné termotolerantní kvasinky?

U druhu *C. cylindracea* byla zjištěna poměrně vysoká frekvence výskytu CUG kodonu (33,5 % ze všech možných leucinových kodonů). Tato vysoká frekvence výskytu CUG kodonu byla zřejmě umožněna záměnou nukleotidu m1G za A37 ve struktuře ser-tRNA<sub>CAG</sub>, což vedlo k tomu, že ser-tRNA<sub>CAG</sub> je kompletně aminoacylována pouze serinem. Tím byl negativní efekt dvojnásobného překladu u tohoto druhu kvasinky potlačen. U ostatních druhů kandid je frekvence výskytu jak CUG kodonu, tak ser-tRNA<sub>CAG</sub> velmi nízká. U *C. albicans* většina původních leucinových CUG (99,8 %) z genomu vymizela a nahradila místa, kam serin opravdu patří.

Důležitým aspektem je velmi nestabilní proteom za posledních 270 miliónů let. Jak původní CUG kodony pro leucin, tak i nově vzniklé CUG kodony pro serin jsou do dneška u většiny kandid překládány dvojnásobně. Tato nestabilita nese pravděpodobně významný podíl na změnách fenotypu kvasinky, protože záměna hydrofobního leucinu za polární serin se nedá považovat za konzervativní záměnu.

### 13. Použitá literatura

- Bednář**, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra J. (1996). Lékařská mikrobiologie. *Marvil*, Praha
- Beier**, H. and Grimm, M. (2001). Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs. *Nucleotid Acid Research*. 29: 4767-4782.
- Björk**, GR., Ericson, JU., Gustafsson, CE., Hagervall, TG., Jönsson, YH., Wikström, PM. (1987). Transfer RNA modification. *Annu Rev. Biochem.* 56:263-87.
- Breitschopf**, K., Gross, H. J. (1994). The exchange of the discriminator base A73 for G is alone sufficient to convert human tRNA<sup>Leu</sup> into a serine acceptor *in vitro*. *EMBO Journal*. 13: 3166-3169.
- Butler**, G., Rasmussen, M. D., Lin, M. F., Santos, M. A., Sakthikumar, S., Munro, C. A., Rheinbay, E., Grabherr, M., Forche, A., Reedy, J.L., Agrafioti, I., Arnaud, M. B., Bates, S., Brown, A. J., Brunke, S., Costanzo, M. C., Fitzpatrick, D. A., de Groot, P. W., Harris, D., Hoyer, LL, Hube B, Klis FM, Kodira C, Lennard N, Logue ME, Martin R, Neiman AM, Nikolaou E, Quail M. A., Quinn, J., Santos, M. C., Schmitzberger, F. F., Sherlock, G., Shah, P., Silverstein, K. A., Skrzypek, M. S., Soll, D., Staggs, R., Stansfield, I., Stumpf, M. P., Sudbery, P. E., Srikantha, T., Zeng, Q., Berman, J., Berriman, M., Heitman, J., Gow, N. A., Lorenz, M. C., Birren, B. W., Kellis, M., Cuomo, C. A. (2009). Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*. 459(7247): 657-62.
- Calderone**, R. A. (2002). *Candida* and candidiasis. *ASM Press*, Washington, DC
- Crick**, F. H. C. (1966). Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* 19: 548-555.
- Crick**, F. H. C. (1968). The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.* 38: 367-379.
- Dostál**, J., Brynda, J., Hrušková-Heidingsfeldová, O., Siegllová, I., Pichová, I., Řezáčová, P. (2009). The crystal structure of the secreted aspartic protease 1 from *Candida parapsilosis* in complex with pepstatin A. *Journal of Structural Biology*. 167: 145-152.
- Dostál**, J., Dlouhá, H., Maloň, P., Pichová, I. and Hrušková-Heidingsfeldová O. (2005). The precursor of secreted aspartic proteinase Sapp1p from *Candida parapsilosis* can be activated both autocatalytically and by a membrane-bound processing proteinase. *Biol. Chem.* 386: 791-799.

- Dirheimer, G., Keith, G., Dumas, P., and Westhof, E. (1995).** Primary, secondary and tertiary structures of tRNAs: v *tRNA: Structure, Biosynthesis and Function* (Söll, RajBhandary, Eds.), American Society of Microbiology, Washington, DC
- Garcia-Effron, G., Katiyar, S. K., Park, S., Edlind, T. D., Perlin, D. S. (2008).** A naturally occurring proline-to-alanine amino acid change in Fks1p in *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* accounts for reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(7):2305-2312.
- Haynes, K. (2001).** Virulence in *Candida* species. *TRENDS in Microbiology.* 9(12): 591-596.
- Hershberg, R., Petrov, D. A. (2009).** General Rules for Optimal Codon Choice. *PloS Genetics.* 5(7): 1-10.
- Hrušková-Heidingsfeldová, O. (2008).** Secreted proteins of *Candida albicans*. *Frontiers in Bioscience.* 13: 7227-7242.
- Hrušková-Heidingsfeldová, O., Dostál, J., Majer, F., Havlíková, J., Hradilek, M., and Pichová, I. (2009).** Two aspartic proteinases secreted by the pathogenic yeast *Candida parapsilosis* differ in expression pattern and catalytic properties. *Biol. Chem.* 390: 259-268.
- Ikemura, T. (1985).** Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol. Biol. Evolution.* 2: 13-34.
- Kawaguchi, Y., Honda, H., Taniguchi-Morimura, J., Iwasaki, S. (1989).** The codon CUG is read as serine in an asporogenic yeast *Candida cylindracea*. *Nature.* 341: 164-166.
- Lass-Flörl, C. (2009).** The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses.* 52: (197-205).
- Massey, S. E., Moura, G., Beltrão, P., Almeida, R., Garey, J. R., Tuite, M. F., and Santos, M. A. S. (2003).** Comparative Evolutionary Genomics Unveils the Molecular Mechanism of Reassignment of the CTG Codon in *Candida* spp. *Genom Research.* 13: 544-557.
- Monod, M., G. Togni, B. Hube, and D. Sanglard. (1994).** Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Molecular Microbiol.* 13: 357-368.
- Miranda, I., Silva, R., and Santos, M. A. S. (2006).** Evolution of the genetic code in yeasts. *Yeast.* 23: 203-213.
- Moura, G., Miranda, I., Cheesman, C., Tuite, M. F., and Santos, M. A. (2002).** Stop codon decoding in *Candida albicans*: from non-standard back to standard. *Yeast.* 19: 727-733.

- Naglik, J. R., Challacombe, S. J., Hube, B. (2003).** *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(3): 400-428.
- Perreau, V. M., Keith, G., Holmes, W. M., Przykorska, A., Santos, M. A. S., and Tuite, M. F. (1999).** The *Candida albicans* CUG-Decoding ser-tRNA has an Atypical Anticodon Stem-Loop Structure. *J. Mol. Biol.* 293: 1039-1053.
- Pesole, G., Lotti, M., Alberghina, L., and Saccone, C. (1995).** Evolutionary origin of non-universal CUG<sup>Ser</sup> codon in some *Candida* species as inferred from molecular phylogeny. *Genetics*. 141: 903-907.
- Ogrydziak, D. M. (1993).** Yeast extracellular proteases. *Crit. Rev. Biotechnol.* 13: 1-55
- Ohama, T., Suzuki, T., Mori, M., Osawa, S., Ueda, T., Watanabe, K., and Nakase, T. (1993).** Non-universal decoding of the leucine codon CUG in several *Candida* species. *Nucleic Acid Research*. 21: 4039-4045.
- Osawa, S., Jukes, T. H., Watanabe, K., and Muto, A. (1992).** Recent Evidence for Evolution of the Genetic Code. *Microbiological Reviews*. 56(1): 229-264.
- Ruchel, R., Boning, B., and Borg, M. (1986).** Characterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of the enzyme during infection *in vitro*. *Infect. Immun.* 53: 411-419.
- Santos, M. A., Cheesman, C., Costa, V., Moradas-Ferreira, P., Tuite, M. F. (1999).** Selective advantages created by codon ambiguity allowed for the evolution of an alternative genetic code in *Candida* spp. *Mol Microbiol.* 31(3): 937-947.
- Santos, M. A., Keith, G., and Tuite, M. F. (1993).** Non-standard translational events in *Candida albicans* mediated by an unusual seryl-tRNA with a 5'-CAG-3' (leucine) anticodon. *The EMBO Journal*. 12(2): 607-616.
- Santos, M. A. S., Moura, G., Massey, S. E., and Tuite, M. F. (2004).** Driving change: the evolution of alternative genetic codes. *TRENDS in Genetics*. 20(2): 95-102.
- Santos, M. A. S., Perreau, V. M., and Tuite, M. F. (1996).** Transfer RNA structural change is a key element in the reassignment of the CUG codon in *Candida albicans*. *The EMBO Journal*. 15(18): 5060-5068.
- Santos, M. A. S., and Tuite, M. F. (1995).** The CUG codon is decoded *in vivo* as serine and not leucine in *Candida albicans*. *Nucleotid Acids Research*. 23(9): 1481-1486.

- Santos, M. A. S., Ueda, T., Watanabe, K., Tuite, M. F. (1997).** The non-standard genetic code of *Candida* spp.: an evolving genetic code or novel mechanism for adaptation? *Mol Microbiol.* 26(3): 423-431.
- Schultz, D. W., and Yarus, M. (1994).** Transfer RNA Mutation and the Malleability of the Genetic Code. *J. Mol. Biol.* 235: 1377-1380.
- Sengupta, S., and Higgs, P. G. (2005).** A Unified Model of Codon Reassignment in Alternative Genetic Codes. *Genetics.* 170: 831-840.
- Suzuki, T., Ueda, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., and Watanabe, K. (1994).** Characterization of serine and leucine tRNAs in an asporogenic yeast *Candida cylindracea* and evolutionary implications of genes for tRNA<sup>Ser</sup>CAG responsible for translation of a non-universal genetic code. *Nucleotid Acids Research.* 22(2): 115-123.
- Tavanti, A., Davison, A. D., Gow, N. A., Maiden, M. C., and Odds, F. C. (2005).** *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* spp. nov. to replace *C. parapsilosis* groups II and III. *Journal Clinical Microbiology.* 43: 284-292.
- Trofa, D., Gácsér, A., and Nosanchuk, J. D. (2008).** *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews.* 21(4): 606-625.
- Tuite, M. F., Santos, M. A. (1996).** Codon reassignment in *Candida* species: An evolutionary conundrum. *Biochimie.* 78: 993-999.
- de Viragh, P. A., D. Sanglard, G. Togni, R. Falchetto, and M. Monod. (1993).** Cloning and sequencing of two *Candida parapsilosis* genes encoding acid proteases. *J. Gen. Microbiol.* 139: 335-342.
- Weig, M., and Brown, A. J. P. (2007).** Genomics and the development of new diagnostics and anti- *Candida* drugs. *TRENDS in Genetics.* 15(7): 300-317.

**Internetové stránky:**

<http://www.sanger.ac.uk/sequencing/Candida/parapsilosis/>